

ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH

ČAS. LÉK. ČES., 148
2009, č. 12, s. 581–668
CLC EAL 148 (12)
581–688 (2009)

INDEXED IN:
EMBASE/Excerpta Medica
MEDLINE/Index Medicus
INIS Atomindex
CHEMICAL ABSTRACTS
Excerptováno v Bibliographia
Medica Českoslovacca, Scopus

ROČNÍK 148/2009, č. 12

VEDOUcí REDAKTOR

Prof. MUDr. Jiří Horák, CSc.
I. interní klinika 3. LF UK a FNKV
Šrobárova 50, 100 34 Praha 10

REDAKČNÍ RADA

Prof. MUDr. Pavel Barták, CSc.
Dermatovenerologická klinika 3. LF UK a FNKV
Šrobárova 50, 100 00 Praha 10

Prof. MUDr. Jaroslav Blahoš, DrSc.
ČLS JEP
Sokolská 31, 120 26 Praha 2

Prof. MUDr. Radim Brdička, DrSc.
Ústav hematologie a krevní transfuze
U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2

Doc. MUDr. Petr Čáp, PhD.
Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie
Nemocnice Na Homolce
Rentgenova 2, 150 30 Praha 5

Prof. MUDr. Jan Dvořáček, DrSc.
Urologická klinika 1. LF UK a VFN
Ke Karlovu 6, 128 00 Praha 2

MUDr. Norbert Gaier, CSc.
Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN
Albertov 4, 128 00 Praha 2

Doc. MUDr. Jozef Glasa, CSc.
Národné referenčné centrum pre manažment
a liečbu chronických hepatitíd
Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovenská republika

Prof. MUDr. Miloš Hájek, DrSc.
Chirurgická klinika ÚVN
U Vojenské nemocnice 1/200, 169 02 Praha 6

Pavel Hamet, M.D., PhD.
Centre hospitalier de l'université de Montreal
Hotel Dieu, 3840, rue Saint-Urban
Montreal (Québec) H2W 1T8, Canada

Prof. MUDr. Jan Holčík, DrSc.
Ústav sociálního lékařství LF MU
Komenského nám. 2, 662 43 Brno

Prof. MUDr. Zbyněk Hrnčíř, DrSc.
II. interní klinika LF UK a FN
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

Prof. MUDr. Ivan Hulín, DrSc.
Ústav patologickej fyziológie LF UK
Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika

MUDr. Pavel Jerie
Leymenstrasse 49
4153 Reinach, BL 1
Švýcarsko

Doc. MUDr. Lubomír Kukla, CSc.
Oddělení preventivní a sociální pediatrie LF MU
Bieblova 16, 613 00 Brno

Doc. MUDr. Jaroslav Lindner, CSc.
II. chirurgická klinika kardiovaskulární chirurgie
1. LF UK a VFN
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

Doc. MUDr. Pavel Mohr, Ph.D.
Psychiatrické centrum Praha
Ústavní 91/7, 181 02 Praha-Bohnice

Prof. MUDr. Jan Petrášek, DrSc. – čestný člen
redakční rady
III. interní klinika 1. LF UK a VFN
U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2

Prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.
Onkologická klinika 1. LF UK a VFN
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

Prof. PhDr. Milada Říhová, CSc.
Ústav dějin lékařství a cizích jazyků 1. LF UK
Karlovo náměstí 40, 120 00 Praha 2

Prof. Alexander Schirger, M.D.
Mayo Clinic, Hypertension W-9
Rochester, Minnesota 55905, USA

Prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.
III. interní klinika 1. LF UK a VFN
U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2

Prof. MUDr. Eduard Zvěřina, DrSc.
Klinika ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Prof. MUDr. Aleš Žák, DrSc.
IV. interní klinika 1. LF UK a VFN
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

KONZULTANTI

Prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.
1. interní klinika 1. LF UK a VFN
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

Prof. MUDr. Evžen Růžička, DrSc.
Neurologická klinika 1. LF UK a VFN
Kateřinská 30, 120 21 Praha 2

Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.
Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN
Ke Karlovu 2, 121 09 Praha 2

OBSAH

Úvodník <i>Eckschlagler T, Průcha M.</i> Průtoková cytometrie a její využití . . . 583	<i>Raška I.</i> Surveillance a budoucnost epidemiologie (Praha, 11. listopadu 2009) . . . 652
Přehledový článek <i>Bartůňková S.</i> Děti v ohrožení metabolickým syndromem . . . 584	Sjezdy <i>Grozda P.</i> XXV. lékárnické dny (Litoměřice, 3.–5. října 2009) . . . 658 <i>Šlapák I.</i> VII. Ningerovy dny (Luhačovice, 9.–10. října 2009) . . 658 <i>Donát J.</i> Současný stav hormonální terapie patologií menopauzy (10. konference ČMAS ČLS JEP a SOM ČGPS ČLS JEP, 16.–18. října 2009) . . . 659
Původní práce <i>Vašatová M, Tichý M, Horáček JM, Pudil R, Horáková L, Palička V.</i> Multianalytový přístup k diagnostice srdečních chorob technologií proteinových biočipů . . . 591	Zprávy . . . 590, 661 Knihy . . . 665
Speciální sdělení <i>Cevela R, Čeledová L, Bělohávková J.</i> Posuzování zdravotního stavu a pracovní schopnosti u onemocnění pohybového systému . . . 597 <i>Nešpor K, Scheansová A.</i> Efektivita léčby patologického hráčství – pilotní studie . . . 602	Pokyny pro autory Časopisu lékařů českých . . . 666
Abstrakta <i>Průcha M.</i> Mezinárodní konference Analytical Cytometry V (Olomouc, 5.–8. září 2009) . . . 604	Laureáti Nobelovy ceny <i>Čech P.</i> Georg von Békésy . . . 667

CONTENTS

(No. 12, 3rd December 2009) Journal of Czech Physicians

Editorial <i>Eckschlagler T, Průcha M.</i> Analytical cytometry . . . 583	<i>Raška I.</i> Surveillance and future of epidemiology (Prague, November 11, 2009) . . . 652
Review Article <i>Bartůňková S.</i> Children in the risk of metabolic syndrome . . . 584	Congresses <i>Grozda P.</i> XXVth pharmacists' days (Litoměřice, October 3 to 10, 2009) . . . 658 <i>Šlapák I.</i> VIIth Ninger's days (Luhačovice, October 9 to 10, 2009) . . . 658 <i>Donát J.</i> Present state of hormonal therapy of menopause pathologies (The 10th conference of ČMAS ČLS JEP and SOM ČGPS ČLS JEP, October 16 to 18, 2009) . . . 659
Original Article <i>Vašatová M, Tichý M, Horáček JM, Pudil R, Horáková L, Palička V.</i> Multi-marker approach in the diagnostics of cardiac diseases by protein biochip technology . . . 591	News . . . 590, 661 Books . . . 665
Special Articles <i>Cevela R, Čeledová L, Bělohávková J.</i> Assessment of health state and working capacity of people suffering with locomotive system diseases . . . 597 <i>Nešpor K, Scheansová A.</i> Pathological gambling – a pilot study of treatment effects . . . 602	Instruction to the Authors . . . 666
Abstracts <i>Průcha M.</i> International Conference "Analytical Cytometry V" (Olomouc, September 5–8, 2009) . . . 604	Nobel Prize Laureates <i>Čech P.</i> Georg von Békésy . . . 667

<http://www.cls.cz>

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2009

ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH

Vydává Česká lékařská společnost J. Ev. Purkyně, Sokolská 31, 120 26 Praha 2.
Vedoucí redaktor prof. MUDr. Jiří Horák, CSc. Odpovědná redaktorka Mgr. Helena Glezgová.**Příspěvky do Časopisu lékařů českých procházejí dvojitým recenzním řízením.
Articles published in the Journal of the Czech Physicians subject to double review.**

Tiskne: Tiskárna Prager – LD s.r.o., Kováků 9, 150 00 Praha 5.

Rozšiřuje: V České republice Nakladatelství Olympia, a.s., Praha, do zahraničí (kromě SR) – Myris Trade s.r.o., V Štíhlách 1311/3, P.O. Box 2, 142 01 Praha 4, ve Slovenské republice Mediaprint Kapa Pressegrasso, a.s. oddelenie inej formy predaja - P.O. BOX 183, Vajnorská 137, 831 04 Bratislava, tel.: 02/444 588 21, fax: 02/444 588 19, e-mail: predplatne@abompkapa.sk.

Vychází 12x ročně. Předplatné na rok 1224 Kč (55,32 €), jednotlivé číslo 102 Kč (4,61 €).

Informace o předplatném podává a objednávky českých předplatitelů přijímá: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP,

Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel.: 296 181 805 – Jana Spalová, e-mail: spalova@cls.cz

Informace o podmínkách inzercí poskytuje a objednávky přijímá: Inzertní oddělení ČLS JEP,

tel.: 224 266 253, tel./fax: 224 266 265, e-mail: ntsinzerce@cls.cz

Registrační značka MK ČR E 77.

Rukopisy zasílejte na adresu prof. MUDr. Jiří Horák, CSc., I. interní klinika 3. LF UK a FNKV, Šrobárova 50, 100 34 Praha 10, e-mail: horak@fnkv.cz

Rukopis předán do výroby dne 8. 12. 2009. Zasláné příspěvky se nevracejí, jsou archivovány ČSL JEP.

Vydavatel získá otiskem příspěvku výlučně nakladatelské

právo k jejich užití. Otištěné příspěvky autorů nejsou honorovány, autoři obdrží bezplatně jeden výtisk časopisu,

Vydavatel a redakční rada upozorňují, že za obsah

a jazykové zpracování inzerátů a reklam odpovídá výhradně inzerent.

Žádná část tohoto časopisu nesmí být kopírována a rozmnožována za účelem dalšího rozšiřování

v jakémkoliv formě či jakýmkoliv způsobem, ať již mechanickým či elektronickým včetně pořizování fotokopíí, nahrávek, informačních databází na mechanických nosičích, bez písemného souhlasu vlastníka autorských práv a vydavatelského oprávnění.

Úvodník

Průtoková cytometrie a její využití**Eckschlager T, Průcha M.**Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Klinika dětské onkologie FN Motol, Praha
Nemocnice Na Homolce Praha, Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie

Součástí tohoto čísla Časopisu lékařů českých jsou zpráva a souhrny z konference „Analytická cytometrie V“, která se ve dnech 5.–8. září 2009 konala v Olomouci v Uměleckém centru Univerzity Palackého a byla zaměřena na problematiku metod optického vyšetřování buněk, zvláště pak průtokové cytometrie.

Průtoková cytometrie je laboratorní metoda umožňující měření fyzikálních a chemických vlastností buňky při průchodu laserovým paprskem. V současné době je to standardní metoda k analýze buněk (částic) v suspenzi. Tato metoda našla největší uplatnění v medicíně a v biologii. Významná část klinických aplikací je založena na tzv. imunofenotypizaci, průkazu antigenů – (CD znaků – cluster of differentiation), které charakterizují jednotlivé buněčné subpopulace. Principem je reakce antigen-protilátka a vizualizace protilátky značením pomocí barviva – fluoroforem. Z dalších klinicky významných aplikací je to měření obsahu DNA v buňkách (cytometrická DNA analýza umožňující hodnocení ploidie a kinetiky buněčného cyklu), stanovení koncentrace a aktivity některých enzymů v buňkách, hodnocení vnitřního prostředí buněk (pH, hladiny intracelulárního kalcia), posuzování průniku některých léků do buněk (adriamycin, ellipticin), průkaz fetomaternální transfuze, kontrola transfuzních přípravků (kontaminace leukocyty) a měření retikulocytů. V oblasti alergologie metoda umožňuje vyšetřování přecitlivělosti na antibiotika, potraviny a hmyzí jedy. K dalším aplikacím patří průkaz HLA-B27 antigenu u revmatických chorob, vyšetření LDL receptorů na monocytech u familiární hypercholesterolemie, stanovení autoprotiátěk proti trombocytům a proti HLA antigenům v transplantaci medicíně. V současnosti jsou již dostupné metody multiplexové analýzy umožňující současné měření mnoha sérových proteinů. Výhodou takového přístupu je úspora biologického materiálu, úspora časová i finanční. Vyšetření průtokovým cytometrem je rutinní součástí sledování pacientů s AIDS, kdy počet CD4⁺ lymfocytů je základním parametrem pro sledování aktivity onemocnění. Průtokové cytometrie se využívá pro stanovení diagnózy leu-

kémií, lymfomů a některých dalších zhoubných nádorů. Následná terapie těchto onemocnění vychází z přesného imunologického zařazení leukémie nebo lymfomu, které umožňuje nejvhodnější léčebný postup. Metody se využívá ke sledování účinků imunosupresivní léčby po transplantaci solidních orgánů nebo u imunoterapie nádorů.

Velice rozsáhlé je spektrum metodik využitelných v biomedicínském výzkumu. Tam je cytometrie kromě výše uvedených metod často využívána pro detekci různých typů buněčné smrti a viability buněk, měření membránových potenciálů, hodnocení buněčných lipidů, stanovení reaktivních kyslíkových radikálů apod. Průtoková cytometrie slouží k hodnocení funkce lymfocytů (test blastické transformace, produkce cytokinů po stimulaci), granulocytů a monocytů (fagocytární aktivity, produkce kyslíkových radikálů aj.) i NK buněk (cytotoxicita).

Metoda nachází uplatnění i v jiných oborech, než je medicína, například v biologickém výzkumu půdních mikroorganismů, mořského planktonu či rostlin. Pomáhá zde genetikům, fyziologům, šlechtitelům nebo evolučním biologům. Jedním z průkopníků těchto technik v rostlinné biologii je předseda České společnosti pro analytickou cytologii a předseda organizačního výboru konference doc. ing. Jaroslav Doležel, DrSc. z Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky. Ve svém výzkumu využívá cytometrii k analýze a sortování rostlinných chromosomů.

K dalším metodám analytické cytologie patří čipy pro analýzu RNA (expresní čipy) nebo DNA (CGH mikroarray), digitální a konfokální mikroskopie a příbuzné moderní technologie. Tyto, v současnosti velmi intenzivně rozvíjené metody mají své uplatnění dosud převážně ve výzkumu. Lze však předpokládat, že v dohledné době naleznou své místo i v klinické diagnostice.

Souhrny uvedené v tomto čísle Časopisu lékařů českých vám umožní seznámit se s možnostmi těchto metodik a s dalším směřováním klinických a výzkumných aplikací.

Adresy pro korespondenci:

prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.
Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FNM
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5
e-mail: tomas.eckschlager@lfmotol.cuni.cz
MUDr. Miroslav Průcha, Ph.D.
Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Na Homolce
Roentgenova 2, 150 30 Praha 5
e-mail: miroslav.prucha@homolka.cz

Přehledový článek

Děti v ohrožení metabolickým syndromem

Bartůňková S.

Univerzita Karlova v Praze, FTVS, Katedra fyziologie a biochemie

SOUHRN

Celosvětový nárůst obezity v dětském věku alarmoval v posledních několika letech přední vědecké týmy. Rozhodly se hledat příčiny již v prenatálním období, stanovit diagnostická kritéria pro dětský a adolescentní věk a nalézt způsoby jak monitorovat rizika a předcházet manifestaci metabolickému syndromu. Příspěvek je literární rešerší z prestižních lékařských časopisů. Zaměřuje se nejen na problém samotné obezity, ale také na rizikové komplikace, časný vývoj aterosklerózy, zvýšený krevní tlak, inzulinovou rezistenci, jaterní steatózu a spánkové poruchy dýchání.

Klíčová slova: rizika obezity u dětí, metabolický syndrom, prevence a terapie.

SUMMARY

Bartůňková S. Children in the risk of metabolic syndrome

The global increase of children obesity has recently alerted top research teams. They have focused on finding causes present already in the prenatal period, on establishing diagnostic criteria for both childhood and adolescent ages, and on seeking for methods of monitoring risk and preventing metabolic syndrome manifestations. This paper is a literature review from prestigious medical journals that monitor the development of risks from the ontogenetic point of view. The paper deals not only with the issue of obesity itself, but also all risk complications like early atherosclerosis, higher blood pressure, insulin resistance, fatty liver, or sleep respiratory disorders.

Key words: risk of obesity of children, metabolic syndrome, prevention and therapy of obesity.

Ba.

Čas Lék Čes 2009; 148: 584–590

ÚVOD

Obezita se stala veřejným zdravotním problémem. Podle údajů IOTF (International Obesity Task Force) trpí v současné době ve světě 1,1 miliardy dospělých nadváhou a 313 milionů jedinců obezitou. Prevalence obezity se za poslední dvě desetiletí zdvojnásobila až ztrojnásobila, zvýšil se i výskyt jejích komplikací, mezi jinými i tzv. metabolického syndromu (MS). Zatímco metabolický syndrom dospělých je již desítky let pod různými názvy ostře sledován, dětské obezitě a metabolickému syndromu dětí a adolescentů je s ohledem na její nárůst věnována mimořádná pozornost až v posledních letech. Uvádí se, že v rozvinutých zemích došlo ke zvýšení dětské nadváhy a obezity z 12 % nad 30 % a v rozvojových zemích ze 2 % na 12 % (1). Problém se týká překvapivě i některých středomořských regionů. Například v některých částech Itálie dosahuje prevalence nadváhy až 36 % (2). Nárůst prevalence obezity u dětí a dospívajících se zvyšuje paralelně s jejími komplikacemi. Zvýšenou pozornost je třeba věnovat jak dětem, u nichž byla zjištěna rodinná zátěž, hypertenze nebo inzulinová rezistence, tak i těm, jejichž body mass index (BMI) přesáhl 85. percentil, nebo u nichž došlo k rychlému vzestupu hmotnosti (3).

Celosvětovou epidemii obezity považuje Bornstein et al. za

komunikační, společensky nakažlivý projev globalizace, odvíjející se od generalizovaných trendů v životním stylu, stravování a kulturní adaptaci (4). Infekční agens mohou vyvolat obezitu centrálními mechanismy, modulovat adipocytární funkci nebo alespoň přispívat k chronicky zánětlivému prostředí metabolického syndromu. Porozumění obezitě jako globální komunikační poruše by podle autora pomohlo nalézt vhodnější způsoby prevence a léčby.

DĚTSKÁ OBEZITA

Situace v České republice

V naší republice byla zjištěna obezita u 6,6 % chlapců a 5,6 % dívek (5). To znamená, že u nás ještě není situace s obezitou tak závažná jako v některých jiných světových regionech, nicméně rychle se měnící životní styl může vést k urychlení jejího nárůstu. Proto byla v roce 2004 ustanovena Národní rada pro obezitu. Jejím úkolem bylo připravit Národní akční plán proti obezitě, řídící se jak směrnicemi Evropské unie, tak i zkušenostmi zemí, kterým se již podařilo provést některé zákonné úpravy. Předpokládá těsnou spolupráci s rezorty školství, zdravotnictví a Potravinářskou komorou.

Adresa pro korespondenci:

doc. MUDr. Staša Bartůňková, CSc.
Katedra fyziologie a biochemie UK FTVS
Josef Martího 31, 162 52 Praha 6
e-mail: bartunkova@ftvs.cuni.cz

Tab. 1. Hodnocení BMI u různých stupňů dětské obezity v České republice (7)

věk	Chlapci			Dívky		
	obezita: mírná	střední	těžká	mírná	střední	těžká
6,0–6,9	19,6–24,8	24,9–28,8	> 28,8	19,7–24,8	24,9–28,6	> 28,6
7,0–7,9	20,2–25,0	25,1–29,2	> 29,2	20,6–24,6	24,7–28,8	> 28,8
8,0–8,9	21,1–25,3	25,4–30,4	> 30,4	21,5–24,4	24,5–28,8	> 28,8
9,0–9,9	22,2–25,7	25,8–30,5	> 30,5	22,4–25,2	25,3–29,4	> 29,4
10,0–10,9	23,3–26,2	26,3–30,9	> 30,9	23,1–25,7	25,8–30,0	> 30,0
11,0–11,9	24,3–27,0	27,1–32,0	> 32,0	24,2–26,3	26,4–31,4	> 31,4
12,0–12,9	24,8–27,8	27,9–33,3	> 33,3	25,3–27,6	27,7–32,8	> 32,8
13,0–13,9	25,1–28,6	28,7–33,5	> 33,5	25,6–28,9	29,0–34,6	> 34,6
14,0–14,9	25,5–29,3	29,4–34,7	> 34,7	25,5–29,5	29,6–35,0	> 35,0
15,0–15,9	26,2–31,0	31,1–39,6	> 39,6	25,8–29,7	29,8–36,3	> 36,3
16,0–16,9	26,9–32,5	32,6–38,3	> 38,3	27,2–30,2	30,3–37,3	> 37,3
17,0–18,9	27,6–33,5	33,6–40,4	> 40,4	27,3–31,4	31,5–38,1	> 38,1

V roce 2007 byla komisí Evropské unie vydána publikace „White Paper“ věnovaná strategii výživy a boji proti nadváze a obezitě.

Ve stejném roce byla u nás vydána i velice přehledná a obsahově vyčerpávající publikace Pařízkové a spol. věnované této problematice (6).

Celonárodní antropometrická měření mají v České republice dlouhodobou tradici. Vlastní referenční hodnoty naší populace umožňují sledovat i vývojové trendy v našich zemích.

K hodnocení hmotnosti u dětí se využívají nejen speciálně upravené kategorizace hodnot indexu tělesné hmotnosti, BMI vzhledem k věku a pohlaví (tab. 1), ale především růstové (percentilové) grafy a standardizace pomocí z-skóre.

Mezinárodní kritéria nadváhy a obezity

Podle expertů Světové zdravotnické organizace je za **obezitu** v dětském věku považováno **BMI > 97. percentil** pro věk a pohlaví a za **nadváhu BMI** v rozmezí **90–97. percentil** (8–10).

Příčiny

Obezita u dětí může být podmíněná nutričně, geneticky, hormonálně i lékově. Geneticky podmíněná obezita se vyskytuje nejčastěji ve formě polygenní, tzn. při kombinaci určité genetické dispozice a vlivů prostředí, méně často ve formě monogenní, vyvolané mutací jednoho genu. S obezitou jsou spojeny i některé geneticky podmíněné syndromy (11).

Nejčastější formou obezity je však obesitas simplex vyskytující se celosvětově v energeticky nerestriktivním prostředí, tedy při nerovnováze mezi příjmem a výdejem. Ve studiích je proto sledován především životní styl, zohledňuje se nejen porodní hmotnost, délka kojení, stravovací návyky a pohybové aktivity dětí, ale někdy i bydliště, BMI rodičů a jejich vzdělání, počet dětí v rodině atd.

Problém s obezitou nepostihuje jen Evropu a Severní Ameriku, ale i asijské země (12). V posledních 30 letech zaznamenali v Číně zvýšenou prevalenci obezity u školních dětí spojenou se zvýšeným rizikem morbiditu a metabolického syndromu. Podle Barkerovy hypotézy jsou za to odpovědné intrauterinní změny vyvolávající fetální adaptaci. Ty přetrvávají do dospělosti a vedou k řadě chronických onemocnění. Intenzivní studie na poli epigenetiky předpokládají i ovlivnění fenotypu prostředím s následnou genovou expresí, modifikací metylace DNK a histonů, které zpětně ovlivňují genovou expresi. Výzvou do budoucna je podle autorů určit, zda skutečně existují epigenetické změny odpovědné za vývoj obezity v dětství a dospělosti a zda tyto změny jsou zodpovědné za transgenerační přenos. Je pravděpo-

dobné, že právě tento epigenetický mechanismus může být klíčem k prevenci obezity a metabolického syndromu.

Většina studií posledních let, včetně provedené meta-analýzy (13) potvrdila inverzní vztahy mezi porodní hmotností a obezitou či metabolickým syndromem. **Nízká porodní hmotnost (< 2500 g) zvyšuje riziko metabolického syndromu** v dospělosti. Rovněž narušení vývoje v raném dětství vlivem stresu, infekcí či nedostatečné výživy, doprovázené zpomalením růstu v prvních dvou letech života, se projevuje horším lipidovým profilem. Dlouhodobá britská studie Medical Research Council Survey of Health and Development sledovala antropometrické parametry 2311 chlapců a dívek opakovaně ve 2., 4., 7., 11., 15. a 36. roce. Získané údaje byly porovnány s jejich lipidovým profilem v 53. roce (14). U osob s vyšší výškou, zejména delší délkou končetin byl pozorován nálezní nižší celkový a LDL cholesterolu. Stejně tak vyšší výška u dětí ve 2 letech a pozdější rychlejší růst po 15. roce měl protektivní význam. Ti, kdo měli do 2 let vyšší výšku, měli v 15 letech o 6–10 % nižší hodnoty celkového cholesterolu než ti, kteří měli výšku průměrnou. Naopak jedinci s vyšším BMI mezi 15–36 a 36–56 rokem měli vyšší hodnoty jak celkového, tak i LDL cholesterolu, zcela v shodě s jinými studiemi. Riziko poruch lipidového metabolismu se objevilo u osob s narušeným vývojem v raném dětství a pozdějším urychleným nárůstem BMI v dospělosti.

Na druhé straně však **i vysoká porodní hmotnost (≥ 4000 g) může korelovat s pozdější nadváhou, obezitou a metabolickým syndromem**, jak popsal Hirschler et al. při sledování 1027 devítiletých argentinských školáků z nižších sociálních vrstev (15).

KOMPLIKACE OBEZITY

Mezi časné zdravotní následky obezity patří ortopedické komplikace a zhoršená mobilita, poruchy glycidového a lipidového metabolismu, tedy diabetes mellitus 2. typu a časná ateroskleróza, zvýšený krevní tlak, spánkové poruchy, narušené imunitní funkce, kožní, reprodukční a psychosociální problémy i řada dalších.

V předkládané rešerši se však objevují jen vybrané studie týkající se časné aterosklerózy, jaterní steatózy a metabolického syndromu. Tyto komplikace však spolu vzájemně souvisí.

Časná ateroskleróza

Woollett et al. (16) ve své studii prokázal, že zvýšený transport mateřského cholesterolu může ovlivnit fetální metabolismus a sterolovou produkci. Zvýšené vstřebávání mateř-

ského cholesterolu může narušit syntézu cholesterolu (např. syndrom Smith-Lemli-Opitz) nebo naopak akcelerovat rozvoj choroby, jako je například ateroskleróza.

Podle Yanga et al. má ateroskleróza svůj začátek již ve fetálním období (17). Autoři vyšetřili 79 japonských dětí a rozdělili je do dvou věkových kategorií: 42 dětí bylo ve věku 5–9 let a 37 dětí 10 až 18letých. Dědičnou dispozici (výskyt hypertenze, obezity nebo dyslipidémie) mělo 23 dětí. Dětem byly odebrány krevní vzorky na stanovení triacylglycerolů, celkového, HDL a LDL cholesterolu. Děti s rodinnou anamnézou měly signifikantně vyšší hodnoty intimy karotid v průběhu sonografického vyšetření. Diastolický tlak i aterogenní index (celkový cholesterol/HDL C) významně skórovaly pro rizikové faktory aterosklerózy. Předpokládá se, že pravidelné monitorování vysoce rizikových dětí při vývoji a progresi cévní léze přispěje k omezení vývoje kardiovaskulárního onemocnění.

V americkém projektu NGHS (National Heart, Lung and Blood Institute Growth and Health) bylo longitudinálně v ročních měřeních sledováno 1166 bělošských a 1213 afroamerických dívek ve věku od 9 do 18 let (18). Zatímco prevalence a incidence nadváhy se v průběhu dospívání zvýšila u bělošské populace ze 7 % jen na 10 %, u afroamerických dívek došlo k výraznému zvýšení ze 17 % na 24 %. Incidence nadváhy se ukázala být vyšší mezi 9. až 12. rokem než později v adolescenci. Děvčata, která měla nadváhu v dětství, byla 11–30× častěji obézní v pozdějším věku. Nadváha byla významně spojena se zvýšením krevního tlaku, cholesterolu a hladinou triacylglycerolů. Podle autorů se **kardiovaskulární riziko** u dětí s nadváhou objevuje **již ve věku 9 let**.

V rakouské studii bylo vyšetřeno 140 obézních dětí ve věku 13 let a 100 zdravých dětí stejného věku (19). Sledovaly se u nich adipocytokiny, zánětlivé biomarkery, parametry inzulínové rezistence a lipidové subfrakce. U obézních dětí bylo navíc provedeno scintigrafické vyhodnocení distribuce tukové tkáně (SAT). U obézních byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny C-reaktivního proteinu, indikujícího časná stadia aterosklerózy. Nízké hodnoty adiponektinu negativně korelovaly s ultrasonograficky prokázanou tloušťkou karotické intimy. Adiponektin koreloval pozitivně s hladinou HDL cholesterolu a sérovým apolipoproteinem A1, negativně potom s triacylglyceroly, inzulínovou rezistencí, kyselinou močovou a sérovou transaminázou. Regresní analýza prokázala, že adiponektin je nejsilnější predikční marker časné aterosklerózy. Adiponektin u chlapců pozitivně koreloval s distribucí tukové tkáně v gluteální krajině a na vnitřní straně stehen, u dívek negativně koreloval s tukovou vrstvou v krční krajině. Studie prokázala významné vztahy mezi rozložením podkožního tuku a hladinami adiponektinu, stejně jako mezi nízkou hladinou adiponektinu a počínající aterosklerózou.

Pomocí měření tloušťky karotické intimy byla i u 12letých německých dětí s diabetem 1. typu prokázána časná ateroskleróza (20). Tloušťka karotické intimy u diabetiků byla nevýznamně vyšší (0,571 mm, resp. 0,548 mm u zdravých). Současně byly sledovány i další rizikové faktory, jako jsou hodnoty krevního tlaku a projevy dyslipidémie. U obézních dětí byl nalezen signifikantně vyšší krevní tlak, ale přitom nižší aterogenní lipidový profil. Hodnoty BMI a markery zánětu, endoteliální dysfunkce i fibrinolytické aktivity byly sice u diabetických dětí vyšší, ale nekorelovaly významně s tloušťkou karotické intimy. Autoři se domnívají, že u dobře kontrolovaných dětí s 1. typem diabetu může mít hodnota krevního tlaku v časném stadiu aterogeneze větší význam než dyslipidémie.

Soubor 50 tureckých dětí ve věku 12 let s BMI 28,2 kg · m⁻² (střední stupeň obezity) byl srovnáván s kontrolní skupinou stejně starých dětí s BMI 17,6 kg · m⁻² (21). Tloušťka karotické intimy u obézních dětí byla významně větší. Byly sledovány vztahy mezi tloušťkou karotické intimy a citlivostí na inzulín. Inzulínová rezistence se u těchto dětí ukázala jako nezávislý rizikový faktor.

Další studii o kardiovaskulárním riziku obezity v dětském věku publikoval Quijada et al. (22). Šetření proběhlo u prepu-

bertálních 6–12letých venezuelských dětí a zahrnovalo široké spektrum ukazatelů kardiovaskulárního rizika. Oproti kontrolní skupině byl u obézních nalezen signifikantně vyšší krevní tlak, významně horší lipidový profil, významně vyšší HOMA skóre, bazální a pozátěžový inzulín, stejně jako C-reaktivní protein a leptin. U 69 % obézních dětí byl diagnostikován MS. Poměr mezi hladinami triacylglycerolů a HDL cholesterolem může být podle autorů velice užitečným diagnostickým ukazatelem rizika dyslipidémie, hypertenze a metabolického syndromu.

Yoshinaga et al. vyšetřil 321 japonských dětí ve věku 6–12 let (23). Z nich bylo 212 hodnoceno jako obézní, tzn. BMI u nich byl vyšší než 95. percentil pro věk a pohlaví. U obou skupin, skupiny kontrolní i obézní se měřily se hladiny adiponektinu, leptinu, grehlinu, C-reaktivního proteinu a rezistinu. Leptin byl ve studii nejcitlivějším markerem pro predikci akumulace kardiovaskulárních rizikových faktorů a přítomnosti metabolického syndromu. Obě, leptinové i adiponektinové hodnoty se zhoršily, objevil-li se alespoň jeden rizikový faktor. Yoshinaga se zajímal i o vztahy mezi celkovým počtem rizikových faktorů a jednotlivými rizikovými faktory (24). Potvrdilo se, že nejen samotná obezita, ale všechny rizikové faktory jako komplex rizika vyvolávají zhoršení jednotlivého rizika.

Jaterní steatóza

Jaterní steatóza může od své jednoduché formy přejít přes steatohepatitidu v jaterní cirhózu, s následným jaterním selháním a stát se tak velice závažnou, život ohrožující jaterní chorobou. Se zvýšením obezity dětského věku v některých západoevropských státech se zvyšuje i výskyt nealkoholového ztučnění jater. Nealkoholová jaterní steatóza je komplikací dětské obezity a výrazem nezdravého životního stylu (25). V patogenezi onemocnění hrají podstatnou roli inzulínová rezistence a porucha lipidového metabolismu. Redukce nadváhy pohybovou aktivitou a dietou je proto hlavní prevencí vzniku závažných jaterních onemocnění. Změna životního stylu může zlepšit i inzulínovou rezistenci. Farmakoterapie má podle autorů jenom přídatnou hodnotu.

Vztahem mezi středním stupněm obezity a metabolismem glukózy, inzulínovou senzitivitou a suspektní jaterní steatózou se u desetiletých italských dětí zabýval Chiloire et al. (26). Podkožní tuk byl měřen kalipericky, játra byla vyšetřena ultrasonograficky a v krvi byly stanoveny inzulín, HOMA skóre, lipidový profil, koncentrace transamináz a glykémie nalačno. Steatóza byla diagnostikována u 64 % dětí s pozitivním vztahem k obezitě. Děti se steatózou vykazovaly vyšší produkci inzulínu a inzulínorezistenci, indikující pozdější metabolický syndrom. Autoři poukazují na to, že k diagnostice steatózy je třeba ultrasonografické vyšetření. Samotné hodnoty transamináz se neukázaly adekvátním markerem jaterní steatózy.

Metabolický syndrom

Hlavními složkami MS jsou: diabetes mellitus (DM) 2. typu s inzulínovou rezistencí, esenciální hypertenze, androidní obezita, poruchy koagulace a hyperlipoproteinémie. Zpřísněná kritéria podle IDF (International Diabetes Federation, 2002) pro dospělé jsou: obvod pasu u mužů > 94, u žen > 80 cm, TG > 1,7 mmol · l⁻¹ nebo HDL-C (vysokodenzitní lipoproteinový cholesterol) < 0,9 mmol · l⁻¹, glykémie > 5,6 mmol · l⁻¹, krevní tlak > 130/85 torrů. Podle studie Li et al. (27) jsou pro diagnostiku MS a kardiovaskulárního onemocnění přísnější kritéria IDF vhodnější.

Problematikou specifických kritérií pro adolescenty se zabývala i International Diabetes Federation. Jolliffe et al. (28) použil růstové křivky z reprezentativních dat National Health and Nutrition Examination Surveys do věku 20 let, odkdy je možné akceptovat kritéria dospělých (tab. 2). Výsledky získané z růstových křivek modifikoval ke každé komponentě MS, k obvodu pasu, systolickému a diastolickému

Tab. 2. Kritéria pro metabolický syndrom u adolescentů podle IDF

Hodnoty pro chlapce					
Věk	WC (cm)	TKs (torry)	TKd (torry)	HDL-C, mmol.l ⁻¹	TG, mmol.l ⁻¹
(r)	(83.)	(93.)	(97.)	(26.)	(89.)
12	85,1	121	76	1,13	1,44
14	88,9	125	79	1,07	1,52
16	91,8	128	82	1,03	1,59
18	93,4	129	84	1,03	1,65
20	94,0	130	85	1,03	1,70

Hodnoty pro dívky					
Věk	WC (cm)	TKs (torry)	TKd (torry)	HDL-C, mmol.l ⁻¹	TG, mmol.l ⁻¹
(r)	(50.)	(93.)	(99.)	(43.)	(89.)
12	72,5	121	80	1,25	1,60
14	75,7	125	83	1,26	1,46
16	77,7	128	84	1,27	1,46
18	79,2	129	85	1,28	1,21
20	80,0	130	85	1,30	1,70

WC – obvod pasu, TKs – systolický krevní tlak, TKd – diastolický krevní tlak, HDL-C – cholesterol vysokodenzitního lipoproteinu, TG – triacylglyceroly

mu tlaku, HDL cholesterolu, triacylglycerolům a glukóze. Vypracoval tak **kritéria pro metabolický syndrom pro jedince od 12 do 20 let**, odlišná pohlavím. V poslední dekádě se prevalence metabolického syndromu zdvojnásobila a odpovídala tak 7,6 % při použití kritérií pro dospělé a 9,6 % při použití nových kritérií pro adolescenty.

Sinaiko et al. (29) publikoval výsledky prospektivního výzkumu u souboru amerických adolescentů, vyšetřených ve 13, 15 a 19 letech. Sledoval u nich BMI, výskyt inzulínové rezistence vztážené k aktivní tělesné hmotě i lipidový profil. BMI ve 13 letech nebyl prediktorem rizika v 19 letech. Změna v BMI predikovala všechny tři faktory (vyšší krevní tlak, dyslipidémii a inzulínovou rezistenci) i celkové skóre. Inzulínová rezistence ve 13 letech predikovala vyšší TK, triacylglyceroly i celkové skóre. Změna v inzulínové rezistenci predikovala poruchy triacylglycerolů i hodnoty skóre. Výsledky ukázaly, že inzulínová rezistence nemusí být závislá na BMI, nicméně snížení inzulínové rezistence vztážené k hmotnosti může znamenat redukci prevalence kardiovaskulárního rizika.

Na dynamiku vztahů mezi zvyšující se obezitou a závažností kardiovaskulárních rizikových faktorů se u 186 třináctiletých izraelských obézních dětí zaměřil Weiss (30). Hodnotil jednotlivé složky metabolického syndromu před a průměrně po 19 měsících sledování. BMI z-skóre negativně korelovalo se změnami inzulínové senzitivity. Děti, u kterých došlo ke snížení jejich BMI z-skóre, měly oproti dětem se zvýšeným BMI z-skóre, významně snížené jak hladiny glukózy a triacylglycerolů, tak zvýšený vysokodenzitní lipoproteinový cholesterol. Změny v hmotnosti tak měly vliv na každou jednotlivou komponentu metabolického syndromu i na přetrvávání této diagnózy.

Oxysteroly je možné považovat v adolescentním věku za potenciálně významný marker jak oxidačního stresu, tak aterosenní dyslipidémie. Významné zvýšení koncentrace oxysterolů v séru korelovalo s výskytem obezity, inzulínem nalačno a hladinami apolipoproteinu B u souboru 189 patnáctiletých dívek, jejichž BMI byl 22,5 kg · cm⁻² (31). Tato kanadská studie byla součástí výzkumu u dětí, jejichž matky trpěly v průběhu těhotenství gestačním diabetem.

Pro lepší diagnostiku metabolického syndromu se hledají jednoduchá kritéria. U souboru 185 čtrnáctiletých městských afroamerických dívek byl sledován výskyt MS podle kritérií dospělých (32). Osmnáct procent sledovaných dívek splňovalo 3–5 kritérií. U 64 % dívek byla zjištěna nadváha, 56 % dívek mělo vyšší obvod pasu. Dívky s nadváhou i s větším obvodem pasu měly významně vyšší výskyt MS. Autoři konstatují, že oba antropometrické parametry – hodnotu BMI

i obvod pasu – je možné použít jako kritérium pro adolescentní formu metabolického syndromu, nicméně obvod pasu se podle autorů jevil jako lepší prediktor.

Spánková apnoe

Zařazení spánkových poruch dýchání a spánkové apnoe do definice metabolického syndromu je dosud kontroverzní, přestože jak obézní děti, tak obézní dospělí jsou takto ohroženi. V souvislosti se zvýšenou prevalencí dětské obezity stoupá výskyt metabolického syndromu u obézních dětí až na 30 %. Ukazuje se, že adipocytokiny, produkované z tukové tkáně hrají klíčovou roli v rozvoji metabolického syndromu. Naopak leptin, dříve označovaný za antiobézní hormon, je podle nových koncepcí důležitější pro stavy energetického deficitu než pro predikci metabolického syndromu. Na druhé straně adiponektin má vztah nejen k obezitě a inzulínové rezistenci, ale je nejlepším prediktorem metabolického syndromu i v dětském věku. U novorozenců a malých dětí se však oba adipocytokiny objevují ve vysokých koncentracích, takže je obtížné vysvětlit zvýšené riziko pro metabolickou poruchu v pozdějším věku. Seskupení rizikových metabolických faktorů je snad možné vysvětlit nízkým stupněm systémového zánětu. Všechny vlivy z tukové tkáně mohou být nejen markery, ale také mediátory metabolických složek obezity (33).

PREVENCE A TERAPIE

Předpokládá se komplex nejméně 250 interakcí obézních genů a faktorů prostředí disponujících pro obezitu. Včasná diagnostika a úprava životního stylu, případně i farmakoterapie mohou s předstihem zachytit vývoj nevratných patologických změn a redukovat tak genetickou determinaci. Komplexní přístup k prevenci je však daleko rozsáhlejší, než je uvedeno v předkládané rešerši. Ten by měl zahrnout již průběh těhotenství, kojeneckou výživu, školní i rodinné stravování, stejně jako odpovědný přístup zdravotníků, potravinářského průmyslu a obchodu i řídicích státních institucí.

Koncepčnímu řešení dětské obezity v naší republice by měl přispět projekt **COPAT** (Childhood Obesity Prevalence and Treatment) (34).

V současné době již existuje ve světě i u nás celá řada intervenčních programů. Mezinárodní tým expertů (35) vybral z rozsáhlých databází posledních dvou dekád 982 příspěvků a 500 z nich podrobili kritické analýze. Provedli i rozbor 147

programů doporučených pro redukci obezity. Ukázalo se, že žádný z těchto programů není možné použít univerzálně. Je třeba vždy respektovat řadu důležitých faktorů, jako jsou věková kategorie, pohlaví, zdravotní stav, příslušné etnikum a možnosti dané skupiny. Pozitivní výsledky krátkodobého intervenčního programu nemusí mít vždy stejnou déletrvající odezvu v reálném životě.

Analýzou intervenčních programů zaměřených na redukci nadváhy a obezity u školní mládeže ve věku 6–19 let se zabývali v přehledové holandské studii Doak et al. (36). Většina studií potvrdila možnost ovlivnění antropometrických parametrů (BMI a % tuku), denního režimu (pohybová aktivita, dieta a trávení času sledováním TV) i vybraných psychologických ukazatelů (sebehodnocení, pocity diskriminace a deprese). Několik publikací však poukázalo i na opačný fenomén, prevalenci podváhy.

Edukační programy

Nejsložitějším problémem, jak se ukazuje, je edukace veřejnosti. Řada našich specializovaných pracovišť, koordinovaná z Českého institutu metabolického syndromu (37), se snaží popularizovat nejnovější poznatky. Na internetových stránkách byl založen **Klub metabolického syndromu** (38), určený odborné i laické veřejnosti. Pro členy klubu jsou zde k dispozici odborné novinky, pro pacienty je zřízen diskuzní klub a **Fórum zdravé výživy** s osvětovými informacemi. Jsou tu k dispozici informace o pohybové aktivitě s konkrétními programy, a to pod hesly „Metabolický syndrom klub“, „Český institut metabolického syndromu“. Pacienti zde naleznou srozumitelné návody pro své vytrvalostní aktivity jak z hlediska intenzity, tvání, frekvence, tak i formy zatížení.

Mezi zahraničními výzkumy se objevují studie popisující příznivý efekt vhodné zvolené edukace. V afroamerické populaci je obezita známým letitým zdravotním problémem, který stojí ročně 100 miliard dolarů. Vysoký výskyt obezity je spojen i s vysokou úmrtností na kardiovaskulární choroby. Ve studii afroamerických obézních dívek ve věku 11–15 let byl použit interaktivní behaviorální internetový program, zahrnující i internetové poradenství (39). Součástí projektu se stali i obézní rodiče. V prvních 12 týdnech půlročního sledování měly obě skupiny kontaktní sezení. Údaje o BMI, hmotnosti, tělesném složení, jídelníčku a váhových úbytcích byly shromažďovány na začátku a po 6 měsících sledování. Účast v programu byla měřena počtem připojení na webových stránkách. Adolescenti ztratili více tělesného tuku (-1,6 %) a rodiče statisticky významně tělesnou hmotnost (-2,1 kg). Společná účast rodičů a adolescentů v programu byla velice pozitivně hodnocena. Adherence k programu byla vysoká, setrvalo v něm 88 % účastníků.

Zajímavým projektem byl rovněž finský STRIP (Special Turku Coronary Risk Factor Intervention Project for Children) (40). Do tohoto projektu bylo začleněno 1062 sedmiměsíčních dětí, rozdělených na intervenční a kontrolní skupinu. Dětem nebo lépe rodinám v intervenční skupině bylo poskytnuto individuální poradenství, založené na zdravé výživě a doporučené vhodné pohybové aktivitě. Výška a hmotnost byla měřena alespoň jednou za rok. Nadváhu či obezitu představovalo zvýšení hmotnosti o 20 %, resp. o 40 % ve vztahu k průměrné finské populaci. V intervenční skupině bylo ve věku dvou let méně dívek s nadváhou než ve skupině kontrolní. Ve věku 10 let mělo nadváhu 10 % dívek v intervenční skupině a 18 % v kontrolní skupině, zatímco u chlapců rozdíly nebyly velké (11,8 % v intervenční a 12,1 % v kontrolní skupině). V intervenční skupině byly jen 3 děti obézní, v kontrolní skupině jich bylo 14. Individuální režimové poradenství prováděné 2x za rok snížilo u desetiletých školáček výskyt nadváhy a obezity bez primární energetické restrikce.

Pozitivní vliv pohybové aktivity v prevenci obezity je obecně znám. Jsou známy i pozitivní výsledky pohybové léčby u jejich komplikací. O dobré edukaci mladých diabetiků svědčí i výzkum pohybového režimu u 127 předškolních,

školních dětí a adolescentů s 1. typem diabetu. Autoři (41) srovnávali jejich aktivity s aktivitami stejně starých zdravých dětí odpovídajícího věku. Diabetičtí školáci byli významně aktivnější ve středních intenzitách zatížení a adolescenti dokonce ve středních i náročnějších aktivitách než tzv. zdravá populace. U školáků i dospívajících byly nalezeny negativní korelace mezi glykovaným hemoglobinem a dobou strávenou při mírných, resp. mírných i středně intenzivních aktivitách. Většina diabetických pacientů tedy respektovala klasické pediatrické návody pro pohybovou aktivitu, a proto srovnání se zdravou populací bylo příznivé.

O současné trendy trávení volného času mezi mládeží se zajímal Mark (42). V souboru 1803 amerických adolescentů ve věku 12–19 let sledoval vztah mezi dobou strávenou u televize, počítače či videoher a diagnózou metabolického syndromu. Jedinci, kteří trávili tímto způsobem až 5 hodin denně, měli podle kritérií NCEP (National Cholesterol Education Program) nejvyšší výskyt MS. Je zajímavé, že stupeň jejich pohybové aktivity neměl na vztah mezi dobou strávenou u monitoru a výskytem metabolického syndromu významný vliv.

Základním výchovným úkolem rodičů je vypracovat u svých dětí nejen správné hygienické, ale také dietní návyky, a to nejen z hlediska množství a složení potravy, ale i z hlediska správného časování jejího příjmu.

Podle dlouholetých zkušeností a podle výsledků řady vědeckých studií byly vypracovány a zveřejněny **návody specifických dietních opatření** od doby kojení až po dospělost (43). V úvahu se braly i studie prenatálních a ranných postnatálních rizik. Řada opatření má sice obecnou platnost, některé poznatky však stojí za uvedení. Děti matek obézních v době těhotenství mají 2x vyšší riziko být obézní již v dětském věku. Děti s nízkou porodní hmotností a s rychlým hmotnostním přírůstkem v prvních 4–6 měsících mají celoživotní riziko pro obezitu. Děti se zvýšenou dietní samoregulací v časném věku mají lepší vyhlídky obstát v běžném přebytečném prostředí. Pediatrické studie prokázaly, že snížením saturovaných tuků o pouhých 3 % (z 10 na 7) je možné snížit LDL cholesterol o 16 %. Zatímco zařazení ryb do jídelníčku se plně doporučuje pro přísun žádoucích nenasycených tuků (v přímořských státech až 2x týdně), mohou být některé druhy ryb pro těhotné a kojící matky rizikové. Důvodem je nebezpečí kontaminace mědí (43).

Nové dietní poznatky se týkají i oblíbené dětské pochoutky, čokolády. Konsumpce čokolády je považována za protektivní dietní složku kardiovaskulárního rizika pro vysoký obsah kyseliny stearové a antioxidantních flavinoidů. Ding et al. vypracoval rozsáhlou rešerši z publikací MEDLINE od roku 1966 do roku 2005 (44). U 236 vybraných relevantních publikací provedl metaanalýzu mezi příjmem flavinoidů a mortalitou na kardiovaskulární onemocnění. Zjistil, že kakao a čokoláda mohou působit příznivě prostřednictvím snížení krevního tlaku, protizánětlivého a antiagregačního účinku, zvýšeného HDL-C a snížených oxidací LDL-C. Stearová kyselina hladiny cholesterolu neovlivňovala, i když výsledky epidemiologických studií u sérové a dietní stearové kyseliny mohly být zkráceny odlišnou metodologií. Většina studií se shoduje v nesporném pozitivním efektu flavinoidů.

Současná farmakoterapie obezity

Na prvním místě stojí samozřejmě režimová opatření, pohybová aktivita a dieta, nicméně u extrémních obezit a obezit nereagujících na tuto formu redukce je možno i u dětí a dospívajících použít farmakoterapii. Antiobezitika bývala dříve velice drahou záležitostí, a proto si je pacient mohl dovolit užívat jen krátkou dobu, většinou s následným jojo efektem. V současné době jsou však velmi dobré zkušenosti s daleko levnějšími preparáty, blokujícími vstřebávání tuků ze zažívacího traktu a navozujícími tak negativní energetickou bilanci. Zjistilo se, že se uplatňují i při prevenci dyslipidémie a diabetu.

Současná farmakoterapie dyslipidémie

Bez ohledu na doporučení pro změnu životního stylu budou některé děti a adolescenti s vysokým rizikem hyperlipidémie, zejména familiárního typu hypercholesterolemie, vyžadovat účinnou farmakoterapii. Proto byly vědecké týmy vyzvány předními lékařskými asociacemi k důkladnému prověření současných terapeutických efektů, týkajících se zejména užívání statinů u dětí a dospívajících (45). Následná doporučení pomohou rozhodovat o výběru pacientů, zahájení terapie, jejím monitorování a udržování.

ZÁVĚR

Epidemie obezity a nadváhy, a to i u dětí a dospívajících, je celosvětovou výzvou pro urychlené hledání nových způsobů boje s rizikem stále narůstající hrozby chronických civilizačních onemocnění.

Pro ochranu veřejného zdraví je nezbytné, aby došlo k zásadnímu posunu v odpovědnosti jedinců za stravování, pohyb a kontrolu hmotnosti. S ohledem na dětskou obezitu přebírají odpovědnost za zdraví dětí nejen rodiče, ale i společnost prostřednictvím školských, zdravotnických, potravinářských a vládních institucí.

Zkratky

BMI	– body mass index
COPAT	– Childhood Obesity Prevalence and Treatment
DM	– diabetes mellitus
IDF	– International Diabetes Federation
MS	– metabolická syndrom
SAT	– distribuce tukové tkáně

LITERATURA

- Lobstein T, Bauer L, Uauy R.** Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes Rev* 2004; 5 (Suppl.1): 4–8.
- James PT, Rigby N, Leach R.** The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2004; 11: 3–8.
- Spiotta RT, Luma GB.** Evaluating obesity and cardiovascular risk factors in children and adolescents. *Am Fam Physician* 2008; 78: 1052–1058.
- Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Wong ML, et al.** Is the worldwide epidemic of obesity a communicable feature of globalization? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116 (Suppl. 1): S30–S32.
- Lebl J, Kytarová J.** Obezita v dětském věku. Stanovisko České lékařské akademie. *Revue ČLA* 2008; 4: 28–29.
- Pařízková J, Lisá L.** Obezita v dětství a dospívání. 2. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén 2007; 239 s.
- Vignerová J, Bláha P.** Obezita u dětí a dorostu v České republice – dlouhodobé změny, metody sledování. In: Pařízková J, Lisá L. Obezita v dětství a dospívání. 2. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén 2007; 27–65.
- Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, et al.** Establishing a standard definition for childhood overweight and obesity world-wide: international survey. *BMJ* 2000; 320: 1–6.
- Wabitsch M.** Overweight and obesity in European children: definition and diagnostic procedures, risk factors and consequences for later health outcome. *Eur J Pediatr* 2000; 159: S2–S11.
- WHO.** Obesity, Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation. World Health Organisation: Geneva 2000, 894.
- Hainerová I.** Genetické faktory v etiologii a patogenezi obezity. In: Pařízková J, Lisá L. Obezita v dětství a dospívání. 2. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén 2007; 87–106.
- Loke KY, Lin JB, Mabel DY.** 3rd College of paediatrics and child health lecture-the past, the present and the shape of things to come. *Ann Acad Med Singap* 2008; 37: 429–434.
- Silveira WMF, Horta BL.** Birth weight and metabolic syndrome in adults: meta-analysis. *Rev Saude Pública* 2008; 42: 10–18.
- Skidmore PM, Hardy RJ, Kuh DJ, et al.** Life course body size and lipid levels at 53 years in a British birth cohort. *J Epidemiol Community Health* 2007; 61: 215–220.
- Hirschler V, Bugna J, Rogue M, Gilligan T, et al.** Does low birth weight predict obesity/overweight and metabolic syndrome in elementary school children? *Arch Med Res* 2008; 39: 796–802.
- Woollett LA.** Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 1155–1161.
- Yang XZ, Liu Y, Mi J, et al.** Pre-clinical atherosclerosis evaluated by carotid artery intima-media thickness and the risk factors in children. *Chin Med J* 2007; 120: 359–362.
- Thompson DR, Obarzanek E, Franko DL, et al.** Childhood overweight and cardiovascular disease risk factors: the National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study. *J Pediatr* 2007; 150: 18–25.
- Pilz S, Horejsi R, Möller R, et al.** Early atherosclerosis in obese juveniles is associated with low serum levels of adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4792–4796.
- Schwab KO, Doerfer J, Krebs A, et al.** Early atherosclerosis in childhood type 1 diabetes: role of raised systolic blood pressure in the absence of dyslipidaemia. *Eur J Pediatr* 2007; 166: 541–548.
- Atabek ME, Pirgon O, Kivrak AS.** Evidence for association between insulin resistance and premature carotid atherosclerosis in childhood obesity. *Pediatr Res* 2007; 61: 345–349.
- Quijada Z, Paoli M, Zerpa Y, et al.** The triglyceride/HDL-cholesterol ratio as a marker of cardiovascular risk in obese children; association with traditional and emergent risk factors. *Pediatr Diabetes* 2008; 9: 464–471.
- Yoshinaga M, Sameshima K, Tanaka YH, et al.** Adipokines and the prediction of the accumulation of cardiovascular risk factors or the presence of metabolic syndrome in elementary school children. *Circ J* 2008; 72: 1874–1878.
- Yoshinaga M, Sameshima K, Tanaka Y, et al.** Association between the number of cardiovascular risk factors and each risk factor level in elementary school children. *Circ J* 2008; 72: 1594–1597.
- Bocca G, Stolk RP, Scheenstra R, et al.** Non-alcoholic fatty liver disease in children: a new complication of obesity. *Ned-Tijdschr-Geneskd* 2008; 152: 2443–2447.
- Chiloiro M, Riezzo G, Chiarappa S, et al.** Relationship among fatty liver, adipose tissue distribution and metabolic profile in moderately obese children: an ultrasonographic study. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 2693–2698.
- Li WJ, Xue H, Sun K, et al.** Cardiovascular risk and prevalence of metabolic syndrome by differing criteria. *Chin Med J* 2008; 121: 1532–1536.
- Jolliffe CJ, Janssen I.** Development of age-specific adolescent metabolic syndrome criteria that are linked to the Adult Treatment Panel III and International Diabetes Federation criteria. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 891–898.
- Sinaiko AR, Steinberger J, Moran A, et al.** Influence of Insulin Resistance and Body Mass Index at Age 13 on Systolic Blood Pressure, Triglycerides, and High-Density Lipoprotein Cholesterol at Age 19. *Hypertension* 2006; 48: 730–736.
- Weiss R, Shaw M, Savoye M, Caprio S.** Obesity dynamics and cardiovascular risk factor stability in obese adolescents. *Pediatr Diabetes* 2009; v tisku.
- Alkazemi D, Egeland G, Vaya J, et al.** Oxysterol as a marker of atherogenic dyslipidemia in adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4282–4289.
- Camhi SM, Kuo KJ, Young DR.** Identifying adolescent metabolic syndrome using body mass index and waist circumference. *Prev Chronic Dis* 2008; 5: A115.
- Koerner A, Kratzsch J, Gausche R, et al.** Metabolic syndrome in children and adolescents – risk for sleep-disordered breathing and obstructive sleep-apnoea syndrome? *Arch Physiol Biochem* 2008; 114: 237–243.
- COPAT.** Základní informace o projektu. Dostupné z: www.copat.cz/index.php/aktualne-o-projektu/zakladni-informace-o-projektu (26. 8. 2009).
- Flynn MTA, McNeil DA, Maloff B, et al.** Reducing obesity and related chronic disease risk in children and youth: a synthesis of evidence with “best practice” recommendations. The International Association for the study of Obesity. *Obesity reviews* 2006; 7 (Suppl. 1): 7–66.

36. **Doak CM, Visscher TLS, Renders, et al.** The prevention of overweight and obesity in children and adolescents: a review of interventions and programmes. *International Life Sciences Institute. Obesity reviews* 2006; 7: 11–136.
37. **Rosolová H.** The Czech Institute of the Metabolic Syndrome. *MetS insights* 2005; 7: 7–8.
38. Klub metabolického syndromu. Dostupné z: www.metabolicky-syndrom-klub.cz
39. **Williamson DA, Martin DO, White MA, et al.** Efficacy of an internet-based behavioural weight loss program for overweight adolescent African-American girls. *Eating Weight Disorders* 2005; 10: 193–203.
40. **Hakanen M, Langstrom H, Kaitosaari T, et al.** Development of overweight in an atherosclerosis prevention trial starting in early childhood. The STRIP study. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 618–626.
41. **Massin MM, Lebrethon MC, Rocour D, et al.** Patterns of physical activity determined by heart rate monitoring among diabetic children. *Arch Dis Child* 2005; 90: 1223–1226.
42. **Mark AE, Janssen I.** Relationship between screen time and metabolic syndrome in adolescents. *J Publ Health* 2008; 30: 153–160.
43. American Heart Association Scientific Statement. Dietary Recommendations for Children and Adolescents. *Circulation* 2005; 112: 2061–2075.
44. **Ding EL, Huffless SM, Ding X, et al.** Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systemic review. *Nutr Metab (Lond)*, 2006; 3: 2.
45. **McCrindle BW, Urbina EM, Dennison BA, et al.** Drug therapy of high-risk lipid abnormalities in children and adolescents: a scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Youth Committee, Council of Cardiovascular Disease in the Young, with the Council on Cardiovascular Nursing. *Circulation* 2007; 115: 1948–1967.

Článek byl připraven v rámci výzkumného záměru MSM 0021620864.

Zprávy

Pandemic (H1N1) 2009

V souvislosti s vývojem epidemiologické situace ve výskytu Pandemic (H1N1) 2009 a sezonní chřipky opakovaně upozorňuji na to, že česká republika – stejně jako ostatní státy Evropské unie – přistoupila k mitigaci (a to již v září 2009), to znamená k praktickému uplatňování zmírňování důsledků pandemie chřipky. Na základě tohoto přístupu je třeba s okamžitou platností důsledně postupovat podle následujících pravidel, neboť jejich nedodržování by nadále vedlo k neindikovanému přetěžování zdravotního systému:

1. V NRL pro chřipku ve Státním zdravotním ústavu v Praze budou vyšetřovány a potvrzovány pouze vzorky biologického materiálu od pacientů se závažným průběhem Pandemic (H1N1) 2009, kteří jsou současně hospitalizováni ve zdravotnických lůžkových zařízeních a dále ve výjimečných případech vysoce rizikové kontakty s touto infekcí.

2. Vyšetřování biologického materiálu v ostatních případech, pokud bude indikováno, zajistí vybrané laboratoře. Tyto laboratoře hlásí pozitivní výsledky do NRL pro chřipku v definovaném formátu (o němž budou co nejdříve informovány).

3. Lůžková zdravotnická zařízení budou poskytovat zdravotní péči pouze pacientům uvedeným v bodě 1.

4. Praktičtí lékaři pro dospělé a praktičtí lékaři pro děti a dorost zajistí symptomatickou léčbu pacientů, jejichž zdravotní stav nebude vyžadovat hospitalizaci. Odběry biologického materiálu na virologické vyšetření u těchto pacientů obecně nejsou indikovány. Pokud však existují důvody pro odběr (na základě individuálního uvážení ošetřujícího lékaře), bude postupováno podle bodu 2.

5. Pacienti, kteří netrpí závažným chronickým onemocněním a mají chřipkové příznaky, budou ponecháni v domácí léčbě.

6. Odběrové soustavy, které jsou k dispozici na KHS, jsou určeny POUZE pro odběr vzorků v rámci sentinelového sledování ARI/ILI vyhlášeného HH nikoliv paušálně pro odběry k vyšetřování Pandemic (H1N1) 2009.

7. K monitorování výskytu Pandemic (H1N1) 2009 bude počínaje 20. listopadem 2009 spuštěna internetová aplikace „Pandemie“. Rozsah požadovaných dat ke sledování, eventuálně dalších podrobností, vám budou zaslány následně. Systém hlášení ARI/ILI zůstává ve standardním režimu.

8. Tento pokyn se NETÝKÁ programu virologické surveillance vyhlášené pokynem hlavního hygienika ČR (č. j. 35522/2009/OVZ ze dne 18. srpna 2009), která probíhá sentinelovým způsobem ve všech krajích ČR dle zavedeného režimu, přičemž uvedené vyšetřování i nadále zajišťuje NRL pro chřipku.

MUDr. Michael Vít, PhD.
hlavní hygienik ČR a náměstek ministryně zdravotnictví MZ ČR

Původní práce

Multianalytový přístup k diagnostice srdečních chorob technologií proteinových biočipů

¹Vašatová M, ¹Tichý M, ^{2,3}Horáček JM, ⁴Pudil R,
⁴Horáková L, ¹Palička V.

¹Univerzita Karlova v Praze, LF a FN Hradec Králové, Ústav klinické biochemie a diagnostiky

²Univerzita obrany Hradec Králové, Fakulta vojenského zdravotnictví,
Katedra válečného vnitřního lékařství

³Univerzita Karlova v Praze, LF a FN Hradec Králové, II. interní klinika, Oddělení klinické hematologie

⁴Univerzita Karlova v Praze, LF a FN Hradec Králové, I. interní klinika

SOUHRN

Východisko. Multianalytový přístup je doporučován pro rychlou diagnostiku a stratifikaci rizika akutního koronárního syndromu. Testovali jsme analytickou vhodnost technologie proteinových biočipů pro stanovení kardiálních markerů.

Metody. Analýza kardiálních markerů: CK-MB mass, cTnI, myoglobinu, glykogen fosforylázy BB (GPBB), srdečního typu proteinu vázajícího mastné kyseliny (h-FABP) a karboanhydrázy III (CAIII) bylo provedeno systémem Evidence Investigator (Randox). Byly testovány analytické parametry soupravy Cardiac array. Výsledky získané systémem Evidence Investigator byly porovnány s hodnotami měřeními metodami na stanovení CK-MB mass a myoglobinu pro Elecsys 2010 (Roche). Markery poškození myokardu byly měřeny u 28 dárců krve, 28 pacientů s akutním infarktem myokardu a 21 pacientů po chemoterapii antracykliny (monitorování kardiotoxicity).

Výsledky. Passing-Bablokova regrese ukazuje statisticky významné rozdíly ve výsledcích. Důvodem těchto odchylek je nedostatečná standardizace metod a diskrepance mezi kalibracemi. Nové analyty h-FABP a GPBB jsou slibnými časnými markery akutního infarktu myokardu a diagnostická senzitivita h-FABP by mohla být vyšší než u myoglobinu. Tyto markery mohou být užitečné pro monitoring kardiotoxicity antracyklinů.

Závěry. Použití biočipové technologie v kardiologické diagnostice představuje výzvu do budoucna, ale bude nutná dokonalejší standardizace imunochemických metod.

Klíčová slova: proteinový biočip, kardiální marker, kardiotoxicita, infarkt myokardu.

SUMMARY

Vašatová M, Tichý M, Horáček JM, Pudil R, Horáková L, Palička V. Multi-marker approach in the diagnostics of cardiac diseases by protein biochip technology

Background. Multi-marker approach is recommended for rapid diagnostics and risk stratification of acute coronary syndrome. We tested the analytical performance of protein biochip technology for determination cardiac markers.

Methods. Analysis of cardiac markers: CK-MB mass, cTnI, myoglobin, glycogen phosphorylase BB (GPBB), heart type of fatty acid binding protein (h-FABP) and carbonic anhydrase III (CAIII) was performed by system Evidence Investigator (Randox). Analytical parameters of Cardiac array were tested. The Evidence Investigator results were compared with Elecsys 2010 (Roche) CK-MB mass and myoglobin methods. Markers of myocardial injury were determined in 28 blood donors, 28 patients with acute myocardial infarction diagnosis and 21 patients after chemotherapy containing anthracyclines (monitoring of cardiotoxicity).

Results. The Passing-Bablok regression shows statistically significant differences in results. The reasons for these differences are poor standardization of methods and discrepancies between calibrations. New substances h-FABP and GPBB are promising early markers of acute myocardial infarction and diagnostic sensitivity of h-FABP would be better than myoglobin test. These markers can be useful for monitoring of cardiotoxicity of anthracyclines.

Conclusions. In future, the use of biochip technology in cardiology diagnostic represents an important challenge but it is a necessary standardization of immunochemical methods.

Key words: protein biochip, cardiac marker, cardiotoxicity, myocardial infarction.

UI.

Čas Lék čes 2009; 148: 591–596

Adresa pro korespondenci:

RNDr. Martina Vašatová

ÚKBD LF UK a FN

Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

fax: +420 495 832 003, e-mail: ulrycmar@fnhk.cz

ÚVOD

V diagnostice akutních koronárních syndromů zaujímá stanovení biochemických markerů nekrózy myokardu důležité místo. U akutních koronárních syndromů bez elevace ST segmentů je jejich pozitivita známkou netrasmurálního (non Q) infarktu myokardu a umožňuje diagnostikovat nemocné s nestabilní anginou pectoris. Nově European Society of Cardiology, American College of Cardiology Foundation, American Heart Association a World Heart Federation publikovaly univerzální definici infarktu myokardu, ve které je přesně dáno použití biochemických markerů poškození myokardu. V první řadě jsou to srdeční troponiny pro průkaz nekrózy myokardu a pro diagnostiku reinfarktu je to stanovení myoglobinu a CK-MB mass (1, 2).

Současná biochemie nabízí možnosti stanovení více parametrů postižení myokardu současně. Tato tzv. multimarkero- vá strategie umožňuje stratifikaci rizika pacientů s akutními koronárními syndromy, například nestabilní anginou pectoris.

Tento přístup může být také užitečný i v jiných oblastech kardiologické diagnostiky – například při studiích kardiotoxicity léčiv (3) nebo při monitorování poškození myokardu účinkem radiofrekvenční katérové ablace (4).

V posledních letech se rozšiřují poznatky o nových analytech, které by bylo možné využívat v kardiologické diagnostice, ale zatím nejsou součástí rutinní klinické praxe. Jde hlavně o BB izoenzym glykogen fosforylázy (GPBB) (5) a srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (h-FABP) (6). Tyto látky by mohly hrát významnou roli jako časné markery ischemie nebo nekrózy myokardu v době, kdy ještě nelze očekávat pozitivitu troponinu, což má velký praktický význam pro akutní diferenciální diagnostiku nemocných vyšetřovaných pro bolesti na hrudi k vyloučení koronární etiologie obtíží.

FABP je cytoplazmatický protein účastnící se oxidace mastných kyselin. Strukturálně není vázán v buňkách a je schopen se velmi rychle uvolnit do krve. Jeho hladina signifikantně roste 1–3 hodiny po počátku infarktu myokardu, vrcholu dosahuje okolo 6.–8. hodiny a k normálu se vrací během 24–30 hodin. Jeho koncentrace je také vyšší během akutní ischemie. V lidském organismu bylo objeveno 9 subtypů FABP s různou tkáňovou lokalizací. Srdeční typ h-FABP může být použit jako časný diagnostický marker pro AIM s lepší senzitivitou a specificitou než myoglobin (6–8).

Glykogen fosforyláza je dimerický glykogenolytický enzym složený ze dvou identických podjednotek: GPBB (brain), GPLL (liver) a GPMM (muscle). Isoenzym BB je hlavní formou tvořenou v mozku a myokardu. Mnohem nižší koncentrace se vyskytují v leukocytech, krevních destičkách, slezině, játrech, ledvinách a dalších orgánech. Během ischemie myokardu je stimulována enzymatická aktivita GPBB a dochází ke změně v buněčné lokalizaci, z formy vázané na sarkoplazmatické retikulum na volný cytosolový enzym. Koncentrace GPBB roste okolo 3 hodin po nástupu bolesti na hrudi a vrcholu dosahuje přibližně po 6 hodinách. Tento enzym je schopen indikovat jak nekrotické poškození buněk myokardu, tak pouze ischemické procesy (5).

Karboanhydráza III (CAIII) je enzym přítomný v kosterním svalstvu, přičemž v myokardu se nevyskytuje. Z tohoto důvodu kombinované určení sérové hladiny CA III a myoglobinu zvyšuje diagnostickou specificitu a senzitivitu stanovení myoglobinu jako časného markeru pro AIM (9, 10).

Nový multianalytový přístup může pomoci v diagnostice různých kardiologických onemocnění. Cílem naší práce bylo testovat analytickou vhodnost použití Cardiac Array panelu pro přístroj Evidence Investigator (Randox), který je založený na technologii proteinových biočipů pro stanovení markerů poškození myokardu ve dvou klinických modelech: akutní infarkt myokardu s elevacemi ST segmentů, jako druhý model byla zvolena skupina pacientů s hematologickým onemocněním a současnou léčbou chemoterapií antracykliny s potenciální kardiotoxicitou.

MATERIÁL A METODY

Evidence Investigator™, biočipový analyzátor firmy Randox (Randox Laboratories Ltd., Velká Británie) umožňuje současné testování několika analytů z jednoho vzorku. Systém má proti klasickým imunochemickým technikám výhody zahrnující multiplexní přístup k analýze a možnost redukce objemu vzorku a reagensií.

Na přesně definovaných pozicích jsou na biočipu navázané protilátky proti jednotlivým analytům. Měření kardiálních markerů je založeno na principu sendvičové enzymoimunoanalýzy. Pro detekci protilátek je využívána chemiluminiscenční reakce peroxidu s luminolem, katalyzovaná křenuovou peroxidázou. Luminiscence je cíleně snímána z jednotlivých ploch (spotů) na biočipu CCD kamerou. Zobrazení technologie umožňuje kvantifikovat množství světla vycházejícího z jednotlivých reakčních ploch a software systému signály přepočítá na hodnotu koncentrací analytů ve vzorku.

Diagnostický panel Cardiac Array obsahuje dobře známé kardiální markery rutinně používané v klinické praxi: izoenzym kreatinkinázy CK-MB (CK-MB mass), myoglobin (MYO) a srdeční troponin I (cTnI) společně s novými analyty, jako jsou BB izoenzym glykogen fosforylázy (GPBB), srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (h-FABP) či karboanhydráza III (CAIII).

Sérum je výrobcem upřednostňováno jako biologický materiál první volby pro stanovení na analyzátoru Evidence Investigator. Všechny koncentrace kardiálních markerů jsou udávány v $\mu\text{g/l}$. Devítibodová kalibrační závislost sestavená výrobcem je součástí každého setu. Rozsah měření pro jednotlivé analyty je následující: CK-MB mass = 0,4–100 $\mu\text{g/l}$, MYO = 1,8–700 $\mu\text{g/l}$, GPBB = 1,97–290 $\mu\text{g/l}$, h-FABP = 0,15–150 $\mu\text{g/l}$, CAIII = 0,2–200 $\mu\text{g/l}$ a cTnI = 0,18–50 $\mu\text{g/l}$.

Vnitřní kontrola kvality byla měřena na třech hladinách koncentrací pomocí kontrolních materiálů dodávaných výrobcem. Z naměřených výsledků kontroly kvality byla určena správnost (BIAS) a mezilehlá přesnost (reprodukovatelnost, Interassay CV) měření.

Pro porovnání biočipové technologie Evidence Investigator s rutinně užívanými metodami byla měřena skupina vzorků s širokým rozsahem měřených hodnot. Vzorky byly vybrány jak ze skupin dárců krve, tak od pacientů s různými kardiologickými diagnózami ($n = 75$). Výsledky testů pro CK-MB a MYO získané analýzou na biočipech byly srovnávány s odpovídajícími testy pro imunochemický analyzátor Elecsys 2010 (Roche). Ke zpracování dat byl použit statistický software MedCalc (Belgie).

Pro orientační ověření referenčních intervalů udávaných výrobcem jsme stanovili kardiální markery ve vzorcích sér od 28 dárců krve.

Klinické studie

Pro získání zkušeností s panelem kardiálních markerů na přístroji Evidence Investigator (Randox) bylo provedeno několik předběžných klinických studií. Jako příklad je uvedeno sledování kinetiky kardiálních markerů u pacientů s AIM a hodnocení kardiotoxicity cytostatické léčby u hematologických pacientů.

V první skupině byly použity vzorky sér 28 pacientů (47–86 let, 21 mužů, 7 žen) s diagnózou AIM s elevacemi ST segmentů. Diagnóza byla stanovena podle pravidel doporučených Českou kardiologickou společností.

První odběr byl proveden do 6 hodin od vzniku bolesti na hrudi, druhý odběr 24 hodin po odběru prvním a třetí 5. den od přijetí pacienta k hospitalizaci. Byla sledována kinetika analytů v průběhu patologického procesu.

Kardiotoxicita onkologické léčby byla sledována u 21 pacientů (44 \pm 10 let, 14 mužů, 7 žen) s akutní leukémií po chemoterapii antracykliny (kumulativní dávka 448,7 \pm 91,3 mg/m^2).

Přípravný režim představoval podání cyklofosfamidů (celková dávka 120 mg/kg, 60 mg/kg/den v tříhodinových intravenózních infuzích po 2 dny) společně s perorálním podáním busulfanu nebo celotělovým ozařováním. Tato léčba byla následována transplantací kvetvorných buněk. Kardiální markery byly měřeny před a 6, resp. 24 hodin po ukončení předtransplantačního režimu a dále 24 hodin a 14 dní po transplantaci kvetvorných buněk.

Vzorky do těchto studií byly získané ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Krev byla odebrána žilním katétretem a do hodiny byla zpracována v laboratoři (centrifugace 5 min, 3500 otáček/min). Sérum bylo skladováno při -70 °C do analýzy. Projekt byl schválen etickou komisí FN a LF UK v Hradci Králové.

VÝSLEDKY

Správnost a mezilehlá přesnost (reprodukovatelnost) vypočtená z naměřených hodnot kontroly kvality je shrnuta v tabulce (tab. 1). Námi stanovené hodnoty jsou ve shodě s údaji výrobce ve všech parametrech kromě mezilehlé přesnosti u myoglobinu, kde jsme naměřili vyšší hodnoty variačního koeficientu (11,6–15,6 %) než udává výrobce (8,8–9,5 %).

mass a z 90,4 % u MYO). Z klinického hlediska je důležité sledování kinetiky kardiálních markerů. Z našich výsledků vyplývá, že pro kardiologickou diagnostiku lze použít metody obě, ale nelze kombinovat výsledky měření z jednotlivých analyzátorů mezi sebou. Tomu také odpovídá skutečnost, že jsou rozdílné hodnoty cut off udávané jednotlivými výrobci (Elecsys: CK-MB mass = 6,8 µg/l, MYO = 72,0 µg/l a Evidence Investigator: CK-MB mass = 3,9 µg/l, MYO = 59,0 µg/l).

Pro ověření referenčních mezí udávaných výrobcem jsme stanovili hladiny kardiálních markerů u skupiny dárců krve (tab. 3). (Koncentrace jednotlivých analytů, které jsme naměřili v této skupině, přibližně odpovídají údajům o referenčních hodnotách výrobce.)

Klinické studie

Koncentrace kardiomarkerů naměřených ve skupině pacientů s diagnózou akutního infarktu myokardu jsou uvedeny v tabulce (tab. 4).

U všech 28 pacientů byla již při prvním odběru zvýšená koncentrace h-FABP a zároveň dosahovala maximální naměřené hodnoty. Při druhém odběru byla hladina h-FABP podstatně nižší a při třetím již byly všechny hodnoty v referenčních mezích. U myoglobinu byla při prvním odběru naměřena koncentrace nad cut off u 90 % pacientů (s maximem u 85 %). U 15 % pacientů byla maximální naměřená hladina při

Tab. 1. Výsledky hodnocení interní kontroly kvality pro Evidence Investigator Cardiac Array (Randox) (n = 10)

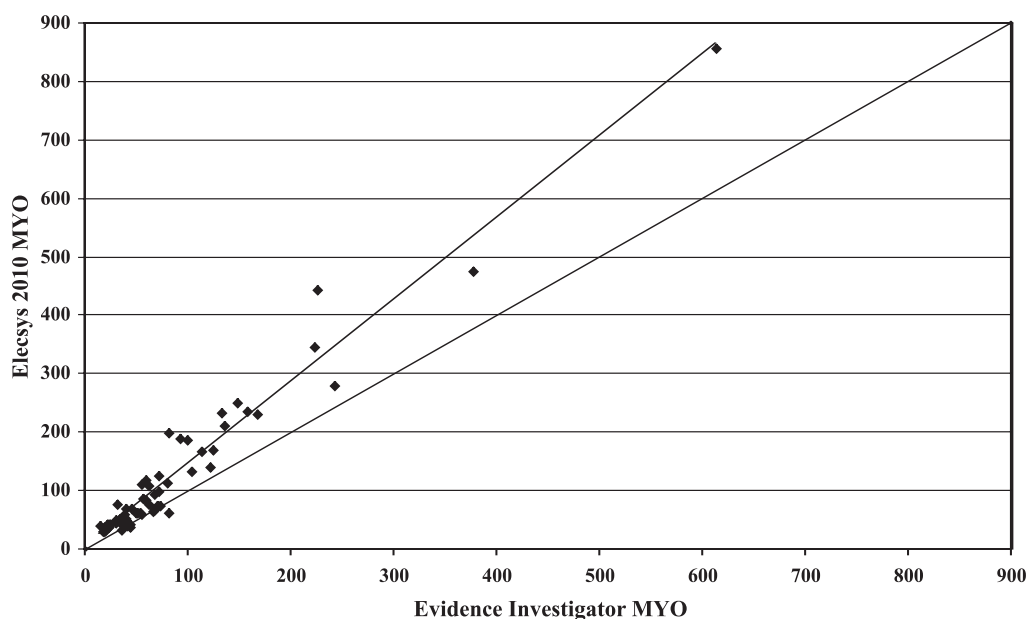
		CK-MB mass	MYO	GPBB	h-FABP	CAIII	cTnl
koncentrace (µg/l)	kontrola 1	3,9	86,3	8,4	3,2	4,0	1,6
	kontrola 2	13,2	124,6	27,9	18,9	29,6	7,0
	kontrola 3	30,9	120,7	68,1	43,8	39,6	12,0
BIAS (%)	kontrola 1	2,0	-7,5	-8,8	-3,2	5,0	-9,1
	kontrola 2	2,8	-6,5	0,8	5,3	-6,0	3,0
	kontrola 3	3,6	-8,1	-1,7	-2,4	-9,9	0,4
CV (%)	kontrola 1	7,5	13,5	6,6	5,0	7,0	8,7
	kontrola 2	6,9	11,6	4,2	5,7	9,3	6,0
	kontrola 3	8,6	15,6	7,9	8,7	9,8	9,0

Tab. 2. Porovnání biočipové technologie Evidence Investigator a rutinně používaného systému Elecsys 2010 (n = 75)

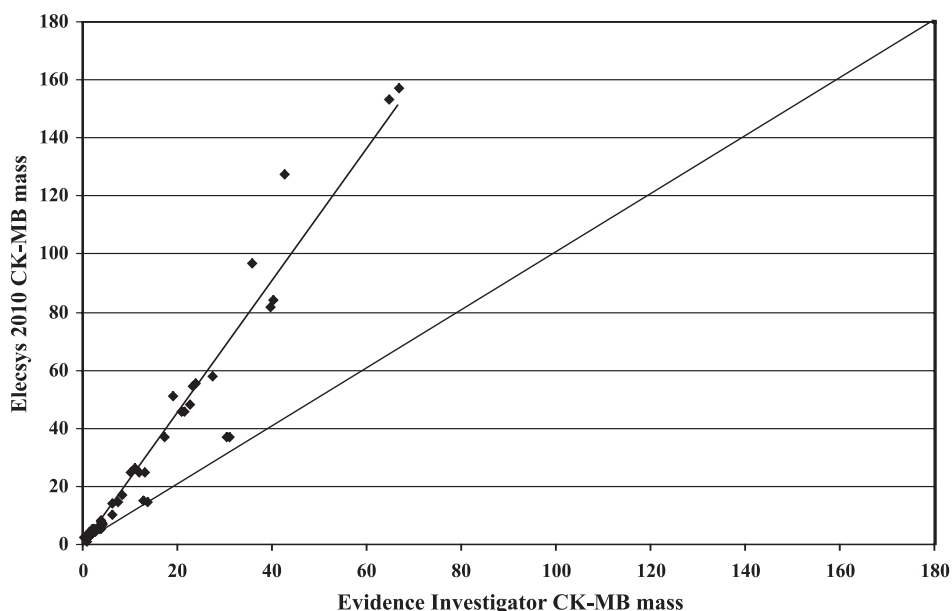
Analyt	Systém	Koncentrace (µg/l)				Shoda (%)
		medián	interkvartil. rozpětí	min.	max.	
CK-MB mass	Elecsys 2010	5,2	2,8–24,9	1,2	156,9	94,5
	Evidence	2,6	1,3–12,6	0,4	66,7	
MYO	Elecsys 2010	62,4	41,3–124,2	29,0	854,9	90,4
	Evidence	52,6	35,1–82,1	15,5	614,3	

Na vybrané sérii vzorků bylo provedeno pro CK-MB mass a myoglobin porovnání výsledků naměřených systémem Evidence Investigator (Randox) a rutinně užívaným analyzátozem Elecsys 2010 (Roche). Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (tab. 2). K hodnocení výsledků byla použita Passing-Bablokova regrese. Výsledky měření na obou systémech vykazovaly statisticky významné rozdíly. Rovnice regrese byly následující: Elecsys = 1,4232 Evidence + 0,4320 (korelační koeficient r = 0,9752) pro myoglobin (graf 1) a Elecsys = 2,0656 Evidence + 0,0946 pro CK-MB mass (r = 0,9748) (graf 2). Absolutní naměřené hodnoty jsou sice číselně nesrovnatelné, ale v rozlišení normálních a patologických koncentrací se metody téměř shodují (z 94,5 % u CK-MB

2. odběru (po 24 hodinách). Obdobně jako h-FABP se koncentrace myoglobinu velmi rychle navracely k normě. Hladina GPBB byla rovněž pozitivní u 90 % pacientů, ale maximální naměřené hodnoty bylo dosaženo pouze u 68 % z nich. Při 3. odběru (5. den) přetrvávala zvýšená hladina GPBB u 65 % pacientů. Z čehož lze usuzovat na pomalejší kinetiku GPBB ve srovnání s myoglobinem a h-FABP. Koncentrace CK-MB mass dosahovala maxima u 75 % pacientů při 2. odběru, přičemž u 3. odběru byly hladiny v 92 % případů v normě. Kardiální troponin I vzhledem ke své pomalé kinetice dosahoval u 20 % pacientů při 1. odběru dokonce koncentrací pod cut off, ale při 2. odběru už byla ve všech případech naměřena zvýšená hladina (u 95 % maximální hodnota).



Graf 1. Passing-Bablokova regrese pro myoglobin Elecsys vs. Evidence Investigator
 $Y = 1,4232 X + 0,4320$
 (95% CI směrnice: od 1,2985 do 1,5867 a 95% CI úseku: od -12,1281 do 5,6862)



Graf 2. Passing-Bablokova regrese CK-MB mass Elecsys vs. Evidence Investigator
 $Y = 2,0656 X + 0,0946$
 (95% CI směrnice: od 1,9238 do 2,1402 a 95% CI úseku: od -0,1761 do 0,3993)

Před hematologickou léčbou byla u všech pacientů koncentrace kardiomarkerů v referenčních mezích. Přípravný režim před transplantací kvetvorných buněk vyvolal u 5 pacientů (24 %) zvýšení hladiny GPBB. U 2 pacientů (9 %) přetrvávala pozitivita ještě 14 dní po transplantaci, což může souviset s předchozí léčbou antracykliny jako projev chronické kardiotoxicity. U jednoho pacienta se zvýšila koncentrace h-FABP po 14 dnech po transplantaci. Ostatní měřené kardiální markery (CK-MB mass, MYO a cTnI) zůstaly v referenčních mezích. Z tohoto lze usuzovat, že GPBB by mohla být možným citlivým markerem subklinické kardiotoxicity při podání hematologické léčby.

Použité hodnoty cut-off pro jednotlivé kardiální markery jsou uvedeny v tabulce 3.

DISKUZE

Pro diagnostiku poškození myokardu existuje v dnešní době široké spektrum biochemických markerů.

Stanovení kardiálních troponinů je doporučeno na prvním místě. I když je stanovení cTnT dobře standardizované, oba troponiny jsou v praxi využívány ve stejné míře, v Evropě vyšetřuje 51 % laboratoří cTnT a 49 % laboratoří cTnI (11). Neustálým problémem stanovení kardiálních troponinů zůstává nízká analytická citlivost metod. Jako cut off pro diagnostiku AIM je doporučována hodnota 99. percentilu zdravé populace stanovená s analytickou přesností (CV%) do 10 % (1). Toto kritérium většina souprav pro stanovení troponinu nesplňuje, i když v současné době již pronikají na

Tab. 3. Koncentrace kardiálních markerů ve skupině 28 dárců krve

	Koncentrace (µg/l)					
	CK-MB mass	MYO	GPBB	h-FABP	CAIII	cTnI
průměr	2,1	39,4	4,3	2,4	23,8	0,18
SD	1,4	18,3	2,4	1,1	13,5	0,07
cut off výrobce	3,9	59,0	7,3	4,5	55,0	0,40

Tab. 4. Průměrné koncentrace kardiálních markerů ve skupině 28 pacientů s AIM

	Koncentrace (µg/l)					
	CK-MB mass	MYO	GPBB	h-FABP	CAIII	cTnI
0–6 hod.	17,7	363,8	46,7	76,6	95,7	3,2
24 hod.	31,7	97,8	18,6	8,4	71,5	18,1
5 dní	3,1	58,9	16,4	3,9	40,7	4,5

trh soupravy s nižšími limity detekce a kvantifikace (high sensitivity troponin), kterými je možné měřit velmi nízké koncentrace troponinu s požadovanou přesností. Stanovení CK-MB mass je doporučeno pro diagnostiku infarktu myokardu pouze v případě, že není možné stanovení troponinů, zůstává však pro rychlou kinetiku markerem první volby při diagnostice reinfarktu. Analýza myoglobinu hraje hlavní roli v časných hodinách po vzniku infarktu myokardu pro svou vysokou negativní prediktivní hodnotu. Prakticky má ale frekvence jeho vyšetření v diagnostice akutního koronárního syndromu sestupný charakter (11).

Po shrnutí poznatků o kardiálních markerech je možné říci, že v mnoha případech je pro pacienta výhodnější komplexní pohled na biochemii kardiálních markerů. Biočipový analyzátor Evidence Investigator (Randox) je první analytický systém, který dovoluje simultánní stanovení klasických kardiálních markerů: troponinu I, myoglobinu a CK-MB mass a nových molekul: GPBB, h-FABP a CAIII, které nejsou zatím v diagnostice AIM rutinně používány.

Výsledky sledování analytických parametrů soupravy souhlasí s daty udávanými výrobcem kromě hodnot naměřených pro myoglobin. U myoglobinu jsme naměřili hodnoty variačního koeficientu vyšší (11,6–15,6 %) než udává výrobce (8,8–9,5 %). Na tuto skutečnost poukazují i další publikované práce (8, 12). Podle našich zkušeností problémem stanovení systémem Evidence investigator zůstává trvale hodnocení kontroly kvality.

Pro porovnání panelu Cardiac Array pro Evidence investigator (Randox) s klasickými imunochemickými postupy jsme vybrali analyzátor Elecsys 2010 (Roche). Získané výsledky z obou systémů vykazovaly statisticky významné rozdíly, jejichž důvodem je slabá standardizace metod a rozdíly v kalibračních metod. V současné době je tudíž pro každý systém potřeba hodnotit výsledky podle rozdílných hodnot cut off a samozřejmě je potřeba především individuálně sledovat trendy v růstu a poklesu koncentrací kardiálních markerů.

Klinická data získaná o nových kardiálních markerech ukazují, že h-FABP je v prvních hodinách po vzniku AIM citlivějším diagnostickým markerem než myoglobin. I když je h-FABP stejně jako myoglobin orgánově nespecifický, vyskytuje se v kosterním svalstvu v daleko menší míře než myoglobin. Jeho společné stanovení s myoglobinem zvyšuje diagnostickou specifitu testu. Vzhledem k odlišnému zastoupení obou proteinů v různých tkáních může být vypočtený poměr h-FABP/MYO užitečný pro odlišení léze myokardu od poškození kosterního svalstva (6).

Karboanhydráza III je dalším markerem používaným k odli-

šení poškození myokardu od kosterního svalstva. Je to cytoplazmatický protein, který se tvoří pouze ve svalectech příčně pruhovaných a nikoliv v myokardu. Dalo by se proto očekávat, že při AIM budou hladiny CAIII v normě. Námi naměřené výsledky ovšem ukazují, že se koncentrace CAIII u některých pacientů během AIM výrazně zvyšuje.

Sérová koncentrace GPBB u pacientů s AIM má v prvních hodinách podobnou kinetiku vzestupu jako myoglobin. Glykogen fosforyláza BB se zatím jeví jako možný časný marker budoucnosti.

U stanovení kardiotoxicity cytostatické léčby cyklofosfamidem se jeví jako použitelný marker glykogen fosforyláza BB, která vykazovala u 24 % pacientů vzestup hladin po podání přípravného režimu před transplantací krevních buněk, a po ukončení léčby se vracela k normálním hodnotám.

Multiplexní analýza systémem Evidence Investigator je vhodná zatím zejména pro výzkumné účely. Nevýhodami tohoto poloautomatického systému zůstávají velký podíl manuální práce a nutnost sběru série vzorků. Firma již ale vyvinula automatický analyzátor, který umožňuje využívat technologii proteinových biočipů i pro statimová vyšetření.

Závěrem je možné říci, že současné stanovení více kardiálních markerů umožní komplexnější pohled na diagnostiku poškození myokardu a využití multiplexního přístupu zvyšuje diagnostickou senzitivitu a specifitu biočipového stanovení ve srovnání s jednotlivými testy. Z tohoto důvodu může být využití čipové technologie v některých situacích vhodné. Relativní nevýhodou však může být nutnost zpracování celého měřeného panelu bez možnosti výběru spektra analytů. Toto by mělo být v budoucnu vyřešeno úpravami panelu na žádost klinického pracoviště.

Zkratky

AIM	– akutní infarkt myokardu
CAIII	– karboanhydráza III
CCD	– charge couple device
CK-MB mass	– MB izoenzym kreatinkinázy (hmotnostní koncentrace)
cTnI	– kardiální troponin I
cTnT	– kardiální troponin T
GPBB	– BB izoenzym glykogen fosforylázy
GPLL	– LL izoenzym glykogen fosforylázy
GPMM	– MM izoenzym glykogen fosforylázy
h-FABP	– srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny
MYO	– myoglobin
SD	– směrodatná odchylka
95% CI	– 95% konfidenční interval

LITERATURA

1. **Thygesen K, Albert JS, White HD.** Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 2173–2195.
2. **Friedecký B, Engliš M, Franeková J, et al.** Doporučení České společnosti klinické biochemie ke stanovení biochemických markerů poškození myokardu. *Klin Biochem Metab* 2008; 16: 50–55.
3. **Horacek JM, Tichy M, Pudil R, et al.** Multimarker approach to evaluation of cardiac toxicity during preparative regimen and hematopoietic cell transplantation. *Neoplasma* 2008; 55: 532–537.
4. **Pudil R, Parizek P, Tichy M, et al.** Use of the biochip microarray system in detection of myocardial injury cause by radiofrequency catheter ablation. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 1726–28.
5. **Mair J.** Glycogen phosphorylase isoenzyme BB to diagnose ischemic myocardial damage. *Clin Chim Acta* 1998; 272: 79–86.
6. **Pelsers MMAL, Hermes WT, Blaty JFC.** Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta* 2005; 352: 15–35.
7. **Liao J, Chan CP, Cheung Y, et al.** Human Heart-type fatty acid-binding protein for on-site diagnosis of early acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2009; 133: 420–423.
8. **Mion MM, Novello E, Altinier S, et al.** Analytical and clinical performance of a fully automated cardiac multi-markers strategy based on protein biochip microarray technology. *Clin Biochem* 2007; 40: 1245–1251.
9. **Vuori J, Huttunen K, Vuotikka P, et al.** The use of myoglobin / carbonic anhydrase III ratio as marker for myocardial damage in patients with renal failure. *Clin Chim Acta* 1997; 265: 33–40.
10. **Beuerle JR, Azzazy HME, Styba G, et al.** Characteristics of myoglobin, carbonic anhydrase III and the myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise and myocardial infarction patients. *Clin Chim Acta* 2000; 294: 115–128.
11. **Collinson P, Pulkki K, Suvisaari J, et al.** How well do laboratories follow guidelines on cardiac markers? The Cardiac Marker Guideline Uptake in Europe Study. *Clin Chem* 2008; 54: 448–449.

Práce byla podpořena výzkumnými záměry MZO 00179906 a MSM 0021620817.

Dodržování jednoduchých zásad zdravého životního stylu má klíčový vliv na prevenci chronických onemocnění

Současný život v rozvinuté společnosti znamená sníženou nutnost pohybu či těžké fyzické práce, stravu chudou na cenné nutrienty, ale bohatou na kalorie, tuky a cukry a vysokou expozici tabákovému kouři. Tím důležitější je role lékařů, kteří by měli populaci informovat a vychovávat ke zdravému životnímu stylu.

Autoři se pokusili jednoduchým, instruktivním a srozumitelným způsobem klasifikovat základní faktory životního stylu a jejich vliv na nejčastější chronická onemocnění. Týkaly se čtyř hlavních faktorů životního stylu: života bez kouření, života s fyzickou aktivitou, s dodržováním zásad zdravé diety a bez výkyvů hmotnosti. Byla sledována souvislost s rizikem diabetu, koronárního onemocnění, mozkové mrtvice a rakoviny.

Studie sledovala 23 153 osob v Německu ve věku 35–65 let. Z původní kohorty 27 548 byly 4000 účastníků vyloučeny pro věk, nedostatečně vyplněný dotazník nebo přítomnost některé

ze čtyř sledovaných nemocí při zařazení do studie. Na konci studie byl sledován výskyt diabetes mellitus (DM), infarktu myokardu (IM), cévní mozkové příhody (CMP) a rakoviny. Průměrná doba sledování byla 7,8 roku. Fyzická aktivita byla definována jako nejméně 3,5 hodiny týdně, výkyv hmotnosti jako BMI nad 30 během života, zdravá dieta jako vysoký příjem ovoce, zeleniny a nízká konzumace masa, nekuřáctví jako celoživotní nekuřáctví. Všechny čtyři faktory byly hodnoceny 1 = zdravé, 0 = nezdravé, tedy celkově v rozmezí 0–4 body.

Během doby sledování se nově diagnostikoval DM u 3,7 %, IM u 0,9 %, CMP u 0,8 % a rakovina u 3,8 %. Méně než 4 % účastníků nemělo žádný zdravý faktor životního stylu, 23,7 % mělo jeden, 35,4 % dva, 27,8 % tři a 9,1 % všechny čtyři. Po vyloučení vlivu věku, pohlaví, vzdělání a zaměstnání se snižovalo riziko všech onemocnění s rostoucím počtem zdravých faktorů životního stylu.

Mezi 924 účastníky s 0 body došlo k 209 onemocněním během 6510 pacient-roků (patient-years, PY), což je 32,1/1000 PY. Když se s touto skupinou s nulovým počtem bodů zdravého

životního stylu, které bylo přiřazeno relativní riziko 1, porovnávalo riziko skupin s 1, 2, 3 a 4 body zdravého životního stylu, riziko progresivně klesalo na 0,51, 0,37, 0,28 a 0,22. Tedy, ti se všemi čtyřmi faktory zdravého životního stylu měli o 78 % (!!!) nižší riziko některé ze sledovaných nemocí. **Pro diabetes to znamenalo snížení rizika o 93 %, pro IM 81 %, pro CMP 50 % a pro rakovinu 36 %.**

Autoři uzavírají, že dodržování jednoduchých pravidel zdravého životního stylu může mít podstatný vliv na vznik chronických onemocnění. I když uvážíme, že limitem studie mohly být subjektivní informace sledovaných i to, že se odehrála pouze v Německu, jedná se o fantastické výsledky.

Jak prosté, milý Watson!

Literatura:

1. **Ford ES, Bergmann MM, Kroger J, Schienkewitz A, et al.** Healthy living is the best revenge: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam Study. *Arch Intern Med* 2009; 169(15): 1355–1262,

E. Králíková

K marihuaně zcela legálně

Kanabinoidy a jejich deriváty obsahují přes 60 biologicky aktivních činidel užívaných v přírodní medicíně již po celá staletí. Hlavní exogenní kanabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) je psychoaktivní ingrediencí marihuany. Nová poznání endogenních kanabinoi-

dů, jako je arachidonoyl ethanolamide, 2-arachidonoyl-glycerol or palmithyloethanolamide a jejich receptory navozují diskuzi o použitelnosti těchto preparátů v současné medicíně. Jsou to důležité mediátory, jejichž úloha však není dosud dostatečně prozkoumána. Zde jsou sumarizovány současné poznatky s ohledem na možné využití v terapii.

Literatura:

1. **Kupczyk P, et al.** Cannabinoid system in the skin – a possible target for future therapies in dermatology. 2009; 669–679.

P. Barták

Speciální sdělení

Posuzování zdravotního stavu a pracovní schopnosti u onemocnění pohybového systému

Čevela R, Čeledová L, Bělohávková J.
Odbor lékařské posudkové služby MPSV ČR, Praha

SOUHRN

Článek seznamuje s novým přístupem k posuzování zdravotního stavu, míry poklesu pracovní schopnosti a invalidity u onemocnění pohybového systému na základě výsledků projektu „Promítnutí pokroků lékařské vědy do funkčního hodnocení zdravotního stavu a pracovní schopnosti ve vztahu k Mezinárodní klasifikaci nemocí a s přihlédnutím k Mezinárodní klasifikaci funkčních schopností“ řešeného Českou lékařskou společností J. E. Purkyně.

Klíčová slova: pohybový systém, posuzování zdravotního stavu, pracovní schopnost.

SUMMARY

Čevela R, Čeledová L, Bělohávková, J. Assessment of health state and working capacity of people suffering from locomotive system diseases

The article informs about a new approach to health state assessment, rate of working capacity decline and incapacity of people suffering from locomotive system diseases. It is based on the project results "Progress of medical science advances reflected in functional health state assessment and working incapacity in relation to International classification of illnesses and International classification of functional abilities" conducted by Czech Medical Association J. E. Purkyne.

Key words: health state assessment, working capacity, locomotive system diseases.

Če.

Čas Léč čes 2009; 148: 597-601

ÚVOD

V předchozím čísle jsme čtenáře seznámili s novým přístupem k posuzování zdravotního stavu, míry poklesu pracovní schopnosti a invalidity u onkologicky nemocných. Další kapitolu, která byla zpracována Českou lékařskou společností J. E. Purkyně (ČLS JEP) v letech 2007–2008 v rámci projektu Ministerstva práce a sociálních věcí „Promítnutí pokroků lékařské vědy do funkčního hodnocení zdravotního stavu a pracovní schopnosti ve vztahu k Mezinárodní klasifikaci nemocí (MKN) a s přihlédnutím k Mezinárodní klasifikaci funkčních schopností“, představují postižení pohybového systému. Podklady zpracované předními odborníky dle jednotlivých kapitol MKN 10 představují základní východisko pro vydání nové vyhlášky o posuzování invalidity, které se jeví jako nezbytné, neboť od 1. ledna 2010 nabývají účinnosti zásadní změny zákona o důchodovém pojištění v oblasti invalidních důchodů; jedná se zejména o invaliditu ve třech stupních (ruší se plná a částečná invalidita), nové vymezení invalidity (jen v závislosti na poklesu pracovní schopnosti)

a stanovení nových posudkových kritérií. Návrh vyhlášky je zpracován na základě nových zmocnění obsažených v § 108 odst. 1 písm. b) zákona č. 155/1995 Sb., o důchodovém pojištění, ve znění zákona č. 306/2008 Sb., a v § 127 odst. 2 zákona č. 582/1991 Sb., o organizaci a provádění sociálního zabezpečení, ve znění zákona č. 479/2008 Sb. Právě tato zmocnění nabývají účinnosti od 1. ledna 2010 a reagují na koncepční změny v oblasti invalidity a invalidních důchodů schválené v rámci tzv. parametrických změn důchodového pojištění.

HODNOCENÍ FUNKČNÍHO POSTIŽENÍ A DISABILITY U POHYBOVÉHO ÚSTROJÍ DLE NÁVRHU NOVÉ VYHLÁŠKY

Z jednotlivých onemocnění z důvodu velkého rozsahu uvádíme pouze příklady, a to jen některých oddílů kapitoly XIII (Nemoci svalové a kosterní soustavy) a kapitoly XV

Adresa pro korespondenci:

MUDr. Bc. Rostislav Čevela
Odbor posudkové služby MPSV ČR
Na Poříčním právu 1, 128 00 Praha 2
e-mail: rostislav.cevela@mpsv.cz

(Funkční poruchy, postižení po úrazech, operacích) nové vyhlášky.

KAPITOLA XIII – NEMOCI SVALOVÉ A KOSTERNÍ SOUSTAVY

Oddíl A – artropatie

Osteoartróza

Osteoartróza (OA) patří k nejčastějším kloubním onemocněním. Postihuje asi 12 % populace a její prevalence stoupá s věkem. Ve věkové skupině nad 70 let se udává výskyt OA až v 50 %. OA kolenního kloubu postihuje 5–15 % lidí ve věku 35–74 let. Častěji jsou postiženy ženy v poměru 2–5 : 1. OA je degenerativní kloubní onemocnění, u kterého dochází k poruše integrity kloubní chrupavky a v návaznosti na ní i ke změnám subchondrální kosti a přilehlých měkkých kloubních tkání a svalstva. OA nejvíce postihuje kyčelní a kolenní klouby, nacházíme ji však běžně i v jiných lokalizacích (páteř, drobné klouby rukou a nohou aj.). Rozlišujeme dvě základní formy onemocnění: primární OA, která se odvíjí od metabolické poruchy chondrocytární syntetické aktivity, a sekundární, nasedající na předcházející patologický kloubní proces.

Primární OA (idiopatická) může být lokalizovaná nebo generalizovaná (postihuje tři a více kloubů nebo kloubních skupin).

Sekundární OA má příčinu mimo chrupavku. Vzniká následkem traumatu, vrozené nebo vývojové vady (např. vrozené vymknutí kyčlí) nebo v důsledku jiného onemocnění (zánětlivá onemocnění kloubů, metabolická onemocnění, akromegalie, hyperparatyreóza, krystalické artropatie, aseptické nekrózy kloubní – např. kyčelní kloub u alkoholiků, při léčení glukokortikoidy, neuropatický kloub), z důvodu mechanického přetížení (osové deviace, nadváha, chronické přetěžování kloubu prací, sport).

Zvláštním typem generalizované OA je tzv. **erozivní osteoartróza**, u které je více vyjádřena zánětlivá komponenta a může být mírně odlišná léčebná strategie. Postihuje ruce a je charakterizovaná přítomností erozí.

Medicínsky i socioekonomicky jsou nejzávažnější lokalizací osteoartrózy kolenní a kyčelní klouby. OA váhonosných kloubů je příčinou bolesti a zhoršení funkčních schopností mnoha nemocných a nejčastější příčinou disability ve společnosti. OA může ovlivňovat stabilitu kloubní, může se projevat jako porucha kloubní osy. OA je v principu kauzálně neléčitelná, proto je nutné akceptovat určitou progresi onemocnění. Při rychlé progresi je nutné zintenzivnit léčebný přístup.

Pracovní neschopnost a stupeň invalidity záleží na tom, které klouby jsou postiženy, zda je postižena dominantní ruka, zda se jedná o rychle progredující nebo erozivní OA. Pravidelné cvičení doma dle instruktáže fyzioterapeuta pomáhá udržovat pracovní schopnost. Významný parametr pro posuzování je rozsah flexe v kolenních a kyčelních kloubech. Je nutné posuzovat konkrétní rozsahy pohybu v kloubu vzhledem ke konkrétnímu povolání. Optimální je provést ergodiagnostické vyšetření v ergodiagnostickém centru.

Pokud rozsah a stupeň OA nemá dopad na funkci kloubů a končetin nebo je dopad jen minimální, není pracovní schopnost snížena. Pro dopad na pracovní schopnost je rozhodující postižení mobility, chůze, stání, sezení, schopnost udržování a změny polohy těla, vstávání a usedání, ohýbání, klek, dřep a schopnosti vykonávání koordinovaných činností při přemísťování a manipulaci s předměty.

Pokud OA působí ve svých důsledcích funkčně významné omezení kloubů a končetin, které způsobuje, že řada denních aktivit je vykonávána s obtížemi, může jít o snížení pracovní schopnosti cca o třetinu. V případech, kdy jde již o neschopnost vykonávat některé běžné denní aktivity, je pracovní schopnost zpravidla snížena o polovinu. V případech, kdy OA

jíž omezuje schopnost vykonávat většinu běžných denních aktivit, jde o neschopnost soustavné práce.

U postižení ručních kloubů dochází k omezení obratnosti, koordinace svalových skupin, k poruchám úchopové funkce ruky a ke snížení síly svalové. Pracovní neschopnost u iritované koxartrózy a gonartrózy je krátkodobá a stupeň invalidity u koxartrózy a gonartrózy je dán stupněm postižení a funkčního omezení dolních končetin. U těžších forem artrózy nosných kloubů jsou vhodná pracovní zařazení vstoje a vsedě s občasným přecházením s vyloučením nošení těžkých břemen.

Kazuistika 1 – artróza hlezenního kloubu

Žena, 49 let, absolventka dvouleté ekonomické školy bez maturity vykonávala vždy práce administrativního charakteru.

V roce 2003 utrpěla zlomeninu v oblasti levého hlezenního kloubu, která byla řešena osteosynteticky, osteosyntetický materiál byl po zhojení odstraněn v roce 2005. Sekundárně došlo ke vzniku těžké artrózy v oblasti horního hlezenního kloubu, která byla jednoznačně verifikována rentgenologickým vyšetřením. Funkčně byla přítomna praktická rigidita kloubu. Postavení kloubu bylo správné.

Příslušná OSSZ hodnotila zdravotní postižení jako ztuhnutí horního hlezenního kloubu v nepříznivém postavení.

Nejednalo se však o relevantní posouzení, neboť u posuzované bylo zcela jednoznačně prokázáno příznivé postavení kloubu. I při tomto nesprávném posouzení však posuzovaná nedosáhla žádného stupně invalidity.

PK MPSV ČR zdravotní postižení zařadila dle přílohy č. 2, vyhlášky 284/1995 Sb. v plném znění do kapitoly XV, oddílu H, položky 61, písmeno a), ve kterém se praví: „Ztuhnutí horního hlezenního kloubu v příznivém postavení“. Procentní míra poklesu schopnosti soustavné výdělečné činnosti odpovídala příslušným 10 %. Nejednalo se o plnou ani o částečnou invaliditu.

Vertebrogenní algický syndrom na podkladě degenerativních změn a retrolistézy při negativním klinickém neurologickém nálezu neomezoval posuzovanou nad rámec základního onemocnění. Z těchto důvodů a z důvodu vhodného pracovního zařazení nebylo shledáno opodstatnění dalšího zvýšení poklesu schopnosti soustavné výdělečné činnosti dle §6, odst. 4 výše uvedené vyhlášky.

KAPITOLA XV – FUNKČNÍ PORUCHY, POSTIŽENÍ PO ÚRAZECH, OPERACÍCH

Oddíl F – postižení končetin

Endoprotézy horních a dolních končetin

Aloplastiky kyčelních kloubů patří dnes k nejčastějším ortopedickým operacím, kdy jsou destruovaná kloubní jamka i hlavice nahrazeny endoprotézou. Endoprotéza kyčelního kloubu se skládá z jamky a dřívku. Velmi časté jsou i totální výměny kolenních kloubů. Vzácnější jsou endoprotézy ramenních a loketních kloubů. Mezi vzácné patří totální endoprotézy radiokarpálního kloubu a metakarpofalangeálních kloubů.

Endoprotézy kyčelních kloubů dělíme dle ukotvení na:

- cementované (obě komponenty – femorální i acetabulární) jsou fixovány kostním cementem,
- necementované, kde jsou komponenty fixovány do kosti bez cementové mezivrstvy,
- hybridní, kde je každá z komponent fixována rozdílnou technikou. Nejčastější indikací k totální endoprotéze kyčelního kloubu je koxartróza.

Dlouhodobé výsledky po implantacích endoprotézu jsou všeobecně velmi dobré, ač jsou pacienti operováni v relativně mladém věku a kvalita kosti je pravidelně snížena dlouhodobou hypoaktivitou a terapií kortikoidy. Oboustranná implanta-

Tab. 1. Návrh vyhlášky o posuzování invalidity – Kapitola XIII Nemoci svalové a kosterní soustavy, oddíl A – artropatie

Položka	Druh zdravotního postižení	Míra poklesu pracovní schopnosti v %
1	<p>Osteoartróza Primární lokalizovaná nebo generalizovaná, sekundární vzniklá následkem traumatu, vrozené nebo vývojové vady, z důvodu mechanického přetížení nebo v důsledku jiného onemocnění, erozivní (postihující ruce, s více vyjádřenou zánětlivou komponentou) <i>posudkové hledisko</i> Při stanovení míry poklesu pracovní schopnosti se hodnotí funkčně významné postižení kloubů, lokalizace osteoartrózy zhoršující mobilitu (kolenní a kyčelní klouby, zejména ve vztahu k dosažení kritických hodnot pro pohyblivost a běžný život), zda je postižena dominantní horní končetina a ruka nebo zda se jedná o rychle progredující nebo erozivní osteoartrózu. Přihlíží se i k případným komplikacím, jako je nekróza kostí, instabilita kloubu. Pro dopad na pracovní schopnost je rozhodující postižení pohyblivosti, schopnosti stání, sezení, změn polohy těla, vstávání a usedání, ohýbání, schopnosti vykonávat koordinované činnosti při manipulaci s předměty, dopad na celkovou výkonnost a schopnost vykonávat denní aktivity.</p>	
1a	lehké formy s lehkým dopadem na funkci kloubů a končetin, pohyblivost a celkovou výkonnost	10
1b	středně těžké postižení s funkčně významným postižením dvou a více velkých/nosných kloubů nebo s funkčně významným omezením většiny malých kloubů rukou nebo nohou, zachovány pohybové schopnosti, snížení celkové výkonnosti, některé denní aktivity vykonávány s obtížemi nebo s využitím kompenzačních mechanismů nebo prostředků	20–35
1c	těžké postižení s funkčně těžkým postižením dvou a více velkých/nosných kloubů nebo s těžkým postižením většiny malých kloubů rukou (zejména narušení úchopu) nebo nohou, se značným omezením pohybových schopností a celkové výkonnosti při středně těžkém zatížení, některé denní aktivity omezeny	40–50
1d	zvláště těžké postižení těžké postižení pohybových schopností, celkové výkonnosti, některé denní aktivity značně omezeny	60–70

ce v jedné době se neosvědčila, mobilizace pacientů je obtížná a operační zátěž značná. Preference je v postupné implantaci v krátkých, minimálně tříměsíčních časových odstupech.

Mezi komplikace TEP patří bolestivost, luxace TEP, peripatetické zlomeniny, heterotopické osifikace, nervová obrna.

Předoperační fyzioterapie (návlek chůze s opěrnými pomůckami, posilování gluteálního svalstva, abduktorů a vnitřních rotátorů, uvolňování hypertonických adduktorů a flexorů) výrazně zkracuje hospitalizaci a pooperační fyzioterapii. Po 3 měsících RTG kontrola, operatér doporučí postupné odkládání berlí, eventuálně doporučí vycházkovou hůl při přetrvávajícím pocitu nejistoty.

Kazuistika 2 – stav po totální endoprotéze (TEP) kyčelních kloubů

Muž, 39 let, absolvent střední školy s maturitou, který byl v minulosti léčen kortikoidy pro glomerulonefritidu, byl sledován pro lehkou formu osteoporózy a pro aseptickou nekrózu hlavic kyčelních a ramenních kloubů. V důsledku této nekrózy mu byly mikroinvasivním přístupem implantovány totální kloubní náhrady obou kyčelních kloubů, pravého kyčelního kloubu v 10/2007, levého kyčelního kloubu v 01/2008.

Příslušná OSSZ posoudila posuzovaného v roce 2007 a 2008 plně invalidním. V roce 2009 nebyl při kontrolní KLP na OSSZ hodnocen plně ani částečně invalidní.

Jizvy po operaci obou kyčelních kloubů byly zhojeny a stav byl stabilizován. Funkce kloubů byla odpovídající pooperačnímu stavu, kde flexe se pohybovala mezi 90–100 stupni. Dle rentgenologického vyšetření byly kloubní náhrady správně umístěné, známky uvolnění nebyly zjištěny. Posuzovaný byl schopen chůze bez opory a bez ortopedických pomůcek.

Na obou ramenních kloubech byla také popsána aseptická nekróza hlavic ramenních kloubů. U obou ramenních kloubů došlo během několika měsíců ke zhoršení jejich funkce, od prakticky normální rozsahu pohybu až po abdukci do 75 stupňů a omezenou rotaci o 1/3.

Osteoporóza byla lehkého stupně, kdy se T-skóre pohybovalo v rozmezí -1,7/-2,1. Z důvodu osteoporotického postižení nebylo zjištěno podstatné snížení výkonnosti a pohyblivosti, nebyla zjištěna ani zvýšená lomivost, těžké deformace apod.

Základní onemocnění – chronická ledvinová nedostatečnost na podkladě chronické glomerulonefritidy byla relativně stabilizovaná. Na základě komplexních vyšetření urologického pracoviště se jednalo pouze o mírnou formu chronické ledvinové nedostatečnosti, léčba kortikoidy již byla z důvodu osteoporózy a aseptických nekrosů v minulosti ukončena.

PK MPSV ČR se neztotožnila s posudkem OSSZ a zdravotní postižení hodnotila jako nadále odpovídající částečné invaliditě. Zdravotní postižení bylo hodnoceno dle kapitoly XV, oddílu H, pol. 50.2, přílohy č. 2 vyhlášky 284/1995 Sb. v plném znění, ve které se praví: „Endoprotézy kyčelních, kolenních kloubů – oboustranná (totální endoprotéza)“. Posudkově bylo s ohledem na relativně dobrou hybnost obou kloubních náhrad hodnoceno na dolní hranici procentního rozmezí (40–70 %), tj. 40 %. Pro snížení této hranice ve smyslu § 6 odst. 5 výše citované vyhlášky nenalezla komise, s ohledem na zhoršující se, tj. nestabilní stav na ramenních kloubech, důvod.

Taktéž nebyl nalezen důvod pro hodnocení na horní hranici procentního rozmezí, tj. plně invalidním, neboť u posuzovaného nebyla pohyblivost operovaných kloubů těžce omezena, nebyla zjištěna porucha motorické inervace, výrazné svalové atrofie či zkrácení končetiny více než o 4 cm.

Ztráty horních a dolních končetin a jejich částí

Ztráty horní a dolní končetiny jsou výsledkem chorob, které vedou k indikaci amputace končetiny. Jsou to: choroby končetinových cév, traumata, tumory, infekce, kongenitální anomálie, poranění a onemocnění nervová. U ztrát končetin je nutná kvalitní ucelená rehabilitace včetně spolupráce s psychologem.

Amputace je odstranění periferní části těla včetně krytu měkkých tkání s přerušením skeletu, která vede k funkční anebo kosmetické změně s možností dalšího protetického

Tab. 2. Návrh vyhlášky o posuzování invalidity – Kapitola XV Funkční poruchy, postižení po úrazech, operacích, oddíl B – postižení končetin

Položka	Druh zdravotního postižení	Míra poklesu pracovní schopnosti v %
1	Ztráty končetin, jejich částí <i>posudkové hledisko</i> Míra poklesu pracovní schopnosti se stanoví podle omezení fyzické výkonnosti, pohyblivosti, chůze, stání, schopnosti koordinace pohybů, funkčního postižení ruky, manipulace a přenášení předmětů, dopadu na schopnost vykonávat denní aktivity, s přihlédnutím k dominanci horní končetiny.	
1a	anatomická ztráta jedné končetiny nebo ztráta končetiny s krátkým pahýlem stehna nebo paže, bez možnosti kompenzace protézou	70
1b	anatomická ztráta části dolní končetiny ve stehně nebo ztráta horní končetiny v paži s ohledem na dominanci	50–60
1c	anatomická ztráta dolní končetiny v bérce nebo ztráta horní končetiny v předloktí s ohledem na dominanci	35–45
1d	anatomická ztráta ruky nebo částečná ztráta ruky s úplnou ztrátou úchopu s ohledem na dominanci, nebo ztráta nohy	35
1e	anatomická ztráta části ruky s ohledem na dominanci při částečně zachované funkci úchopu nebo ztráta palce ruky s ohledem na dominanci při částečně zachované funkci úchopu nebo ztráta části nohy v nártu nebo ztráta části nohy v záprstí	25–30
1f	anatomické ztráty několika prstů jedné ruky při zachovaném úchopu nebo ztráta několika prstů nohy nebo nohou (kromě palce nohy)	5–15
1g	anatomické ztráty několika prstů na obou rukách při zachovaném úchopu nebo ztráta palce či obou palců na nohách nebo ztráta několika prstů nohy včetně palce nohy	15–25
1h	kombinované anatomické ztráty částí dvou končetin nebo podstatných částí končetin (v paži, ve stehně), podle rozsahu a významnosti ztráty, ztráty dominantní horní končetiny, dopadu postižení na funkci končetin, na pohyblivost, schopnost chůze, stání, koordinaci pohybů, manipulaci a přenášení předmětů	40–70
1i	anatomické ztráty dvou končetin nebo částí tří končetin	80
2	Endoprotézy na horních končetinách, endoprotézy ramenního kloubu, loketního kloubu <i>posudkové hledisko</i> Míra poklesu pracovní schopnosti se stanoví jen při prokázání omezení rozsahu pohybu, svalové síly a funkce končetiny pro manipulaci a přenášení předmětů a denní aktivity, podle rozsahu funkční poruchy.	
2a	lehké poruchy, lehké omezení hybnosti a funkce	10
2b	středně těžké poruchy, s poruchou motorických funkcí končetiny, svalovými atrofiemi, podstatným omezením hybnosti v kloubu, některé denní aktivity omezeny s ohledem na dominanci končetiny	25–35
2c	těžké poruchy, uvolňování, zánětlivé komplikace, těžké poruchy hybnosti paže	50–70

ošetření. Exartikulace se od amputace liší pouze v tom, že periferie je odstraněna v linii kloubu. Resekce je odstranění interkalárního segmentu pouze s částí měkkých tkání, přičemž tento defekt může být lokálně nahrazen. Účelem těchto rekonstrukčních výkonů je eliminace onemocnění anebo funkčního postižení se snahou o dosažení návratu lokomoce nebo částečné funkce.

V pooperačním období je nutný dlouhodobý rehabilitační plán na bázi ucelené rehabilitace. Správné bandážování, časné „otuzování“ pahýlu a polohování pahýlu, prováděné v rámci rehabilitačního ošetřovatelství nebo fyzioterapie je předpokladem pro možnost kvalitního oprotézování. Ve světě v posledních desetiletích nastal odklon od měkkého bandážování pahýlu směrem k rigidní sádrové fixaci, která je po týdnu měněna. Tento postup by měl bránit otoku, chránit pahýl, podporovat hojení a formování pahýlu, bránit rozvoji kontraktur. Na ortopedických pracovištích se používá stále také měkké elastické bandážování pahýlu se stejně dobrými výsledky.

Existuje také možnost přímo na operačním sále provést odlietek protézy a naložit prvotní jednoduchou protézu přímo na čerstvý amputační pahýl.

Každá amputace at horní, nebo dolní končetiny je zásah do psychiky nemocného, proto je důležitá psychologická, eventuálně psychiatrická péče.

Po amputaci dominantní horní končetiny je nutné přecvičování

na nedominantní horní končetinu. Nepostradatelné jsou pro pacienta pomůcky pro „funkčně jednoruké“. U ztrát končetin je velmi důležitý nácvik sebeobsluhy – osobní hygiena, sebesycení, příprava stravy, oblékání. Nácvik lokomoce školou chůze pro amputované se provádí intenzivně v rehabilitačních ústavech a centrech technické pomoci. Možné je také absolvovat kondiční jízdy speciální autoškoly pro občany s úpravou spojky, brzdy a plynu na ruční ovládání při postižení dolních končetin nebo absolvování celé autoškoly pro zdravotně postižené, nevlastní-li občan řidičský průkaz.

Komplexní rehabilitační péči o amputované zabezpečují rehabilitační ústavy a specializovaná centra technické pomoci.

Při postižení funkce horních končetin ztrátovým poraněním, vrozenými nebo získanými vadami, následky po úrazech, zánětlivými i degenerativními onemocněními je pro stanovení míry poklesu soustavné výdělečné činnosti nutné vycházet z toho, zda se jedná o postižení dominantní či nedominantní končetiny.

Mladí pacienti po amputacích dolní končetiny mají pouze nevelké životní omezení a dobré protetické vybavení umožňuje i kvalitní profesi. Starší spoluobčané zejména polymorbidní se hůře učí nácviku chůze na vysoké protéze, eventuálně na dvou protézách, funkční omezení bývá větší, dosahuje upoutání na vozík pro invalidy. U pacientů po amputaci horní končetiny transumerální volí operatér délku pahýlu tak, aby

následné protetické vybavení umožňovalo určitou stabilizaci lokte v libovolné poloze flexe/extenze i rotace.

Amputace ruky vždy znamenají velkou funkční ztrátu, zachování proximální řady karpu umožňuje pronosupinační pohyby pažlu protězy. Protetické vybavení je převážně kosmetické. Možnost myoelektrické protězy výrazně zlepšila kvalitu života nemocného.

Traumatické defekty ruky by po základním ošetření měly být řešeny definitivně na specializovaných plastických pracovištích zabývajících se chirurgií ruky nebo mikrochirurgií.

Ztráta ruky je hendikepující pro pacienta, velikost funkčního postižení je závislá na tom, zda se jedná o dominantní končetinu či nedominantní.

Pokles pracovní schopnosti po amputačních ztrátách končetin vyplývá z reziduálního omezení fyzické výkonnosti a mobility (schopnost chůze, stání, sezení), schopnosti koordinace pohybů a manipulace a přenášení předmětů.

Úplné ztráty končetin, zejména dominantních, působí zpravidla neschopnost soustavně pracovat, pokud nejsou vytvořeny zcela mimořádné pracovní podmínky.

Částečné ztráty končetiny/končetin podmiňují pokles pracovní schopnosti o třetinu; rozsáhlejší ztráty nebo kombinované částečné ztráty podmiňují pokles pracovní schopnosti zpravidla polovinu, podle rozsahu funkčních důsledků, kvalifikace a adaptace.

Kazuistika 3 – traumatická amputace prstů dominantní ruky

Muž, 59 let, vyučený zámečnický vykonával vždy dělnické profese.

Posuzovaný v minulosti prodělal amputační ztrátu posledních dvou článků II. prstu a celého III. až V. prstu dominantní ruky. Zároveň byl sledován pro artrózu s omezenou hybností levého ramenního kloubu, která byla řešena akromioklavikulární resekci.

Příslušnou OSSZ byl posuzovaný opakovaně posouzen částečně invalidním pro dekompenzovanou artrózu levého ramenního kloubu.

PK MPSV ČR byl posouzen shodně částečně invalidním, ale nikoliv pro artritické postižení ramenního kloubu, nýbrž na ztrátové poranění prstů na dominantní ruce. Funkce levé ruky nebyla včetně jemné motoriky dobře zachována, úchop byl možný pouze mezi palcem a proximálním článkem II. prstu, ruku nebylo možné dát v pěst. Posuzovaný se přeúčil na praváka. Levou ruku používal pouze jako ruku pomocnou. Nelze vyloučit, že z důvodu jejího přetěžování došlo ke vzniku artritického postižení levého ramenního kloubu, které bylo následně řešeno operativně – akromioklavikulární resekci. Hybnost operovaného ramenního kloubu byla omezena, abdukce se rovnala 70 stupňům, zevní i vnitřní rotace byla omezena o 1/3 původního rozsahu.

Zdravotní postižení komise zařadila do kapitoly XV, oddílu H, položky 30 přílohy č. 2, vyhlášky 284/1995 Sv. v plném znění, tj. „Ztráta tří prstů ruky s výjimkou palce dominantní končetiny“. Ze zde uvedeného rozmezí poklesu schopnosti soustavné výdělečné činnosti 25–30% bodů zvolila s ohledem na souběžné postižení levého ramenního kloubu horní hranici a dle § 6 odst. 4 výše uvedené vyhlášky ji s ohledem na profesi zvýšila o 10 %. Celkový 40% pokles schopnosti soustavné výdělečné činnosti odpovídal částečné invaliditě.

ZÁVĚR

V kapitole XIII – Nemoci svalové a kosterní soustavy – vychází obecné posudkové zásady při hodnocení míry poklesu pracovní schopnosti z funkčního postižení pohybového systému. Přitom je třeba zhodnotit, zda jde o zánětlivé, systémové nebo degenerativní postižení, jeho lokalizaci, rozsah a tíži, aktivitu, stupeň strukturálního postižení, zda je postižen

jeden nebo více kloubů, postižení funkce kloubů, přítomnost mimokloubních příznaků, stupeň alterace celkového stavu. Je nutno vzít v úvahu i dosavadní vývoj postižení, tzn. rychlost progresu, odpověď na léčbu a eventuálně komplikace léčby. Pro stanovení míry poklesu pracovní schopnosti je rozhodující dopad zjištěných skutečností na celkovou výkonnost, pohybové schopnosti, schopnost zvládat denní aktivity a na kvalitu života. Pro hodnocení funkčního postižení se využívají dotazníky na hodnocení funkce, kvality života, algofunkční indexy atd. a posouzení funkčních důsledků postižení pohybového a nosného ústrojí a funkčních schopností podle Mezinárodní klasifikace funkčních schopností, disability a zdraví. Samotné degenerativní změny bez funkční poruchy nebo provedená operace na pohybovém systému, která má dobrý funkční výsledek, nepodmiňují pokles pracovní schopnosti.

V kapitole XV – Funkční poruchy, postižení po úrazech, operacích – se při hodnocení míry poklesu pracovní schopnosti vychází z funkčního postižení, na kterém se podílí jak postižení nosného a pohybového systému, tak i postižení funkce dalších orgánů a systémů. Přitom se hodnotí zejména postižení výkonnosti, pohyblivosti (chůze, stání), schopnost koordinace pohybů, přenášení a manipulace s předměty, schopnost vykonávat denní aktivity. Dopad na pracovní schopnost mají rozsah a tíže postižení funkce orgánů nebo tělesných systémů, anatomické nebo funkční ztráty končetin nebo jejich částí, muskuloskeletální změny, narušení pohyblivosti kloubů a končetin, lymfédém, neuropatie, poruchy mluvení, přijímání potravy, zažívání, močení, defekace, chronická bolest, psychické změny, poruchy smyslů, výsledek operačního výkonu, popř. estetické postižení. Samotné proděláné úrazy, operace, implantace kloubní náhrady s dobrým funkčním výsledkem nepůsobí pokles pracovní schopnosti.

Zkratky

MPSV ČR	– Ministerstvo práce a sociálních věcí České republiky
OSSZ	– okresní správa sociálního zabezpečení
OA	– osteoartróza
PK	– posudková komise
WHO	– Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

LITERATURA

1. **Dungl P, a kol.** Ortopedie. Praha: Grada 2005; 1273 s.
2. **Jarošová H, Votavová M, Pavelka K.** Kapitola XIII – Nemoci svalové kosterní soustavy Závěrečné zprávy projektu výzkumu MPSV ČR HR163/07 „Promítnutí pokroků lékařské vědy do funkčního hodnocení zdravotního stavu a pracovní schopnosti ve vztahu k Mezinárodní klasifikaci nemocí a s přihlédnutím k Mezinárodní klasifikaci funkčních schopností. Praha: MPSV 2008; s. 215.
3. **Neušimlová S, Růžička E, Tichý J, et al.** Neurologie. Praha: Galén 2002; 351 s.
4. **Olejárová M, Prokeš M.** Praktická revmatologie. Praha: Apotex; 172 s.
5. **Pavelka K, Rovenský J.** Klinická revmatologie. Praha: Galén 2003; 952 s.
6. **Pavelka K, a kol.** Farmakoterapie revmatických onemocnění. Praha: Grada 2005. 434 s.
7. **Poděbradský J, Vařeka I.** Fyzikální terapie I a II. Praha: Grada 1998; s. 264, 176.
8. **Sosna A, Vavřík P, Krbec M, Pokorný D, a kol.** Základy ortopedie. Praha: Triton 2001; 175 s.
9. **Žvák I, Brožík J, Kočí J, Ferko A.** Traumatologie ve schématech a RTG obrazech. Praha: Grada 2006; 205 s.
10. Vyhláška č. 284/1995 Sb., kterou se provádí zákon o důchodovém pojištění, ve znění pozdějších předpisů
11. Návrh vyhlášky, kterou se stanoví procentní míry poklesu pracovní schopnosti a náležitosti posudku o invaliditě a upravuje posuzování pracovní schopnosti pro účely invalidity

Speciální sdělení

Efektivita léčby patologického hráčství – pilotní studie

Nešpor K, Scheansová A.

Psychiatrická léčebna Bohnice a Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha

SOUHRN

V této nekontrolované pilotní studii uvádíme, k jakým změnám došlo během léčby u patologických hráčů. Náš soubor tvořilo 47 osob, které docházely na ambulantní skupinovou terapii. Kromě značných finančních úspor jsou při léčbě nápadná zejména zlepšení v oblastech vztahů, spánku, soustředění, paměti a výkonnosti.

Klíčová slova: patologické hráčství, hazardní hry, léčba, skupinová psychoterapie, ambulantní léčba.

SUMMARY

Nešpor K, Scheansová A. Pathological gambling – a pilot study of treatment effects

We describe the changes during the treatment of pathological gambling. 47 outpatients undergoing group psychotherapy participated in this uncontrolled study. Considerable improvements of their financial situation, relationships, sleep quality, concentration and productivity were observed.

Key words: pathological gambling, therapy, group psychotherapy, outpatient treatment.

Ne.

Čas Lék Čes 2009; 148: 602–603

ÚVOD

Poměrně často se setkáváme s otázkou, jak efektivní je léčení pro patologické hráčství. Už jedna z prvních prací na toto téma prokázala efektivitu desenzitizace ve fantazii (1). Petry et al. (2) doložili efektivitu krátké intervence pro problémové a patologické hráčství. Dannon et al. (3) zjistili účinnost SSRI, topiramatu a naltrexonu v této indikaci. Dowling et al. (4) uvedli příznivé výsledky u žen léčených kognitivně-behaviorální terapií. Petry et al. (5) uvádějí dobré výsledky při použití kognitivně behaviorální terapie. Abstinenci usnadňovaly i návštěvy setkání svépomocné organizace. Citovaná autorka proto doporučuje kognitivně behaviorální terapii kombinovat s účastí na setkáních svépomocné organizace. O účinnosti psychologické léčby pro patologické hráčství svědčí metaanalýza autorů Pallesena et al. (6). Užitečná je také rodinná terapie (7). V posledních letech se často objevuje názor, že při posuzování výsledků léčby je kromě abstinence správné brát v úvahu i další okolnosti života, například mezilidské vztahy, pracovní uplatnění, kvalitu života nebo nepřítomnost trestné činnosti.

Cílem této naší pilotní studie bylo získat základní informaci o tom, jaký efekt má léčba patologického hráčství u lidí, kteří se ambulantně léčí, ať už po předchozí ústavní léčbě nebo bez ní.

POUŽITÉ METODY

Pro účely této studie jsme vytvořili původní dotazník. Ten jsme administrovali klientům, kteří docházejí z nechráněného prostředí na ambulantní skupinovou terapii patologických hráčů. Dotazník byl anonymní a jeho první čtyři otázky odpovídaly kritériím pro patologické hráčství Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10). Do hodnocení jsme zahrnuli pouze ty dotazníky, v nichž respondenti odpověděli kladně na všechny tyto čtyři otázky.

Soubor tvořilo 47 osob (45 mužů a 2 ženy). Průměrný věk činil 36,9 roku (SD = 10,0). Předchozí ústavní léčbu podstoupilo 29 osob. Délka ambulantní léčby činila 4 dny až 9 let, průměr 264 dní, medián = 90.

VÝSLEDKY

Počet dní, kdy při ambulantní léčbě respondenti abstinovali, činil 4 dny až 9 let, $x = 256$ dní, medián = 85 dní.

Finanční ztráty v důsledku hazardu před léčbou za období, které odpovídalo délce ambulantní léčby (tedy tzv. zrcadlový design), činily v průměru 1 570 590 Kč, medián = 200 000 Kč na osobu.

Finanční ztráty kvůli hazardu při ambulantní léčbě nemělo

Adresa pro korespondenci:

MUDr. Karel Nešpor, CSc.

Psychiatrická léčebna Bohnice a Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví

Ústavní 91, 181 02 Praha 8

fax: +420 284 016 279, e-mail: nespor.k@seznam.cz

žádné 40 respondentů, u zbývajících sedmi činily tyto ztráty v průměru 60 672 Kč (od 1 do 250 000, medián = 12 000). Průměrná úspora při léčbě činila u jednoho klienta 1 556 802 Kč (od 2000 Kč do 44 milionu Kč, medián = 150 000 Kč). Velmi důležité je zlepšení kvality života respondentů, jak o tom svědčí následující přehled.

Změna kvality života při ambulantní léčbě pro patologické hráčství

Jak se změnila rodinná vztahy během nynější ambulantní léčby oproti stavu před léčbou?

Zlepšily se podstatně 21×, zlepšily se 21×, nezměnily se 2×, zhoršily se 2×, velmi se zhoršily 1×, neodpověděly 1×.

Jak se změnil sexuální život během nynější ambulantní léčby oproti stavu před léčbou?

Zlepšil se podstatně 9×, zlepšil se 19×, nezměnil se 17×, zhoršil se 1×, velmi se zhoršil 1×.

Jak se změnila pracovní vztahy během nynější ambulantní léčby oproti stavu před léčbou?

Zlepšily se podstatně 12×, zlepšily se 17×, nezměnily se 14×, zhoršily se 1×, velmi se zhoršily 3×.

Jak se změnil během nynější ambulantní léčby spánek oproti stavu před léčbou?

Zlepšil se podstatně 19×, zlepšil se 21×, nezměnil se 7×, zhoršil se 0, velmi se zhoršil 0.

Jak se změnila paměť a soustředění během nynější ambulantní léčby oproti stavu před léčbou?

Zlepšily se podstatně 15×, zlepšily se 28×, nezměnily se 4×, zhoršily se 0, velmi se zhoršily 0.

Jak se změnil během nynější ambulantní léčby pocit duševního zdraví oproti stavu před léčbou?

Zlepšil se podstatně 23×, zlepšil se 21×, nezměnil se 3×, zhoršil se 0, velmi se zhoršil 0.

Jak se změnila během nynější ambulantní léčby výkonnost oproti stavu před léčbou?

Zlepšila se podstatně 12×, zlepšila se 27×, nezměnila se 8×, zhoršila se 0, velmi se zhoršila 0.

Jak se změnila během nynější ambulantní léčby finanční situace oproti stavu před léčbou?

Zlepšila se podstatně 9×, zlepšila se 25×, nezměnila se 10×, zhoršila se 2×, velmi se zhoršila 1×.

DISKUZE

Nápadné je zejména subjektivní zlepšení vztahů, spánku, soustředění, paměti a výkonnosti. Uvědomujeme si, že tato naše práce má metodologické nedostatky. Vysoké hodnoty směrodatných odchylek svědčí pro heterogenost souboru. Studie zahrnuje pouze osoby, které docházejí na ambulantní

skupinovou terapii. Lze namítnout, že ti, kdo nedocházejí, na tom nebudou tak dobře. Na druhou stranu je ale možné, že u lidí s počínajícími problémy postačila ke zvládnutí stavu krátká intervence a předání svépomocné příručky (8). Tito lidé pak možná necítili při abstinenci potřebu se dlouhodobě ambulantně léčit.

Další možnou námitkou je skutečnost, že v této práci vycházíme výlučně z informací poskytovaných klienty. Ověřovat výši prohraných částek před léčbou by ovšem bylo metodologicky velmi náročné. Vyžadovalo by to mnohem nákladnější a pracnější prospektivní studii.

ZÁVĚR

I když má předkládaná pilotní práce metodologické nedostatky, jednoznačně ukazuje na pozitivní efekt léčby v různých oblastech života patologických hráčů. Zvláště nápadné je zlepšení v oblasti vztahů, spánku, soustředění, paměti a výkonnosti.

LITERATURA

1. **McConaghy N, Armstrong MS, Blaszczyński A, Allcock C.** Controlled comparison of aversive therapy and imaginal desensitization in compulsive gambling. *Br J Psychiatry* 1983; 142: 366–372. Nahrávka desenzitizace v češtině je zdarma ke stažení na www.drnespor.eu.
2. **Petry NM, Weinstock J, Ledgerwood DM, Morasco B.** A randomized trial of brief interventions for problem and pathological gamblers. *J Consult Clin Psychol* 2008; 76: 318–328.
3. **Dannon PN, Lowengrub K, Musin E, Gonopolsky Y, Kotler M.** 12-month follow-up study of drug treatment in pathological gamblers: a primary outcome study. *J Clin Psychopharmacol* 2007; 27: 620–624.
4. **Dowling N, Smith D, Thomas T.** Treatment of female pathological gambling: the efficacy of a cognitive-behavioural approach. *J Gamb Stud* 2006; 22: 355–372.
5. **Petry NM, Ammerman Y, Bohl J, Doersch A, Gay H, Kadden R, Molina C, Steinberg K.** Cognitive-behavioral therapy for pathological gamblers. *J Consult Clin Psychol* 2006; 74: 555–567.
6. **Pallesen S, Mitsem M, Kvale G, Johnsen BH, Molde H.** Outcome of psychological treatments of pathological gambling: a review and meta-analysis. *Addiction* 2005; 100: 1412–1422.
7. **Hodgins DC, Toneatto T, Makarchuk K, Skinner W, Vincent S.** Minimal treatment approaches for concerned significant others of problem gamblers: a randomized controlled trial. *J Gamb Stud* 2007; 23: 215–230.
8. **Nešpor K.** Už jsem prohrál dost. Praha: Sportpropag 2006; 130. Zdarma ke stažení z www.drnespor.eu.

Materiály určené pacientům (zdarma)

Příručka „Už jsem prohrál dost“: www.drnespor.eu/hahra06d.pdf
Desenzitizace ve fantazii: www.drnespor.eu/dv4.mp3
Svépomoc pro patologické hráčství (video): www.youtube.com/watch?v=E1CWM8MH94k

Děkujeme MUDr. Miloslavu Kopečkovi, Ph.D. za připomínky k textu.

Abstrakta

Mezinárodní konference Analytical Cytometry V Olomouc, 5.–8. září 2009

Ve dnech 5. až 8. září 2009 se v Olomouci konala mezinárodní konference Analytical Cytometry V. Konferenci organizovala Česká společnost pro analytickou cytometrii ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Olomouc, Biofyzikálním ústavem AV ČR, v.v.i., Brno, Univerzitou Palackého v Olomouci, Českou imunologickou společností, Českou hematologickou společností ČLS J. E. Purkyně a Českou společností alergologie a klinické imunologie.

Česká společnost pro analytickou cytometrii byla založena v roce 2001 a sdružuje odborné pracovníky zabývající se aplikací průtokové cytometrie v základním teoretickém a aplikovaném klinickém výzkumu (www.csac.cz).

Již v pořadí V. konference byla výjimečná v tom, že se poprvé podařilo sloučit část základního výzkumu a část klinickou, která dosud probíhala samostatně v rámci Dnů průtokové cytometrie v Nemocnici Na Homolce. Konference se uskutečnila v Olomouci, v nádherných prostorách Uměleckého centra Univerzity Palackého – Konviktu pod záštitou rektora Univerzity Palackého prof. RNDr. L. Dvořáka, CSc.

Odborné přednášky byly rozděleny do dvou částí. První den byl věnován plenárním přednáškám, které byly prezentovány zahraničními přednášejícími. Témata byla různorodá pokrývající širokou škálu biologického a rostlinného výzkumu stejně jako klinických aplikací. Přednášející představují absolutní špičku ve svém oboru a tomu odpovídala i odborná úroveň jejich sdělení. V. Ouředník konferenci zahájil plenární přednáškou „Per aspera ex astra – the cell from a cosmic perspective“, ve které nesmírně poutavým způsobem prezentoval nejmodernější poznatky historie vzniku kosmu a života na Zemi. Následovaly přednášky zahraničních přednášejících: D. Basiji: Emerging Clinical Applications of Imaging Flow Cytometry, S. Boettchera: Multicolor flow cytometry for classification and minimal residual disease follow-up in B cell malignancies, DH. Busche: Stem-cell like plasticity of distinct subsets of antigen-specific CD8+ T cells, Ger van den Engheho: Application of flow cytometry and cell sorting in marine microbiology, T. Horna: Development of cellular assays for automated microscopy to measure multiple parameters by single cell high content analysis, L. Rauové: Mechanisms underlying thrombosis in heparin induced thrombocytopenia, J. Ouředníkové: Since when was genius found respectable or

honesty in science, A. Tomera: Flow cytometric analysis of platelet activation process – *in vitro* and *ex vivo* a T. Horna: Development of cellular assays for automated microscopy to measure multiple parameters by single cell High Content Analysis.

V dalších dvou dnech pak proběhly prezentace 47 odborných sdělení, jejichž autoři byli vyzváni organizátory k prezentaci. Paralelně probíhaly sekce s tématy pokrývající metodologickou oblast průtokové cytometrie, aplikaci do rostlinného nebo experimentálního klinického výzkumu. Byly prezentovány práce zahrnující metodologie třídění buněk, digitální mikroskopie a příbuzných nejmodernějších optických metod včetně obrazové analýzy a využití DNA čipů. Klinická část probíhala ve dvou sekcích. V první byly prezentovány práce týkající se postavení T regulačních lymfocytů a jejich uplatnění v současné diagnostice. Přednášky S. Blažičkové, T. Eckschlagera, V. Krále se věnovaly úloze T regulačních lymfocytů u autoimunitních a nádorových onemocnění, L. Sedláčková prezentovala možnosti průtokové cytometrie v diagnostice potravinových alergií. Druhá část byla věnována zejména oblasti hematookologie, kde pracoviště ve FN Motol s představiteli O. Hrušákem, E. Mejstříkovou a T. Kalinou představuje mezinárodní špičku v této oblasti.

Na závěr konference byly vybrány nejlepší prezentace formou přednášky a formou posterů, jejichž autoři obdrželi finanční odměnu.

Úroveň konference byla na velice vysoké odborné úrovni a organizátory potěšil pozitivní ohlas z úst zahraničních i domácích účastníků. Ti ocenili prvotřídní organizátorské schopnosti týmu doc. J. Doležela, nádherné prostředí konání konference – Uměleckého centra Palackého Univerzity – Konviktu a především velice vysokou odbornou úroveň prezentovaných přednášek a prací. Příští konference se bude konat za 2 roky v Praze.

MUDr. Miroslav Průcha, Ph.D.

Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie

Nemocnice Na Homolce

Roentgenova 2, 150 30 Praha 5

e-mail: miroslav.prucha@homolka.cz

Per aspera ex astra - the cell from a cosmic perspective Ouředník V.

Department of Biomedical Sciences, Iowa State University, Ames, Iowa, USA; e-mail: voured@iastate.edu and Center for Astrophotography, Alpine Astroville Lue-Stailas, Val Muestair, Switzerland; e-mail: aav@alpineastroville.com

A living cell is more complex than any inanimate matter created in the Universe. This presentation summarizes, in general terms, our present knowledge of the major events that led to the emergence of life during cosmic evolution. We

will see how the initial abundance of hydrogen and helium in space became progressively “contaminated” with traces of heavy elements, the prerequisites for future planet formation and appearance of organic molecules.

Already towards the end of the first billion years of Earth's existence, these molecules were used to produce the most essential building blocks of life: amino acids and nucleic acids. Leading from the simplicity of an early, radiation-dominated cosmos to the complexity (and increasing entropy) of inanimate matter and the appearance of life, Nature's path appears to logically connect the latter to the rest of the expanding material Universe.

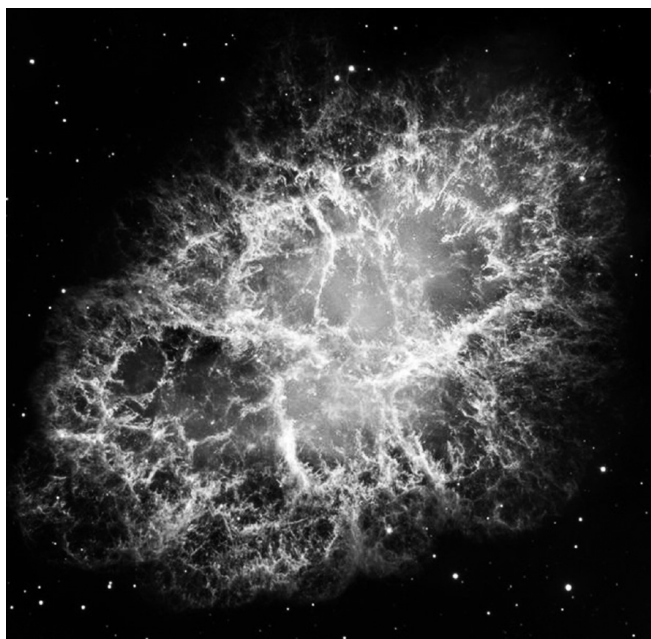


Fig. 1. Massive stars (10–30 solar masses) have been essential for the appearance of heavy elements beyond iron in the Universe.

Their large stellar winds and the ending of their life in form of supernovae have seeded the interstellar space with all the elements in the Periodic Table for billions of years. The famous Crab Nebula, imaged here by the Hubble Space Telescope, is the remnant of a supernova explosion observed in the constellation of Taurus by Chinese astronomers in the year 1054 AD. The nebula is about 6500 light years away and spans about 10 light years. Its filaments are still expanding at a speed of at least 1000 km/sec and the central neutron star (3×10^9 tons/cm³!) is a pulsar rotating about 30 times each second. Image credit: NASA/ESA

Since when was genius found respectable or honesty in science

Oufedník J.

Department of Biomedical Sciences, Iowa State University, Ames, USA; e-mail: joured@iastate.edu and Center for Astrophotography, Alpine Astroville Lue-Stailas, Val Muestair, Switzerland; e-mail: aav@alpineastrovillage.com

Ethical concepts and principles, such as honesty, integrity, trust, accountability, respect, confidentiality, and fairness, play a key role in shaping research conduct within science. Ethical conduct is important to foster collaboration, cooperation, and trust among scientists, to advance the goals of research, to fulfill scientists' social responsibilities, and to avoid or minimize damaging scandals resulting from unethical or illegal behavior.

Research always takes place within a social context. Economical and political interests as well as social, cultural, and religious values influence scientific goals, resources, and practices. Money plays a crucial role in deciding whether a particular problem will be studied, who will study it, how it will be studied, and even whether the results will be published.

The talk discusses motivations for becoming a scientist and possible temptations that can lead to scientific dishonesty. Presented will be also some particular cases of irresponsible behavior in science and how they negatively influenced the integrity of the investigations in specific scientific areas, including biomedical and stem cell research.

Emerging clinical applications of imaging flow cytometry

Basiji D.

Amnis Corporation, 2505 Third Ave., Suite 210, Seattle, WA 98121, USA; e-mail: basiji@amnis.com

Imaging flow cytometry is now in use at over 50 basic and clinical research institutions and has been employed in over 70 scientific publications. The technology images cells directly in flow, combining the information content of microscopy (12 images per cell) with the speed (1000 cells per second) and population statistics of flow cytometry. The technology is being used in multiple clinical areas, including the detection of minimal residual disease via high throughput FISH, immune monitoring pre- and post-transplant for the informed modulation of immunosuppressive therapy, and the detection, enumeration, and functional analysis of exceedingly rare circulating endothelial cells. This presentation will include extensive data from these studies and the novel clinical applications that are emerging.

Application of flow cytometry and cell sorting in marine microbiology

van den Engh G.

VP Advanced Cytometry, BD Cell Analysis, 12730 28th Ave NE, Seattle, WA 98125, USA; e-mail: engh@cytopeia.com

In recent years, flow cytometry has been proven to be a useful tool in oceanography for measuring pico-plankton. Use of flow cytometry has led to significant discoveries. Carbon fixation by cyanobacteria in the tropical oceans is much more important than previously thought. It has been discovered that cyanobacteria also play a role in nitrogen fixation. These findings force us to reevaluate the importance of marine microorganisms in the global carbon cycle.

The light scattering and fluorescent properties of Pico-plankton are very different from the mammalian cells that are usually analyzed in flow cytometry. Much can be done to improve the instruments for oceanographers. Improvements in both instrument design and the manner in which phytoplankton is measured will be described. Results obtained on a recent research cruise to the arctic will be presented. It is expected technological improvements that are inspired by oceanography will also lead to improvements in biomedical instrumentation.

Flow cytometry as a proteomics tool

Lund-Johansen F.

Dept. of Immunology, Rikshospitalet-Radiumhospitalet, N-0027 Oslo, Norway; e-mail: fridtjof.lund-johansen@medisin.uio.no

Elements from DNA microarray analysis such as sample labeling and microspotting of capture reagents have been successfully adapted to multiplex measurement of soluble cytokines. Application in cell biology is hampered by the lack of mono-specific antibodies and the fact that many proteins occur in complexes. Here, we incorporated a principle from western blotting and resolved protein size as a second parameter. Proteins from different cellular compartments were labeled and separated by size exclusion chromatography into 20 fractions. All were analyzed with replicate antibody arrays. The elution profiles of all antibody targets were compiled to color maps that resemble western blots with bands of antibody reactivity across the size separation range (670–10 kDa). A new solid phase designed for processing in microwell plates was developed to handle the large number of samples. Antibodies were bound to protein G-coupled microspheres surface-labeled with 300

combinations of four fluorescent dyes. Fluorescence from particle color codes and the protein label was measured by high speed flow cytometry. Cytoplasmic protein kinases were detected as bands near predictable elution points. For proteins with atypical elution characteristics or multiple contexts, two or more antibodies were used as internal reference of specificity.

Membrane proteins eluted near the void volume, and additional bands corresponding to intracellular forms were detected for several targets. Elution profiles of cyclin-dependent kinases (cdks), cyclins and cdk-inhibitors, were compatible with their occurrence in complexes that vary with the cell cycle phase and subcellular localization. A two-dimensional platform circumvents the need for mono-specific capture antibodies and extends the utility of antibody array analysis to studies of protein complexes.

Flow cytometric analysis of platelet activation: basic and clinical application

Tomer A.

Ben-Gurion University of the Negev, Faculty of Health Sciences; Blood Bank and Transfusion Medicine, Soroka Medical Center, Beer-Sheva, Israel; e-mail: atomer@bgu.ac.il

Flow cytometry is a useful technique for the study of platelet activation process *in vitro* and *ex vivo*. Using activation specific markers, flow cytometric analysis can demonstrate the a) activation of the major membrane glycoprotein (GP) IIb/IIIa (CD41a) receptor (integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$); b) release reaction, by the expression of P-selectin (CD62p), the α -granule GP translocated to the platelet surface membrane following activation, and c) platelet procoagulant activity, as demonstrated by the binding of annexin A5 protein to the membrane anionic-phospholipids – the prothrombinase-complex (prothrombin, factors V and X) binding sites – exposed on the surface of activated platelets.

During coronary angioplasty (PTCA), blood samples obtained from five patients demonstrated the activation of platelet GP IIb/IIIa and the expression of P-selectin. Later studies showed the degree of activation to be correlated with the rate of vascular re-occlusion.

Thirty-three sickle cell disease patients, eleven during pain episodes and twenty-two during periods without pain, showed increased platelet activation that was markedly increased during pain episodes. Moreover, patients with pain

episodes showed a highly activated platelet microparticles (3–30%) with markedly increased binding of annexin A5. The platelet procoagulant activity was associated with increased plasma markers of thrombin generation and fibrinolytic activity.

Sixty-eight women with pregnancy-related hypertension (PRH) demonstrated significantly increased expression of p-selectin compared to normal pregnant controls that was further enhanced during preeclampsia. Platelet procoagulant activity was significantly increased in women with PRH compared to normals, followed by marked augmentation during preeclampsia. The platelet procoagulant activity was associated by the appearance of platelet microparticles (5–30%) expressing high binding (100-fold) of annexin A5. The flow cytometric findings were corroborated by elevated plasma markers of thrombin generation, thrombin-anti-thrombin complex and prothrombin fragment F1.2., and with the pregnancy outcome.

Using flow cytometric techniques, a rapid, sensitive and specific functional method was developed for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia, by demonstrating *in vitro* activation of normal platelets by patients' sera in the presence of pharmacological concentrations of heparin.

We conclude that flow cytometry may be a useful tool for the studies of mechanisms inducing *in vivo* and *in vitro* platelet activation and for the detection of ongoing *in vivo* prothrombotic activity.

Mechanisms underlying thrombosis in heparin induced thrombocytopenia

Rauova L.

Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA; e-mail: lubica@email.chop.edu

Unfractionated heparin remains the drug of choice for a significant number of medical indications where rapid and reversible anticoagulation is necessary or desired. A serious complication of treatment with heparin is heparin induced thrombocytopenia (HIT), an autoimmune disorder distinguished by low platelet counts, paradoxically associated with a high risk of limb- and life-threatening thrombosis. The reason for development of thrombosis has not been well defined and consequently the effectiveness of therapy is incomplete and may be complicated by bleeding. An array of approaches, including a key role for flow cytometry, has been

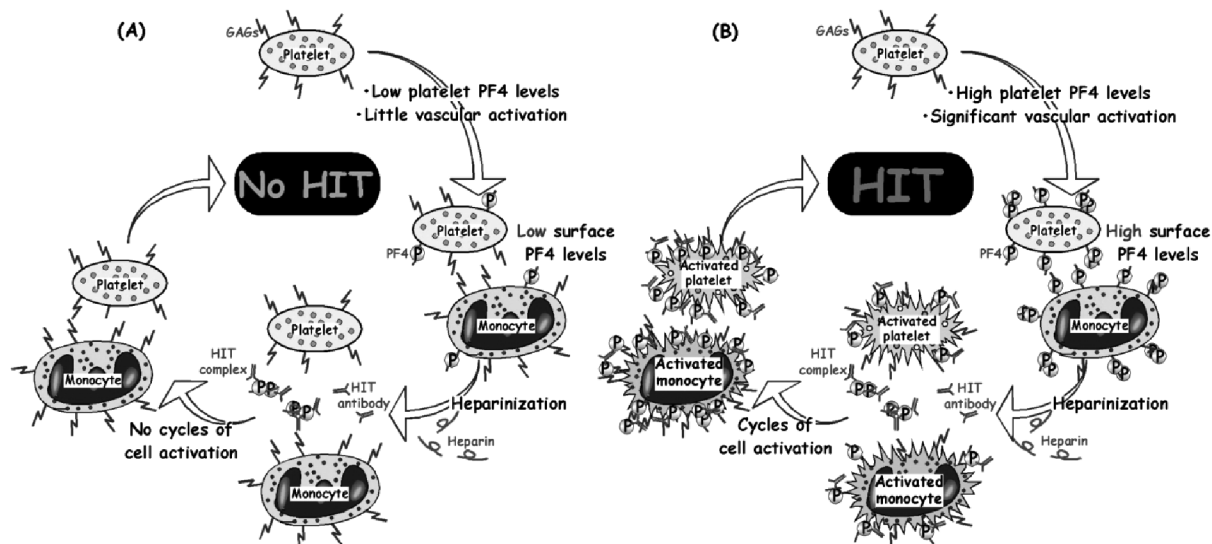


Fig. 1. Model of the role of platelet and monocyte surface PF4/GAG complexes in the pathogenesis of HIT

employed to elucidate the molecular mechanisms of HIT. HIT is caused by antibodies that recognize the platelet chemokine, Platelet Factor 4 (PF4), complexed to heparin or to cellular glycosaminoglycans (GAG). The pathogenically important PF4/GAG complexes are of very high molecular weight and form over a remarkably narrow molar range of reactants. The unique feature of HIT antibodies, in contrast to other autoimmune thrombocytopenic antibodies, is their ability to activate platelets and other vascular cells. Following activation, platelets release large amounts of chemokines, including PF4 and RANTES. These two chemokines have been shown to cooperate to enhance the arrest of monocytes on (activated) endothelium and to lead to more surface binding of PF4. Subsequent interaction of HIT antibodies with PF4 bound to the monocyte surface leads to expression of tissue factor in monocytes that causes accelerated membrane-dependent coagulation. An explosive feed forward, prothrombotic loop is further enhanced by tissue factor-bearing microparticles formed as a consequence of cellular activation. Cessation of heparin is necessary but not sufficient therapeutic intervention and HIT can also occur in patients days after withdrawing heparin. At this juncture, not only is there no heparin remaining, but also the targeted platelets are likely to have been cleared. At this point, the procoagulant state is most likely driven by activated monocytes, which according to our preliminary studies have persistent surface HIT antigen at low PF4 levels. Our model of the role of platelet and monocyte surface PF4/GAG complexes in the pathogenesis of HIT, depicted in Figure 1, accounts for the seemingly paradoxical occurrence of thrombocytopenia and thrombosis, and why the procoagulant state persists after heparin has been discontinued and thrombocytopenia has resolved. It also suggests that steps proximal to the generation of thrombin, including antigen formation on cell surfaces, and Fc receptor-mediated platelet and monocyte activation, upstream of thrombin formation, may be more rational targets for intervention than administration of thrombin inhibitors.

Stem-cell like plasticity of distinct subsets of antigen-specific CD8⁺ T cells

Busch DH.

Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, Technische Universität München, Trogerstr. 30, 81675 Munich, Germany; e-mail: dirk.busch@lrz.tum.de

It is well accepted that CD8⁺ T cells play a pivotal role in providing protection against infection with intracellular pathogens and some tumors. In many cases protective immunity is maintained for long periods of time (immunological memory). Over the past years, it has become evident that in order to fulfill these multiple tasks, distinct subsets of effector and memory T cells have to be generated. Until today, however, only little is known about the underlying mechanisms of subset differentiation and the timing of lineage fate decisions. In this context, it is of special importance to determine at which level of clonal expansion functional and phenotypical heterogeneity is achieved. Different models for T cell subset diversification have been proposed; these differ mainly in the time point during priming and clonal expansion (prior, during, or beyond the first cell division) when differentiation programs are induced. Recently developed single-cell adoptive transfer technology has allowed us to demonstrate that individual precursor cells still bear the full plasticity to develop into a plethora different T cell subsets. This observation targets the shaping of T cell subset differentiation towards factors that are still operative beyond the first cell division. These findings have important implications for vaccine development, as the modulation of differentiation patterns towards distinct subsets could become

a powerful strategy to enhance the efficacy and quality of vaccines. Furthermore, our findings indicate that adoptive T cell immunotherapies might be possible to perform with very low cell numbers, which could facilitate the transfer of this promising approach to a variety of different clinical applications.

References

1. **Stemberger C, Huster H, Koffler M, Anderl F, Schiemann M, Wagner H, Busch DH.** A single naive CD8⁺ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* 2007; 27: 985–997.
2. **Stemberger C, Neuenhahn M, Gebhardt FE, Schiemann M, Buchholz VR, Busch DH.** Stem cell-like plasticity of naïve and distinct memory CD8(+) T cell subsets. *Semin Immunol* 2009; 21: 62–68.

Multicolor flow cytometry for classification and minimal residual disease follow-up in B cell malignancies

Böttcher S.

Second Department of Medicine, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany; e-mail: s.boettcher@med2.uni-kiel.de

The advent of multicolor flow cytometry, now allowing to simultaneously assess eight and more fluorochromes using routine bench top analyzers continues to change our approach to many hematological diseases. High speed and broad availability, regarded as the main advantages of flow cytometry for decades, are now supplemented with improved precision and sensitivity. On the other hand, those novel developments also increase the complexity of flow cytometric approaches. Therefore, careful design of standardized multicolor panels and appropriate standardized techniques for staining and instrument set-up as well as novel analysis tools are mandatory to maximally exploit the newly emerging possibilities of flow in hemato-oncology.

B cell malignancies belong to the most common diseases assessed in clinical flow cytometry. They can be used as a particularly well-suited examples on how the novel technical developments will influence our approaches to hematological diseases at initial diagnosis and for follow-up.

Multicolor flow can improve the distinction between B lineage Non-Hodgkin lymphoma entities. The EuroFlow consortium (coordinator: Prof. Dr. J. J. M. van Dongen, Rotterdam) developed an eight-color staining protocol for fast differential diagnosis of B lineage Non-Hodgkin Lymphoma subtypes using flow cytometry only (Böttcher et al., 2009a). The protocol comprised antigens associated with B cell maturation, markers known to be associated with particular B-cell malignancies, integrins, and chemokine receptors. The development of the panel utilized principal component analysis algorithms integrated into Infinicyt software to identify the markers with highest power to separate any two B-NHL entities. In a step-wise testing procedure using more than 150 B-NHL cases novel markers (e.g. CD200) were introduced into the panel to improve the differential diagnosis. On the other hand, redundant markers could be deleted using the same analysis tools. The combination of the final panel version and INFINICYT software now allows the reliable differential diagnosis of most B-NHL diseases using a 24-antigen immunophenotype. The EuroFlow consortium currently acquires several hundreds of well-characterized B-NHL cases to be used as templates for semi-automated diagnosis of mature B cell malignancies.

Modern flow cytometry can also be applied to sensitively assess treatment responses after therapy in B lineage malignancies. These measurements of minimal residual disease (MRD) are currently gaining interest as for many

diseases a multitude of treatment options are becoming available. MRD measurements can be used to tailor therapy for individual patients. In chronic lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia multicolor MRD flow already has demonstrated its clinical significance to predict time to disease progression. Besides MRD flow, several PCR methods are currently in use for MRD analysis in B cell malignancies. Comparative analyses to labor-intensive ASO primer real-time quantitative PCR in CLL proved that 4 color MRD flow is equally effective as PCR for MRD assessments with sensitivities of up to 10^{-4} . Interestingly, this even was the case in patients who received rituximab-containing regimens (Böttcher et al., 2009b). Accordingly, MRD measurements using flow were of great significance for progression free survival in both arms of a randomized clinical trial that recruited patients treated with chemotherapy with or without the monoclonal antibody CD20.

It is expected that the same algorithms that were applied to improve differential diagnosis between B-NHL malignancies will also be highly valuable to design 8 color protocols that distinguish normal B cells from B cell malignancies. Those protocols will be applicable to malignancies with heterogenous immunophenotype, such as mantle cell lymphomas. This is an effort currently undertaken by the EuroFlow consortium.

References

1. **Böttcher S, Rawstron A, Flores J, Lucio P, de Tute R, Mendonca A, Lecrevisse Q, Kalina T, Kneba M, van Dongen JJM, Orfao A.** Improved differential diagnosis between WHO-defined mature B-cell malignancies using integrated 8-color flow cytometry and novel software for multivariate analysis of immunophenotypic data. *Haematologica* 2009; 94 (s2): 273 abstract n. 0670.
2. **Böttcher S, Stilgenbauer S, Busch S, Brüggemann M, Raff T, Pott C, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Döhner H, Hallek M, Kneba M, Ritgen M.** Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy – a comparative analysis. *Leukemia* 2009 (in press).

A new complex epigenetic marker: the replication-coupled, cell cycle dependent, dual modification within the histone tail

Fidlerová H.¹, Kalinová J.¹, Blechová M.², Velek J.², Raška I.¹

¹Charles University in Prague, First Faculty of Medicine and Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Albertov 4, 128 01 Prague 2, Czech Republic;

e-mail: iraska@lf1.cuni.cz

²Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Flemingovo nam. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

We shall describe an evidence for the reversible, cold-dependent detection of the epitope (referred to as epiC), recognized by a monoclonal anti-actin antibody in diploid human fibroblast cell nuclei and mitotic chromosomes. With a help of the detailed 3D confocal and cross-correlation analysis along with biochemical and immunochemical experiments, we shall show that the epiC positivity appears on the newly replicated chromatin domains with some delay (of about 1 h) with respect to their DNA replication and then persists on the newly replicated chromatin until next early G1 phase, during which it disappears. However, while this epiC positivity is detected in the early replicated chromatin domains, it is not found in the mid/late replicating domains either during S phase, or at any other cell cycle phases. The unique spatio-temporal pattern of epiC positivity suggests that some replication-coupled modulation of early replicated

chromatin domains, which could be involved in transfer/maintenance of epigenetic information on transcriptionally competent part of genome, is detected. Indeed, in contrast to the actin epitope, epiC consists of different amino acid sequence within histone H4 tail carrying two postranslational modifications and is a new complex epigenetic histone marker that might represent a global marker related to the timing decision point. The relevance of epiC marker in the transfer/maintenance of epigenetic information on the transcriptionally competent part of the genome will be dealt with.

This work was supported by the Czech grants 304/06/1691, LC535, MSM0021620806 and AV0Z50110509.

Development of cellular assays for automated microscopy to measure multiple parameters by single cell High Content Analysis

Horn T.

European Technology Center, BD Biosciences, Becton Dickinson AG, Binningerstr. 94, CH- 4123 Allschwil, Switzerland;
e-mail: thomas_horn@europe.bd.com

High-content imaging is an automated process that begins with image acquisition and concludes with data analysis. This process requires fully automated microscopy that integrates image analysis and subsequent transfer of the numerical data into statistical representations such as graphs, heat maps and tables. The main focus of this technology lays on transferring automatically acquired images into meaningful data.

The power of high-content imaging resides in the ability to measure not only fluorescence intensity and morphological changes, but also temporal and spatial dynamics. This technology allows also to perform multiplexed assays that simultaneously measure and analyze a large number of such cellular parameters. However, multiplexing is often restricted due to reagent, assay, and instrumentation limitations. BD Biosciences is addressing this by developing specific instrumentation, assays, reagents, and software that enable such multiplexing. We will highlight the capabilities of the BD Pathway™, such as kinetic and confocal imaging, and the impact these features have on high-content imaging. In particular, we will address several challenging applications including stem cells and neurobiology. In addition, we will discuss the development of a line of BD™ Bioimaging Certified reagents that have direct impact on the ability to multiplex.

To facilitate the use of antibodies for imaging applications, BD Biosciences embarked on a screening process to evaluate a large library of monoclonal antibodies for utility in bioimaging applications. The library of antibodies included specificities that recognized proteins involved in cell signaling, cell cycle, apoptosis, cancer and neurobiology. Antibodies were tested using 3 cell lines and several fix/perm methods that are relevant to high-content imaging applications on automated platforms. Specific criteria regarding signal to noise, sub-cellular localization and other important parameters were used to qualify reagents. Two distinct Bioimaging Certified reagent product lines resulted from this antibody screen. One is a continually expanding collection of currently greater than 200 unlabeled primary antibodies that have been shown to have general utility in bioimaging applications. The other is a subset of these reagents that have been further developed into primary conjugated antibodies to facilitate multiplexed high content analysis with monoclonal antibodies. These reagents, combined with an automated imaging platform, will enable the rapid development of novel cell-based assays.

To enable live-cell assays we developed an environmentally controlled on-stage chamber with an integrated pipetting system in combination with an automated fluorescent microscope for imaging of individual cell cultures in multi-well plates. The broad range of assay types include nuclear protein translocations, live/dead cell detection, intracellular calcium dynamics and various measures of the apoptotic cascade like Caspase-3, JC-1 distribution and nuclear fragmentation. For another parameter, DNA strand break count we demonstrated the effect of utilizing our confocal imaging technology to improve the quality of the data by achieving higher z'-scores. The use of our Neurite Outgrowth and Angiogenesis algorithms will demonstrate the capacity to detect differentiation and morphological changes depending upon exposure to various stimuli. Furthermore new applications such as intracellular bacterial count, cell cycle analysis and the multiplexing of intracellular calcium concentration measurements with mitochondrial membrane potential assessment will be discussed.

Our data will show that live-cell imaging of kinetics and endpoint parameters together with high-resolution confocal microscopy is a powerful tool for exploring cellular events in multidimensional space and time.

LECTURES

CD4⁺CD25⁺ T cells in systemic lupus erythematosus

Blažičková S.^{1,2}, Rauová L.^{1,3}

¹National Institute of Rheumatic diseases, Piestany, Slovak Republic;
e-mail: blazickova@laboratoria.sk

²Laboratories Piestany, Slovak Republic

³Department of Pediatrics, School of Medicine,
University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease characterized by a wide spectrum of clinical manifestations, the loss of tolerance to self-antigens and the production of a vast spectrum of autoantibodies. Recent studies have suggested that CD4⁺CD25⁺ regulatory T-(Treg) cells exhibit immune suppressive activity and also play a critical role in the maintenance of self-tolerance. Several studies have shown a significantly decreased percentage of CD4⁺CD25⁺ T-cells in patients with SLE, which correlated inversely with disease activity and/or production of autoantibodies. The decreased frequency of CD4⁺CD25⁺ T cells in adult patients with SLE implies that a deficiency of Tregs is associated with SLE pathogenesis.

In our present study, we examined the frequency of CD4⁺CD25⁺ T-cells in 50 patients with SLE over fourteen years. 37 patients were newly diagnosed before starting any immunosuppressive therapy. The clinical course and activity of the disease, treatment efficacy and level of autoantibodies (dsDNA, DNP, ENA) were followed. The frequency of CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25^{high} in whole peripheral blood was analyzed by flow cytometry. We found a decreased of number of CD4⁺CD25^{high} T-cells in the group of untreated active patients, which after treatment with a pulse therapy of methylprednisolone was increased. Treatment with cyclophosphamide also restored the decreased number of CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells. There was no correlation between the number of CD4⁺CD25⁺ T-cells and the activity of disease or organ involvement.

Deficiency of Treg may not be the only abnormality of immune regulation in SLE, as combined defects in immune regulation may be responsible for dysregulation of peripheral tolerance and the induction of autoreactivity against self-structure in SLE. The detection and isolation of CD25⁺ Tregs in humans is complicated by the fact that CD25 is a marker

of recent T-cell activation. Human peripheral blood contains a heterogeneous compartment of CD4⁺CD25⁺ T-cells, including Treg cells and a considerable amount of active effector T-cells. Nevertheless, we suggest that the decreased number of CD4⁺ CD25⁺ T cells in the peripheral blood of patients with SLE constitutes a defective Treg population and contributes to the pathogenesis of SLE. Our results argue that a breakdown of tolerance as a result of impaired Treg function contributes to the excessive autoantibody formation seen in active SLE.

Which cells are producers of IFN- γ in QuantiFERON-TB Gold in-Tube assay?

Bobovcak M.

Highly Specialized Institute of Lung Diseases, Nová Polianka – Vysoké Tatry, Slovak Republic; e-mail: bobovcak@npolianka.sk

Tuberculosis is the single leading cause of death from any single infectious agent. About one-third of the world population is latently infected with Mycobacterium tuberculosis. Over 8 million new cases and nearly 3 million deaths occur each year. The situation is deteriorating due, in part, to the human immunodeficiency virus pandemic and shifts in the age distribution of the population. Latent tuberculosis infection (LTBI), persists in some, who might develop tuberculosis disease month or years later. The main purpose of diagnosing LTBI is to consider medical treatment for preventing active disease. Interferon-gamma (IFN- γ) release assays (IGRAs) provide a new tool for LTBI diagnosis and surveillance for new TB infection. Two commercial IGRAs are now available: the QuantiFERON-TB Gold In-Tube[®] (QFT) assay (Cellestis Limited, Australia) and the T-SPOT.TB assay (Oxford Immunotec, UK). IGRAs have features that are advantageous compared with tuberculin skin test (TST) for serial testing. According to manufacturers – they are highly specific and are therefore unaffected by prior bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination; as they can be repeated without concern with boosting effect.

Proclaimed principle of the assays is releasing IFN- γ by specific T effectors upon activation by mycobacterium TB specific antigens (ESAT6, CFP10, TB7.7) in short term *in vitro* cultivation. Although IGRAs have been recommended for serial testing, data are often confused at the interpretation of new or repeated IGRA results. The data are also often indeterminable. Some existing studies suggest that conversions, reversions and nonspecific variations occur with IGRA serial testing, just as they do with TST serial testing. Published studies also reported inconsistent data for dormant infection in compare with active disease.

We made decision to verify immunological dogma that T-cell effectors are the main peripheral blood subpopulation which is activated upon challenging by TB antigens (in short term incubation), used in IGRAs assays. However IGRAs assays tell us nothing about the nature of immunological response in the test tube.

The aim of our preliminary study was phenotypization and enumeration of peripheral blood lymphocytes, which are secreting IFN- γ to culture in QFT Gold whole blood in tube assay.

Heparinised blood of QFT – IFN- γ – ELISA positive patients were retested after new venipuncture with a new set of the testing tubes (NIL control, TB antigen tube and Mitogen PHA tube). After initial 19 hours of incubation, Brefeldin-A was added to all tubes for last 4 hours of cultivation. Immediately after cultivation each sample was stained by antibodies cocktail for surface marker staining and IFN- γ antibody for intracellular detection of the cytokine after the following permeabilisation. Cells were analyzed by multicolor multiparameter flow cytometry by the acquisition protocol: ic IFN- γ Fitc /s CD16+56 PE /s CD45 ECD/CD3 PC5/s CD4 PC

7, in CXP software in FC500 Beckman Coulter cytometer. Activation of cells (CD69+ positivity) was determined by another protocol: CD69 PE/CD3 ECD/CD4PC5.

Our study is still running but preliminary data are very interesting. In principle, effectors which could produce IFN- γ in whole blood are subpopulations of CD3+4+ Th1 cells, CD3+8+ Tc cells, NK cells CD3-16+56+ and mixed population of NKT (or NKT like) cells CD3-4 \pm 8 \pm 56+. According to our results: activated population CD3+CD69+ in comparison to CD3-CD69+ population was more included in mitogen PHA stimulation than in TB antigens tube. The CD3-CD69+ cells were prominent population here. However not each activated CD69+ lymphocyte also has produced IFN- γ cytokine.

There are really a few cells in the peripheral blood that are producers of this cytokines upon challenge. In NIL-control tubes was only 1/100 % of IFN- γ + cells in lymphocytes in average. In TB antigens tubes was approximately from 1/10 to 1 % of IFN- γ + cells in lymphocytes. QFT Elisa negative patients had the count of these cells in the levels near the detection limit.

The surprise of the study is the result of phenotypisation of IFN- γ + lymphocytes. While in PHA stimulation (PHA is strong T-cell activator) Th and Tc population was dominated (CD3+4+56-, CD3+4-56-), in TB antigens stimulated samples the IFN- γ + NKT (or NKT like, CD3+4 \pm 56+) and NK (CD3-4-56+) cells were prevailing subpopulation. We also reported only the minority of Th and Tc cells which responded to these antigens. The interesting observation resulted from dividing of QFT positive subjects according to diagnoses: old cured nonactive TB, active TB and LTBI. There was also identified T cell component of the response in old TB and active TB, which almost missed in latent TB patients.

While NK cells could be secondarily stimulated by released IFN- γ paracrine and autocrine way (and by others cytokines like IL1), NKT cells could be stimulated by specific stimulus via TCR receptor. TCR receptor of NKT can bind not only classic lipid antigens but also larger peptides with hydrophobic properties. Mycobacterial peptides ESAT6 and CFP10 used in IGRA assay are such type of antigens. NKT cells represent the link between native and acquired immune response and have regulatory, effector and also memory properties. NKT cell is strong and rapid producer of IFN- γ in some situations. Their role in TB pathogenesis and granuloma formation *in vivo* is not totally uncovered. We have observed also CD3 (TCR) downregulated population of cells in TB antigens tubes (CD3-4 \pm 56-, CD3-4+56+). This situation is often observed upon T cell activation. There could be also masked TB antigen activated T-helper and T-cytotoxic clones (and probably also NKT cells) inside this downregulated population.

Our observations offer some new important problems to solve. Which population reacts earlier and which are secondary responded: T, NKT or NK? In future we are going to gather data from more patients and answer also these kinetic questions. The important question is also to determine phenotypes of these NKT - IFN- γ producers. Peripheral NKT or NKT like cells are functionally and phenotypically mixed population w/wo restringed repertoire of TCR, etc. These studies could answer the problems with interpretation or misinterpretation of such type TB tests. It could be also helpful for novel assays designing.

Regulatory T cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma

Boucek J.¹, Mrkvan T.², Chovanec M.¹, Kuchar M.¹, Betka J.¹, Boucek V.⁴, Hladikova M.⁴, Betka J.¹, Rihova B.², Eckschlager T.³

¹Charles University, 1st Faculty of Medicine, Dept. Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

²Institute of Microbiology AS CR, Prague, Czech Republic

³Dept. Paediatric Haematology Oncology and Dept. Medical Informatics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; e-mail: eckschlagertomas@yahoo.com

⁴Dept. Haematology Blood transfusion, Hospital Rudolf and Stephania Benesov, Czech Republic

Regulation of immune responses plays an important role in the maintenance of homeostasis including suppression of cancer. Immune system is indeed complex and highly regulated to suit the purpose of ensuring responses to dangerous substances or organisms, and tolerating those which are harmless for the host. Several mechanisms are employed to safeguard those substances which are considered harmless, including self-antigens that do not cause any overt activations of the immune system, one of which is peripheral immune tolerance. Although significant advances in the field of treatment of patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) have been documented within last years, regrettably, survival rates for this disease have not improved over many years (Forastiere et al., 2001). Thus, the development of new molecular markers which could help to describe the biological and immunological status of the patients and predict the progression of the disease seems to be promising. Relationship between immune system and cancer cells is very important and decisive for the progression of malignancy. Among others, T regulatory cells are a crucial subset which plays a role in the control of tumor growth (Strauss et al, 2007).

Blood samples collected at the time of diagnosis were obtained from 112 HNSCC patients who underwent curative therapy. All patients were examined at the Dept. Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Univ. Hosp. Motol. We used 20 peripheral blood samples from healthy volunteers as controls. Peripheral blood samples were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur). Used antibodies: anti CD45 FITC/CD14 PE for correct lymphocyte gating, anti CD3 FITC/CD19 PE, anti CD3 FITC/ CD16CD56 PE, anti CD4 FITC/ CD8 PE, anti CD45RA FITC/anti CD4 PE and anti CD3 FITC/ CD4 PE/CD25 APC (Beckmann Coulter). Results were expressed as the percentage of appropriate cells in lymphocytic gate. Total blood count and biochemical and tumor makers were also examined. To study the relation between different categories, the data were classified in a frequency 2 \times 2 table χ^2 test with Danderar's correction. Numerical data were presented as mean \pm standard deviation and were analyzed using Student's t-test. The correlations between immunological parameters and early recurrence of disease were evaluated by nonparametric Spearman's coefficient. P values of < 0.05 were considered significant. Software SPSS v. 10.1 was used for statistical calculations.

The percentage of circulating CD3+CD4+CD25+ and CD4+ cells was increased while NK cells (CD3-CD16+CD56+) were decreased in patients with HNSCC relative to those in controls. Platelets count and α -1-antitrypsin were higher in patients with tumors of hypopharynx than in those with tumors of base of the tongue. (There were no statistically significant differences in T- and N-stages and tumor grading between different tumor localizations). The group of patients was divided according to the size of primary tumor (T1-T4 stage), the spread of tumor to the regional lymphatic nodes (N⁰ vs. N⁺) and grade (distant metastases – M1 were not detected in any patient at the time of diagnosis). There was increase of tumor markers SCC; AAT, Cyfra-21, CRP and

ratio of naïve T lymphocytes and level of CRP with increasing size of the primary tumor (T). The level of tumor marker Cyfra-21 and CRP were higher and the percentage of B cells was lower in N⁺ group than in N⁰. We found higher proportion of CD8⁺ and lower CD4⁺/CD8⁺ ratio in patient with less differentiated tumors (G1+G2 vs. G3+G4). The group of patients with recurrent disease was compared to the group without evidence of disease over a follow-up interval longer than one year. The increase of Treg cells and AAT and decrease of erythrocyte count and hemoglobin levels was found in group with early recurrency.

We have observed increased percentage of circulating CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood in patients with HNSCC similarly to reported data. All hitherto published data have shown that the total amount of Treg in peripheral circulation of HNSCC is two-fold higher than in controls, although the exact numbers are slightly different among the different laboratories (Schaefer et al, 2005; Strauss et al, 2007). In an interval of follow-up longer than one year we compared the group of patients with recurrent disease with disease-free group. We found a difference in the level of T regulatory cells at the time of primary diagnosis between patients in remission and in relapse. The level of T regulatory cells in peripheral blood correlates with a higher probability of early recurrence of HNSCC. This finding has helped us to select patients eligible for extensive therapy and more intensive follow-up. One may speculate that erythrocyte count, hemoglobin level and regulatory T cell proportion may be useful as predictive factors in HNSCC.

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of The Czech Republic - Grant MSM 0021620813.

References

1. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 1890–1900.
2. Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. – *Br J Cancer* 2005; 92: 913–920.
3. Strauss L, Bergmann C, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. The frequency and suppressor function of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6301–6311.

Regulatory T cells in autoimmune diseases

Kral V., Pohorska J.

*Institute of Public Health, Ustí nad Labem, Czech Republic;
e-mail: vlastimil.kral@zuusti.cz*

The concept of polarization of the immune response was one of the main topics on the field of immunology in the end of 20th century. There was expectation to solve the problem of diagnostics, therapeutics and control of allergy and autoimmune diseases. Recently we are witnessing analogical situation. Abnormalities in newly discovered T cells subsets – regulatory T cells (Treg) and proinflammatory IL-17 producing helper T cells (Th17) have been implicated in autoimmune, allergic and immunoinflammatory conditions (Afzali, 2007; Oukka, 2007). Many studies, both in mice and humans, have confirmed the importance of T reg subset in the pathogenesis of many autoimmune diseases (i.e. thyroiditis, gastritis, RA, SLE, etc.) (Toubi, 2008)

Treg immunophenotype was discovered as CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. However, in humans the expression of specific transcription factor FoxP3 is not exclusively confined to CD4⁺CD25^{hi} cells. Naïve CD25^{lo} and activated T-cells are able to express FoxP3. It was found that IL-7 receptor (alpha

chain of IL-7R, CD127) is down-regulated on human Treg cells and immunophenotype CD4⁺CD25^{int-hi}FoxP3⁺CD127^{lo-dim} of human Treg was postulated (Liu, 2006).

Treg immunophenotyping by using both CD127 and FoxP3 markers was done by 4-colour flow cytometry. Following groups of patients and controls were investigated: 1) autoimmune diseases patients (rheumatoid arthritis, RA, n = 36, ulcerative colitis, UC, n = 9, Crohn's disease, CD, n = 28, psoriasis, PS, n = 26); 2) healthy controls, HC, n = 14; 3) other immunopathology conditions (allergy, AL, n = 15; infection (latent and/or treated TBC), IF, n = 22).

Results of Treg cells are following (values represent the portion of CD4⁺ population): 1) RA 7.4 ± 3.0% (patients on biological therapy, n = 8) and 5.9 ± 2.4% (DMARD's treated, n = 28); PS 7.6 ± 4.0% (x_{min} - x_{max} range 1.8–20.4); UC 4.0 ± 1.4 (x_{min} 0.7 - x_{max} 5.6); CD 6.7 ± 2.1% (x_{min} 3.5 - x_{max} 11.7); 2) HC 5.9 ± 1.1% (x_{min} 4.0 - x_{max} 7.5); 3) other patients groups: AL 6.6 ± 1.1 (x_{min} 4.9 - x_{max} 8.8); IF 8.5 ± 2.9 (x_{min} 3.8 - x_{max} 16.6).

There was shown that Treg cells vary (up and down, see PS group for example) in autoimmune diseases in comparison to HC and AL groups. A visible tendency to higher Treg levels was found at IF group (latent and, more profoundly, treated TBC). For achieved results analysis there would be necessary to have the complete data of conventional and/or biological therapy of autoimmune disease patients. However, there is another knowledge probably influencing interpretation of Treg immunophenotyping results – the evidences of impaired function of regulatory T cells when immunophenotype is quite normal (Afzali, 2007).

Treg determination by means of CD127 and FoxP3 provides the quite well reproducible results and this method would be useful for clinical research.

References

1. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 32–46.
2. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. – *JEM* 2006; 7: 1701–1711.
3. Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 87–90.
4. Toubi E. Targeting T Regulatory Cells in Autoimmune Diseases. *IMAJ* 2007; 10: 73–76.

Basophil activation test in food allergy

Sedlackova L., Prucha M.

*Department of Clinical Biochemistry, Haematology and Immunology,
Hospital Na Homolce, Prague, Czech Republic;
e-mail: lenka.sedlackova@homolka.cz*

The food allergy is a growing problem to diagnose, as it is to treat. The traditional diagnostic tools – specific IgE and skin prick tests – do not have optimal sensitivity and specificity. The gold standard of diagnostic – double blind placebo controlled exposition test – is not widely applicable in routine praxis. The functional laboratory tests such as basophil activation test bring new hope to solve this situation. They are easy to perform and in contrast to clinical tests are completely safe for patients.

The aim of the study was to establish basophil activation test in routine immunology laboratory diagnostics of food allergy, to evaluate performance characteristics of this test and to compare its results with specific IgE.

Children and adult patients with symptoms suspected from food allergy were tested for basophil activation test and specific IgE to milk, egg, wheat flour, soybean, peanut and walnut.

Data will be presented including comparison of both methods. A small proportion of patients are non-responders and it is not possible to evaluate their basophil activation test. Despite of this our first results are very promising and the basophil activation test is useful tool in food allergy diagnostics.

Tissue specific stem cell markers used in cytometry

Klíma J., Hlučilová J., Juhás Š., Vodička P., Motlík J.
Institute of Animal Physiology and Genetics v.v.i., Academy of Sciences of Czech Republic, Liběchov; e-mail: klima@iapg.cas.cz

Stem cells represent a privileged cell population possessing self renewal capability and having potential to differentiate into various cell types. Researchers can exploit only few putative stem markers or particular properties in which they differ from other somatic cells. There are several strategies to identify and isolate them. The most crucial and most commonly approach uses immunophenotyping of stem population mostly evaluated via flow cytometry (Challen et al., 2009) or histochemistry. Moreover a majority of surface or even intracellular markers are not directly related to determination or maintenance of stemness. An alternative method is based on side population (SP) detection that was successful in many adult tissues (Challen et al., 2009; Kim and Morshead, 2003; Redvers et al., 2006). SP cells having stem or progenitor properties export xenobiotics in non-specific manner and could be thus identified by flow cytometry. Aldehyde dehydrogenase activity is another example of stem cell marker that is not involved in stemness determination but is coexpressed (Levi et al., 2009). More rarely used marker for mainly quiescent stem cells is the small cell size that could be determined via various methods based on image analysis or electronic volume determination.

A brief overview on limitations of each approaches and possibilities how to combine those for the purpose of better identification of stem cells will be given. Selected markers and methods will be presented in several studies on neural, epidermal and bone-marrow derived mesenchymal stem cells of mammals.

This work was supported by grants 2B06130, 1M0538 and AVOZ50450515.

References

1. Challen GA, Boles N, Lin KK, Goodell MA. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A* 2009; 75: 14–24.
2. Kim M, Morshead CM. Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis. *J Neurosci* 2003; 23: 10703–10709.
3. Levi BP, Yilmaz OH, Duester G, Morrison SJ. Aldehyde dehydrogenase 1a1 is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems. *Blood* 2009; 113: 1670–1680.
4. Redvers RP, Li A, Kaur P. Side population in adult murine epidermis exhibits phenotypic and functional characteristics of keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 13168–13173.

Expression of neuronal markers during fetal and postnatal period in the miniature pig spinal cord

Hlučilova J.¹, Cizkova D.², Juhás S.¹, Strnadel J.¹, Motlík J.¹, Marsala M.³

¹Institute of Animal Physiology and Genetics, AS CR, v.v.i., Liběchov; e-mail: hlučilova@iapg.cas.cz

²Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, CE, Košice

³Anesthesiology Research Lab, University of California, San Diego

Doublecortin (DCX) is a microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neuronal precursors during embryonic development of CNS and within well-marked areas of adult brain (Couillard-Despres et al., 2005). Neuronal precursors begin to express DCX shortly after exiting the cell cycle, and continuing to express DCX for 2-3 weeks as the cells mature into functional neurons. Afterwards a mature neuronal marker NeuN (Neuron-specific nuclear protein) starts to be detectable. Therefore, DCX seems to be a suitable marker for neurogenesis in developing organisms or for determining neurogenic regions in adulthood (Brown et al., 2003). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is an intermediate filament protein that is expressed in astrocytes and ependymal cells in CNS. Substantive evidence now indicates that adult NSCs express GFAP and exhibit properties associated with glia both *in vivo* and *in vitro*. These findings raise important questions regarding the relationship of GFAP-expressing neural stem cells to GFAP-expressing astrocytes (Zhu and Dahlström, 2007). Moreover GFAP decreases have been reported in Down's syndrome, schizophrenia, bipolar disorder and depression.

The aim of this study was to observe expression of DCX, NeuN and GFAP in the miniature pig spinal cord in four fetal stages (40, 60, 80 and 100 d), two postnatal periods (newborn and 14 d) and in adult pig. Frozen spinal cord sections were taken from cervical, thoracic and lumbar spinal cord. Free-floating sections were double-immunoassayed with a combination of DCX (goat anti-Doublecortin, Santa Cruz Biotechnology) and NeuN (Mouse anti-Neuronal Nuclei, Chemicon) antibodies or double-immunoassayed with a combination of DCX (goat anti-Doublecortin, Santa Cruz Biotechnology) and GFAP (Mouse anti-GFAP, Sigma) antibodies. Hippocampus from adult rat was used as a positive control for DCX expression in neuronal precursors. Moreover we isolated, cultivated and differentiated spinal cord neural stem cells *in vitro*. These cells were harvested from 80 days gravidity fetuses. The neurospheres were dissociated at day 7 by mechanical trituration and re-plated and processed either for proliferation or for differentiation studies. After differentiation (7, 14, 21 days) the cells were fixed and incubated with primary antibodies for developmental neuronal markers DCX (goat-polyclonal IgG antibody 1 : 200 (Santa Cruze, CA), Tuji (mouse IgG antibody 1 : 1000, BIII-tubulin, Chemicon), MAP2 (rabbit IgG antibody 1:1000, Chemicon).

Staining of spinal cord sections with DCX antibodies revealed strong positivity in 40 days old fetus, immunoreactivity was detected in all neurons and neuropils. This fetal stage was connected with no GFAP presence in whole spinal cord. In 60 and 80 days old fetuses we observed weaker expression of DCX (maximum expression in dorsal horn, ventral horn and central canal) but there were great number of migrating DCX positive cells and also number of NeuN positive cells was rapidly increased. In 60 days old fetuses the GFAP spinal cord expression started. GFAP positive cells were firstly located in the periphery of dorsal, ventral and lateral funiculus as well as in the surroundings of central canal. In 80 days old fetuses the GFAP expression expanded into white matter. The 100 days old fetuses showed only lightly DCX positivity in dorsal horn. On the other side GFAP positivity was present in whole white matter. In newborn pig, doublecortin antibody we only detected in dorsal horn (lamina

II and III) of lumbar spinal cord. In addition GFAP expression was slightly observed in gray matter of spinal cord. No DCX immunoreactivity we detected in 14 days old miniature pig as well as in adult porcine spinal cord. Moreover GFAP positivity in white and grey matter of adult miniature pigs was increased in comparison with spinal cords of newborn piglets. Neuronal differentiation of neural progenitors isolated from porcine fetal spinal cord (F80) under *in vitro* conditions at 4–21 days showed that bipolar, primitive neuronal precursors expressing DCX could be seen already at 4 days. Multipolar ramified DCX positive neuronal progenitors occurred at 7–10 day. Further differentiation showed only immature TUJ1 and MAP2 positive fully differentiated neurons.

This data demonstrate that DCX was expressed in early post-mitotic spinal cord neurons during embryonic and fetal stage, but was absent in the adult naive spinal cord in miniature pig. This result we also confirmed by Western blot analysis. Marked decrease of DCX positivity in spinal cord fetuses was occurred in the third trimester of pregnancy. NeuN and GFAP immunoreactivity was increased with progressive embryonic development. Miniature pig neural stem cells isolated from spinal cord were able differentiate into neurons *in vitro*.

This work was supported by AV0Z50450515, 1M0538, APVV-51002105, APVV SK-CZ 0045-07, and MEB0808108, 2B06130.

References

1. **Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM., Winkler J, Aigner L, Kuhn HG.** Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 2003; 467: 1–10.
2. **Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L.** Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 1–14.
3. **Zhu H, Dahlström A.** Glial fibrillary acidic protein-expressing cells in the neurogenic regions in normal and injured adult brains. *J Neurosci Res* 2007; 85: 2783–2792.

Osteogenic differentiation of miniature pig mesenchymal stem cells in 2D and 3D environment

Juhas S., Hlucilova J., Klima J., Strnadel J., Holubova M., Motlik J.

Institute of Animal Physiology and Genetics, AS CR, v.v.i., Liběchov; e-mail: juhas@iapg.cas.cz

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells that can differentiate into a variety of cell types (osteoblasts, chondrocytes, myocytes and adipocytes). They are also the primary cell source for cartilage and bone formation and so may be optimal for cell-seeded scaffolds and can be used for bone tissue repair (Sumanasinghe et al., 2006). Several studies reported that porcine MSCs are a valuable model system for mesenchymal basic research and tissue engineering (Ringe et al., 2002).

Therefore in this study we studied miniature pig MSCs osteogenic ability by various evaluation methods in different cultivation conditions and systems. The porcine MSCs cultured in the growth medium up to the 3rd passage (CD29⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺ and CD45⁻), were transferred into Petri dishes (2D environment) un/coated with vitronectin and collagen I or embedded in plasma clot (PC) scaffolds (3D environment). Afterwards these cells were cultured in osteogenic medium containing glycerol 2-phosphate, ascorbic acid 2-phosphate and dexamethasone. During three weeks of differentiation, the formation of nodules and deposition of calcium were visualized by Alizarin red S staining. Expression of osteopontin, osteocalcin and osteonectin as osteogenic markers was evaluated by

immunocytochemistry and Western blot analysis. We also detected the alkaline phosphatase in 2D system.

Osteocalcin was started to be observed in 2D environment on 7th day of osteo-differentiation. On the other side in PC scaffolds osteocalcin expression was immunostained on 14th day at first. After one week of 2D and 3D differentiation osteonectin was determined and its expression persisted to the final collection. We already detected high expression of osteopontin at the creation of PC scaffolds and 100% confluence of MSCs in control medium. Osteopontin was presented during osteogenic differentiation and also control cultivation but the expression signal was more intensive in osteogenic medium. After 7 days of differentiation in multilayers and after 21 days of differentiation in PC scaffolds we observed decrease of osteopontin visualization. Moreover we detected the osteonectin expression during whole osteo-cultivation with maximum on the 7th (ECM coated dishes) or 14th (ECM uncoated dishes) day of differentiation by Western Blot analysis. There is evidence that contact with vitronectin and collagen I promotes the osteogenic differentiation of human MSCs, and that ECM contact may be sufficient to induce differentiation in these cells (Salasznyk et al., 2004). Therefore we used this methodology and we found out specific differences in osteogenic markers expression in MSCs differentiated on uncoated and coated dishes. At the beginning of the differentiation (100% confluence of cells) there was approximately two-fold increase of osteonectin and osteopontin expression in MSCs growing on ECM coated dishes in comparison with uncoated dishes. This result was in accordance with above-mentioned study.

We suggest that MSCs seeded on ECM coated dishes started already differentiate without osteogenic medium during proliferation in control medium before gaining of the total confluence. Time path of osteopontin expression in differentiated MSCs with or without ECM molecules also support results concerning osteonectin detection. Our study indicates comparable ability of miniature pig MSCs osteo-differentiation in 2D and 3D environment.

This work was supported by AV0Z50450515, 1M0538, and 2B06130.

References

1. **Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Häupl T, Sittlinger, M.** Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 321–327.
2. **Salasznyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE.** Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. 2004; 1: 24–34.
3. **Sumanasinghe RD, Bernacki SH, Lobo EG.** Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen matrices: effect of uniaxial cyclic tensile strain on bone morphogenetic protein (BMP-2) mRNA expression. *Tissue Eng* 2006; 12: 3459–3465.

Irradiation of dental pulp stem cells and periodontal ligament stem cells via ^{60}Co – apoptosis or senescence?

Visek B.¹, Soukup T.¹, Rezecova M.², Muthna D.², Bruckova L.³, Kucerova L.⁴, Jiroutova A.², Suchanek J.⁵, Mokry J.¹

¹Department of Histology and Embryology, Charles University in Prague, Medical Faculty in Hradec Králové;

e-mail: viseb6ar@ffhk.cuni.cz

²Department of Medical Biochemistry, Charles University in Prague, Medical Faculty in Hradec Králové

³Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice

⁴Department of Clinical Genetic, Teaching Hospital in Hradec Králové

⁵Department of Stomatology, Teaching Hospital in Hradec Králové

Dental pulp stem cells (DPSC) and periodontal stem cells (PLSC) are elements which significantly participate in regenerative processes in oral cavity. Their main role is maintenance of tissue homeostasis and regeneration of damaged tissues. More, many patients nowadays undergo radiotherapeutic treatment that is focused on oral tissues. So we put a question – what is the most expressive reaction of DPSC and PLSC to the irradiation? Can these cells hold their proliferation kinetic parameters or not? Which changes in cell cycle can we observe? These and some other questions are the particular aims of our work.

In this work we used gamma rays of ^{60}Co for irradiation. Applied doses were 2, 6 and 20 Gy. Moreover, we compared the irradiated cell lineages with control untreated cells. To the experiment were used 3 cell lineages (2 × DPSC, 1 × PLSC). These cell lineages were cultivated in MAPC media, contained PDGF + EGF both before and after irradiation. Cells were analyzed in days 1, 3, 6 and 13 after irradiation. Viability and proliferation activity were analyzed in ViCell XR and Z2 Counter (both Beckman Coulter), respectively. Cell cycle was assessed by using of 2 methods, both staining with propidium iodide and dual staining with anti-cyclin A2/7-AAD. Early and late phase of apoptosis were detected via Annexin V/7-AAD and analyzed by using flow cytometer Cell Lab Quanta SC+MPL (Beckman Coulter).

Both in light and phase microscope, irradiated cells did not show significant morphological changes. Cumulative number of population doublings was decreased both in DPSC and PLSC (DPSC: 5.8 (control lineage), 2.7 (2 Gy), 1.0 (6Gy) and 0.9 (20 Gy); PLSC: 5.3 (control lineage) and 1.4 (20Gy)). Viability showed decrement from 92.0% (control lineage) to 88.2% (2 Gy), 87.1% (6Gy) and 87.0% (20 Gy) in DPSC. Viability in PLSC decreased from 95.0% (control lineage) to 90.9% (20 Gy). In cell cycle phases we observed increased number of G2/M-phase in irradiated cells depending on the used dose. Percentage share of G2/M phase in DPSC was 12%, 13% and 63% in control lineage, 2 Gy and 20 Gy, respectively. PLSC showed increment from 11% to 45% in control lineage and 20 Gy, respectively. All the irradiated lineages showed high expression of beta-galactosidase. Both markers of early (Annexin V+/7-AAD-) and late (Annexin V+/7-AAD+) apoptosis in irradiated cells were not significantly increased compare to the control lineages. In karyotype we observed changes in all the irradiated lineages depend on the used radiation dose.

We concluded that the main reaction of the DPSC and PLSC to the irradiation is the senescence. There was observed the block in G2 phase of cell cycle and proliferation activity was significantly decreased, depend on used dose. There was not observed signs of apoptosis in all the cultivated and irradiated cells. The minimal changes of monitored parameters we observed in 2 Gy irradiated cell (both DPSC and PLSC). So we suppose that this dose is potentially acceptable in clinical applications.

This work was supported by grant GA CR 304/09/1568.

External quality control of CD34⁺ stem cell enumeration: a multicenter analysis

Lysák D.¹, Kalina T.², Martínek J.³, Píkalová Z.⁴, Vokurková D.⁵, Jarešová M.⁶, Marinov I.⁷, Ondřejková A.⁸, Špaček M.⁹, Stehlíková O.¹⁰

¹University Hospital Plzeň, Plzeň, Czech Republic; e-mail: lysak@fnplzen.cz

²Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

³P&R Lab a.s., Nový Jičín, Czech Republic;

⁴University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

⁵University Hospital Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic

⁶Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

⁷Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

⁸Krajská nemocnice T. Bati, a.s., Zlín, Czech Republic

⁹University Hospital Královské Vinohrady, Prague, Czech Republic

¹⁰The Faculty Hospital Brno, Brno, Czech Republic

CD34⁺ cell enumeration is one of the basic laboratory methods in haemato- oncology. Many clinical decisions are made on the basis of the results of this measurement (stem cell collection timing, graft quality assessment etc.). Therefore this method is expected to be adequately accurate and precise. The intra- and inter- laboratory variability should be minimal.

We performed a multicenter measurement of CD34⁺ cells. The aim of the project was to assess the inter-laboratory variability and verify the performance of participating laboratories. Since 11/2007 three send-outs were organized. Stabilized blood samples were sent into 10 Czech flow cytometry laboratories and analyzed according to the local protocols. WBC and CD34⁺ counts and basic methodological details were reported and statistically evaluated. A special scoring system was created comparing the measured value to the distribution of values reported by all laboratories (correct values have score -1 to +1). Most laboratories (9/10) have used ISHAGE based gating protocols (one laboratory Milan protocol) and double platform method.

Between-laboratory variability for CD34⁺ percent and CD34⁺ count (cells/κl) was higher during 1st control cycle (43 % and 58 %) in comparison to the later cycles (cycle 2.: 30 % and 32 %; cycle 3.: 29 % and 31 %). Following the 1st send-out the average score per sample has declined for CD34⁺ % (4.79 → 1.96 → 1.28) as well as for CD34⁺/μl (2.04 → 2.41 – new lab joined the project → 1.16).

The project was effective in reducing between-laboratory variability and resulted in more comparable results reported by participating laboratories. The control cycles also appeared to be useful as a tool of proficiency testing of the laboratory technicians. The analysis confirmed that the participation of the flow laboratory in some between-laboratory measurement or the external quality control scheme is an important part of the good laboratory practice and quality management system.

The study is supported by the grant of the Ministry of Health of the Czech Republic (IGA NR/ 9268-3).

Technical aspects and guidelines for application of EuroFlow protocols: towards 8-color flow cytometry in the diagnosis and classification of hematopoietic malignancies

Kalina T.¹, Flores-Montero J.², Lécresse Q.², Cullen M.³, Lhermitte L.⁴, Sedek L.⁵, Mendonça A.⁶, Böttcher S.⁷, te Marvelde J.⁸, Mejstříková E.¹, Hrusak O.¹, van Dongen J. J. M.⁸, Orfao A.² – On behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708)

¹Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University Prague and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; e-mail: tomas.kalina@lfmotol.cuni.cz

²Department of Medicine, Cancer Research Centre (IBMCC-CSIC-USAL) and Cytometry Service, University of Salamanca, Salamanca, ES

³St. James University Hospital, Leeds, UK

⁴Department of Hematology, Hôpital Necker, Paris, FR

⁵Department of Pediatric Hematology and Oncology, Medical University of Silesia, Zabrze, PL

⁶Department of Hematology, Instituto Portugues de Oncologia, Lisbon, PT

⁷2nd Department of Medicine, University Klinik Schleswig-Holstein, Kiel, DE

⁸Department of Immunology, Erasmus MC, Rotterdam, NL

EuroFlow collaborative project is aimed at designing approaches for fast and sensitive diagnostics of hematopoietic malignancies using 8-color flow cytometry. We have extensively tested approaches for instrument settings, compensation, choice of fluorochromes and staining protocols. We have developed new analysis software "Infinicyt" for advanced semi-automated analysis of 8-color flow cytometry data.

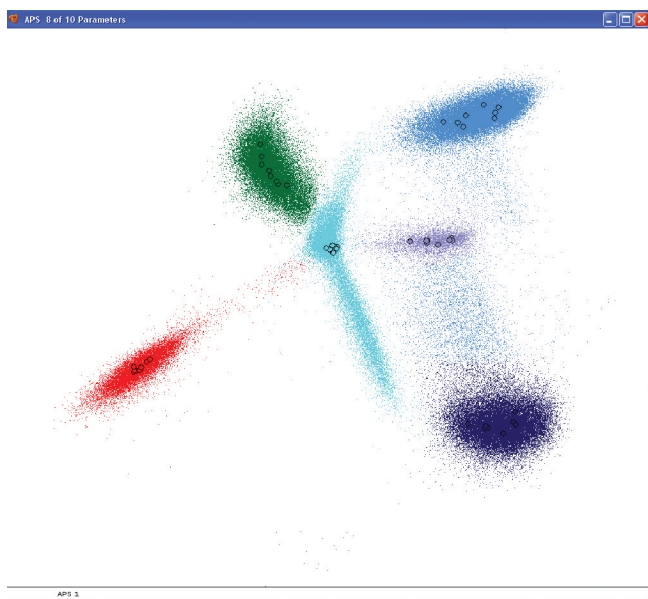


Fig. 1. Novel Infinicyt "APS view" presenting 8-parameter cells' phenotype in a single dot plot. B-cells in red, Monocytes in green, CD4-T cells in light blue, CD8-T cells in dark blue, NK-cells in turquoise.

When a test cohort of 30 healthy donors' peripheral blood was measured using the common Euroflow protocol in 8 participating laboratories, we could demonstrate the coefficients of variation of each parameter to be lower than 50%. Furthermore, we could merge the data files into one file that is amenable to analysis in the Infinicyt software where all expected cell types cluster to the same position (Fig. 1). In conclusion, we show that 8-color flow cytometry is useful tool for diagnosis and classification of hematopoietic malignancies.

Cytometry reveals differentiation in hematopoiesis

Hrušák O., Mejstříková E., Kalina T.

CLIP-Cytometry, Dept. of Pediatric Hematology and Oncology, Charles University and Univ. Hospital Motol, Prague; e-mail: Ondrej.Hrusak@lfmotol.cuni.cz

Clinical hematologists consider flow cytometry as the most useful laboratory investigation in acute leukemia (AL) diagnostics, as demonstrated in a recent poll. This is certainly influenced by a very good accessibility of diagnostic material – most importantly, bone marrow. Very good collaboration of clinical centers of the Czech Pediatric Hematology Working Group with our reference laboratory enables a population-based analysis. This shows the incidence of cell lineages (and cells at various stages of differentiation) that may undergo leukemic transformation. Subtype definition (based on the criteria of the European Group for Immunophenotyping of Leukemias, EGIL) is simple. However, there is a striking inconsistency worldwide in the way how definition is interpreted in everyday life. Therefore, there is a lack of consecutive cohorts of patients, which would show efficacy of different types of chemotherapy in borderline (=hybrid) AL. In our cohort of 694 pediatric patients, treated from 1996 to 2006 we show that the 5-year event-free survival is $75 \pm 2.1\%$ and $47 \pm 4.9\%$, following the lymphoid- or myeloid-directed therapy. In addition, we show various definitions of hybrid AL (AHL). Based on the uniform criteria, most of our AHL patients receive a lymphoid-directed therapy. Although the prognosis of AHL is generally poorer than that of non-hybrid ALL, we found no indication for a general use of myeloid-directed treatment in these patients. We show a usefulness of cytometric techniques in combination with molecular genetics and novel statistical approaches in the definition of AHL and other borderline AL subtypes.

Supported by IGA NR/9531-3, NPV 2B06064 and MŠMT MSM0021620813.

Dynamics of malignant and non malignant cells in bone marrow during the early phase therapy of childhood ALL; correlation with genetic changes using polychromatic FACS sorting

Mejstříková E.¹, Froňková E.¹, Lhermitte L.², Semerák P.¹, Kováč M.¹, Kalina T.¹, Hrušák O.¹

¹CLIP-Cytometry, Dept. of Pediatric Hematology and Oncology, Charles University and Univ. Hospital Motol, Prague; e-mail: ester.mejstrikova@lfmotol.cuni.cz

²Department of Hematology, Hôpital Necker, Paris, France

Bone marrow represents dynamic tissue with a complex cellular composition. Origin of leukemia interferes with non malignant hematopoiesis just not only on the basis of mechanical suppression but very probably also by soluble factors produced by non malignant and malignant cells. Therapy of leukemia represents a specific situation where reduction of blasts is accompanied by the reappearance of normal hematopoiesis. Leukemic cells non-randomly change its phenotype.

In patients with de novo ALL and in whom we evaluated MRD and reconstitution of non malignant hematopoiesis where analyzed in software FlowJo (4-color data, 10/2002 – 10/2007) and Infinicyt (8-color data, data since 11/2007 till now). WBC counts with differential count and hierarchical clustering analysis of initial immunophenotypic data were analyzed in recruited patients.

Background identified by 4-color was high at later time points when recovery of hematopoiesis is typical (day 33 and week 12) and this background hampered sensitivity in these

time points. 8-color FC leads to more fine separation of non malignant and malignant cells. We identified a novel subgroup of patients in who significant instability of immunophenotype leads to monocytic phenotype during the treatment.

To conclude, 8-color FC represents perspective methodology not only for MRD but also for the identification of novel ALL subtypes.

Supported by IGA NR/9531-3, NPV 2B06064 a MZ CR 000064203, MSM0021620813.

Detection of minimal residual disease of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry using the Rawstronęs protocol – a reliable tool for clinical evaluation of CLL therapy

Stehlíková O., Hrabčáková V., Francová H., Brychtová Y., Doubek M., Mayer J., Klabusay M.
Laboratory of Flow Cytometry and Cellular Therapy, Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Dept. of Internal Medicine – Hematooncology, University Hospital, Brno; e-mail: vhrabcakova@fnbrno.cz

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common type of leukemia in adult population. Prognosis of the disease is evaluated with respect to clinical as well as molecular parameters. After the modern intensive therapy regimens using monoclonal antibodies or allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells, complete remission (CR) of the disease is often reached, according to the NCI-WG criteria. However, in some patients, leukemic cells are still present at low counts (often less than 10^4 of leucocytes) as minimal residual disease (MRD). If present, these cells can cause a relapse of the disease after the treatment was ended. Rawstron et al. (Leukemia, 2007) developed an international standardized 4-color flow cytometry protocol on minimal residual disease detection and the data were also matched with molecular evaluation of MRD level. Due to specific phenotype of CLL or SLL (small-cell lymphocytic lymphoma) tumor cells, it is possible to determine the MRD level in peripheral blood or bone marrow down to less than 0.01% of leucocytes.

We used the flow cytometry protocol for MRD detection in routine monitoring of ten CLL patients after allogeneic stem cell transplantation. Four basic flow cytometry protocols using a combination of 4 monoclonal antibodies (anti-CD3, 5, 19, 20, 22, 38, 43, 45, 79b, and 81) were designed for a proper MRD interpretation. Peripheral blood and/or bone marrow specimen were also analyzed and compared with quantitative real-time PCR evaluation of mutation status of IgVH.

In this work, we present results of MRD observation on a pilot group of patients with CLL, who were treated at the Department of Internal Medicine-Hematooncology, University Hospital Brno. The results of treatment responses were correlated with blood count, presence of graft-versus-host disease or influence of immunosuppressive therapy. Regular observation of minimal residual disease after the CLL therapy using high-sensitive laboratory methods enables the modification of the therapy before the relapse of the disease and, according to the recent results, it is correlated with the prognosis of the patient.

This work was supported by grant IGA MZ ČR No. NS 9671-4.

Flow cytometric analysis of T regulatory cells in monoclonal gammopathy patients

Muthu Raja K. R.^{1,2}, Zahradova L.², Mikulkova Z.^{1,4}, Kovarova L.², Buresova I.², Hajek R.^{2,3}, Michalek J.^{1,4}

¹Dept of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic; e-mail: rajakarthick594@gmail.com

²University Research centre- Czech Myeloma Group, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Internal Hematooncology Department, Faculty Hospital, Brno, Czech Republic

⁴University Cell Immunotherapy Center, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Regulatory T cells (T reg) are immunosuppressive T cells which aid in maintenance of self tolerance and comprises about 5–10% among CD4+ T cell population. Monoclonal gammopathy patients were reported to highly associate with immune dysfunctions. So, we were interested to demonstrate the role of T reg cells in monoclonal gammopathy patients.

T reg cells were identified by the surface staining for CD4, CD25, CD127 and followed by intracellular staining for FoxP3. The phenotype of T reg cell population was characterized as CD4+CD25hi+FoxP3+ CD127 low/negative. Analyses of T reg cell level were done in peripheral blood and bone marrow of 68 monoclonal gammopathy patients and peripheral blood of 12 healthy volunteers. The patient group includes 11 MGUS patients, 5 asymptomatic myeloma (A MM) 39 myeloma patients (MM) and 13 relapsed patients. The median age of the patient group was 66.5 years; both male and female patients were in equal proportions in the group. Forty-nine patients had < 10% of bone marrow plasma cells and rest of the patients had > 10% of bone marrow plasma cells. Myeloma patients > 65 years were treated by low-dose regimen (cyclophosphamide 50 mg p.o daily, thalidomide 100 mg daily and dexamethasone 20 mg day 1–4 and 15–18) and < 65 years patients treated by high-dose regimen (cyclophosphamide 500 mg i.v day 1 and 15, thalidomide 200 mg daily, dexamethasone 40 mg day 1–4 and 15–18). Thirty myeloma patients have been analyzed for T reg cells in peripheral blood after each treatment cycle.

Statistically significant difference was observed in peripheral blood T reg cell level of the respective groups (MM vs relapsed myeloma $p = 0.01$, relapsed myeloma vs A MM $p = 0.01$, relapsed myeloma vs MGUS $p = 0.01$, relapsed myeloma vs healthy volunteers $p < 0.01$). Bone marrow T reg cell level also showed statistically significant difference between MM and MGUS patients ($p = 0.03$). No statistically significant difference was noticed in the level of T reg cells between > 10% and < 10% of bone marrow plasma cell infiltration group. Follow-up of myeloma patients during the treatment cycles showed statistically significant data in peripheral blood T reg cell level, between 2nd and 5th cycle ($p = 0.04$) of low dose group. No significant difference was observed in high dose group.

Our studies showed that there is a trend in increase of T reg cell levels in relapsed myeloma patients than other patient groups and healthy volunteers. There is no significant change in T reg cell levels after treatment, exceptionally in few cases.

This work was supported by MSMT LC06027, MSM 0021622434, MSMT NPV11 2B06058.

Flow cytogenetics accelerates genomics of cereals with complex genomes

Doležel J., Šimková H., Šafář J., Suchánková P., Bartoš J., Kubaláková M., Valárik M., Číhalíková J.
Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany, AS CR, v.v.i., Olomouc, Czech Republic;
e-mail: dolezel@ueb.cas.cz

Genome analysis and sequencing in barley, rye and wheat is hampered by their large and complex genomes, which consist mainly of repetitive DNA. Polyploidy adds another layer of complexity due to the presence of two and three homoeologous genomes in tetraploid and hexaploid wheat, respectively. While these features make wheat a suitable model to study genome expansion and the role of polyploidy in plant genome evolution, they make genome sequencing and dissection of traits of interest very difficult. With the aim to simplify the analysis of the giant genomes of cereals, we developed strategies to isolate chromosomes and chromosome arms using flow cytometric sorting. This approach makes it possible to target defined parts of the genomes representing only a few percent of nuclear genomes. Particular chromosomes are isolated by sorting based on intrinsic differences in DNA content. However, due to small differences in DNA content, only chromosome 3B can be sorted in wheat. We have demonstrated that this difficulty can be overcome by means of cytogenetic stocks. Thus, in tetraploid wheat, all chromosome arms can be sorted from lines carrying telocentric chromosomes (telosomes). The use of double ditelosomic lines facilitates simultaneous sorting of long and short arms. In hexaploid wheat, all chromosome arms can be sorted from telosomic lines except of long arms of chromosomes 3B and 5B, which can only be sorted as isochromosomes. In barley and rye, only chromosomes 1H and 1R can be sorted from lines with normal karyotypes. However, arms of all remaining chromosomes can be sorted from wheat-barley and wheat-rye chromosome arm addition lines.

The ability to obtain high-quality DNA from particular chromosomes and arms has opened new avenues for genome analysis in these crops. For wheat and rye, chromosome-specific BAC libraries are being created and used to construct BAC contig maps to facilitate genome sequencing and positional gene cloning. The plan is to construct BAC libraries from all 21 chromosomes of hexaploid wheat. Subgenomic BAC libraries and DNA from sorted chromosomes have been used to develop DNA markers to enrich genetic maps at selected genome regions. In applications that require large amounts of DNA but not of high molecular weight, time consuming chromosome sorting can be replaced by representative whole-genome amplification. The amplified DNA can be used for high-throughput allocation of DNA markers to chromosomes and arms using DNA arrays. Shotgun sequencing using the next-generation sequencing technologies is an emerging and powerful application of DNA amplified from sorted chromosomes, as large amounts of sequence data can be obtained from target genome regions in a short time.

This work has been supported by the Czech Science Foundation (grant awards 521/07/1573, 521/08/1629) and the Czech Republic Ministry of Education, Youth and Sports (grant award LC06004).

Structural changes of the chromatin during protoplastization of the plant cells and their regeneration

Ondřej V., Protivánková I., Doležalová I., Lebeda A.
Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic; e-mail: vladan.ondrej@upol.cz

Plant protoplasts (plant cells devoid of a cell wall) represent a very efficient experimental model for physiological, molecular, and developmental studies because of their capability to dedifferentiate, re-enter the cell cycle, and then proliferate or regenerate into the various organs, or else make new plants in the same way as zygotes. They are also valuable tools for biotechnological applications such as somatic hybridization, increasing genetic variability by somaclonal variability, and genetic transformation. It has become a 'hot topic' to study protoplast dedifferentiation, not only as a biotechnological application in modern breeding systems, but also in order to find the mechanisms of protoplast development to totipotency and relationships to changes in nuclear organization.

Chromatin is a substrate for several key processes related to the switching on and off of genes within cell differentiation, and development of the organism. The chromatin, in both animal and plant cells, undergoes epigenetic changes, such as in chromatin condensation (Tessadori et al., 2007) and covalent modifications in DNA and in histone tails (Jenuwein and Allis, 2001; Verbsky and Richards, 2001). Protoplast dedifferentiation is characterized by a new balance between the less-dense portion of the genome that is transcribed (euchromatin), and that which is condensed with repressed transcription (heterochromatin). In plants, except those with high genome size (reviewed in van Driel and Fransz, 2004) highly condensed chromatin is easily recognized by light microscopy, after DAPI staining of the interphase nuclei. These blocks of heterochromatin (chromocenters) lose their compaction during protoplast dedifferentiation (Tessadori et al., 2007; Ondřej et al., 2009). Using FISH technique we were able to study rearrangement of the repeated sequences of the cucumber genome that are located in the chromocenters in relation to the protoplasts re-entering to the cell cycle and their regeneration. We found large-scale relaxation of the pericentromeric repeats and subtelomeric satellite DNA type I repeats but just partial relaxation of 5S rDNA repeats. The re-entry to the cell cycle of the protoplasts is demonstrated by the occurrence of partial repeats reassembly and establishing new formed chromocenters 48 hours after protoplasts isolation.

This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (MSM 6198959215).

References

1. **Jenuwein T, Allis CD.** Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074–1080.
2. **Ondřej V, Kitner M, Doležalová I, Nadvorník P, Navrátilová B, Lebeda A.** Chromatin structural rearrangement during dedifferentiation of protoplasts of *Cucumis sativus* L. *Molecules and Cells* 2009; 27: 443–447.
3. **Tessadori F, Chupeau MC, Chupeau Y, Knip M, Germann S, van Driel R, Fransz P, Gaudin V.** Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated *Arabidopsis* cells. *Journal of Cell Science* 2007; 120: 1200–1208.
4. **van Driel R, Fransz P.** Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both? *Experimental Cell Research* 2004; 296: 86–90.
5. **Verbsky ML, Richards EJ.** Chromatin remodeling in plants. *Current Opinions in Plant Biology* 2001; 4: 494–500.

Glycerol-based preservation technique of plant tissues for flow cytometric analyses

Kubešová M.^{1,2}, Kolář F.³, Loureiro J., Těšitel J.³, Trávníček P.^{1,2}, Suda J.^{1,2}

¹Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; e-mail: kubesovamagdalena@seznam.cz

²Institute of Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Průhonice, Czech Republic

³Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Flow cytometry (FCM) has experienced a massive boom in study of plant population biology and biosystematics in last years. The universal use of FCM in this field is, however, strongly hampered by a need of fresh plant tissues for the analyses. Several techniques of storage of plant material for FCM analyses have been proposed, nevertheless, none of them could be accepted as a sufficient universally applicable method. In particular, the poor results of genome size determination procedures (propidium iodide FCM) of long-term stored samples call for further investigations in this field.

We have studied possibilities of isolated plant nuclei storage in 30% glycerol solution in freeze conditions (Hopping 1993). We have focused on the utility of this originally „intra-laboratory“ procedure for a long-term storage of various plant taxa collected in the field. Moreover, performance of the glycerol procedure has been compared to other routinely used plant storage techniques, i.e. silica-gel dried samples and fresh tissue stored in cold. The first dataset based on 34 species from Papua New Guinea tropical forest revealed the wide applicability of the glycerol storage technique across the angiosperms. Moreover, in most cases this procedure gave the most convenient FCM results from all the storage techniques used (the highest proportion of successful analyses and the lowest CVs within the successful analyses). In particular, the applicability of this technique for the genome-size estimation procedure (propidium iodide FCM) should be highlighted. No degradation of the up to 15 days stored frozen samples has been shown as a general feature. Secondly, a laboratory experiment with six taxa (including three routinely used plant standards) has been conducted in order to further evaluate the temporal change of the glycerol-preserved nuclei and to quantify the possible effect of various preserving techniques on fluorescence shifts in FCM analyses.

In conclusions, the glycerol-based preservation technique of plant nuclei seems to be a convenient (yet not universal) alternative for long-term storage of plant material collected for FCM analyses in some flow cytometer remote areas (e.g. the tropics).

References

1. **Hopping ME.** Preparation and preservation of nuclei from plant-tissues for quantitative DNA analysis by flow cytometry. – New Zealand Journal of Botany 1993; 31: 391–401.

Morphological and ecological differentiation within *Glyceria fluitans*-group

Chudáčková H.^{1,2}, Vít P.², Urfus T.^{2,3}, Zákřavský P.³, Hroudová Z.³

¹Dept. of Botany, National Museum, Prague, Czech Republic; e-mail: hana.chudackova@gmail.com

²Dept. of Botany, Charles University, Prague, Czech Republic

³Dept. of Genetic Ecology, Institute of Botany of Academy of Science of the Czech Republic, Průhonice, Czech Republic

Complexes of closely related taxa often show significant differences in ecological demands whereas their morphological differences might be very small. Knowledge of the differentiation between taxa in both ways can reveal important information about microevolutionary processes in the whole group. Wider geographical distribution can be caused by polyploidization but it can also be influenced by higher level of phenotypic plasticity. We have therefore attempted to assess the possible reasons for differentiation within a model group of four closely related taxa – *Glyceria fluitans* group.

The *Glyceria fluitans* group is a complex of closely related taxa that differ, besides ploidy level, also in their European area of distribution and frequency of occurrence. Their distribution areas overlap in the Czech Republic. Some differences in reproductive systems in this group are known thanks to work of British botanist Martin Borrell (Borrell 1956, 1958). Frequency of occurrence seems to correlate with ploidy level, tetraploids (*G. fluitans* and *G. notata*) being the more frequent while diploids (*G. declinata* and *G. nemoralis*) occur rarely. A wide range of methods have been employed in order to reveal which environmental conditions and characteristics of individual species may be connected to their performance and whether their morphological variation correlates with their ecological amplitude.

The species under study showed differences in habitat range (polyploids having more than one ecological optimum), soil reaction (*G. fluitans* preferring lower pH whereas *G. notata* occurs in alkaline, K⁺ rich soils), soil trophic levels (the occurrence of *G. nemoralis* seems to correlate closely with the presence of phosphorus in the soil – unlike *G. declinata*, which prefers soils low in nutrients), and in species composition of plant communities (this reflects the differences in preferred habitats). Among the diploids, *G. declinata* inhabits secondary habitats, on contrary to *G. nemoralis*, while tetraploids differ in their preference of either running or stagnant water. Although *G. declinata* is distributed sparsely in its native area of distribution, it was currently found spreading as an invasive plant in parts of California.

Using a very efficient method of flow cytometry, the nuclear genome size was established for the first time for most members of this group. Differences in nuclear genome size among diploids were found – unlike in tetraploids, which were indistinguishable. The results are consistent with studies showing that species with larger genomes tend to be limited in their distribution and range of ecological environments they can occupy (*G. nemoralis*, with the highest 1Cx value, is the rarest species in this group). A biosystematic approach (DAPI and propidium-iodide flow cytometry, chromosome counting using rapid squash techniques, isoenzyme analyses and multivariate morphometrics) was employed together with measurements of environmental factors such as soil chemistry, plant species community etc.

Frequency of occurrence, morphological variation and ties to abiotic environmental factors were compared in order to assess the influence of various environmental factors on the main characteristics of each species. Multivariate statistics shed some light on the main differences between the studied species. Two taxa with previously unknown morphology were found on one location in the vicinity of Znojmo (southern Moravia). As the flow cytometry analyses revealed major differences in these two taxa's nuclear genome size unlike

any interspecies variation found among the rest of the 600 plants, they are thought to be somewhat different from the rest of the *Glyceria fluitans* group. When morphological differences were found to support the flow cytometry results, a hybrid origin of at least one of these taxa was proposed.

The possibility of allotetraploid origin of *Glyceria notata* can also be suggested as this species carries intermediate morphological characteristics of the two possible parents – the diploids *G. nemoralis* and *G. declinata*. Although the cytometry analyses support this hypothesis we were unable to obtain verification by the means of isoenzyme analyses. Therefore employment of molecular techniques such as AFLP or ITS sequencing is needed in order to solve this matter without any doubts and is expected to be carried out in a near future.

This work was supported by the Grant Agency of the Charles University (project no. 43-257124; 2007-2009).

References

1. **Borrill M.** A biosystematic study of some *Glyceria* species in Britain. 1. Taxonomy. *Watsonia* 1956; 3: 291–298.
2. **Borrill M.** A biosystematic study of some *Glyceria* species in Britain. 2. Cytology. *Watsonia* 1956; 3: 299–306.
3. **Borrill M.** A biosystematic study of some *Glyceria* species in Britain. 3. Biometrical studies. *Watsonia* 1958; 4: 77–88.
4. **Borrill M.** A biosystematic study of some *Glyceria* species in Britain. 4. Breeding systems, fertility relationships and general discussion. *Watsonia* 1958; 4: 89–100.

The *Juncus bufonius* polyploid complex in central Europe

Rooks F.¹, Jarolímová V.², Drábková L.², Kirschner J.²

¹Department of Botany, Faculty of Science,
Charles University in Prague, Czech Republic;
e-mail: fredrooks@gmail.com

²Institute of Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic,
Czech Republic

Cytometric ploidy level screening was done in 120 populations of the cosmopolitan *Juncus bufonius* group, mainly in central Europe. Two polyploid cytotypes, which are sometimes treated separately as *J. minutulus* and *J. bufonius* s. str., were detected and considered to be DNA tetraploids and hexaploids with 2C values of $1.18 \pm 2.8\%$ pg 2C DNA and $1.84 \pm 1.6\%$ pg 2C DNA, respectively. The correspondence between nuclear DNA content and the number of chromosomes was verified by chromosome counting, establishing that true polyploidy, as opposed to agmatoploidy, is behind the karyological variation. To assess the utility of supposedly diagnostic quantitative morphological characters, measurements of 6 floral and 3 vegetative quantitative characters (no less than 10 measurements per flower, 30 per plant) were obtained for 358 mature plants of known ploidy level from 49 localities. Principal component analysis did not show any separation of the ploidy levels. Canonical discriminant analysis indicated inner tepal length followed by mean capsule width and mean capsule length to be the most useful characters for identifying the ploidy levels; however, the estimated cross-validation error rate of a simple k nearest neighbor classification analysis is 0.45. No novel distinction between the cytotypes was discovered. It is thus concluded that it is impossible to reliably tell apart *J. minutulus* and *J. bufonius* s. str. in both mixed or pure populations. Therefore, *J. bufonius* in Europe is best treated as a single variable species with two cytotypes which are almost inseparable using quantitative morphological traits suggested by extant literature.

Genome size in *Hieracium* subgenus *Hieracium* (Asteraceae) is strongly correlated with major phylogenetic groups.

Chrtek Jr. J.^{1,2}, Zahradnicek J.², Krak K.¹, Fehrer J.¹

¹Institute of Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic,
Průhonice, Czech Republic; e-mail: chrtek@ibot.cas.cz

²Department of Botany, Faculty of Science,
Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Hieracium subgenus *Hieracium* is one of the taxonomically most intricate groups of vascular plants, due to polyploidy and a diversity of breeding systems including sexuality and apomixis (Gustafsson 1974). The aim of the present study was to analyze nuclear genome size in a phylogenetic framework and to assess relationships between genome size and ploidy, breeding system and selected ecogeographic features.

Holoploid and monoploid genome sizes (C- and C_x-values) of 215 cultivated plants from 89 field populations of 42 so-called 'basic' *Hieracium* species were determined using propidium iodide flow cytometry. Chromosome counts were available for all analyzed plants, and all plants were tested experimentally for their mode of reproduction (sexuality vs. apomixis). For constructing molecular phylogenetic trees, the external transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA was used.

The mean 2C values differed up to 2.37-fold among different species (from 7.03 pg in diploid to 16.67 in tetraploid accessions). The 1C_x values varied 1.22-fold (between 3.51 and 4.34 pg). Variation in 1C_x values between conspecific (species in a broad sense) accessions ranged from 0.24% to 7.2%. Little variation (not exceeding the approximate measurement inaccuracy threshold of 3.5%) was found in 33 species, whereas variation higher than 3.5% was detected in seven species. Most of the latter may have a polytopic origin. Mean 1C_x values of the three cytotypes (2n, 3n and 4n) differed significantly (average of 3.93 pg in diploids, 3.82 pg in triploids and 3.78 pg in tetraploids) indicating downsizing of genomes in polyploids. The pattern of genome size variation correlated well with two major phylogenetic clades which were composed of species with western or eastern European origin. The monoploid genome size in the 'western' species was significantly lower than in the 'eastern' ones. Correlations of genome size with latitude, altitude and selected ecological characters (light and temperature) were not significant. A longitudinal component was apparent only for the whole data set but was absent within the major lineages.

Phylogeny was the most important factor explaining the pattern of genome size variation in *Hieracium* sensu stricto, species of western European origin having significantly lower genome size in comparison with those of eastern European origin. Any correlation with ecogeographic variables, including longitude, was outweighed by the divergence of the genus into two major phylogenetic lineages.

References

1. **Gustafsson A.** Apomixis in higher plants II. The causal aspect of apomixis. *Acta Univ Land N. F. Adv* 1974; 43: 69–179.

Apoptosis induced by valproic acid in normoxic and hypoxic conditions in neuroblastoma cell lines

Cipro Š.¹, Hřebačková J.¹, Hraběta J.¹, Poljaková J.^{1,2}, Eckschlager T.¹

¹Dept. of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; e-mail: simon.cipro@gmail.com

²Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

Valproic acid (VPA) is a widely used histone deacetylase inhibitor. It is well described as a potent inducer of apoptosis in many cancers. Nevertheless, these experiments were performed in normoxic conditions (21% of O₂) only. Commonly, solid tumors contain hypoxic areas that are caused partly by imbalance between angiogenesis and tumor growth and partly by low quality of new vessels. Hypoxia could lead to more aggressive phenotype of tumor cells and contribute to development of chemoresistance. Moreover, hypoxia could up-regulate antiapoptotic proteins such as Bcl-2 or IAP-2 (Dong, 2003) and down-regulate proapoptotic proteins such as Bid and Bax (Erler et al., 2004). Sensitivity of hypoxic cells to apoptosis could be then significantly decreased. Some of these pro/antiapoptotic proteins are under transcriptional control of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1).

HIF-1 is a transcription factor playing pivotal role in adaptation to hypoxia, its protein level is decreased by VPA and other histone deacetylase inhibitors as well (Kim et al., 2007). Thus, we elucidated whether VPA-induced apoptosis is present also in hypoxia and if this type of cell death is processed through the same pathways as in normoxia.

Four neuroblastoma cell lines were used in this study: UKF-NB-3 (N-type), SK-N-AS (S-type) and cell lines derived from these resistant to cisplatin. Apoptosis was measured using two independent methods; sub-G1 peak and annexin V/PI staining (BioVision). Cell cycle analysis was performed with propidium iodide. Cells were evaluated by flow cytometry. For hypoxic conditions, cells were incubated in hypoxic chamber with 1% O₂, 5% CO₂ and 94% N₂. IC₅₀ values of VPA were assessed by MTT assay. Samples were treated with different concentrations of VPA (0.5, 1, 2, 5, 10 mM) for 24 and 48 hours.

We confirmed previous reports that VPA provokes apoptosis in normoxia. Interestingly, we found that VPA-induced apoptosis is much more prominent in hypoxia. These differences between normoxia and hypoxia are evident even after treatment with 1 mM VPA, serum concentration usually found in patients treated with VPA. In UKF-NB-3, relevant amount of apoptotic cells was detected after 24-hour incubation with 2 mM VPA; 3.3 % in normoxia and 10.9 % in hypoxia. Apoptosis in SK-N-AS appeared no earlier than after 48 hours. These findings were consistent with our previous results where in normoxia SK-N-AS cells revealed less susceptibility to VPA (IC₅₀ values was 1.02 mM and 2.06 mM for UKF-NB-3 and SK-N-AS respectively).

We used caspase-8 inhibitor to determine whether apoptosis is initiated by extrinsic apoptotic pathway both in normoxia and hypoxia. 5 mM VPA reduced apoptosis in SK-N-AS cells in normoxia whereas its level remained unchanged in hypoxia. These data suggest that VPA-induced apoptosis is processed through another pathway than in normoxia.

Cell cycle analysis showed that VPA treatment led to G2/M arrest, with significant difference between controls and VPA treated samples at VPA concentrations of 5 and 10 mM. Cell cycle arrest likely contributes to initiation of apoptosis.

To evaluate if the treatment with VPA could prevent chemoresistance in hypoxia, we measured apoptosis induced by 1 mM VPA and 1 μM cisplatin in combination. Rate of

apoptosis in UKF-NB-3 treated with cisplatin was 7.5% in normoxia and 4.3% in hypoxia. Treatment of these cells with the combination caused 15.7% apoptosis in normoxia and 18.6% in hypoxia. Our data showed that hypoxia-induced chemoresistance might be prevented by VPA. Moreover, there is synergistic effect between these drugs both under normoxic and hypoxic conditions.

We described that hypoxia does not decrease VPA-induced apoptosis which further strengthen the hypothesis that VPA used either in monotherapy or in combination with other anticancer agents could be beneficial in treating neuroblastoma.

This work was supported by grant GAUK 72208/2008.

References

1. Dong Z, Wang JZ, Yu F, Venkatachalam MA. Apoptosis-resistance of hypoxic cells: multiple factors involved and a role for IAP-2. – Am J Pathol 2003; 163: 663–671.
2. Erler JT, Cawthorne CHJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford IJ, Dive C. Hypoxia-Mediated Down-Regulation of Bid and Bax in Tumors Occurs via Hypoxia-Inducible Factor 1-Dependent and Independent Mechanisms and Contributes to Drug Resistance. Mol Cell Biol 2004; 24: 2875–2889.
3. Kim SH, Jeong JW, Park JA, Lee JW, Seo JH, Jung BK, Bae MK, Kim KW. Regulation of the HIF-1 stability by histone deacetylases. Oncol Rep 2007; 18: 647–651.

Reovirus induced cell death in hypoxic and apoptosis resistant medulloblastoma cells

Hraběta J., Figová K., Cipro Š., Eckschlager T.

Department Pediatric Hematology/Oncology, Charles University 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; e-mail: janhrabeta@gmail.com

Despite the advances in clinical oncology that help to decrease patients' mortality, cancer remains one of the main causes of death in all developed countries. Current efforts to improve cancer therapy are aimed at enhancing drug efficacy while maintaining acceptable degree of toxicity. In order to succeed, innovative therapeutic modes have been designed. One of these is represented by oncolytic viruses that infect, replicate in, and lyse tumor cells, but do not grow at all, or at a limited extent, in non-tumor cells (Eckschlager and Figová, 2008). Reoviruses (RV) (acronym for Respiratory Enteric Orphan viruses) are viruses that, thanks to their natural properties, selectively replicate in a wide spectrum of tumor cells. Research into the mechanism of reovirus tumor selectivity has revealed that they replicate well in cells with activated *Ras* signaling pathway, which is an attribute shared by many cancer cells. *In vitro* studies, animal experiments and, subsequently, clinical studies suggested that reovirus type 3, strain Dearing, may be an efficient and safe anticancer agent (for review see Eckschlager and Figová, 2008).

Tumor hypoxia strongly correlates with advanced disease stage and poor clinical outcome. This is, in part, due to increased genomic instability in hypoxic tumor cells and enhanced resistance of hypoxic tumors to radio- and chemotherapy. While the mechanism of hypoxic cell radioresistance is well characterized, the underlying mechanisms contributing to hypoxia-mediated chemoresistance are poorly understood. Some studies demonstrated that hypoxia-induced chemoresistance to cisplatin and doxorubicin *in vitro* is through the HIF pathway and was inhibited by silencing of HIF-1 α gene (Brown et al. 2006).

The aim of this study was to compare the effects of RV on medulloblastoma (MBL) derived cell lines in hypoxic and

normoxic conditions and to elucidate whether hypoxia (atmosphere with 1% O₂) influence replication of RV and its oncolytic activity in MBL in *in vitro* conditions.

Used cell lines: medulloblastoma derived lines Daoy and U87. Reovirus type 3, strain Dearing was propagated in Vero cells. Virus stocks were kept frozen at -70 °C. Their titres were determined by the standard plaque assay using agar overlay. For induction of hypoxia conditions *in vitro*, we cultivated the cells in a closed system (Hypoxic chamber, Billups-Rothenberg, Inc., USA) with defined gas mixture: O₂ (1%), CO₂ (5 %), N₂ (94 %). Hypoxic phenotype of tested cells was verified by the expression of HIF protein using Western blot or real time RT PCR (VEGF, GLUT1). We determined RV antigen producing cells by indirect immunofluorescence measured by flow cytometry after permeabilisation of the cells using Fix & Perm kit (An der Grub) according to manufacturer's protocol. As the primary antibody we used MAB994 monoclonal antibody reactive with RV type 3 σ1 hemagglutinin (Millipore, Billerica, MA) and as the secondary antibody the FITC-Conjugated Goat Anti-mouse Immunoglobulin Polyclonal Antibody (BD). IC₅₀ of cytostatics and RV were assessed by MTT test and calculation done from non-linear regression curve. Cell cycle analysis was performed by flow cytometry (FACSCalibur). Apoptosis was determined by flow cytometry as hypodiploid peak and by the examination of modifications of nuclear morphology using fluorescent microscope.

RV is able to replicate in MBL cell line both in normoxic and hypoxic conditions. Percentage of apoptotic cell is higher in normoxia than in hypoxia 24 and 48 hrs after infection however after 72 hrs is higher in hypoxia. We suppose that after 3 days cells are adapted to hypoxia. On the other hand susceptibility of MBL cells to cisplatin is reduced in hypoxia even after 4 days. RV induced arrest of MBL cells in G2/M phase of cell cycle in normoxic conditions and abolished hypoxia induced G0/G1 cell cycle arrest and induced G2/M arrest. This is in accordance with the observations of Tyler and colleagues made in mouse L929 cells and other cell lines susceptible to RV, that the virus induces apoptosis and cell cycle arrest in G2/M phase (Tyler et al, 2001). Pancaspase inhibitor (Z-VAD-FMK) suppressed apoptosis caused by RV in normoxia and hypoxia, but did not significantly increase cell viability.

We conclude that RV induces changes of cell cycle kinetics and death of MBL cells which is caspase independent in normoxic and hypoxic conditions. One might speculate that RV therapy is promising therapeutic tool in MBL which is active also in hypoxic parts of tumor that are less sensitive to radiotherapy and chemotherapy.

Supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of The Czech Republic - Grant MSM 0021620813.

References

1. **Brown LM, et al.** Reversing hypoxic cell chemoresistance *in vitro* using genetic and small molecule approaches targeting hypoxia inducible factor-1. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 411-418.
2. **Eckschlager T, Figova K.** Reolysin. *Drugs future* 2008; 33: 489-495.
3. **Tyler KL, et al.** Reoviruses and the host cell. *Trends Microbiol* 2001; 9: 560-564.

Expression changes in neuroblastoma cell lines caused by development of drug-resistance

Procházková P.¹, Libra A.², Hraběta J.¹, Poljaková J.¹, Bunčák M.², Eckschlager T.¹

¹Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Medical School Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; e-mail: proch.pavel@gmail.com

²Generi-Biotech, Hradec Králové, Czech Republic

One of the main causes of chemotherapy failure is the rise of resistance. Drug-resistant lines, which can be prepared by exposing parental cells to increasing concentrations of a particular drug, have been shown to be suitable models for the study of changes accompanying resistance and its mechanisms (Kotchetkov et al., 2005). In our work, we concentrated on drug-resistance of high-risk neuroblastoma (HR NBL), which is the most frequent extra-cranial tumor in children and is a major cause of death from neoplasia in infancy.

Drug-resistance in NBL might be caused by multiple factors, including overexpression of the genes for the multidrug-resistance-associated protein (mrp) and MDR1 gene-encoded P-170 glycoprotein (Pgp). ATP binding cassette transporters (ABC transporters) could be overexpressed and thus expulse drugs from cells. Drug-resistance could be also caused by changes in apoptotic pathways e.g. mutations of p53 and/or overexpression of Bcl-2 that contribute to neoplastic transformation by blocking apoptosis.

The well known mechanism of drug-resistance is overexpression of Pgp. We used flow cytometry and examined expression of Pgp in cell lines resistant to drugs commonly used in NBL therapy i.e. doxorubicin (DOXO) and vincristine (VCR) and to not common drug in cancer treatment – ellipticine (ELLI). DOXO and VCR-resistant cell lines have high expression of Pgp, which certify that DOXO and VCR are expelled from cells by Pgp. ELLI-resistant cell line have surprisingly decreased expression of Pgp. In examination of other proteins that could have role in drug-resistance, only mrp2 and CD57 have approximately 1,5x higher expression in comparison to the sensitive cell line.

For better description of possible mechanism of ELLI-resistance we used expression microarray analysis. We registered the downregulation of P-gp expression which was consistent with flow cytometric analysis. The expression of most other ABC transporters was not influenced. In apoptotic pathways, we found deletion of BAX gene investigated by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and higher expression of Bcl-2 protein. Both have no significant changes on mRNA expression levels. This is not too meaning change and we suppose that modifications in apoptotic pathways might be additional mechanism in ELLI-resistance.

Characteristic change for ELLI-resistance is downregulation of topoisomerase II (TOPII) (Khélifa et al., 1999). TOPII mediate topological changes in DNA by a process in which DNA segments are passing through transient DNA double strand breaks. In microarray and real-time PCR experiment we observed downregulation of both TOP (TOPI and TOPII α). Downregulation of TOPI and TOPII α correspond with loss of one gene copy of TOPI and TOPII α investigated by FISH.

Mechanism of ELLI and DOXO action is similar. Both drugs intercalate DNA and/or induce inhibition of TOPII (Fosse et al., 1992). DOXO-resistant cell line has high Pgp expression which corresponds to upregulation of MDR1. Using expression microarray we found out in DOXO-resistant cell line many expression changes which could fill in next information about DOXO-resistance. DOXO-resistant cells upregulate DNAJC15 which is usually downregulated in drug-resistant cells or his inactivation is connected with development of pediatric brain tumors (Lindsey et al., 2006).

Next identify target of drug-resistance is upregulation of MM-TRAG (MGC4175) which is overexpressed especially in DOXO-resistant cells (Duan et al., 2004).

Our results demonstrate that drugs with similar mode of action could have different mechanism of resistance. We confirmed that DOXO- and VCR-resistance is especially caused by overexpression of Pgp in majority of NBL lines. Contrary wise DOXO-resistant MR-32 does not overexpress Pgp. ELLI-resistance is complicated phenomenon which still waiting for future discovery.

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant MSM0021620813) and Ministry of Health (grant 1A8696-4/2005).

References

1. **Duan Z, Brakora KA, Seidel MV.** MM-TRAG (MGC4175), a novel intracellular mitochondrial protein, is associated with the taxol – and doxorubicin-resistant phenotype in human cancer cell lines. *Gene* 2004; 340: 53–59.
2. **Fosse P, Rene B, Charra M, Paoletti C, Saucier JM.** Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by ellipticine derivatives: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 1992; 42: 590–595.
3. **Khélifa T, René B, Le Mée S, Lambert B, Saucier JM, Markovits J, Jacquemin-Sablon H, Jacquemin-Sablon A.** Transfection of 9-hydroxyellipticin-resistant Chinese hamster fibroblasts with human topoisomerase II α cDNA: selective restoration of the sensitivity to DNA religation inhibitors. *Cancer Res* 1999; 59: 4927–4936.
4. **Kotchetkov R, Driever PH, Cinatl J, Michaelis M, Karaskova J, Blaheta R, Squire JA, Von Deimling A, Moog J, Cinatl J Jr.** Increased malignant behavior in neuroblastoma cells with acquired multi-drug resistance does not depend on P-gp expression. *Int J Oncol* 2005; 27: 1029–1037.
5. **Lindsey JC, Lusher ME, Strathdee G, Brown R, Gilbertson RJ, Bailey S, Ellison DW, Clifford SC.** Epigenetic inactivation of MCJ (DNAJD1) in malignant paediatric brain tumours. *Int J Cancer* 2006; 118: 346–352.

The minimal residual disease is an independent negative prognostic factor in colorectal cancer patients

Srovnal J.¹, Kesselova M.¹, Vyslouzil K.², Skalicky P.², Straznicka J.³, Sramek V.³, Cwiertka K.³, Ruzkova V.¹, Radova L.¹, Hajduch M.^{1,3}

¹Laboratory of Experimental Medicine, Department of Pediatrics; e-mail: josef.srovnal@seznam.cz

²1st Department of Surgery

³Department of Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, and University Hospital in Olomouc, Czech Republic

Minimal residual disease (MRD) in colorectal cancer patients means the presence of isolated tumor cells in patient, who underwent radical resection of primary tumor and has no signs of systemic disease. It is supposed, that these isolated tumor cells can be a precursors of micrometastasis. But prognostic value of MRD is still not clear. In our project we aimed on the detection of MRD in colorectal cancer patients using QRT-PCR method and we correlated our results with clinical-pathological features of the disease.

For the detection of MRD in peripheral blood and bone marrow we used QRT-PCR for a carcinoembryonic antigen (CEA) and cytokeratine 20 (CK20) as a cancer cells markers. This method is very sensitive and can detect 1 cancer cell in nearly 10 millions of non-cancer cells, thus allow us to make more precise staging in colorectal cancer patients. In the years 2004–2006 we examined for MRD more than 200 colorectal cancer patients of stage I–III, who underwent

curative surgery at 1st Department of Surgery of FN and LF Olomouc. The samples of peripheral blood and bone marrow at surgery and one month after surgery were analyzed for the MRD presence in each patient.

We found out, that the bone marrow is more suitable compartment for MRD investigation than peripheral blood. The presence of MRD in bone marrow predicts the systemic relaps. The results of survival analysis show significant better disease-free survival (DFS) in control bone marrow MRD negative patients than MRD positive ($p = 0,01$). We found, that not only the MRD positivity, but also the increasing of MRD in bone marrow indicates shorter DFS ($p = 0,0005$).

Conclusion: Using QRT-PCR method we can identify colorectal cancer patients with low clinical stage of disease, but in higher risk of disease recurrence, who could have benefit from adjuvant chemotherapy. In our study we demonstrate, that the minimal residual disease is an independent negative prognostic factor in colorectal cancer patients

This project was supported by grant projects MSM6198959216, IGA MZ CR NR/7804-5 and MPO 1H-PK/45.

Dynamic monitoring of epithelial-mesenchymal transition induced by the transforming growth factor – 1 in prostate epithelial cells

Staršichová A.¹, Kubala L.², Lincová E.¹, Pernicová Z.¹, Kozubík A.¹, Souček K.¹

¹Department of Cytokinetics; e-mail: ksoucek@ibp.cz

²Department of Free Radical Pathophysiology, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic

Phenomenon of plasticity of differentiated adult cells could have great therapeutic potential, but at the same is characteristic for progression of serious pathological states. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a crucial process in embryogenesis, but it also occurs during progression of tumors derived from epithelial cells. We report on application of a real-time noninvasive system for dynamic monitoring of cellular plasticity. Analysis of cell impedance profile recorded as cell index using a real-time cell analyzer revealed its significant increase after the treatment with the transforming growth factor – 1 in prostate epithelial cells. Changes in the cell index profile were parallel with cytoskeleton rebuilding and induction of epithelial-mesenchymal transition and negatively correlated with cell proliferation. This novel application of such approach demonstrated great potential of the impedance-based system for noninvasive and real-time monitoring of cellular fate.

This work was supported by grant No. 204/07/083 of the Czech Science Foundation, grant No. 9600-4 of the Ministry of Health of the Czech Republic and grants Nos. AV0Z50040507, AV0Z50040702 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Intracellular lipid droplets in differentiation and/or apoptotic response of colon epithelial cell lines

Hofmanová J.^{1,2}, Stixová L.^{1,2}, Hýždálová M.¹, Netíková J.¹, Kozubík A.^{1,2}

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Acad. Sci. Czech Republic, v.v.i., Brno; e-mail: hofmanova@ibp.cz

²Department of Animal Physiology and Immunology, Institute of Experimental Biology, Fac. of Sciences, Masaryk University, Brno

Lipid droplets (LDs) are found in the cytosol of most eukaryotic cells, where they participate in a variety of cellular

functions. They contain a core of triacylglycerols (TAG) and cholesterylesters surrounded by a phospholipid monolayer mainly made up of phosphatidylcholine and specific associated proteins (Olofsson et al., 2008). LDs are reported to be very dynamic organelles, whose appearance changes rapidly upon lipogenesis or lipolysis. LD biogenesis is highly regulated process, that culminate in the compartmentalization of a specific set of proteins and lipids, that place LDs as inducible organelles with role in cell signaling, regulation of lipid metabolism, membrane trafficking and control of the synthesis and secretion of inflammatory mediators (Ducharme et al., 2008). Cells accumulate LDs in response i/ to exogenous lipid availability, present in serum lipoproteins or free fatty acids or ii/ to many kinds of cellular stress, including inflammation, induction of apoptosis by various stimuli or contact inhibition. LD content arising from the medium has a storing purpose for energy generation and membrane building. In the case of stress induction, the metabolic origin of LD-associated neutral lipids and physiological function are not known. LD formation and accumulation is studied mostly in adipocytes and cells of immune system. Less is known about the role of LDs in colon cells and particularly about differences between normal and cancer cells (Accioly et al., 2008).

In our experiments we compared formation of cytoplasmic LDs in human colon epithelial cell lines derived from fetal colon (FHC), adenomas (AA/C1, RG/C2), adenocarcinomas (HT-29, HCT-116), and lymph node metastasis (SW620) to the treatment with short-chain fatty acid - sodium butyrate (NaBt) and ω -3 (DHA, 22:6) or ω -6 (AA, 20:4) polyunsaturated fatty acids (PUFAs) alone or in combination. Accumulation of TAG in LDs was quantitatively measured using flow cytometry (FACSCalibur, BD) and two fluorescent dyes Nile red and BODIPY 493/503. In addition, we searched for the attendance of LD formation with proliferation, differentiation and apoptotic response, which was different in individual cell lines and was accompanied with changes of other parameters such as membrane lipid packing (flow cytometry, merocyanine 540), reactive oxygen species (ROS) production (flow cytometry, DHR-123), number of cells with decreased mitochondrial transmembrane potential (MMP flow cytometry, TMRE), caspase activities (fluorimetry), and expression of regulatory proteins of Bcl-2 family (Western blotting).

NaBt induced G0/G1 or G2/M arrest of the cell cycle, differentiation (FHC, AA/C1, HT-29) and/or apoptosis (RG/C2, HCT-116, SW620) depending on the cell line. Combination of NaBt with AA or especially with DHA suppressed differentiation in FHC, AA/C1 and HT-29 cells and then evoked strong apoptotic response in FHC cells. In these fetal cells, it was associated with more pronounced lipid unpacking, LD accumulation, oxidative response and decrease of MMP than in cancer cells. The role of ROS and caspases was verified by using antioxidant Trolox and pancaspase inhibitor Z-VAD, respectively.

Taken together, our results confirm the interaction of butyrate and PUFAs in colonic cells (Hofmanová et al., 2005) and suggest that changes of lipid accumulation manifested by increased LD formation may be involved in signalling regulating colon epithelial cell kinetic.

This work was supported by grants Nos. 524/07/1178 and 305/09/1526 GACR, and 1QS500040507 IGA ASCR.

References

1. **Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, et al.** Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 1732–1740.
2. **Ducharme NA, Bickel E.** Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Encocrinology* 2008; 149: 942–949.
3. **Hofmanová J, Vaculová A, Lojek A, Kozubík A.** Interaction of polyunsaturated fatty acids and sodium butyrate during apoptosis

in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Eur J Nutr* 2005; 44: 40–51.

4. **Olofsson SO, Boström P, Andersson L, Rutberg M, et al.** Triglyceride containing lipid droplets and lipid droplet-associated proteins. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 441–447.

Dibenzocyclooctadiene lignans restore the cytotoxic action of doxorubicin in multi-drug resistant lung cancer cells COR-L23/R

Slaninová I.¹, Březinová L.², Koubíková L.¹, Hammerová J.¹, Slanina J.²

¹Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic; e-mail: ipokorna@med.muni.cz

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Cancer multidrug resistance is one of the major causes of failure of chemotherapy. Over-expression of the ATP binding cassette members, particularly P-glycoprotein (Pgp, ABCB1) and family of multidrug resistance-associated proteins (MRP1 – MRP9) exporting drugs out of the cells, are responsible for most cases of clinical cancer multidrug resistance (Filipits, 2004; Yu et al., 2007). One of the current challenges of anticancer therapy research is uncovering compounds, which can act as MDR modulators and co-administer them with anticancer drugs to make treatment more effective and to minimize drug side-effects. Recently, dibenzocyclooctadiene lignans have been discussed as compounds that have the potential to overcome multidrug resistance (Sun et al., 2007, Pan et al., 2005). These lignans originated from fruit of *Schisandra chinensis* (Schisandraceae) that is a well-known medicinal plant in traditional Chinese medicine. The fruits and seeds have been used for centuries as a tonic and antitussive. Many studies have indicated that the active ingredients are lignans possessing an unusual structure derived from dibenzo[a,c]cyclooctadiene, which have been shown to possess a broad range of biological effects, including hepatoprotective and antiviral properties. Recently, dibenzocyclooctadiene lignans have been discussed as compounds that are able to overcome multidrug resistance.

In this study, nine dibenzo[a,c]cyclooctadiene lignans, schizandrin, gomisin A, gomisin N, gomisin J, angeloylgomisin H, tigloylgomisin P, deoxyschizandrin, γ -schizandrin and wuweizisu C, isolated from seeds of *Schisandra chinensis*, were examined for their effect on multidrug resistance, as well as their anti-proliferative activities. COR-L23/R, a multidrug-resistant sub-line over-expressing multidrug resistance-associated proteins 1 and 2 (MRP1 and MRP2) and its parent cell line COR-L23 (human lung cell carcinoma) were used in these experiments. Our observations showed that COR-L23/R was nearly hundred times more resistant to doxorubicin than the parental line COR-L23; although both cell lines were similarly sensitive to lignans treatment, indicating that the lignans are not exported from the resistant cells. We found out that two lignans, *R*-(+)-deoxyschizandrin and *R,S*-(±)- γ -schizandrin at relatively non-toxic concentrations restored the cytotoxic action of doxorubicin, a MRP1 substrate, to COR-L23/R cells. Using doxorubicin accumulation assay we demonstrated that *R*-(+)-deoxyschizandrin and *R,S*-(±)- γ -schizandrin significantly enhanced the accumulation of doxorubicin in drug resistant cells. Both lignans alone had no effect on the cell cycle; however, when combined with sub-toxic doses of doxorubicin, they induced cell cycle arrest in the G2/M phase, which is typical for toxic doses of doxorubicin.

Our results suggest that *R*-(+)-deoxyschizandrin and *R,S*-(±)- γ -schizandrin potentiate the cytotoxic effect of doxorubicin in doxorubicin resistant lung cancer cells COR-L23/R by increasing the accumulation of doxorubicin inside the cells. In the structural point of view, we can conclude that the common

structural feature of both active lignans is the *R*-biaryl configuration and the absence of a hydroxy group at C-8. Unlike the reversal effect, the cytotoxicity of lignans with the *R*-biaryl configuration was similar to that observed for lignans with the *S*-biaryl configuration.

This work was supported by the Czech Science Foundation (project No. 522/07/0995) and the Ministry of Education of the Czech Republic (VZ MSM0021622415 and LC06077).

References

1. **Filipits M.** Mechanisms of cancer: multidrug resistance. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2004; 1: 229–234.
2. **Pan QR, Tao W, Lu QH, Hu X.** Schisandrin B – A novel inhibitor of P-glycoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 335: 406–411.
3. **Sun M, Xu XL, Lu QH, Pan QR, Hu X.** Schisandrin B: A dual inhibitor of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1. *Cancer Letters* 2007; 246: 300–307.
4. **Yu XQ, Xue CC, Wang G, Zhou SF.** Multidrug resistance associated proteins as determining factors of pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Current Drug Metabolism* 2007; 8: 787–802.

Prediction of localization and interactions of apoptotic proteins

Vařecha M., Ulman V., Matula P., Kozubek M.
Masaryk University, Faculty of Informatics, Centre for Biomedical Image Analysis, Brno, Czech Republic; e-mail: mvara@fi.muni.cz

During apoptosis several mitochondrial proteins are released. Some of them participate in caspase-independent nuclear DNA degradation, especially apoptosis-inducing factor (AIF) and endonuclease G (endoG). Another interesting protein, which was expected to act similarly as AIF due to the high sequence homology with AIF is AIF-homologous mitochondrion-associated inducer of death (AMID). We studied the structure, cellular localization, and interactions of several proteins *in silico* and also in cells using fluorescent microscopy. We found the AMID protein to be cytoplasmic, most probably incorporated into the cytoplasmic side of the lipid membranes. Bioinformatic predictions were conducted to analyze the interactions of the studied proteins with each other and with other possible partners. We conducted molecular modeling of proteins with unknown 3D structures. These models were then refined by MolProbity server and employed in molecular docking simulations of interactions. Our results show data acquired using a combination of modern *in silico* methods and image analysis to understand the localization, interactions and functions of proteins AMID, AIF, endonuclease G, and other apoptosis-related proteins.

This work was supported by The Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic (project numbers MSM0021622419, 2B06052, and LC535).

Three-color flow cytometric analysis of viability and apoptosis in non-fixed preparations and their morphological aspects

Borský M., Ionescu M., Klabusay M.
Laboratory of Flow Cytometry and Cellular Therapy, University Hospital Brno, Czech Republic, e-mail: mborsky@fnbrno.cz

Cell viability monitoring is crucial for work and research in the field of tissue culture. For this purpose, easy, fast and reliable assay is required. Flow cytometry can detect apoptosis and necrosis stages by analyzing light-scattering properties of the cells and their surface and

intracellular markers. Many assays using different approaches are available. We established innovated three-color flow cytometric protocols for cells growing in suspension.

Calcein/AnnexinV/PI (CAP) assay assesses intracellular esterase activity of cells by enzymatic conversion of the nonfluorescent cell-permeant calcein AM to intensely fluorescent calcein. Calcein (C) is well retained within a live cell and produces intense uniform green fluorescence (ex/em ~495 nm/~515 nm). Apoptotic cells are distinguished by Ca²⁺ dependent Annexin V - DY647 (ex/em ~633 nm/~672 nm) binding phosphatidylserine (PS) exposed on the outer leaflet of the plasma membrane. Membrane permeability is tested by propidium iodide (PI) (ex/em ~493 nm/~632 nm) that binds stoichiometrically to double-stranded nucleic acid, allowing fluorescence intensity to be used as an indicator of DNA content. Intact cells are PI⁻ because membrane of living cells excludes cationic dyes, such as PI.

We have used CAP protocol for assessing viability and apoptosis of SU-DHL4 (human B cell lymphoma) and human B-cells by flow cytometry. We observed that this CAP assay describes the apoptosis of cells very precisely. After treatment with an apoptotic activator Camptothecin, six stages of cell fate were distinguished gradually in time. To analyze morphology of these stages we performed cell sorting and staining by Giemsa-Romanowski for light microscopy study.

Intact and viable cells provided C^{bright}A⁻P⁻ signal and formed compact population on scatter plot. C^{bright}A^{dim}P⁻ cells had higher FSC and morphologically we observed nuclear shrinkage with (or without) small nuclear fragments in basophilic cytoplasm. Cells with lower FSC parameter and two or more nuclear fragments in acidophilic cytoplasm were situated in to the gate C^{bright}A⁺P⁻ while gates C⁺A⁺P⁻ and C^{dim}A⁺P⁻ included cells with blebs, progressed karyorrhexis and strong acidophilic cytoplasm. Finally, C⁺A⁺P⁺ cells were found in gate FSC^{dim}SSC^{bright} and their edges were rimless with different numbers of nuclear fragments in strong acidophilic cytoplasm. The last stage of cell's fate appears after disintegration of cells onto apoptotic bodies in gate FSC⁻SSC⁻. Calcein positive (A⁻P⁻) cytoplasm fragments of SU-DHL4 cells were noticed in the same gate as well. Theoretically we can suggest others categories like C^{bright/+}A^{dim/+}P⁺ (injured cells) and C⁻A⁻P⁺ (free nuclei).

Compared to other methods, CAP assay uses positive markers for three stages of the cell fate and provides more information. However, it cannot detect very early apoptosis. Although we described in detail viable and apoptotic stages of SU-DHL4 and B-lymphocytes by CAP assay and morphological analysis, it is necessary to optimize this protocol for other kinds of cells and cytometers.

This work was supported by grant IGA NR9670-4.

References

1. **Krysko DV, Berghe TV.** Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008; 44: 205–221.
2. **Huerta SMD, Goulet EJ.** Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research* 2007; 139: 143–156.

Combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer

Rožkov, D.¹, Tišerová H.¹, Fučíková J.¹, Lašt'ovička J.¹, Podrazil M.¹, Ulčová H.¹, Budinský V.¹, Prausová J.², Linke Z.², Minárik I.^{1,3}, Šedivá A.¹, Špišek R.¹, Bartůňková J.¹

¹Institute of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; e-mail: daniela.rozkova@lfmotol.cuni.cz

²Department of Oncology and Radiotherapy, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

³Department of Urology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Immunotherapy has emerged as another treatment modality in cancer. The goal of immunotherapy in advanced cancer patients does not have to be the complete eradication of tumor cells but rather the restoration of a dynamic balance between tumor cells and the immune response. Appropriate combination of tumor mass reduction (by surgery and/or chemotherapy) and neutralization of tumor-induced immunosuppression might set the right conditions for the induction of anti-tumor immune response by active immunotherapy.

More than four hundred prostate cancer patients have been treated with DC-based immunotherapy and tumor-specific immune responses have been reported in two-thirds of them. In half of these patients, DC immunotherapy resulted in transient clinical responses.

We review experimental basis and key concepts of combined chemo-immunotherapy and document its principles in the case report of patient with hormone refractory metastatic prostate cancer with sinister prognosis.

Tregs, among other factors, potently inhibit tumor-specific T cells. Prostate cancer patients have elevated numbers of circulating and tumor infiltrating Tregs and there is evidence that Tregs increase tumor growth *in vivo*. We measured the Tregs levels and because of the high frequency of circulating Tregs in our patients, we first administered metronomic cyclophosphamide. After obtaining IRB approval, we started regular vaccinations with antigen pulsed autologous dendritic cells (DCs). DCs were generated from patient monocytes cultivated in the presence of cytokines. Immature DCs were then cocultivated with apoptotic prostate cancer cells (UV-treated allogenic cancer cell line LNCap) and their phenotype as well as the pulsation efficiency was analyzed by multicolor flow cytometry.

Overall six doses of dendritic cells-based vaccine have been administered every 3–4 weeks, subsequently every 6 weeks. In accordance with the principles of combined immunotherapy, we continued palliative chemotherapy with docetaxel to reduce the tumor cell burden. DC-based vaccination induced prostate cancer cell-specific immune response. Combined chemo-immunotherapy consisting of alternate courses of chemotherapy and vaccination with mature DCs pulsed with LNCap prostate cancer cell line led to the marked improvement in the clinical and laboratory presentation and to the decrease of PSA levels by more than 90%.

Polyfunctional CMV-specific T-cell response but not IFN- γ alone is a hallmark of protection from CMV reactivation in children post-transplant

Krol L.^{1,2}, Kotus D.², Hubacek P.¹, Sedlacek P.¹, Kalina T.^{1,2}

¹Department of Pediatric Hematology and Oncology, Charles University 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; e-mail: ladislav.krol@fmotol.cz

²CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague) – Cytometry, Prague, Czech Republic

Cytomegalovirus (CMV) infection causes significant morbidity and mortality in children after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). In order to find hallmark of protection we studied the functional composition and magnitude of CMV-specific T cell response in CMV-seropositive (CMVpos) and CMV-seronegative (CMVneg) children and compared it to healthy adults and fully reconstituted patients post-HSCT. The response profile was compared to patients with CMV reactivation.

Polychromatic flow cytometry was used for detection of CMV-specific immune. The ability of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells to produce cytokines: interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-2 (IL-2) and to express activation marker CD40L and/or to mobilize the degranulation marker CD107a in response to CMV antigens was evaluated by intracellular cytokine staining method after *in vitro* stimulation. Peripheral blood samples were collected from 10 CMVpos children, 10 CMVneg children, 10 CMVpos adults and 10 pediatric patients who underwent HSCT 2 or more years before. We also evaluated 14 samples from 3 patients with detectable CMV viremia who were treated for CMV reactivation by ganciclovir.

The type of polyfunctional CMV-specific response was evaluated in healthy CMVpos and CMVneg children. The comparison showed significant ($p < 0.01$) CMV-specific response was marked by CD4⁺ production of IFN- γ +IL-2+154+ (mean 0.077%) and IFN- γ +154+ (mean 0.09%) and by CD8⁺ production of IFN- γ +IL-2+ (mean 0.028%), IFN- γ +107a+ (mean 0.073%) and IFN- γ + (mean 0.45%). CMV-specific responses of adults were of the same type, but the magnitude of the response tended to be higher. Finally, we compared CMV-specific responses in CMVpos children and pediatric patients post-HSCT. In HSCT patients all CMV responses were several times elevated with maximal 13-fold elevation in CD8+IFN- γ + subset. However, the monofunctional CD8+IFN- γ + subset is not a specific hallmark of CMV-protection, since all 3 patients post-HSCT with ongoing CMV reactivation had increased numbers of these cells over healthy children (mean 0.98%; SD \pm 1.801 versus 0.45%; SD \pm 0.378).

CMV-specific immune response is determined by a concerted action of polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T-cells that has similar composition in children and adults, but is markedly increased in children post-HSCT. Monofunctional CD8+IFN- γ + response doesn't correlate with protection of patient from CMV reactivations.

Supported by grant GAUK-47807/2007, MZO000064203 and IGA-NS/9996-4.

Human and pig peripheral blood lymphocytes as biodosimetric indicators: a flow cytometric study

Sinkorova Z.¹, Sinkora J.², Vokurkova D.³, Zarybnicka L.⁴

¹Department of Radiobiology, University of Defence, Hradec Králové, Czech Republic; e-mail: sinkorova.zuzana@seznam.cz

²BD Czech Republic, s.r.o., Prague, Czech Republic

³Institute of Clinical Immunology and Allergology, Charles University in Prague

⁴Faculty of Medicine in Hradec Králové, Czech Republic

The aim of this study was to identify peripheral blood lymphocyte subpopulations and subsets with unique radioresistance or radiosensitivity and to study their potential as biodosimetric indicators that would allow for retrospective determination of the received dose of ionizing radiation. To introduce swine as a large animal model in radiobiology for comparison of *in vitro* data with the situation *in vivo*.

Heparin-treated porcine or human peripheral blood was irradiated with selected doses of Co⁶⁰ γ rays and incubated for predefined time interval in a humidified atmosphere at 37 °C. After that multicolor surface immunophenotyping and flow cytometry were used for the determination of lymphocyte subset proportions. Briefly, blood aliquots were stained with cocktails of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies directed against lymphocyte markers, red blood cells were removed by ammonium-chloride based lysing solution, leukocytes were washed and data were acquired and analyzed on a CyAn (Beckman Coulter) or FACSCalibur (Becton Dickinson) flow cytometer. In some cases, Ficoll Histopaque isolated peripheral blood mononuclear cells were used. Progression of radiation induced apoptosis was also investigated by fluorinated Annexin V binding to superficially exposed phosphatidyl serine and propidium iodide exclusion assay. For *in vivo* or *ex vivo* studies, 4 week-old piglets were irradiated by a selected dose (0–10 Gy) and peripheral blood lymphocyte compartment composition was studied either directly after blood collection (*in vivo* approach) or after incubation of the collected blood *ex vivo*. Results: We have demonstrated that lymphocyte shrinking accompanied by a forward scatter parameter value decrease occurs at early stages of apoptosis. A homogenous population of lymphocytes with unaffected scatter characteristics thus consists of a great majority of "intact" cells (lymphoid cells that do not bind Annexin V) and a small fraction of Annexin V-low lymphocytes in the very first stage of apoptosis in terms of phosphatidyl serine translocation. Careful gating in the scattergram thus allows for studying cells surviving irradiation *in vivo* or subsequent cultivation *in vitro* and no other apoptosis detection is required in large scale experiments. Based on phosphatidyl serine and propidium iodide binding we have designed four stages of apoptosis progression: early, intermediate, late and very late represented by Annexin V^{lo} PI⁻, Annexin V^{hi} PI⁻, Annexin V^{hi} PI^o and Annexin V^{hi} PI^{hi} cells, respectively. Relative radiosensitivity of individual lymphocyte subsets was then determined by comparing their proportions among the intact population in irradiated and control, sham-treated samples using the IVNIR (irradiated versus non-irradiated ratio) parameter, which has been calculated as the percentage of the selected subset in the irradiated sample divided by its respective value in the non-irradiated control.

We have proven that markers commonly used in biodosimetric research like CD4 and CD8 are not suitable as biodosimetric indicators due probably to the heterogeneity of the CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte population: each of them consists of cells at different stages of differentiation that possess unequal radiosensitivity. In our hands, well defined, therefore much more homogeneous lymphocyte subsets have proven much more suitable for radiobiological purposes. We have identified human CD8⁺ NK cells, CD21⁻ B-cells and CD27⁺ B-cells as useful bioindicators of the

received dose *in vitro*. In contrast, essentially all NK cells in pigs have the CD8⁺ phenotype and this marker cannot be used for identification of an unusually radiosensitive population like in humans. Quite the opposite, CD8⁺ NK cells represent a predominating lymphoid population in sublethally irradiated pigs which can at least partially be explained by mobilization on NK cells upon irradiation and/or maturation of radioresistant NK precursors. In this respect, CD8⁺ NK cells in pig peripheral blood also possess biodosimetric capacity but their behavior has an opposite trend that in human blood *in vitro*.

Three lymphocyte subsets with biodosimetric potential have been identified in humans; two of them being B-cells and the third one are NK cells bearing CD8 on the surface. Significant interspecies differences have been found between humans and pigs in terms of lymphocyte subset radiosensitivity. On the other hand, swine as a large animal model is very useful for comparing radiobiological experiments *in vitro* and *in vivo* and provides a powerful tool for *ex vivo* (incubation of blood collected from formerly irradiated individuals) data interpretation.

This work was supported by the Ministry of Defense of the Czech Republic (Grant No. OPUOFVZ 200806) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Grant No. 2B08028).

References

1. Vokurková D, Sinkora J, Vávrová J, Rezacová M, Knížek J, Ostreicher J. CD8+ natural killer cells have a potential of a sensitive and reliable biodosimetric marker *in vitro*. *Physiol Res* 2008; 55: 689–698.
2. Rehakova Z, Sinkora J, Vlkova M, Vokurkova D, Osterreicher J, Vavrova J, Driak D. CD27(+) peripheral blood B-cells are a useful biodosimetric marker *in vitro*. *Physiol Res* 2008; 57: 589–600.

Profiling of polychromatic flow cytometry data on B-cells reveals patients' clusters in CVID

Kalina T.^{1,2}, Stuchlý J.^{1,2}, Janda A.^{1,2}, Růžicková Š.³, Litzman J.⁴, Šedivá A.⁵, Vlková M.⁵

¹Department of Pediatric Hematology and Oncology, ²nd Faculty of Medicine, Charles University Prague and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; e-mail: tomas.kalina@fmotol.cuni.cz

²CLIP - Childhood Leukemia Investigation Prague
³Laboratory of Diagnostics of Autoimmune Diseases, Institute of Biotechnology of Academy of Sciences of the Czech Republic, p.r.i., Prague, Czech Republic

⁴Department of Clinical Immunology and Allergology, St Anne's Faculty Hospital and Medical Faculty, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁵Department of Immunology, ²nd Faculty of Medicine, Charles University Prague and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

The aim of this study was to find an expert-free approach for phenotype analysis of Common Variable Immunodeficiency (CVID) patients that describes all differences in the 6-color space and to form groups of patients with similar phenotypes using computational methods.

CVID is a heterogeneous primary immunodeficiency disorder. The defined molecular defect is recognized in less than 10% of cases and is unknown in the majority of patients. The current CVID classification, EUROClass (1), is based on quantification of selected B-cell subsets.

Using 6-color polychromatic flow cytometry, we analyzed B-cell phenotypes in a cohort of 48 CVID patients and 49 healthy donors. We used a "probability binning" algorithm (2) to create 1024 bins (i.e., six-color gates) that optimally covered the cells' distribution within the entire B-cell compartment. A matrix file recording cellular content in all the bins was made. The hierarchical clustering of the individual

samples was analyzed using a Pearson correlation of the bins' values.

The Cut Tree algorithm found 12 clusters. In 6 clusters, healthy individuals predominated; in one cluster, smB+CD21low (CVID patients by EUROClass) cells prevailed; in one cluster, smB-CD21norm cells prevailed; in one cluster, smB+CD21low cells prevailed; the remaining cluster was mixed.

The overall reproducibility of this approach was evaluated by testing replicates of two samples from the same donor 98 and 336 days apart. When the B-cell profile of replicates was used to match the original cohort using the similarity matrix of the Pearson correlation, 15 replicates matched the same individual, 3 replicates matched a different individual within the same cluster and 3 replicates matched to a different cluster. We were able to define B-cell subsets over- or under-represented in a particular cluster and display them back in the flow-cytometry software, thus resembling manually created gating.

To conclude, we describe a new analytical approach that enables a search in an expert-free environment for patient cohorts that are defined by similar B-cell profiles and thus contribute to the description of differences between CVID patient groups.

This work was supported by grants IGA NR/9198-3 and MZ CR 000064203.

References

1. **Roederer M, Moore W, Treister A, Hardy RR, Herzenberg LA.** Probability binning comparison: A metric for quantitating multivariate distribution differences. *Cytometry* 2001; 45: 47–55.
2. **Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, et al.** The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008; 111: 77–85.

Heparinized BM is aspirated after patient's formal consent and immediately diluted with the same volume of Iscove's medium. The mononuclear fraction is isolated by gradient centrifugation (Histopaque 1077). PCs are labeled by the antibody against CD138 (universal PC marker), conjugated with a fluorochrome.

Samples with very low infiltration (less than 0.2%) and low overall cellularity (less than 10×10^6 cells): Such samples have very low yield of cells. When we sort plasma cells directly onto microscope slides, even limited amount of cells offer preparations on which FISH probes can be applied. Microscope slides are placed on the „ACDU holder“, which is the optional part of our sorter. Usually we sort 1000 cells onto one slide; we use „High“ sort setup and „Single cell precision mode“. The presence of cells can be verified under the microscope; cells are floating in a small drop of sheath fluid.

Samples with low infiltration and high overall cellularity (over 40×10^6 cells): Sorting of such samples is extremely time consuming (2 or more hours of proper sorting) with the negative effects on cell viability. For such samples we use combination of magnetic and fluorescent separation. Fluorescently labeled, and washed sample is incubated with the antibody against the used fluorochrome, the antibody is conjugated with the magnetic particle. The cell suspension is then applied onto the LS column in the VarioMACS device and both negative (CD138-) and positive (CD138+) fractions are collected. Positive fraction can be immediately sort to high purity on FACSria.

Our results showed that BM samples from MGUS patients are specific by the low infiltration of target population and often high overall cellularity. Standard sort cannot always ensure good purity and good yield of target population and it is necessary to use less common practice or combined procedures for PC separation. Supplying of highly purified cells is the first condition for MGUS research on cellular and molecular level and offers new possibilities to our research teams.

This work was supported by the Ministry of Education grants LC06027 and MSM0021622434.

References

1. **Rajkumar SV.** MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Update on Pathogenesis, Natural History, and Management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005; 340–345.
2. **Rawstron AC, et al.** Report of the EMN on multiparametric FC in MM and related disorders. *Haematologica* 2008; 93: 431–438.

POSTERS

Specific practice in plasma cell separation from the bone marrow of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) patients

Burešová I.¹, Muthu Raja K. R.¹, Kovářová L.^{1,2}, Perutka T.¹, Suská R.¹, Hájek R.^{1,2,3}

¹University research centre - Czech myeloma group (URC-CMG), Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Czech Republic; e-mail: buresova.i@seznam.cz

²Department of clinical hematology, LEHABI, Faculty Hospital Bohunice, Brno, Czech Republic

³Clinic of Internal Medicine – Hematology and Oncology, Faculty Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) is asymptomatic plasma cell (PC) disorder which may progress into the symptomatic multiple myeloma (MM). One of the diagnostic criteria of MGUS is the presence of PC in BM below 10% (Rajkumar, 2005). The PC infiltration is higher than in healthy individuals (less than 2%) and lower than in MM patients. But these numbers are relevant for morphological evaluation of BM smears, in flow cytometry analysis the frequencies are lower (Rawstron et al., 2008). MGUS research cannot get along without plasma cell separation. In our laboratory, we have a FACSria high-speed sorter from BD Biosciences, which can sort low frequency populations (0.2–5%) with high purity (over 90%). Nevertheless some types of samples demand to use specific practice.

The use of seven-color flow cytometry for detection of mononuclear phagocyte subpopulations during salmonella infection in pigs

Zelníčková-Ondráčková P.^{1,2}, Matiašovic J.¹, Volf J.¹, Rychlík I.¹, Faldyna M.^{1,2}

¹Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic; e-mail: zelnickova@vri.cz

²University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

The first aim of this work was to introduce the seven-color flow cytometry for evaluation of mononuclear phagocyte (MP) subpopulations in pigs. Moreover, using this method, the changes in these subpopulations after *in vivo* salmonella infection were assessed in the bone marrow (BM) and peripheral blood (PB).

The antibodies against cell surface markers CD14, CD163, CD172 α , CD203 α , SWC8 and MHCII together with viability staining with 7-aminoactinomycin D were used for the identification of MP subpopulations. The samples were analyzed by seven-color flow cytometer FACS Aria.

Since three of above mentioned primary antibodies shared the same subisotype and they were unfortunately not available as direct conjugates with appropriate fluorochromes the new technique for antibody labeling (the Zenon technology) had to be introduced and successfully used in pig.

Initially, all MP were identified as CD172 α ⁺ SWC8⁻ CD203 α ⁻ viable mononuclear leukocytes. After that the MP subpopulations were discriminated by CD14, CD163 and MHCII markers. Four distinct MP subpopulations indicating three completely distinct maturation pathways were found in the BM. The (CD172 α ^{lo}) CD14⁻ CD163⁻ MHCII⁻ BM MP continuously developed into (CD172 α ^{lo}) CD14⁻ CD163⁻ MHCII⁺ or (CD172 α ^{hi}) CD14⁺ CD163⁻ MHCII⁻ or (CD172 α ^{hi}) CD14⁺ CD163⁺ MHCII⁻ cells. Since three corresponding MP subpopulations were then identified in the peripheral blood: (CD172 α ^{lo}) CD14⁻ CD163⁻ MHCII⁺ dendritic cells and (CD172 α ^{hi}) CD14⁺ CD163⁻ MHCII⁺ or (CD172 α ^{hi}) CD14⁺ CD163⁻ MHCII⁺ monocytes, we can suggest that all these three PB MP subpopulations develop by unique pathways in the BM.

In Salmonella infected piglets, the only population of (CD172 α ^{hi}) CD14⁺ CD163⁻ MHCII⁻ cells was changed, indicating the role of this population in pathogenesis of salmonella infection in pigs.

This work was supported by grant GA524/08/1606.

Flow cytometric analysis of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) internalization

Skender B.^{1,2}, Vondálová Blanářová O.^{1,2}, Jelínková I.^{1,2}, Hofmanová J.^{1,2}, Souček K.^{1,2}, Kozubík A.^{1,2}

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., Brno, Czech Republic; e-mail: belma@ibp.cz

²Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) is a transmembrane protein belonging to the Tumor Necrosis Factor (TNF) superfamily. Its expression is characteristic especially for various cells of immune system. TRAIL transduces an apoptotic signal by binding to its receptors DR4 (TRAIL-R1) and DR5 (TRAIL-R2), which both contain a death domain as a part of their cytoplasmic tail enabling them to bind death-inducing signaling complex (DISC), which leads to the activation of procaspase-8. Two complementary pathways were shown to lead from caspase-8 activation to execution of apoptosis (Lacour S. et al, 2003). One of them is independent on mitochondria (extrinsic pathway) and the second includes amplification of the apoptotic signal on the mitochondrial level (intrinsic pathway).

TRAIL induces apoptosis in cancer cells while sparing most of normal cells. Thus, in contrast to other members of the TNF superfamily, TRAIL administration *in vivo* is relatively safe. The absence of toxic side effects in addition to its anti-tumor properties makes this protein promising agent in anti-cancer therapy (Ishibashi M. et Ohtsuki T., 2008).

Recent experiments showed that TRAIL-induced apoptotic pathway can be also activated by internalization of this ligand with adaptor molecule DISC (Kohlhaas S. L. et al, 2007). These findings brought a new insight in TRAIL signaling. In this work, we evaluated method for measurement of internalized TRAIL using flow cytometry in two different cancer cell lines - PC3 (prostate cancer cell line) and HCT-116 (colon cancer cell line). We used Alexa Fluor 647 Microscale Protein Labeling Kit for TRAIL labeling. Sucrose was used as a negative control upon its ability to completely block receptor internalization while inducing minimum levels of apoptosis. Using fluorescently-labeled TRAIL we were able

to quantify internalization of the ligand which can help us to better understand this new signaling pathway.

This work was supported by grants No. 1QS500040507 IGA ASCR and 301/07/1557, 524/07/1178 GACR.

References

1. Ishibashi M, Ohtsuki T. Studies on Search for Bioactive Natural Products Targeting TRAIL Signaling Leading to Tumor Cell Apoptosis. *Medicinal Research Reviews* 2008; 28: 688–714.
2. Kohlhaas SL, Craxton A, Sun X-M, Pinkoski MJ, Cohen GM. Receptor-mediated Endocytosis Is Not Required for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Apoptosis. *J Biol Chem* 2007; 282: 12831–12841.
3. Lacour S, Micheau O, Hammann A, Drouineaud V, Tschopp J, Solary E, Dimanche-Boitrel M-T. Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 1807–1816.

Time-lapse living cells microscopy of cell line K562 for study of CML-associated proteins dynamics – immobilization of suspension cultured cells

Potěšilová M., Vařecha M., Stejskal S., Koutná I., Kozubek M.

Centre for Biomedical Image Analysis, Faculty of Informatics, Masaryk University, Brno, Czech Republic; e-mail: m.potesilova@gmail.com

Chronic myelogenous leukemia (CML) is characterized by genetic abnormality, the Philadelphia chromosome carrying BCR/ABL gene. This gene generates an aberrant kinase p210 (or less frequent type p190 or p230) whose unregulated activity mainly participates in the hematopoietic stem cells malignant transformation (Barnes and Melo, 2002). To fully understand the leukemogenesis it is important to describe not only p210 kinase function, but also the roles of native ABL1 and BCR kinases in the cell. We focus on localization and dynamics of these proteins in living leukemic cells that can bring new insights into the protein function.

Time-lapse microscopy of living cells is a method allowing us to study proteins in their natural environmental conditions in real time. Thanks to fluorescent proteins it is possible to examine protein localization and moreover protein dynamics or protein-protein interactions in living cells (Rustom et al., 2000). Adherent cells are mainly used for this type of methods, since these cells are not mobile or subject to gravity. However, we work with suspension cells such as K562 or CD34⁺ hematopoietic stem cells in our CML study.

Living-cell microscopy of non-adherent cells is complicated and seldom done, because it is necessary to immobilize suspension cultured cells to coverglass to protect them from the microscope stage movements, objective focus, and media flow caused by additional pipetting. It is also crucial to maintain the viability of the cells during such experiment and not to alter it by immobilization techniques. There are different ways to immobilize cells in 2D or 3D mode. For 2D mode it is possible to use surfaces coated with poly-L-lysine, chemically etched glass, fibronectin, collagen, and so forth. Unfortunately these surfaces also change shape and viability of suspension cells. Thus they are not very suitable for living-cells experiments. Therefore, we tested the immobilized culture of K562 cells on poly-L-lysine coated LabTec chamber. We compared results with novel method using oleyl poly (ethylene glycol) ether (SUNBRIGHT OE-020CS) modified LabTec chamber, suitable for studying suspension cells with maximal viability, unaffected cell growth, and maintained cell shape (Kato et al., 2003).

This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic grants NPVII (2B06052) and LC535.

References

1. **Barnes DJ, Melo JV.** Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol* 2002; 108: 180–202.
2. **Kato K, Umezawa K, Funeriu DP, Miyake M, Miyake J, Nagamune T.** Immobilized culture of nonadherent cells on an oleyl poly(ethylene glycol) ether-modified surface. *Biotechniques* 2003; 35: 1014–1018, 1020–1021.
3. **Rustom A, Gerlich D, Rudolf R, Heinemann C, Eils R, Gerdes HH.** Analysis of fast dynamic processes in living cells: high-resolution and high-speed dual-color imaging combined with automated image analysis. *Biotechniques* 2000; 28: 722–728, 730.

Detection of cellular prion protein on surface of lymphocytes and circulating dendritic cells is affected by blood storage

Glierová H, Holada K.

Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; e-mail: hana.glierova@lf1.cuni.cz

Prion diseases, also called Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE), are fatal neurodegenerative disorders affecting humans and animals. The basic event in pathogenesis of prion infection is conversion of normal cellular prion protein (PrP^c) into its pathological form, infectious prion protein (PrP^{sc}). PrP^c is expressed on various cell types including blood cells however little is known about the nature and behavior of prions in blood. The most common human TSE is Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) occurring with frequency 1–2 cases/million inhabitants per year. New variant form of CJD (vCJD) was transmitted to humans by food infected with BSE. Four cases of secondary vCJD transmitted by blood transfusion highlight the need for development of screening test for prions and raise concerns about the safety of blood products.

We assume that prion infection may lead to expression of PrP^{sc} on a distinct sub-population of blood cells to the level detectable by flow cytometry using conformation sensitive antibodies. Due to scarcity of CJD patients the studies of PrP^{sc}/PrP^c expression may involve shipment of blood samples from several collaborating centers. Our study was aimed at definition of the best conditions for shipment of blood and on examining the effect of different conditions on the level of nonspecific binding of PrP^{sc} specific antibody V5B2.

The effect of anticoagulant and storage temperature on the binding of anti-prion antibodies to selected populations of blood leukocytes was studied. Blood of ten healthy donors was collected into standard EDTA and citrate vacutainer tubes. The blood was split into three parts. First was analyzed within 4 hours of blood collection, the other two were stored overnight at different temperatures (RT, 4 °C) before analysis. The analysis of PrP expression was accomplished by quantitative three color flow cytometry utilizing R-phycoerythrin conjugated monoclonal antibodies AG4 (PrP 31–51), AH6 (PrP 159–175) and V5B2 (PrP 214–225). Two antibody panels were used: first for identification of circulating dendritic cells which were defined as lineage markers negative (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56, all FITC) and HLA-DR (PE DY647) positive cells, second antibody panel utilized CD3 (PerCP), CD19 (APC) and CD56 (FITC) to define T-cell, B-cell and NK-cell populations, respectively.

Significant effect of studied factors on the detection of surface PrP^c was found. Generally, the storage of blood led to decrease in PrP^c expression, which was more pronounced

at RT and with AG4 detection. The extent of decrease was cell population specific ranging from almost complete loss to negligible alteration. Differences in nonspecific binding of V5B2 were not detected.

Both, the choice of anticoagulant and storage temperature influence the detection of PrP^c on sub-populations of blood cells. If shipment of blood samples cannot be avoided, than anticoagulation with EDTA and temperature 4 °C are conditions of choice. Changes introduced by storage of blood did not introduce artificial binding of V5B2 suggesting the significance of its eventual binding to cells in CJD blood.

This work was supported partly by grants of Czech Science Foundation 310/05/H533 and 310/08/0878.

Investigation of bacterial populations in freshwater outdoor aerated and non-aerated microcosms

Mikula P.¹, Maršálek B.^{1,2}

¹Department of Experimental Phycology and Ecotoxicology, Institute of Botany ASCR, Brno, Czech Republic; e-mail: premysl.mikula@centrum.cz

²Research Centre for Environmental Chemistry and Ecotoxicology (RECETOX), Masaryk University, Brno, Czech Republic

The aim of our study was to investigate total bacterial counts and characteristics of bacterial populations in freshwater outdoor microcosms with different aeration regimes. Natural sediment from Nove Mlýny reservoir was added into twelve outdoor microcosms (about 80 litres of volume). Microcosms were subsequently filled with natural water containing plankton communities. Six microcosms were continuously aerated by an air pump (group 1), whereas remaining non-aerated microcosms were covered to provide minimal oxygen concentrations (group 2). After aeration procedure water from all microcosms was sampled and total bacterial counts as well as the ratio between HNA (high nucleic acid content) and LNA (low nucleic acid content) bacteria were investigated by means of flow cytometry (Gasol et al., 1999). For the measurements CyFlow ML cytometer (Partec GmbH, Muenster, Germany) equipped with blue laser emitting at 488 nm (20 mW) was used. Samples were stained with SYBR Green I using slightly modified Marie's protocol (Marie et al., 1997). Bacteria were enumerated according their side scatter (SSC) and green fluorescence (FL1, 527/30 nm). Red fluorescence (FL2 630 LP) was also measured for the discrimination of phytoplankton cells. Total bacterial counts in individual microcosms differed greatly not only between both groups tested, but also within each group (4.01×10^5 to 3.15×10^6). On the other hand, interesting data were obtained when we studied HNA/LNA ratio. Whereas majority of HNA bacteria was detected in all microcosms from group 1 (HNA/LNA ratio 2.62), in group 2 microcosms which weren't aerated, this trend was not apparent (HNA/LNA ratio 0.98). Our results confirmed the hypothesis that the aeration of water column can strongly influence bacterial populations.

This work was supported by Institute of Botany ASCR (Project No. AV0Z60050516) and the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (Project No. IM6798593901).

References

1. **Gasol JM, Zweifel UL, Peters F, Fuhrman JA, Hagstrom A.** Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4475–4485.
2. **Marie D, Partensky F, Jacquet S, Vaulot D.** Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 186–193.

Expansion of adoptively transferred activated naive CD8⁺ T cells by IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes as a scale of immunosuppressive activity of anti-cancer drugs

Tomala J.¹, Chmelová H.¹, Strohalm J.², Etrych T.², Říhová B.¹, Kovář M.¹

¹Laboratory of Tumor Immunology, Department of Immunology and Gnotobiology, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic;
e-mail: tomala@biomed.cas.cz

²Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Recently devised method for selective expansion of various populations (Boyman et al, 2006), based on the finding that the biological activity of IL-2 *in vivo* could be greatly enhanced by association with certain anti-IL-2 mAbs, opens broad new possibilities of application in different fields, ranging from vaccination and transplantation to treatment of autoimmune diseases and tumours.

For two out of three anti-IL-2 mAbs available, injecting IL-2-mAb complexes led to marked and selective proliferation of MP CD8⁺ cells and NK cells, i.e. cells expressing low-affinity IL-2Rs.

Thus, we explored the possibility to use IL-2 immunocomplex-driven expansion of CD8⁺ T cells to measure immunosuppressive activity of anti-cancer drugs.

We have used purified CFSE labeled CD8⁺ OT-1 cells for adoptive transfer into B6/SLJ congenic mice with appropriate stimulation with peptide (SIINFEKL) and treatment with S4B6/IL-2 immunocomplexes. Subsequently, free doxorubicin a various polymer-bound doxorubicin conjugates have been applied. We have measured clonal expansion and expression of selected surface markers.

We have shown that the expansion of OT-1 CD8⁺ T cells driven by S4B6/IL2 immunocomplexes could be utilized as an appropriate method in determining immunosuppressive effect of anti-cancer therapeutics. As an example, we demonstrated that free doxorubicin has strikingly strong immunosuppressive impact on expanding CD8⁺ T cell population, in comparison to polymer bound doxorubicin conjugates, which inhibit expansion of CD8⁺ T cells much less.

References

1. Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* 2006; 311: 1924–1927.

NK and NKT cells increase after rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis

Kryštůfková O.¹, Król P.², Hulejová H.¹, Pavelka K.¹, Šenolt L.¹, Vencovský J.¹

¹Laboratory of Flow cytometry and Clinical Department, Institute of Rheumatology and Dept. of Rheumatology 1st Medical Faculty, Charles University, Prague; e-mail: krys@revma.cz

²Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, General Teaching Hospital, Charles University, 1st Medical School, Prague, Czech Republic

Rituximab (RTX) is a chimeric monoclonal antibody registered for treatment of rheumatoid arthritis (RA) which induces rapid depletion of B cells expressing CD20. The killing of B lymphocytes is mediated by NK cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. The initial consumption of NK cells is followed by their enhanced production and extended life-span. Lower numbers of NK cells in peripheral blood of patients with active RA and their expansion in inflamed synovium were reported. NKT cells,

a heterogeneous T cell population characterized by co-expression of NK and T cell markers, are involved in regulation of immune response by rapid secretion of cytokines. Reduced levels of NKT cells have been detected in some Th1 mediated autoimmune diseases, such as RA. Increase of relative and absolute values of circulating NK and NKT cells during RTX treatment was reported in SLE patients. The aim of the study was to evaluate changes in peripheral blood NK and NKT cells during RTX treatment of RA patients and relate these to clinical responses.

Twenty-five RA patients were treated with two infusions of 1 g RTX 2 weeks apart and followed up at two month intervals. Profile of PBMC (obtained by gradient centrifugation) was measured by multicolor flow cytometry at baseline, after 8 weeks and 24 weeks of RTX application. 10⁶ cells were stained by 7-colors panel and acquired on CyAn ADP. After the sequential gate for singlets, lymphocytes and CD45⁺CD14⁻ cells, the percentage from lymphogate was analyzed. B cells were defined as CD19⁺, NK cells as CD3⁻CD16/56⁺, NKT as CD3⁺CD16/56⁺ and CD3^{bright} cells were considered to be $\gamma\delta$ T-cells.

All patients reached B-cell depletion (from baseline 0.14 × 10⁹/l to 0.002 × 10⁹/l at 8 week) after baseline. Eighteen patients showed a good or moderate EULAR response at week 16. Twenty patients were re-treated with the median 8 months from baseline.

At week 8, a significant increase of NK and NKT frequency was observed – for NK from baseline 10.6% to 14.5% (p = 0.001) and for NKT from baseline 5.7% to 7.0% (p = 0.006). Increase in CD3^{bright} – $\gamma\delta$ T cells (from 1.2% to 2%; p = 0.025) was also recorded. Increase in absolute numbers of NK cells from 0.17 to 0.23 × 10⁹/l (p = 0.011) and of CD3^{bright} cells from 0.02 to 0.03 (p = 0.014) was seen at week 8. At week 24, no additional significant changes of all the followed lymphocyte subsets were found. For evaluation of the effect of NK and NKT cell elevation at week 8 (expressed as percentage of baseline values) on the clinical response, they were compared with the difference of DAS28 score from baseline to week 16. Interestingly, change in DAS28 score correlated negatively with the change of NK cell percentage (rs = -0.42; p = 0.038) and positively with the change of absolute NKT cell numbers (rs = 0.44; p = 0.006). The latter was probably result of the changes of absolute lymphocyte numbers, which correlated strongly with clinical response (rs = 0.63; p = 0.0002).

Conclusion: NK and NKT cells increase after B cell depleting therapy in RA. The negative correlation of the change of NK cells with the change in DAS28 score suggests an ongoing consumption of NK cells in week 8 followed with better clinical response in week 16. Since the increase in NKT cells correlates well with improvement in disease activity, a regulatory role of NKT cell could be important in mediating the effect of anti-CD20 treatment or reflect the decrease of disease activity in the sites of inflammation. The significance of an increase in $\gamma\delta$ T cell numbers needs further clarification.

Institutional support VZ MZ 0002372801 Ministry of Health, CR.

Different properties of cord blood cells of newborns of healthy and allergic mothers

Hrdý J.¹, Novotná O.¹, Kocourková I.², Šterzl I.¹, Prokešová L.¹

¹Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic;
e-mail: jirka81@seznam.cz

²Institute for the Care of Mother and Child, Prague, Czech Republic

Allergic diseases belong to common illnesses with still increasing incidence over recent decades which does not seem to stop this trend. Allergic diseases represent serious

medicinal, social and economical problem. The need for the development of prevention strategies is of particular interest. A clear understanding of the immunological processes promoting Th2-polarized atopic sensitization in early life is of essential importance. It is also necessary to keep in mind the strong genetic background of allergic diseases. In our study, we tried to identify some early prognostic markers in cord blood cells pointing to increased risk of future allergy development which could serve to early introduction of preventive measures.

Properties of cord blood cells of children with high risk of allergy (children of allergic mothers) were compared with cord blood cells of children of healthy mothers. We tested *in vitro* proliferation of cord blood mononuclear leukocytes (CBML) by ³H thymidine incorporation. Expression of cytokines (IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, IFN-gamma, TNF-alpha, TGF-beta and EGF) in nonstimulated and polyclonally stimulated CBML was measured by real-time PCR. Concentration of cytokines mentioned above was tested by ELISA in cord blood sera of children of healthy and allergic mothers and in culture supernatants of CBML stimulated by *Bacillus firmus* (a gram-positive bacterium) or PHA. Cord blood myeloid dendritic cells – mDCs (grown *in vitro* from CD14 positive monocytes) were characterized by gene expression of activation markers (CD80, CD83, CD86), IDO (indoleamine 2, 3-dioxygenase), TNF-alpha, IL-6 and cytokines of IL-12 family. Proportion of Tregs in cord blood of children of healthy and allergic mothers was compared by flow cytometry. T-test was used for statistical analyzing normally distributed data otherwise non-parametric Mann-Whitney test was exploited.

CBML of children of allergic mothers have significantly higher both spontaneous and polyclonally stimulated proliferation activity pointing to possible increased promptness of future allergy onset (1). Nonstimulated cord blood cells of allergic group are characterized by increased expression of IL-10, IL-13, EGF and decreased expression of IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-8, IFN-gamma, TNF-alpha and TGF-beta in comparison with CBML of children of healthy mothers. Expression of cytokines after *in vitro* stimulation of CBML is generally increased in allergic group in comparison with healthy one. These two groups differ also in serum cytokine levels although only IL-10 and EGF were significantly different: IL-10 was increased and EGF decreased in cord sera of allergic group. Increased proportion of mDC expressing CD83 after LPS stimulation was found in allergic group. Tendency to increased IL-6 expression after LPS stimulation was found in mDC of children of allergic mothers. We did not observe significant difference in proportion of Tregs between cord bloods of children of healthy and allergic mothers.

Allergic phenotype was apparent already on the level of cord blood cells. Higher lymphocyte proliferation activity and higher stimulation readiness of mDC and lymphocytes of cord blood of children of allergic mothers imply easier allergy induction. Also, significantly decreased levels of EGF in newborns of allergic mothers could negatively influence maturation and permeability of mucosal membranes of these children and support thus allergen penetration.

This work was supported by grants of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic MSM0021620806 and Grant Agency of the Czech Republic 310/08/H077.

References

1. Zizka J, Hrdy J, Lodinova-Zadnikova R, Kocourkova I, Novotna O, Sterzl I, Prokesova L. Effect of breast milk of healthy and allergic mothers on *in vitro* stimulation of cord blood lymphocytes. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: 486–494.

Modulation of cytokinetic parameters and ECM-mediated signaling in colon adenocarcinoma cells, HT-29, in dependence on the type of cell culture surface

Kočí L.¹, Procházková J.^{1,2}, Hofmanová J.¹, Hýžďalová M.¹, Kozubík A.¹

¹*Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i, Brno, Czech Republic; e-mail: koci@ibp.cz*

²*Veterinary Research Institute, v.v.i, Brno, Czech Republic*

Since colorectal cancer represents one of the most common types of tumor disease in the Western world, the development of various therapeutical approaches is therefore the necessity of crucial importance. Colon carcinogenesis is a multistep process, which requires deregulation of essential cellular mechanisms including e.g. cell proliferation, cell cycle control and communication between cells and components of extracellular matrix (ECM). In this study, we have analyzed aforementioned cytokinetic parameters in an *in vitro* model of colorectal adenocarcinoma represented by HT-29 cells, in dependence on the type of cell culture surface.

To assess the importance of cell anchorage type, we have cultivated cells in ECM protein-coated (collagen IV and fibronectin) and non-coated (control) tissue culture plastic. First, the adhesion rate of HT-29 cells has been tested with xCELLigence system (Roche Diagnostics) using different culture surfaces. A special attention has been paid to determination of time interval, which would be sufficient for analysis of cell adhesion and for description of early events (up to 6 h) associated with formation of cell-ECM contacts. During this time interval, we observed apparently enhanced adhesion of HT-29 cells only on the cell culture surface coated with collagen, but not with fibronectin. Second, these experiments help us to establish approximate doubling time of HT-29 cells (around 8 hours). Third, our results further indicate that the type of cell culture surface has no significant effect on cell number or cell cycle distribution, while adhesion rate of HT-29 cells seems to be strongly enhanced, especially in the presence of collagen IV. Finally, expression of some molecules implicated in the cell-ECM signaling has been tested at different levels (mRNA, protein).

Taken together, our data imply that HT-29 cells could be used as an appropriate *in vitro* model for studying the role of cell-ECM contacts in the context of colon carcinogenesis.

This work was supported by grants 305/09/1526 GACR, 524/07/1178 GACR and 1QS500040507 IGA AV ČR.

Telomerase (pTERT) mRNA expression in the pig granulosa cells *in vitro*

Tománek M.¹, Kott T.², Chronovska E.¹, Kottová E.²

¹*Institute of Animal Science, Department of Biology of Reproduction, Prague 10 - Uhřetěves, Czech Republic; e-mail: tomanek.milan@vuzv.cz*

²*Institute of Animal Science, Department of Molecular Genetics, Prague 10 – Uhřetěves, Czech Republic*

Telomerase plays an essential role in cell viability and has been defined as a key factor for the regulation of cell proliferation and senescence. Recent studies showed that under various physiological and pathological conditions the dynamics of telomerase expression and activity in proliferating, regenerating or differentiating tissue is regulated by cellular microenvironment and growth factors (Bayne and Liu, 2005). We described recently telomerase enzymatic activity in pig granulosa cells *in vitro* and we suggested that its activity and correlation with cell proliferation and differentiation may be differentially regulated in small and large developing ovarian follicles (Tománek et al, 2008). The aim of presented work was to develop a new RT-PCR method

of pig telomerase (pTERT) mRNA quantification and its use for the study of pTERT mRNA expression in the pig follicular granulosa cells *in vitro*.

Granulosa cells (GC) were isolated from small (SF-GC) and large (LF-GC) follicles and cultured for 96 h *in vitro* in DMEM/F12 medium supplemented with 2% FBS, ITS, gentamycin, testosterone (10^{-8} M), EGF (10 ng/ml) and pFSH (50 ng/ml). Telomerase activity was assayed with the modified protocol based on the TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kit, (Chemicon). For RT-PCR, the total RNA was isolated from granulosa cells with the use of Total RNA Chemistry method and 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems). Primers and TagMan MGB probes for pTERT were designed with the Primer Express ver. 3 Program. The mRNA was reverse transcribed into cDNA with the High Capacity cDNA Archive Kit and RT-PCR was performed on the ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Freshly isolated SF-GC expressed higher levels of pTERT mRNA than LF-GC (3.363 vs. 1.834 RU) as well as higher levels of telomerase activity (112.11 vs. 71.20 TPG/prot.). During *in vitro* culture, pTERT mRNA levels in SF-GC increased in control and FSH treated cells (5.815 and 6.405 RU) and slightly decreased in EGF treated cells (2.723 RU). On the other hand, LF-GC expressed significantly lower pTERT mRNA levels (1.112, 0.78 and 0.95 for control, EGF and FSH) as well as the levels of telomerase activity (8.32, 9.66 and 11.12 TPG/mg prot. for control, EGF and FSH, respectively). In conclusion, we suggest that telomerase expression and activity in pig follicular granulosa cells is related to their proliferative potential and function in developing ovarian follicles and pTERT mRNA expression and telomerase activity decline in highly differentiated, luteinized granulosa cells.

Supported by GACR 523/05/2062 and MZE 0002701401 grants.

References

1. Bayne S, Liu JP. Hormones and growth factors regulate telomerase activity in ageing and cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 240: 11–22.
2. Tománek M, Chronowska E, Kott T, Czerneková V. Telomerase activity in pig granulosa cells proliferating and differentiating *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 2008; 104: 284–298.

Interaction of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids with DNA

Hammerová J.¹, Táborský P.², Urbanová J.², Gregorová J.³, Táborská E.³, Slaninová I.¹

¹Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic;
e-mail: ipokorna@med.muni.cz

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Alkaloids are low-molecular weight nitrogen containing secondary plant metabolites, usually with heterocyclic structure. QBAs are group of alkaloids occurring in some species of *Fumariaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae* and *Rutaceae* families. Extracts from some plants containing QBAs are used in folk medicine as antimicrobial, antifungal and anti-inflammatory agents (for review see Šimánek, 1985). In addition to wide range of biological activities, QBAs also display interesting colour properties (from yellow to dark red) and fluorescence properties (Kovář et al., 1985; Slaninová et al., 2008). The chromophores responsible for fluorescence are highly condensed aromatic rings with

electron-donor substituents containing oxygen. The other important property of these alkaloids is the ability to interact with DNA.

The interaction of SA with DNA has been described by several authors during the last decade. Although the concept of intercalation is generally accepted, also other types of interactions have been considered, eg. out side binding of SA to the phosphate backbone of the double helical DNA or its binding to G-C rich regions of DNA (for review see Slaninová et al., 2008).

Recently we have described that macarpine (MA), chelirubine (CHR), sanguirubine (SR) and sanguinarine (SA) stain nucleic acids in living cells (Slaninová et al., 2007). We concluded that they can be used as supravital fluorescent DNA probes both in fluorescence microscopy and flow cytometry including multiparameter analysis of peripheral blood and bone marrow. The best DNA staining properties showed MA. MA binds DNA stoichiometrically and can report the DNA content. QBA are excitable using common argon lasers (488 nm) emitting at a range of 575–755 nm (i.e. fluorescence detectors FL2-5).

In order to characterize QBA–DNA interactions, we have carried out *in vitro* studies of binding of QBA to double stranded DNA (Urbanová et al., 2009) using fluorescence and UV-Vis spectroscopy. We have studied the spectral properties of SA, chelerythrine (CHE), CHR, SR, chelilutine (CHL), sanguilutine (SL) and MA in presence and in absence of *calf thymus* DNA. Generally, QBAs have at least four absorption maxims in UV-Vis spectrum between 250 and 550 nm. First maximum is below 300 nm, second dominant peak is usually between 310 and 350 nm, the third absorption band is about 400 nm and merges to a wide band absorption between 450 and 520 nm (the last two bands are responsible for the colors of the alkaloids). Two different emission bands were found in the fluorescence spectra of the studied QBAs after excitation by light with a wavelength of about 330 nm (second excitation band). First, the high energetic band is situated between 400 and 500 nm, second, the low energetic band, is present between 500 and 700 nm. Intensities of these bands changes at the presence of DNA and these changes are characteristic for each alkaloid. Results from these experiments confirmed a great affinity of the studied alkaloids to DNA – association constants ($\log K_{11}$) are about 5. Although calculated association constants for all alkaloid-DNA systems were comparable, we observed dramatic differences in fluorescence emission of all studied alkaloids in presence of *calf thymus* DNA in comparison to fluorescence of free alkaloids. The most remarkable were changes in emission spectra of MA, CHR and SR (Urbanová et al., 2009).

The results from all our studies, fluorescence spectroscopy, fluorescence microscopy and flow cytometry, confirmed great affinity of QBAs to double stranded DNA that is accompanied by changes in fluorescence properties. These characteristics of QBA provide possibilities to their use in analytical and bioanalytical chemistry and in fluorescence microscopy and flow cytometry.

This work was supported by the Czech Science Foundation (project No. 525/08/0819) and the Ministry of Education of the Czech Republic (VZ MSM0021622415 and LC06077).

References

1. Kovář J, Šimek K, Kožoušková E, Klukanová H. Fluorescence properties of some isoquinoline alkaloids. *Collect Czech Chem Commun* 1985; 50: 1312–1328.
2. Šimánek V. Benzophenanthridine alkaloids. In: Brossi, A. (ed.) *The Alkaloids* 26. Orlando: Academic Press 1985; 185–240.
3. Slaninová, I, Slanina, J, Táborská, E. Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitalních DNA sond. *Chem. Listy* 2008; 102: 427–433.

4. **Slaninová I, Slanina J, Táborská E.** Quaternary Benzo(c)-phenanthridine alkaloids – novel cell permeant and red fluorescing DNA probes. *Cytometry Part A* 2007; 71A: 700–708.
5. **Urbanová J, Lubal P, Slaninová I, Táborská E, Táborský P.** Fluorescence properties of selected benzo[c]phenanthridine alkaloids and studies of their interaction with CT DNA. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009; 997–1002.

Evaluation of Ca²⁺ signaling in hepatocytes by flow cytometry

Uhrová D, Kostecká P, Krejčová V, Zídek Z, Kmoníčková E.

*Institute of Experimental Medicine,
Academy of Science of Czech Republic; e-mail: jollydan@post.cz*

Flow cytometry has previously been used to measure calcium flux in other cell types, including eosinophils, lymphocytes etc. Here we describe that calcium flux can be detected in rat hepatocytes. For modulation of calcium signaling, SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase) inhibitor, thapsigargin, was used in various concentrations (0.1; 0.4; 1.0 μM) and cells were incubated in medium with 1 mM Ca²⁺ or in Ca-free medium. Hepatocytes were incubated in the presence of calcium indicator dye Fluo-4/AM, added from 1 mM stock solution in anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO). Suspension of cells (10⁶/ml) were loaded with 1 μM Fluo-4/AM (Molecular Probes, Invitrogen) for 45 min in the dark at 37 °C. After incubation hepatocytes were washed twice at room temperature in assay buffer with 1 mM Ca²⁺ or in Ca-free buffer to remove extracellular dye. Analyses were performed with the FACSAria flow cytometer (Becton Dickinson). Green fluorescence was measured over a period of 70 s.

Our pilot measurements yield promising data for measurement of Ca²⁺ signal in hepatocytes by flow cytometry with Fluo-4/AM dye. 1. Low signal of fluorescence was recorded in the Ca-free samples. On the other hand, higher fluorescence intensity was found in hepatocytes incubated with 1 mM Ca²⁺ which reflects influx of extracellular calcium. 2. In last named experimental conditions the dependency of measured signal on concentration of SERCA inhibitor is apparent.

However, there are some complications during on-line monitoring: hepatocytes represent dishomogenous cell population, are fragile for manipulation and can aggregate. The major problem represents their size and quick sedimentation. Nevertheless we can assume that this method is suitable for measuring of Ca²⁺ signaling in hepatocytes and further experiments are in progress.

This work was supported by: GA ČR 304/07/1129; GA ČR 309/08/H079; AVOZ 50390 703.

nonmalignant granulocytes. GPI-anchored CEACAM6 is expressed on the tumors of colon, stomach, pancreas, lungs and breast, and the expression is often associated with a poor clinical outcome (Hammarstrom, 1999). Within the framework of the so-called membrane lipid rafts, CEACAM6 co-localizes with beta1 integrin and activates the anti-apoptotic signaling pathways (PI3K/AKT) in the colon and pancreatic carcinomas (Chan and Stanners, 2007). Antibodies targeting the N-domain of CEACAM6 inhibit the adhesion and metastasis in the *in vitro/in vivo* models of all the above listed tumors (Blumenthal, 2005). Within the hematopoietic system CEACAM6 is expressed on the granulocytes and is involved in the homotypic and heterotypic adhesion and Ca²⁺ mediated signaling. It increases the adhesiveness of the granulocytes to the ECM components through the beta1 and beta2 integrin activation (Nair and Zingde, 2001). In addition, CEACAM6 is the most frequent aberrant myeloid marker in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). In BCP-ALL CEACAM6 positively correlates with the chromosomal translocation BCR-ABL and with the hyperdiploidy. Based on the stable expression of CEACAM6 from the diagnosis to the relapse, a feature exploited for the detection of the minimal residual disease, it is possible to estimate its contribution to the chemoresistance and recurrence of the disease (Kalina, 2005).

In our study, we examined the underlying molecular mechanism of CEACAM6 signaling and its effect to leukemic cells behavior. We used a model of antibody-mediated clustering of CEACAM6 molecules and cocultivation of leukemic blasts on a stromal feeder layer, which *in vitro* approximates bone marrow microenvironment. We demonstrated that CEACAM6 clustering mildly enhanced surface expression of beta1 integrins (CD49e/CD29) and beta2 integrins (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18) and also increased the binding activity of beta1 and beta2 integrins to VCAM-1 and ICAM-1 ligands. Next, we detected enhanced phosphorylation of anti-apoptotic kinases p44/42 MAPK, Akt and of kinase p38 MAPK with a resembling dynamics. Clustering of CEACAM6 triggered apoptosis of ALL blasts. When ALL blasts were cocultured on stroma and treated with imatinib (BCR/ABL inhibitor) CEACAM6 signaling enhanced survival of blast cells.

Thus, for the first time, we show that aberrant expression of myeloid CEACAM6 is functionally engaged in communication between ALL blasts and their microenvironment. CEACAM6 clustering enhanced integrin surface expression and integrin-ligand binding, activated downstream signaling molecules p44/42 MAPK, Akt and p38 MAPK and influenced survival of ALL blasts. This can play at least a supportive role in malignant behavior of leukemic cells.

This work was supported by GA UK 7539/2007, VZ MŠMT 0021620813.

References

1. **Hammarstrom S.** The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 67–81.
2. **Chan CH, Stanners CP.** Recent advances in the tumour biology of the GPI-anchored carcinoembryonic antigen family members CEACAM5 and CEACAM6. *Curr Oncol* 2007; 14: 70–73.
3. **Blumenthal RD, Hansen HJ, et al.** Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). *Cancer Res* 2005; 65: 8809–8817.
4. **Nair KS, Zingde SM.** Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the cd66 antigens. *Cell Immunol* 2001; 208: 96–106.
5. **Kalina T, Vaskova M, et al.** Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens. *BMC Cancer* 2005; 5: 38.

P14

Aberrant CEACAM6 influences integrin-ligand interactions and survival of leukemic cells

Kanderová V, Hrušák O, Kalina T.

CLIP-Cytometry, Charles University, 2nd Medical School, Prague, Czech Republic; e-mail: kanderov@seznam.cz

Signal exchange between cell and its microenvironment is essential for proliferation, differentiation, survival, apoptosis or migration. Adhesion molecules of CEA (carcinoembryonic antigen) family initiate signaling pathways, which influence all above mentioned processes in malignant GI tissues and in

Differentiation and apoptotic response of colon cancer cell lines to short- and long-chain fatty acids

Stixová L,^{1,2} Hofmanová J,^{1,2} Netíková J,¹ Kozubík A.^{1,2}

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Acad. Sci. Czech Republic, v.v.i, Brno; e-mail: lenka@ibp.cz

²Department of Animal Physiology and Immunology, Institute of Experimental Biology, Fac. of Sciences, Masaryk University, Brno

Dietary lipids, especially omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and butyrate, the short-chain fatty acid produced by microbial fermentation of fibre, are important modulators of colon epithelial cell kinetics and play an important role in colon carcinogenesis. These compounds are thus considered as chemoprotective nutrients in colon cancer.

We compared the differentiation and apoptotic response of the colonic cell lines derived from human normal fetal tissue (FHC) and poorly differentiated adenocarcinoma (HCT-116) to sodium butyrate (NaBt), docosahexaenoic acid (DHA, 22 : 6, ω-3), and their combination. The effects of NaBt and DHA were different in these two cell lines. While in FHC cells NaBt induced G₀/G₁ arrest, differentiation and low level of apoptosis, in HCT-116 cells G₂/M arrest, no differentiation and high degree of apoptosis were detected. Moreover, in FHC cells significant potentiation of apoptosis (DAPI staining, fluorescence microscopy) accompanied by increased arrest in the cell cycle, cell detachment, and decrease of differentiation (detected by alkaline phosphatase activity and carcinoembryonic antigen expression) were detected after combined treatment with NaBt and DHA.

Apoptotic cells were also visualized by flow cytometry using the M30 antibody. M30/propidium iodide double staining revealed that FHC cells arrested in G₀/G₁ and HCT-116 cells arrested in G₂/M phases of the cell cycle enter apoptosis mainly from these respective phases of the cell cycle. Modulation of percent of cells with decreased mitochondrial membrane potential (flow cytometry, TMRE) corresponded only partially with apoptotic response. Detection of caspase-3 activity by both fluorimetry and flow cytometry suggests its role in both FHC cell differentiation and apoptosis.

Our results support the idea of the interaction of butyrate and PUFAs in the colon and suggest its diverse impact in normal or neoplastic epithelium with varied participation of extrinsic and intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathways.

This work was supported by grants Nos. 524/07/1178 and 305/09/1526 GA CR, and 1QS500040507 IGA ASCR.

the disease recurs in more severe manner, the tumor is more aggressive and cancer cells acquire androgen independence. Each cell type presented in prostate epithelium is characterized by expression of specific intracellular and extracellular markers. One of the type of cells, present in both normal and cancer prostate epithelium, are neuroendocrine cells or neuroendocrine-like cells, respectively. These cells are able to secrete many biologically active factors and modulate cancer tissue microenvironment. Such modulations can probably contribute to acquisition of androgen-independence of prostate cancer cells.

In our study transdifferentiation of prostate cancer cell line LNCaP was induced by prolonged cultivation in androgen-depleted media. This led to induction of neuroendocrine-like phenotype of these cells. Using flow cytometry we showed that expression of neuroendocrine marker neuron-specific enolase was uniformly increased in whole population of cells, which undergo transdifferentiation. Interestingly, androgen depletion induced increase in expression of cytokeratin and vimentin, markers of epithelial and mesenchymal differentiation, respectively. While the expression of cytokeratin was uniformly increased in whole population, increased expression of vimentin was detected only in subpopulation of transdifferentiated cells. To prove functional induction of neuroendocrine transdifferentiation in LNCaP cell line during long term androgen ablation, we detected expression of serotonin and histamine, markers, which are secreted by neuroendocrine and neuroendocrine-like cells.

Further, we wanted to find out if expressions of selected extracellular molecules change as a result of transdifferentiation and if expressions of some of these extracellular molecules correlate with expression of vimentin. Using flow cytometry we detected expression of CD44 and CD133, which are known as markers of prostate stem cells and prostate cancer stem cells. Expression of each selected molecule had distinct pattern.

In conclusion, our results showed, that transdifferentiation of prostate cancer cells affects not only the expression of specific neuroendocrine markers, but also influences expression of other extracellular and intracellular molecules. This indicates that population of neuroendocrine-like LNCaP cells, which arise in consequence of transdifferentiation induced by androgen depletion *in vitro*, is heterogeneous and distinct subpopulations are presented.

This work was supported by MU Rector's Program for Student's Creative Activity Support, and grants Nos. 204/07/0834, 310/07/0961 of the Czech Science Foundation, grant No. NS9600-4 of the Ministry of Health of the Czech Republic, and grants Nos. AV0Z50040507 and AV0Z50040702 of the Grant Agency of Academy of Sciences of the Czech Republic.

Multicolor detection of selected intra- and extra-cellular markers during neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer epithelial cells

Pernicová Z.^{1,2}, Lincová E.^{1,2}, Staršíchová A.^{1,3}, Kozubík A.^{1,2}, Souček K.¹

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic; e-mail: pernicova@ibp.cz

²Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Prostate cancer is one of the world's most extended types of cancer in men. At the beginning, patients with prostate cancer usually benefit from the conventional treatment with hormonal therapy, which embody in androgen ablation. But

MicroRNA in epithelial-mesenchymal transition of benign prostate hyperplasia cells

Lincová, E.^{1,2}, Pernicová, Z.^{1,2}, Staršíchová, A.^{1,2}, Kozubík, A.^{1,2}, Souček, K.¹

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics AS CR, Brno, Czech Republic; e-mail: lincova@ibp.cz

²Department of Experimental Biology, Masaryk University, Faculty of Science, Brno, Czech Republic

Epithelial-mesenchymal transition (EMT), in which epithelial cells lose their polarity and become motile mesenchymal cells, occurs during development and is viewed as an essential early step in tumor metastasis. Transcription factors and EMT regulators of the ZEB family are thought to be involved in tumor progression, thus having potential clinical interest. MicroRNAs (miRNAs) are an abundant class of small non-protein-coding regulators of gene expression that play an important role in tumorigenesis

and, depending on their targets, can function as tumor suppressors or oncogenes. miR-200 family and miR-205, which regulate expression of ZEB transcription factors, have been found downregulated during EMT, suggesting an important role in inhibition of EMT. The aim of this study is to describe the role of miRNA in EMT of benign prostate hyperplasia cells.

EMT of BPH-1 cell line was induced by TGF- α 1 treatment and assessed by cell morphology and expression of epithelial (E-cadherin) and mesenchymal markers (N-cadherin, vimentin) on both protein and mRNA level. Expression of ZEB1, ZEB2, miR-200 family and miR-205 was analyzed by qRT-PCR. The effect of miR-200 on ZEB proteins translation was assessed by luciferase assay.

Decrease in expression of microRNAs of miR-200 family and miR-205 was observed 48 hours after treatment, which correlates with expression of EMT markers. Significant changes in expression of ZEB1, ZEB2 and SNAI2 transcripts observed already after 24 hours of TGF- α 1 treatment suggest a possible role of these transcription factors in early stages of the EMT process of nontumorigenic prostate epithelial cell line.

This work was supported by grants No. 204/07/0834, No. 310/07/0961 of the Czech Science Foundation and by the AS CR, grants no. AV0Z50040507 and AV0Z50040702 and by the Masaryk University Rector's Program for Support of Students' Creative Activity.

References

1. **Gregory PA, Bert AG, et al.** The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 593–601.

Activation of caspases in cells lytically infected with vaccinia virus

Lišková, J, Mělková, Z.

Institute of Immunology and Microbiology, 1st Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic; e-mail: zmelk@f1.cuni.cz

Vaccinia virus is a member of poxvirus family consisting of large DNA viruses that replicate in cytoplasm of infected cells. Various strains of vaccinia virus have been used for vaccination against smallpox as well as for experimental vaccination with recombinant proteins expressed by this highly efficient and immunogenic vector. Despite of a wide use of vaccinia virus, the nature of vaccinia virus-induced cell death remains insufficiently characterized. In most cells types, vaccinia virus is considered to cause a lytic infection, an equivalent of necrosis, while in certain other cell types, it induces apoptosis. Activation of the apoptotic cascade characterized by proteolytic cleavage of pro-caspases into active caspases is a hallmark of apoptosis. However, we have observed caspase activation and/or activity during a lytic infection of epithelial cell lines BSC-40 and HeLa G with vaccinia virus (Kalbacova et al., 2008).

In this report, we explored the above described phenomenon in detail. The caspase activation was first characterized by flow cytometry using a fluorescent pan-caspase inhibitor FITC-VAD-FMK which binds irreversibly to the active site of activated caspases. The specificity of the assay was confirmed using a pretreatment of the cells with the non-fluorescent pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK, resulting in a decrease of fluorescent signal. In contrast, inhibitors of other proteases like calpain or cathepsins D and E remained without any effect in this assay, further demonstrating a specificity of the assay for caspases. Additionally, activation of calpain and cathepsins during infection with vaccinia virus was characterized using specific

inhibitors and western blot analysis of the cleavage products. Consequently, specific inhibitors of individual caspases (inhibitors of caspase-1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 13) were used in the above described flow cytometric assay to compete out the binding of the fluorescent inhibitor and to decrease the fluorescent signal. The fluorescence was highly decreased by pretreatment of the cells with specific inhibitors of caspases-2 and 4 – to a similar level like with Z-VAD-FMK, and somewhat decreased by pretreatment with the inhibitor of caspase-3. Inhibitors of other caspases remained without effect. The activity of caspases-2, 4 and 3 was then confirmed in lysates of infected cells using an *in vitro* cleavage assay involving specific fluorogenic substrates. Again, the specificity of each cleavage was confirmed using specific non-fluorescent inhibitors. Finally, the cleavage of caspase substrates, PARP and cytokeratin-18, was characterized in vaccinia virus-infected cells using a western blot analysis. While we found cleavage of cytokeratin-18, we did not observe any significant cleavage of PARP, a critical substrate of the executioner caspases. Thus, the lack of cleavage of PARP correlates with the final lytic outcome of vaccinia virus infection in these cells.

In conclusion, we describe activation and activity of caspases-2 and 4 in epithelial cells lytically infected with vaccinia virus. The role of these caspases during vaccinia virus infection will be discussed.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic – projects Nos. 310/05/0477 and 310/05/H533, and by the Ministry of Education of the Czech Republic – project No MSM0021620806.

References

1. **Kalbacova M, Spisakova M, Liskova J, Melkova Z.** Lytic infection with vaccinia virus activates caspases in a Bcl-2-inhibitable manner. *Virus Research* 2008; 135: 53–63.

Assessment of PI3K and MAPKs roles in expression of ABC transporters performed by dye exclusion assays

Procházková, J.¹, Sotolářová, K.¹, Procházková, J.², Kozubík, A.^{1,2}, Pacherník, J.¹

¹*Department of Animal Physiology and Immunology, Institute of Experimental Biology, Masaryk University, Brno; e-mail: jjpro@sci.muni.cz*

²*Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, ASCR, v.v.i, Brno*

Cancer therapy failure is often caused by selection of clones resistant not only to the chemotherapeutics used, but usually also to other type of drugs. One of participating mechanism of such multidrug resistance (MDR) is overexpression of ATP-dependent transmembrane carriers, so called ABC (ATP-binding cassette) transporters (Gottesman et al. 1995).

There are three main types of MDR associated ABC transporters in mammals – MDR1/ABC B1/Pgp, MRP1/ABC C1, and BCRP/ABC G2 (reviewed in Li et al., 2007). Natural role of these transporters is to protect organism against cytotoxic agents. Their expression is thus increased in cells important for integrity of organism as are stem cells and other less differentiated progenitor cells. Cancer cells often display such undifferentiated or dedifferentiated phenotype, too. Higher ability to exclude dyes is one of major hallmarks of progenitor cells. These rare less stained cells thus create so called “side” population next to the major, intensively stained population of cells.

Recently it was found out that expression of ABC transporters could be in some cases regulated by mitogen activated protein kinases (MAPKs), namely the p38 and ERK

subtype (Katayama et al., 2007). In regulation of expression of the ABC transporters is involved also phosphatidylinositol trisphosphate kinase (PI3K)/ protein kinase B (Akt) pathway (Liang et al., 2009). Those kinases were also shown to modulate the activity of transcription factors involved in regulation of ABC transporters as are p53, AP1, or C/EBPbeta (Scotto 2003). We first aimed to evaluate how is the expression of ABC transporters affected by pharmacological inhibitors of studied kinases (p38, ERK1/2, JNK1/2, Akt) and in the next step we tested the involvement of particular transcription factors.

All the experiments were performed on A549 cell line derived from non small cell lung carcinoma that is rich for all three tested ABC transporters. Dye exclusion assays were tested on leukemic cells transfected by individual types of ABC transporters (HL-60-MDR1, HL-60-MRP1, PLB-BCRP). Calcein AM (0.2 μ M) is fluorescent in green spectrum after intracellular cleavage by unspecific esterases and it is a substrate of mainly MRP1 protein. JC-1 (0.25 μ g/ml) is a cationic carbocyanin probe that enters mitochondria, emits green light, and is a substrate of MDR1. BCRP protein can exclude a conjugate of FL-1 dye BODIPY and alpha-adrenergic blocker prazosin (0.5 μ M) that has the affinity to this ABC transporter. Chlorophyll catabolite pheophorbide A (1 μ M) is another substrate of BCRP and it emits in far red channel. For inhibition of dye exclusion and thus testing the specificity of staining we used pharmacologic inhibitors – Cyclosporin D (20 μ M, CSD), reported inhibitor of ABC B1/Pgp; Fumitremorgin C (20 μ M, FTC), inhibitor of ABCG2/BCRP; MK571 (20 μ M, MK886) inhibitor of MRP1, and Verapamil (20 μ M, V), general inhibitor of majority of membrane transporters. Staining was performed in 37 °C for 10 minutes (Krejčová et al., 2009). Immunocytochemistry of surface expression or total expression of ABC transporters was performed by FACS or Western blotting, respectively. Used antibodies were produced by Santa Cruz Biotechnol.

Assessment of function of ABC transporters by dye exclusion assays is complicated by the sensitivity of the technique to density of the cell suspension. This obstacle we aimed to overcome by comparison of the sample cells with inner control – cells transfected by particular ABC protein. Transfected cells are significantly less stained than A549 cells as they express extremely high amount of given transporter. Co-incubation of sample A549 cells with ABC transfectant, which we can set to constant median of fluorescence, thus allows a precise comparison.

Dye exclusion assays showed that spontaneous expression of studied ABC transporters is modified by inhibitors of kinases. P38 kinase inhibitor SB203580 (10 μ M), JNK inhibitor SP600125 (2 μ M) and PI3K inhibitor LY294002 (10 μ M) down-regulate expression of all studied ABC transporters (although to a different extent) and thus it is plausible that these kinases stimulate their expression. On the other hand, inhibition of ERK by U0126 (1 μ M) hampered cell proliferation and up-regulated ABC transporters expression. The exact mechanism of the U0126 effect is not known yet, but it could be connected to the general defense mechanism of the cell against toxic compounds, which could be mediated by increased expression of ABC transporters (Abolhoda et al., 1999).

Project is supported by GAČR 301/08/0717, AV0Z50040507 and AV0Z50040702 of Academy of Sciences of Czech Republic.

References

1. **Abolhoda A, Wilson AE, Ross H, et al.** Rapid Activation of MDR1 Gene Expression in Human Metastatic Sarcoma after *in Vivo* Exposure to Doxorubicin. *Clin Can Res* 1999; 5: 3352–3356.
2. **Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA, Pastan I.** Genetic analysis of the multidrug transporters. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 607–649.

3. **Katayama K, Yoshioka S, Tsukahara S, Mitsuhashi J, Sugimoto Y.** Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2092–2101.
4. **Krejčová D, Procházková J, Kubala L, Pacherník J.** Modulation of cell proliferation and differentiation of human lung carcinoma cells by the interferon-alpha. *Gen Physiol Biophys* 2009 (in press).
5. **Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y.** Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Research* 2007; 17: 3–14.
6. **Liang J, Ge F, Guo Ch.** Inhibition of PI3K/Akt partially leads to the inhibition of PrPC-induced drug resistance in gastric cancer cells. *FEBS Journal* 2009; 276: 685–694.
7. **Scotto KW.** Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 2003; 22: 7496–7511.

Flow cytometric methods for description of apoptosis in a context of the cell cycle and the type of the cell death

Vondálová Blanářová O.¹, Jelínková I.^{1,2}, Souček K.¹, Hofmanová J.¹, Kozubík A.^{1,2}

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, AS CR, v.v.i., Brno, Czech Republic; e-mail: blanarova@ibp.cz

²Faculty of Science, Masaryk University Brno, Czech Republic

Apoptosis as a programmed form of cell death is an important mechanism for maintaining of homeostasis in the tissues of the multicellular organism. Induction of apoptosis in malignant cells belongs to crucial issues in cancer therapy. There is a need for accurate and non-time-consuming methods for detection of apoptosis in context of other aspects of the cell fate in a development of new anticancer drugs *in vitro* and *in vivo*. Flow cytometry fulfil the requirements, because it makes possible to combine detection of various markers in an individual cell.

Induction of apoptosis by many antitumor drugs is strongly dependent on position of the cell in the cell cycle. Description of relation of induction of apoptosis on cell cycle phase may shed light on mechanisms of activation of apoptotic pathways as well as rise of resistance to the anticancer therapy and resistance prevention. TUNEL assay followed by staining of DNA by propidium iodide is a widely used method for deciphering cell cycle phase specific apoptosis. However, detection of DNA breaks is somehow hindered in many cell types and there is a great advantage to use methods for detection apoptosis on different basis than DNA fragmentation. We tested methods based on detection of active form of caspase-3 and presence of cleaved fragments of cytokeratin 18. Cytokeratin 18 is a part of cytoskeleton in epithelial cells and is cleaved in early stages of apoptosis by active effector caspases-3, -6 and -7. They proved to be better suited for detection of apoptosis with analysis of the cell cycle than TUNEL assay in our experimental model of epithelial colon adenocarcinoma cell line HCT-116. Cell cycle specific apoptosis was analysed after incubation with various anticancer cytotoxic drugs.

Another question frequently asked and answered by flow cytometry is time course of apoptotic machinery and decision of the individual cell between apoptosis as a programmed cell death and necrosis, eventually secondary necrosis. We studied method employing cellular probe, which localise only to the death cells, even after permeabilisation of the plasmatic membrane Live/Dead Fixable Dead Cell Stain (Invitrogen). Detection of fluorescence of this probe is very useful for resolution between apoptosis and necrosis with combination of detection of various apoptotic markers, even in fixed samples. We tested this probe in combination with M30 and active caspase-3 antibody and both methods gave straightforward and consistent results.

This work was supported by grants No. 1QS500040507 IGA AS CR and 301/07/1557 GA CR.

Platinum(IV) complex LA-12 modulates expression of trail receptors in human colorectal carcinoma cell line

Jelínková I.^{1,2}, Vondálová Blanářová O.^{1,2}, Hofmanová J.^{1,2}, Sova P.³, Kozubík, A.^{1,2}

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, AS CR, v.v.i., Brno, Czech Republic; e-mail: ivina@ibp.cz

²Faculty of Science, Masaryk University Brno, Czech Republic

³R&D, Pliva-Lachema, a.s., Brno, Czech Republic

Platinum compounds are anticancer drugs frequently used in the therapy of solid tumours. Recently, platinum(IV) complexes have been introduced as an important approach to the treatment of cancer. Novel promising anticancer adamantylamine Pt(IV) complex LA-12 was found to be highly effective in various cancer cells representing different types of tissues.

TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) selectively induces apoptosis in a number of tumour cell lines, but not in most normal human cells. Therefore it is an intensively studied promising candidate for cancer therapy. However, some cancer cells are resistant to TRAIL effects. The elucidation of the TRAIL signalling pathways is hence essential for proper understanding of the mechanisms involved in cell resistance at different levels. It is possible to overcome resistance and increase apoptosis, e.g. by combination of TRAIL with platinum compounds. Cisplatin treatment mediated sensitivity to TRAIL-induced cell death in human granulosa tumour cells (Woods, 2008). It has been shown that treatment with cisplatin upregulates TRAIL receptors DR4 and DR5 and sensitizes cells to TRAIL-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma (Kondo, 2006).

The aim of this study was to describe the effects of LA-12 on sensitivity to TRAIL-induced cell death by upregulation of TRAIL receptors in human colorectal carcinoma cell line HCT116 p53^{+/+}. Our data showed that pretreatment with LA-12 increase expression of TRAIL receptors on cytoplasmic membrane and subsequent incubation with TRAIL may increase sensitivity to induced apoptosis.

This work was supported by grants No. 1QS500040507 IGA ASCR and 301/07/1557 GACR.

References

1. **Kondo K, et al.** Prospective antitumor effects of the combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and cisplatin against esophageal squamous cell carcinoma. *Surg Today* 2006; 36: 966–974.
2. **Woods DC, Alvarez C, Johnson AL.** Cisplatin-mediated sensitivity to TRAIL-induced cell death in human granulosa tumor cells. *Gynecol Oncol* 2008; 108: 632–640.

1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates NSAIDs-induced expression of growth differentiation factor 15

Slavíčková E.^{1,2}, Lincová E.^{1,3}, Pernicová Z.^{1,3}, Staršíchová A.¹, Kozubík A.^{1,3}, Souček K.¹

¹Department of Cytokinetics, Institute of Biophysics, Brno, Czech Republic; e-mail: slavickova@ibp.cz

²Department of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Department of Animal Physiology and Immunology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Anti-tumorigenic effects of vitamin D3 and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are well established in several types of cancer disease. The potential use of NSAIDs as anticancer drugs through their inhibition of proliferation

and induction of apoptosis has been documented. Interestingly it was shown that interaction between effects of NSAIDs and vitamin D3 might exist, but mechanisms driving these processes are still unknown.

TGF- β proteins are autocrine mediators of several effects of biologically active compounds such as vitamin D3. An important cytokine from TGF- β family is growth differentiation factor 15 (GDF-15/MIC-1). GDF-15 belongs to stress-associated genes and regulates inflammatory and apoptotic pathways in injured tissues. Its high expression in prostate cancer tissue and serum of the patients suggests a possible role in tumor progression. Prostate cancer is a frequently diagnosed malignancy and is the leading cause of cancer-related deaths in Western world. Therefore, public health implication of identifying an effective chemopreventive strategy and treatment against this disease is very considerable.

In our study, we analyzed effects of indomethacin (non-specific inhibitor of cyclooxygenases) in combination with dihydroxyvitamin D3 on cytokinetics and GDF-15 expression in prostate cancer epithelial cells LNCaP. Our data show that mutual treatment of indomethacin and vitamin D3 inhibits cell proliferation. We observed a significant decrease in cell numbers and induction of cell cycle arrest. Simultaneously, GDF-15 expression was increased on both mRNA and protein level. Using western blotting, we detected both the precursor and the active form of GDF-15. Expression of the active form was significantly increased in samples treated with both indomethacin and vitamin D3 compared to treatments with only one of these drugs. Using ELISA we further confirmed the increased level of active form of GDF-15 in conditioned medium of LNCaP cells after the treatment.

In summary our data suggest a possible role of GDF-15 in antiproliferative action of dihydroxyvitamin D3 and NSAIDs. Their ability to induce inhibition of proliferation demonstrates great potential for chemoprevention in several types of cancer.

This work was supported by grant No. 204/07/083 of the Czech Science Foundation, grant No. 9600-4 of the Ministry of Health of the Czech Republic and grants Nos. AV0Z50040507, AV0Z50040702 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Measurement of viability of adult cardiomyocytes under specific culture conditions

Skopalik J.¹, Matejovič P.², Pásek M.², Scheer P.³, Klabusay M.¹, Stejskal S.⁴

¹Laboratory of Flow Cytometry and Cellular Therapy, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic; e-mail: j.skopalik@seznam.cz

²Department of Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

⁴Department of Biomedical Imaging, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Isolated cardiac myocytes from adult rat have been used for electrophysiological and pharmacological experiments for more than twenty years. In order to study mechanism of myocardial regeneration, this type of cells could be used for *in vitro* "stem cell - myocyte cocultivation experiments". The cocultivation experiments have been done only with neonatal myocyte yet (Beeres 2005 and others). If we want to start the cocultivation experiments with adult rat myocyte, at first we must analyze myocyte viability and functionality during short-term cultivation in RPMI medium with addition of fetal bovine serum (standard condition for stem cell cultivation).

Rat adult cardiac myocytes were isolated (method published by Bébarová 2005), the cells were then cultured in

RPMI medium with fetal bovine serum. Viability, relative systolic shortening, amplitude of intracellular calcium concentration oscillating and long-term changes of cell geometry was measured over 3 days of the culture. The calcein + propidium iodide kit (Invitrogen) was used to viability measurement, the systolic shortening and geometry changes were determined by fluorescence microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss) with digital camera (Sony) and VLC graphic software (Fig. 1). The calcium concentration oscillations were visualized using Ca²⁺ sensitive fluorescent dye fluo-4 (Invitrogen).

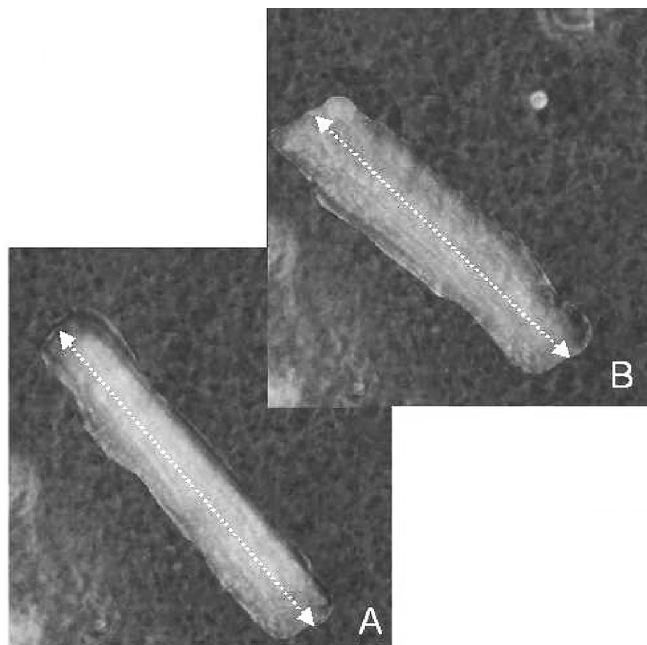


Fig. 1. Calcein-loaded viable cardiomyocyte. Measurement of systolic shortening (A – diastolic length, B – systolic length)

Initial viability of the myocytes ranged from 20 to 50%. The amount of viable cells decreased only very slowly over 3 days of culture. Most of the viable cells preserved rod shape, others became rounded. Relative systolic shortening was about 10% at the beginning of cultivation and about 5% after 48 hours.

We can conclude that significant part of the cultivated myocytes preserved their viability and good functional properties, this type of myocytes is suitable for 24 and 48 hours *in vitro* “stem cell – myocyte cocultivation experiments”.

References

1. **Bébarová M, Matejovič P, Pásek M, Šimurdová M, Šimurda J.** Effect of Ajmaline on Action Potential and Ionic Currents in Rat Ventricular Myocytes. *Gen Physiol Biophys* 2005; 24: 311–325.
2. **Beeres S, Atsma ED, der Laarse A.** Human Adult Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Repair Experimental Conduction Block in Rat Cardiomyocyte Cultures. *Journal of the American College of Cardiology* 2005; 46: 1943–1952.

Flow cytometric detection of a composite low grade B-cell lymphoma with two immunophenotypically distinct cell populations

Stránská E, Veselá E, Kalinová M, Kamarádová K, Mandáková P, Augustiňáková A, Campr V, Kodet R.
Department of Pathology and Molecular Medicine, Charles University in Prague, 2nd Medical Faculty, Prague, Czech Republic;
e-mail: eliska.stranska@fnmotol.cz

Composite lymphomas are defined as two morphologically, immunophenotypically and genetically distinct types of lymphoma, either two non-Hodgkin's lymphomas (NHL), or a rare association of NHL and Hodgkin lymphoma (HL), localized in the same anatomical site (excluding lymphoma progression or transformation). The incidence of these tumors is low.

We present an unusual case of a lymphoma arising in a 57-year-old man with a progressing temporal subcutaneous resistance. After the biopsy was done, the flow cytometric immunophenotyping revealed two distinct CD19⁺ B-cell subpopulations. One of them was composed of small cells (15% from lymphoid gate) with lambda light chain restriction and coexpression of CD5, CD20 and CD23 and corresponded to B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). The other subpopulation was composed of middle-sized cells (40% from lymphoid gate) with bright expression of lambda light chains and immunophenotype: CD20⁺ CD23⁻ CD38⁺ CD10⁻ CD5⁻ and was consistent with marginal zone lymphoma (MZL).

The cytometrical diagnosis was confirmed by histological and immuno-histochemical examination. In addition, the molecular detection of the rearranged immunoglobulin genes (IgH, IgK and IgL) was performed and showed the biclonal origin of those two phenotypically distinct B-cell subpopulations.

Within the staging of the disease, flow cytometry showed the minimal infiltration of bone marrow with B-CLL only, and bone marrow trepanobiopsy revealed a mild nodular infiltration.

In summary, based on the combination of diagnostic and following clinical examinations, the represented case was classified as a composite lymphoma: cutaneous marginal zone lymphoma (MZL), clinical stage I A, and B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), clinical stage IV A.

This work was supported by Research Project FNM MZO 00064203 n. 6704.

References

1. **Fend F, Quintanilla-Martinez L, Kumar S, et al.** Composite Low Grade B-Cell Lymphomas with Two Immunophenotypically Distinct Cell Populations Are True Biclinal Lymphomas. *Am J Pathol* 1999; 154: 1857–1866.
2. **Mokhtar NM.** Composite Lymphoma. *J Eg Nat Can Inst* 2007; 19: 171–175.
3. **Thirumala S, Esposito M, Fuchs A.** An Unusual Variant of Composite Lymphoma - A Short Case Report and Review of the Literature. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1376–1378.

Expression CD27 on plasma cells in monoclonal gammopathies

Kovářová L.^{1,2}, Burešová I.^{1,2}, Suská R.^{1,2},
Zarbochová P.³, Hájek R.^{1,2,4}

¹Department of Haematology, Laboratory of Experimental Haematology and Cell Immunotherapy, University Hospital, Brno, Czech Republic; e-mail: lkovarova@fnbrno.cz

²University Research Centre-Czech Myeloma Group, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁴Department of Haemato-oncology, University Hospital and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Flow cytometry is widely used tool for analysis of plasma cells (PCs) in monoclonal gammopathies (MG), although is not necessary for diagnosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and/or multiple myeloma (MM). However PCs phenotyping is useful for differential diagnosis, prediction of outcome and minimal residual disease (MRD) monitoring in MM as well. MM is characterized by a clonal expansion of neoplastic PCs. These PCs are mostly CD19⁺CD56⁺, but in a small group of patients clonal CD19⁺ PCs occur. Light chain clonality assessment is widely used to discriminate between clonal and polyclonal PCs, although, especially in low infiltration cases, results are not convincing. CD27 is expressed on memory B-cells and also on normal polyclonal CD19⁺ plasma cells, so one can assume that this marker can be used for confirmation of polyclonal CD19⁺ PCs in MM as well.

The aim of this study was to analyze expression of CD27 on CD19⁺ PCs in different groups of MG patients and to prove that CD27 can be routinely used to confirm polyclonality of CD19⁺ PCs.

A total of 60 patients were analyzed and this group consisted of 15 MGUS patient; 10 newly diagnosed MM patient; 9 MM patient with possibility of relapse; 14 MM patient after transplantation; and 10 control patient without MGUS and/or MM. Bone marrow was incubated with appropriate monoclonal antibodies (Immunotech, Beckman Coulter), lysed and analyzed by flow cytometer FC500 (Beckman Coulter). PCs were identified as CD38⁺CD138⁺ cells and expression of CD19, CD56, and CD27 was analyzed on these PCs. Flow cytometry analysis of clonality assessment using kappa and lambda light chains was done in almost all cases.

When analyzed MGUS patients, correlation between medians of CD19⁺ PCs (37.1%) and CD19⁺CD27⁺ PCs (40.9%) was found (0.95). Only 1 case with clonal CD19⁺ PCs was found in new MM; median of CD19⁺ PCs (0.9%) and CD19⁺CD27⁺ PCs (2.0%) was low, although correlation was higher than in MGUS (0.97). There were found 3 cases of clonal CD19⁺ PCs in subgroup of MM patients with possible relapse, median of CD19⁺ PCs (54.0%) was higher than CD19⁺CD27⁺ PCs (42.2%) and correlation was lower than in previous subgroups (0.87). There was found only 1 case of clonal CD19⁺ PCs in MM patients after transplantation, thus correlation between CD19⁺ PCs (78.5%) and CD19⁺CD27⁺ PCs (80.8%) was similar to MGUS and new MM subgroups (0.92). As was expected, high correlation between CD19⁺ PCs (63.8%) and CD19⁺CD27⁺ PCs (64.7%) was found in patients without MGUS/MM (0.94). Finally, the correlation between median of CD19⁺ PCs and CD19⁺CD27⁺ PCs in group of 5 patients with clonal CD19⁺ PCs was significantly lower (0.36) than in group 55 patients with phenotypically polyclonal CD19⁺ PCs (0.96).

We confirmed that CD19⁺CD27⁺ PC are phenotypically normal polyclonal PCs and CD19⁺CD27⁻ PCs are clonal PCs in all cases. In our hands expression of CD27 on CD19⁺ PCs can discriminate between clonal and polyclonal CD19⁺ PCs and thus can be potentially used instead of labor intensive light chains assessment.

This work was supported by LC06027, GACR 301/09/P457 and MSM0021622434.

References

1. **Bataille R, Jago G, Robillard N, et al.** The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006; 91: 1234–1240.
2. **Guikema JE, Hovenga S, Vellenga E, et al.** CD27 is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low CD27 expression in patients with high-risk disease. *British Journal of Haematology* 2003; 121: 36–43.
3. **Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al.** Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008; 93: 431–438.

Elevated regulatory T cells (Tregs) in the blood of psoriatic patients treated with Goeckerman's therapy

Kondelkova K.¹, Vokurkova D.¹, Borska L.², Fiala Z.³,
Hamakova K.⁴, Rehacek V.⁵

¹Institute of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic; e-mail: Katerina.Kondelkova@seznam.cz

²Institute of Pathological Physiology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic

³Institute of Hygiene and Preventive Medicine, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic

⁴Clinic of Dermal and Venereal Diseases, University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

⁵Transfusion Department, University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

Regulatory T cells (Tregs) are a specialized subpopulation of T cells that act to suppress immune responses, thereby maintaining homeostasis and self-tolerance (Liu et al., 2006). It has been shown that Tregs are able to inhibit T cell proliferation and cytokine production and play a critical role in preventing autoimmunity (Grant et al., 2009). Psoriasis, a common disorder affecting 1–2% of individuals in Western societies, bears many features of a T cell-mediated autoimmune disease. Goeckerman's therapy (GT) of psoriasis is based on a daily application of pharmacy coal tar on the affected skin with subsequent exposure to UV light (Borska et al., 2007). The purpose of this study was to compare the quantity of Tregs in the peripheral blood between psoriatic patients and healthy volunteers and then to evaluate the influence of GT on the frequency of Tregs in the peripheral blood of patients with psoriasis.

26 patients with chronic plaque form of psoriasis (11 males, 15 females, average age 45.8 years, range 18–81 years) and 20 healthy volunteers (14 males, 6 females, average age 39.8 years, range 22–62 years) were enrolled in the study. Psoriasis areas and the severity index were measured (PASI score 17.5 ± 8.8). The immunophenotypic analysis was performed on erythrocyte lysed heparinized peripheral blood on a flow cytometer FC500 Cytomics (Beckman Coulter) with a 4-color antibody panel: CD3-FITC/CD127-PE/CD25-PC5/CD4-PC7. Appropriate isotype-matched negative control was used to assess the background fluorescence intensity. The obtained data were analyzed using software CXP Analysis. Tregs were characterized by the expression of CD3⁺CD4⁺ CD25^{high}CD127^{low} phenotype.

Statistical differences between the groups were evaluated by the non-paired and paired t-test (MedCalc software) after data normality evaluation. The results are given as the mean ± standard deviation. P value less than 0.05 is recognized as significant. Tregs were significantly higher (P = 0.0042) in the patients with psoriasis after GT (4.3 ± 1.6) than at the beginning of the therapy (3.2 ± 1.1). There was no significant correlation of Treg admission in the peripheral blood of the healthy controls and psoriatic patients.

This study describes the changes in the frequency of Tregs in peripheral blood of patients with psoriasis treated with GT. This therapy is highly efficient in the treatment of psoriasis and it achieves good clinical response followed by a long-term remission in a majority of patients. The disease activity was significantly diminished by GT (from 17.5 ± 8.8 to 8.0 ± 6.6 after therapy, $P < 0.0001$). Both the coal tar and UV light exhibit immunosuppressive activity. We found that CD4⁺ T lymphocyte subpopulation in peripheral blood, phenotypically CD25^{high}CD127^{low} Treg cells, increases suppressor activity in psoriasis.

This work was supported by Research project, MZO, No. 00179906.

References

1. Borska L, Fiala Z, Krejsek J, Andrys C, Vokurkova D, Hamakova K, Kremláček J, Ettler K. Immunologic changes in TNF-alpha, sE-selectin, sP-selectin, sICAM-1, and IL-8 in pediatric patients treated for psoriasis with the Goeckerman regiment. *Pediatr Dermatol* 2007; 24: 607–612.
2. Grant J, Bourcier K, Wallace S, Pan D, Conway A, Seyfert-Margolis V, Wallace PK. Validated Protocol for FoxP3 Reveals Increased Expression in Type 1 Diabetes Patients. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2009; 76B: 69–78.
3. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St. Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone J. A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *Journal of Experimental Medicine* 2006; 203: 1701–1711.

Vplyv Imunoglukánu® na imunitnú odpoveď po intenzívnom fyzickom strese u vrcholových športovcov

Tibenská E.¹, Bobovčák M.²

¹OLD-Medirex a.s., Bratislava, Slovenská republika; e-mail: elena.tibenska@medirex.sk

²OKL-VÚPCH Nová Polianka, Slovenská republika

Je známe, že mierna či primeraná fyzická aktivita pozitívne ovplyvňuje imunitný systém. Nadmerná a vyčerpávajúca fyzická záťaž naopak navodzuje imunopresiu, prinajmenšom v niektorých zložkách prirodzenej a získanej imunitnej odpovede. Fyzický stres u pravidelne trénujúcich aktívnych športovcov môže navodiť dlhodobú a chronickú depresiu imunitnej odpovede. Boli pozorované zmeny v počte i aktivite NK-buniek po akútnom a aj dlhodobom fyzickom strese. Podobné zmeny boli zaznamenané i v ďalších subpopuláciách imunokompetentných buniek a taktiež i vo funkčnej aktivite fagocytárneho kompartmentu. V niekoľkých štúdiách bol popísaný benefičný efekt beta glukánov na metabolickú aktivitu fagocytov v súvislosti s fyzickým stresom. V našich predchádzajúcich prácach, v experimentoch *in vitro*, sme dokázali významný modulačný efekt $\beta(1,3/1,6)$ -D-glukánu izolovaného z huby *Pleurotus ostreatus* resp. Imunoglukánu® na funkčné prejavy imunokompetentných buniek.

Cieľom pilotnej štúdie bolo preukázať zmeny v zastúpení buniek periférnej krvi, v subpopuláciách imunokompetentných buniek, a zmeny v aktivite NK-buniek po akútnej vyčerpávajúcej fyzickej záťaži a po hodine relaxácie u aktívnych vrcholových športovcov s cieľom dokázať predpokladaný protektívny a imunomodulačný efekt Imunoglukánu.

Pilotnej štúdie sa zúčastnilo 20 vrcholových pravidelne trénujúcich športovcov zimných disciplín. Štúdia mala dve fázy: v prvej fáze bola aplikovaná záťaž vo forme stupňovitého bicyklového testu až do vyčerpania. Boli

vykonané vyšetrenia nasledovných parametrov: krvný obraz, subpopulácie lymfocytov- v relatívnom i absolútnom počte, s dôrazom na NK bunky, subpopulácie NK buniek CD16±/CD8±/CD56± a NK aktivita. Parametre boli vyšetované pred záťažou, 5 minút po záťaži a po hodinovej relaxácii. Športovci boli rozdelení na dve terapeutické skupiny. Jedna skupina užívala 100 mg Imunoglukánu denne, druhá skupina placebo počas doby dvoch mesiacov pri súčasne prebiehajúcej letnej tréningovej príprave. V druhej fáze štúdie bol aplikovaný rovnaký záťažový test a schéma vyšetrení ako v prvej fáze.

Diferenciálny počet leukocytov a subpopulácie lymfocytov boli vyšetrené bezprostredne po odbere na prietokovom cytometri FC500 (Beckmann-Coulter) po ofarbení monoklonovými protilátkami (Immunotech, Coulter) v štvorfarebnom fluorescenčnom prokole s nasledovným zložením: CD4+CD19-FITC/CD8+CD16+CD56-PE /CD3-PC5/ CD45-PC7. Farbenie: koktail saturačných koncentrácií protilátok v PBS s NaN₃ bol zmiešaný s plnou krvou a inkubovaný v tme 15 minút pri RT, erytrocyty boli lyzované 15 minút lýzou roztokom Versalyse (Immunotech) a vzorka bezprostredne analyzovaná na prietokovom cytometri. Absolútne počty jednotlivých populácií buniek boli získané po prepočte na počet leukocytov z vyšetreného krvného obrazu.

Testy na NK aktivitu boli vykonané do 4 hodín po odbere. Izolácia mononukleárnej frakcie leukocytov zo vzorky bola vykonaná mixér flotačnou technikou s použitím Optiprepu (Axis-Shield) podľa odporúčaného protokolu. NK test bol urobený s použitím firemného flow cytometrického testu: NKTEST – ORPEGEN-Pharma, podľa firemného návodu. Výsledok NK aktivity bol stanovený v lytických jednotkách LU, teda počte efektorov potrebných na 20% lýzu 10 000 terčových buniek a vyjadrený ako počet LU v obsiahnutých v 107 buniek (LU20/107 efektorov). Hodnota bola vypočítaná extrapoláciou z krivky zostrojenej zo všetkých štyroch vyšetrených riedení vzorky pacienta.

V oboch fázach štúdie bola preukázaná vysoko signifikantná zmena ($p < 0,00001$) v relatívnom a nárast v absolútnom počte imunokompetentných buniek pod vplyvom záťaže a to najmä u NK-buniek. Signifikantný nárast ($p < 0,0001$) bol pozorovaný aj v hodnotách NK aktivity. Po perióde relaxácie došlo k významnému poklesu relatívneho i absolútného počtu NK-buniek, a tiež NK aktivity pod bazálnu úroveň. Na pozorované zmeny v porovnaní prvej a druhej fázy štúdie nemala terapia glukánom žiadny vplyv okrem protektívneho efektu na NK aktivitu. V prvej fáze štúdie, NK aktivita poklesla po hodinovej relaxácii u oboch terapeutických skupín pod bazálnu úroveň. V druhej fáze po terapii glukánom sme už signifikantný pokles aktivity u tejto skupiny nezaznamenali, zatiaľ čo u skupiny užívajúcej placebo tento efekt pretrvával.

Naše výsledky preukázali, že počas intenzívneho opakovaného cvičenia dochádza k mobilizácii a redistribúcii buniek imunitného systému v súvislosti so stresom, ktoré môžu viesť k nežiadúcemu efektu depresie imunitnej odpovede. Z pozorovaných údajov usudzujeme, že niektoré nežiadúce efekty najmä v oblasti funkcie buniek je možné modulovať. Práve v tejto oblasti sa ako sľubným ukazuje pozitívny protektívny vplyv partikulárneho fungálneho $\beta(1,3/1,6)$ -D-glukánu resp. Imunoglukánu®, na aktivitu NK buniek. Hoci táto malá pilotná štúdia je limitovaná nízkym počtom probandov, jej výsledky naznačujú, že zložitej téme stresovej modulácie imunitnej odpovede je aj v budúcnosti žiaduce venovať pozornosť v rozsiahlejšej a komplexnejšej štúdií zameranej predovšetkým na funkčné prejavy buniek.

Note of the editor: The authors did not submit an English version of the abstract.

EXCELLYSE I - human peripheral blood lysing solution for Becton Dickinson flow cytometersBenko M.¹, Kalina T.², Havranová M.³,
Špryngar M.¹, Škrob F.¹¹EXBIO Praha, a.s., Prague, Czech Republic; e-mail: benko@exbio.cz²CLIP Childhood Leukaemia Investigation Prague,
Faculty Hospital Motol, Czech Republic³IMMUNIA, Prague, Czech Republic

Flow cytometry analysis is among the most precise methods used for peripheral blood cell defining and counting so far. Thus, it is of great importance preparing a sample, where any interfering and ineligible cells are removed. So far, Ficoll-Hypaque density gradient method was used to separate leukocytes from whole blood. This method is rather time consuming and may lead to certain leukocyte subset loss. Direct blood sample staining followed by red blood cell lysis therefore takes place instead of density gradient, as a fast and accurate method for whole blood flow cytometry analysis. Antibody stained peripheral blood cells were surface fixed due to the presence of formaldehyde under gentle conditions in buffered solution. Subsequent addition of deionized water created osmotic shock leading to erythrocyte lysis, while preserving leukocytes. Both lyse/wash and lyse/no wash lysing protocols were tested.

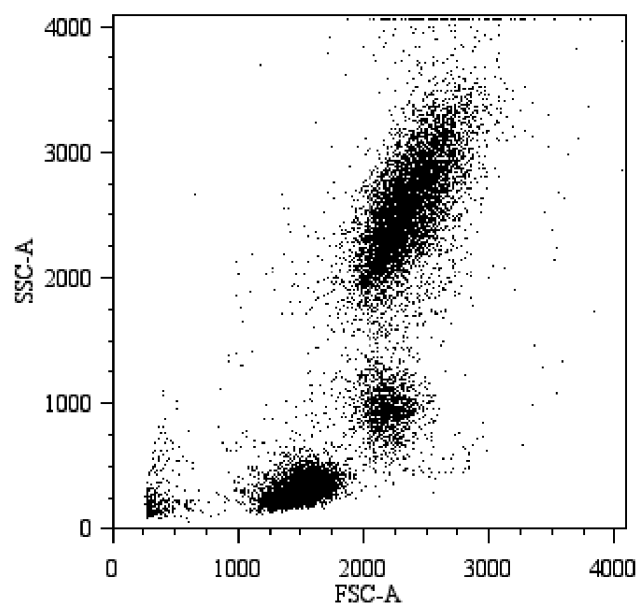


Fig. 1. Example of FSC vs. SSC dot-plot of peripheral blood leukocytes from lysed/washed whole blood using EXCELLYSE I lysing solution, analyzed on BD Biosciences FACSCanto™ cytometer (registered trademark of Becton Dickinson and Company)

Results show that using EXCELLYSE I lysing solution leads to a significant erythrocyte lysis, fixation of leukocytes and antigen preserving. Leukocyte populations are homogenous, well distinguished with very low debris left (as shown in Fig. 1) and without considerable size change. EXCELLYSE I lysing solution shows no significant fluorescence signal quenching of small organic molecules such as FITC, nor large proteins like R-phycoerythrin. Time-dependent, long-term study focused on the stability of the reagent revealed no change in function and quality throughout the whole experiment. No change in reagent's pH value occurred during the study, a feature related to formaldehyde stability, otherwise formic acid would form as a result of formaldehyde oxidation.

These results demonstrate that EXCELLYSE I is a useful tool for flow cytometry sample preparation when used with BD cytometers.

This work was supported by Exbio Praha, a.s., Prague, Czech Republic.

References

1. **Carter PH, Resto-Ruiz S, Washington GC, Ethridge S, Palini A, Vogt R, Waxdal M, Fleisher T, Noguchi PD, Marti GE.** Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants, and five cell preparations. *Cytometry Wiley-Liss, Inc.* 1992; 13: 68–74.
2. **Tamul KR, Schmitz JL, Kane K, Folds JD.** Comparison of the effects of Ficoll-Hypaque separation and whole blood lysis on results of immunophenotypic analysis of blood and bone marrow samples from patients with hematologic malignancies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995; 2: 337–342.

The level of CD20 and CD52 antigen expression in minimal residual disease population in patients with chronic lymphocytic leukemia in complete remission

Pevná M, Brychtová Y, Mayer J, Klabusay M.

Laboratory of Flow Cytometry and Cellular Therapy,
Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic;
e-mail: 22524@mail.muni.cz

Despite significant progress in treatment, chronic lymphocytic leukaemia (CLL) remains incurable disease. Aim of the therapy in most patients is to achieve a complete remission (CR) of disease, which is associated with extension of time to progression and with improved quality of life. Methods of flow cytometry and polymerase chain reaction (PCR) enable to detect minimal residual disease (MRD) in patients with CLL, who achieved CR. CR with negative MRD is associated with favorable extension of the remission period (Bosch, 2008). In some approaches to achieve MRD-negative CR in patients with CLL, monoclonal antibody alemtuzumab (anti-CD52 antibody) is used for consolidation after chemotherapy (O'Brien, 2003) or alemtuzumab therapy is extended until the eradication of MRD is reached (Moreton, 2005). We present a group of patients with CLL, who achieved MRD-positive CR after standard therapy and in whom the level of CD52 antigen expression on residual population of CD5⁺19⁺ cells was determined with the quantitative flow cytometry approach.

Samples of peripheral blood of patients with CLL, who achieved CR after previous treatment according to the NCI-WG criteria („National Cancer Institute - Sponsored Working Group“), were analyzed by flow cytometry. The level of expression of CD20 and CD52 antigens were measured on tumor population of CD5⁺19⁺ cells using the standardized fluorescent microbeads. The level of expression was calculated in molecules of equivalent soluble fluorochrome units (MESF) for each sample.

In the cohort of patients who achieved MRD-positive CR, the median value of MRD was (5%) of leukocytes. The median value of CD20 expression was (25 000) MESF units and the median CD52 expression was (1 025 000) MESF units. In a comparison group of patients, in whom these values were determined before the therapy, the respective values were as follows: (25 000) MESF for CD20 antigen and (245 000) MESF for CD52 antigen. Thus, the results surprisingly show significantly higher levels of expression of CD52 antigen on MRD population in patients with CLL in CR. The cause of this phenomenon is unknown.

Our results may support the concept of MRD therapy with alemtuzumab for the eradication of MRD. High expression of CD52 antigen on the residual population of tumor cells will have advantage in targeted killing of these cells with monoclonal antibody treatment. Further research will be necessary to clarify this issue.

This work was supported by grant IGA MZ CR No. NR9671-4.

References

1. Bosch F, Ferrer A, Villamor N, González M, Briones J, González-Barca E, Abella E, Gardella S, Escoda L, Pérez-Ceballos E, Asensi A, Sayas MJ, Font L, Altés A, Muntanola A, Bertazzoni P, Rozman M, Aymerich M, Giné E, Montserrat E. Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 155–161.
2. Moreton P, Kennedy B, Lucas G, Leach M, Rassam SMB, Haynes A, Tighe J, Oscier D, Fegan Ch, Rawstrone A, Hillmen P. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2971–2979.
3. O'Brien SM, Kantarjian HM, Thomas DA, Cortes J, Giles FJ, Wierda WG, Koller ChA, Ferrajoli A, Browning M, Lerner S, Albitar M, Keating MJ. Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2003; 98: 2657–2663.

Long-time follow-up of CD4⁺ T cells in peripheral blood after autologous hematopoietic stem cells transplantation in multiple sclerosis patients

Marečková, H.¹, Krasulová, E.², Havrdová, E.², Kovářová, I.², Trněný, M.³, Vacková B.³, Pohlreich D.³, Kozák T.⁴, Lhotáková P.⁴, Šterzl I.¹

¹*Inst. of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital Prague, Czech Republic; e-mail: hmare@lf1.cuni.cz*

²*Dept. of Neurology, First Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital Prague, Czech Republic*

³*Dept. of Haematology, First Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital Prague, Czech Republic*

⁴*Dept. of Clinical Haematology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic*

High-dose immunoablation with autologous hematopoietic stem cells transplantation (ASCT) presents a treatment with well-known potential of inducing obvious and long-lasting effect on a wide range of autoimmune disorders including multiple sclerosis (MS). Exact mechanisms of ASCT remain largely unknown. First year after ASCT profound lymphopenia can be observed, reconstitution of the particular lymphocyte subsets is however different. Namely delayed CD4⁺ T-lymphocytes recovery has been consistently reported within several studies. The aim of the study was to report the results from long-time follow-up of CD4⁺ T-lymphocytes subsets after ASCT in MS patients.

Eight patients (F/M = 5/3, age 30 ± 8 years, MS duration 7 ± 2 years, EDSS 6.5) with secondary progressive MS underwent ASCT after detailed discussion and informed consent signing. Stem cells were mobilized by high-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor, *ex vivo* purging of the graft was performed, BEAM regime (BCNU, etoposid, cytarabin, melphalan) was used for immunoablation followed by antithymocyte globulin administration intravenously. Peripheral blood was taken and immunophenotyping was performed before ASCT and consecutively 5–11 years after ASCT using flow cytometer FACSCalibur and monoclonal antibodies BD Bioscience (CD4, CD8). MS treatment after ASCT included interferon beta 1b (n = 1), intravenous immunoglobulins (n = 5), azathioprine (n = 2), mycophenolate mofetil (n = 1), cyclosporine A (n = 1), low-dose corticosteroids up to equivalent of 10 mg of prednisolone daily (n = 8). CD4:CD8 ratio exceeded 1 (1.11–1.87) in all patients before ASCT. The treatment

led to expected decrease of CD4⁺ lymphocytes, within 24 months after ASCT CD4:CD8 ratio varied between 0.46 and 1.3. Even 5–11 years after ASCT CD4:CD8 ratio remained lower compared to values before ASCT in every individual patient. Despite a small group of the patients we consistently observed prolonged (5–11 years) recovery of CD4⁺ T-lymphocytes after ASCT in every individual patient. This cannot be referred only to the immunosuppressive or immunomodulatory treatment after ASCT. Our results document long-lasting ASCT ability to influence the immune system regulation.

The study was supported from the Czech Ministry of Education (research program MSM 0021620807) and from the Czech Ministry of Health (grant IGA MZ CR NR/9375-3/2007).

Detection of activated NK cells in peripheral blood of women with recurrent pregnancy abortions and infertility of unknown aetiology

Vokurková D, Jankovičová K, Burešová E.

Institute of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Medicine and University Hospital in Hradec Kralové, Charles University in Prague, Czech Republic; e-mail: vokurkovad@lfhk.cuni.cz

The regulation of natural killer (NK) cells in the peripheral blood and endometrial layers has been associated with reproductive immunopathology such as recurrent spontaneous abortions (RSA) and infertility of implantation failures (Rai et al., 2005). In addition, immunophenotypic characteristics of NK cells in these women support the changes for their increased activity status. It has been reported that intracellular Th1 cytokine expressions are increased over Th2 cytokine expressions in the peripheral blood of these women (Kwak-Kim and Gilman-Sachs, 2008).

The aim of this study was to investigate the functional status and immunophenotypic characteristics of NK in women who suffer from RSA or infertility of unknown etiology. We tried to set up a fast and simple method of evaluating the activity of NK cells by the detection of the early activation marker CD69 after JAR human trophoblast cell line and sperm cells antigens co-culture, respectively, with the peripheral blood of the women.

Peripheral heparinized blood samples of the infertile women were incubated in 96-well plate tissue culture at 37 °C in 5% CO₂ humidified incubator together with tissue culture cell medium for 40 hours. The trophoblast cell line JAR or sperm cell antigens from relevant sexual partner, respectively, were added to the blood samples in optimal concentration. The negative (tissue culture cell medium alone) and positive (pokeweed mitogen) control were enrolled in each experiment. After the incubation, activated NK cells were identified by the detection of CD3, CD56⁺, and CD69⁺ markers. Appropriate isotype-matched negative control was used to assess background fluorescence intensity. Measurement and analysis of the samples were accomplished using the FC500 Cytomics flow cytometer and obtained data acquisition were analyzed using software CXP Analysis (both Beckman Coulter).

In conclusion, peripheral blood NK cells of some women with RSA and infertility of unknown aetiology have higher proportions of activated NK cells *in vivo*. Unbalanced CD69 expression may explain the underlying pathology (Ntrivalas et al., 2001). We have possibility to compare the reactivity in both co-culture assays with results of the inhibition migration test performed at our department; nevertheless, some women have reactivity in only one of these two tests. However, the first findings indicate that co-culture experiments seems to be another effective assays to investigate cell mediated reactivity in women with reproductive failure.

References

1. Kwak-Kim J, Gilman-Sachs A. Clinical Implication of Natural Killer Cells and Reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: 388–400.
2. Ntrivalas EI, Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Chung-Bang H, Ng SC, Beaman KD, Mantouvalos HP, Beer AE. Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum Reprod* 2001; 16: 855–861.
3. Rai R, Sacks G, Trew G. Natural killer cells and reproductive failure-theory, practice and prejudice. *Human Reprod* 2005; 20: 1123–1126.

Expression of RAN, ZHX-2 and CHC1L gene in multiple myeloma

Legartová S, Harničarová A, Bártová E, Galiová G. *Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i, Brno, Czech Republic; e-mail: sonicka.sonicka1@centrum.cz*

Gene expression studies by the use of Real Time PCR are considered as a powerful tool for analysis of genes involved in pathophysiology of human diseases. Recent studies of RAN (6p21), ZHX-2 (8q24.3), CHC1L (13q14.3) loci show an importance of these gene expression for multiple myeloma (MM) prognosis and progression (Armellini et al., 2008). ZHX-2 gene was observed as a weakly expressed in a high-risk disease, while increased ZHX-2 expression was associated with better responses and longer survival after high-dose chemotherapy. On the other hand, CHC1L gene was less expressed in hyperdiploid cells and RAN locus was highly transcriptionally active in symptomatic MM and myeloma cell lines (Armellini et al., 2007). ZHX-2 and CHC1L loci are mapped close to the c-myc and Rb1 genes, which both play an important role in tumor cell proliferation (Avet-Loiseau et al, 2001; Shaughnessy et al., 2000); therefore, these genomic regions represent important prognostic markers for many tumors.

In our laboratory we tried to established Real Time PCR methodology for RAN, ZHX-2 and CHC1L genes, which could be applied in clinics. We tried to find a relevant internal control for RT-PCR reaction; therefore, the expression of selected genes was studied in peripheral blood cells of healthy individuals and in myeloma cell lines. Our preliminary results showed, that expression of candidate genes should be analyzed in the cells of newly diagnosed patients and expression levels should be compared only in the cell populations with identical infiltration of malignant clone to bone marrow. Additionally, RNA purity and proper RNA parameters obtained by Agilent Bioanalyzer should be set up for routine RT-PCR diagnostics of tumor-related gene expression. Our experiments showed methodological approaches and troubleshooting on how gene expression can be analyzed by clinical laboratories.

This work was supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Grant No. LC06027, ME919 and following projects: AVOZ50040507, AVOZ50040702.

References

1. Armellini A, Sarasquete ME, García-Sanz R, Chillón MC, Balanzategui A, Alcoceba M, Fuertes M, López R, Hernández JM, Fernández-Calvo J, Sierra M, Megido M, Orfño A, Gutiérrez NC, González M, San Miguel JF. Low expression of ZHX2, but not RCBTB2 or RAN, is associated with poor outcome in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2008; 141: 212–215.
2. Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, Minvielle S, Harousseau JL, Bataille R. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* 2001; 98: 3082–3086.

3. Shaughnessy, J, Tian, E, Sawyer, J, Bumm, K, Landes, R, Badros, A, Morris, C, Tricot, G, Epstein, J, Barlogie, B. High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. *Blood* 2000; 96: 1505–1511.

Cell cycle analysis by flow cytometry as power tool for identification of potential drugs with anticancer activity

Lachnitova L, Kollareddy M, Kamenickova A, Potockova J, Dzubak P, Hajduch M.

Laboratory of Experimental Medicine, Department of Pediatrics and Oncology Palacký University, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, Czech Republic; e-mail: lenka.lachnitova@seznam.cz

Flow cytometry became the helpful tool for the investigation of cellular parameters, such as their volume and morphological complexity, DNA or RNA content, cell surface or intracellular antigens, enzymatic activity and many others. We used flow cytometry to identify potential drugs with anticancer activity. We tested mechanism of anticancer actions of different quinolinone and triterpene derivatives on the population of leukemic CEM cells. To estimate the differences in the cell cycle we used four methods – basic analysis of cell cycle and apoptosis by PI staining, monitoring of RNA/DNA synthesis by BrU/BrdU incorporation and analysis of mitotic marker pH3^{Ser10}.

Monitoring of RNA synthesis is based on incorporation of BrU (5'- bromouridine) into RNA. Following the formaldehyde fixation is BrU detected by the anti-BrdU (anti-5'-bromo-2-deoxyuridin) antibody. Thus we can measure the cellular synthesis of RNA. Similarly, BrdU (5'-bromo-2-deoxyuridine) as an analog of thymidine is incorporated into DNA and visualized by the anti-BrdU antibody. After adding fluorescent PI which intercalate into DNA we can enumerate the fractions of cells in G0/G1, S and G2/M phases of the cell cycle and distinguish diploid and tetraploid cells. Histone H3 is phosphorylated only during the mitosis; therefore the method based on phosphorylation of histone H3 on Ser 10 enables us to discriminate mitotic cells. Increased capacity of our tests is also achieved by use of HTS module and batch analysis in connection with FACSCalibur.

We found that some of the tested quinolinones and triterpenes induced significant changes in the cell cycle, RNA and DNA synthesis of CEM cell population. Some derivatives were able to block the cells in the S phase or during the mitosis. One promising compound was inducing the polyploidy of the cell population suggesting some regulatory mechanisms in the Aurora or Polo – kinase pathways. These interesting compounds are further studied and we will try to find detailed information about their mechanisms of anticancer activities.

Study is supported by grants GACR 301/09/P433, LC07017, MSM6198959216 and EHP/Norway CZ0099.

Incorporation of gene for green fluorescent protein into cancer cells as the first step in study of experimental tumor complexity

Valaskova Z.¹, Vrabцова M.¹, Markovicova D.¹, Lackovicova L.², Mravec B.^{1,2}, Bizik J.³, Perzelova A.⁴, Macikova I.⁴, Danihel L.⁵, Kinova S.⁶, Buckingham T.¹, Hulin I.¹

¹Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia; e-mail: zuzana.valaskova@fmed.uniba.sk

²Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

³Cancer Research Institute, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia;

⁴Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia

⁵Institute of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia

⁶1st Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia

Understanding of living as a remarkable phenomenon is a great stimulus for progress in the field of scientific research. Proteins represent the essence of life. They participate in every manifestation in nature and form part of each cell. The study of protein in real state and the endeavor to define structural components of cells were limited on fixative samples as in living tissue antibody binding on protein results in changes of function and behavior of this protein. A great progress in the study of dynamic protein processes was the discovery of gene for green fluorescent protein (GFP) for which in October 2008 the Nobel Prize in chemistry was awarded. Primal position as 'a green crayon' thus is replaced by prominence position in revolution of cell processes imaging techniques.

The process of tumor formation in a living organism is composed of several steps and can be seen as a type of Darwinian evolution on a microscopic level. During the tumor process some aspects cannot be arranged by duration and sequence. That is why the process can be attributed as one with signs of complexity as a characteristic that is happening in time, but it is always a non-linear process.

In our laboratory, for study of complexity of interaction between tumor and organism, induction of tumor process by application of tumor cells BP6 is extensively used (Mravec et al., 2009). However experiments that used application of tumor cell into animals are often limited by detection of tumor process in incipience. Recently in the field of cancer biology a tumor cellular marker – the gene encoding GFP is being used. We tested the ability of BP6 cells transfected with GFP to induce tumor process in Wistar rats (58 total: 25 male and 33 female). Our data suggest interference between BP6 cells and GFP. It was anticipated that incorporation of GFP gene might change physiological properties of cytoskeleton, worsen adhesive characteristics of tumor cells and BP6 cells incorporated with GFP gene have had smaller ability to induce both experimental intraperitoneal and subcutaneous tumors. Study comparing the capability of tumor induction in experimental model of colon adenocarcinoma cells transfected with GFP in immunocompetent and T- and B-cell-deficient SCID mice shows that immune reaction was responsible for early elimination of these tumor cells (Steinbauer et al., 2003). Tumor cells being contacted also by host dendrite cells, macrophages engulfing tumor cells and it's evident that induction of tumor growth with GFP cells is result of multilevel interactions within organism.

It is more of suspicion than an argument on the enormous significance of described information and partly of the study observations. Because of great importance of protein molecules we can't repudiate the significance of GFP at the grade of higher regulatory systems than suspension of cell cultures. In view of prospective progress of scientific research we suppose prevalent use of GFP in marking of tumor in

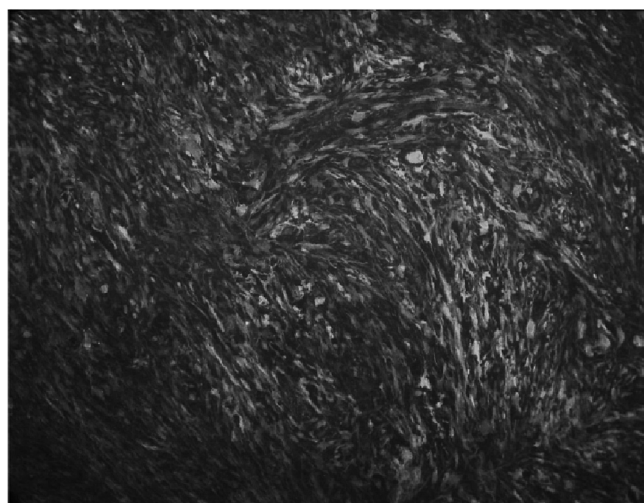


Fig. 1. Fluorescence imaging of intraperitoneal BP6 GFP fibrosarcoma

organism for host immune system. GFP could enable (supposedly) to monitor proliferation of cells not only within experimental work, but also in human medicine. Aftertime GFP could serve as "target" for guide of tumorigenesis inhibiting substances.

This study was supported by the Slovak Research and Development Agency under contract No. APVV-0045-06, VEGA grants (1/3422/06, 1/4251/07, 1/4312/07) and by UK grant 450/2009.

References

- Mravec B, Lackovicova L, Pirnik Z, Bizik J, Bundzikova J, Hulin I, Kiss A. Brain response to induced peripheral cancer development in rats: dual fos-tyrosine hydroxylase and fos-oxytocin immunohistochemistry. *Endocr Regul* 2009; 43: 3–11.
- Steinbauer M, Guba M, Cernaianu G, Köhl G, Cetto M, Kunz-Schughart LA, Geissler EK, Falk W, Jauch KW. GFP-transfected tumor cells are useful in examining early metastasis *in vivo*, but immune reaction precludes long-term tumor development studies in immunocompetent mice. – *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 135–141.

Fine needle aspiration biopsy as a new method for the monitoring tumor environment after the treatment with polymeric drugs

Betka J.^{1,2}, Hovorka O.¹, Větvíčka D.¹, Bouček J.^{1,2}, Ulbrich K.³, Říhová B.¹

¹Institute of Microbiology ASCR v.v.i, Prague, Czech Republic; e-mail: yucatan@volny.cz

²Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Faculty Hospital Motol, Postgraduate Medical School, Prague, Czech Republic

³Institute of Macromolecular Chemistry ASCR v.v.i, Prague, Czech Republic

Conventional chemotherapy exposes both normal and malignant cells to identical doses of cytotoxic agents and relies upon the enhanced sensitivity of rapidly dividing cancer cells to achieve preferential killing. Water soluble polymers based on *N*-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide (HPMA) bearing anticancer drug doxorubicin bound through amide (DOX-HPMA^{AM}) or hydrazone (DOX-HPMA^{HYD}), were developed to eliminate unwanted side effects of conventional chemotherapy. However, the mechanism of activity of the polymeric conjugates and their effect on immune system is far from being understood. Fine needle aspiration biopsy (FNAB) from the malignant suspicious organs in the human body like lymph node or salivary and thyroid gland – is

commonly used clinical method, how to acquire the samples from the body with minimal influence to tissues. We have applied this method to study the effect of polymeric drug delivery systems on the immune system.

C57BL/6 mice bearing EL4 T-lymphoma stably expressing Enhanced Green Fluorescent Protein (EL4-EGFP⁺) were treated with DOX-HPMA^{AM}, DOX-HPMA^{HYD} or free doxorubicin. FNAB method was applied to isolate samples from both treated and untreated EL4-EGFP⁺ tumors in different time intervals. All samples were stained with specific fluorescently labeled antibodies (anti - CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45, CD69 and NK1.1), analyzed by flow cytometry (LSRII, BD) and verified with the samples obtained from the tumor during the autopsy. The same procedure was applied to the samples of different lymph nodes to observe the infiltration of tumor cells.

This method allows us to compare changes in representation and activation of the tumor infiltrating lymphocytes before and during the treatment procedure with parent drug and its polymeric counterpart. It seems, that percentage of CD4 and CD8 lymphocytes has increased rapidly after the treatment by DOX-HPMA^{AM} and DOX-HPMA^{HYD} conjugates between third and fifth day after the drug has been applied, but has remained at same level in case of free doxorubicin. The percentage of EGFP positive tumor cells in particular lymph nodes has decreased with the distance of the nodes from the tumor.

This research was supported partly by MEYS 1M0505 and by Grant Agency of Academy of the Sciences of the Czech Republic grant # IAA400200702.

References

1. Muzzafar T, Wei EX, Lin P, Medeiros LJ, Jorgensen JL. Flow cytometric immunophenotyping of anaplastic large cell lymphoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2009; 133: 49–56.
2. Říhová B, Kovář L, Kovář M, Hovorka O. Cytotoxicity and immunostimulation: double attack on cancer cells with polymeric therapeutics. *Trends in Biotechnology* 2009; 27: 11–17.
3. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *National Review Immunology* 2008; 8: 59–73.

Fluorescence-activated cell sorting for the transplantation of human embryonic stem cell-derived neural precursors after MCAO in rats

Turnovcová K.^{1,2}, Kozubenko N.^{1,2}, Kapcalová M.^{1,2}, Jiráček D.³, Burian M.^{1,3}, Jendelová P.^{1,2}, Syková E.^{1,2}

¹Department of Neuroscience, Laboratory of Stem Cells and Tissue Repair, Institute of Experimental Medicine, ASCR, v.v.i, Prague, Czech Republic; e-mail: karolina.turnovcova@biomed.cas.cz

²Department of Neuroscience and Center for Cell Therapy and Tissue Repair, 2nd Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic

³MR Spectroscopy, MR Unit, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Human embryonic stem cell-derived neural precursors (hESC-NPs) can be used in therapies to restore function following neurological deficit. Neural precursors derived *in vitro*, however, show broad heterogeneity depending on the cell lineage, the differentiation protocol and the developmental stage. Such heterogeneity can often lead to tumor formation after transplantation in experimental models of stroke. Here, we describe the cell surface markers characterizing our CCTL14 hESC line in subsequent subcultures using fluorescence-activated cell sorting (FACS) in combination with an evaluation of graft survival and tumor formation.

Human embryonic stem cells and hESC-derived neural precursors can be characterized by a broad spectrum of surface and intracellular markers. Undifferentiated embryonic stem cells express immature markers such as SSEA4, SSEA3, TRA-1-60, TRA-1-81, nanog, oct3/4 and sox2, which disappear after the induction of differentiation. At the same time, markers of neural stem and progenitor cells start to appear: CD133, SSEA1 (CD15), A2B5, CD29 and CD271 (p75). Further differentiation leads to the expression of CD24 and neural cell adhesion molecule NCAM (CD56) (Pruzsak et al., 2007).

In our experiments, neural differentiation consisted of two main stages. The initial neural differentiation was induced by noggin; the cells were then cultivated and expanded in serum-free induction media for 14 days. These pre-induced cells were then marked as passage 1 of Neural Progenitors (NPs) and were either kept in culture for another 13 passages or used for terminal differentiation. In our transplantation experiments, the cells did not undergo terminal differentiation because mature neurons do not survive the transplantation procedure and therefore are not suitable for cell therapy. NPs were expanded, and in each subsequent passage the expression of a number of surface and intracellular markers (SSEA4, TRA-1-60, nanog, CD133, SSEA1, CD271, CD24, CD29, NCAM, NF70, nestin, beta-III-tubulin) was evaluated, in addition to the expression of some somatic markers such as HLA-ABC. Simultaneously, NPs from passages 1, 5, 8 and 10 were transplanted into a rat model of transient focal ischemia. Middle cerebral artery occlusion was performed, and one week later, 100 x 10⁵/μl cells were injected in 2.5–3 μl into the striatum. Histological analysis was performed at the end of the experiment (1 month after cell grafting).

Our study revealed that at the early stages of differentiation (P1–P2), the cells were positive for NCAM/CD133, beta-III-tubulin, NF70 and nestin with the strong coexpression of SSEA4, TRA-1-60 and nanog, as well as the expression of CD24. During the next several passages (P3–P5), the expression of SSEA4, TRA-1-60 and CD24 was downregulated, while the expression of the neural markers NCAM, β-III-tubulin, NF70 and nestin remained the same. SSEA1 appeared only during passages P2–P6. The expression of CD271 remained high up to P9–P10, and then was downregulated, whereas the expression of HLA-ABC was low up to P8, then gradually increased in later passages (P9–P13). Histological evaluation revealed that the transplantation of nanog- and SSEA4-positive NPs (P1) led to tumor formation in 100% of the recipient rats. A 50% decrease in tumor formation was observed after the transplantation of P5 NPs, compared to P1 NPs. The difference between these populations of cells consists in the complete down-regulation of the expression of the main pluripotent markers (nanog, SSEA-4, TRA-1-60). The transplantation of P8 NPs yielded the best results among all the experimental groups: no tumors were found during 3 months observation after transplantation, and in most grafts (5 of 7 recipients) the cells migrated towards the lesion. Immunohistochemical analysis revealed the co-staining of transplanted cells for HuNu/nestin and HuNu/NCAM, confirming that P8 NPs maintained a neural profile. The differences in the *in vitro* characteristics of the P8 NP population from the P5 NPs consist of a 4-fold decrease in CD24 and SSEA-1 expression and a 2-fold increase in CD133 expression. The transplantation of P10 NPs was completely safe in terms of tumor formation, but the survival of the grafted cells was much lower (only 5 of 8 grafts survived). P10 NPs did not proliferate, and very weak migration was found in all grafts. Their surface marker expression profile did not reveal significant differences from that of P8 NPs, only the expression of CD271 was lower by 50% and the expression of HLA-I reached a high level (88.5%).

Our results show that the population of hESC-derived NPs that is appropriate and safe for *in vivo* use has a CD133^{hi}/CD24^{lo}/CD15^{lo} expression profile. However, since the role of these proteins in neurogenesis, the development of the human nervous system and tumor formation is still unclear, further research into neural marker expression profiles should yield new insights relevant to future strategies for cell-mediated therapies.

Support was provided by grants AV0Z50390703, 1M0538, 309/08/H079, LC554 and the EC FP6 project STEMS (LSHB-CT-2006-037328).

References

1. Pruszk J, Sonntag KC, Aung MH, Sanchez-Pernaute R, Isacson O. Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations. *Stem Cells* 2007; 25: 2257–2268.

CSFE-based proliferative assay in rabbits – preliminary study

Jeklová E.¹, Ondráčková P.¹, Levá L.¹, Šinkora J.², Faldyna M.¹

¹Veterinary research institute, Brno, Czech Republic; e-mail: jeklova@vri.cz

²BD Biosciences, Praha, Czech Republic

The ability of lymphocytes to respond to plant mitogens by their proliferation provides a simple, semiquantitative *in vitro* correlate of cell-mediated immunity. Various lymphocyte subsets respond differently to lectin stimulation. Generally, concanavalin A (conA), which is most often used as a plant mitogen, preferentially stimulates T cells. Nevertheless, there exist species specific differences in lymphocyte subsets stimulated by various lectins. In humans after conA mitogenic stimulation, mainly CD4⁺ and less CD8⁺ lymphocyte subsets proliferate (Azzolina et al., 1990). The predominant subsets of porcine lymphocytes responding to the above mentioned plant lectin stimulation are CD4⁺CD8⁺, CD8⁺ and $\gamma\delta$ TCR⁺ (Dorn et al., 2002). In contrast to that, conA causes proliferation of CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ TCR⁺ and noticeable proliferation of B-cells in cattle (Quade and Roth, 1999). While subset responsiveness to specific mitogens has been described for human, pig and cattle lymphocytes, there is little or no published information describing the subsets of lymphocytes that respond to conA or other mitogens in rabbits, which represent animal species often used as an experimental model in human and veterinary research. It is known from earlier studies in rabbits that conA only stimulates proliferation of T lymphocytes (Fanger et al., 1974). Watkins et al. (1984) noted that rabbit CD4⁺ lymphocyte subpopulations are highly responsive to conA mitogen, but there is no information about other lymphocyte subsets.

The aim of this study was to characterize lymphocyte subpopulations that are stimulated by various plant mitogens in rabbits. Using flow cytometry and multicolor immunophenotyping of carboxyfluorescein (CSFE) stained cells we found that, similar to humans, mainly T-cells are stimulated by conA and phytohaemagglutinin in rabbits while pokeweed mitogen represents a predominant B-cell stimulator.

This work was supported by Czech Science Foundation (GA ČR 524/08/P568).

References

1. Azzolina LS, Stevanoni G, Tommasi M, Tridente G. Phenotypic

analysis of human peripheral blood lymphocytes by automatic sampling flow cytometry after stimulation with mitogens or allogeneic cells. *Ric Clin Lab* 1990; 20: 209–216.

2. Dorn AD, Waters WR, Byers VM, Pesch BA, Wannemuehler MJ. Characterization of mitogen-stimulated porcine lymphocytes using a stable fluorescent dye (PKH2) and multicolor flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87: 1–10.
3. Fanger MW, Reese AC, Schoenberg MD, Stavitsky AB, Reese AL. Evidence for T lymphocyte subpopulation in the rabbit. *J Immunol* 1974; 112: 1971–1980.
4. Quade MJ, Roth JA. Dual-color flow cytometric analysis of phenotype, activation marker expression, and proliferation of mitogen-stimulated bovine lymphocyte subsets. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 67: 33–45.
5. Watkins JR, McNicholas JM, Loken MR, Knight KL. Characterization of functionally distinct subpopulations of rabbit T lymphocytes. *Immunology* 1984; 53: 659–667.

Spontaneous acute leukaemia in a pet rat (*Ratus norvegicus*)

Jeklová E.¹, Jekl V.², Ondráčková P.¹, Řeháková K.², Knotek Z.², Faldyna M.¹

¹Veterinary research institute, Brno, Czech Republic; e-mail: jeklova@vri.cz

²University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

A fourteen month old male pet rat (*Ratus norvegicus*) was presented to the Avian and Exotic Animal Clinic of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno due to apathy, dyspnoea and subcutaneous mass on the neck and armpit. The owner stated the duration of these signs for two days. Clinical examination revealed weakness, hunched posture, low skin elasticity, enlargement of peripheral lymph nodes and splenomegaly. The rat demonstrated a mild discomfort on abdominal palpation.

Abnormal haematology and plasma biochemistry results included marked leukocytosis with high amount of blasts, relative neutropenia and lymphopenia, elevated levels of AST, ALP and phosphorus. The patient was euthanised due to infaust prognosis.

At necropsy, multiple round lesions 2 mm in diameter within lung parenchyma were observed. Generalised lymphadenopathy and diffuse splenomegaly was confirmed. Samples of peripheral blood, suprascapular lymph node and bone marrow were obtained for immunophenotyping. Using flow cytometry, neoplastic cells showed high forward scatter and in all examined organs, the cells were of uniform phenotype CD8⁺, CD172 α ⁺, CD161⁺, CD3⁺, CD4⁺, IgM⁺, CD79 α ⁺. Definitive diagnosis was spontaneous acute leukaemia.

This study was supported by Ministry of Agriculture of the Czech Republic (MZe 0002716102).

Leukemic infiltration of central nervous system in dogs with acute lymphoblastic leukemia

Borska P.¹, Faldyna M.², Leva L.², Schanilec P.¹, Blatny J.³, Stourac P.⁴

¹Small Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic; e-mail: lymfom@yahoo.com

²Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

³Department of Clinical Hematology, Children's University Hospital, Brno, Czech Republic

⁴Department of Clinical Neurology, Faculty Hospital, Brno, Czech Republic

Central nervous system (CNS) involvement is identified in almost 5% of children and 10% of adult patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) (Bleyer 1985; Cortes et al.,

1995). Leukemic infiltration of CNS has diagnostic, therapeutic and prognostic significance and generally is associated with a poor prognosis (Schinstine et al, 2006). Correct appreciation can be complicated by peripheral blood contamination or nonspecific pleocytosis due to intrathecal administration of cytotoxic agents or infection. Immunophenotypization may be helpful for the detection of malignant clones in cerebrospinal fluid (CSF) and can enhance the accuracy of cytologic examination alone (French et al., 2000; Babusikova and Zeleznikova, 2004). To our knowledge, there is no report concerning flow cytometric analysis of CSF in dogs with lymphoproliferative disorders.

Cerebrospinal fluid specimens were collected by cisternal puncture from 4 dogs with ALL. All samples were submitted to cytologic examination. Flow cytometry analysis was performed and the phenotypic profiles of malignant cells at different sites (CSF, peripheral blood, bone marrow) of the same patient were compared. The cells were counted in a Fuchs-Rosenthal chamber. Differential cell count was evaluated from slides prepared by cytocentrifuge Cytospin-2 (Shandon Ltd, Astmoor, UK) followed by staining with May-Grünwald, Giemsa-Romanowski. A panel of monoclonal antibodies was used to characterize malignant cells. Data were acquired on a standard FACSCalibur™ flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA) operated by the CELLQuest™ software. In each sample, 40 000 cells were measured and the data were saved in the list mode. Propidium iodide was used to stain DNA in dead and damaged cells and to exclude such events from analysis. The WinMDI™ software was used for data processing. Gating was based on forward angle and right angle scatter signals.

Cytologic examination indicated presence of suspected pathological clone in all 4 dogs with ALL included in our study. The immunophenotype of malignant cells in CSF was established in 2 dogs with B-ALL (CD79 α +CD21 $^{-}$), while cellularity was > 5 leu/ μ l. No changes of phenotypic profiles of specimens from different sites were found.

This study was partly supported by Ministry of Agriculture of the Czech Republic (M.F. L.L.) 0002716202 and FRVS (P.B.) 764/G3/2007.

References

1. **Babusikova O, Zeleznikova T.** The value of multiparameter flow cytometry of cerebrospinal fluid involved by leukemia/lymphoma cells. *Neoplasma* 2004; 51: 345–351.
2. **Bleyer WA.** Central nervous system leukemia. *Pediatr Clin North Am* 1984; 35: 789.
3. **Cortes J, O'Brien SM, Pierce S, Keating MJ, Freireich EJ, Kantarjian HM.** The value of high dose systemic chemotherapy and intrathecal therapy for central nervous system prophylaxis in different risk groups of adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 86: 2091–2097.
4. **French CA, Dorfman DM, Shaheen G, Cibas ES.** Diagnosing lymphoproliferative disorders involving the cerebrospinal fluid: increased sensitivity using flow cytometric analysis. *Diagn Cytopathol* 2000; 23: 369–374.
5. **Schinstine M, Filie AC, Wilson W, Stetler-Stevenson M, Abati A.** Detection of malignant hematopoietic cells in cerebral spinal fluid previously diagnosed as atypical or suspicious. *Cancer* 2006; 108: 157–162.

Phenotypical characterisation of lung, peripheral blood and bone marrow mononuclear phagocyte subpopulations and dynamics of their changes during inflammation induced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Zelnickova-Ondrackova P.^{1,2}, Kucerova Z.¹,
Nechvatalova K.¹, Leva L.¹, Faldyna M.^{1,2}

¹Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic;
e-mail: zelnickova@vri.cz

²University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno,
Czech Republic

The aim of this work was to describe the porcine mononuclear phagocyte (MP) subpopulations, which are involved in infiltration of inflamed tissue under *in vivo* conditions in pigs.

The *in vivo* infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) was used for induction of inflammatory response in the lung tissue. Cell surface markers CD14, CD163, MHCII and SWC9 were used for the identification of MP by flow cytometry. Together with analysis of MP, which appeared in the inflamed lungs, the changes in MP subpopulations in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) compartments were assessed in order to elicit the possible origin and maturation stages of the infiltrating MP.

The population of MP, which migrated to the inflamed lungs, had CD14 $^{+}$ CD163 $^{+}$ SWC9 $^{+/-}$ MHCII $^{+/-}$ phenotype. The population of PB MP, which was elevated in the PB after APP infection, was CD14 $^{+}$ CD163 $^{+}$ SWC9 $^{-}$ MHCII $^{-}$ suggesting that PB CD14 $^{+}$ CD163 $^{+}$ MP give rise to the inflammatory monocytes/macrophages. The SWC9 and MHCII molecules appear on these cells after leaving the PB. In healthy animals, the BM MP precursors were represented by CD14 $^{-}$ CD163 $^{-}$ cells maturing directly into CD14 $^{+}$ CD163 $^{+}$, which are then released to the PB. After infection, a completely different maturation pathway of MP precursors appeared; that was represented by CD14 $^{-}$ CD163 $^{-}$ SWC9 $^{-}$ MHCII $^{-}$ MP directly switching into CD14 $^{+}$ CD163 $^{+}$ SWC9 $^{-}$ MHCII $^{-}$ MP. These cells are then probably released directly to the PB.

In conclusion, the populations of MP, which are involved in the inflammatory response in pigs, were described in this work.

This work was supported by grant MZE 0002716202.

Determination of blood and duodenal immunocompetent cells in diets contaminated with DON and ZEA mycotoxins

Revajová V.¹, Levkut M.¹, Herich R.¹, Ševčíková Z.¹,
Slaminková Z.¹, Leng L.², Bořutová R.²

¹Department of Pathological Anatomy, University of Veterinary
Medicine, Košice, Slovak Republic; e-mail: revajova@uvm.sk

²Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences,
Slovak Republic

Mycotoxins are fungal secondary metabolites toxic to animals. They occur in agricultural products and threaten food safety. The presence of mycotoxins in poultry feeds is a significant factor for financial losses to animal industries. Deoxynivalenol (DON), also known by the colloquial name vomitoxin, as well as zearalenon (ZEA), the most common mycotoxins are produced by *Fusarium* spp. and are included into type B trichothecenes. Syndromes caused by mycotoxins range from acute mortality to slow growth and reduced reproductive efficiency. Consumption of mycotoxins may also result in impaired immunity and decreased resistance to infectious diseases (Oswald et al., 2005). Understanding of their action is essential to predicting potential deleterious effects they might have on human health.

Numerous studies that have been conducted on host resistance, antibody responses and cell-mediated immunity in animals showed that trichothecenes can be either immunostimulatory or immunosuppressive depending on dose, exposure frequency, and timing of functional immune assay (Bondy and Pestka, 2000).

Low dose trichothecene exposure can increase resistance to certain pathogens, elevate serum IgA levels and initiate rapid and transient upregulation of many immune related genes; the latter effect can be exacerbated by concurrent exposure to inflammagenic stimulus such as lipopolysaccharide. High dose exposure severely injures actively dividing tissues including bone marrow, lymph nodes, spleen, thymus, and intestinal mucosa that can result in immunosuppression as evidenced by depression of circulating blood leukocytes, decreased resistance to pathogens, inhibition of antibody responses to model antigens, and impaired delayed type hypersensitivity responses (Pestka et al., 2004).

Leukocytes, which represent the functional cell repertoire of the immune system, are exquisitely sensitive to trichothecenes. Macrophages, B- and T-cells are all affected. The stimulatory effects of low doses of trichothecenes are related to their ability to induce immune- and inflammation-associated genes. In contrast, it appears that the suppressive effects on leukocyte function are linked with the induction of apoptosis as has been demonstrated in macrophages, T and B cells both *in vivo* and *in vitro* (Yang et al., 2000).

Human and animal contamination occurs mainly orally and the toxin must traverse the intestinal epithelial barrier before inducing potential health effects. In chicken, DON seems to be rapidly and efficiently absorbed, most probably from the upper parts of the small intestine; absorption is time and concentration-dependent. A rapid plasma clearance and excretion due to an efficient hepatic or renal first-pass effect, rapid intestinal transit time and intestinal microflora which plays a major role in DON detoxification might explain the relative tolerance of poultry. Dietary concentration greater than 5 mg/kg are necessary to cause detrimental effects. Feed refusal and reduced weight gain were found in chickens when dietary concentration of DON reached 16–20 mg/kg, but chronic intake of *Fusarium* mycotoxins will adversely affect of layer performance, immune response and metabolism (Awad, 2008).

In our experiment we used flow cytometry for study the effect of diets containing low and high dose of DON and ZEA on white blood cells, phagocytic activity of granulocytes, T and B cell numbers in the peripheral blood and duodenal intraepithelial lymphocytes of Ross 308 hybrid chicken broilers. Both doses caused the decrease of total count of leukocytes and lymphocytes. In spite of higher number of heterophiles, their phagocytic activity was lower in comparison to control chickens. Determination of lymphocyte subpopulations in the peripheral blood showed decrease of T cells values (CD3, CD4, CD8, CD44) and MHC II cells, but increase of IgG cells in both dose, and IgM cells only in group fed with low dose. Duodenal intraepithelial lymphocyte (IEL) subpopulations showed decrease values of CD3 and CD4 cells in groups fed with both contaminated diets. Percentage of CD8 and CD44 in group fed with high dose exceeded the values of control. MHC II cells were significantly improved, and IgA cells were significantly decreased in both experimental groups comparing to controls. Two weeks mycotoxins application showed immunomodulatory effects in chickens.

This work was supported by the Research and Development Support Agency, Slovakia, Grant No. APVV-0399-07, APVV-20-041605, VEGA Slovakia, Grant No. 6173, VEGA Slovakia 1/0044/08 and 1/0609/09.

References

1. **Awad WA, Ghareeb K, Bohm J, Razzazi E, Hellweg P, Zentek J.** The impact of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) on poultry. *Int J Poultry Sci.* 7: 827-842. 2008.
2. **Bondy GS, Pestka JJ.** Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol Environ. Health B Crit Rev* 2000; 3: 109–143.
3. **Oswald IP, Marin DE, Boubet S, Pinton P, Taranu I, Accensi F.** Immunotoxicological risk of mycotoxin for domestic animals in Europe. *Food Addit Contam* 2005; 22: 354–360.
4. **Pestka JJ, Zhou H-R, Moon Y, Chung YJ.** Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unravelling a paradox. *Toxicol Lett* 2004; 153: 61–73.
5. **Yang G, Jarvis BB, Chung Y, Pestka JJ.** Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK and SAPK/JNK activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 164: 149–160.

Microgeographic genome size differentiation of the wild barley, *Hordeum spontaneum*, at “Evolution Canyon”, Israel and multispecies comparison

Doležalová I.¹, Pavlíček T.², Gasmanová N.¹, Nevo E.², Hammerová I.¹, Lebeda A.¹

¹Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc-Holice, Czech Republic; e-mail: ivana.dolezalova@upol.cz
²Institute of Evolution, University of Haifa, Mt. Carmel, Israel

We used flow cytometry to examine differences of relative genome size (GS) in wild barley, *Hordeum spontaneum*, between the opposite slopes of the microsite “Evolution Canyon”, Mt. Carmel, Israel (EC). Samples of wild barley were collected in 2004 and 2006.

In both years, higher GS (significantly higher in 2004) was recorded in the population representing the less insulated, cooler, wetter, and microclimatically less fluctuating “European maquis-like” north-facing slope than in the populations of the opposite, more insulated, warmer, and drier “African savannah-like” south-facing slope. In addition, intraslope GS variability and documented differences between both temporal samples indicate the presence of significant spatiotemporal GS fluctuations at EC, in spite of the interslope physical distance of 100 to 400 m. There might be two explanations for significantly smaller GS in 2006 than in 2004: (i) Year to year different microclimate conditions (expected but not measured) are expressed in differential germinability of different genotypes present in the soil seed bank (Yan et al., 2008). (ii) Rapid retrotransposon dynamics including expansions and contractions (e.g. Shirasu et al., 2000; Schulman and Kalendar, 2005) – if we expect that retrotransposons are responsible for most of GS variability in wild barley – is behind spatio-temporal changes in GS even on the generation scale.

Multispecies comparisons do not conclusively support the earlier proposed positive relationship between GS and drought stress (Bureš et al., 2004). In a contrast to the presently studied wild barley were found significant positive correlation between GS and drought stress in *C. siliqua* (Bureš et al., 2004). In other tested species (*C. persicum*, *L. peregrinus*, *O. surinamensis*) the GS/drought relationship did not reach statistical significance. However, the significant overall multispecies test and the significant Spearman correlation between overall GS and the level of drought stress, provide some support for the proposed relationship or indicate the presence of other environmental factor(s) partly linked to or overlap with the drought stress gradient (Fig. 1).

This study was supported by the Israel Discount Bank Chair of Evolutionary Biology, Ancell-Teicher Research Foundation for Genetics and Molecular Evolution and MSM6198959215.

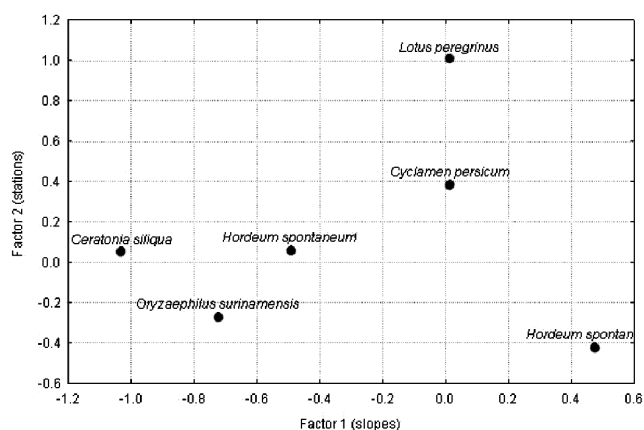


Fig. 1. Two dimensional scatterplot obtained by Multidimensional scaling on the nonparametric inter-species Kendall Tau correlation matrix of GS distributions along the drought gradient at "EC".

References

1. Bureš P, Pavlíček T, Horová L, Nevo E. Microgeographic genome size differentiation of the carob tree, *Ceratonia siliqua*, at "Evolution Canyon", Israel. *Ann Bot* 2004; 93: 1–7.
2. Shirasu K, Schulman AH, Lahaye T, Schulze-Lefert P. A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Gen Res* 2000; 10: 908–915.
3. Schulman AH, Kalendar R. A movable feast: diverse retrotransposons and their contribution to barley genome dynamics. *Cyt Gen Res* 2005; 110: 598–605.
4. Yan J, Chen GX, Cheng JP, Nevo E, Guterman Y. Phenotypic variation in caryopsis dormancy and seedling salt tolerance in wild barley, *Hordeum spontaneum*, from different habitats in Israel. *Gen Res Crop Evol* 2008; 55: 995–1005.

Optimization of *Arabidopsis thaliana* protoplast FACS sorting for gene expression analysis

Libus J.¹, van der Graaff E.², Laux T.²

¹Institute of Experimental Botany, AS CR, v.v.i.; Praha, Czech Republic; e-mail: libus@ueb.cas.cz

²Institut für Biologie III, Universität Freiburg, Schänzlestrasse 1, D-79104 Freiburg I. B, Germany

We have improved the previously published method of isolation of specific cell populations from plant roots for microarray analysis of gene expression. The increased yield of material enabled us to avoid RNA amplification and thereby reduce the risk of artifacts. We have employed the method to get data about root apical meristem function in *Arabidopsis thaliana*.

References

1. Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung J, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN. A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* 2003; 302: 1956–1960.
2. Birnbaum K, Jung JW, Wang JY, Lambert GM, Hirst JA, Galbraith DW, Benfey PN. Cell type-specific expression profiling in plants via cell sorting of protoplasts from fluorescent reporter lines. *Nat Methods* 2005; 2: 615–619.

Hybridisation of diploid and tetraploid taxa of *Centaurea* sect. *Jacea*: frequency, role of unreduced gametes, and morphological variation

Koutecký P, Štech M, Baďurová T, Košnar J.

University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic; e-mail: kouta@prf.jcu.cz

Polyploidy is considered one of the main evolutionary mechanisms in plants. However, process of formation of polyploids is not fully understood yet. *Centaurea* sect. *Jacea* includes diploids ($2n = 22$) and tetraploids ($2n = 44$). They are strictly sexual and mainly self-incompatible (though autogamy at very low rate is present). Taxa of the same ploidy level (irrespective whether diploid or tetraploid) hybridise frequently and their hybrids are fertile, while hybridisation between the ploidy levels is rare. Hybrids of some taxa can easily be identified morphologically. These features make *Centaurea* sect. *Jacea* suitable model for studies of diploid-tetraploid interactions.

Published results of crossing experiments (Gardou, 1972; Hardy et al., 2001) show that inter-ploidy hybrids are usually triploid, i.e. formed by union of reduced gametes. Very rare occurrence of tetraploid hybrids (by unreduced gametes of diploids) was also detected. Strong reproductive isolation between ploidy levels was also confirmed by flow cytometric screening of three mixed populations in which no hybrid triploid individuals were found (Hardy et al., 2000).

Within ongoing study we focus on frequency of hybridisation between the two ploidy levels and role of unreduced gametes. We combine extensive flow cytometric screening of ploidy levels in wild populations (both mature plants and seeds) and crossing experiments. The first results indicate major role of unreduced gametes that has been overlooked by previous studies.

Screening of both seeds and mature plants confirmed that hybridisation between ploidy levels is rare. In seed screening, probably hybrid seeds (both DNA triploids and DNA tetraploids) were found in several mixed populations with very small frequency less than 0.1%. However, they virtually do not contribute to mature population, since within ca 15 mixed populations studied so far hybrids were found in the only one. All hybrids were DNA tetraploids formed most probably by unreduced gametes of diploid (*C. elatior*) and reduced gamete of tetraploid (*C. jacea*). No DNA triploids were found. In addition, single DNA hexaploid individual morphologically corresponding to typical *C. jacea* was found in another mixed population. It originated probably from union of reduced and unreduced gamete of the same species.

In opposite, in crossing experiments hybrids between diploid and tetraploids are regularly produced. They include both DNA triploids (both gametes reduced) and DNA tetraploids (reduced gamete of the tetraploid + unreduced gamete of the diploid). Single DNA pentaploid (reduced pollen of the diploid + unreduced ovule of the tetraploid) was also found. Control crosses within the ploidy level did only yield progeny of the same ploidy level. Accordingly, no deviation from expected DNA ploidy levels was found during flow cytometric screening of single taxon populations.

Our results show that unreduced gametes are formed at both ploidy levels, though their contribution to reproduction is much higher in diploids. Marked discrepancy in number and ploidy levels of hybrids between crossing experiments and wild populations was found. One of possible explanations is pollen competition that could be important isolation mechanism between different ploidy levels. Therefore, we intend to perform another crossing experiment with mixtures of pollen to test the pollen competition.

Hybrids *C. elatior* × *C. jacea* displays unexpected morphological variation even in the first filial generation. It seems that morphology of the progeny depends on a mother plant and it is shifted towards it instead of being intermediate.

The hybrids *C. elatior* ♀ × *C. jacea* ♂ are of particular interest. They are usually tetraploid and some morphotypes much resemble some other tetraploid taxa, such as *C. macroptilon* and *C. oxylepis*. Allopolyploid origin of these taxa through unusual pathway involving hybridisation of diploid (unreduced gametes) with already established tetraploid (reduced gametes) can therefore be hypothesised and ought to be tested.

This work was supported by grants 206/08/1126 from the Grant Agency of the Czech Republic and MSM6007665801 from Ministry of Education of the Czech Republic.

References

1. **Gardou Ch.** Recherches biosystématiques sur la section *Jacea* Cass. et quelques sections voisines du genre *Centaurea* L. en France et dans les régions limitrophes. Feddes Repert 1972; 83: 311–472.
2. **Hardy OJ, Vanderhoeven S, de Loose M, Meerts P.** Ecological, morphological and allozymic differentiation between diploid and tetraploid knapweeds (*Centaurea jacea*) from a contact zone in the Belgian Ardennes. New Phytol 2000; 146: 291–290.
3. **Hardy OJ, de Loose M, Vekemans X, Meerts P.** Allozyme segregation and inter-cytotype reproductive barriers in the polyploid complex *Centaurea jacea*. Heredity 2001; 87: 136–145.

Towards Proper Evaluation of Image Analysis Methods Used in Biomedical Research

Svoboda D, Kozubek M, Stejskal S.

Centre for Biomedical Image Analysis, Masaryk University, Brno, Czech Republic; e-mail: svoboda@fi.muni.cz

In recent years, the biomedicine, like the other fields of research, has become more and more tied up with the computer science. The vast majority of measurements is acquired, stored and further evaluated in the instruments controlled by the appropriate computer programs. In optical microscopy such equipment has already become a standard as it is very comfortable and fast to use it. The whole process of observation can be typically split into four main parts:

1. Specimen preparation – In the very beginning, the biomedical specialist has to prepare the specimen that is to be observed. This part is usually the most time consuming.

2. Image transmission – This part of observation is controlled by the microscope. The image of the specimen is transmitted through the optical system of the microscope. Due to some imperfections (chromatic aberrations, blur, uneven illumination, etc.) the signal is affected.

3. Image acquisition – In optical microscopy, the image is typically acquired by CCD camera that is responsible for the image formation. Such an image is stored somewhere in the computer hard drive and conveyed for the further processing.

4. Image analysis – The images of some specimens are submitted to selected image analysis methods. These usually include image restoration, image segmentation and image recognition.

The last step of this process, the image analysis, offers a large variety of image processing methods. It is clear that the results of such methods are crucial to final evaluation and conclusions. That is why each user has to verify whether the selected method is appropriate and whether it performs correctly. For this purpose, we implemented a simulation toolbox [1] called CytoPacq (<http://cbia.fi.muni.cz/simulator/>) that is capable of simulating the first three steps:

- 3D-CytoGen ... generates the digital phantom (specimen preparation)
- 3D-OptiGen ... imitates the whole optical system (image transmission)
- 3D-AcquiGen ... simulates the behaviour of CCD camera (image acquisition)

As a result, CytoPacq offers synthetic image data as they would look like if acquired by real microscope and camera. Furthermore, the ideal image of an unaffected specimen is also generated. Hence, the synthetic data can be submitted to any image analysis method and the results of such method can be simply compared to the ideal image and evaluated.

The work was supported by the Czech Ministry of Education (Grants No. 2B06052 and LC535).

References

1. **Svoboda D, Kozubek M, Stejskal S.** Generation of Digital Phantoms of Cell Nuclei and Simulation of Image Formation in 3D Image Cytometry. Cytometry Part A 2009; 75A: 494–509.

Acquarium: Free image acquisition and analysis software for image cytometry

Matula P, Daněk O, Maška M, Vinkler M, Kozubek M. Centre for Biomedical Image Analysis, Faculty of Informatics, Masaryk University, Brno, Czech Republic; e-mail: pam@fi.muni.cz

Image cytometry is the measurement of such characteristics as dimension, volume, shape, and reaction kinetics of biological and medical samples. It is usually performed using an optical microscope, scientific camera, and image acquisition and analysis software. Acquarium (<http://cbia.fi.muni.cz/acquarium>) is free software for carrying out the common pipeline of many spatial cell studies using fluorescence microscopy. It can be used for image

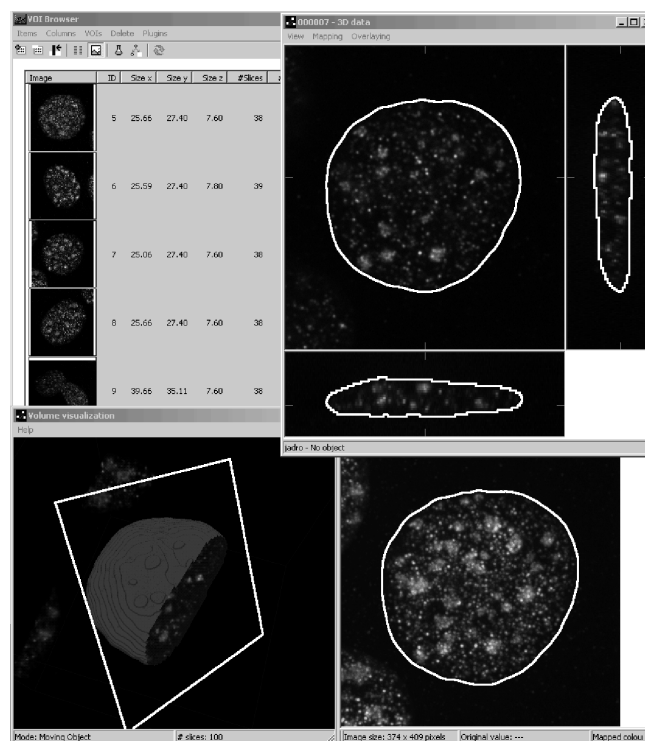


Fig. 1. This image shows four different means of image data visualization in Acquarium. (Top left window) The list of images prepared for image analysis is shown. The important image parameters are listed for each item. (Top right window) Three orthogonal cross sections of an image are shown. The outline of the cell nucleus computed by the software (white contour) is overlaid on the input image. (Bottom left window) Volume visualization window offers a spatial view at the input images and the image analysis results. A user can use an arbitrarily located clipping plane to explore the volume. (Bottom right window) The maximal intensity projection image (in the axial direction) is shown.

acquisition and/or image analysis. The image acquisition part is optimized for fast image capture using spinning disk microscopes, which are suitable for 2D or 3D imaging of both fixed and living cells. The image analysis part is focused on comfortable work with a collection of many 3D images. It has a modular design and is extensible via plug-ins. Acquiarius can execute a batch of plug-ins on selected images, which makes extensive analyses possible. Data visualization capabilities of Acquiarius are illustrated in Figure 1.

Image analysis in Acquiarius usually consists of the following steps:

- Raw image correction – It may, for example, include uneven illumination correction, chromatic aberration correction, or alignment of live cell images.
- Object detection in input images (segmentation) – Plug-ins on the basis of thresholding, energy minimization, or mathematical morphology algorithms are implemented. Software builds 'is-a-part-of' structure of objects (e.g. nucleoli 'is-a-part-of' nucleus). Therefore mutual spatial relations between objects can be studied.
- Object measurement, classification and filtering – Objects can be filtered or classified by computed features (e.g. average intensity, volume, surface area, roundness, location, the number of child objects). Object parameters can be plotted in graphs (histogram or scatter diagrams). Images containing objects with interesting parameters can be found in the collection and accessed in the software by clicking with a mouse in a graph.

- Statistics and summaries – Statistics plug-ins can generate different types of text files summarizing object parameters or compute object statistics.

Acquiarius is intended for the following main applications:

- Quantification of objects, especially dot counting in 2D, 3D, as well as time lapse images and counting the number of larger domains in cells, e.g. the number of nucleoli or protein sites in cell nucleus.
- Spatial arrangement studies. For example, colocalization studies, or radial distribution of hybridization dots in nuclei.
- Measurement of geometrical and shape parameters of cellular structures. For example, volume, surface area, roundness, etc.

The Acquiarius software contains many general purpose algorithms suitable for various image cytometry applications.

We thank all former, current and future developers and collaborators. Grant sponsor: Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project No. 2B06052).

References

1. **Matula P, Maška M, Daněk O, Matula P, Kozubek M.** Acquiarius: Free software for the acquisition and analysis of 3D images of cells in fluorescence microscopy. In: IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, 4 p, Boston, 2009.

Pozn.: Za věcný obsah abstrakt odpovídají autoři.

Způsoby boje se stafylo-superantigenem

Stafylokokový superantigen je pyrogenní exotoxin, který vyvolává masivní aktivaci T-buněk, což vede k toxickému šokovému syndromu a ke smrti. Je to nepříliš vzácná klinická příhoda, i když je současně vyvolána i silná adaptivní imunitní reakce. Ukazuje se, že odpověď lidského interleukinu-2 na superantigen je inhibována současnou pří-

tomností bakterií. Příčinou jsou peptidoglykany v molekulách, vázané k Toll-like receptorům-2 a indukujícím IL-10 se současnou apoptózou antigen-prezentujících buněk. V experimentu autoři *in vivo* zajišťují výraznou prevenci mortality současným podáním stafylokokového enterotoxinu B buď s horkem zabitými stafylokoky, nebo peptidoglykan ze *S. aureus* v myším modelu navozeného toxického šokového syndromu.

Literatura:

Chau TA, et al. Toll-like receptor 2 ligands on the staphylococcal cell wall downregulate superantigen-induced T cell activation and prevent toxic shock syndrome. *Nature Medicine* 2009; 15: 641–648.

P. Barták

Dermatologie patří mezi interní obory

Jak kůže, tak srdce jsou cíle mechanického stresu a musí odolávat především desmozomy v kůži a v myokardu. Mutace desmozomálních proteinů se projevují v dědičných kožních i kardiálních syndromech a autoři se zde poku-

sili poskytnout přehled poruch, jako je Naxos choroba a Carvajalův syndrom, kde je deficece plakoglobinu a desmoplakinu. Kožní projevy mohou signalizovat nebezpečné letální srdeční onemocnění, a proto je poznání takových syndromů užitečné. Tak lze vývoj choroby zpomalit, léčit arytmiie a předejít náhlé smrti.

Literatura:

Bolling MC, Jonkman MF. Skin and heart: une liaison dangereuse. 2009; : 658–668.

P. Barták

Abstrakta

Surveillance a budoucnost epidemiologie

Praha, 11. listopadu 2009

Sto let od narození prof. Karla Rašky

Ve středu 11. listopadu 2009 proběhlo v přeplyněné síni Coriových (U nemocnice 5, Praha 2) pod názvem „Surveillance a budoucnost epidemiologie“ symposium konané u příležitosti 100 let od narození našeho největšího epidemiologa Karla Rašky (narozen 17. listopadu 1909 v šumavském Strašíně), jehož nejvýznamnějším přínosem světové medicíně bylo vytvoření aktivní epidemiologické bdělosti (surveillance) a nového programu eradikace pravých neštovic, který byl založen na implementaci surveillance. Kampaň Světové zdravotnické organizace v eradikaci neštovic prováděná podle Rašky byla v roce 1977 završena úspěšně a surveillance podle Rašky je dodnes používána jako jeden ze základních metodických pilířů veřejného zdravotnictví. V Časopise lékařů českých přinášíme svým čtenářům souhrny sdělení prezentovaných na sympoziu, jakož i pozdravný dopis dr. Halídana Mahlera, bývalého generálního ředitele SZO. Činíme tak rádi i proto, že prof. Karel Raška byl mj. také vedoucím redaktorem Časopisu lékařů českých.

prof. MUDr. Jiří Horák, CSc.
vedoucí redaktor Časopisu lékařů českých

Karel Raška - legenda epidemiologie

Eva Aldová, Eva Švandová

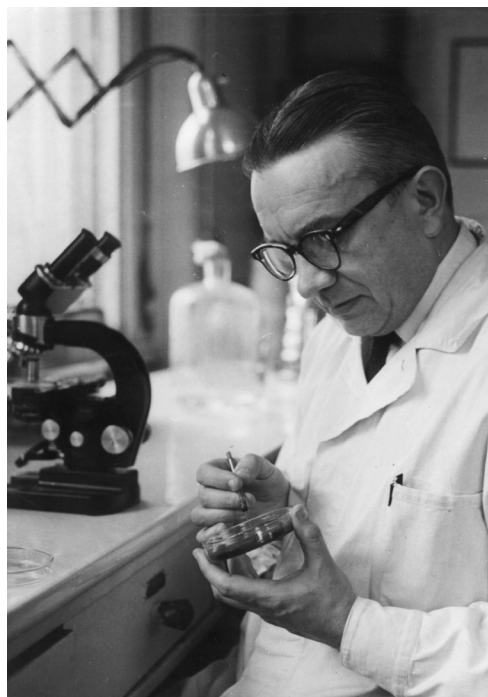
Dlouholeté spolupracovnice prof. K. Rašky

Dvě dlouholeté pracovnice Státního zdravotního ústavu vzpomněly několika významných prací profesora Rašky, aby alespoň částečně ilustrovaly šíři jeho zájmů a pečlivost zpracování vybraných úkolů.

Svoji epidemiologickou „školu“ budoval od základů kvalitní laboratorní práce. Prosadil myšlenku referenčních laboratoří, které zajistí srovnatelnost a opakovatelnost mikrobiologických výsledků. Pro kvalitní přípravu pracovníků epidemiologických stanic prosadil specializovanou hygienickou fakultu, doplňovanou atestačním řízením v rámci ústavu pro doškolení lékařů. Jeho zájem o terénní práci pokračoval i v případě lokálních epidemií, kdy poskytoval radu i pomoc svou i celého ústavu.

Ocenění jeho zkušenosti, energie i tvůrčího myšlení bylo vyjádřeno tím, že byl bez konkurzu jmenován ředitelem Divize infekčních nemocí WHO v Ženevě. Tam prosadil myšlenku svého pojetí surveillance nemocí a tu pak doložil svým návrhem eradikace varioly. Myšlenka to byla natolik revoluční, že byl vyslán, aby sám přesvědčil americkou vládu o poskytnutí potřebných financí. Deset let stovky specialistů (včetně 20 československých) a tisíce lokálních pracovníků zemí Asie, Afriky a Jižní Ameriky realizovaly smělý projekt – podařilo se. Na konci této bitvy bylo mnoho vítězů. Svět oslavoval vítězství nad tímto strašným onemocněním – ne tak profesor Raška. Po návratu ze Ženevy byl sesazen z funkce ředitele Ústavu epidemiologie a mikrobiologie, pak dostal výpověď a později mu byl dokonce zakázán vstup do areálu ústavu. Nebyl to jen politický systém této země, byla to obyčejná osobní nenávisť – a v důsledku této ministerské nelibosti i slabost a strach některých jeho podřízených, žáků, dokonce i přátel.

Profesor Raška se sice nedal zcela zlomit – stále měl zájem o problémy infekčních i neinfekčních nemocí, četl a radil, pokud byl vyzván. Jeho srdce však sláblo. Když přišlo skutečně velké světové ocenění jeho práce – Jennerova medaile Královské lékařské společnosti v Londýně, bylo jeho srdce už slabé na příliš velkou radost. Profesor Raška se nedožil politické změny v Československu, ale vlastně se dodnes nedočkal oficiálního ocenění tady doma toho, co pro prestiž tohoto státu udělal. Jeho jméno se ještě nedostalo do nových lékařských učebnic, a tak ho připomíná jen deska v už zase neexistujícím Ústavu epidemiologie a mikrobiologie.



Prof. Karel Raška při práci v laboratoři

Samotné slovo epidemiologie se mnohým špatně vyslovuje, tak se nepoužívá – pokud ale budou žít myšlenky profesora Rašky v praxi, bude tím nejlépe oslaven smysl jeho práce.

Karel Raška – The Development of Modern Epidemiology: The Role of the International Epidemiological Association W. W. Holland

Emeritus Professor of Public Health Medicine, University of London
Visiting Professor, London School of Economics and Political Science

This Association was founded in 1956. Raska was a founding member and played an important role in the Association. The contributions Raška made to the science of Epidemiolo-

gy will be described. Through his interaction with members of the Association his ideas and influence in the field of communicable disease control were responsible for the success of a variety of public health actions worldwide. This will be described and discussed.

Karel Raška – tvůrce naší koncepční epidemiologie v medicíně, na univerzitách, ve vědě a vědeckých společnostech

Ivo Hána

Rada vědeckých společností ČR

Karel Raška předběhl svou dobu a progresivně zapojil moderní pojetí epidemiologie, opírající se v mnohém o koncepci „surveillance“ a také „public health“ do československého zdravotnictví.

Novodobá epidemiologie se začala teoreticky koncipovat především v anglosaské literatuře a Karel Raška ji prakticky přenesl do medicínské praxe v oblasti infekčních chorob na široké bázi již v padesátých letech 20. století.

Jeho pojetí epidemiologie vycházelo z praxe jak laboratorní tak terénní, kterou dovedl do stavu výrazně systémového provádění s vizí perspektivního využití (např. založení světových sérových bank).

Úspěchy v této práci dovedl prezentovat u nás i v zahraničí přednáškami, instrukcemi, organizačními opatřeními a publikacemi.

To byl důvod pro jeho jmenování na místo ředitele divize infekčních chorob Hlavní úřadovny WHO v Ženevě.

Své pojetí epidemiologické praxe dovedl k úspěšnému vrcholu při koordinaci celosvětové eradikace neštovic ve zmíněné funkci v Ženevě.

Tam vykonal i velice záslužnou práci pro propagaci československého zdravotnictví a zasloužil se o vyslání mnoha desítek lékařů a dalších odborníků na práci pro WHO.

Zajistil významnou a dlouhodobou spolupráci našeho zdravotnictví s WHO (např. pořádání mezinárodních kurzů pro frekventanty z celého světa v Praze či založení WHO referenčních laboratoří u nás).

Jeho myšlenky v oblasti epidemiologie nakažlivých nemocí (včetně surveillance) byly převzaty v obecné epidemiologii i v epidemiologii nemocí neinfekčních.

Vychoval celou řadu následovníků a inicioval rozvoj epidemiologických studií i v jiných oblastech medicíny.

Měl jakýsi „šestý smysl“ nejen pro rozpoznání problémů v epidemiologii infekčních nemocí, ale i problémů obecně ve vědě, a pro včasné zachycení trendů včetně organizace vědecké práce a vědeckých společností.

Výsledky práce Karla Rašky jsou pro naši vlast a celý svět (surveillance a eradikace varioly) nedocenitelné. Je s podivem, že u nás ještě nejsou státními a odbornými institucemi uznány a zhodnoceny.

Přínos profesora Karla Rašky pro WHO

Alena Šteřlová
Kancelář WHO v ČR

Profesor MUDr. Karel Raška je naším nejvýznamnějším epidemiologem 20. století. Jako ředitel Ústavu epidemiologie a mikrobiologie Státního zdravotního ústavu v Praze, byl v roce 1963 jmenován ředitelem Divize infekčních nemocí v centrále WHO v Ženevě a pracoval zde do roku 1970. Generální ředitel WHO dr. Candau mu toto místo nabídl bez konkurzu s vědomím Raškovy mezinárodní autority, odborné úrovně a organizačních schopností. Raška se s mimořádnou energií rozhodl celosvětově zvládnout eradikaci černých neštovic a podařilo se mu přesvědčit i americkou vládu, aby tento program financovala. Raška rovněž správně zanalyzo-



val pozitivní i negativní rysy tehdejšího politicko-geografického uspořádání světa, které umožňovalo zahájit tak rozsáhlý veřejně zdravotnický program v globálním měřítku.

Metoda práce se opírala o nově koncipovanou aktivní surveillance nákaz, založené na aktivním vyhledávání ohnisek infekce, léčbě nemocných, zjišťování a očkování všech kontaktů a byla odklonem od předtím propagovaných masivních očkovacích kampaní. Zvolená metoda byla úspěšná a poslední onemocnění pravými neštovicemi bylo zaznamenáno u somálského kuchaře Maliho již v roce 1977.

Metoda aktivní epidemiologické surveillance jako zcela nová koncepce vymýcení pravých neštovic pak byla přijata valným shromážděním WHO za jednu ze základních metod práce na poli epidemiologie přenosných nemocí a je dodnes uznávanou metodou veřejného zdravotnictví.

V letošním roce již uplynulo 30 let od potvrzení celosvětové eradikaci neštovic, které bylo oficiálně vyhlášeno WHO v roce 1979. Na eradikaci se však podílelo pod vedením profesora Rašky i dalších dvacet českých a slovenských epidemiologů a virologů. Světová zdravotnická organizace dodnes jejich práci oceňuje. Eradikace varioly je nejuspěšnější a svým způsobem ojedinělá akce v celé historii WHO.

Karel Raška a pravé neštovice Vladimír Zikmund

Aktivní účastník intenzivního programu eradikace pravých neštovic SZO v celém jeho průběhu

Po krátké praxi na Vojenské lékařské akademii v Hradci Králové jsem se stal shodou několika náhod epidemiologem v Liberci. Tak jsem byl od počátku odborné praxe trvale v kontaktu s předním epidemiologem profesorem Raškou. On mne posléze navrhl a prosadil do Světové zdravotnické organizace (SZO) do Afriky.

Raška, který byl od roku 1963 ve významném postavení v SZO, se ihned po příjezdu do Ženevy ujal konsolidace do té doby roztříštěných snah o eradikaci varioly (EV) a přivedl do SZO několik předních československých epidemiologů, kteří ještě před rokem 1972 na různých místech světa významně a rozhodujícím způsobem zasáhli do jejího průběhu. Zajistil plynulou finanční, materiální i personální pomoc USA a SSSR i doplnění výhradně používaného očkování využitím všech prvků surveillance, zejména aktivního vyhledávání ohnisek náказы a jejich systematické likvidace napříč světadíly.

Raška však nejdříve musel překonat nedůvěru předních odborníků jak v samotné SZO, tak v některých nejvíce postižených zemích. Také spočítal, že EV je vysoce efektivní,

neboť odpadnou vysoké náklady na celosvětovou prevenci.

Intenzivní fáze eradikace varioly v letech 1967 až 1977, kterou Raška naprogramoval a po všech stránkách zajistil, byla úspěšně dovršena.

Karel Raška patřil k významným představitelům pražského jara. Po přepadení ČSR Sovětským svazem v roce 1968 ostře protestoval i na mezinárodním fóru. Po návratu do ČSR mu byla komunistickými činiteli veškerá vědecká činnost omezena až nakonec zakázána. Raška se ocitl v domácím exilu, ale odmítl odchod do zahraničí. Od té doby se šíří světem i českou krajinou ticho o Karlu Raškoví a objevují se na jeho místě jiné postavy, které se o EV ve světě také zasloužily.

Skvrnitý tyfus v Terezíně – retrospektiva epidemie a poučení pro současnost

Josef Trmal
KHS Ústeckého kraje

Skvrnivka provází zejména válečné konflikty. Poslední velká epidemie tohoto onemocnění na území Čech proběhla koncem druhé světové války v Malé pevnosti a městě Terezín, terezínském ghettu. První případy onemocnění se objevily již koncem roku 1944, počet případů narůstal a začátkem měsíce května 1945 epidemie kulminovala. Situaci značně zkomplikovala snaha německého vedení věznic vyšetřit skvrnivku utajit. Negativním momentem byl příliv nových vězňů, mnohdy vězňů se skvrnivkou, z evakuovaných koncentračních táborů do města Terezín. Absence účinných protiepidemických opatření, vyčerpanost a podvýživa vězňů se odrazila na nemocnosti a smrtelnosti mezi vězni. První šetření epidemiologické situace na místě provedl dr. Raška 2. května 1945. Následně 4. května 1945 dorazila do Terezína kolona České pomocné akce, která přivezla potřebný zdravotnický personál a materiál. Zavlečením skvrnivky do přelidněného města Terezín zde s určitým zpožděním také došlo k rychlému vzplanutí epidemie. Díky rozhodnutí v realizaci protiepidemických opatření zahrnující zejména důslednou karanténu a odvěšivení všech osob se podařilo epidemii zvládnout. Celkový počet onemocnění není přesně znám, ale pohybuje se pravděpodobně okolo 5000. Smrtelnost, pokud bylo možné z evidovaných případů zjistit, byla vysoká – 22,95 %. Epidemie prokázala, že i tak hroznivé nákazy, jakou je skvrnivka, je možné řešit důslednou realizací protiepidemických opatření. Epidemie byla vyřešena díky nesmírnému úsilí všech zdravotníků a mnohdy i za cenu nejvyšší – za cenu vlastního života.

Surveillance invazivního pneumokokového onemocnění

Pavla Křížová
Státní zdravotní ústav, Praha

S objevením konjugovaných pneumokokových vakcín se pozornost mezinárodních organizací, jako jsou WHO (World Health Organisation), PACE (Pneumococcal Awareness Council of Experts) a ECDC (European Centre for Disease Prevention and Controls), zaměřila na provádění kvalitních programů surveillance invazivních pneumokokových onemocnění, na jejichž základě by bylo možno určit vakcinační strategii a sledovat její účinnost.

Celorepublikový program surveillance invazivních pneumokokových onemocnění (IPO) byl v České republice zahájen v lednu 2008, v roce 2007 probíhala pilotní studie surveillance, v letech 2000–2006 studie Národní referenční laboratoře pro streptokoky a enterokoky SZÚ. Celková nemocnost IPO byla 2,9/100 000 obyvatel v roce 2007 a 3,3/100 000 v roce 2008. V letech 2000–2006 se pohybovala v rozmezí 2,3–4,3/100 000. Nejvyšší specifická věková nemocnost IPO byla v průběhu surveillance zaznamenána

u dětí 0–11měsíců (11,4 a 15,7/100 000), u dětí 1–4 roky (8 a 5,7/100 000) a u osob nad 65 let (6,3 a 6,5/100 000). Celková smrtelnost dosahovala 21,4 % v roce 2007 a 15,9 % v roce 2008. Specifická věková smrtelnost IPO v průběhu surveillance byla u dětí 0–11 měsíců 7,7 % a 11,1 %, u dětí 1–4 roky 18,7 % a 4,3 %. Pokrytí sérotypů pneumokokovými vakcínami bylo hodnoceno za období 2000–2008. Ve dvou nejmladších věkových skupinách (0–11 měsíců a 1–4 roky) bylo pokrytí sérotypů konjugovanými vakcínami podstatně vyšší než u dospělé populace (40–64 roků a nad 65 let). U dětí 0–11 měsíců dosahovalo pokrytí 7-valentní konjugovanou vakcínou (PCV-7) 61,6 %, 10-valentní konjugovanou vakcínou (PCV-10) 70,7 % a 13-valentní konjugovanou vakcínou (PCV-13) 78,7 %. Sérotypy zjištěné u dětí 1–4 roky byly zastoupeny v PCV-7 v 63,4 %, PCV-10 v 71,9 % a PCV-13 v 85,6 %. U pacientů nejvyšších věkových skupin pokrytí sérotypů dosahovalo hodnoty nad 60 % až u PCV-13. Zjištěná data nemocnosti a smrtelnosti v České republice jsou srovnatelná s předvakcinačními hodnotami uváděnými v Evropě.

Většina evropských zemí zařadila pneumokokovou konjugovanou vakcínu do národního imunizačního schématu malých dětí, v souladu s doporučením WHO, PACE a ECDC. Zařazení pneumokokové konjugované vakcíny do národního imunizačního programu v České republice je plánováno od ledna 2009. Je žádoucí pokračovat v programu surveillance, což umožní sledovat účinnost vakcinace a eventuální změnu sérotypů.

Surveillance klíšťové encefalitidy v České republice

Bohumír Kříž^{1,2}, Milan Daniel¹, Vlasta Danielová¹,
Čestmír Beneš¹

¹Státní zdravotní ústav, Praha

²Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta

Virus KE byl izolován v Českých zemích v roce 1948 (z klíšťat *Ixodes ricinus* i z pacientů) nezávisle ve dvou oblastech Čech (Berounsko) a Moravy (Vyškovsko). V roce 1951 proběhla velké epidemie KE na jihovýchodě Slovenska (Rožňava). Od té doby je KE povinně hlášena. Od roku 1971 byly dle nařízení MZ hlášeny pouze laboratorně ověřené případy. K dispozici je tedy dostatečně dlouhá časová řada pro pozorování dlouhodobých změn výskytu této infekce. V šedesátých a sedmdesátých letech 20. století se nízké a vyšší hodnoty incidence nepravidelně střídaly v 3–5letých intervalech mezi 1,7/100 000 a 5,9/100 000. Období osmdesátých let se vyznačovalo celkově nižší incidencí než předešlé, s hodnotami mezi 1,4/100 000 a 3,4/100 000. V devadesátých letech došlo k rychlému vzestupu nemocnosti, který kulminoval v roce 1995 (7,2/100 000) a v roce 2006, kdy bylo dosaženo nejvyšších hodnot incidence za celé sledované období (10,0/100 000). V roce 2008 bylo hlášeno 633 případů onemocnění (6,1/100 000). V devadesátých letech postupně došlo ke změně charakteru věkové specifické nemocnosti. Nemocnost měla původně v dětských a adolescentních skupinách vzestupný trend, který byl ukončen v první věkové skupině dospělých a pak setvával, s malými výkyvy, na téměř stejných hodnotách do věkové skupiny 60letých a následně klesal. V současnosti má křivka trendu specifické nemocnosti dvouvrcholový tvar s maximy ve školním věku a ve skupině starších dospělých. Nemocnost mužů KE je tradičně vyšší než žen (1,5 × 1,0).

Výskyt onemocnění KE je výrazně ovlivňován klimatickými faktory především teplotou, působením na:

1. biologii klíštěte *Ixodes ricinus* a jeho rozšíření v přírodě,
2. replikaci viru KE v klíštětech a rezervoárových hlodavcích,
3. lidské chování. KE je v České republice onemocnění související úzce s rekreačními aktivitami osob, které jsou také ovlivňovány klimatickými faktory.

Křivka sezonního výskytu v minulosti kulminovala vždy v letních měsících. V devadesátých letech se objevil nový fenomén. V některých letech byl detekován druhý, menší vrchol nemoci v podzimních měsících.

K zvýraznění tohoto jevu došlo v roce 2006, který byl výjimečný nejenom vysokou incidencí KE, ale i nejvyšším zaznamenaným vrcholem v podzimním období roku. Klimatické podmínky v průběhu zimních měsíců let 2004–2005 a 2005–2006 a v první polovině roku 2006 byly neobvykle příznivé pro vývoj a přežívání klíšťat *Ixodes ricinus*, jejichž vývoj z vajíčka v dospělce trvá v našich podmínkách průměrně dva až tři roky. Dostatek vláhy v březnu a srpnu a nadprůměrné teploty během ostatních měsíců roku zajistily nejenom vhodné podmínky pro vývoj klíšťat, ale i pro neobvykle intenzivní růst hub, což se projevilo samozřejmě vyšší návštěvností ohnisek, přetrvávající až do podzimních měsíců. Jednou z příčin vysokého výskytu byly tedy i rekreační aktivity české populace.

Od začátku devadesátých let do současnosti je pozorován posun výskytu jak klíšťat, tak i nemoci, do vyšších nadmořských poloh. To se týká nejenom horských oblastí Krkonoš a Šumavy, ale i celých regionů. K nejvyššímu vzestupu došlo v kraji Vysočina, kde incidence dosáhla 20,5/100 tisíc.

Trvalé odkazy a aktuální výzvy v boji proti virovým hepatitidám

Jozef Dlhý^{1,2}, Jitka Částková²

¹KHS Královéhradeckého kraje

²Státní zdravotní ústav, Praha

Virovým hepatitidám náleží v oblasti infekční epidemiologie zcela právem výjimečné postavení. Tato poměrně heterogenní skupina nálezů s častokrát velice podobným klinickým obrazem, vyznačující se různorodostí etiologických agens a ve většině případů odlišnými epidemiologickými charakteristikami, představuje pravděpodobně nejcitlivější epidemiologický indikátor změn, kterými prochází novodobá společnost.

Přestože byly základy vědeckých poznatků o infekční povaze virových hepatitid vytvořeny již koncem 19. století, společnost musela ještě řadu následujících desetiletí čelit rozsáhlým epidemiím virové hepatitidy A, souvisejících s negativními dopady válečných konfliktů a nízkou úrovní znalostí o adekvátních protiepidemických opatřeních. Od doby, kdy byly během 2. světové války v okupovaných Čechách zaznamenány první zdokumentované epidemické výskyty virové hepatitidy A, do doby, kdy bylo možné v našich podmínkách začít poprvé pracovat s potřebnými vědecky podloženými statistickými údaji, uplynula relativně velice krátká doba. Díky nadčasovému vnímání a důraznému prosazování metod komplexního přístupu, který již v té době odpovídal surveillance, byly profesorem K. Raškou a jeho spolupracovníky poprvé provedeny analýzy epidemií virové hepatitidy A v letech 1950–1951. Výsledky těchto analýz umožnily nejenom formulaci účinných protiepidemických opatření, ale zároveň upozornily na velice těsné vztahy mezi nedostatečným personálním pokrytím v oboru epidemiologie a mezerami v protiepidemické práci zdravotnické služby. Protiepidemická opatření v ohniscích virové hepatitidy, formulovaná podle algoritmů vytvořených na základě bohatých terénních zkušeností během 2. světové války a v období následujícím profesorem Raškou, se stala odborným pilířem pro práci generace jeho žáků a dalších následovníků. Prostor pro uplatnění těchto poznatků v České republice v dalším období rozhodně nechyběl. Koncem sedmdesátých let 20. století byla řešena rozsáhlá epidemie virové hepatitidy A v souvislosti s konzumací produktů vyrobených z jahod polského původu a v návaznosti na zdokonalování poznatků v oblasti virologie a pokroky při výrobě očkovačích látek byla v souladu s doporučeními Světové zdravotnické organizace

začátkem osmdesátých let 20. století zahájena aktivní imunizace proti virové hepatitidě B u zdravotníků, která byla v dalším období postupně rozšířena o další profesně rizikové skupiny a završena zavedením plošného očkování novorozenců a dvanáctiletých dětí v roce 2001. Vytvoření podmínek pro očkování proti virové hepatitidě A začátkem devadesátých let znamenalo další významný pokrok v možnostech prevence šíření nákazy především v prostředí sociálně rizikových vrstev obyvatelstva.

Zpětný pohled na aktivity epidemiologů, mikrobiologů a klinických lékařů, vyplývající z potřeb řešení někdy velice obtížných situací spojených s výskytem virových hepatitid ukazuje, že v České republice prozatím stále existuje potenciál pro uplatňování zásad epidemiologické metody práce, jejichž základy byly vytvořeny profesorem Raškou.

Je důležité, aby tento potenciál nedostal dalších nepříznivých změn, které by v podmínkách dynamicky se měnící globální společnosti mohly znamenat snížení úrovně a efektivity surveillance se všemi logickými důsledky.

Surveillance rotavirových infekcí

Petr Pazdiora

Ústav epidemiologie LF UK, Plzeň

První izolace a úspěšný přenos rotaviřů se pravděpodobně podařil u telat v roce 1943, v roce 1973 byly tyto viry poprvé prokázány v lidském duodenálním biotickém materiálu. V Československu byla diagnostika těchto infekcí zaváděna již na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let 20. století v Praze a Bratislavě. Údaje o počtech těchto nákaz a jejich celostátním významu nebyly v té době k dispozici.

Vzhledem k zavedení diagnostiky rotavirových infekcí v osmdesátých letech minulého století v Plzni a dlouhodobému zájmu o jejich sledování byly získány nejen první poznatky o jejich místním významu v etiologii hospitalizovaných gastroenteritid, ale i o jejich úloze v etiologii nozokomiálních nákaz. Postupně se údaje o této naze začaly objevovat i v celostátním informačním systému hygienické služby EPIDAT. Koncem devadesátých let byly zformulovány základy mikrobiologické surveillance rotavirových infekcí, která je v současnosti nejpřesnějším zdrojem o výskytu těchto nákaz v různých částech republiky – údaje jsou získávány každoročně až z 83 diagnostických laboratoří. V EPIDATu jsou v současnosti údaje o 75 % laboratorně potvrzených infekcí, pravidelně se zde objevují zdokumentované rotavirové epidemie gastroenteritid nejen v dětských kolektivech, ale i v zařízeních sociální péče. Každoročně dochází v období leden až duben k sezonnímu nárůstu těchto infekcí. Zatímco u sporadických onemocnění získaných v populaci převládají onemocnění u dětí ve věkové skupině 7–36 měsíců, nozokomiální infekce postihují především kojence do 6 měsíců. Závažnou komplikací je zejména dehydratace, která často vede i k hospitalizaci, resp. rehospitalizaci. Podle plzeňských údajů z let 1995–2008 je každé 25. dítě do svých 5. narozenin hospitalizováno s rotavirovou nálezou. Na základě celostátních laboratorních dat lze odhadnout, že v roce 2008 bylo hospitalizováno v této věkové skupině kvůli rotavirové gastroenteritidě 4066 dětí, 32 528 jich bylo ošetřeno ambulantně. Úmrtí v tomto roce nebylo hlášeno.

V řadě zemí, zejména v Severní a Jižní Americe, Asii i Evropě stoupá každoročně proočkovanost proti rotavirovým infekcím. Dokumentován je pokles nemoci, snížené počty hospitalizovaných dětí. V České republice je zájem o očkování zatím minimální, proočkovanost je nižší než 1%. Proočkovanost i v okolních středo- a ve východoevropských zemích je významně vyšší (např. na Slovensku v roce 2008 byla udávána 9% proočkovanost). Pro zlepšení situace je nutné nejen zvyšování informovanosti rodičů o tomto účinném preventivním opatření, ale především jeho aktivní propagace všemi praktickými lékaři pro děti a dorost.

Surveillance tetanu v České republice

Vladimír Janout

Národní referenční laboratoř pro tetanus
Ústav preventivního lékařství LF UP, Olomouc

Příspěvek se zabývá řešením hlavních problémů, které se v rámci surveillance tetanu objevily v České republice.

Zdůrazňuje významnou úlohu prof. MUDr. Karla Rašky, DrSc., který již na počátku šedesátých let minulého století vypracoval principy surveillance a její aplikace při řešení opatření proti infekčním nemocem v České republice.

Také u tetanu byly v rámci surveillance řešeny následující problémy:

- problematika onemocnění tetanem u řádně očkovaných osob,
- problematika imunity proti tetanu u starších osob,
- rychlá sérologická diagnostika přítomnosti protilátek proti tetanu.

Je uveden příklad rozhodování podle principů medicíny založené na důkazu.

Příspěvek uvádí, že se v rámci surveillance tetanu v České republice podařilo vyřešit všechny problémy související s výskytem tetanu a imunitou proti této infekci. Proto je možno konstatovat, že tetanus je v České republice eliminován.

Surveillance akutních respiračních infekcí virového původu v České republice

Martina Havlíčková, Jan Kynčl

Státní zdravotní ústav, Praha

Respirační infekce představovaly odedávna významný zdravotnický problém. Po první izolaci chřipkového viru v roce 1933 a úspěšných pokusech s protichřipkovou vakcínou byla chřipka jako jedna z prvních **preventabilních** respiračních virových infekcí zahrnuta mezi infekce, které Světová zdravotnická organizace začala v celosvětovém měřítku sledovat. Mezinárodní monitoring cirkulace chřipkových virů začala Světová zdravotnická organizace postupně budovat od roku 1948. Národní referenční laboratoř pro chřipku byla ve Státním zdravotním ústavu oficiálně zřízena v roce 1956, nicméně již od roku 1951 se virologické oddělení z popudu prof. Rašky problematikou respiračních viróz zabývalo. Vedením nové laboratoře byla pověřena dr. Běla Tůmová. V roce 1956 se v laboratoři podařilo izolovat do té doby zcela neznámý chřipkový virus z respiračního sekretu koní, u nichž způsoboval onemocnění známé dříve jako Hoppengardenský kašel. Tento mimořádný úspěch měl mezi světovými virology velký ohlas a virus pod jménem A/equi/Prague 1/56 je dodnes uváděn ve všech světových sbírkách.

Postupně se sledování respiračních virových patogenů v České republice rozšířilo od chřipky na celou řadu dalších respiračních virů. Sledování bylo víceméně plošné s četným sběrem klinického materiálu (nazofaryngeálního sekretu a krevních vzorků). Virologický program pak logicky doplňoval sledování počtu nemocných s akutní respirační infekcí podle definovaných diagnóz. NRL pro chřipku se dlouhodobě zabývala i ekologií chřipkového viru a velmi těsně spolupracovala s veterinárními odborníky. Program epidemiologické bdělosti v oblasti chřipky a dalších respiračních virů byl plně vybudován na základech, jejichž nosná pravidla a principy byly dány filozofií epidemiologické školy prof. Rašky, který každou nákazu považoval za komplexní jev vyžadující logické propojení medicínského i přírodovědného přístupu a pohledu na věc. Současná praxe již neumožňuje plošný sběr klinických vzorků, avšak ve spolupráci s řadou kolegů v terénu se během posledních 5 let podařilo vybudovat síť spolupracujících praktických lékařů, kteří se podílí na systematickém sběru klinického materiálu a byl tak vytvořen základ pro sentinelový systém sběru virologických dat. Tento program zaštiťuje hlavní hygienik ČR, který jej také každý rok

oficiálním pokynem zahajuje. V NRL pro chřipku a v NRL pro nechřipkové respirační viry je v programu virologické surveillance každý rok vyšetřeno 500–1000 klinických vzorků.

V roce 1998 byla NRL pro chřipku v SZÚ jako jedna z prvních evropských laboratoří „východního bloku“ přizvána do programu EISS (European Influenza Surveillance Scheme) a v současné době je plně začleněna do programu, který koordinuje Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC).

Surveillance a bakteriální střevní infekce

Petr Petráš

Státní zdravotní ústav, Praha

Bakteriální střevní infekce jsou nejčastěji vyvolány konzumací potravin kontaminovaných bakterií, či enterotoxinem, které tyto bakterie produkují.

Ročně je v České republice dokumentováno několik tisíc až desítek tisíc případů těchto onemocnění. Je jim proto věnována velká pozornost všech profesí zdravotnických pracovníků. NRL pro salmonely, vedena dr. Dobromilou Matějovskou a NRL pro shigely, kterou vedla dr. Eva Aldová, byly také mezi prvními Národními referenčními laboratořemi, které prof. Karel Raška v roce 1957 založil. V současnosti je v České republice, podobně jako v západní Evropě, nejčastější střevní bakteriální infekcí kampilobakteriáza, která v roce 2007 vystřídala do té doby nejčetnější salmonelózy. V roce 2008 bylo v EPIDATu hlášeno 20 175 kampilobakterióz a 11 009 salmonelóz. Ve stejném roce bylo registrováno i 229 případů vysoce infekčního onemocnění, kterým jsou shigelózy (bakteriální úplavice).

Stafylokoková enterotoxikóza, jako nejčastější alimentární intoxikace, je způsobena enterotoxinem, který produkuje řada kmenů druhu *Staphylococcus aureus*. Ročně je evidováno a diagnostikováno několik epidemií.

V poslední době se pozornost soustřeďuje i na enterohemoragické kmeny *Escherichia coli* (EHEC). Tyto velice nebezpečné bakterie vyvolávají hemoragické kolitidy, které mohou u malých dětí progredovat v systémové onemocnění, hemolyticko-uremický syndrom (HUS). Ten je hlavní příčinou akutního renálního selhání u malých dětí, v těžkých případech s letálním koncem. V letošním roce bylo v NRL pro *Escherichia coli* a shigely dosud diagnostikováno 5 kmenů EHEC od dětí hospitalizovaných s HUS včetně jednoho úmrtí dvouleté dívky.

Bakteriální střevní infekce stojí v popředí zájmu i Evropského centra pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC). Česká republika jako členská země EU je povinna vykazovat tato onemocnění do systému TESSy (The European Surveillance system). K řádnému plnění těchto povinností je nezbytná všestranná spolupráce epidemiologů, mikrobiologů, ošetřujících lékařů, ale též veterinářů.

Globální epidemie HIV/AIDS – historie a současnost

Marie Brůčková

Státní zdravotní ústav, Praha

Globální epidemie HIV/AIDS je výzva, kterou už, bohužel, nemohl prof. MUDr. Karel Raška, DrSc. přijmout. Jinak by byl určitě ve středu dění a zcela jistě by zásadním způsobem ovlivnil řešení pandemie AIDS.

Proč se nedaří ani po téměř 30 letech soustředěného úsilí vyřešit problém HIV/AIDS a proč pandemie s neztenčenou silou decimuje světovou populaci?

Proč onemocnění popsané poprvé v roce 1981, jehož virový původce byl objeven v roce 1983, není dosud možno úspěšně vyléčit? Proč dosud neexistuje specifická profylaxe ve formě úspěšné vakcíny? Mnoho otázek, málo odpovědí.

Vznik onemocnění AIDS, prvenství objevu jeho původce, stanovení zdroje nákazy a způsob jejího přenosu provází

řada nejasností až mystérií. Široce založená evropská surveillance HIV/AIDS řízená zkušenými evropskými pracovníky z Paříže od roku 1983 jako jedna z nejlépe propracovaných sítí (networks) objasnila řadu epidemiologických parametrů této nákazy, výskytu a šíření HIV/AIDS však nedokázala zabránit. Je prokázáno, že zdrojem původce nákazy jsou opice Starého světa, jedná se tedy prakticky o zoonózu. Za objev vyvolavatele AIDS, RNA viru HIV, získali v minulém roce francouzští virologové z Pasteurova ústavu, Françoise Barré Sinoussi a Luc Montagnier, Nobelovu cenu. Zcela opomenuti přitom zůstali američtí virologové (R. Gallo a v té době v USA pracující československý vědec M. Popovič), kteří prakticky současně s francouzským pracovištěm izolovali a podrobně analyzovali virového původce AIDS. Bohužel, jak bylo později prokázáno, ke konstrukci prvního laboratorního diagnostika použili virus francouzský. I když byli očistěni z podezření úmyslného podvodu, určitý stín na jejich profesní kariéře to zanechalo, a to se projevilo zřejmě i při udělení Nobelovy ceny. Boje o prvenství ve vědeckých idejích a objevech nejsou zase až tak výjimečné, jak by se mohlo zdát. A ne vždy je oceněn ten s největšími zásluhami. Prof. K. Raška a eradikace varioly jsou toho také dobrým příkladem.

V současné době se HIV šíří v lidské populaci z 80–90 % sexuální cestou, a to jak homosexuální tak heterosexuální (posttransfuzní nákazy byly po zavedení masového screeningového testování krevních dárců prakticky vyloučeny). Vysoce ohroženou populační skupinou zůstávají však, zvláště v některých regionech východní Evropy, injekční uživatelé drog. A zde je jedno z vysvětlení neúčinnosti preventivních opatření při nedostupnosti specifické vakcíny. Jedná se totiž o nutnost behaviorálních změn a jejich prosazování v oblasti sexu a zneužívání drog je velmi obtížné.

Proč dosud nebyla zkonstruována účinná anti HIV vakcína? Plyne to především z unikátní povahy viru HIV. Uplatňují se zejména enormní mutagenost HIV a zcela jiné imunitní mechanismy, než bývají obvyklé u běžných virových infekcí. Řada vyvinutých a experimentálně použitých HIV vakcín sice vyvolala tvorbu protilátek, ale těmto protilátkám chyběl protekční charakter. V oblasti anti HIV se nabízí řada nejrůznějších přístupů, které zde nelze rozebírat, a je jen nutno věřit, že některý z nich přinese konečné řešení. Bohužel se však po počátečním entusiasmu objevují názory renomovaných světových imunologů a virologů, kteří skepticky tvrdí, že efektivní anti HIV vakcína nebude nikdy zkonstruována. Jsem přesvědčena, že s těmito závěry by profesor K. Raška nikdy nesouhlasil.

Symposium „Surveillance a budoucnost epidemiologie“ bylo zorganizováno 1. LF UK v Praze a Společností pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP ve spolupráci se Státním zdravotním ústavem a 3. LF UK v Praze. Organizace symposia byla umožněna díky laskavé podpoře poskytnuté firmami Edlin s.r.o., Fei Europe B. V., Mikro spol. s r.o. a Olympus Czech Group s.r.o., veliký dík patří firmě GlaxoSmithKline, s.r.o. jako hlavnímu sponzorovi.

prof. MUDr. Ivan Raška, DrSc.

Molekulární epidemiologie tuberkulózy

Milan Kubín

Hygienická stanice hlavního města Prahy

Metody molekulární genetiky završily snahy o poddruhové členění komplexu *Mycobacteria tuberculosis*, které se pak v zásadním rozsahu uplatnilo v epidemiologii tuberkulózy. Triviální název DNA fingerprinting používaný pro nejčastěji používané techniky svědčí o vysokém stupni individualizace jednotlivých klonů mykobakteriálních populací, jejichž detekce se promítla nejen při průkazu přenosu tuberkulózy mezi zdrojem infekce a infikovanými jedinci, ale také při studiu šíření tuberkulózy v populaci, v geografických rozdílnostech mykobakteriálních populací, jejich specifických vlastnostech – jako např. virulenci a citlivosti na antituberkulotika apod.

Metodu RFLP založenou na detekci specifické insertivní sekvence IS6110 v restričních fragmentech genomu *Mycobacteria tuberculosis* jsme použili pro charakterizaci mykobakteriálních populací vylučovaných nemocnými s tuberkulózou v Praze, v jihomoravském a severomoravském regionu, při průkazu mikroepidemií tuberkulózy v oblasti nízké prevalence tuberkulózy v jihomoravském kraji, při průkazu šíření multirezistentní tuberkulózy, u vězňů s tuberkulózou a při ověřování profesionální infekce tuberkulózou.

Technika spoligotypizace využívající polymorfie přímých repetitivních sekvencí založená na průkazu hybridizace specifických spacerů v souboru 43 oligonukleotidů byla uplatněna při analýze 230 izolátů *Mycobacteria tuberculosis* z Prahy a jihomoravského regionu. Hlavním poznatkem této studie byl průkaz kmenů skupiny *Beijing* izolovaných od nemocných z jihovýchodní Asie, která je endemickou oblastí tohoto genotypu. Výsledky spoligotypizace 393 českých kmenů byly také zařazeny do rozsáhlé srovnávací mezinárodní studie více než 39 000 izolátů komplexu *Mycobacteria tuberculosis* ze 122 zemí cílené na geografické rozšíření jednotlivých genotypů.

Využití metod DNA fingerprintingu komplexu *Mycobacteria tuberculosis* a zejména jejich novější automatizované techniky se staly v řadě evropských států integrální součástí národních programů kontroly tuberkulózy. Dokumentují především přenos tuberkulózy mezi zdrojem infekce a infikovanými jedinci, a doplňují tak dřívější tradiční metody sledování kontaktů, dovolují také sledovat genetickou strukturu původce tuberkulózy v populaci a umožňují identifikovat import dříve neznámých mykobakteriálních klonů ze vzdálených geografických oblastí.

Pozdravný dopis dr. Halfdana Mahlera, bývalého Generálního ředitele SZO

Professor Ivan Raska

Institute of Cellular Biology and Pathology
First Faculty of Medicine, Charles University of Prague

October 20, 2009

Dear Professor Ivan Raska,

I realize that your father would pass his 100th birthday anniversary on the 17th of November 2009.

Living in an intimate intellectual dialogue with your father in WHO Geneva I could follow his many intense endeavours to promote WHO's investment in Communicable Diseases in general and in Surveillance and Smallpox Eradication in particular. He succeeded inter alia in the establishment of two new independent Units within the Communicable Diseases Division, that of Surveillance and that of Smallpox Eradication. After a long, difficult struggle, WHO decided to send him to USA to negotiate with its Government an intensification of the Global Smallpox Eradication campaign. To WHO HQs great surprise he returned to Geneva with a great victory: the USA's Government would fully support WHO with an acceleration of the Global Smallpox Eradication Programme and its related Surveillance Programme. And so, some 10 years later WHO could declare Smallpox for globally eradicated! In my personal opinion WHO - including your father - deserved a Nobel Prize for that extraordinary accomplishment!

With my warmest thoughts
Halfdan Mahler

Sjezdy

XXV. lékárnické dny

Litoměřice, 3.–5. října 2009

Tradiční každoroční odborné setkání lékárníků celé republiky zavítalo tentokrát do severočeských Litoměřic. Prvním stěžejním tématem byla farmakoterapie nemocí v dětském věku. Pozváni byli renomovaní řečníci. První přednášku o fyziologických funkcích dětského organismu přednesl s nadhledem sobě vlastním brněnský fyziolog doc. MUDr. Z. Wilhelm. Doc. MUDr. J. Hoza z 1. LF UK v Praze nás provedl úskalími léčby lékem u dětí. Reaktivita dětského či dospívajícího organismu na léčivo bývá mnohdy dosti odlišná od reakce dospělých. Doc. Vilma Marešová, přednostka infekční kliniky nemocnice na Bulovce, přednesla přehled antibiotik užívaných v pediatrii a jejich vhodný výběr, indikace a správné dávkování. MUDr. L. Škvorová z dětské kliniky Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem přednesla společné sdělení se svým otcem na téma endokrinní onemocnění v dětském a adolescentním věku a jejich správné léčení. Dopolední blok uzavřela MUDr. K. Jarošová přehledovou přednáškou o dětských revmatických nemocech a jejich adekvátní léčbě.

Druhým nosným tématem, které se vinulo zbývající programem, byla všehochuť ze současné farmacie a lékárenství. Čestný člen České farmaceutické společnosti ČLS JEP, pan profesor J. Květina přednášel o posledních výsledcích svého výzkumného týmu, který využívá k pokusům kapslovou endoskopii a podobné diagnostické metody k monitorování léčiva v předklinickém zkoušení. PharmD. P. Škvor seznámil posluchače s novinkami v legislativě postgraduálního vzdělávání. Volně na něj navázal Mgr. J. Kotlář s komentářem k současnému stavu specializačního vzdělávání lékárníků a farmaceutických asistentek. PharmDr. Z. Sklenář pak podal přehled rizikových léčiv v pediatrické dermatologické receptuře. Otáz-

ku jak spolupracovat ve veřejné lékárně s nutriční terapeutkou, zodpověděl v závěrečné přednášce sobotního programu PharmDr. P. Krpálek.

Sobotní program se skládal již jen ze tří sdělení. Zamyšlení nad budoucností veřejných lékáren si připravil Mgr. M. Hampel, I. Slaninová nás seznámila s možnými perspektivami lékárnických aliancí a PharmDr. L. Chudoba se zamyslel nad rolí lékárny z pohledu lékové politiky Svazu zdravotních pojišoven.

Na konci odborné části proběhla panelová diskuze za účasti Mgr. St. Havlíčka, prezidenta České lékárnické komory (ČLeK) a dopoledních přednášejících. Nesla se v duchu stále nedořešených problémů lékárníků jak směrem ven, tak směrem dovnitř.

Celá akce byla velmi dobře připravena jak po stránce odborné, tak společenské. Úvodní večer nám zpříjemnil jazz band pana Růžičky z Litoměřic složený ze žáků LŠU. Hráli k tanci i poslechu. Uvítací večer navodil skvělou atmosféru. Nepřekonatelný však nadlouho zůstane společenský večer v sobotu 3. října, kdy se všichni účastníci lékárnických dnů stali posádkou výletní lodi Porta Bohemica 1, která brázdila vody Labe do pozdních nočních hodin. Při příjemné hudbě, dobrém jídle i moku (pivo, burčák, víno) se lékárníci rozšoupili na tuto profesní skupinu až nevidaně. Potřebovali jistě zapomenout na spoustu starostí všedního dne, které jejich práci stále znepříjemňují. To se, myslím, ve třech dnech strávených v krásných Litoměřicích podařilo.

PharmDr. Pavel Grodza
1. místopředseda ČFS ČLS JEP
e-mail: panacea@iol.cz

VII. Ningerovy dny

Luhačovice, 9.–10. října 2009

Ve dnech 9. a 10. října 2009 se v Luhačovicích konaly VII. Ningerovy dny pořádané Klinikou dětské ORL LF MU a FN Brno. Jako hlavní témata byla probírána problematika spánkové medicíny a poruch čichu a chuti.

První den jednání byly v odpoledním bloku předneseny přednášky, které se zabývaly problematikou spánkové medicíny. Celý blok přednášek pátečního odpoledne byl připraven a moderován dr. Martinou Ondrovou z Kliniky dětské ORL LF MU a FN Brno. První přednáška podala základní přehled problematiky a v dalších dvou pneumolog J. Vyskočilová a neurolog M. Moráň přednesli diagnostiku a terapii poruch spánku z pohledu příslušných oborů. Přednáška doc. J. Plzáka z FN v Motole prezentovala možnosti chirurgické léčby poruch spánku a spánkové apnoe a přednáška M. Pretla z VFN Praha zahrnovala pohled neurologa na možnosti léčby. Závěrečné tři přednášky T. Pniaka, R. Minaříka a V. Pavelece

demonstrovaly zkušenosti autorů s přístupem k léčbě ronchopatie a problematiky poruch spánku. Ve druhé části odpoledne byly předneseny přednášky o spánkové medicíně v dětském věku: M. Máchalová Brno, I. Příhodová – neurologická klinika 1. LF UK Praha. M. Ondrová z Brna, P. Švecová ze Svitav a J. Kraus z Benešova prezentovali své zkušenosti s operačními technikami při redukci objemu krčních tonsil u dětí.

Sobotní dopoledne bylo v první části věnováno problematice poruch chuti a čichu pod vedení J. Vodičky z pardubické ORL kliniky. Doc. E. Račeková ze Slovenské akademie věd úvodní přednáškou dokumentovala neurogenезi čichového systému za fyziologických a patologických podmínek. Kolegové J. Vodička, H. Jelínková a H. Gabrielová z pardubické ORL kliniky své přednášky soustředili na problematiku vyšetření čichu a chuti. Byly též probírány otáz-

ky poruch čichu po operacích nosu (P. Lukášek a A. Menšíková).

Diskuze se pak týkala klinického využití poznatků a algoritmů při vyšetření chuti a čichu různými metodami.

Poslední sobotní bok byl věnován variím a byl zde prezentován SusySafe Projekt, který se zabývá problematikou cizích těles u dětí. M. Černý a I. Bártová z Pardubic přednesli přednášky s námětem endoskopického vyšetření polykacích cest. Závěrečná přednáška M. Váňové z Luhačovic o reakci tonsil na lokální kortikoidy vyvolala bohatou mezioborovou diskuzi s protichůdnými názory a vysloveno doporučení pokračovat ve studii a zahrnout větší počet pacientů.

Společenská část se setkala s nadšeným ohlasem téměř 150 účastníků, při setkání u bohatého stolu, cimbálu a vybraných vín. V sálu Společenského domu byly kuloárně diskutovány odborné otázky i domlouvány schůzky do pozdních ranních hodin. Další Nigrovy dny jsou plánovány zase za dva roky.

*prof. MUDr. Ivo Šlapák, CSc.
KDORL LF MU a FN Brno
e-mail: islapak@fnbrno.cz*

Současný stav hormonální terapie patologií menopauzy

**Aktuální zpráva z 10. konference ČMAS ČLS JEP
a SOM ČGPS ČLS JEP
Špindlerův Mlýn, 16.–18. října 2009**

Ve dnech 16.–18. října 2009 se v hotelu Horal ve Špindlerově Mlýně konala 10. konference o menopauze, nazvaná Klimakterická medicína ke Světovým dnům menopauzy a osteoporózy.

Datum 18. říjen je tradičně uznáván jako Světový den menopauzy a 20. říjen jako Světový den osteoporózy. Myšlenka ustanovit Světový den menopauzy vzešla z Mezinárodní menopauzální společnosti (IMS), světové organizace založené v roce 1978. Výbor IMS každý rok vyzývá všechny národní menopauzální společnosti, aby tento den věnovaly velkou pozornost problémům menopauzy a rizikům, která milionům žen na celém světě přináší menopauza a s ní spojený estrogenní deficit. Každý Světový den menopauzy (od příštího roku Světový měsíc menopauzy) má svoji národní rovinu, v níž se k této akci připojuje i Česká menopauzální a andropauzální společnost ČLS JEP (ČMAS) a Sekce pro otázky menopauzy (SOM) ČGPS JEP. Obě naše menopauzální organizace oslavovaly v posledních několika letech Světový den menopauzy zcela mimořádným způsobem. K tomuto datu pořádaly svoje konference o menopauze. Byly to konference v Hradci Králové, Ostravě, Brně a Hradci nad Moravicí. Od roku 2008 se konference konají střídavě ve Slovenské a v České republice jako mezinárodní česko-slovenské akce ve spolupráci se Sekcí gynekologické endokrinologie a klimakteria Slovenské gynekologicko-porodnické společnosti SLS. V loňském roce se první společná konference konala v Popradu, letošní druhá ve Špindlerově Mlýně.

Prudké zhoršení počasí a silné sněžení v Krkonoších vedlo k obavám, zda se konference vůbec uskuteční a pokud ano, jestli na ni nakonec někdo přijede. Špindlerův Mlýn a Svatý Petr nás skutečně přivítaly závějem vysokými několika desítek centimetrů, vánoční scénérií a sněžením. Přesto dorazilo hodně účastníků, řada z nich i na letních pneumatikách. Odpadly pouze čtyři přednášky, z toho dvě autorů z Německa, kde kalamita byla ještě horší. Účast na konferenci byla nakonec velká, přednášky byly provázeny bohatou diskuzí a myslím, že všichni účastníci byli s úrovní a průběhem jednání spokojeni.

Po úvodních dvou přednáškách A. Doležala a J. Doležalové „Obrazy z dějin porodnictví“ a J. Donáta „Současný stav v léčbě patologií postmenopauzy“ následoval odborný program rozdělený do tematických bloků: perimenopauza,

návrh doporučení k hormonální léčbě, osteoporóza, alternativní možnosti řešení potíží spojených s přechodem, mamnologická problematika a volná sdělení. Satelitní sympozium firmy Bayer Schering Pharma, generálního sponzora konference, se týkalo otázek hormonální terapie, kardiovaskulárního rizika po menopauze a hormonální léčby a anti-concepce po čtyřicítce.

Za největší přínos konference považují vytvoření návrhu doporučení k hormonální léčbě, a to proto, že hormonální léčbu provází stále ještě mnoho neoprávněných obav, přičítá se jí i v lékařských kruzích hodně nežádoucích a negativních účinků, mezi gynekology i lékaři jiných oborů vládne strach z rakoviny, žilních trombóz, embolizací, gynekologové se bojí léčit osteoporózu atd. Přes jednoznačné závěry velkých randomizovaných studií, prokazujících významné snížení rizika všech zlomenin po estrogenní léčbě, estrogeny stále ještě oficiálně nejsou považovány za lék první volby u postmenopauzální osteoporózy. Při tvorbě doporučení pro hormonální léčbu ČMAS i SOM vycházely z doporučení IMS, publikovaných v roce 2004, 2007 a 2008 (1–3) a především z materiálů a prohlášení Severoamerické menopauzální společnosti (NAMS) (4). Tato společnost každý rok vydává a publikuje svoje prohlášení k hormonální léčbě, každý rok organizuje svoje konference o menopauze, vydává časopisy Menopause a Menopause Management a každý měsíc na internetu uveřejňuje svoje Flashes. Má bohatý vzdělávací a doškolovací program, každoročně ukončovaný zkušebními testy a udělením osvědčení k výuce a léčbě patologií menopauzy (5).

Návrh doporučení podle materiálů IMS přednesl na konferenci T. Fait. Panelová diskuze (J. Donát, J. Zahradková, M. Burdová, P. Koliba, T. Fait) pak bod po bodu přehodnotila všechny podstatné údaje doporučení a výsledkem je nové doporučení pro hormonální terapii na rok 2009/2010. Doporučení bude vedle Časopisu lékařů českých publikováno i v České gynekologii a v Klimakterické medicíně. Stane se základem pro doporučení a žádost o přehodnocení hormonální léčby ve vztahu k postmenopauzální osteoporóze na úrovni centrálních orgánů.

Nové doporučení je plně v souladu s nejnovějšími vědeckými poznatky a závěry a s prohlášeními NAMS (6).

DOPORUČENÍ ČMAS A SOM ČGPS ČLS JEP PRO HORMONÁLNÍ LÉČBU U ŽEN PO MENOPAUZE

I. Hormonální terapii (HT), a to u žen s dělohou estrogen-progestogenní (EPT) a u žen bez dělohy samotné estrogenu (ET), doporučujeme:

1. k léčbě klimakterického syndromu (vazomotorická symptomatologie);
2. k léčbě urovaginálních příznaků (urogenitální atrofizace sliznic) a při atrofizaci ostatních sliznic (především oka), při urovaginálních potížích preferujeme vaginální estradiol;
3. u předčasné (spontánní nebo arteficiální) menopauzy k prevenci osteoporózy a ischemické choroby srdeční. HT by měla být podávána nejméně do průměrného věku menopauzy (51 let).
4. k prevenci a léčbě postmenopauzální osteoporózy (léčba je vhodná zejména pro mladší ženy ve věku 50–59 let). Často současně léčíme i klimakterický syndrom (až u 80 % žen).
5. Obecně: HT terapii doporučujeme, převažuje-li její prospěch nad rizikem.



Foto 1. Prof. Josef Donát při závěrečném hodnocení konference

II. Hormonální terapii (EPT a ET) nedoporučujeme:

1. u karcinomu prsu (v současnosti i v minulosti);
2. u estrogen-dependentních maligních nádorů;
3. při idiopatické tromboembolické nemoci (hluboká žilní trombóza vzniklá v souvislosti s těhotenstvím, hormonální antikoncepcí nebo hormonální léčbou, plicní embolizace);
4. při infarktu myokardu a stavu do jednoho roku po něm;
5. u stavů po ischemické mozkové mrtvici;
6. Obecně: HT nedoporučujeme, převažuje-li její riziko nad prospěchem.

III. Další prospěch hormonální terapie:

1. Významně snižuje (EPT i ET) riziko kolorektálního karcinomu, nelze ji ale doporučit jako prevenci.
2. Lze ji doporučit u hypertenze i diabetes mellitus.
3. Příznivě ovlivňuje lipidové spektrum a ve věku 50–59 let může působit jako primární kardiovaskulární prevence, teprve ve věku nad 70 let toto riziko zhoršuje.

IV. Další možná rizika hormonální terapie:

1. Riziko karcinomu prsu se u EPT zvyšuje po sedmi letech užívání, samotné estrogenu riziko nezvyšují, je možné je podávat až 15 let.
2. U žen s dělohou by i nízkodávková estrogení terapie měla být oponována progestogeny ke snížení rizika vzniku hyperplazie a karcinomu endometria.

3. U žen se zvýšeným rizikem pro tromboembolickou nemoc preferujeme nízkodávkou a transdermální formu HT.

4. Za všech okolností preferujeme nízkodávkovou léčbu, a to jak ve složce estrogení, tak progestogení.

5. HT není doporučována jako primární nebo sekundární prevence ischemické choroby srdeční, ET u žen ve věku 50–59 však může preventivně působit, snižuje intervenční koronární index.

6. Ve věku nad 60 let HT zvyšuje riziko stařecké demence, naopak ve věku 50–59 let toto riziko snižuje.

7. HT není prevencí Alzheimerovy nemoci.

V doporučení ČMAS a SOM se bezprostředně odráží přehodnocení studie WHI, a to obou jejích větví, napříč všemi věkovými skupinami i jednotlivých věkových skupin v mnoha sledovaných problémech. Nové výsledky byly zveřejněny na 19. výročním mítinku NAMS v roce 2008 (6), na 12. světovém kongresu IMS v Madridu v roce 2008 (7), na 8. workshopu IMS v Pise v roce 2009 (8), na 8. evropském kongresu o menopauze (EMAS) v Londýně v roce 2009 (9) a na 20. výročním mítinku NAMS v roce 2009 (10).



Foto 2. Špindlerův Mlýn 17. října 2009

Česká menopauzální a andropauzální společnost jako přidružený člen IMS s úzkou informační a metodickou návazností na NAMS může být garantem nejnovějších vědeckých poznatků a závěrů v oblasti klimakterické medicíny a hormonální terapie. Je mezioborovou společností, přístupnou vysokoškolákům i středním zdravotním pracovníkům všech oborů, zainteresovaných v problematice zdravotních aspektů klimakteria a stárnutí ženy a muže.

LITERATURA

1. Guidelines for the hormone treatment of women in the menopausal transition and beyond. Position Statement by the Executive Committee of the International Menopause Society. *Climacteric* 2004; 7: 8–11.
2. Pines A, et al. IMS updated recommendations on postmenopausal hormone therapy. *Climacteric* 2007; 10: 181–194.
3. Birghäuser MH, et al. Updated practical recommendations for hormone replacement therapy in the peri- and postmenopause. *Climacteric* 2008; 11: 108–123.
4. Position Statement. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2008; 15/4: 584–602.

5. **Crandall Carolyn J.** The NAMS competency exam. Menopause Management 2008; 17/3: 26–30.
6. Abstracts of the 19th Annual Meeting of The North American Menopause Society, September 24–27, 2008. Orlando, FL, Menopause 2008; 15/6: 1197–1232.
7. Abstracts of the 12th World Congress on the Menopause. Climacteric 2008; 11 (Suppl. 2).
8. 8th IMS Workshop: Aging, menopause, cardiovascular disease and HRT, Pisa 2009.
9. Abstracts of the 8th European Congress on Menopause (EMAS): Securing a healthy future, London, UK, May 16–20, 2009.
10. Abstracts of the 20th Annual Meeting of The North American Menopause Society, A new experience: bringing technology to menopausal health. San Diego, USA, September 30 –October 3, 2009.

*prof. MUDr. Josef Donát, DrSc.
Porodnicko-gynekologická klinika
Pardubické krajské nemocnice, a.s.
Kyjevská 44, 532 03 Pardubice
e-mail: donat.praha@centrum.cz
Foto Marcela Burdová*

Zprávy

SPOLEK LÉKAŘŮ ČESKÝCH

Spolek lékařů českých v Praze pořádá v lednu, únoru a v březnu 2010 pravidelné přednáškové večery s diskuzí.

Začátek vždy v 17 hodin v Lékařském domě v Praze 2, Sokolská 31.

DNE 25. LEDNA 2010

Přednáškový večer Gynekologicko-porodnické kliniky 1. LF UK a VFN
Přednosta: prof. MUDr. Alois Martan, DrSc.

Klausův večer

Koordinátor: prof. MUDr. Alois Martan, DrSc.

1. A. Pařízek: Úvod (5 min)
 2. Z. Hájek: Diagnostika předčasného porodu (10 min)
 3. M. Koucký: Infekce – nejčastější příčina předčasného porodu? (10 min)
 4. A. Pařízek: Tokolyza (10 min)
 5. B. Ošťádal: Vliv betamimetik na matku a myokard v časně fázi ontogenetického vývoje (10 min)
 6. V. Sebroň: Tokolická terapie a plod/novorozeneček (10 min)
- Diskuze

DNE 1. ÚNORA 2010

Přednáškový večer 1. chirurgické kliniky 1. LF UK a VFN
Přednosta: prof. MUDr. Zdeněk Krška, CSc.

Kukulův večer

Pokročilá interdisciplinární spolupráce

Koordinátor: prof. MUDr. Zdeněk Krška, CSc.

1. Z. Krška: Úvod – Interdisciplinární spolupráce u pokročilých stavů (10 min)
 2. J. Šváb: ISZ – limity konzervativní léčby (10 min)
 3. K. Kudrna, P. Kříž: Příprava warfarinovaných nemocných k akutní osteosyntéze stehenní kosti (10 min)
 4. O. Paul: Krvácení do GIT (10 min)
 5. D. Schmidt: Interdisciplinární výkony na trávicím traktu (10 min)
 6. J. Ulrych: Akutní pankreatitida (10 min)
 7. M. Sedlář, M. Reháček: Bodné poranění srdce (10 min)
 8. Z. Krška, S. Čermák, S. Trča: Generalizované gynekologické tumory (10 min)
- Diskuze

DNE 8. ÚNORA 2010

Přednáškový večer III. interní kliniky 1. LF UK a VFN
Přednosta: prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.

Charvátův večer

Koordinátor: prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.

1. S. Svačina: Úvod – výskyt obezity a nové možnosti léčby (10 min)
 2. M. Haluzík: Novinky v endokrinní funkci tukové tkáně. (15 min)
 3. Sucharda P.: Metabolická chirurgie - krok za hranice obezity? (10 min)
 4. Slabá Š.: Psychoterapie obezity (10 min)
 5. Matoušek M.: Fyzická aktivita v léčbě obezity v praxi (15 min)
- Diskuze

DNE 15. ÚNORA 2010

Slavnostní přednáškový večer Spolku lékařů českých v Praze

Předseda: prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.

Maydlova přednáška Hirschsprungova choroba

Přednášející: prof. MUDr. Richard Škába, CSc.

DNE 22. ÚNORA 2010

Přednáškový večer 1. interní kliniky 3. LF UK a FNKV
Přednosta: prof. MUDr. Jiří Horák, CSc.

Jonášův večer

Koordinátor: MUDr. Jiří Žabka, CSc.

1. J. Žabka: Úvod (5 min)
 2. M. Havrda, J. Žabka, I. Rychlík, Z. Verneřová: Nefropatie ve vyšším věku (analýza bioptických nálezů u starších pacientů na našem pracovišti) (10 min)
 3. J. Žabka, M. Havrda, M. Mokřejšová, K. Krátká, O. Remeš: Fokálně segmentální glomerulosklerosa – klinický přístup (10 min)
 4. K. Krátká, M. Havrda, O. Remeš, F. Málek: Příčiny úmrtí u nemocných s kardiorenálním syndromem (10 min)
 5. O. Remeš, K. Nehézová, J. Vránová, M. Havrda, J. Žabka, I. Rychlík: Srovnání tří sonografických metod k vyšetření stavu intravaskulární hydratace (kolapsibilní index a „flat ratio“ dolní duté žíly, měření průměru jaterních žil) u nemocných s chronickým onemocněním ledvin (CKD) (10 min)
 6. M. Mokřejšová: Renální osteodystrofie – vyváží benefit náklady? (10 min)
 7. M. Havrda, K. Krátká, J. Vránová: Vliv nefrotoxických farmak na reziduální diurézu u nemocných léčených peritoneální dialýzou (10 min)
- Diskuze

DNE 1. BŘEZNA 2010

Přednáškový večer Kliniky anesteziologie a resuscitace 2. LF UK a FN Motol
Přednosta: prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc.

Koordinátor: MUDr. Jiří Bureš

1. K. Cvachovec: Úvod (5 min)
 2. O. Gabriel: Paralelní a fontánovská cirkulace – klinické využití patofyziologických principů u vad s funkčně společnou komorou (15 min)
 3. V. Mixa: Kombinovaná anestezie u dětí (15 min)
 4. P. Pavlíček: Hemolyticko-uremický syndrom v dětském resuscitační péči (15 min)
 5. V. Bicek: Transplantace plic ve FN Motol (15 min)
 6. M. Pelichovská: Akutní pankreatitida v resuscitační péči (15 min)
- Diskuze

DNE 8. BŘEZNA 2010

Přednáškový večer Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN
Přednosta: doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.

Seklův večer

Prenatální genetická péče

Koordinátor: doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.

1. M. Kohoutová: Úvod (5 min)
 2. A. Baxová: Možnosti a limity prenatální diagnostiky skeletálních dysplázií (15 min)
 3. K. Veselá: Léky v graviditě (15 min)
 4. R. Mihalová: Zajímavosti a úskalí cytogenetického vyšetření u plodu (15 min)
 5. P. Lněnička: Rychlá diagnostika chromosomálních aneuploidií z pohledu molekulárního genetika (15 min)
- Diskuze

DNE 15. BŘEZNA 2010

Přednáškový večer II. interní kliniky 1. LF UK a VFN
Přednosta: prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc.

Pelnářův večer Kazuistická sdělení

Koordinátor: prof. MUDr. Michael Aschermann, DrSc.

1. A. Linhart: Úvod (5 min)
 2. S. Magage, M. Pšenička, E. Kejřová, M. Smola: Neadekvátní výboje implantabilního kardioverteru – defibrilátoru (15 min)
 3. J. C. Lubanda, P. Vařejka, P. Procházka, S. Heller, M. Chochola: Ruptura pseudoaneuryzmatu descendentní aorty po operaci koarktace aorty (15 min)
 4. P. Procházka, S. Heller, M. Chochola, L. Skalická, J. C. Lubanda, P. Vařejka: Arteriovenózní píštěl – intervenční léčba (15 min)
 5. S. Heller, M. Chochola, L. Skalická, J. C. Lubanda, P. Procházka, P. Vařejka: Perkutánní léčba akutních tepenných uzávěrů (15 min)
- Diskuze

DNE 22. BŘEZNA 2010

Přednáškový večer Centra diabetologie IKEM Praha
Přednosta: prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc.

Syllabův večer

Koordinátor: prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc.

1. T. Pelikánová: Úvod (5 min)
 2. T. Pelikánová: Nová farmaka v léčbě hyperglykémie, algoritmus léčby diabetu 2. typu (15 min)
 3. R. Kožnarová: Nové technologie v diabetologii (15 min)
 4. F. Saudek: Pokroky v transplantační léčbě diabetu (15 min)
 5. A. Jirkovská, M. Dubský, R. Bém: Léčba ischemie kmenovými buňkami u syndromu diabetické nohy (15 min)
- Diskuze

DNE 29. BŘEZNA 2010

Přednáškový večer Kliniky dětské chirurgie 2. LF UK a FN Motol
Přednosta: prof. MUDr. Jiří Šnajdauf, DrSc.

Kafkův večer Dětská chirurgie

Koordinátor: prof. MUDr. Jiří Šnajdauf, DrSc.

1. J. Šnajdauf: Úvod (5 min)
 2. M. Pygl: Dlouhodobé výsledky po operaci brániční kýly (10 min)
 3. P. Kuklová: Duodenum šetřící resekce hlavy pankreatu u dětí (10 min)
 4. L. Kavalcová: Sakrokokyceální teratomy u dětí (10 min)
 5. J. Trachta: Rozštěpové vady močového měchýře (10 min)
 6. M. Pýchová: Plicní sekvence (10 min)
- Diskuze

*prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.
vědecký sekretář*

*prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.
předseda*

Zprávy

SLAVNOSTNÍ PŘEDÁNÍ CEN ČESKÉ
LÉKAŘSKÉ SPOLEČNOSTI JEP

Dne 27. listopadu se v Zaháňském salóнку Valdštejnského paláce konalo pod záštitou místopředsedy Senátu ČR Milana Štěcha (na fotografii 1 vlevo) předání cen za nejlepší knižní publikace a odborné články za rok 2008. Úvodní slovo a poděkován oceněným za jejich práci přednesl předseda České lékařské společnosti prof. MUDr. Jaroslav Blahoš, DrSc., a děkan královéhradecké lékařské fakulty prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., dr.h.c.

Ohodnoceny byly tyto publikace:

1. cena za knižní publikaci
(foto 1)

Viktor Kašák, Vladimír Koblížek a kol. – Naléhavé stavy v pneumologii (Maxdorf Jessenius: Praha 2008).

2. cena za knižní publikaci
(foto 2)

Tomáš Fait, Michal Vrablík, Richard Češka a kol. – Preventivní medicína (Maxdorf Jessenius: Praha 2008).

3. cena za knižní publikaci
(foto 3)

Jiří Beran, Jiří Havlík a kol. – Lexikon očkování (Maxdorf Jessenius: Praha 2008).



Obr. 1. Zprava Viktor Kašák, Vladimír Koblížek, Jaroslav Blahoš, Vladimír Palička a Milan Štěch



Obr. 2. Zleva Tomáš Fait, Michal Vrablík, Richard Češka při přebírání 2. ceny



Obr. 3. Zleva Jiří Beran, Jiří Havlík



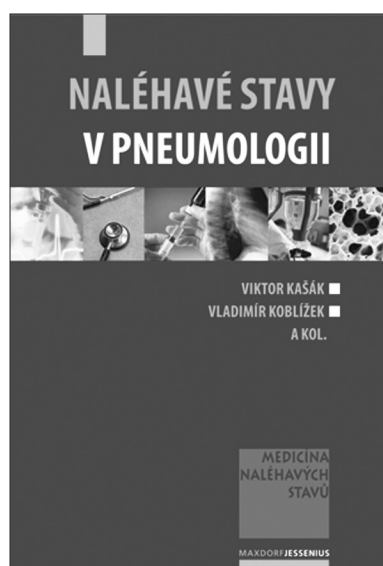
Obr. 4. Eva Syková (vlevo)

4. cena za časopiseckou publikaci (foto 4)

Eva Syková a kol. – soubor 14 prací v zahraničních i domácích renomovaných časopisech z oboru neurovědy.

Podrobné informace o oceněných publikacích přinášejí níže uvedené anotace.

Text a foto Helena Glezgová



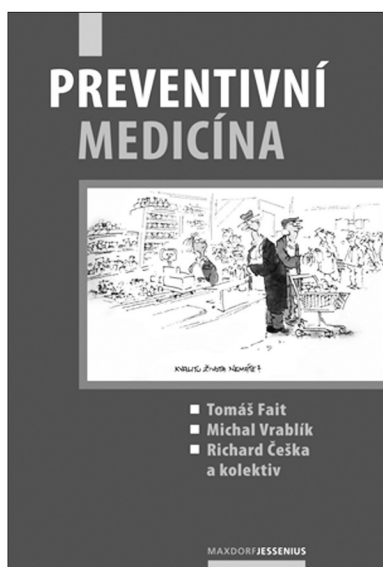
NALÉHAVÉ STAVY V PNEUMOLOGII

Viktor Kašák, Vladimír Koblížek a kol.

V průběhu poslední čtvrtiny 20. století došlo ve všech rozvinutých zemích k vytvoření sítě specializovaných zařízení intenzivní medicíny. Ta jsou schopna kompetentně řešit stavy, které pacienta bezprostředně ohrožují na životě, resp. hrozí trvalými následky. Vedlejším důsledkem tohoto vývoje je však značný pokles faktické schopnosti ostatních lékařů řešit naléhavé situace u svých pacientů. Naléhavé stavy tak představují mimořádně obtížnou situaci se značným rizikem chyby, resp. postupu non lege artis. Přitom právě na lékařích mimo jednotky intenzivní péče obvykle závisí osud pacienta do té doby, než je na specializované oddělení přijat.

Vydalo nakladatelství Maxdorf v roce 2008, 520 str., formát: B5, váz., cena: 795 Kč, edice Jessenius, ISBN: 978-80-7345-158-5.

Objednávky můžete posílat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz. Na objednávce laskavě uveďte i jméno časopisu, v němž jste se o knize dozvěděli.



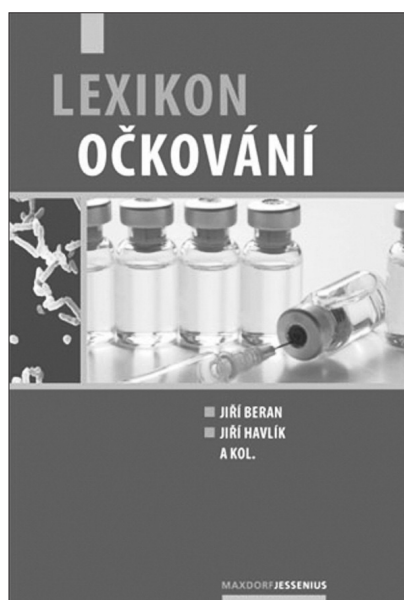
PREVENTIVNÍ MEDICÍNA

Tomáš Fait, Michal Vrablík, Richard Češka a kolektiv

Publikace pojednává o preventivní medicíně, která je sice moderním oborem, ale prevencí se zabývali již lékaři před mnoha tisíci lety. V knize je zdůrazněna role praktického lékaře, který může být klíčovým zprostředkovatelem masově individualizované prevence a podpory zdraví. Je k tomu předurčen svými vědomostmi, znalostí pacienta a jeho rodiny, znalostí anamnézy a prostředí, ve kterém žije a pracuje, a schopností posoudit hodnoty a preference pacienta. Totéž platí i pro praktického lékaře pediatra. Publikace přináší přehled současných programů primární a sekundární prevence v jednotlivých oborech, např. gynekologii, obezitologii, diabetologii, onkologii, ortopedii, psychiatrii a v mnoha dalších oblastech.

Vydalo nakladatelství Maxdorf v roce 2008, 552 str., cena 695 Kč, formát B5, váz., edice Jessenius, ISBN: 978-80-7345-160-8.

Objednávky můžete posílat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz. Na objednávce laskavě uveďte i jméno časopisu, v němž jste se o knize dozvěděli.



LEXIKON OČKOVÁNÍ

Jiří Beran, Jiří Havlík a kolektiv

V České republice má prevence infekčních onemocnění prostřednictvím očkování dlouhou tradici. Přesto je informací o nových vakcínách a trendech v očkování u odborné veřejnosti stále nedostatek. Nové směry ve vývoji vakcín a detailní znalost původců i epidemiologie mnoha infekcí s sebou v posledních několika málo letech přinesly řadu zcela nových, i u nás již zaregistrovaných očkovacích látek. Kniha přináší přehled dostupných očkovacích látek ve formě lexikonu, který ve zjednodušené formě informuje nejen o infekci, proti které chrání, ale také o vlastní vakcíně.

Vydalo nakladatelství Maxdorf v roce 2008, 352 str., cena 795 Kč, formát B5, váz., edice Jessenius, ISBN: 978-80-7345-164-6.

Špičky

Šťastné a veselé – jenom aby!

Na svátcích chce vydělat kdekdo včetně výrobců třaskavin a alkoholu. Jistý policejní expert na výbušniny předstíral neznalost. Žádal prodejce pyrotechniky o informaci, jak nakládat s nabízeným zbožím. Instrukce zněla: „Zapal, zahod a utíkej!“ Prodejce nevědě, že nabízená dalekonosná rachejtla se má odpalovat nahoru za pomoci rampy, jinak by zákazníka dohonila jedna dvě.

Tekutá výbušnina

U vzorku české populace došlo nejčastěji k domácímu násilí za situace, kdy před tím oba nebo jeden z aktérů pil alkohol (1). Přítomnost alkoholu byla udávána u dvou třetin všech případů násilného chování. Zahraniční prameny uvádějí, že domácí násilí pod vlivem alkoholu bývá závažnější a mívá horší následky.

Následující řádky posíláme jako vánoční dárek všem, kdo podobnou informaci potřebují.

Jak se chránit před domácím násilím (částečně podle 2)

- Vyhybat se alkoholu a drogám. Výzkumy z různých zemí i z České republiky ukazují, že mnoho obětí násilných trestných činů bylo v době činu pod vlivem alkoholu. Je to pochopitelné, opilý oběť se hůře brání a nebývá dost opatrná.

- Přítomnost dalšího člověka nebo více lidí už sama o sobě někdy stačí, aby se nebezpečný člověk uklidnil. Máte-li v nebezpečné situaci možnost přivolat pomoc, udělejte to. I rozčilení lidé nebo opilí se lépe ovládají před svědky. Tam, kde existuje větší riziko (např. zbraň) nebo kde k násilí došlo, je správné volat policii.

- Pokud je to možné, odstraňte z okolí opilého člověka nebezpečné předměty.

- V kritické situaci je lépe být blíže dveřím.

- Osvědčuje se udržovat bezpečnou vzdálenost (nejméně delší než délka natažené paže). Na útok z delší vzdálenosti se dá lépe reagovat a fyzicky odstup napomáhá i odstup psychologickému.

- Kromě vzdálenosti je třeba pamtovat i na další složky mimoslovní komunikace, například hovořit klidným, hlubším a tišším hlasem a vyhnout se prudkým gestům a pohybům, které by si druhý mohl vykládat jako útok nebo ohrožení. Opilý, zfetovaný, duševně nemocný nebo rozčilený člověk vnímá totiž často spíše právě tyto složky komunikace než věcné argumenty.

- To, co možnému agresorovi říkáme, by mělo být jednoduché a jednoznačné. Schopnost vnímat složité věty je u intoxikovaných lidí zhoršená.

- Osvědčuje se oslovovat druhého člověka jménem, dáváme tak najevo respekt a spíše se uklidní.

- Doporučuje se také nabídnout, aby se potenciální agresor posadil. Jestliže to přijme, riziko útoku pronikavě klesá.

- Z toho, že došlo k násilí, nebo z vyhrožování je třeba vyvodit důsledky: například podat trestní oznámení, trvat na tom, aby se manžel protialkoholně léčil nebo se přestát s agresivním člověkem stýkat. Od roku 2007 existuje možnost, aby policista na dobu deseti dnů vykázal útočnicka ze společných prostor. Lze se také obrátit na soud. Ten může vydat předběžné opatření, kterým uloží útočnickovi, aby dočasně opustil společně obývaný prostor a jeho okolí, nevstupoval do něj a aby se zdržel setkávání s obětí. Předběžné platí měsíc a dá se prodloužit.

- S opilým člověkem nemá velký význam se přit nebo ho přesvědčovat o nutnosti léčení. Po a vystřízlivění může být ale takový rozhovor velmi prospěšný. Další informace o tom, jak si počínat, jestliže žije ve společné domácnosti někdo s alkoholovým problémem, najdete jinde (3).

Doporučení těm, kdo mají sklon k agresivitě

Uvedené postupy můžete kombinovat a zvýšit tak jejich účinnost.

- Vyhněte se alkoholu a drogám, protože zhoršují sebeovládání. Návod, jak zvládat problém s alkoholem, je volně ke stažení (3).

- Na situaci, kdy byste se mohl dát vyprovokovat, se předem připravte. Můžete si například její zvládnutí předem nacvičit.

- Uvědomte si, kde máte „červené knoflíky“, tj. tlačítka, po jejichž zmáčknutí se začnete automaticky vztekat. Nenechte se ovládat lidmi, kteří vaše červené knoflíky mačkají pro zábavu. Příště při jejich zmáčknutí zachováte klid. To bude překvapení!

- Většina lidí se zklidní, když dýchá pomalu, zhluboka a do břicha a dlouze vydechuje.

- Raději opusťte rizikovou situaci, než abyste se přestali ovládat. Problém většinou vyřešíte mnohem lépe s odstupem a nadhledem.

- Uklidnění pomáhá i tělesná aktivita nebo práce (třeba delší procházka nebo bezpečné cvičení).

- Jestliže se vám podaří se situaci zasmát a probudit v sobě smysl pro humor, je velmi pravděpodobné, že hněv zeslábně nebo zmizí.

- Pomáhá také relaxace. Můžete se uvolnit celkově (nahrávky jsou zdarma na www.drnespor.eu) nebo si nenápadně uvolnit pouze břicho, ruce či obličej.

- Speciální technika, která byla vytvořena právě k zvládnání hněvu, je semafor. Představte si světla semaforu, při červené zastavte automatické agresivní jednání, při žluté porovnejte své možnosti (vyřešit situaci žertem, odejít, přejít to mlčením atd.) a vyberte si nejvhodnější eventualitu. Nakonec při zelené vybranou možnost realizujte. Dodatečně pak můžete zhodnotit, jestli jste zvolili správně. To vám pomůže se příště rozhodovat ještě lépe.

- Jestliže vám semafor připadá příliš složitý, prostě si uvědomte negativní následky případné agrese a výhody toho, když se ovládnete.

- Zpomalte. Hněv má blízko k primitivním částem osobnosti, které reagují rychle a ukvapeně. Vy naopak potřebujete jednat chytře a s rozmyslem.

- Už to, že si hněv hned na začátku uvědomíte a pojmenujete ho jako hněv, vám ho pomůže lépe zvládnout.

- Se sebeuvědomováním souvisí také uvažování o příčinách hněvu a agrese. K nejčastějším příčinám patří duševní bolest a zklamání z toho, že člověk nedostává něco, nač si dělá právo. I kdybyste při uvažování o příčinách hněvu na nic nepřišli, zaměstnáte tak rozumnější část mozku, a tak se ovládnete lépe.

- Jste-li v kontaktu s rozhněvaným člověkem, uvědomte si, že je to jeho hněv, ne váš. Nepřistupujte na stupňující se konflikt. Například paní A řekne panu A něco nepříjemného, pan A odpoví ještě ostřeji, paní A začne křičet, pan A křičí ještě hlasitěji atd. Tyto tzv. eskalující (stupňující se) konflikty jsou zbytečné a při troše rozvahy se jim dá zpravidla vyhnout.

- Raději opusťte rizikovou situaci, než abyste se přestali ovládat. Problém většinou vyřešíte mnohem lépe s odstupem a nadhledem.

Na závěr

Přejeme vám, aby vaše svátky byly střizlivé, šťastné a veselé.

Literatura:

1. Nešpor K, Csémy L. Domácí násilí a alkohol. Čes a slov psychiatrie 2005; 101: 174–175.
2. Nešpor K. Jak zlepšit sebeovládání. Ústí nad Orlicí: Oftis 2007; 112
3. Nešpor K. Zůstat střizlivý. Brno: Host 2006; 238. Zdarma ke stažení z www.drnespor.eu.

Karel Nešpor, Ladislav Csémy

Kniha

Tschuschke V. (Hrsg.)
GRUPPENPSYCHOTHERAPIE

Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2010; s. 366, cena 49,95 euro. ISBN 978-3-13-143691-7.

Skupinová psychoterapie je způsob léčby, ale i cesta k lepšímu porozumění sobě a nejbližším lidem. Využívá se při ní dynamiky meziosobních vztahů, která se projevuje v každé menší společenské skupině, v níž se lidé dostávají do subjektivně blízkých vztahů. Psychoterapeutická skupina mívá obvykle kolem deseti pacientů, mezi nimiž se v průběhu léčebného procesu vytvářejí poměrně silné vazby. Samozřejmě skupinové dění a léčba mají svá jasná pravidla a celý tento proces iniciují a nesou za něj odpovědnost přítomní psychoterapeuti. Upozorňují, že skupinová psychoterapie má u nás téměř šedesátiletou tradici, užívá se zejména při léčebném ovlivňování osob s psychickými potížemi, závislostí na návykových látkách a při léčbě somatoforních a psychosomatických poruch zdraví.

Recenzovaná publikace vychází po devíti letech ve druhém a doplněném vydání v nakladatelství Georg Thieme Verlag, které věnuje velkou pozornost postgraduálnímu vzdělávání lékařů a klinických psychologů. Právě těmto profesním skupinám je publikace určena především.

Vydavatelem monografie Gruppenpsychotherapie je německý profesor psychologie a vedoucí Katedry lékařské psychologie na univerzitní klinice v Kolíně n. Rýnem, jenž zároveň vede psychoonkologické pracoviště Centra pro integrovanou onkologii na kolínské univerzitě. Autorsky se na knize spolupodílelo 51 lékařů a psychologů jak z německé jazykové oblasti, tak z anglosaských zemí.

Práce je rozdělena do šesti hlavních částí a 63 kapitol, závěrem pak nalezneme seznam použité literatury a věcný rejstřík.

Prvá část (Interpersonální rovina léčby) uvádí do problematiky, nalezneme zde vymezení tohoto způsobu léčby a teoretická východiska včetně zjištění týkajících se účinných faktorů terapie. Na začátku knihy je probrána i oblast etiky a morálky, stejně jako problematika zajišťování a ověřování kvality léčby.

Ve druhé části (Vzdělání a supervize) se seznámíme s požadavky kladenými na lékaře a psychology, kteří se chtějí profesionálně zabývat skupinovou psychoterapií v rámci smluvních vztahů se zdravotními pojišťovnami. Součástí vzdělávání je

sebezkušnostní část, kdy jsou budoucí psychoterapeuti sami v roli klientů (pacientů) a mají možnost prožít skupinovou dynamiku a psychoterapeutický proces na sobě. Zdá se, že pro výkon psychoterapeutické profese je tato součást vzdělání nejdůležitější. Ve druhé části je pojednáno i o balintovských seminářích, jež jsou určeny pro lékaře klinických oborů a přispívají k hlubšímu porozumění vztahu mezi lékařem a pacientem, kdy tento vztah a osobnost lékaře může na pacienta působit příznivě – jako lék.

Třetí část knihy (Před zahájením skupinové léčby) je zaměřena převážně prakticky. Podrobně je probrána otázka indikace a prognózy, stejně jako příprava pacientů na tento způsob léčby. Příprava pacientů (vedle diferencované indikace) je považována za hlavní předpoklad příznivého průběhu a výsledků léčby. Ve třetí části knihy se poučíme o tom, jak se v Německu píše žádost zdravotním pojišťovnám o proplácení léčby.

Ve čtvrté části (Techniky vedení skupiny) jsme seznámeni s rolí psychoterapeuta a s rozličným vedením skupin dle různých psychoterapeutických škol (analytická a hlubinně psychologická škola, behaviorální přístup, rogersovská psychoterapie). Je zde dotčena i spolupráce mezi členy terapeutického týmu.

Pátá část (Skupinový proces) nám zprostředkuje poznání jednotlivých terapeutických fází a dynamiky vývoje skupin. Podrobně se dovíme o účinných faktorech léčby, přenosu a protipřenosu, o tzv. odporu nemocného a o práci s obtížnými pacienty (např. s hraniční nebo narcistickou poruchou osobnosti).

V šesté části (Efekty léčby) je pojednáno o výsledcích a cílech terapie, což splývá jen v optimálních podmínkách a při reálném odhadu výsledků a cílů léčby. Pozornost je věnována také ekonomické stránce léčby se závěrem, že při správné indikaci nemocných je tento způsob léčby úsporný. Závěrem šesté části jsou uvedené zkušenosti samotných nemocných s touto terapií.

Sedmá část (Formy skupinové léčby) nás seznamuje se složením a typy různých léčebných skupin, dovíme se o přednostech a naopak i o záporech léčby krátkodobé (do 25 setkání) a dlouhodobé. I krátkodobá léčba představuje pro mnohé pacienty vydatnou pomoc, ovšem dlouhodobá terapie, jak ukázaly katamnestické studie, přináší lepší léčebné výsledky.

V osmé části (Speciální uspořádání skupinové psychoterapie) se dovíme

o možnostech a způsobech skupinové práce s psychosomaticky nemocnými v rámci rehabilitace, o léčbě na denních klinikách a o skupinové terapii psychiatrických pacientů.

Devátá část (Speciální populace) je nejrozsáhlejší. Jsme v ní informováni o postupech a úskalích skupinového přístupu u různých diagnostických skupin nemocných. Pozornost je věnována pacientkám s poruchami příjmu potravy, nemocným vyhledávajícím pomoc sexuologa, nemocným s depresí, onkologickým pacientům a dalším diagnostickým skupinám. Seznámení jsme i se skupinovou psychoterapií dětí a mladistvých, stejně jako s léčbou starších osob.

Desátá a závěrečná část (Základní pojetí) poskytuje přehled teoretických východisek a klinické praxe u nejdůležitějších psychoterapeutických přístupů. Pojednáno je o skupinové analýze, behaviorální terapii, rogersovském přístupu, interpersonální skupinové psychoterapii, tvarové terapii atd.

Přínos recenzované monografie spatřuji v tom, že umožňuje i lékařům nepsychotherapeutům vhled do problematiky skupinové psychoterapie. Napsána a zredigována je s citem pro míru, vyváženost a objektivitu. Teoretické stati jsou doložené a přiblížené příklady z praxe. Duchu dnešní doby odpovídají i odkazy na empirické výzkumy. Zřetelná je i snaha prof. Volkera Tschuschkeho po hledání obecného modelu skupinové psychoterapie, byť v kapitolách převládá behaviorální a psychoanalytický pohled. Těší nás, že i u českých autorů (lékařů prof. M. Bouchala, prof. F. Knoblocha a psychologa prof. S. Kratochvíla) sledujeme tuto tendenci po integraci a syntéze různých psychoterapeutických směrů již před 50 roky.

Osobně mne v knize nejvíce zaujala část o psychoterapeutické léčebné pomoci onkologicky nemocným. Čtenářkám a čtenářům, kteří se chtějí o této problematice více dovědět, doporučuji do češtiny přeloženou monografii prof. V. Tschuschkeho Psychoonkologie – psychologické aspekty vzniku a zvládnutí rakoviny (Praha, Portál, 2004).

Publikaci o skupinové psychoterapii užívané v rámci zdravotnictví lze doporučit německy čtoucím lékařkám a lékařům, kteří si přejí rozšířit své odborné vzdělání ve směru současné psychologie a psychoterapie. Porozumět textu lze i na základě psychologických znalostí, získaných během studia medicíny.

Jan Vymětal
Karlovo náměstí 40, 128 00 Praha 2

Pokyny pro autory Časopisu lékařů českých

Časopis lékařů českých zpoplatňuje publikaci článků s dedikací grantového či jinak finančně podporovaného výzkumu a vývoje z veřejných zdrojů. Cena jedné černobílé tiskové strany v časopisu je 1800 Kč včetně DPH a potřebnou částku lze čerpat z prostředků na tento výzkum.

Pokud si přeje autor článku uveřejnit dedikaci grantu, výzkumnému záměru apod., zašle redakci spolu s rukopisem vyplněný formulář objednávky k publikaci práce. Formulář lze nalézt na domácí stránce ČLČ (<http://www.cls.cz/nts/casop/lekari/lekari.asp>). Příslušná částka bude fakturována ve fázi korektury a daňový doklad bude autorovi zaslán po zveřejnění článku. Rukopisy s dedikací bez přiložené objednávky nebudou redakci posuzovány a autor bude upozorněn na nutnost zaslání objednávky publikace. Pokud ani pak redakce objednávku neobdrží, bude rukopis autorovi vrácen.

Blíže informace: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel./fax: 224 266 226 (Marcela Havlíková), e-mail: havlikova@cls.cz.

ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH

Je vydáván Českou lékařskou společností J. Ev. Purkyně. Je časopisem interdisciplinárním a přísně vědeckým, publikujícím přehledové články a původní vědecké práce ze všech oborů medicíny. Přináší rovněž informace z jednání, sjezdů, recenze nejnovějších knih, kapitoly z dějin medicíny, osobní zprávy, kazuistiky, články o pre- i postgraduálním vzdělávání lékařů, odpovědi na odborné dotazy čtenářů aj.

Tyto Pokyny pro autory jsou v souladu s „Jednotnými požadavky na úpravu rukopisů určených k publikaci v lékařských a biologických časopisech“ (3. revize, 1988, Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals – publikovanými v plném překladu v Čas Lék čes 2000; 139(1): 31.

OBECNÉ POŽADAVKY NA ÚPRAVU RUKOPISŮ

K publikaci v Časopisu lékařů českých může být přijat pouze **rukopis, který nebyl a nebude publikován v jiném časopisu**. Výjimku tvoří pouze abstrakta vědeckých konferencí. Rukopisy zašlete v **papírové formě** ve formátu A4 a celý **text, tabulky, obrázky, fotografie i seznam použité literatury včetně příloh také na CD nebo disketě 3,5" (Word 6.0/95 a vyšší verze)**. Text, který má být zvýrazněn, podtrhněte, text, který má být vysázen kurzívou, podtrhněte vlnkou. **Text v elektronické podobě graficky neupravujte!** Pro urychlení komunikace **uvádějte e-mailovou adresu a telefonní číslo**.

Redakce netrvá na imprimatur vedoucího pracoviště. **K originálu rukopisu přiložte prohlášení podepsané všemi uvedenými autory**, že splňují požadavky autorství a že souhlasí s jeho uveřejněním v předkládaném znění.

Při autorské korektuře není dovoleno měnit ani doplňovat text. Korekturu je nutné provést podle platných korektorských značek (ČSN 88 0410). **Korektury vracejte obratem, nejpozději však do 8 dnů od data odeslání z redakce**. Na pozdější autorské korektury nemůže být brán z časových důvodů zřetel.

MÍRY, HMOTNOSTI, JEDNOTKY

Výsledky chemických, fyzikálních i klinických vyšetření se uvádějí v jednotkách SI normy (Système international de Unités). Hodnoty pulzu, teploty a krevního tlaku je možné uvádět v konvenčních jednotkách.

NÁZVY LÉČIV

U léčivých specialit je nutné vedle výrobního názvu uvést i generický název.

ZKRATKY A SYMBOLY

Pokud je použita zkratka, musí před jejím prvním použitím v textu předcházet plný název. **V nadpisu a souhrnu zkratky nepoužívejte.**

TABULKY

Rozsáhlé tabulky přeplněné daty nebudou přijaty. Každá tabulka musí být opatřena popisem, vysvětlivkami a symboly statistického hodnocení. **Číslo tabulky** musí být uvedeno na příslušném místě v textu.

OBRAZOVÁ DOKUMENTACE

Obrázky, fotografie musí mít profesionální úroveň. **Pérovky, fotografie a výstupy z přístrojů přijímá redakce ve formátech tif, eps a jpg, grafy v programu Excel zpracované pro jednobarevný tisk. Fotografie, obrázky, grafy a schémata dodejte na disketě 3,5", CD, zip nebo jaz, ale veškerá dokumentace musí být zaslána i v papírové podobě.** Pokud jsou obrázky ve formátu jpg, je třeba užít velkého rozlišení (nejlépe kompresní poměr 10–12) z důvodů kvality. Názvy obrázkových souborů musí vycházet ze jména autora a čísla obrázku (např. MACEK1.tif). U mikrofotografií musí být uveden způsob barvení a zvětšení. Označte horní okraj obrázku. Médium (disketu, CD...) označte jménem autora a názvem práce. **Autor je povinen zavit dokumentaci osobních iniciál pacienta. Číslo obrázku (grafu) musí být uvedeno na příslušném místě v textu.**

V rukopisech předkládaných k publikaci je nutné přesně vyznačit, **které obrázky mají být barevné, a připojit písemný souhlas s platbou**. Je třeba uvést přesnou adresu plátce, v případě právnické nebo podnikající fyzické osoby také IČ a DIČ. **Barevné strany bez ohledu na to, kolik obsahují barevných obrázků, si hradí autoři sami** (2000 Kč za jednu tiskovou stranu). **Obrazová dokumentace, která nebude mít tyto náležitosti, bude automaticky publikována černobíle.**

LITERATURA

Smí obsahovat jen skutečné prameny, tj. publikace, na něž se autor v textu odvolává. Nesmějí se uvádět práce jen z důvodů formálních. **Citace uvádějte v pořadí, v jakém se vyskytují v textu.** V textu citace vyznačte číslem z závorce, např. (1). Vyhýbejte se odkazům na abstrakta; tzv. „nepublikovaná pozorování“ a „osobní informace“. Správnost odkazu (citace) by měla být ověřena. **Při citacích upřednostňujte domácí autory a publikace před zahraničními.**

Příklady citací monografické publikace (1), příspěvku v monografické publikaci (2), ve sborníku (3), článku v časopisu (4):

1. **Dominik J, Žáček P.** Chirurgie srdečních chlopní (...nejen pro kardiochirurgy) ve 200 vyobrazeních. Praha: Grada Publishing 2008.
2. **Jiskra J.** Autoimunitní polyorgánové syndromy. In: Límanová Z, et al. Trendy soudobé endokrinologie, Štítná žláza. Praha: Galén 2006; 227–237.
3. **Dunovský J.** Úmluva o právech dítěte a práva dětí v České republice. In: Sborník z 1. mezinárodní konference o dětských právech. České Budějovice: Zdravotně sociální fakulta JU 2003; 5–15.
4. **Goetz P, et al.** Hrozi zneužití – diskreditace lékařské genetiky. Čas Lék čes 2008; 147: 159–161.

POUŽITÍ CIZÍCH MATERIÁLŮ

Materiály (schémata, obrázky, grafy aj.) převzaté z jiných pramenů/publikací mohou být publikovány pouze s písemným souhlasem osoby/nakladatelství, které mají příslušné autorské/nakladatelské právo (copyright ©). Vyžádejte si svolení i od autorů prací v tisku, nepublikovaných dat, příp. osobního sdělení. Písemné potvrzení o svolení přiložte k rukopisu.

ETICKÉ ASPEKTY

Je-li referováno o pokusech na lidech, přiložte čestné prohlášení, že studie byla před zahájením schválena místní etickou komisí. **Zásadně neuvádějte na ilustrujícím materiálu jména nebo iniciály nemocných nebo nemocniční či protokolová čísla.** U pokusů na zvířatech uveďte, zda byly dodrženy ústavní nebo národní předpisy a směrnice pro chov a experimentální používání zvířat, nebo přiložte čestné prohlášení o souhlasu místní etické komise.

KONFLIKT ZÁJMŮ

Autor má povinnost oznámit redakci podporu firmy, jejíž produkt v práci použil. Předpokládá se, že autoři přehledových farmakoterapeutických článků nejsou finančně zainteresováni (nebo konkurenti) ve společnosti/firmě, o jejímž výrobku v článku referují. Všechny informace tohoto druhu, které budou redakci sděleny, budou drženy v tajnosti.

ÚPRAVA JEDNOTLIVÝCH TYPŮ ČLÁNKŮ

AKTUÁLNÍ TÉMA, PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK, FARMAKOTERAPIE, KAZUISTIKA, SPECIÁLNÍ SDĚLENÍ

Titulní strana: krátký, výstižný název práce; zkratka jména, příjmení autora/ů; úřední název pracoviště.

Souhrn: 1x česky, 1x anglicky, max. rozsah 200 slov bez vnitřního členění, zakončeno 3–10 klíčovými slovy.

Vlastní text – seznam použitých zkratek – literatura – poděkování.

Adresa pro korespondenci: celé jméno s tituly, adresa, fax a e-mail prvního autora.

PŮVODNÍ PRÁCE, VYŠETŘOVACÍ METODY

Titulní strana: krátký, výstižný název práce; zkratka jména, příjmení autora/ů; úřední název pracoviště.

Strukturovaný abstrakt: 1x česky, 1x anglicky, max. rozsah 200 slov s následujícím členěním:

Východisko: 2–4 věty charakterizující stav problému, 2–3 věty udávající cíl práce.

Metody a výsledky: charakteristika sledované skupiny, použité metody. Nejvýznamnější výsledky, vyjádřené numericky s udáním statistické významnosti.

Závěry: co z dané studie vyplývá.

Klíčová slova: 3–10 slov.

Vlastní text – metody – výsledky – diskuze – seznam použitých zkratek – literatura.

Adresa pro korespondenci: celé jméno s tituly, adresa, fax a e-mail prvního autora.

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ

Všechny rukopisy typu **původní práce a vyšetřovací metody jsou od 1. ledna 2008 redakcí přijímány pouze s anglickým překladem, který dodá autor.** Článek v anglické podobě stejným požadavkům recenzentů jako článek v češtině a po proběhlém recenzním řízení a příp. úpravách bude uveřejněn v anglické mutaci časopisu na internetu. **Redakce překlady nezajišťuje, vyhrazuje si však právo nekvalitní překlad vrátit autorovi k přepracování.**

ZPRÁVY ZE SJEZDŮ, DĚJINY LÉKAŘSTVÍ, DOPISY REDAKCI, DISKuze

Titulní strana: krátký, výstižný název práce; zkratka jména, příjmení autora/ů; úřední název pracoviště.

Vlastní text

Adresa pro korespondenci: celé jméno s tituly, adresa, fax a e-mail prvního autora.

U VŠECH FOREM RUKOPISŮ

Pod seznamem použité literatury se uvádí informace o případné podpoře grantem (plný název agentury a číslo grantu), dále přesná adresa pracoviště i bydliště a rodné číslo prvního autora.

Každý rukopis je hodnocen redakcí a prochází zdvojeným recenzním řízením. Nepřijatá práce jsou na vyžádání vráceny zpravidla do 3 měsíců.

Redakce nepřijme práce: které neodpovídají uvedeným požadavkům; které byly nepříznivě posouzeny recenzenty; jestliže redakce v poslední době práci stejného tématu přijala nebo již publikovala; není-li v záměru redakce a posláni časopisu danou problematiku publikovat; pokud k článku charakteru původní práce či vyšetřovacích metod není přiložen anglický překlad.

Rukopisy vyhovující uvedeným požadavkům zašlete na adresu:

prof. MUDr. Jiří Horák, CSc.
1. interní klinika 3. LF UK a FN Královské Vinohrady
Šrobárova 50, 100 34 Praha 10
e-mail: horak@fnkv.cz

Laureáti Nobelovy ceny

GEORG VON BÉKÉSY

(1899–1972)

Syn uherského šlechtice Alexandra von Békésyho a jeho ženy Pauly rozené Mazalyové se narodil 3. června 1899 v Budapešti a útlé dětství tam prostoval. Rodinný lékař byl v koncích. V posledním pokusu doporučil chlapci změnu podnebí, čemuž otec diplomat snadno vyhověl a hned na jeho první misi v Mnichově se György úplně uzdravil. „*Naneštěstí, když mi to vyprávěli, pojal jsem k veškerému lékařství nedůvěru na celý život. Je to vážná věc, být v pozdějších letech jako vědec zapleten do medicíny a nevěřit jí.*“ (My Experiences in Different Laboratories. Fizikai Szemle 1999; 49 (5): 166–173). V Mnichově obdivoval György takové moderní vymoženosti jako automatický telefon, zavedený v roce 1900. Školy navštěvoval zde i v dalších otcových působištích Cařihradu, Budapešti, odkud ve kvintě gymnázia přešel na soukromou školu v Curychu a v roce 1916 tam maturoval. Při svém hudebním nadání pomýšlel na dráhu koncertního pianisty, dal však přednost přírodním vědám: v letech 1916–1920 studoval chemii na univerzitě v Bernu, kde otec sloužil jako maďarský chargé d'affaires, a v roce 1921 dosáhl György von Békésy hodnosti bakaláře.

Pak se vrátil do poválečné vlasti, poznamenané zhroutilím monarchie a ztrátou většiny uherských zemí, aby přispěl k jejímu zotavení. Po krátké vojenské službě studoval na budapeštské univerzitě fyziku, během studií se zabýval interferenční mikroskopií a po dosažení titulu Ph.D. v roce 1923 se pokoušel uplatnit v oboru optiky, avšak marně. Hledal tedy aspoň dobře vybavenou výzkumnou laboratoř, kde by zkoumal cokoli a třeba i zadarmo, načež zjistil, že takovou laboratoř má pouze Maďarská pošta a ta s fyzikem ani nepočítá. Přesto však tu pro Békésyho našli místo se skrovným platem, zato vlídným zacházením, odkud se v následujícím bezmála čtvrtstoletí vzdálil jen na stáž v letech 1926–1927 u inženýra Karla Kűpfmüllera v ústřední laboratoři jednoho ze středisek vývoje telekomunikace, akciové společnosti Siemens & Halske v Berlíně.

Maďarskem procházelo několik linek tehdejší evropské telefonní sítě, poruchy na jeho území měly tedy mezinárodní dosah. Vláda požádala poštovní laboratoř o posouzení, který prvek sítě – sluchátka, kabely či mikrofony – je třeba zdokonalovat především. Tehdy byly mezinárodní telefonní linky v obvodu uzavřeném s jiným městem testovány srovnáváním vstupní voltáže

řady čistých tónů vysílaných z Budapešti s výstupní voltáží při návratu. Každé měření trvalo mnoho minut až hodin a Békésy pozorně sledující všechno, co se na linkách dělo, vyslechl spoustu hovorů i nezbytného cvakání při spojování i rozpojování stanic. Zvuk tohoto cvakání nebyl pokaždé stejný: Békésy vypožadoval souvislost se stavem linky. Z vědomí, že každé cvaknutí je shlukem zvuků širokého spektra kmitočtů a že ladění struny ověříme drnknutím rychleji než tahem smyčce, zrodil se jeho nápad užít cvaknutí jako zkušební signál. Békésy tak **vynalezl metodu rychlého testování telefonních linek**, které tím zkrátily z hodin na vteřinu. Na vládní otázku našla jeho práce odpověď, že nejslabším článkem telefonní sítě jsou membrány sluchátek, zkreslující vibrace mnohem více než bubínek lidského ucha.

Toto srovnání obrátilo zájem Békésyho ke studiu sluchového ústrojí, jehož anatomie byla tehdy už podrobně prozkoumána, fyziologové však dosud tápali ve výkladu některých fází procesu vnímání zvuku, z čehož muzikálního Békésyho znepokojovala zejména otázka rozeznávání výšky tónů. Podle Helmholtzovy rezonanční teorie je každé vlákno bazilární membrány hlemýždě vnitřního ucha vyladěno na svou frekvenci, znějícím tónem téže frekvence je rozkmitáno a odvozený nervový vzruch je sluchovým nervem přenášen do mozku. Tato teorie byla všeobecně přijímána, v pokusech o její ověření však Helmholtz, Corti i další s technikou preparace odlamováním skalní kosti ztroskotávali na neodvratných deformacích blanitého labyrintu, který navíc během preparace vysychal a ztrácel přirozené mechanické vlastnosti, což výsledkům ubíralo na věrohodnosti.

Békésyho tyto nedobré zkušenosti neodradily, neboť **vynalezl metodu rychlé a nedestrukční preparace hlemýždě**. Fyzik bez lékařského vzdělání sbíral vědomosti a dovednosti v pitevnách. Na základě poznatku, že v prostředí se stoprocentní vlhkostí lze ušní tkáň po dostatečně dlouhou dobu uchovat prakticky neporušenou, **vynalezl preparaci ve vodní lázni**. Pro tuto potřebu **vyvinul podvodní mikroskop**, a protože převažujícím pokusným materiálem byl drobnou sluchový orgán morčete, **vyvinul mikrochirurgické nástroje pro šetrnou práci ve vnitřním uchu** i drobných živočichů. Odlamování kosti nahradil odbušováním vysokorychlostní vrtačkou, přičemž protékající voda neustále odplavovala odvrtný kostní prach. Dokázal tak šetrně otevřít bezmála

celý závit při vrcholu hlemýždě a přímému pozorování ve stroboskopickém světle zpřístupnit značný úsek bazilární membrány poprášené stříbrem. V roce 1928 **prokázal, že bazilární membrána vibruje v postupující vlně**, přičemž vždy je amplituda vibrace v jednom místě nejvyšší. Dále **prokázal, že poloha maxima vibrace závisí na jejím kmitočtu**: vyšší frekvence blíže k bázi, nižší frekvence blíže k vrcholu hlemýždě. György von Békésy tak na základě vlastních výzkumů **vytvořil místní teorii rozeznávání výšky tónů**: oscilace báze třmínku v oválném okénku působí výkyvy tlaku perilymfy a ty vytvářejí na bazilární membráně putující vlnu. V místě vrcholu vlny, jehož poloha odpovídá kmitočtu oscilací, je bazilární membrána nejvíce vyklenuta a smyslové buňky Cortiho ústrojí nejvíce ohnuty a podrážděny, každý kmitočet tak dráždí svou skupinu smyslových buněk. Nikoli rezonance, nýbrž deformace bazilární membrány tedy aktivuje receptory.

V téže době zároveň stále řešil problémy kvality telefonního přenosu (Über den Einfluss der nichtlinearen Eisenverzerrungen auf die Güte und Verständlichkeit eines Telephonie-Übertragungssystemes. Elektr. Nachr.-Tech 1928; 5: 231–246) a vypracoval akustické plány studia právě zřízeného Maďarského rozhlasu.

Jednou Békésy sháněl článek Ludwig Macha o přístroji, nazývaném dnes Mach-Zehnderův interferometr, a náhodou přitom narazil na práci jeho otce Ernsta Macha, rodáka z Chrlicu u Brna, profesora a rektora Karlo-Ferdinandovy univerzity v Praze, velkého teoretického fyzika a pozoruhodného filozofa. Předmětem této práce Ernsta Macha byly útlumové reakce ve zrakové soustavě a Békésy nad ní začal uvažovat, že Machovy zákony mohou platit i pro sluch. Fyzikální vyšetřování mechanických vlastností ucha ho utvrzovalo v přesvědčení, že i za ostrost rozlišování výšky tónů musí odpovídat nějaký druh nervového zosťrujícího mechanismu. Svá první zkoumání možné úlohy útlumu u sluchu zveřejnil už v roce 1928 v práci o vibraci bazilární membrány hlemýždě vnitřního ucha (Zur Theorie des Hörens; die Schwingungsform der Basilmembran. Phys. Z 1928; 29: 793–810). Tímto článkem **položil základy soustavného studia postranního útlumu**, rozšířeného později i na kožní cití, vidění a chuť.

Po jmenování soukromým docentem budapeštské univerzity v roce 1932 prováděl své výzkumy jak v poštovní, tak i v univerzitní laboratoři. Zabýval se problémy akustiky hudebních síní jak teoreticky (Über die Hör-

samkeit von Konzert- und Rundfunkanlagen. Elektr. Nachr. Tech. 1934; 11: 369–375), tak prakticky (v roce 1935 navrhl akustické řešení Studia 6 pro orchestrální koncerty). V letech 1939–1946 přednášel na budapeštské univerzitě jako mimořádný (1939) a řádný (1940) profesor experimentální fyziky, přičemž i tehdy pokračoval ve výzkumné práci pro poštu.

V roce 1946 se však rozhodl poválečné Maďarsko opustit, aby se už nikdy nevrátil. Přijal pozvání ze stockholmského Karolinského institutu k práci u neurofyziologa Yngveho Zottermana, badatele v oblasti smyslového vnímání. V roce 1947 tam **sestrojil nový typ audiometru ovládaného vyšetřovanou osobou** pomocí tlačítka, jímž tlumí sílu čistého tónu o pomalu se měnícím kmitočtu. Tato sluchová zkouška (**Békésyho audiometrie**) slouží k určování stupně hluchoty, k rozlišování mezi poruchami sluchu kochleárního a nervového původu, její princip je však využíván i mimo obor akustiky, například při určování změny citlivosti oka při adaptaci na tmu.

V roce 1947 odešel György (ve světě pak častěji Georg) von Békésy do USA na Harvardovu univerzitu, když ho do tamní psychoakustické laboratoře pozval její zakladatel a přednosta Stanley Smith Stevens. Békésy tu nejprve dokončil měření základních biomechanických vlastností vnitřního ucha a na jejich podkladě pak **sestrojil zvětšený model hlemýždě**, sestávající z vodou naplněné plastové trubice přepažené membránou 30 centimetrů dlouhou; pohyb pístu (vibrátoru) na jednom konci vytvářel vlny putující podél membrány. Cortiho ústrojí simuloval Békésy jednoduše vlastním předloktím položeným podélně na trubici. Ačkoli vlny putovaly podél celé délky membrány s téměř stejnou amplitudou a ve stroboskopickém světle byla patrna vibrace celého předloktí, on sám cítil vibraci jen v jednom dvou- až třicentimetrovém úseku, jehož poloha v trubici závisela na frekvenci vibrátoru. Opět jako před léty usoudil, že cítí jen vrchol putujících vln, že potlačení vnímání podnětu kolem vrcholu je důsledkem nervového útlumu a že podobně je podnět vnímán i orgánem Cortiho.

Békésyho spisy o hlavních výsledcích vlastního studia sluchu v letech 1928–1958 byly vydány v roce 1960 v jednom svazku (Experiments in Hearing. Translated and edited by E. G. Wever. New York: McGraw-Hill Book Co. 1960).

„Za své objevy fyzikálního mechanismu stimulace v ušním hlemýždi“ dostal Georg von Békésy v roce 1961 jako první fyzik Nobelovu cenu za fyziologii nebo lékařství. Na slavnosti ve Stockholmu 10. prosince 1961 vyzvedl v úvodním projevu neurofyziolog Carl Gustaf Bernhard z Karolinského institu-

tu jedinečnost díla, v němž se fyzika pojí s anatomii. Zdůraznil, že Békésyho objevy jsou základem našeho chápání hlemýždě jako analyzátoru frekvence. V závěru vyjádřil uspokojení, že laureát splňuje Nobelovo přání, aby cena byla udělována za vynikající objevy, které jsou výsledkem práce jednoho jediného vědce. O den později v nobelovské přednášce hovořil laureát o tom, že přírodu nelze lidskou fantazií překonat a že člověk by se měl od přírody učit. Zmínil se o své práci v telefonních službách, která ho přivedla k uchu jako životnímu tématu, o zkoumání skutečného hlemýždě a pokusech s jeho modelem, který prokázal funkci frekvenčního analyzátoru následně ztříhacího vnímání nervovým útlumem. Hovořil i o svých výzkumech analogií mezi uchem, kůží a okem a vyslovil názor, že možná není daleko doba, kdy tyto tři smyslové orgány, dosud v učebnicích fyziologie ostře oddělované, budou mít některé kapitoly společné (Concerning the Pleasures of Observing, and the Mechanics of the Inner Ear. In: Nobel Lectures, Physiology or Medicine, 1942–1962. Elsevier 1964: 722–746).

Blížícímu se penzionování předešel v roce 1966 odchodem z Harvardu, vydal souhrn svého dosavadního díla (Sensory Inhibition. Princeton: Princeton University Press 1967) a přijal pozvání na Havajskou univerzitu v Honolulu, kde ho jmenovali profesorem věd o smyslech a zřídili mu zvláštní laboratoř, jejíž provoz spolufinancovala Havajská telefonní společnost. Výzkumný program laboratoře odrážel rozšíření Békésyho zájmu z původního studia sluchu na obecné vlastnosti smyslů, zejména hmatu a chuti. Denně prodléval v laboratoři od devíti ráno do deseti večer. Také si zde dopřával potěšení z bezprostředního kontaktu s polynéským uměním. Bezdětný starý mládenec zůstal prostým a skromným člověkem stranícím se reflektorů. Dával přednost samotě, protože „soustředit se na jeden obor můžete, jen když jste do jisté míry osamělí.“ Do konce si zachoval posedlost dvěma věcmi: zkoumáním lidského ucha a sběratelstvím primitivního umění. Spojení obou vášní bylo u něho logické, hledání pravdy a láska k umění šly v jeho životě a díle ruku v ruce. O svém prvním setkání s ústrojím Cortiho napsal: „Pod stereoskopickým mikroskopem jsem vnitřní ucho shledal tak krásným, že jsem se rozhodl právě u tohoto problému setrvat. Byla to krása a radost z krásy, co mě k uchu připoutalo.“ Námětem jeho poslední práce o postranním útlumu jsou obrysové a kontrastové efekty v orientálním umění, jehož velkým ctitelům se na Havaji stal (Compensation Method to Measure the Contrast Produced by

Contours. J Opt Soc Am 1972; 62: 1247–1251).

Zemřel v Honolulu 13. června 1972 ve věku třiasedmdesáti let. Nekrolog ve Washington Post 16. června 1972 označil jeho dílo za vědecký základ pokroků v léčbě hluchoty a obrovský příspěvek poznání akustiky. Šest měsíců nato oznámila Medical Tribune, že Georg von Békésy odkázal Nobelově nadaci svou sbírku uměleckých děl v hodnotě 400 000 dolarů, desetkrát převyšující jeho Nobelovu cenu. Dne 9. prosince 1974 pak Nobelova nadace zpřístupnila sbírku veřejnosti. Posmrtně vyšel Békésyho článek o citlivosti smyslových orgánů (Sense Organs and Their Sensitivity. Adv ORL 1973; 19: 1–30), autobiografická črta (Some Biophysical Experiments from Fifty Years Ago. Ann Rev Physiol 1974; 36: 1–16) a úvod oddílu o sluchové soustavě v mnohasvazkové kolektivní práci o fyziologii smyslů (Keidel WD, Neff WD. (eds.) Auditory Systems, Handbook of Sensory Physiology V/I. Berlin: Springer Verlag 1974; 1–8).

POUŽITÁ LITERATURA

1. **Asimov I.** Asimov's Biographical Encyclopedia of Science and Technology. The Lives and Achievements of 1195 Great Scientists from Ancient Times to the Present Chronologically Arranged. 2 ed. Garden City: Doubleday & Co. Inc. 1982: 672.
2. **Békésy G.** My Experiences in Different Laboratories. Fizikai Szemle 1999; 5: 166–173.
3. **Daintith J, Mitchell S, Tootill E, Gjertsen D. (eds.)** Biographical Encyclopedia of Scientists, 2. ed. Bristol – Philadelphia: Institute of Physics Publishing 1994; 1: 65–66.
4. **Garraty JA, Carnes MC. (eds.)** American National Biography. New York – Oxford: Oxford University Press 1999; 2: 486–487.
5. **Magill FN. (ed.)** The Nobel Prize Winners. Pasadena – Englewood Cliffs: Salem Press 1991; 2: 827–835.
6. **McMurray EJ. (ed.)** Notable Twentieth-Century Scientists. New York: Gale Research Inc. 1995; 1: 139–140.
7. Nobel Lectures, Including Presentation Speeches and Laureates' Biographies: Physiology or Medicine, 1942–1962. Amsterdam: Elsevier Publishing Company 1964: 719–748.
8. **Ratliff F.** Georg von Békésy, June 3, 1899 – June 13, 1972. National Academy of Sciences, Biographical Memoirs 1976; 48: 25–49.
9. **Sodomka L, Sodomková Magd., Sodomková Mark.** Kronika Nobelových cen. Praha: Euromedia Group k. s. – Knižní klub 2004: 314.
10. **Wasson T. (ed.)** Nobel Prize Winners. New York: The H. W. Wilson Company 1987: 76–78.

MUDr. Pavel Čech
Kabinet dějin lékařství 3. LF UK
Ruská 87, 100 00 Praha 10
e-mail: pavel.cech@lf3.cuni.cz