

# ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH

ČAS. LÉK. ČES., 145  
2006, č. 2, s. 85–168  
CLC EAL 145 (4)  
85–168 (2006)

INDEXED IN:  
EMBASE/Excerpta Medica  
MEDLINE/Index Medicus  
INIS Atomindex  
CHEMICAL ABSTRACTS  
Excerptováno v Bibliographia  
medica czechoslovaca

ROČNÍK 145 / 2006, č. 2

## VEDOUcí REDAKTOR

*Doc. MUDr. Petr Bartůněk, CSc.*  
IV. interní klinika 1. LF UK a VFN  
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

## REDAKČNÍ RADA

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

*Prof. MUDr. Jaroslav Blabůš, DrSc.*  
ÚVN, 169 02 Praha 6

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

*Prof. MUDr. Evžen Čech, DrSc.*  
Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN  
Apolinářská 18, 128 08 Praha 2

*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

*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 Holčák, DrSc.*  
Ústav sociálního lékařství LF MU  
Komenského nám. 2, 662 43 Brno

*Prof. MUDr. Zbyněk Hrnčíř, DrSc.*  
II. interní klinika LF UK a FN  
Pospíšilova 13, 500 05 Hradec Králové

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

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

*Doc. MUDr. Josef Kopecký, DrSc.*  
Zdravotně sociální fakulta Ostravské univerzity  
Syllabova 19, 703 00 Ostrava - Zábřeh

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

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

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

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

*Doc. MUDr. Petr Smolík, CSc.*  
Psychiatrická klinika LF UK a FN  
500 05 Hradec Králové

*Prof. MUDr. Martin Vizek, CSc.*  
Ústav patologické fyziologie 2. LF UK  
Plzeňská 130/221, 150 00 Praha 5

*Prof. MUDr. Eduard Zvěřina, DrSc.*  
Klinika ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FNM  
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 Martásek, DrSc.*  
Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN  
Ke Karlovu 2, 121 09 Praha 2

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

*Prof. MUDr. Marie Pešková, DrSc.*  
I. chirurgická klinika 1. LF UK a VFN  
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

**OBSAH**

**Úvodník**  
 Goetz P.: Historie lékařské genetiky v České republice ..... 88

**Přehledové články**  
 Čapek P., Brdička R.: Hypertrophic Cardiomyopathy ..... 93  
 Komentář Veselka J. .... 96  
 Brdička R., Beránek M., Čimburová M., Dvořáčková J., Dvořáková D., Hájková J., Haškovec C., Kebrálová V., Karas M., Kratochvílová A., Lošan F., Macek M. jr., Musil F., Putzová M., Rožmanová Š., Riedlová P., Safrová M., Scheinost O., Štolba P., Trka J., Vaněček T., Vrtěl R.: Frekvenční pohled na vyšetření odchylek genu ..... 98  
 Habart D.: Nové obzory v léčbě hemofilie – rekombinantní a transgenní koncentráty, genová léčba a modifikované koagulační faktory ..... 104  
 Pánková R.: Psychosomatické přístupy v dermatovenerologii ..... 112  
 Komentář Barták P. .... 115  
 Komentář Honzák R. .... 116

**Původní práce**  
 Vevera J.: Cholesterol, násilí a sebevraždnost – příběh plný omylů ..... 118  
 Komentář Zeman M. .... 123  
 Komentář Smolík P. .... 125  
 Vraná M., Dobrovolná M., Cetkovský P., Nazarová S., Vondráčková H., Sedláček P.: Analýza HLA-dpbl genu u transplantací hematopoetických kmenových buněk ..... 126  
 Vrtěl R., Vodička R., Šantavá A., Šantavý J., Krejčířiková E.: Prenatální diagnostika tuberózní sklerózy založená na znalosti kauzální mutace ..... 130  
 Vodička R., Vrtěl R., Procháčka M., Šantavá A., Dušek L., Vrbická D., Singh R., Krejčířiková E., Schneiderová E., Šantavý J.: Analýza volné fetální DNA v maternální plazmě s využitím STR lokusů ..... 133  
 Seemanová E., Jarolím P., Seeman P., Varon R., Sperling K.: Zvýšené riziko malignit u heterozygotů v rodinách pacientů s Nijmegen breakage syndromem ..... 138

Vašků V., Bienertová-Vašků J., Pávková-Goldbergová M., Semrádová V., Vašků A.: Asociace variant polymorfismů v genu pro endotelin-1 (EDN1) s terapií u pacientů s kožními T-lymfomy ..... 144  
 Vašků A., Špinarová L., Pávková-Goldbergová M., Špinar J., Souček M., Vítovec J.: Příspěvek k farmakogenetice chronického srdečního selhání – betablokátory ..... 148  
 Komentář Linhart A. .... 152  
 Tisoňová J., Magulová L., Göbšová M., Wawruch M., Laššánová M., Božeková L., Křiška M.: Konzultační činnost dvou slovenských center při farmakoterapii v graviditě a laktácii ..... 154  
 Komentář Perlík F. .... 158  
 Komentář Hájek Z. .... 159

**Kazuistika**  
 Spáčil J., Hradec J., Král J.: Opakované embolizace do periferních tepen z plicní metastázy choriokarcinomu ..... 160

**Diskuzní příspěvek**  
 Lebl J.: Konfrontace s fenoménem IF ..... 162  
 Hořejší J.: Víte ještě, co čtete? ..... 163

**Sjezdy**  
 Janků F., Petruželka L.: Novinky z 13. evropské konference o rakovině (ECCO-13) ..... 165

**Osobní zprávy** ..... 143  
**Knihy** ..... 92, 103, 117, 132  
**Nejvýznamnější osobnosti pražské lékařské fakulty**  
 Svobodný P.: František Burian ..... 168

**CONTENTS**

(No. 2, 3rd February 2006) Journal of Czech Physicians

**Editorial**  
 Goetz P.: History of Medical Genetics in the Czech Republic ..... 88

**Review Articles**  
 Čapek P., Brdička R.: Hypertrophic Cardiomyopathy ..... 93  
 Commentary Veselka J. .... 96  
 Brdička R., Beránek M., Čimburová M., Dvořáčková J., Dvořáková D., Hájková J., Haškovec C., Kebrálová V., Karas M., Kratochvílová A., Lošan F., Macek M. jr., Musil F., Putzová M., Rožmanová Š., Riedlová P., Safrová M., Scheinost O., Štolba P., Trka J., Vaněček T., Vrtěl R.: Frequentational View on the Genome Changes Testing ..... 98  
 Habart D.: New Approaches to Haemophilia Treatment – Recombinant and Transgenic Concentrates, Gene Therapy and Engineered Coagulation Factors ..... 104  
 Pánková R.: Psychosomatic Approach in Dermatovenerology ..... 112  
 Commentary Barták P. .... 115  
 Commentary Honzák R. .... 116

**Original Articles**  
 Vevera J.: Cholesterol, Violence and Suicidality – History of Errors ..... 118  
 Commentary Zeman M. .... 123  
 Commentary Smolík P. .... 125  
 Vraná M., Dobrovolná M., Cetkovský P., Nazarová S., Vondráčková H., Sedláček P.: HLA-DPB1 Gene Analysis in Haematopoietic Stem Cell Transplantations ..... 126  
 Vrtěl R., Vodička R., Šantavá A., Šantavý J., Krejčířiková E.: Prenatal Diagnostics of Tuberous Sclerosis Based on Causal Mutation Knowledge ..... 130  
 Vodička R., Vrtěl R., Procháčka M., Šantavá A., Dušek L., Vrbická D., Singh R., Krejčířiková E., Schneiderová E., Šantavý J.: Analysis of Free Foetal DNA in Maternal Plasma Using STR Loci ..... 133  
 Seemanová E., Jarolím P., Seeman P., Varon R., Sperling K.: Increased Risk of Malignancies in Heterozygotes in Families of Patients with Nijmegen Breakage Syndrome ..... 138

Vašků V., Bienertová-Vašků J., Pávková-Goldbergová M., Semrádová V., Vašků A.: Association of Polymorphic Variants in Endothelin-1 (EDN1) Genes with the Therapy of Patients with Cutaneous T-cell Lymphomas ..... 144  
 Vašků A., Špinarová L., Pávková-Goldbergová M., Špinar J., Souček M., Vítovec J.: Pharmacogenetics of Chronic Heart Failure – Beta Blockers ..... 148  
 Commentary Linhart A. .... 152  
 Tisoňová J., Magulová L., Göbšová M., Wawruch M., Laššánová M., Božeková L., Křiška M.: Consultation Activity of Two Slovak Centres for Pharmacotherapy During Pregnancy and Lactation ..... 154  
 Commentary Perlík F. .... 158  
 Commentary Hájek Z. .... 159

**Case Reports**  
 Spáčil J., Hradec J., Král J.: Recurrent Peripheral Arterial Embolism from Metastatic Lung Choriocarcinoma ..... 160

**Discussions**  
 Lebl J.: Confrontation with IF Phenomenon ..... 162  
 Hořejší J.: Do You Still Know, what You Read? ..... 163

**Congresses**  
 Janků F., Petruželka L.: News from the 13th European Cancer Conference (ECCO-13) ..... 165

**Personal News** ..... 143  
**Books** ..... 92, 103, 117, 132  
**The Most Eminent Personalities of the Prague Medical Faculty**  
 Svobodný P.: František Burian ..... 168

<http://www.clsjep.cz>

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2006

**ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH**

Vydává Česká lékařská společnost J: Ev. Purkyně, Sokolská 31, 120 26 Praha 2.  
 Vedoucí redaktor doc. MUDr. Petr Bartůněk, CSc. Odpovědná redaktorka Mgr. Helena Glezgová.

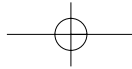
**Příspěvky do časopisu lékařů českých procházejí zdvojeným recenzním řízením.**  
**Articles published in the Journal of the Czech Physicians subject to double review.**

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

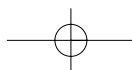
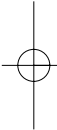
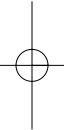
Rozšiřuje: V České republice Nakladatelství Olympia, a.s., Praha, do zahraničí (kromě SR) – Myris Trade s.r.o., V Štíhlách 1311/3, P.O. Box 2, 142 01 Praha 4, ve Slovenské republice Mediaprint-Kapa Pressegross, a.s. oddelenie inej formy predaja - P.O. BOX 183, Vajnorská 137, 831 04 Bratislava, tel.: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

Vychází 12x ročně. Předplatné na rok 1152 Kč (1560 Sk), jednotlivé číslo 96 Kč (130 Sk).  
 Informace o předplatném podává a objednávkou českých předplatitelů přijímá: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel.: 296 181 805 – Jana Špalová, e-mail: spalova@cls.cz  
 Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávkou přijímá: Inzertní oddělení ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel.: 224 266 253, tel./fax: 224 266 265, e-mail: ntsinzerce@cls.cz  
 Registrační značka MK ČR E 77.

Rukopisy zasílejte na adresu doc. MUDr. Petr Bartůněk, CSc., IV. interní klinika I. LF UK a VFN, U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2.  
 Rukopis předán do výroby dne 12. 1. 2006. Zasláné příspěvky se nevracejí, jsou archivovány ČSL JEP. Vydavatel získá otiskem příspěvku vyloučné nakladatelské právo k jejich užití. Otiskované 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 fotokopii, nahrávek, informačních databází na mechanických nosičích, bez písemného souhlasu vlastníka autorských práv a vydavatelského oprávnění. Zpracování pro internet provádí: NT Servis s. r.o., U Kněžské louky 2124/53, 130 00 Praha 3, tel.: 284 818 342-3, fax: 284 820 966, e-mail: ntservis@ntservis.cz, internet: www.ntservis.cz



# Zentiva inz pí. Klobásová



ÚVODNÍK

# Historie lékařské genetiky v České republice

Goetz P.

*Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FNM, Praha  
Společnost lékařské genetiky České lékařské společnosti JEP, Praha*

## SOUHRN

Je prezentována historie lékařské genetiky v našich zemích od dob Mendelových. Uvedeny vlivy zneužití genetiky v předválečném a válečném fašistickém Německu a likvidace genetiky v poválečném komunistickém Rusku na rozvoj genetiky a chování genetiků u nás. Je popsáno další budování české moderní lékařské genetiky, role Společnosti lékařské genetiky České lékařské společnosti J. Ev. Purkyně a zásluhy významných genetiků v organizačním, odborném i výukovém zkvalitňování oboru. Charakterizována síť genetických pracovišť a poskytovaných služeb v našem státě i v evropském kontextu a začlenění české lékařské genetiky do moderní zdravotnické péče.

**Klíčová slova:** J. G. Mendel, zneužití eugeniky, lisenkismus, Společnost lékařské genetiky, genetická zdravotní péče.

## SUMMARY

*Goetz P.: History of Medical Genetics in the Czech Republic*

History of the medical genetics in Bohemia since the period of Mendel is described. Effects of the abuse of genetics in Germany before and during the Second World War as well as consequences of the liquidation of genetics in the post-war Russia on the development of genetics and the activity of geneticist in the Czech countries are documented. The paper gives information on the progress of modern Czech medical genetics, the role of the Society of Medical Genetics of the Czech Medical Association and the credit the eminent geneticist achieved in the organization and advancement of this specialization. The network of genetic laboratories and the list of available services in the Czech Republic are described in the context of model health care in contemporary Europe.

**Key words:** J. G. Mendel, misuse of eugenics, lisenkism, Society of Medical Genetics, genetics in health care.

Po.

Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 88–92.

## ZAVAZUJÍCÍ KORENY

Tradičně velmi významná přírodovědecká a kulturní brněnská komunita a stimulující vědecké prostředí brněnského augustiniánského kláštera se nepochybně podstatnou měrou podílelo na formování vědecké osobnosti a zaměření moravského kněze a středoškolského profesora Gregora Mendela (1822–1884). Narodil se moravské matce a rakouskému otci v Hynčicích u Nového Jičína, při křtu dostal jméno Johan, jméno Gregor přijal při vstupu do brněnského augustiniánského kláštera, který posléze jako opat i prelát řídil (1). V letech 1857–1863 provedl 20 000 pokusů s křížením hrachu, u kterého sledoval přesně stanovené znaky (tvar semen – hladká, svraskalá, barvy květů – fialové, bílé atd.) v potomstvu kříženců a poměry jejich nositelů (2). Objevil, že se na potomstvo nepředávají znaky, ale „elementy“, které projevy znaků řídí. S výsledky své práce seznámil brněnské přírodovědce v roce 1865, přednáška vyšla tiskem v brněnském přírodovědném periodiku v roce 1866 (3). Jeho práce zůstala 35 let téměř nepovšimnuta. Příčin bylo několik. Přestože dnes víme, že brněnský časopis s Mendelovou prací byl v rámci časopiseckých výměn distribuován do 115 univerzit a vědeckých společností v Evropě a Spojených státech amerických, úroveň tehdejšího biologického poznání neumožňovala dostatečně pochopit a ocenit Mendelovy objevy. Nebyla známa existence chromozómů, které nesou „elementy“, tj. dnešním jazykem geny, i způsob dělení

buněčných jader, byly poznány až v poslední čtvrtině 19. století. V podstatě tragická byla i korespondence Mendela s tehdejšími slavnými mnichovskými botaniky Nägelim, který Mendelově práci nerozuměl, nebo jí přímo oponoval. Považoval Mendela za prostoduchého, snaživého amatéra, takže ho ani nemotivoval, aby dále publikoval své výsledky v prestižnějších časopisech, a nešťastně mu doporučil, aby své pokusy zopakoval na jiném rostlinném modelu – jeřábku. Výsledky pokusů s jeřábkem Mendelovi nepotvrdily jeho předchozí závěry získané s křížením hrachu. Také nemohly a dnes víme, proč. Sledované geny jsou u jeřábků ve vazbě, takže segregací poměry sledovaných znaků v potomstvu jsou naprosto jiné, ve srovnání se vzájemně nevázanými – volně kombinovatelnými příslušnými geny u hrachu. Nezdar s jeřábkem způsobil, že Mendel o validitě svých předchozích výsledků pochyboval a dalších pokusů zanechal. Přispěly k tomu i povinnosti související s vedením augustiniánského kláštera (2).

Teprve v roce 1900 získali současně Holanďan Hugo de Vries, Němec Carl Correns a Rakušan Erich von Tschermak výsledky, které byly v dokonalé shodě s Mendelovými poznatky a kterých se v literatuře dopátrali a Mendelovu prioritu uznali. Znovuobjevení Mendelových zákonů v roce 1900 je tedy považováno za počátek rozvoje genetiky, nicméně náš moravsko-rakouský rodák Gregor Mendel je na celém světě uznáván jako zakladatel a otec moderní genetiky.

prof. MUDr. Petr Goetz, CSc.  
150 06 Praha 5, V Úvalu 84  
fax: +420 224 433 503, e-mail: petr.goetz@lfmotol.cuni.cz

Velmi rychle se prokázalo, že také některé lidské znaky/onemocnění (tzv. monogenní) se dědí jednoduše mendelisticky. Pionýrem v této oblasti je britský biolog William Bateson (1861–1926), který upozornil že Garrodovy vrozené poruchy metabolismu odpovídají recesivnímu způsobu dědičnosti, prokázal dominantní dědičnost u brachydaktylie a dalších poruch a otevřel cestu rozvoji lékařské genetiky v rozvinutých státech světa (4).

### POČÁTKY LÉKAŘSKÉ GENETIKY U NÁS

Ještě před znovuoobjevením Mendelových zákonů v roce 1891 vyšla česká publikace dr. Františka Laurina, řádného člena České akademie císaře Františka Josefa pro vědy, slovesnost a umění nazvaná Pokrevnosti a švagrovství. Za upozornění stojí fakt, že již tehdy používané rodokmenové značky a dělení generací, zřejmě převzaté a upravené z literatury, jsou prakticky shodné se současnými. Zákonitosti genetiky a jejich první aplikace v praxi nepochybně ovlivnily vědecké zaměření profesora Vladislava Růžičky, přednosty Ústavu pro všeobecnou biologii a pokusnou morfologii české lékařské fakulty v Praze, který již v roce 1915 publikoval v Časopisu lékařů českých soubornou práci „O konstituci, dědičnosti u člověka a význam mendelismu pro eugeniku“ (5). V roce 1917 následovala Růžičkova moderní monografie „Dědičnost u člověka ve zdraví a nemoci“ (6). V roce 1923 následovala další rozsáhlá monografie téhož autora „Biologické základy eugeniky“, kde jednu z úvodních kapitol napsal brněnský dr. J. Kříženecký. V době vydání monografie byly značně rozšířené a propracované zásady eugeniky. Tento přístup byl charakterizován jako snahy o fyzické a duševní zlepšení lidstva a po zjištění, že zákonitosti dědičnosti jsou platné i pro člověka, rozšiřuje v roce 1911 J. Davenport definici eugeniky jako snahy o zúšlechťení lidstva dokonalejším křížením (7). Je třeba si uvědomit, že v té době byly pojmy jako antropologie, genetika člověka a eugenika často zaměňovány a od roku 1907 až do konce druhé světové války se všechny genetické společnosti na světě nazývaly „eugenické“ (8).

Česká Eugenická společnost byla založena v roce 1915. Její zásluhou byl vybudován Ústav pro národní eugeniku v Praze na Albertově, jehož činnost se rozvíjela od roku 1924 až do uzavření gestapem v roce 1941. Rozsah činnosti těchto institucí, dle tehdejších materiálů, zahrnoval „popis a rozbor přirozené měny obyvatelstva, a to jak po stránce kvantitativní, tak i kvalitativní, systematickým poklesem porodnosti, nežádoucími úkazy diference plodnosti, geneticko-statistickými studii o jednotlivých znacích populačně a eugenicky významných, jako o dlouhověkosti, o dědičnosti talentů a nadprůměrných vloh, i speciálními studii o populačním stavu a genetických vztazích některých úchylných konstitucí“. Bylo doporučováno zakládání předmanželských genetických poraden, diskutovány otázky sterilizace z genetických příčin. Po válce byla činnost Eugenické společnosti nakrátko obnovena. Čelnými představiteli Eugenické společnosti byli doc., později prof. B. Sekla, prof. J. Bělehrádek, prof. J. Drachovský, doc. V. Bergauer. Z dostupných materiálů je zřejmé, že činnost zmíněných institucí nepodporovala a ani neospravedlňovala zneužití genetiky ve smyslu rasové hygieny, rasových zákonů apod. Nacházíme dokonce kritický článek doc. V. Bergauera, tehdejšího ředitele Československého ústavu pro národní eugeniku v Praze. Sám byl později jednou z obětí rasové hygieny a konečného řešení židovské otázky; v roce 1942 zahynul v koncentračním táboře.

K předválečným zakladatelům a neohroženým zastáncům lékařské genetiky i v následujících těžkých dobách nepochybně patří prof. RNDr. a MUDr. B. Sekla, DrSc., dlouholetý přednosta Biologického ústavu Fakulty všeobecného lékařství UK v Praze (s přestávkami kopírujícími období vědecké a politické nesvobody). Seklovy zásadní monografie „Dědičnost v přírodě a společnosti“

vydané v roce 1937 a „Dědičné zdraví“ (1941) se staly na další tři desetiletí hlavními publikacemi s lékařským zaměřením (5). Stimulovaly, kromě jiného, i založení první genetické poradny v Praze.

### ZHOUBNÉ VLIVY ZNEUŽITÍ GENETIKY

Ve 30. a 50. letech minulého století došlo ve dvou totalitních státech k zneužití genetiky s tragickými následky, které negativně ovlivnily i rozvoj genetiky u nás.

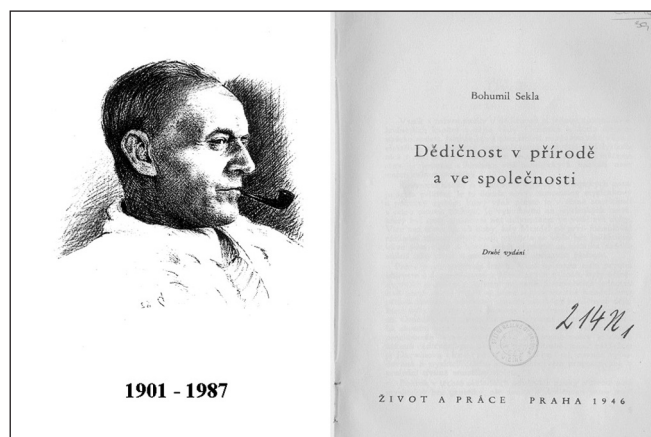
Tehdejší poznatky o genetické podmíněnosti normálních i abnormálních znaků (například mentální retardace, alkoholismus, kriminalita) spolu s eugenickým hnutím byly zneužity ve fašistickém Německu v podobě rasové teorie a rasové hygieny. Jedním z ideologických a pseudovědeckých zakladatelů byl proslavený anatom a antropolog prof. E. Fisher (jeho asistentem byl i dr. Mengele), přednosta Ústavu pro antropologii, lidskou genetiku a eugeniku v Berlíně. Ve své monografii „Principy lidské dědičnosti a rasové hygieny“, rozpracoval teorii o geneticky podmíněné nerovnocennosti lidských ras s nadřazeností rasy arijské, nordické. Vše, co „kvalitu“ této rasy ohrožovalo (vadné geny postižených jedinců, zejména židovské geny) je třeba „prostředky“ negativní eugeniky eliminovat. Je prokázáno, že ze zmíněné monografie čerpal Hitler ve své publikaci Mein Kampf. Totalitní fašistický režim následně zajistil povinné sterilizace (ale často o nich pacienti ani nevěděli) postižených, „geneticky méněcenných“ jedinců (do roku 1933 provedeno 400 000 sterilizací), o nichž bylo rozhodováno soudně, dle sterilizačního zákona, za přítomnosti jmenovaných lékařských „znalců“. V roce 1936 byla založena Společnost pro rasovou hygienu, která posléze měla 60 poboček po celém Německu. Vyvrcholením zneužití genetiky a rasové hygieny byl antisemitismus s obudným konečným řešením židovské otázky a následným holocaustem 6 milionů Židů ve vyhlazovacích koncentračních táborech. Nepochybná vina německých genetiků na těchto tragických událostech spočívala v tom, že buď ze strachu, kariérizmu, někteří snad i z přesvědčení, zdůvodňovali rasovou teorii i hygienu.

O postojích českých genetiků jsme se již zmínili, je však třeba připomenout, že profesor Sekla ve svém druhém vydání „Dědičnosti v přírodě a společnosti“ v roce 1946 nejen rasismus odsoudil, ale i své předchozí postoje charakterizuje slovy: „Jest mi velkým dosti učiněním, že zejména v částech, jež jednájí o nepřijatelných důsledcích rasismu, záleží rozdíl proti prvnímu vydání (1937) téměř jen v tom, že tyto partie knihy byly převedeny do minulého času. Výsledek války nutí téměř k závěru, že falšování vědecké pravdy a podvodné napodobení vědeckého postoje, jehož jsme byli svědky v této oblasti, bylo obecnou charakteristikou systému, který byl právě poražen a že právě tato jeho charakteristika byla jednou z příčin jeho pádu“ (obr. 1).

Ke zneužití genetiky a eugeniky však docházelo i dalších státech světa, například ve Spojených státech amerických, kde byl založen Eugenický úřad o 200 zaměstnancích, který registroval „geneticky nekvalitní“ jedince. Bylo také sterilizováno 25 000 Američanů s „nežádoucími geny k přenosu do dalších generací“ a proklamováno, že „obecné blaho je nadřazeno právům jedince“.

Komunistické Rusko německé rasistické a „eugenické“ aktivity odmítlo, ale zároveň odmítlo i genetiku jako takovou. Sovětský botanik a agrární biolog profesor T. D. Lysenko (přítel Stalinův) na zasedání Leninovy všesvazové akademie zemědělských věd 31. července 1948 ve svém referátu „O stavu současné biologie“ odmítl Mendelovy zákony dědičnosti, preferoval dědičnost získaných znaků a určující vliv zevního prostředí, popřel geny i chromozomy („chromozóm je artefakt buržoazních pavědců“) apod. Následovně Lysenko odmítl i Virchowovu buněčnou teorii (podvodné pokusy O. B. Lepešinské – vznik buněk z nebuněčného materiálu). Tragédie lysenkismu nespočívá v odlišných vědeckých názorech,





Obr. 1. Profesor MUDr. RNDr. Bohumil Sekla, DrSc.

ale ve způsobu, jakým byly mocensky prosazované. Lysenkisti na místo vědecké argumentace a diskuze používali vůči svým odpůrcům prostředky totalitní komunistické moci, někteří světově proslulí genetici dokonce pro své vědecké odlišné názory zahynuli ve Stalinových gulazích (prof. Vavilov). Těmito způsoby byla v sovětském Rusku na mnoho let likvidována genetika a další biologické obory.

U nás období lysenkismu v 50. letech neprobíhalo s tak těžkými represemi jako v Sovětském svazu, přesto testovalo vědecké a morální kvality našich genetiků. Málokdo obstál. Byl to opět profesor Sekla, jediný z význačných biologů-genetiků, který nikdy lysenkismus nejen nepřijal, ale i otevřeně kritizoval. V důsledku toho byl zbaven vedení Biologického ústavu Fakulty všeobecného lékařství v Praze, nesměl přednášet studentům. Nicméně i v období lysenkismu dosáhli čeští imunogenetici mimořádně vynikajícího objevu. Skupina dr. M. Haška z Československé akademie věd formulovala zákony imunologické tolerance ve stejné době jako nositel Nobelovy ceny prof. P. B. Medawar. Naši, v té době ještě lysenkisti, však své výsledky publikovali v českém písemnictví.

### REHABILITACE GENETIKY, DOHÁNĚNÍ ZTRACENÝCH LET

Ani po kritice lysenkismu v 60. letech minulého století se však u nás organizovaná lékařská genetika nevyvíjela zcela adekvátně. Slibné začátky rozvoje po letech zavržení datujeme do roku 1963.

Byla ustavena Komise pro lékařskou genetiku, kterou vzal pod ochranná křídla moderně koncepčně uvažující pražský profesor J. Charvát, DrSc. Mezi zakládajícími členy byli zejména pražští genetici prof. B. Sekla, doc. M. Černý, prof. O. Hněvkovský, doc. B. Blehová, dr. R. Chrz, dr. J. Neuwirth, dr. J. Šobra a další. Bylo to období zachycující světový rozvoj genetického poradenství a chromozomální analýzy – klinické cytogenetiky. Komisi začlenil profesor Charvát do tehdejší Endokrinologické společnosti.

Velmi aktivní byli kliničtí a experimentální cytogenetici. Již v roce 1963 založili Cytogenetickou sekci Československé biologické společnosti ČSAV, která velmi intenzivně pracuje dosud. Zakládajícími členy byli brněnští doc. D. Soudek, dr. M. Vrba, hradecký dr. J. Žižka, doc. V. Izakovič z Bratislavy a Pražáci doc. M. Macek a dr. R. Chrz.

Samostatná Společnost lékařské genetiky (SLG) České lékařské společnosti J. Ev. Purkyně byla založena v roce 1967. Prvým předsedou byl zvolen profesor Sekla, vědeckým tajemníkem doc. M. Černý. V dubnu 1970 však přišly první normalizační změny. Z výboru musel odejít předseda, jako signatář „Dvou tisíc slov“, i tajemník, který byl vyloučen z KSČ. Nakrátko převzal předsed-

nictví vynikající lékařský genetik prof. Z. Brunecký z Brna, ale i ten byl z politických důvodů nepřijatelný. Vystřídal ho představitel plzeňské genetické internistické školy prof. J. Sova. Ani on však nebyl ze stejných důvodů tolerován a musel ukončit svou funkci v roce 1972. Novým předsedou Společnosti byl pak po dlouhá léta prof. O. Štark, přednosta Biologického ústavu Fakulty všeobecného lékařství v Praze, vědeckým tajemníkem doc. M. Macek, vedoucí Genetického oddělení Ústavu výzkumu vývoje dítěte pražské fakulty dětského lékařství (6).

Normalizace přinesla i v našem oboru emigrační vlnu. Odešli vynikající genetici, kteří se také v cizině skvěle uplatnili. Mám na mysli zejména manžele Genčíkovi z Bratislavy, doc. D. Soudka a prof. R. Laxovou z Brna, prof. J. Červenku z Prahy.

Když v lednu 1990 proběhly po mnoha letech první svobodné volby, stala se předsedkyní Společnosti lékařské genetiky prof. E. Seemanová a vědeckým tajemníkem doc. P. Goetz, oba z genetického ústavu 2. lékařské fakulty v Praze Motole. Od roku 1994 předsedal Společnosti po dvě volební období prof. J. Šantavý, přednosta Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Olomouci, vědeckým sekretářem zůstal po celé období prof. P. Goetz a s malými změnami celý výbor. V roce 2002 byl zvolen nový výbor Společnosti pod vedením prof. P. Goetze, novým sekretářem se stala RNDr. A. Oltová z Brněnského Oddělení lékařské genetiky.

Před založením Slovenské společnosti lékařské genetiky i po něm, koncem 60. let minulého století, čeští i slovenští genetici vždy velmi těsně spolupracovali. Vytvořil se funkční federální výbor, sjezdy byly celostátní, stejně jako konference a větší pracovní schůzky. I po rozdělení Československa kontakty a spolupráce pokračují. Mezi zakládajícími členy slovenského výboru Společnosti lékařské genetiky patřily známé osobnosti: prof. Vršanský, který byl i prvním předsedou, výborný genetik a cytogenetik doc. V. Izakovič, prof. A. Sršeň, dr. A. Tajmírová, doc. M. Ondřejčák, dr. P. Křížan a další.

Vytrvalá a důsledná organizační práce doc. M. Macka, vykrystalizovala v oficiální přijetí Koncepce lékařské genetiky již v roce 1970. Koncepce velmi moderní, kterou nebylo třeba příliš opravovat ani po 30 letech. Poslední novelizaci, za přispění výboru SLG, provedl prof. J. Šantavý.

Prvé genetické poradny a cytogenetické laboratoře vznikaly v 60. letech, konstituovala se první oddělení lékařské genetiky (na fakultě dětského lékařství – dr. M. Macek, dr. E. Seemanová, dr. P. Goetz), na fakultě všeobecného lékařství – doc. M. Černý, dr. R. Chrz, na lékařské fakultě v Brně – prof. Z. Brunecký, doc. D. Soudek, doc. R. Laxová). Podařilo se zachytit rozvoj stále přesnějších identifikačních metod chromozómů i nástup prenatalní cytogenetické diagnostiky. Přední světoví odborníci tohoto perspektivního oboru u nás opakovaně přednášeli. Rychle následovalo zakládání a rozvoj dalších oddělení lékařské genetiky, díky entuziasmu a organizačnímu úsilí genetiků v krajích.

Celosvětový explozivní a revoluční nárůst poznatků molekulární genetiky se stále se rozšiřujícími možnostmi studia vztahu genotypu a fenotypu a významnými výstupy medicínskými, zákonitě ovlivnil i naše genetiky. Nejprve pozvolna (metodická a finanční náročnost molekulárně genetických diagnostických postupů), ale velmi brzy lavinovitě, se DNA diagnostika a další molekulárně genetické metody rozšířily nejen do všech Ústavů/oddělení lékařské genetiky, ale i do dalších teoretických, klinických, soudních i kriminalistických laboratorních zařízení. Je třeba zmínit, že první DNA diagnostika u nás byla provedena a publikována v roce 1987 (9).

První celostátní sjezd SLG se konal v roce 1972 v Plzni a dále v 3–4letých intervalech v různých městech Čech, Moravy a Slovenska. Odborná úroveň sjezdů byla tradičně velmi dobrá – i v dobách složitých, kdy se organizátorům dařilo udržet kontakt se světem účastí zvaných zahraničních genetiků.

Je třeba zmínit se a vzdát dík řadě genetiků i negenetiků, kteří se různým způsobem zasloužili o odborný i organizační rozvoj klinické genetiky u nás. Kromě již v textu zmíněných jsou to pracovníci České (dříve Československé) akademie věd: prof. A. Lengerová, dr. M. Vojtišková, dr. R. Šrám, doc. J. Forejt. Na budování sítě oddělení/Ústavů lékařské genetiky v krajích se pionýrským způsobem podíleli doc. J. Žižka, dr. P. Balíček, dr. V. Jüttnerová (Hradec Králové), dr. M. Vrba, dr. Z. Kašpárková, dr. R. Gaillyová, dr. L. Foretová (Brno), prof. J. Šantavý, doc. A. Šantavá (Olomouc), doc. F. Lošan, dr. I. Šubrt (Plzeň), dr. K. Čutka, dr. E. Kantorová (České Budějovice) dr. J. Kofler (Ústí n/L.). Pražáků a Středočechů je celá řada: †doc. J. Kapras, †doc. F. Soukup, †doc. M. Soukupová, †prof. J. Šobra, prof. V. Křen, doc. D. Křenová, doc. M. Kohoutová, dr. J. Židovská, doc. A. Baxová, prof. R. Brdička, prof. K. Michalová, prof. M. Elleder, prof. J. Hyánek, prof. J. Zeman, doc. V. Kožich, prof. E. Seemanová, dr. M. Havlovicová, prof. Z. Sedláček, prof. M. Macek, prof. P. Goetz, dr. P. Gregor, dr. D. Stejskal, dr. E. Švagrová. Svou publikační a přednáškovou aktivitou obohacoval dění a vývoj klinické genetiky, až do dnešních dnů obávaný diskutér prof. J. Ev. Jirásek. Jedni z prvních, velmi těsně a efektivně spolupracujících odborníků v prenatalní diagnostice byli a jsou porodníci, jmenujme alespoň některé pionýry: prof. Z. Hájek, †prof. V. Fuchs, doc. P. Calda, dr. E. Kulovaný.

Je velmi obtížné zmínit všechny pracovníky, kteří se i v dobách složitých zasloužili o rozvoj klinické genetiky u nás. Omlouvám se za neúmyslná opomenutí, která nesnižují zásluhy a vynaložené úsilí těch, kteří nejsou uvedeni. Rozhodující je výsledek společného snažení, na který můžeme být i přes nejednoduchou historii hrdí. Je potěšující, že i v kontextu celoevropském je náš systém a výsledky genetické péče, výuky i výzkumu respektovaný, naše integrace do struktur EU probíhá bez závažných komplikací. V neposlední řadě je naší satisfakcí, že komunita českých lékařských genetiků představuje v současnosti společenství vzájemně vstřícně spolupracujících odborníků bez antagonismů a neférových praktik. Není to v naší době zdaleka obvyklé.

## VÝUKA

Prudký celosvětový rozvoj a význam klinické genetiky pro medicínu si vynutil i „genetizaci“ výukových sylabů českých lékařských fakult. Začátky se datují do roku 1965, resp. 1967, kdy na Fakultě všeobecného lékařství (dnes 1. LF UK) v Praze byl podstatně rozšířen sylabus biologie o základy genetiky s klinickými aplikacemi (prof. B. Sekla), na fakultě dětského lékařství (dnes 2. LF UK) se začala učit klinická genetika (dr. P. Goetz) v 5. ročníku curricula v rámci výuky pediatrie, zásluhou pochopení, předvídavosti a podpory prof. Houštky. V současné době se výuka genetiky koncentruje nejen do biologie v teoretické části studia, ale nejprogressivnější lékařské fakulty učí i klinickou genetiku v klinické části curricula nejen v řadě volitelných předmětů, ale i jako samostatný povinný předmět.

Systematická postgraduální výuka začala koncem 60. let, kdy byla v roce 1967 založena v Institutu pro další vzdělávání lékařů a farmaceutů v Praze Subkatedra lékařské genetiky při Katedře pediatrie. Původní klinické zaměření se postupně rozdělilo na dva směry: lékařský, připravující atestanty pro klinickou genetiku, a laboratorní se zaměřením na metody lékařské genetiky pro vysokoškolačky nelékaře. Zakladatelkou a dlouholetou vedoucí Subkatedry lékařské genetiky byla prof. M. Kučerová, která nejen „opatřila“ atestacemi úctyhodný počet lékařů i nelékařů, ale spolu se svými spolupracovníky (prim. P. Gregor, dr. J. Horáček) šířila i genetickou gramotnost v řadě oborů medicíny a zasloužila se podstatnou měrou o rozvoj klinické genetiky v našich zemích. V roce 2003 se původní subkatedra transformovala na samostatnou Katedru lékařské genetiky, sídlí v Motole, jejím novým přednostou se konkurzním řízením stal prof. P. Goetz. Za dobu postgraduální čin-

nosti subkatedry/katedry atestovalo více než 100 klinických genetiků-lékařů a více než 150 vysokoškolačků nelékařů.

Postgraduální ústav středně zdravotnických pracovníků v Brně vyškolil a genetickými atestacemi opatřil rozsáhlou řadu genetikých sester a laborantek/laborantů, našich nepostradatelných spolupracovníků. Upřímný dík patří sestře Novákové, která byla a je duší postgraduální výuky středně zdravotnických pracovníků-genetiků.

## AKTIVITY A SOUČASNÝ STAV

Původně homogenní struktura, pokud jde o zaměření členů Společnosti lékařské genetiky, se s postupujícím vývojem a specializací oboru začala štěpit ([www.czechia.com/slg](http://www.czechia.com/slg)). Odborná specializace části členů SLG vyústila v ustavení Sekce molekulární genetiky, pod současným vedením prof. M. Macka, dr. L. Foretové, dr. L. Kozáka. Velmi úzké jsou dlouhodobé (od založení v roce 1964) vztahy s Cytogenetickou sekcí AV ČR, vedené místopředsedkyní SLG prof. K. Michalovou. Velmi aktivní je Sekce biochemické genetiky (prof. J. Zeman, doc. V. Kožich). Spolupráce SLG s Českou gynekologickou a porodnickou společností je tradiční, ať již na úrovni spolupráce SLG se Sekcí fetální medicíny (prof. J. Šantavý), Sekcí ultrazvukové diagnostiky (doc. P. Calda) nebo na úrovni dalších společných akcí obou společností.

Nemůže být sporu o tom, že minulé i současné aktivity SLG jsou garantem kontinuálního rozvoje odborné i organizační úrovně oboru. Zejména je potěšitelný stále se zvyšující počet mladých účastníků. Kromě pořádání sjezdů a sympozií (i s mezinárodní účastí) jsou to vysoce odborně i organizačně ceněné výroční konference Cytogenetické sekce Biologické společnosti ČAV (v letošním roce již 38., za spoluúčasti SLG). Stejně vysoké renomé mají Konference klinické a biochemické genetiky hyperlipoproteinémií, jejichž tradici založil zesnulý prof. J. Šobra, pracovní dny dědičných metabolických poruch konané od roku 1970 (zakladatel prof. J. Hyánek). Klinicko-genetické Kaprasovy dny (dr. P. Gregor, dr. J. Židovská), zaměřené na pestrou škálu problémů zasahujících do všech oblastí medicíny, stejně jako pravidelné prosincové pracovní dny molekulární genetiky pořádané prof. R. Brdičkou mají imponující návštěvnost i diskuzi. Narůstající nové poznatky onkogenetické a jejich významný klinický impakt v oblasti hematologických i solidních malignit jsou prezentovány na pravidelných Onkogenetických pracovních dnech (prof. P. Goetz) a dalších akcích s mezinárodní účastí (prof. K. Michalová, dr. L. Foretová). Také oblast prenatalní a preimplantační genetické diagnostiky je opakovaně prezentována a často bouřlivě diskutována na samostatných akcích SLG (prof. J. Šantavý, dr. R. Gaillyová) nebo společně s porodníky nebo cytogenetiky (doc. P. Calda, prof. J. Rubeš). V posledních letech se zvyšuje zájem členů sekce asistované reprodukce České gynekologické a porodnické společnosti o spolupráci s genetiky.

Výbor SLG se zúčastnil i přípravy Zákona o zdravotní péči i řešení některých etických problémů genetiky.

Lékařská genetika patří u nás, tak jako v dalších 15 státech EU, k samostatným medicínským oborům. Podařilo se vybudovat síť více než 40 Ústavů/oddělení lékařské genetiky, převážně státních, které zajišťují genetickou péči pro naši populaci. Spektrum poskytovaných služeb (genetické poradenství, cytogenetická vyšetření, prenatalní diagnostika, molekulárně genetická vyšetření a další) jsou srovnatelná s ostatními evropskými zeměmi, se kterými probíhá v indikovaných případech velmi dobrá spolupráce.

Nepochybným mezinárodním uznáním úrovně české lékařské genetiky je naše zastoupení ve výboru Evropské společnosti lidské genetiky (prof. M. Macek), jejímž jsme kolektivním členem a uspořádání Výroční konference Evropské společnosti lidské genetiky v loňském roce v Praze (prof. M. Macek byl hlavním organizátorem a garantem).

Velmi efektivní jsou centra a instituce s národní i nadnárodní působností, například Centrum cystické fibrózy, Neurogenetické centrum, Centrum nádorové cytogenetiky, Oddělení nádorové epidemiologie a nádorové genetiky, Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, Centrum molekulární biologie a genové terapie, Centrum reprodukční medicíny, Ústav hematologie a krevní transfuze, Ústav vrozených metabolických vad, Laboratoř mitochondriálních onemocnění a další. Interní a externí kontroly kvality genetických vyšetření jsou organizovány (prof. R. Brdička, prof. M. Macek) ve spolupráci s mezinárodními organizacemi EMQUON, ECA, CF Thematic network a dalšími.

Ocenění významu lékařské genetiky pro zdravotnictví je možno spatřovat také v intermitentním zastoupení (jak se střídali ministři) genetiků (prof. P. Goetz) ve vědeckých radách Ministerstva zdravotnictví ČR.

Mezinárodní kolaborativní studie prokazují, že v současné době potřebuje 10 % populace v některém období života genetické zdravotnické služby. Toto procento se bude nepochybně v budoucnosti, s dalším nárůstem zejména molekulárně genetických poznatků a možností, zvyšovat. Nicméně současná síť našich genetických pracovišť, jejich úroveň odborná, personální, metodická i přístrojová, srovnatelná s ostatními evropskými státy, představuje velmi solidní základ pro kvalitní zajištění zdravotnické genetické péče pro naši populaci (10).

## LITERATURA

1. **Nečásek, J. :** Genetika. Praha, Scientia, 1997, 112 s.
2. **Keynes, M., Edwards, A. W. F., Peel, R.:** A century of Mendelism in human genetics. London, New York, Washington, CRC Press, 2004, 161 s.
3. **Mendel, G.:** Versuche über Pflanzen-Hybriden. Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn. Abhandlungen IV Band 1865. Brünn: Im Verlage des Vereines, 1866, 4, s. 3-47.
4. **Harper, P. S.:** Landmarks in medical genetics. Oxford, New York, Oxford Press, 2004, 308 s.
5. **Černý, M.:** Lékařská genetiky. Praha, Státní zdravotnické nakladatelství, 1967, 518 s.
6. **Šantavý, J.:** Společnost lékařské genetiky ČLS JEP, Storočenka, Historie České lékařské společnosti J. Ev. Purkyně. ČLS JEP, Praha, 2005, s. 97-101.
7. **Hrubý, K.:** Genetika. Praha, Nakladatelství Československé akademie věd, 1961, s. 649.
8. **Kahn, A.:** Genetika, medicína a společnost. Záznam přednášky přednesené ve Francouzském institutu v Praze. Britské listy, 15.7. 2003.
9. **Sedláček, Z., Macek, M., Malcolm, S. et al.:** Prvé zkušenosti s molekulárně genetickou diagnostikou hemofilie A. Čas. Lék. čes., 1987, 126, s. 682-685.
10. **Goetz, P.:** Medical Genetics in the Czech Republic, European Society of Human Genetics Newsletter, 2004, 11, s. 1-3.

## KNIHY

### Svačina, Š. (eds.): TRENDY SOUDOBÉ DIABETOLOGIE – SVAZEK 10

Praha, Galén, 2005, 225 s. Vydání první, formát 230x165 mm, vázané, černobílé, cena 290 Kč. ISBN 80-7282-359-1.

Editorem jubilejního, desátého svazku Trendů soudobé diabetologie byl namísto profesorky MUDr. Jindřišky Perušičové, DrSc., (která byla editorem svazků 1-9 a patří jí za to poděkování nakladatelství, autorů i čtenářů) profesor MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., MBA. U dalších svazků bude editorství cirkulovat. Do tohoto čísla přispěla řada našich předních diabetologů. Možná i proto se mohla objevit řada témat v širokém záběru – od patofyziologie přes kliniku až k perspektivám terapie diabetu. Vybraná témata jsou také v souladu s posláním knihovny představovat trendy a novinky oboru.

Vlastní odborný text tvoří 7 samostatných kapitol. V první prof. J. Škrha informuje o proble-

matice diferenciacie pankreatických buněk a perspektivách léčby diabetu, o normální ontogenezi a neogenezi Langerhansových ostrůvků, regeneraci a apoptóze B buněk, ve druhé kapitole referuje doc. F. Saudek o současné transplantaci ledviny a pankreatu, izolované transplantaci pankreatu i izolovaných Langerhansových ostrůvků a regeneraci B buněk. Třetí kapitola z pera prim. A. Šmahelové probírá význam necholesterolových sterolů, lipidů a steroidů u diabetes mellitus 2. typu a diabetické dyslipoproteinémie a hypotézu Simonenové. Čtvrtá kapitola se věnuje metabolickému syndromu a fyzické aktivitě. Napsali ji MUDr. R. Doležalová a docent M. Haluzík. Nestor naší diabetologie, prof. J. Rybka, zpracoval čistě klinické téma Hospitalizovaný diabetik, v němž mohl uplatnit svoje mnohaleté zkušenosti. Jeho text je informačně hodnotný, doprovázený četnými tabulkami. V předposlední kapitole se zamýšlí prof. M. Fried, prof. Š. Svačina a MUDr. Klára Owen nad přínosem bariatrické chirurgie při redukci hmotnosti extrémně obézních diabetiků. Popisuje vlastní techniku

operačních výkonů a jejich indikace i kontraindikace. Autorem poslední, sedmé kapitoly, je prof. Š. Svačina. V tématu Nové formy inzulínoterapie seznamuje čtenáře s netradičními aplikacemi inzulínu, zvláště s inhalační, transdermální a tabletovou aplikací. Téma vždy bylo a je i v současnosti velmi aktuální: Čte se dobře a je i zajímavě napsané.

Doplňkem textu je 50 tabulek a 23 černobílých obrázků. Za každou kapitolou je uvedena použitá literatura. Je aktuální a její rozsah je přiměřený.

**Co napsat závěrem? Jubilejní, desátý svazek Trendů soudobé diabetologie se skutečně podařil. Zasloužil se o to jak výběr prestižních autorů, tak i mimořádně zajímavých a aktuálních témat. Snad nevyzrazují „redakční tajemství“, když napíší, že editorem 11. Trendů soudobé diabetologie bude prof. MUDr. Tereza Pelikánová, DrSc.**

Jan Petrášek  
128 08 Praha 2, U Nemocnice 1

### Vokurka, M., Hugo, J. a kol.:

#### VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK

Praha, Maxdorf, edice Jesenius, 5. vydání, 2005. ISBN 80-7345-056-5.

Informační boom, který je již řadu let charakteristickou konstantou biologických věd, se nemohl nepromítnout do již 5.vydání Velkého lékařského slovníku.

Recenzentovi nezbývá, aby akceptoval sdělení autorů, že toto poslední vydání obsahuje 300 nových hesel, přičemž dalších několik set si

vyžádalo přepracování, převážně ve smyslu aktualizace.

Pojetí jednotlivých hesel respektuje požadavky na dílo tohoto typu: hesla jsou věcná, stručná (jen výjimečně je tomu naopak, ale pak vždy zdůvodněno méně obvyklým, resp. významným přesahem hesla) a srozumitelná.

Slovník byl oceněn opakovaně již v předchozích vydáních, ostatně sama skutečnost pěti vydání v rozmezí několika let je hodnověrným dokladem jeho kvality. Nicméně nelze než litovat, že některá schémata, která jsou graficky velmi zdařilá, nebyla provedena v barvách, což by

nepochybně přispělo ke zvýšení jejich informační hodnoty.

Jsem rád, že autoři, bývalí posluchači I. lékařské fakulty UK v Praze, přizvali jako spoluautory své učitele a kolegy z mateřské fakulty a že jich je většina.

**Z povahy díla plyne, že se dotýká všech oborů lékařské teorie a praxe a neměl by tedy chybět u žádného z těch, kteří graduovali na lékařské fakultě.**

Petr Bartůněk  
128 08 Praha 2, U Nemocnice 2



PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

# Hypertrophic Cardiomyopathy

<sup>1</sup>Čapek P., <sup>2</sup>Brdička R.

<sup>1</sup>Department of Anthropology and Human Genetics, Charles University, Prague

<sup>2</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague

## SUMMARY

Hypertrophic cardiomyopathy is a multigenetic cardiac disease with autosomal dominant pattern of inheritance and incomplete penetrance, with the exclusion of those cases caused by mutations in the mitochondrial genome. The disease is usually caused by mutations in several sarcomeric contractile protein genes. Mutations have been found in four genes that encode components of the thick filament:  $\beta$  myosin heavy chain (5), essential myosin light chains (6), regulatory myosin light chains (6), and cardiac myosin binding protein -C (7), (8); in five genes that encode thin filament proteins: cardiac actin (9), cardiac troponin T (10), cardiac troponin C (11), cardiac troponin I (12), and  $\alpha$ -tropomyosin (10); and in the sarcomeric cytoskeletal protein titin (13). In addition to mutations in contractile sarcomeric proteins, mutations in other genes encoding for non-sarcomeric proteins also have been identified in patients with non pure form of hypertrophic cardiomyopathy. As a complex cardiac disease, hypertrophic cardiomyopathy has unique pathophysiological characteristics and a various morphological, functional, and clinical features.

**Key words:** hypertrophic cardiomyopathy, MYH7 gene, MYBPC3 gene, TNNT2 gene.

## SOUHRN

Čapek P., Brdička R.: Hypertrofická kardiomyopatie

Hypertrofická kardiomyopatie je multigeneticky podmíněná srdeční choroba s dominantní autosomální dědičností a nekompletní penetrancí, s vyloučením těch případů, které jsou způsobeny mutacemi v mitochondriálním genomu. Choroba je obvykle způsobena mutacemi genů pro několik sarkomerových kontraktilních proteinů. Mutace byly nalezeny pro čtyři geny, které kódují součásti silných filament:  $\beta$  myosin těžkého řetězce (5), esenciální myosin lehkého řetězce (6), regulační myosin lehkého řetězce (6) a srdeční myosin vázící proteiny - C (7, 8); na pěti genech, které kódují proteiny lehkého řetězce: srdeční aktin (9), srdeční troponin T (10), srdeční troponin C (11), srdeční troponin I (12), a  $\alpha$ -tropomyosin (10); a sarkomerický cytoskeletální protein titin (13). Navíc k mutacím kontraktilních sarkomerových proteinů byly u pacientů s neúplnými formami hypertrofické kardiomyopatie popsány mutace dalších genů, které kódují nesarkomerické proteiny. Jakožto komplexní srdeční choroba má hypertrofická kardiomyopatie jedinečný patofysiologický profil a různé morfologické, funkční a klinické projevy.

**Klíčová slova:** hypertrofická kardiomyopatie, gen MYH7, gen MYBPC3, gen TNNT2.

Po.

Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 93-96.

Until the latter half of the 1980s, the accumulated knowledge of cardiomyopathies was mainly clinical and descriptive, since the causes for the vast majority of these primary myocardial diseases were unknown. Although myocardial hypertrophy and development of cardiac failure occurs commonly in these patients, the molecular basis of cardiac growth, hypertrophy, and a repair was until recently, totally elusive. Molecular biology has opened the door to a new understanding of some of these disorders (1).

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a multigenetic cardiac disease with autosomal dominant pattern of inheritance and incomplete penetrance, with the exclusion of those cases caused by mutations in the mitochondrial genome. According to Marian et al. (2) approximately two-thirds of patients have a family history of HCM. The rest of the cases are sporadic, which is due to mutations that arise *de novo*.

In these days, hypertrophic cardiomyopathy is defined as a disease of the sarcomere because majority of the genes that are associated with HCM development encode for cardiac sarcomeric proteins, however, other disease causing - genes have been found (3). This heart disease is mostly due to multiple mutations in at least

sixteen genes that have been identified so far. To be able to understand how mutations in different genes especially those that encode for contractile proteins cause hypertrophic cardiomyopathy, it will be necessary to understand the functional consequences of the mutations at a molecular level. It is already known, that different mutant proteins cause similar functional abnormalities, which sequentially initialize the same disease pathways, although they are members of the same functional group and have very different properties and roles. Some of them have enzymatic and force generating roles (e.g. myosin heavy chain), while others play structural roles (e.g. myosin binding protein C) or have regulatory functions (e.g. troponins T, I and  $\alpha$ -tropomyosin).

Mutations that cause hypertrophic cardiomyopathy can be located in one of several very large genes, and most of the affected families do not have sufficient members to allow statistically significant chromosome linkage analysis (4).

Mutations have been found in four genes that encode components of the thick filament:  $\beta$ -MHC (5), essential MLC (6), regulatory MLC (6), and cMyBP-C (7), (8); in five genes that encode thin filament proteins: cardiac actin (9), cardiac troponin T (10), cardiac

RNDr. Pavel Čapek  
128 00 Praha 2, Viničná 7  
fax: +420 224 951 621, e-mail: pcapek@email.cz

troponin C (11), cardiac troponin I (12), and  $\alpha$ -tropomyosin (10); and in the sarcomeric cytoskeletal protein titin (13).

In addition to mutations in contractile sarcomeric proteins, mutations in other genes encoding for non-sarcomeric proteins also have been identified in patients with non-pure form of HCM. Mutations in the  $\gamma_2$  regulatory subunit of an AMP-activated protein kinase (AMPK, gene: PRKAG2) were found to be responsible for a variant of HCM associated with ventricular preexcitation (Wolf-Parkinson-White syndrome) at the chromosome 7q36 locus (14). Mutations in the gene encoding the cytoskeletal muscle LIM protein has also been identified (15). Thus, hypertrophic cardiomyopathy is a genetic model of cardiac hypertrophy caused by a diverse array of mutations in a variety of genes, with the pure form (no other cardiac or non-cardiac phenotype) resulting from mutations in contractile sarcomeric proteins.

For each disease gene, a variety of different mutations have been reported. Methylated CpG dinucleotides within the genome are particularly prone to point mutations (16). Alternatively, a significant number of novel genes may remain to be identified. Generally, individuals with HCM causing mutations are heterozygous, however, cases of homozygous HCM mutations have been also reported. One of these was an Arg<sup>869</sup>Gly point mutation in the MYH7 gene (17), and the other was a Ser<sup>179</sup>Phe mutation in the cardiac troponin T gene (18). Both mutations caused particularly severe phenotype with onset in childhood and premature death.

It is not currently possible to establish a correlation between the presence of the mutation in one of the sarcomeric genes and a particular phenotype (5). Moreover, the same mutation can be found in individuals with a different clinical manifestation (19). A systematic evaluation of genotyped pedigrees found that up to 30% of adults who carry a mutation were „healthy” with a normal echocardiography and ECG as regards conventional diagnostic criteria (20). These „healthy carriers” may however present mild abnormalities on echocardiography which may represent early expression of the disease (21).

Since the majority of HCM disease genes encode protein components of the sarcomere, it has been widely proposed that left ventricular hypertrophy is not a primary manifestation but develops as compensatory response to sarcomere dysfunction. Characterization of the fundamental deficit resulting from HCM-causing gene mutations has been a major focus of research over the last decade. A variety of techniques have been used to examine the effects of mutations on sarcomere structure and function, ranging from in vivo studies of myocardial performance in genetically engineered mouse models to in vitro studies of interactions between single actin and myosin molecules. It is clear, that the type of strategy employed to investigate the effects of sarcomere protein mutations greatly influences the outcome, with conflicting results found for the same mutation in many cases. Investigators have sought to answer questions such as whether the various sarcomere protein mutations cause similar or diverse effects on sarcomere structure and function and whether sarcomere protein mutations act by a dominant negative mechanism or alter function by causing haploinsufficiency. In the dominant negative model, both wild-type and mutant proteins are present in equivalent proportions; the mutant peptide is stably incorporated into the sarcomere but acts as a „poison polypeptide” and perturbs wild-type protein function. Alternatively, mutations may result in null alleles or cause a reduction in the amount of wild-type protein, leading to an imbalance of sarcomere protein stoichiometry. Mutations that truncate the encoded protein are thought to act by haploinsufficiency. Understanding the consequences of sarcomere protein mutations is an essential prerequisite for determining the stimulus for hypertrophy in HCM. For example, if HCM-causing mutant proteins merely induced an imbalance in the stoichiometry of the protein components involved

in sarcomere assembly, in vitro analysis of the mutant proteins per se would have little merit (22).

A characteristic feature of human HCM, like many others autosomal dominant diseases, is the presence of significant variability in the phenotypic expression of phenotypes. It is now well established that genetic factors other than the causal mutations, referred to as the modifier genes, affect the phenotypic expression of a disorder such HCM. Modifier genes are neither necessary nor sufficient to cause HCM, but they affect the severity of the disease significantly. Thus far studies to identify the potential modifier genes for HCM have been limited to allelic association studies, whereby the possible association of variants of candidate genes with cardiac phenotypes has been explored. In this regard, few studies have shown that functional variants of angiotensin-1 converting enzyme (ACE-1) gene are potential modifiers of HCM phenotype, since they are associated with the risk of SCD and the magnitude of left ventricular hypertrophy. Patients with the DD genotype exhibit higher tissue and plasma levels of ACE-1, a higher incidence of sudden death, and more extensive hypertrophy than those with the II genotype. Marian and Roberts (2) have explored association of functional variants of several trophic factors and have shown that variants of endothelin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  are also potential modulators of cardiac phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy.

## DISEASE CAUSING GENES

### *MYH7 gene*

The  $\beta$ -myosin heavy chain gene was the first gene identified as a disease causing gene in HCM. Most mutations found in this gene are related to distinct functional and structural domains of the  $\beta$ -myosin heavy chain. These defects are clustered at specific regions in the globular head of the myosin molecule (sub fragment S 1), that are, firstly, associated with the actin binding site, secondly, near nucleotide binding site (ATP binding), thirdly, adjacent to the region that connects two reactive cysteine residues, fourthly, at the myosin light chain binding interface, and lastly, at the head rod junction.

According to Rayment (23), many of the mutations lie at the interface between structural domains and may influence the transduction of chemical energy into movement. The mutations observed in the  $\beta$ -MHC serve to indicate parts of the molecule that are important for function. They represent a class of molecules that are probably partially impaired and as such highlight the more subtle features of myosin (23).

The primary genetic defect appears to be impaired contractility, which triggers the release of growth factors that result in compensatory hypertrophy and fibroblast proliferation (24). Up regulation of growth factors has been confirmed in FHC mouse models and in humans with FHC (25).

Defects of the MYH7 gene account for the largest proportion of severe cases of HCM. Genotype – phenotype correlative studies have shown that distinct mutations in the MYH7 gene may be associated with different prognosis (26–28).

The previously reported frequency of MYH7 gene mutations in HCM has ranged from 30 to 50% in the initial studies to 10–20% recently (13, 26, 29).

Mutations that are associated with a high incidence of SCD and premature death often exhibit high penetrance and an early age of onset. In contrast, those associated with a benign prognosis often exhibit low penetrance, late onset of disease, and milder left ventricular hypertrophy. Homozygosity for causal mutations and compound mutations has been described that leads to a more severe morphological phenotype and a higher incidence of SCD (30).

Certain mutations in the  $\beta$ -myosin heavy chain gene were associated with normal life expectancy, whereas others were reported to decrease survival because of sudden arrhythmic death or heart failure (27, 31). Such gene defects in MYH7 and other HCM-causing genes have been designated in the literature as either „benign“ or „malignant“. It has also been suggested that charge – changing amino acid substitutions may be associated with more severe disease (27, 32). It has, however, become clear, that intrafamilial variation is also marked, particularly with regard to the morphological features of the disease.

### MYBPC3 gene

The cardiac myosin binding protein C (cMyBP-C) isoform is expressed exclusively in the cardiac tissue. It is located in the sarcomere A bands and forms a series of seven to nine transverse bands spaced at 43-nm intervals. MYBPC3 is comprised of 24 kb of genomic DNA with 37 exons that encode a protein of 1, 274 amino acids.

The protein has multiple immunoglobulin C2-like and fibronectin type 3 domains, as well as a cardiac specific region, a phosphorylation region, and overlapping myosin and titin binding sites. MYBPC3 mutations are found in ~15 to 20% individuals with HCM. Over 140 mutations have been reported. The majority of mutation represents nucleotide substitutions, insertions, deletions, or splice site mutations that result in truncation of the cMyBP-C protein with loss of the myosin and titin binding sites. Missense mutations that preserve the myosin and titin binding sites have also been found. Mutations in the MYBPC3 are generally associated with a relatively mild cardiac hypertrophy and a low incidence of SCD as compared to mutations in the MYH7 gene. However, as shown by Erdmann et al. (34), malignant features such as SCD, sustained ventricular tachycardia and severe hypertrophy also occur. The primary defect caused by mutations in the MYBPC3 gene is likely to be diverse and differ for missense, frame-shift and truncation mutations. The cMyBP-C proteins carrying the missense mutations could incorporate into myofibrils but cause myocyte mechanical dysfunction and impair generation of the contractile force. Insertion/deletion mutations could lead to expression of truncated proteins that degrade immediately and cause haplo-insufficiency, or do not properly incorporate into sarcomere and cause sarcomere dysgenesis. Thus, mutations in the MYBPC3 gene could affect orderly formation of thick filaments and/or alter cardiac myocyte mechanical function, particularly in response to adrenergic stimulation.

Overall, the expected functional defect conferred by mutations in the MYBPC3 gene is impaired generation of force of contraction by the cardiac myocytes, which could lead to increased myocyte stress and subsequent activation of stress-responsive signaling kinases and increased expression of trophic and mitotic factors in the heart (24).

### TNNT2 gene

Cardiac troponin T is expressed in embryonic and adult heart and in developing skeletal muscle. TNNT2 is comprised of 17 kb of genomic DNA and has 17 exons.

A number of different cardiac troponin T isoforms are produced by alternate splicing. The principal isoform in the adult heart consists of 288 amino acids and has two major domains: an NH<sub>2</sub>- terminal domain that interacts with tropomyosin and a COOH-terminal domain that binds to tropomyosin, troponin C, and troponin I.

TNNT2 mutations account for ~5 to 10% of cases of hypertrophic cardiomyopathy.

### CONCLUSION

As described above, genetic heterogeneity (i.e. multiple different genes causing a similar phenotype) has been identified in hypertrophic cardiomyopathy. Similar genetic heterogeneity has been reported for dilated cardiomyopathy, as well. However, it appears that there is a commonality of the proteins that are mutated in each disease. This leads to propose the „final common pathway“ hypothesis, which states that hereditary cardiovascular diseases with similar phenotypes and genetic heterogeneity will occur due to abnormalities in genes encoding proteins of similar function or genes encoding proteins participating in a common pathway cascade (34). The relevance of the hypothesis is its ability to classify disease entities on a molecular and mechanistic basis, i.e. „sarcomyopathies“, or „cytoskeletopathies“ for hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy, respectively, which could lead to more focused approaches to gene discovery and future therapeutic interventions (35).

### REFERENCES

1. **Towbin, J. A.:** Molecular genetic aspects of cardiomyopathy. *Biochemical medicine and metabolic biology*, 1993, 49, s. 285-320.
2. **Marian, A. J., Roberts, R.:** The Molecular Genetic Basis for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2001, 33, s. 655-670.
3. **Bonne, G., Carrier, L., Richard, P. et al.:** Familial Hypertrophic Cardiomyopathy: From mutations to functional defects. *Circ. Res.*, 1998, 83, s. 579-593.
4. **Arad, M., Seidman, J. G., Siedman, C. E.:** Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.*, 2002, 11, s. 2499-506.
5. **Geisterfer-Lowrance, A. A., Kass, S., Tanigawa, G. et al.:** A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain missense mutation. *Cell*, 1990, 62, s. 999-1006.
6. **Poetter, K., Jiang, H., Hassanzadeh, S. et al.:** Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat. Genet.*, 1996, 13, s. 63-69.
7. **Bonne, G., Carrier, L., Bercovici, J. et al.:** Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Genet.*, 1995, 11, s. 438-440.
8. **Watkins, H., Conner, D., Thierfelder, L. et al.:** Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Genet.*, 1995, 11, s. 434-437.
9. **Olson, T. M., Doan, T. P., Kishimoto, N. Y. et al.:** Inherited and *de novo* mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2000, 32, s. 1687-1694.
10. **Thierfelder, L., Watkins, H., Macrae, C. et al.:**  $\alpha$ -Tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell*, 1994, 77, s. 710-712.
11. **Hoffmann, B., Schmidt-Traub, H., Perrot, A. et al.:** First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Hum. Mutat.*, 2001, 17, s. 524.
12. **Kimura, A., Harada, H., Park, J. E. et al.:** Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat. Genet.*, 1997, 16, s. 379-382.
13. **Satoh, M., Takahashi, M., Sakamoto, T. et al.:** Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 262, s. 411-417.
14. **Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H. et al.:** Mutations in the  $\alpha_2$  subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.*, 2001, 10, s. 1215-1220.
15. **Geier, C., Oezcelik, C., Perrot, A. et al.:** Muscle LIM protein: a novel disease gene for hypertrophic cardiomyopathy? *Circulation*, 2001, 104 (Suppl. II), s. II521.

16. **D'Cruz, L. G., Baboonian, C., Phillimore, H. E. et al.:** Cytosine methylation confers instability on the cardiac troponin T gene in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Med. Genet.*, 2000, 37, s. e18.
17. **Ho, C. Y., Lever, H. M., Desanctis, R. et al.:** Homozygous mutation in cardiac troponin T. Implications for hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 2000, 102, s. 1950-1955.
18. **Richard, P., Charron, P., Leclercq, C. et al.:** Homozygotes for a R869G mutation in the betamyosin heavy chain gene have a severe form of familial hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2000, 32, s. 1575-1583.
19. **Van Driest, S. L., Ackerman, M. J., Ommen, S. R. et al.:** Prevalence and severity of benign mutations in the  $\beta$ -myosin heavy chain, cardiac troponin T, and  $\alpha$ -tropomyosin genes in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 2002, 106, s. 3085-3090.
20. **Charron, P., Dubourg, O., Desnos, M., Isnard, R. et al.:** Diagnostic value of electrocardiography and echocardiography for familial hypertrophic cardiomyopathy in a genotyped adult population. *Circulation*, 1997, 96, s. 214-219.
21. **Hagege, A. A., Dubourg, O., Desnos, M. et al.:** Familial hypertrophic cardiomyopathy. Cardiac ultrasonic abnormalities in genetically affected subjects without echocardiographic evidence of left ventricular hypertrophy. *European Heart Journal*, 1998, 19, s. 490-499.
22. **Fatkin, D., Graham, R. M.:** Molecular Mechanisms of Inherited Cardiomyopathies. *Physiol. Rev.*, 2002, 82, s. 945-980.
23. **Rayment, I., Holden, H. M., Sellers, J. R. et al.:** Structural interpretation of the mutations in the  $\beta$ -cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. Biophysic.*, 1995, 92, s. 3864-3868.
24. **Marian, A. J.:** Pathogenesis of diverse clinical and pathological phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet.*, 2000, 355, s. 58-60.
25. **Li, R. K., Li, G., Mickle, D. A. et al.:** Overexpression of transforming growth factor-beta1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.*, 1997, 96, s. 874-881.
26. **Watkins, H., Rosenzweig, A., Hwang, D. S. et al.:** Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.*, 1992, 326, s. 1108-1114.
27. **Anan, R., Greve, G., Thierfelder, L. et al.:** Prognostic implications of novel b-cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.*, 1994, 93, s. 280-285.
28. **Fananapazir, L., Dalakas, M. C., Cyran, F. et al.:** Missense mutations in the beta-myosin heavy-chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, s. 3993-3997.
29. **Jääskeläinen, P., Soranta, M., Miettinen, R. et al.:** The cardiac beta-myosin heavy chain gene is not the predominant gene for hypertrophic cardiomyopathy in the Finnish population. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1998, 32, s. 1709-1716.
30. **Jeschke, B., Uhl, K., Weist, B. et al.:** A high risk phenotype of hypertrophic cardiomyopathy associated with a compound genotype of two mutated beta-myosin heavy chain genes. *Hum. Genet.*, 1998, 102, s. 299-304.
31. **Hwang, T., Lee, W., Kimura, A. et al.:** Early expression of a malignant phenotype of familial hypertrophic cardiomyopathy associated with a Gly716Arg myosin heavy chain mutation in a Korean family. *Am. J. Cardiol.*, 1998, 82, s. 1509-1513.
32. **Seidman, C. E., Seidman, J. G.:** Molecular genetic studies of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Basic. Res. Cardiol.*, 1998, 93, s. 13-16.
33. **Erdmann, J., Raible, J., Maki-Abadi, J. et al.:** Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2001, 38, s. 322-330.
34. **Towbin, J. A.:** The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1998, 10, s. 131-139.
35. **Bowles, N. E., Bowles, K., Towbin, J. A.:** Prospects for gene therapy for inherited cardiomyopathies. *Progress in Pediatric Cardiology*, 2000, 12, s. 133-145.

## KOMENTÁŘ

# K ělánku autorŮ Āapek P. a BrdiĀka R. „Hypertrophic Cardiomyopathy“ *Pohled klinického kardiologa na pŕínos genetiky pro diagnostiku a lěĀbu hypertrofické kardiomyopatie*

Hypertrofická kardiomyopatie (HCM) je geneticky podmíněné onemocnění, u něhoŕ je známo více než 200 kauzálních mutací vedoucích k nesmírně různorodosti klinických projevŮ tohoto onemocnění. Ty nejdůležitější známě mutace jsou popsány v ělánku autorŮ Āapek a BrdiĀka: Hypertrophic cardiomyopathy. Pro klinického kardiologa je takto popsáná problematika zajímavým Ātením Āehosi poněkud abstraktního, ě když bezprostředně se dotýkajícího jeho vlastních pacientŮ. O to více, pokud se ve své klinické praxi specializuje na pacienty s HCM.

Podstatnou otázkou pro praxi je, zda velmi rozsáhlý výzkum HCM na poli genetickěm má ě následné klinické konsekvence. Na takto poloŕenou otázkou není jednoduchá odpověď. Studie, které se zabývaly vztahem mezi genotypem a fenotypem HCM, nepřinesly ŕádný pozitivní výsledek ve smyslu formulování klinických algoritmŮ determinovaných genotypem individuálního pacienta. Klinický obraz onemocnění se může výrazně lišit v rámci jedné rodiny nebo dokonce ě mezi jednovajeĀnými dvojĀaty; nesporně tedy existuje urĀitá variabilita v rámci jedné a těŕe mutace. V současné době dáváme tuto variabilitu do souvislosti s 1. funkcí dalších modifikujících genŮ nebo polymorfismŮ (pravděpodobně existuje urĀitý „genetic cocktail“ determinující změny fenotypu) a 2. vlivem vnějšího prostředí. Je tedy velmi obtížné formulovat, zda daná mutace u daného individua bude mít charakter „benigní“ nebo „maligní“, a na základě toho stratifikovat individuální riziko

doc. MUDr. Josef Veselka, CSc., FESC, FSCAI  
Kardiologická klinika 2. LF UK a FNM  
150 00 Praha 5, V Űvalu 84  
fax: +420 224 434 920, e-mail: veselka.josef@seznam.cz



a přizpůsobit léčbu. Jinými slovy, ve výše uvedeném smyslu genetika zatím ztroskotává na nesmírné heterogenitě genotypu i následných klinických projevů a na základě stanovení genotypu nelze indikovat nejučinnější prevenci náhlé smrti, tedy implantaci kardioverteru-defibrilátoru. Určitou cestou, která by mohla být řešením pro stratifikaci rizika na základě genetického vyšetření, by mohlo být seskupování mutací nikoliv na základě určitého individuálního genotypu, ale dle jejich konkrétního účinku, a tedy funkčního dopadu mutace. Zdá se, že v celém funkčním řetězci začínajícím genotypem, pokračujícím konkrétními modifikovanými proteiny, změnami na úrovni sarkomer, myokardu a celého srdce, by mohla být k dalšímu zkoumání nejdůležitější právě velikost funkčních změn na úrovni sarkomery (1).

Aby situace nebyla příliš jednoduchá, ukázalo se, že příčinou HCM nemusí být vůbec jen mutace podmiňující změny proteinů na úrovni sarkomer. Jedná se o tzv. nesarkomerické mutace. Ty podmiňují změny proteinů cytoskeletu odpovídajících za umístění a organizaci sarkomer uvnitř buňky. Funkčně jsou tedy přímo spjaty se sarkomery, a tudíž není překvapující, že mohou vést k rozvoji onemocnění majícího stejný charakter jako klasicky popisovaná „sarkomerická HCM“. Ještě dále od standardní diagnózy HCM stojí onemocnění podmíněné autozomálně dominantní mutací  $\gamma 2$  regulační podjednotky (PRKAG2) AMP–dependentní proteinkinázy. Tato mutace vede k postižení energetického metabolismu buňky a posléze ke hromadění glykogenu spojeného s hypertrofií myokardu, kterou klinicky neodlišíme od HCM. Postižení trpí navíc převodními poruchami a WPW syndromem.

Díky uvedeným skutečnostem se mi zdá, že klasifikace HCM, jak ji známe, bude v blízké budoucnosti překonána. Naše poněkud obstarožní stanovování diagnózy na základě přítomnosti hypertrofie bude nahrazeno daleko přesnější diagnostikou genetickou jdoucí ruku v ruce se zobrazovacími metodami a klinickými projevy onemocnění (2). Tímto způsobem, při vědomí značné neúplnosti našich současných znalostí, bych se pokusil odpovědět i na nastolenou otázku klinického postavení genetiky v diagnostice a léčbě HCM. Pro současné diagnostické ani terapeutické algoritmy nemá genetika a molekulární biologie žádný podstatný a přímý význam. Na druhou stranu dále zpřesňuje naše znalosti o podstatě tohoto (těchto) onemocnění, které dnes nazýváme jednotně HCM. Jakmile dojde k dalšímu zásadnímu nárůstu informací z genetického výzkumu HCM, pak se objeví i první smysluplné, na genetickém vyšetření založené, diagnostické a terapeutické postupy. Prozatím musíme svoji klinickou strategii, založenou především na stratifikaci rizika náhlé smrti, postavit na známých a do určité míry prověřených klinických faktorech, jako jsou rodinná anamnéza, výskyt synkop, maligních arytmií, masivní hypertrofii levé komory, neschopnosti zvýšit krevní tlak při zátěži, projevech srdečního selhání nebo přítomnosti nitrokomorové obstrukce.

#### LITERATURA

1. Van Driest, S. L., Ommen, S. R., Tajik, A. J. et al.: Sarcomeric genotyping in hypertrophic cardiomyopathy. Mayo Clin. Proc., 2005, 80, s. 463-469.
2. McKenna, W. J., Mogensen, J., Elliott, P. M.: Role of genotyping in risk factor assessment for sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. J. Am. Coll. Cardiol., 2002, 39, s. 2049-2051.

*Vážení přátelé,*

dovolujeme si Vás pozvat na **XII. sympozium časopisu Praktický lékař**.  
Symposium se bude konat **18. března 2006 od 9 hod. v Lékařském domě**,  
Sokolská 31, Praha 2.

Registrace účastníků proběhne od 8.30 hod.

Tématem bude

**Metabolický syndrom a poruchy příjmu potravy.**

*Předběžný program:*

Metabolický syndrom – co o něm víme?  
Diferenciální diagnostika malnutričních stavů  
Extrémy ve výživě – jak s nimi bojujeme?  
Poruchy příjmu potravy (mentální anorexie a bulimie)  
Metabolický syndrom z hlediska výživy  
Léčba metabolického syndromu  
Léčba a prevence metabolického syndromu z hlediska kardiologa

Svou účast, prosíme, potvrďte na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP,  
Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz.  
Uvedte plné jméno a rodné číslo nebo adresu, abychom Vám mohli připravit certifikát.

Akce je hodnocena kredity v rámci celoživotního vzdělávání.

**Příhlášky zasílejte nejpozději do 15. 3. 2006.**

Těšíme se na Vaši účast.

Redakce časopisu Praktický lékař,  
NTS ČLS JEP.

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

## Frekvenční pohled na vyšetření odchylek genomu

<sup>1</sup>Brdička R., <sup>2</sup>Beránek M., <sup>3</sup>Čimburová M., <sup>4</sup>Dvořáčková J., <sup>5</sup>Dvořáková D.,  
<sup>6</sup>Hájková J., <sup>1</sup>Haškovec C., <sup>7</sup>Kebrdlová V., <sup>8</sup>Karas M., <sup>9</sup>Kratochvílová A.,  
<sup>10</sup>Lošan F., <sup>11</sup>Macek M. jr., <sup>12</sup>Musil F., <sup>13</sup>Putzová M., <sup>14</sup>Rožmanová Š.,  
<sup>15</sup>Riedlová P., <sup>16</sup>Safrová M., <sup>17</sup>Scheinost O., <sup>18</sup>Štolba P., <sup>19</sup>Trka J.,  
<sup>20</sup>Vaněček T., <sup>21</sup>Vrtěl R.

<sup>1</sup>Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha,

<sup>2</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN, Hradec Králové

<sup>3</sup>CBO, Oddělení buněčné a molekulární biologie 3. LF UK, Praha

<sup>4</sup>CGB Laboratoř s.r.o., Ostrava

<sup>5</sup>Centrum molekulární biologie a genové terapie IHOK FN, Brno

<sup>6</sup>Centrální hematologická laboratoř VFN, Praha

<sup>7</sup>Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK, Praha

<sup>8</sup>Hemato-onkologické oddělení FN, Plzeň

<sup>9</sup>OLG PDM, Brno

<sup>10</sup>Genetika Plzeň s.r.o., Plzeň

<sup>11</sup>Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN, Praha

<sup>12</sup>BioLab, s.r.o., Klatovy

<sup>13</sup>GENNET, s.r.o., Praha

<sup>14</sup>Hemato-onkologická klinika, Olomouc

<sup>15</sup>Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín

<sup>16</sup>ÚLG FN, Plzeň

<sup>17</sup>Oddělení lékařské genetiky, České Budějovice

<sup>18</sup>Transfuzní oddělení, Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem

<sup>19</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN, Praha

<sup>20</sup>Šiklův patologicko-anatomický ústav FN, Plzeň

<sup>21</sup>Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, Olomouc

### SOUHRN

Laboratoře zabývající se analýzou lidského genomu, ať dědičnými či nedědičnými poruchami, používají obdobné metodické a technologické přístupy. Genetické odchylky však identifikují v různém rozsahu – vyhledávají běžně se vyskytující mutace, populačně vzácnější mutace, mutace s rodinným výskytem nebo identifikují dosud neznámé genetické změny. Kromě spektra mutací se DNA laboratoře vzájemně liší také v ročním počtu vyšetřených vzorků. Při porovnávání je rovněž třeba brát v úvahu, že klinické požadavky mohou zabírat velice široké indikační pole nebo mohou být naopak velmi specifické. Údaje uvedené v tabulkách jsou z roku 2004 a ukazují „záchytnost“ tj. počet pozitivních nálezů ve srovnání s počtem vzorků zaslanych k vyšetření. Vedle skupiny diagnóz, které vyšetřuje velký počet laboratoří, a které patří metodicky k nejjednodušším, existuje i velký počet vyšetření, která jsou prováděna jen jednou laboratoří uvedenou v databázi CZDDNAL [http://www.uhkt.cz/lab\\_a\\_vysetreni/nr\\_lab\\_dna\\_diag/dna\\_lab\\_db](http://www.uhkt.cz/lab_a_vysetreni/nr_lab_dna_diag/dna_lab_db).

Údaje o počtu vyšetření jsou hodnocena z různých hledisek, na prvním místě z hlediska nabídky pokrývající v různé míře požadavky pacientů, pracovní a finanční náročnosti a v neposlední řadě pak účelnosti takových vyšetření.

**Klíčová slova:** laboratorní medicína, molekulárně genetické laboratoře, frekvence vyšetření.

### SUMMARY

*Brdička R., Beránek M., Čimburová M. et al.: Frequentational View on the Genome Changes Testing*

Laboratories dealing with human genome, both inherited and acquired changes, dispose with similar methods and technology. The spectrum of genetic tests is relatively broad and the number of mutations or variants tested differs substantially. Also the number of examinations carried out in individual laboratories varies. Data presented in the tables come from the year 2004 and indicate the number of examinations requested and number of positive results. Many laboratories mentioned in the registry CZDDNAL ([http://www.uhkt.cz/lab\\_a\\_vysetreni/nr\\_lab\\_dna\\_diag/dna\\_lab\\_db](http://www.uhkt.cz/lab_a_vysetreni/nr_lab_dna_diag/dna_lab_db)) perform the same tests but there is also a great number of tests carried out by only one laboratory. Reasons of the request, cost-effectiveness and clinical utility of genetic testing is being discussed.

**Key words:** laboratory medicine, molecular genetic laboratories, frequency of testing.

Br.

Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 98–103.

Vyšetřování genomu se podle přenositelnosti změn do dalších generací tradičně dělí na vyšetřování dědičných anebo nedědičných mutací. Samostatnou skupinu tvoří změny nebo odchylky, jejichž analýzu považujeme za genetické testování. V tomto případě jde o změny přenositelné. Dědičné změny postihují všechny buňky daného jedince. Získal je od svých rodičů (alespoň jednoho z nich) v podobě haploidních genomů jejich gamet (1). Patogenní mutace mohly vzniknout v dávné minulosti a být přenášeny přes mnoho generací anebo se vytvořily teprve nedávno v předchozí generaci „jako nové“. V prvním případě bývají v rámci populace postižení nositeli stejné mutace, ve druhém budou postižení nositeli každý jiné své „osobní“ mutace. Pro vyšetření populačně častých mutací používáme běžně přímou diagnostiku. U nových mutací se často uchylujeme k diagnostice nepřímé. Podobně i přístup výrobců laboratorních pomůcek je různý – detekční soupravy (kity) jsou většinou zaměřeny jen na průkaz nejběžnějších odchylek.

Druhou samostatnou skupinou změn genomu, které se nepřenášejí do dalších generací, jsou změny, které postihují jen některé buňky – buňky somatické. Tyto změny se v rámci organismu propagují množением těchto buněk – vytvářením jejich klonu. Taková situace je typická například pro nádorová onemocnění.

Metodicky jsou postupy při vyšetřování změn struktury genomu, ať dědičných, nebo nedědičných, prakticky stejné, pouze výběr materiálu k vyšetření je odlišný. Zatímco při genetickém testování bychom mohli použít téměř jakoukoliv buňku lidského těla, v případě nedědičných odchylek nacházíme změny genomu jen u vybrané skupiny buněk. Někdy ovšem dochází k tomu, že u jednoho jedince jsou příčinou patologie změny obojího druhu, jak dědičné například v podobě určité dispozice, tak nedědičné, které na takto změněném terénu vzniknou.

Pro určité úvahy, zvláště ekonomické, případně organizační, je třeba vědět, jak často, které vyšetření a kdy je vhodné provádět. Tedy použít epidemiologický pohled. Epidemiologický pohled je rovněž nezbytný pro výběr optimálních a přitom hospodárných (cost-effective) způsobů zajišťování kvality prováděných vyšetření.

V oborech, které testují lidský genom, je výběr vhodných mechanismů kontroly kvality o něco složitější, než je tomu například v klinické biochemii nebo hematologii. Především proto, že zatím většina otázek, které vyšetřování genomu řeší, se týká struktury genomu a má tedy kvalitativní charakter. Pro posuzování některých parametrů kvality byly sice vyvinuty

postupy i pro kvalitativní určování, nicméně stanovení množství falešně pozitivních a falešně negativních výsledků (EURACHEM/CITAC, LGC/VAM/2002/021) je při genetickém testování značně obtížné, až nemožné. I když k falešně negativním i pozitivním nálezům může docházet, nemusíme to poznat. Zásahu na tom mají například pseudogeny, nebo hledání mutací na nesprávném místě. Zvláštní kategorií jsou při používání polymerázové řetězové reakce, tzv. kontaminace, které by mohly být chybně interpretovány jako falešně pozitivní výsledky, ale v podstatě jde o nechtěné vyšetření dvou (více) „vzorků“ – templátů současně. Na rozdíl od „pravé“ falešné pozitivivity, se kontaminace vyskytují většinou hromadně – tj. postihují větší počet vzorků nahromaděných do určitého časového období a představují jednu z největších hrozeb při vyšetřování stavu a funkce lidského genomu. Zcela znehodnotí vyšetřování, dokud se je nepodaří odstranit. Naštěstí ohrožují většinou jen analýzy, u kterých je detekční mez posunuta k minimálním dosažitelným koncentracím templátu.

Při genetickém testování jde především o určení změn struktury genomu – stanovení diagnózy (molekulární) a způsoby, jakým se k ní dospělo, jsou jednak díky neustálému vývoji značně proměnlivé a do jisté míry i nepodstatné – jinými slovy znalost metod a jejich vhodné provádění (technical skill) je sice potřebné, ale není z hlediska dosažení správného výsledku dostatečným kritériem kvality. Proto se externí kontroly kvality v rámci genetického testování zaměřují především na schopnost správné diagnostiky včetně neodmyslitelné schopnosti správné interpretace nálezů a nabídky správného rámce pro klinické posuzování laboratorních výsledků. Tam, kde je pro nesmírnou vzácnost externí posuzování a jeho hodnocení obtížné realizovatelné, můžeme jako náhražku připustit i ověřování technické způsobilosti, tedy úrovně zvládnutí metod – i když právě to nejdůležitější – schopnost správné interpretace nálezů zůstává těžko ověřitelná. Za účelné i hospodárné jsou považovány systémy externí kontroly s 12 a více účastníky (Rob Elles – EMQN – European Molecular Genetic Quality Network, osobní sdělení), čehož bude stále snadnější dosáhnout vzhledem k postupující globalizaci.

V současnosti hledáme rozhraní mezi externí kontrolou kvality, která by byla založena na schopnosti správně diagnostikovat a kontrolou kvality omezenou na metodickou úroveň.

Tento příspěvek je proto jedním z prvních kroků, které za tím účelem činíme.

Tab. 1. Chronická myeloidní a akutní lymfocytární leukémie – BCR/ABL

Zdroj	vzorky zaslané k vyšetření	vzorky pozitivní	%
Centrum molekulární biologie a genové terapie IHOK, Brno	226	30	13
Hematologicko-onkologické odd.FN, Plzeň	172	21	12
Národní referenční laboratoř ÚHK, Praha	177	27	15
Hemato-onkologická klinika, Olomouc	116	23	20
Centrální hematologická laboratoř VFN, Praha	72	10	14
Klinika dětské hematologie a onkologie, Praha	57	6	11
Oddělení lékařské genetiky, České Budějovice	38	6	16
Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín	57	14	24
Ústav klinické biochemie, FN Hradec Králové	16	6	37
<b>Σ</b>	<b>931</b>	<b>143</b>	<b>15</b>

Poznámka k tabulkám 1–5:

V prvním sloupci tabulek jsou zdravotnická zařízení, která poskytla uvedené údaje, ve druhém sloupci počty osob, jichž vzorky byly zaslány k vyšetření. Nejde o opakovaná vyšetření téže osoby například při monitorování vývoje onemocnění. Pozitivní vzorky odpovídají molekulárnímu průkazu „kauzální“ mutace, v případě tabulky 1 fúzi BCR/ABL. V dalších tabulkách odpovídá pozitivita u dominantního typu molekulárního základu vztahu mezi genotypem a fenotypem heterozygotnímu genotypu a u recesivního typu homozygotnímu genotypu, případně genotypu složeného heterozygota.

## ZMĚNY GENOMU SOMATICKÝCH BUNĚK

### Chronická myeloidní leukémie

#### BCR/ABL

Jako příklad situace, kdy určení přítomnosti genetické změny v somatických buňkách je příspěvkem k diagnostické a terapeutické rozvaze, můžeme použít fúzní gen BCR/ABL. Nacházíme ho převážně (cca 90 %) u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML), avšak nikoliv vždy, u pacientů BCR/ABL negativních s klinickou diagnózou CML a akutní lymfocytovou leukémií (ALL) (pokud je nechceme zařadit mezi obecnější myelodysplazie) se mohou vzácně vyskytovat i jiné fúzní geny. Naopak fúzní gen BCR/ABL lze najít i u některých pacientů s ALL u dospělých (>10 %). Dnes je většinou vyšetření na přítomnost BCR/ABL požadováno u myeloproliferací při podezření na CML. Z poměru mezi počtem pozitivních nálezů vůči počtu zaslaných vzorků se dá soudit, že nemolekulární diagnostické prostředky nedovolují stanovit přesnější diagnózu v situacích, kdy klinický obraz onemocnění může být nejednoznačný a identifikace molekulárního znaku pomůže vybrat správnou diagnózu (tab. 1).

K laboratorní diagnostice CML nepochybně patří cytogenetický průkaz filadelfského chromozómu (Ph+) – dnes metodami molekulární cytogenetiky, např. fluorescenční metodou *in situ* (FISH) i v interfázních jádrech, které ovšem neodlišují aktivní od neaktivních buněk.

Pro situaci, kdy vyšetření transkriptu BCR/ABL je pozitivní, má tento nálezn význam také terapeutický, neboť produktem fúzního genu BCR/ABL je kináza, jejíž aktivitu se můžeme pokusit tlumit jejími inhibitory – např. STI (imatinib) (2, 3) (viz [http://www.uhkt.cz/lab\\_a\\_vysetreni/nr\\_lab\\_dna\\_diag/best\\_lab\\_practice/glp\\_bcr\\_abl](http://www.uhkt.cz/lab_a_vysetreni/nr_lab_dna_diag/best_lab_practice/glp_bcr_abl)).

Situace je značně odlišná u chorob, kde klinická jednotka je svými příznaky tak jednoznačná, že molekulární diagnostika je jen potvrzením a k vyřešení diagnostické nejistoty zásadním způsobem nepřispívá. Bohužel takových je i u monogenně dědičných chorob

málo a stále nám přibývají takové, kde je přítomna výrazná genetická složka, ale genů, které se v ní uplatňují, je velký počet, o epigenetických vlivech ani nemluvě.

V tabulkách jsou příklady dědičných změn genomu a údaje z jednotlivých laboratoří, které se jejich vyšetřováním zabývají ([http://www.uhkt.cz/lab\\_a\\_vysetreni/nr\\_lab\\_dna\\_diag/dna\\_lab\\_db](http://www.uhkt.cz/lab_a_vysetreni/nr_lab_dna_diag/dna_lab_db)).

Databáze neviduje všechny laboratoře, které u nás nabízejí genetické testování – některé o zveřejnění nemají z nejrůznějších důvodů zájem. Přestože tabulky nemusí dávat kompletní pohled na danou situaci, ale jsou spíše výběrem, můžeme se pokusit použít je na cestě k určitým závěrům.

## ZMĚNY GENOMU ZÁRODEČNÝCH BUNĚK

### Cystická fibróza

#### CFTR

Příklady dědičných změn genomu můžeme zahájit cystickou fibrózou (CF).

Porovnáme-li tabulky 1 a 2, z nichž první vypovídá o vyšetřování získaných změn a druhá změn dědičných, kupodivu zjistíme, že se od sebe příliš neliší. Průměrná výtěžnost, budeme-li tak nazývat poměr pozitivních nálezů k počtu vyšetřených osob, se pohybuje pod 20 %. Počty registrovaných laboratoří, které se uvedou diagnostikou u nás zabývají – v prvním případě 8 a ve druhém 14, jsou rovněž v jistém souladu s počty provedených vyšetření (tab. 2). Incidence cystické fibrózy je u nás 1 na 2700 novorozenců, CML jako hlavní nositel fúzního genu BCR/ABL postihuje jen 1–2 osoby ze 100 000 za rok, ovšem se zcela rozdílnou distribucí podle věku (viz [http://www.uhkt.cz/lab\\_a\\_vysetreni/nr\\_lab\\_dna\\_diag/best\\_lab\\_practice/glp\\_cf](http://www.uhkt.cz/lab_a_vysetreni/nr_lab_dna_diag/best_lab_practice/glp_cf)).

Změny ve struktuře CFTR nejsou výhradně spojeny s cystickou fibrózou, ale nacházíme je i u jiných onemocnění. Na rozdíl od fúzního genu BCR/ABL, který je obdobou dominantní alely, a vedle

Tab. 2. Cystická fibróza – CFTR

Zdroj	vzorky zaslané k vyšetření	vzorky pozitivní	%
Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK, Praha	437	16	4
ÚKBD, FN Hradec Králové	306	1	0,3
Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, Olomouc	198	1	0,5
CGB laboratoř s.r.o., Ostrava	187	2	1
OLG, Ústí nad Labem	104	1	1
Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín	74	3	4
Genetika Plzeň s.r.o., Plzeň	30	0	0
BioLab s.r.o., Klatovy	5	0	0
<b>Σ</b>	<b>1341</b>	<b>24</b>	<b>1,8</b>

Vysvětlivky jsou uvedeny u tabulky 1.

Tab. 3. Neurofibromatóza – FN1

Zdroj	vzorky zaslané k vyšetření	vzorky pozitivní	%
OLG PDM, Brno	68	15	22*
ÚLG, Plzeň	4	3	75**
<b>Σ</b>	<b>58</b>	<b>18</b>	<b>31</b>

Vysvětlivky jsou uvedeny u tabulky 1.

\* Některé vzorky byly vyšetřeny analýzou DNA – 8 exonů (54) a některé RNA – celá mRNA (14).

\*\* Vyšetření členů rodiny byly provedeno nepřímou DNA diagnostikou.



**Tab. 4.** Huntingtonova choroba – HD

Zdroj	vzorky zaslané k vyšetření	vzorky pozitivní	%
Ústav lék.biologie a genetiky, 1. LF UK, Praha	93	48	52
Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, Olomouc	12	2	17
<b>Σ</b>	<b>105</b>	<b>50</b>	<b>48</b>

Vysvětlivky jsou uvedeny u tabulky 1.

**Tab. 5.** Hemochromatóza – HFE

Zdroj	vzorky zaslané k vyšetření	vzorky pozitivní	%
Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín	66	9	14
Centrální hematologická laboratoř VFN, Praha	60	5	8
ÚKBD FN, Hradec Králové	49	9	18
Šiklův patologicko anatomický ústav FN Plzeň	46	9	19
CBO, Oddělení buněčné a mol. biologie 3. LF UK, Praha	45	5	11
Transfuzní oddělení, Masarykova nemocnice, Ústí n. Labem	44	3	7
GENNET, s.r.o., Praha	18	2	11
<b>Σ</b>	<b>328</b>	<b>42</b>	<b>13</b>

Vysvětlivky jsou uvedeny u tabulky 1.

kterého jsou v buňce přítomny i původní geny BCR i ABL, které nepodlehly fúzi, v případě cystické fibrózy máme před sebou onemocnění vyvolané homozygotností se dvěma stejnými patogenními alelami, anebo složenou heterozygotností se dvěma různými patogenními alelami. Právě mnohotnost alel, množství jejich různých kombinací, případně vliv dalších faktorů, umožňuje vedle typických klinických projevů cystické fibrózy i výskyt mnoha dalších fenotypů (4, 5).

#### Neurofibromatóza

##### FN1

Neurofibromatóza patří mezi dominantně dědičné choroby s natolik typickými příznaky, že molekulární diagnostika ve své podstatě jen potvrzuje správnost klinické diagnózy. Přestože za odpovědné jsou považovány mutace genu NF1 (tab. 3), u některých juvenilních případů byly nalezeny odchylky v genech MLH1 a MSH2.

S délkou přes 300 kb, 60 exony a mRNA o téměř 13 kb, patří gen NF1 mezi velké geny. Vzhledem ke své velikosti a řadě pseudogenů není však molekulární diagnostika nejsnazší.

Gen je značně proměnlivý, odhaduje se, že cca 50 % mutací vzniká *de novo*, dokonce jsou známy i somatické mutace s klonálními projevy. Proto podobně jako u hemofilie A je stále užitečnou nepřímá DNA diagnostika. Domácí četost výskytu mutací není

známa, ale pravděpodobně se neliší od jiných států, kde se pohybuje kolem 1:3500 živě narozených dětí, což by při 100 000 narozených znamenalo cca 30 nově postižených ročně (6–8).

#### Huntingtonova choroba

##### HD

Huntingtonova choroba je svou příčinou členem skupiny onemocnění vyvolaných zvláštním typem mutací, s jasnou kauzalitou v podobě zmnožení určitých opakujících se sekvencí. Molekulárními metodami je diagnostikovatelná dávno před propuknutím klinických příznaků, a protože dosud nebyl nalezen léčebný postup, který by rozvinutí klinických příznaků bránil, představuje její diagnostika vážný etický problém (tab. 4). Dá se říci, že z tohoto hlediska je jedinou diagnostikou, která je regulovaná. Nikoliv však „z moci úřední“, ale pravidly lékařské etiky (viz – [http://www.uhkt.cz/lab\\_a\\_vysetreni/nr\\_lab\\_dna\\_diag/best\\_lab\\_practice/ghp\\_hd](http://www.uhkt.cz/lab_a_vysetreni/nr_lab_dna_diag/best_lab_practice/ghp_hd)) (9).

#### Hemochromatóza

##### HFE

Začneme-li od následků této poruchy metabolismu železa, dospějeme k jaterní cirhóze anebo k jaterním nádorům nebo diabetes mellitus. Začátky onemocnění jsou většinou plíživé, podobně jak tomu bývá u řady chorob, kdy se v organismu hromadí nějaká

**Tab. 6.** Jednotlivá vyšetření nabízená laboratořemi

počet vyšetřovaných diagnóz	1	1	2	2	3	1	4	3	11	21	105
počet laboratoř	18	18	17	14	8	7	5	4	3	2	1

Tabulka podává kvantitativní přehled o šíři nabídky laboratorních genetických vyšetření. Nejčastěji nabízeným vyšetřením je určení Leidenské mutace (def. faktoru V), které uvádí 18 laboratoř, dále je to identifikace def. faktoru II, nabízená rovněž 18 laboratořemi, a třetím nabízeným vyšetřením je polymorfismus metylenetetrahydrofolátreduktázy 17 a mutace genu pro cystickou fibrózu – 14 laboratoř. Na opačném konci distribuce jsou vyšetření nabízená jen jednou laboratoř, kterých je různých celkem 105.

látky, které se díky svému defektu nedokáže zbavit. Za typický příznak probíhající choroby je považováno zvýšení saturace transferrinu nad 62 %, které ve více jak 90 % odpovídá homozygotnímu genotypu pro některou z nejčastějších mutací (tab. 5). Bylo by jistě zajímavé vědět, jak často byla hladina saturovaného transferrinu vyšetřena u pacientů, u nichž bylo požadováno molekulárně genetické vyšetření. Spíše se zdá, že přetrvává méně významné vyšetření ferritinu.

Frekvence homozygotů (složených heterozygotů) je odhadována poměrně vysoko – na 5 na 1000, nicméně díky nízké klinické penetranci není diagnostikována často (10, 11).

## DISKUZE A ZÁVĚRY

Z uvedeného výběru molekulárně genetických analýz lze vyvodit, že laboratoře vyšetřují mnohem větší počet vzorků, než ve kterých se nacházejí pro klinickou diagnózu potvrzující nálezy. To ukazuje na důležitost a význam molekulárního vyšetření, bez kterého se dnes řada oborů nemůže obejít a bez něhož by diagnostické rozvahy zůstávaly na půli cesty. Je pravda, že někdy nemá molekulární diagnóza pro nemocného z hlediska jeho vyhlídek quoad sanationem žádný význam a musíme si počkat na výsledky dalšího výzkumu. Přesto mají vždy význam generační (populační) a epidemiologický, informují nás o riziku pro další generaci, o tom, jak je která mutace v populaci rozšířená, zda její výskyt klesá, nebo stoupá – usnadňuje nám volbu optimálního přístupu v klinické praxi.

**Často diskutovanou otázkou je poměr mezi předpokládaným počtem nemocných odvozených z genových frekvencí a vyšetřených nemocných s podezřením na příslušnou diagnózu, který dospívá k závěru, že diagnostikovaných nemocných bývá méně, než by odpovídalo genovým frekvencím.** Uplatníme-li například u recesivně dědičného onemocnění pro odhad výskytu homozygotů znalost výskytu heterozygotů, často zjistíme, že diagnostikovaných homozygotních nemocných je méně, než kolik by jich mělo být na základě distribučního Hardy-Weinbergova pravidla. Bylo by však jednodušší, kdybychom tuto skutečnost vysvětlili jen selháváním klinické diagnostiky, kdy k podezření na příslušné onemocnění dospívá kliník méně často, než by mohl. Selhávání klinické diagnostiky se sice na této diskrepanci také podílí, ale v úvahu připadá mnohem více příčin. Připomeneme si jen zástupný termín penetrance, který není vysvětlující, ale pouze konstatuje fakt, že vztah mezi genotypem a fenotypem nedodržuje vždy pravidlo buď vše anebo nic. Nebo naopak může homozygotní stav být za určité situace tak nepříznivý, že můžeme uvažovat o letalitě – třeba již v embryonálním období. Z hlediska laboratorní medicíny tedy chybí část vzorků, které by mohly být pozitivní.

Druhou otázkou, která se v našem souboru nabízí, je poměr mezi vyžádaným vyšetřením a počtem pozitivních nálezů. I zde by bylo možné hledat příčinu v klinické nejistotě. Zdrojem nepochybně mezi značným počtem vzorků zaslaných k vyšetření a pozitivními nálezy může být to, že není vždy jasné jaký klinický obraz k požadavku takového vyšetření opravňuje. Ale ani tady nejde o příčinu jedinou a navíc odsouzenihodnou. **V každém případě jsou to ošetřující lékaři, kteří rozhodují, kolik zakázek (vzorků k analýze) a jak odůvodněných laboratorní medicína dostane.** Z tohoto hlediska je tento příspěvek i pokus o jakousi zpětnou vazbu.

Některé laboratoře pracují se vzorky s úzce ohraničenou klinickou indikací a mají vyšší záchytnost, zatímco jiné s velice širokou. Tak například vyšetření genu HFE bylo vyžadováno v případě CBO, Oddělení buněčné a molekulární biologie 3. LF UK, Praha 542x v roce 2004, ale jen 45 s podezřením na hemochromatózu. Podobně ovlivňuje počty vyšetření pleiotropní efekt, kdy pro „monogenně“ podmíněné onemocnění zjišťujeme uplatnění odpovědného genu i u dalších onemocnění či dispozic.

Jakmile se molekulární diagnostika stala integrální součástí vyšetřování nejrůznějších medicínských oborů a přestala být omezena na monogenní dědičné poruchy s jednoduchým vztahem genotyp-fenotyp, vedla k prohloubení a zjemnění diferenciální diagnostiky. Došlo k rozpadu klinických jednotek, který stále pokračuje a neúprosně směřuje k personalizaci medicíny. To pochopitelně vede k nárůstu požadavků na molekulární vyšetření, jež bude v budoucnu možné zvládnout jen pomocí nových technologií, na které již některé laboratoře přes jejich vysokou finanční náročnost přecházejí. Dnes prováděné testování individuálních genů se stane v řadě situací neekonomickým a bude nahrazeno současným vyšetřením všech genů, které by mohlo být při řešení daného problému užitečné.

Poslední otázkou, snad nejožehavější, je šíře a hloubka laboratorního zázemí, které molekulární vyšetření nabízí. Porovnáním se zahraničním prostorem, jak celoevropským, tak celosvětovým, o kterém se můžeme informovat na mnoha internetových adresách, zjistíme, že rozvoj molekulární diagnostiky u nás rozhodně nezaostává a naše laboratoře jsou postupně zařazovány do nadnárodních databází. Stejně jako v cizině i u nás jsou velké rozdíly v komplexnosti nabízených vyšetření. Řada laboratoří poskytuje jen nejednodušší vyšetření a omezuje se na identifikaci několika málo nejčastějších mutací, nebo provádí jen nepřímou DNA diagnostiku, jiné, a měly by to být především referenční laboratoře, se problematikou zabývají mnohem podrobněji. Může se zdát, že není užitečné, aby se vyšetření prováděla dvoustupňově, protože tak mnoho vzorků putuje z jedné laboratoře do druhé, ale bez ohledu na finanční stránku věci, jde také o problém kapacitní. Některé laboratoře (nazvěme je např. regionální centra) by mohly provádět jakýsi předvýběr. Otázkou však zůstává, zda jsou schopny správně oddělit pacienty, kteří vyžadují další vyšetření, od pacientů, u kterých je situace natolik jednoznačná, že další vyšetření již není potřeba (riziko falešně negativních závěrů). Zřejmě bude nezbytné stanovit pro každou diagnózu určitá kritéria, vypracovat algoritmy vyšetřovacích postupů tak, aby riziko nedostatečného vyšetření s falešně negativními závěry bylo minimalizováno. Taková kritéria, ze kterých by vyplývalo, jaké minimum nezbytných vyšetření by měla laboratoř provést, by měla být součástí směrnice pro správnou laboratorní praxi. Tato kritéria by měla ovšem i usměrňovat klinické indikace pro daná vyšetření (tab. 6).

Ačkoliv uvedené údaje nelze považovat za zcela hodnověrné, neboť přehled laboratoří a použitá data byla získána na základě dobrovolnosti, lze je v mnohých ohledech považovat za poučnou. Oprávněně se lze domnívat, že zkrácení způsobené tím, že ne všechny laboratoře v České republice jsou ochotny ke spolupráci a zveřejňování svých údajů, nebude velké, neboť jich, na základě nepřímých informací, je nepatrná menšina. Nepřetržitě také dochází ke změnám – vznikají nové laboratoře, mění se nabídky nabízených vyšetření, jejichž evidence je poměrně obtížná a vždy znamená jisté zpoždění v informacích dostupných pro pacienty.

**Jakmile ekonomické důvody začínají dominovat v rozhodování, která vyšetřování zavést a provádět, orientují se laboratoře podle nákladů a zisku.** Je rozhodně ekonomicky výhodnější, aby laboratoř zpracovávala velký počet stejných vzorků a prováděla co nejjednodušší vyšetření, kde lze efektivně využít detekčních souprav, moderní technologie a automatizace. Kde také kontrola kvality není náročná, ani z hlediska spotřebního materiálu, ale ani vzhledem ke spotřebě pracovní doby a kvalifikaci personálu. To se pravděpodobně také odráží i v tabulce 6.

Porovnáním výkonnosti jednotlivých laboratoří a formálních dokladů o kvalitě jejich práce zjistíme, že situace již není tak uspokojivá. Akreditovaných laboratoří s mezinárodní platností osvědčení není příliš mnoho a rovněž účast v mezilaboratorním porovnávání, jak někdy nazýváme externí kontrolu kvality či ověřování

způsobilosti (EQA/PT), by se mohlo účastnit více laboratoří. Situace je pravděpodobně způsobena především náročností akreditace a účasti v EQA/PT, a to nejen finanční. Pojišťovny zatím nic z toho nezohledňují a současným systémem financování zdravotní péče u nás jsou nepřímo zvýhodňovány ty laboratoře, které rozhodují samy o použití svou činností získaných prostředků, jinými slovy laboratoře soukromé.

#### Zkratky

ALL	– akutní lymfocytová leukémie
BCR/ABL	– fúzní gen
CF	– cystická fibróza
CFTR	– cystic fibrosis transmembrane receptor
CML	– chronická myeloidní leukémie
FISH	– fluorescenční metoda <i>in situ</i>
Ph+	– filadelfský chromozóm
STI	– imatinib (blokátor kinázy)

#### LITERATURA

1. **Brdička, R., Michalová, K.:** Míry jakosti v genetických laboratořích. *Klin. Biochem. Metab.*, 2004, 12, s. 218-220.
2. **Chalandon, Y., Schwaller, J.:** Targeting mutated protein tyrosine kinases and their signaling pathways in hematologic malignancies. *Haematologica*, 2005, 90, s. 949-968.
3. **Hehlmann, R., Berger, U., Hochhaus, A.:** Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. *Ann. Hematol.*, 2005, 84, s. 487-497.
4. **Davies, J., Alton, E., Griesenbach, U.:** Cystic fibrosis modifier genes. *J. R. Soc. Med.*, 2005, 98 (Suppl. 45), s. 47-54.
5. **Sobczynska-Tomaszewska, A., Czarska, K., Bal, J.:** Cystic fibrosis – a disease with many faces. The variable clinical picture versus the heterogeneity of molecular defect. *Med. Wieku Rozwoj.* 2004, VIII, s. 884-899 (článek je v polštině).
6. **Lazaro, C., Ravella, A., Gaona, A. et al.:** Neurofibromatosis type 1 due to germ-line mosaicism in a clinically normal father. *N. Eng. J. Med.*, 1994, 331, s. 1403-1407.
7. **Opocher, G., Conton, P., Schiavi, F. et al.:** Pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease and neurofibromatosis type 1 Review. *Fam. Cancer*, 2005, 4, s. 13-16.
8. **Arun, D., Gutmann, D. H.:** Recent advances in neurofibromatosis type 1. *Curr. Opin. Neurol.*, 2004, 17, s. 101-105.
9. **Seong, I. S., Ivanova, E., Lee, J. M. et al.:** The HD CAG Repeat Implicates a Dominant Property of Huntingtin in Mitochondrial Energy Metabolism. *Hum. Mol. Genet.*, 2005, 14, s. 2871-2880.
10. **Butler, E.:** Hemochromatosis: Genetics and Pathophysiology. *Annu Rev. Med.*, 2005 Aug 5; [Epub ahead of print – on line 2006, 57].
11. **Barry, E., Derhammer, T., Elsea, S. H.:** Prevalence of three hereditary hemochromatosis mutant alleles in the michigan caucasian population. *Community Genet.*, 2005, 8, s. 173-179.

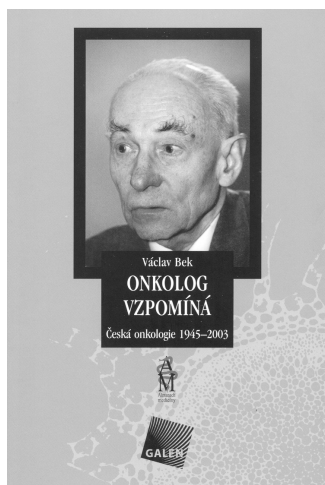
#### KNIHY

#### Bek, V.: ONKOLOG VZPOMÍNÁ ČESKÁ ONKOLOGIE 1945–2003

*Praha, Galén, 2005 Vydáno v edici „Almanach medicíny“, 308 s., cena xx Kč. ISBN 80-7262-286-2.*

Nádorová onemocnění se postupně stávají největším problémem pro zdravotnické systémy v celém světě a lze očekávat, že zhoubné nádory budou stále více ohrožovat lidskou populaci i ve třetím tisíciletí.

Diagnostika a léčba zhoubných nádorů zaznamenává v posledních letech překotný rozvoj počínaje molekulární diagnostikou a cílenou terapií na molekulární úrovni konče. Onkologie již dávno není samostatná lékařská disciplína, ale prostupuje napříč všemi obory. Vědecký výzkum zaznamenal v posledních letech překotný rozvoj a vnesl nové světlo do pochopení vzniku a vývoje nádorové choroby. Vědecký a medicínský obor zabývající se nádorovým onemocněním – onkologie – již dávno není samostatnou lékařskou disciplínou, ale prostupuje napříč všemi obory. Onkologie byla v minulosti vnímána jako ponurá a málo úspěšná lékařská disciplína. Za posledních 15 let (od přelomového roku 1989) významně vzrostl zájem lékařů o problematiku onkologicky nemocných. Založení samostatné Onkologické kliniky 1. lékařské fakulty UK v Praze odštěpením od Radiologické kliniky bylo jedním z mezníků formování oboru.



„Velké úsilí profesora Staška o další rozvoj onkologie na fakultě byl korunován úspěchem: dohodou ministra zdravotnictví s ministrem školství v prosinci 1972 bylo v zásadě rozhodnuto o konstitování samostatné onkologické kliniky. Toto rozhodnutí ředitelství Fakultní nemocnice I se uskutečnilo od 1. února 1973.“ (citováno z publikace 30 let Onkologické kliniky 2003). Přednostou Onkologické kliniky byl jmenován profesor Vladimír Stašek, kterého následuje v období 1974–1998 docent Václav Bek.

Vývoj onkologie jako lékařské disciplíny z pohledu nestora české onkologie, který se sám do historie nesmazatelně zapsal, lze sledovat

v knize jeho vzpomínek. Onkologická klinika jako pracoviště postupně uznaného samostatného oboru neměla svoji původní lokalitu, jak to bylo u velkých klinik s dlouholetou tradicí, a musela o svůj prostor více bojovat.

Období před založením kliniky a další vývoj klinického pracoviště, který byl dynamický, bohatý na události, plný změn a zvrátů sám prožil, zaznamenal a literárně zpracoval až do současnosti aktivní emeritní přednosta Onkologické kliniky 1. lékařské fakulty v Praze docent Václav Bek. Vytvořil hodnotné a podrobné dílo, které má významnou historickou hodnotu a je ho třeba doporučit k přečtení všem, kteří se zajímají o vývoj české medicíny a zvláště oboru, který se rychle rozvíjí. Jednotlivé kapitoly doplňuje bohatá fotodokumentace převážně z archivu autora.

**Publikace tohoto typu mají svoji dokumentaristickou hodnotu a je velkou zásluhou vydavatelství Galén, že historie medicíny nezůstane zapomenuta. Kapitoly věnované přístrojovému vybavení kliniky s plánovanou, ale neuskutečnenou instalací lineárního urychlovače již v roce 1997 by měly být povinnou četbou pro zodpovědné úředníky, kteří v roce vydání této poučné publikace odkládají potvrdit souhlasné stanovisko k obnovené žádosti o obměnu přístrojové techniky Onkologické kliniky 1. lékařské fakulty UK.**

*Luboš Petruželka  
128 00 Praha 2, U Nemocnice 2*

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

# Nové obzory v léčbě hemofilie – rekombinantní a transgenní koncentráty, genová léčba a modifikované koagulační faktory

Habart D.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

## SOUHRN

Koncentráty koagulačních faktorů vyrobené z plazmy dárců umožňují účinnou substituční léčbu nemocných s hemofilii A a B. Současné problémy této léčby zahrnují rozvoj inhibující protilátkové odpovědi u části nemocných (inhibitor), potřebu časté nitrožilní aplikace od dětského věku, velmi nízké riziko přenosu lidské infekce a vysokou cenu, která brání rozšíření léčby do chudších zemí. Klonování genů pro koagulační faktory VIII a IX umožnilo využití rekombinantní technologie k řešení uvedených problémů. Dostupnost malých a velkých zvířecích modelů hemofilie umožňuje preklinické ověření účinnosti a bezpečnosti nově vyvíjených postupů. Třetí generace rekombinantních koncentrátů faktorů VIII a IX odstranila i minimální riziko přenosu lidské infekce. Problém protilátkové odpovědi inhibující podávaný faktor nadále trvá. Rekombinantní aktivovaný faktor VII se stal bezpečnou, účinnou, avšak nákladnou alternativou aktivovaných plazmatických koncentrátů pro léčbu hemofiliků s inhibitorem. Cena rekombinantních koncentrátů je vysoká a omezuje jejich použití na bohaté země. Klinické zkoušky genové léčby hemofilie A a B ukázaly relativní bezpečnost použitých přístupů, ale především obtížnost dosažení a udržení terapeuticky účinné hladiny u člověka. Probíhají další preklinické studie *in vitro* a *in vivo*. Vývoj transgenní technologie dává určitou naději na výrobu lacinějších koncentrátů. Vývoj vylepšených faktorů VIII a IX, které by mohly příznivě ovlivnit klasickou substituční i genovou léčbu, je v preklinickém stadiu.

**Klíčová slova:** léčba hemofilie, zvířecí modely hemofilie, rekombinantní koncentráty, genová léčba, transgenní technologie, modifikované koagulační faktory.

## SUMMARY

*Habart D.: New Approaches to Haemophilia Treatment – Recombinant and Transgenic Concentrates, Gene Therapy and Engineered Coagulation Factors*

Plasma-derived concentrates of coagulation factors VIII and IX allow for effective treatment of haemophilia A and B. Current problems associated with this therapy include induction of inhibitory antibody directed towards coagulation factor (inhibitor), requirement of frequent intravenous application since childhood, very high price precluding utilisation of the treatment in developing countries and very low risk of transmission of known human infections. Cloning of factors VIII and IX allowed for application of recombinant technologies to address these problems. Small and large animal models have become available to test effectiveness and safety of novel treatments. The third generation recombinant concentrates of factors VIII and IX have recently been approved, which overcome the risk of transmission of a human infection. However, the problem of the inhibitory antibody response remains. Recombinant activated factor VIIa has become effective, safe but expensive alternative for treatment of patients with the inhibitor. High price of recombinant concentrates precludes their use in developing countries. Transgenic animals may in future allow for production of cheaper concentrates. Concluded clinical trials with therapeutic gene transfer in haemophilia A and B have shown that the approach is relatively safe, but not yet effective. Ongoing studies *in vitro* and *in vivo* are trying to improve the effectiveness. Engineered molecules of factors VIII and IX already tested *in vitro* and *in vivo*, on animal models may in future improve both classical and gene therapies.

**Key words:** haemophilia treatment, haemophilia animal models, recombinant concentrates, gene therapy, transgenic animals, engineered coagulation factors. Ha.

Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 104–111.

**H**emofilie A a B jsou vrozené krvácivé choroby způsobené deficitem koagulačních faktorů VIII respektive IX (1). Podle Národního registru nemocných s vrozenými poruchami koagulace je v ČR registrováno 833 žijících nemocných s hemofilii A a 119 s hemofilii B. Asi třetina nemocných trpí těžkou formou onemocnění (hladina chybějícího faktoru pod 1 % normy).

Léčba nemocných s hemofilii spočívá v elevaci hladiny chybějícího koagulačního faktoru v krvi na dobu nutnou k zástavě nebo

prevenci krvácení. Chybějící faktory byly zprvu doplňovány podáním plazmy získané od dárců krve. Nízká koncentrace faktorů v plazmě však vedla k přetěžování organismu objemem. Poprvé se podařilo zvýšit podávanou koncentraci FVIII použitím frakce plazmy, která při pomalém rozmrazování zůstane déle ve zmraženém stavu (kryoprecipitát). Postupně byly zaváděny další purifikační kroky na principu chromatografie, které před 30 lety umožnily průmyslovou výrobu koncentrátů obou koagulačních



Tab. 1. Používané zvířecí modely hemofilie

Druh	kmen/rasa	rok	laboratoř	fenotyp	genetický defekt
<b>Hemofilie A</b>					
myš	C57BL6-129Sv	1995	Children's Hospital of Philadelphia, USA	FVIII:C<1%	KO, exon 16 nebo exon 17
pes	irský setr	1949	University North Carolina, Chapel Hill, USA	FVIII:C<1%	sestřih intronu 22
pes	knírač-španěl-bígl	1982	Queen's University, Kingston, Canada	FVIII:C<1%	sestřih intronu 22
<b>Hemofilie B</b>					
myš	C57BL6-129Sv	1997	University North Carolina, Chapel Hill, USA	FIX:C <1%	KO, exony 1-3
myš	C57BL6-129Sv	1997	Scripps Research Institute, La Jolla, USA	FIX:C <1%	KO, exon 8
myš	C57BL6-129Sv	1998	Childrens Hospital Los Angeles, USA	FIX:C <1%	KO, exony 7-8
pes	teriér-bígl	1966	University North Carolina, Chapel Hill, USA	FIX:C <1%	záměnná mutace
pes	Lhasa apso	1996	Auburn University, Alabama, USA	FIX:C <1%	komplexní delece

KO – knock-out

faktorů (2). Koncentráty odvozené z plazmy dárců umožnily účinnou léčbu a prevenci krvácení a zásadně změnily kvalitu života hemofiliků. Preventivní aplikace koncentrátů 2–3x týdně v dětském věku zabránila rozvoji invalidizující hemofilické arthropatie v rozvinutých zemích (3). Z důvodu vysoké ceny koncentrátů však 80 % světové hemofilické populace zůstává bez léčby (rozvojové země).

Substituční terapie přinesla dvě závažné komplikace. První byl přenos virových infekcí (hepatitidy a HIV), který zpočátku postihl většinu hemofilické populace. Riziko přenosu známých patogenních virů (s výjimkou parvoviru B19) se v posledních 15 letech podařilo eliminovat výběrem dárců a zařazením detekce virů (NAT) a viry inaktivujících kroků do výrobního procesu. Zůstává teoretické riziko přenosu prionových a dosud nepoznaných infekcí. Druhou komplikací je indukce protilátek, které blokují aktivitu podávaného faktoru (inhibitor). Výskyt inhibitoru po plazmatických koncentrátech se popisuje u 10–25 % těžkých hemofiliků a v současné době je považován za nejzávažnější komplikaci substituční léčby v rozvinutých zemích.

Další vývoj léčby hemofilie vychází ze znalosti molekulární podstaty onemocnění a využívá principů rekombinantní technologie.

### ZVÍŘECÍ MODEL Y

Testování bezpečnosti a efektivity nových léků bylo v případě hemofilie v průběhu posledních 50 let usnadněno objevem přirozeně se vyskytující hemofilie u zvířat. Hemofilie byla popsána u psů (4–6), koček (7), ovcí (8) a koní (9). Nejlépe byly charakterizovány kolonie hemofilických psů (tab. 1), na nichž byly testovány již plazmatické koncentráty. Pro vývoj genové terapie byl později vytvořen malý zvířecí model – vyřazením (knock-out) genu pro faktor VIII, respektive IX, byly vytvořeny myši postižené těžkou formou hemofilie A, respektive B (tab. 1). Krvácivý fenotyp se projevuje krevními výrony do kloubů u psů a neztišitelným krvácením při poranění kůže u myši i u psů. Při testování nových léčebných postupů je stanovována jednak hladina chybějícího faktoru, jednak úprava krvácivých projevů po standardizovaném poranění kůže. Nebyl popsán výskyt hemofilie u primátů, chybí tedy důležitý model blízký člověku. Podařilo se alespoň vyvinout postupy, které umožňují specificky detekovat v plazmě nehemofilických makaků lidský faktor IX (10) a lidský faktor VIII (11). To umožňuje částečně testovat účinnost genové léčby (přítomná normální hladina endogenního faktoru IX nebo VIII makaka).

### MOŽNOSTI REKOMBINANTNÍ TECHNOLOGIE

Rekombinantní technologie dovoluje upravit DNA kódující příslušný gen tak, aby ji bylo možno vložit do buněk, a to ve formě plasmidu nebo virového vektoru (obr. 1). V posledních letech se podařilo cíleným zásahem do kódující sekvence genu ovlivnit strukturu koagulačního faktoru tak, aby získal nové, klinicky potřebné vlastnosti – vylepšené koagulační faktory (obr. 2).

Geneticky upravené buňky produkují potřebný koagulační faktor do svého okolí (obr. 1). Při výrobě rekombinantních koncentrátů je rekombinantní DNA vložena do buněk tkáňové kultury a koagulační faktor je izolován z média. Rekombinantní DNA může být vložena do zárodečných buněk a koagulační faktor izolován z tělních tekutin vzniklého transgenního organismu. Při pokusech o genovou léčbu je snaha rekombinantní DNA vložit do autologních nebo alogenních buněk tak, aby modifikované buňky dlouhodobě produkovaly chybějící faktor přímo v organismu nemocného.

Některé preklinické experimenty naznačují, že specificky navržené molekuly nukleových kyselin by mohly přímo v organismu hemofilika vést k opravě mutovaného genu nebo jeho produktu.

### VYLEPŠENÝ FAKTOR VIII

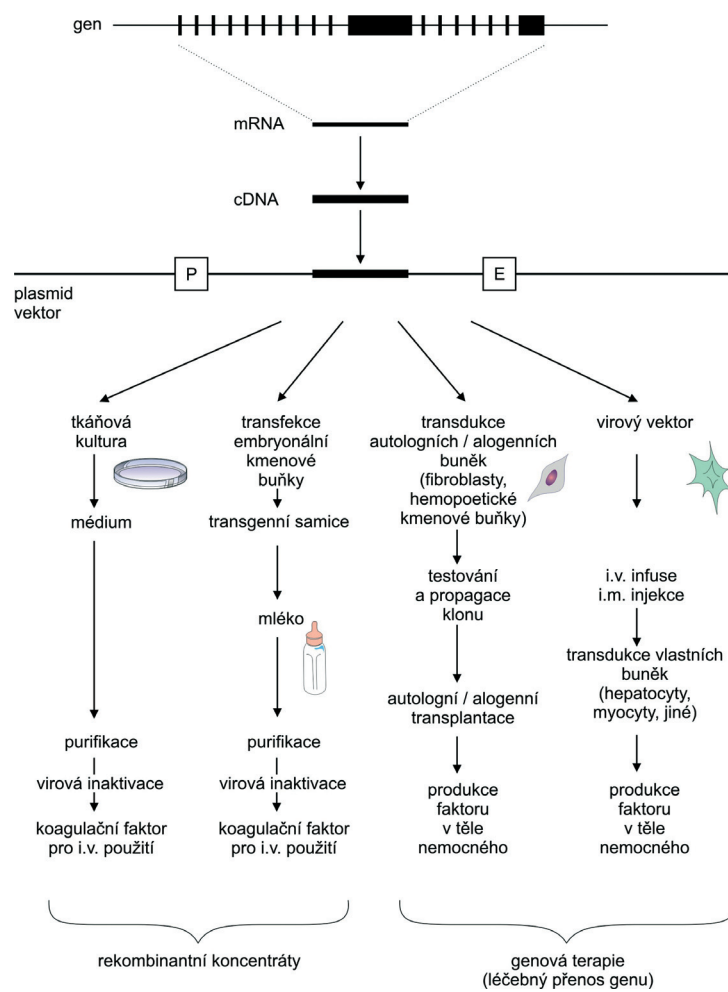
Úsilí o vylepšení molekuly faktoru VIII má tři hlavní cíle:

- zvýšení dostupnosti léčby ve světě, které předpokládá snížení ceny a vyžaduje efektivnější výrobu;
- minimalizaci počtu intravenózních injekcí například prodloužením poločasu faktoru VIII v krvi;
- minimalizaci protilátkové odpovědi inhibující funkci podávaného faktoru.

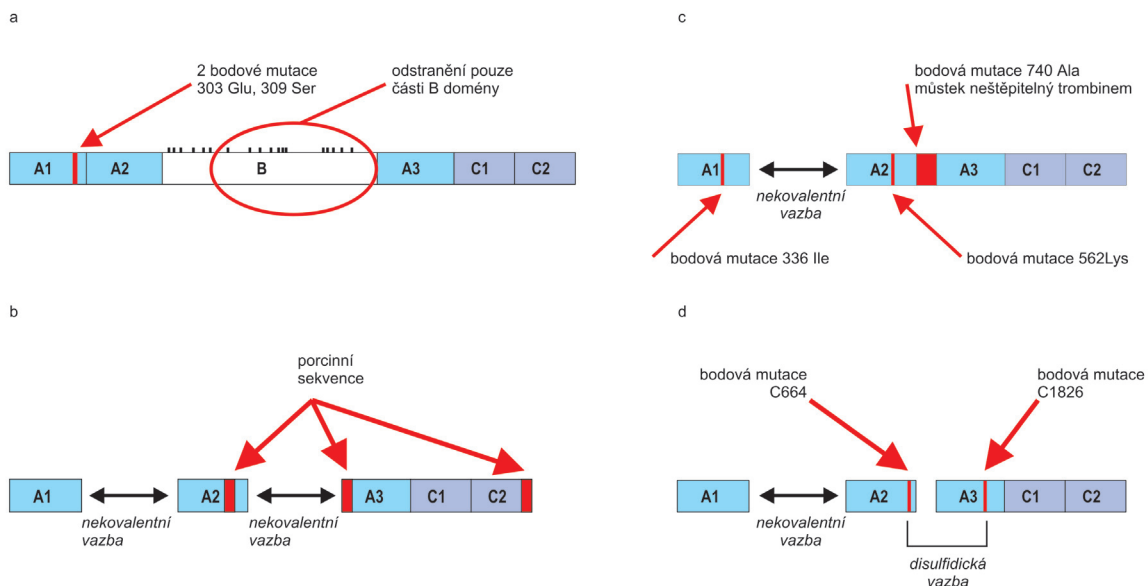
#### Zvýšená exprese

Expresce cDNA faktoru VIII ve tkáňové kultuře je o několik řádů nižší než u jiných bílkovin. Tento jev negativně ovlivňuje výrobu koncentrátů i efektivitu genové terapie. Podařilo se odhalit tři hlavní činitele, které produkci faktoru VIII buňkou ovlivňují. Prvním je přítomnost transkripčního inhibitoru v sekvenci kódující domény B faktoru VIII, druhým je silná interakce tvořícího se faktoru VIII (doména A1) s molekulárním chaperonem BiP (immunoglobulin binding protein, GRP78) a třetím nezbytnost glykosylace domény B pro efektivní transport tvořícího se faktoru VIII z endoplazmatického retikula do Golgiho komplexu (1).

Tyto poznatky vedly k vytvoření modifikovaného faktoru VIII



**Obr. 1.** Možnosti léčby hemofilie pomocí rekombinantní technologie – rekombinantní koncentráty a léčebný přenos genu  
Upravený gen koagulačního faktoru je vložen do plasmidu nebo virového vektoru, jímž je transdukována cílová buňka. Cis-elementy řídicí expresi transgenu (P – promotor, E – enhancer) mohou být tkáňově specifické. Vylepšené koagulační faktory jsou vytvářeny cíleným zásahem do sekvence cDNA.



**Obr. 2.** Cílené modifikace mohou vylepšit některé farmakokinetické a imunologické vlastnosti faktoru VIII  
a) Záměny aminokyselin na kodonech 303 a 309 v doméně A1 snižují afinitu tvořícího se faktoru VIII k chaperonu BiP. Spolu s odstraněním části domény B mizí také DNA sekvence inhibující transkripci. Zachovalá část B domény nese sacharidové zbytky nezbytné pro intracelulární transport.  
b) Sekvence prasečího původu jsou v místech, kam se váže většina protilátek inhibujících FVIII.  
c) Bodové mutace na kodonech 336 a 562 brání proteolytické inaktivaci faktoru VIII aktivovaným proteinem C. B doména je nahrazena můstkem, který není štěpitelný trombinem, a tím brání disociaci A2 domény od domény A3 v molekule aktivovaného faktoru VIIIa.  
d) Záměna dvou aminokyselin na styčných plochách mezi doménami A2 a A3 za cystein vede k vytvoření pevné disulfidické vazby mezi oběma doménami.

s částečně odstraněnou doménou B a se záměnou dvou aminokyselin v doméně A1 (obr. 3a). Jeho sekrece do média je 13násobně zvýšena při zachování koagulační aktivity. Dříve konstruovaný faktor VIII s úplně odstraněnou B doménou (rFVIII-SQ) vykazuje sice výrazné zvýšení transkripce (15x), ale jen částečné zvýšení produkce (1,5x). Stal se první a dosud jedinou vylepšenou molekulou faktoru VIII využívanou v klinické praxi (ReFacto) (tab. 2) (12). Odstranění B domény vede navíc k podstatnému zkrácení kódující DNA, což umožňuje využít pro genovou léčbu nadějně vektory na bázi adeno-asociovaného viru (13).

**Prodloužený poločas**

Faktor VIII je aktivován trombinem, který jej štěpí na třech specifických místech. Ve vzniklém heterotrimeru je podjednotka A2 velmi slabě vázána a její disociace způsobuje rychlou inaktivaci faktoru. Konečnou ireverzibilní inaktivaci zajišťuje aktivovaný protein C specifickým štěpením v doménách A1 a A2 (1).

Dvěma různými způsoby (obr. 2c a 2d) se podařilo vytvořit faktor VIII upravený tak, že po aktivaci trombinem doména A2 zůstane kovalentně vázána ke zbytku heterotrimeru faktoru VIIIa. Modifikovaný faktor VIII vykazuje výrazně prodloužený poločas *in vitro* i na myším modelu (14). Upravený faktor VIII (IR8) je zároveň rezistentní na inaktivaci aktivovaným proteinem C obou doménách (obr. 2c) (15).

**Snížená clearance**

Clearance faktoru VIII z cirkulace zajišťují endoteliální buňky prostřednictvím receptoru LRP (LDL receptor-related protein). Teoreticky se nabízí možnost provést takové záměny aminokyselin, které by změnily lokální náboj vazebných místech faktoru VIII pro LRP, a tím by snížily vychytávání faktoru VIII z cirkulace. Laboratorní ověření této možnosti zatím nebylo publikováno.

lizovány do určitých domén (A2, ar1 a C2). Na základě těchto pozorování byly vytvořeny molekuly hybridního lidského faktoru VIII s kritickými doménami částečně nahrazenými prasečí sekvencí (17). Hybridní humánní-porcinní faktor VIII je funkční *in vitro* i na zvířecím modelu. Vykazuje sníženou reaktivitu (antigenicitu) s většinou protilátek obsažených v panelu sér hemofiliků s inhibitory. Nejnovější výsledky na myším modelu naznačují též sníženou imunogenitu (18). Tyto nadějně výsledky ukazují, že by se touto cestou mohlo podařit vyvinout faktor VIII se sníženým rizikem specifické inhibující protilátkové odpovědi také u člověka.

**MODIFIKOVANÝ FAKTOR IX**

Úpravě molekuly faktoru IX byla zatím věnována menší pozornost. Podařilo se vytvořit modifikovaný faktor IX se sníženou vazbou na kolagen (záměna aminokyseliny v gla-doméně) a upravený faktor IX se zvýšenou specifickou aktivitou (záměna aminokyseliny v katalytické doméně). Obě modifikace by mohly přispět ke zvýšení efektivity genové léčby (19).

**TŘI GENERACE REKOMBINANTNÍCH KONCENTRÁTŮ**

K průmyslové výrobě koagulačních faktorů byly zvoleny buňky CHO (chinese hamster ovary) a BHK-21 (baby hamster kidney) prověřené desítkami let používání. Buňky modifikované vložením příslušného genu jsou po podrobném testování uchovány ve zmraženém stavu a tvoří základní buněčnou banku (MCB – master cell bank). Z té je po krátké expanzi v kultuře vytvořena pracovní buněčná banka (WCB – working cell bank), která je též uchována

Tab. 2. Tři generace rekombinantních koncentrátů

Klinické použití od roku/ výrobce	FVIII/ hemofilie A	FIX/ hemofilie B	FVIIa/ hemofilie s inhibitory
<b>1. generace</b> 1992 / Baxter 1993 / Bayer	Recombinate Kogenate		
<b>2. generace</b> 1996 / NovoNordisk 1998 / Genetics Institute 2000 / Bayer	ReFacto Kogenase FS		NovoSeven
<b>3. generace</b> 1995 / Genetics Institute 1998 / Genetics Institute 2000 / Baxter	ReFacto AF Advate PFM	Benefix	

FVIII – faktor VIII, FIX – faktor IX, FVIIa – aktivovaný faktor VII, FS – free of serum, AF – albumin-free, PFM – protein free manufacturing

Advate – CHO buňky produkují zároveň rekombinantní vWF, který stabilizuje FVIII v médiu; ReFacto – FVIII bez B domény; NovoSeven – syntetizován přirozený faktor VII, aktivován v průběhu purifikace

**Rezistence k inhibitoru**

Faktor VIII izolovaný z prasečí plazmy byl úspěšně používán pro léčbu nemocných s inhibitory (16). Tento postup byl umožněn nízkou zkříženou reaktivitou inhibitorů většiny hemofiliků s prasečím faktorem VIII. Aminokyselinové sekvence faktoru VIII člověka a prasete jsou vysoce homologní, nikoli však identické. Ukázalo se, že epitopy inhibujících protilátek jsou u většiny hemofiliků loka-

ve zmraženém stavu a po rozmrazení slouží jako základ pro individuální šarži koncentrátu. Objem suspenzní kultury se pohybuje mezi 100–2500 litrů. Zejména velkou bílkovinu faktoru VIII je nutno v médiu stabilizovat (albumin z plazmy dárců, rekombinantní von Willebrandův faktor, polysacharidy). Následuje purifikace cílového proteinu chromatografickými metodami. Při výrobě faktoru VIII probíhá afinitní chromatografie s pomocí myších protilátek

nebo syntetického ligandu. Některé preparáty jsou ještě protivirově ošetřeny (nanofiltrace, solvent-detergent). Tři generace rekombinantních preparátů se vzájemně liší teoretickým rizikem přenosu infekce v důsledku použití zvířecích bílkovin a albuminu lidského původu. Preparáty první generace využívají bílkoviny živočišného původu v kultivačním médiu a při purifikaci a albumin z plazmy dárce ke stabilizaci faktoru v konečné lékové formě. Preparáty druhé generace jsou bez přísady lidského albuminu (stabilizace polysacharidy). Koncentráty třetí generace jsou purifikovány pomocí syntetických ligandů a stabilizovány polysacharidy nebo rekombinantními bílkovinami (von Willebrandovým faktorem produkovaným zároveň s faktorem VIII přímo do média).

### REKOMBINANTNÍ FAKTORY V KLINICKÉ PRAXI

Rekombinantní faktory schválené ke klinickému použití u hemofilie jsou uvedeny v tabulce 3. Všechny tyto preparáty jsou považovány za účinné při zástavě a prevenci krvácení a bezpečné z hlediska přenosu infekce. Preparáty první a druhé generace faktoru VIII obsahují stopová množství zvířecích bílkovin, proti nimž vzniká imunitní odpověď, jejíž klinický význam nebyl zatím plně zhodnocen. Předmětem diskuze nadále zůstává riziko indukce protilátek inhibujících koagulační faktor (inhibitor). Byly provedeny klinické studie jak s nemocnými předlěčenými plazmatickými deriváty (PTP – previously treated patients), tak s dříve neléčenými hemofiliky (PUP – previously untreated patients). Studie zachytily vyšší výskyt inhibitoru (až u 35 % nemocných), než bylo uváděno u plazmatických derivátů. Inhibitor byl však u části nemocných pouze přechodný a odlišná metodika použitá u těchto studií brání přímému porovnání rizika indukce inhibitoru plazmatických a rekombinantních preparátů. Zdá se, že výskyt inhibitoru u modifikovaného faktoru VIII bez B domény je srovnatelný s ostatními rekombinantními preparáty (20). Rekombinantní preparáty jsou účinné při navození imunotolerance (21), ale zdá se, že von Willebrandův faktor přítomný v koncentrátech vyrobených z plazmy zvyšuje míru úspěšnosti (22).

Pro léčbu hemofilie B byl schválen jediný preparát rekombinantního faktoru IX, který je považován za účinný a bezpečný, ale pravděpodobně v důsledku kvantitativních rozdílů v glykosylaci vykazuje asi o 30 % nižší plazmatickou hladinu po i.v. podání, což vyžaduje aplikaci vyšších dávek (23).

Jako alternativa aktivovaných plazmatických koncentrátů byl pro léčbu hemofiliků s inhibitorem schválen rekombinantní aktivovaný faktor VII (rFVIIa). Syntéza rFVIIa vychází ze sekvence přirozeného faktoru VII, k aktivaci dochází bez přidání enzymu až v průběhu purifikace (tab. 2).

Rekombinantní koncentráty se staly standardní léčbou především dětské hemofilie v mnoha rozvinutých zemích. V ČR nejsou s výjimkou rFVII rekombinantní koncentráty v širším měřítku používány, a to především z ekonomických důvodů (t.č. se odhaduje 2–4násobná cena ve srovnání s již tak nákladnými plazmatickými koncentráty). Určitou roli může hrát obava ze zvýšení frekvence inhibitoru, která je v ČR poměrně nízká.

### TRANSGENNÍ ORGANIZMY

Transgenní organizmus (živočich nebo rostlina) je geneticky upraven tak, aby produkoval koagulační faktor do vhodné tělní tekutiny, z níž je následně izolován, přečištěn a připraven k léčebnému použití (24). Zatím se podařilo vytvořit transgenní savec, ryby (25) a rostliny produkující rekombinantní faktory VIII, FIX nebo faktor VIIa do mléka (26–29) krve nebo listů. Za vhodný

transgenní organizmus pro výrobu faktorů VIII a IX k použití v humánní medicíně je z několika důvodů považováno prase. Obafaktory vykazují řadu posttranslačních modifikací, které jsou u prasete a člověka obdobné. U prasat, na rozdíl od ovcí či krav, nebyl prokázán výskyt prionové choroby typu spongiformní encefalidity. Naděje na vyšší efektivitu výroby se zakládají na skutečnosti, že denzita buněk v mléčné žláze prasete je o tři řády vyšší ve srovnání s denzitou buněk tkáňových kultur ve fermentačních nádobách při výrobě rekombinantních preparátů. Výroba koncentrátů s pomocí transgenních organizmů vylučuje teoretické riziko přenosu lidské infekce. Teoretické riziko přenosu jiné infekce vyžaduje zařazení virové inaktivace do výrobního postupu. Transgenní technologií je vyráběna řada klinicky využívaných bílkovin, avšak z oblasti plazmatické koagulace zatím pouze antitrombin (30).

### GENOVÁ LÉČBA

Hemofilie je z více důvodů považována za vhodný model pro genovou léčbu dědičných chorob. Především jde o onemocnění monogenní s poměrně jednoduchou a dobře prozkoumanou molekulární patogenezi. Chybějící faktory VIII a IX se uplatňují v krvi, kam jsou produkovány bez složitých regulačních mechanismů (na rozdíl například od inzulinu). Navíc jsou k dispozici malé a větší zvířecí modely (tab. 1) pro preklinické testování efektivity a bezpečnosti genové léčby. Efektivitu genového přenosu lze snadno monitorovat rutinními metodami v běžně dostupném vzorku (aktivita a antigen FVIII nebo IX v plazmě). Svou roli hraje také dosud příznivá klinická zkušenost s podáváním rekombinantních koncentrátů. V neposlední řadě je významné, že nároky na dosaženou hladinu faktoru v krvi mohou být zpočátku relativně nízké (1–5 % normální hladiny), neboť bylo prokázáno, že u těžké formy hemofilie už malé dlouhodobé zvýšení hladiny chybějícího faktoru výrazně snižuje frekvenci hemofilické artropatie (3). Genová léčba by omezila potřebu častých intravenózních aplikací koncentrátů.

V průběhu posledních dvou desetiletí byla v tkáňových kulturách a na zvířecích modelech testována řada odlišných přístupů od léčebného přenosu genu po opravy přímo v buňkách nemocného organismu (31). Není dosud znám optimální postup pro genovou léčbu hemofilie. Úkolem experimentů *in vitro*, preklinických a klinických studií je ověření teoreticky předpokládaných výhod a nevýhod jednotlivých přístupů.

#### Léčebný přenos genu

V současné době je nejbliže klinickému využití léčebný přenos genu. Cílem je přidat do organismu hemofilika funkční gen produkující přirozený nebo modifikovaný faktor VIII nebo faktor IX. Nově je zvažován přenos aktivovaného faktoru VIIa (32).

Vnesení funkčního transgenu do organismu lze dosáhnout genetickou modifikací autologních nebo alogenních buněk *ex vivo* s následnou selekcí, expansí a transplantací. Druhou možností je podat transgen *in vivo* – systémově (i.v.) nebo lokálně (i.m., selektivní katetrizace a. hepatica) tak, aby byl přijat buňkami organismu, které pak produkují cílový protein.

Molekula DNA kódující transgen by měla být efektivně přijímána cílovými buňkami a perzistovat v nich v aktivní formě po dlouhou dobu (řadu let, nebo alespoň měsíců). Vyskytuje-li se transgen v buňce jen v epizomální podobě (v cytoplasmě), dochází k jeho ředění při každém dělení buňky až je postupně ztracen. Cílové buňky by v tomto případě neměly být mitoticky aktivní. Podaří-li se transgen zabudovat do genomu cílové buňky, je zajištěno jeho předávání při dělení buněk. I v těchto případech však může časem dojít k utišení jeho aktivity, například mechanismem hypermetylace. Inzerce transgenu je spojena s reálným rizikem inzerční mutagenyze a vznikem maligního nádoru, například leukémie (33). Další



Tab. 3. Klinické zkoušky genové léčby hemofilie

Zahájení studie	pracoviště a sponzor	gen	vektor	aplikace	dobrovolníci	komplikace	literatura
1993	Fudan University, Šanghaj, Čína	FIX	retrovirus MoMLV	<i>ex vivo</i> (kožní fibroblasty)	2		40
1998	Beth Israel Deaconnes Medical Centre, Boston, USA	FL FVIII	nahá DNA	<i>ex vivo</i> (kožní fibroblasty transpl. na omentum)	6/6 HBV/HCV+ 4/6 HIV+ ukončena	bez toxicity	41
1999	TKT Inc. Boston University of Pittsburgh, USA	BDD FVIII	retrovirus MoMLV	<i>i.v.</i>	13/13 HBV/HCV+ 5/13 HIV+ ukončena	sporná přítomnost vektoru ve spermatu	42
1999	University of Pittsburgh, USA Avigen Inc. Alameda	FIX	rAAV	<i>i.m.</i>	5/8 HBV/HCV+ 2/8 HIV+ ukončena	bez toxicity	43, 44
2001	University of Pittsburgh, USA Avigen Inc. Alameda	FIX	rAAV	a.hepatica	7 pac, pozastavena	přítomnost vektoru ve spermatu, přechodná elevace JT	39
2001	School of Medicine Chapell Hill, USA GenStar, Alameda, SanDiego	BDD FVIII	mAd	<i>i.v.</i>	1 pac, pozastavena	přechodně vzestup ALT trombocytopenie zánětlivé příznaky	39

BDD FVIII – FVIII bez B domény, MoMLV – Moloney murine leukaemia virus, rAAV – recombinant adeno-associated virus, mAd – gutted adenovirus - odstraněna většina vlastních genů

významnou komplikací léčebného přenosu genu je imunitní odpověď organismu na samotný transgen (hypometylovaná sekvence), na vektor (antigeny na povrchu a uvnitř partikule) a konečně na produkovaný koagulační faktor (inhibitor). Imunitní destrukce transdukováných buněk je pokládána za hlavní mechanismus předčasného selhání produkce transgenu *in vivo*. Závažným nežádoucím účinkem by byl přenos transgenu na další generaci, proto je sledována přítomnost vektoru ve spermatu.

V experimentech na hemofilických modelech jsou testovány transgeny ve formě plasmidů (nevirové systémy), které jsou buď aplikovány jako nahá DNA (naked DNA) (34), nebo po vložení do lipozómů (35), případně navázání na nanočástice (36). Vedle toho jsou hledány vhodné systémy na bázi virových vektorů odvozených z virů původně patogenních (adenoviry a retroviry) nebo nepatogenních (adeno-asociovaný virus) pro člověka. Při použití virových systémů je transgen vložen do genomu virového vektoru. Virové částice jsou amplifikovány ve tkáňové kultuře a purifikovány tak, aby byly připraveny k aplikaci *in vivo*, případně k transdukcii autologních nebo alogenních buněk *ex vivo*. Retrovirové vektory s výjimkou lentivirových transdukují jen dělicí se buňky. Vektory na bázi adenoviru, lentiviru a adeno-asociovaného viru (rAAV) transdukují i buňky, které se nedělí. To je nutno zohlednit při volbě cílové tkáně.

Zaměření na cílovou buňku je dáno cestou aplikace (systémová, lokální), vazebnými antigeny na povrchu virové partikule (jejich modifikace se označuje jako pseudotypování vektoru), lipozómu nebo nanočástice a tkáňově specifickými regulačními sekvencemi transgenu. Vektory se vzájemně liší parametry, jako jsou efektivita transdukcce, schopnost transdukovat nedělicí se buňky, schopnost integrace transgenu do genomu cílové buňky, intenzita imunitní odpovědi a konečně velikost transgenu, který je vektor schopen pojmout (packing capacity). Vzhledem k tomu, že dosud jediným

ověřeným způsobem jak vyléčit hemofilii je ortotopická transplantace jater, nabízí se hepatocyt jako vhodná cílová buňka. Zde však nelze použít jinak velmi efektivních retrovirových vektorů (v preklinických experimentech byly úspěšně prováděny parciální hepatektomie a podávány hepatální růstové faktory). Byly testovány další typy cílových buněk včetně kožních fibroblastů, skeletálního svalu a krvetvorné kmenové buňky (s cílem lokálního uvolnění FVIII z modifikovaných krevních destiček) (37).

Preklinické studie byly provedeny na myších a psích modelech hemofilie a na nehemofilických primátech (makak). Byly studovány otázky dlouhodobé terapeutické hladiny faktoru, rizika rozvoje inhibitoru a kontroly specifických rizik genového přenosu (inzerční mutagenese, transdukcce pohlavních buněk). Z důvodu druhové odlišnosti faktoru VIII byly některé experimenty prováděny na imunodeficientních myších (NOD/SCID), při jiných bylo použito druhově specifických genů. Byly testovány promotory různé síly a byl ověřován význam tkáňově specifické exprese léčebného transgenu (kosterní sval, játra, nespecifický promotor) pro efektivitu sekrece FVIII a FIX do plazmy. Na myším i psím modelu se podařilo dosáhnout nejen dlouhodobé (roky) normalizace hladiny faktoru VIII, respektive IX, ale také upravit krvácivý fenotyp.

Prezentace antigenu faktoru VIII nebo IX imunitnímu systému je při genové léčbě jiná než při intravenózní aplikaci. Proto lze jen omezeně odvozovat riziko vzniku inhibitoru ze zkušeností s podáváním rekombinantních koncentrátů. Riziko vzniku inhibitoru při genové terapii lze z důvodu odlišnosti imunitního systému jen částečně predikovat ze zvířecích modelů. Teoreticky je možné, že setrvalá sekrece faktoru buňkami organismu povede k imunotoleranci nebo naopak k indukci inhibitoru. Pravděpodobně záleží též na cílové tkáni (38). Odpověď na tuto otázku se nakonec bez klinických experimentů neobejde.

### Klinické zkoušení léčebného přenosu genu

Nadějně preklinické výsledky vedly k zahájení prvních klinických zkoušek (fáze I–II), které jsou shrnuty v tabulce 3. Většina proběhla na přelomu tisíciletí ve USA pod dozorem RAC (Recombinant DNA Advisory Committee). Provedení pokusu o léčebný přenos genu bylo dosud publikováno u 43 dospělých těžkých hemofiliků (39), jak shrnuje tabulka 3 (40–44). Dobrovolníci byli před tím dlouhodobě léčeni koncentráty, aniž vyvinuli inhibitor, byla u nich zjištěna genetická příčina hemofilie a asi polovina z nich dříve prodělala některou z infekcí, které se často vyskytují zejména u starší generace hemofiliků – HCV, HBV nebo HIV. Aby bylo možno sledovat případné dlouhodobé nežádoucí účinky genové léčby, nepočítá se se zařazováním těchto dobrovolníků do dalších studií.

Primárním cílem uvedených studií bylo ověření bezpečnosti různých metodických přístupů, které se lišily způsobem aplikace, léčebným transgenem a způsobem transdukce. V současné době byly všechny studie již ukončeny, dvě z nich předčasně z důvodu výskytu nežádoucích účinků (přechodná elevace jaterních testů a přítomnost vektoru ve spermatu). S vektory odvozenými od adenoviru byla zánětlivá reakce a jaterní toxicita popsána již při klinickém zkoušení u jiných diagnóz, v jednom případě měla fatální následky (45). V případě vektoru rAAV však jde o neočekávaný náález. Nemocní, jimž byl podán retrovirový vektor, budou doživotně sledováni pro riziko inserční mutagenese (46). U žádného ze 43 dosud testovaných hemofiliků nedošlo k rozvoji inhibitoru.

V průběhu klinického sledování, které trvalo řadu měsíců, byla akutní krvácení léčena koncentráty podle potřeby. Bylo pozorováno mírné snížení spotřeby, které však může být připsáno placebo efektu. Opakovaně byly naměřeny plazmatické hladiny faktoru nad 1 %, avšak u žádného dobrovolníka nedošlo k dlouhodobému vzestupu.

### Oprava hemofilické buňky

Tyto postupy jsou ve velmi časném stadiu vývoje. Cílem chimera-plastiky je oprava poškozeného genu přímo v buňkách nemocného. Využívá endogenních mechanismů pro opravu DNA, jimž je jako předloha nabídnuta hybridní RNA/DNA molekula se správnou sekvencí (34, 47). Cílem metody SMaRT (spliceosome-mediated RNA trans-splicing) je oprava abnormální mRNA faktoru VIII, a tím dosažení produkce normálního faktoru VIII buňkou, aniž došlo k opravě genu samotného. Metoda využívá buněčné mechanismy maturace mRNA, jimž je předložena specificky navržená RNA s opravenou sekvencí. Touto metodou se podařilo přechodně opravit inzerci v exonu 16 a normalizovat hladinu faktoru VIII u vyššího modelu hemofilie A (48).

### ZÁVĚR

S vývojem rekombinantních koncentrátů a genové terapie byla spojena velká očekávání, která se zatím podařilo naplnit jen částečně. Za největší úspěch lze považovat schválení třetí generace rekombinantních koncentrátů koagulačních faktorů VIII a IX pro klinické použití, neboť tyto preparáty jsou již prosty teoretického rizika přenosu známých lidských infekcí. První modifikovaný rekombinantní faktor VIII bez B domény je úspěšně používán v klinické praxi. Plné zhodnocení dalších rizik si však vyžádá ještě delší časové období. Zatím se nepodařilo snížit riziko indukce inhibitoru se ve srovnání s plazmatickými koncentráty. Rekombinantní koncentrát faktoru VIIa je vhodný pro léčbu nemocných s inhibitorem.

Naděje, že rekombinantní koncentráty budou lacinější, a tak umožní dostupnost léčby v chudších zemích, byly zklamány. Novou nadějí jsou rekombinantní preparáty transgenního původu a genová léčba. První fáze klinického zkoušení léčebného přenosu genu u hemofilie však ukázaly, že použité postupy jsou sice relativně bezpečné, ale dosažení terapeutické účinnosti si vyžádá ještě další

preklinický výzkum. Při zavádění genové léčby do praxe bude nutno mít na zřeteli, že v současné době dostupná substituční léčba je velmi bezpečná a je prokazatelně efektivní (49). Vývoj transgenických koncentrátů bohužel zůstává nadále v preklinickém stadiu. Podařilo se vyvinout a částečně otestovat některé další nadějně modifikace faktorů VIII a IX, které by do budoucna mohly zvýšit účinnost genové léčby, snížit frekvenci intravenózních aplikací, nebo dokonce snížit riziko vzniku inhibitoru.

### Zkratky

BDD-FVIII	– B domain deleted factor VIII
BHK-21	– baby hamster kidney
FVIII	– faktor VIII
FIX	– faktor IX
HBV	– virus hepatitidy B
HCV	– virus hepatitidy C
HIV	– virus lidské imunodeficiency
CHO	– chinese hamster ovary
mAd	– gutted adenovirus
MoMLV	– Moloney murine leukaemia virus
MCB	– master cell bank
NAT	– nuclear acid testing
NOD	– non-obese diabetic
rAAV	– recombinant adeno-associated virus
RAC	– Recombinant DNA Advisory Committee
SCID	– severe combined immunodeficiency
SMaRT	– spliceosome-mediated RNA trans-splicing
WCB	– working cell bank

### LITERATURA

1. **Habart, D.:** Molekulární patogeneze hemofilie A. Čas. Lék. čes., 2005, 144, s. 795-800.
2. **Gianguardo, P. L.:** Blood products for hemophilia: past, present and future. BioDrugs, 2004, 18, s. 225-234.
3. **Nilsson, I. M., Berntorp, E., Lofqvist, T., Pettersson, H.:** Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. J. Intern. Med., 1992, 232, s. 25-32.
4. **Graham, J. B., Bucwalter, J. A., Hartley, L. J., Brinkhous, K. M.:** Canine haemophilia: observation on the course, the clotting anomaly and the effect of blood transfusions. J. Exp. Med., 1949, 90, s. 97-111.
5. **Giles, A. R., Tinlin, S., Greenwood, R.:** A canine model of hemophilic (factor VIII:C deficiency) bleeding. Blood, 1982, 60, s. 727-730.
6. **Mausser, A. E., Whitlark, J., Whitney, K. M., Lothrop, C. D. Jr.:** A deletion mutation causes hemophilia B in Lhasa Apso dogs. Blood, 1996, 88, s. 3451-3455.
7. **Maggio-Price, L., Dodds, W. J.:** Factor IX deficiency (hemophilia B) in a family of British shorthair cats. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1993, 203, s. 1702-1704.
8. **Neuenschwander, S., Kissling-Albrecht, L., Heiniger, J. et al.:** Inherited defect of blood clotting factor VIII (haemophilia A) in sheep. Thromb. Haemost., 1992, 68, s. 618-620.
9. **Littlewood, J. D., Bevan, S. A., Corke, M. J.:** Haemophilia A (classic haemophilia, factor VIII deficiency) in a Thoroughbred colt foal. Equine Vet. J., 1991, 23, s. 70-72.
10. **Mimuro, J., Mizukami, H., Ono, F. et al.:** Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques. J. Thromb. Haemost., 2004, 2, s. 275-280.
11. **Andrews, J. L., Shirley, P. S., Iverson, W. O. et al.:** Evaluation of the duration of human factor VIII expression in nonhuman primates after systemic delivery of an adenoviral vector. Hum. Gene Ther., 2002, 13, s. 1331-1336.
12. **Sandberg, H., Almstedt, A., Brandt, J. et al.:** Structural and functional characteristics of the B-domain-deleted recombinant factor VIII protein, r-VIII SQ. Thromb. Haemost., 2001, 85, s. 93-100.
13. **Gnatenko, D. V., Saenko, E. L., Jesty, J. et al.:** Human factor VIII can be packaged and functionally expressed in an adeno-associated

- virus background: applicability to haemophilia A gene therapy. *Br. J. Haematol.*, 1999, 104, s. 27-36.
14. **Gale, A. J., Pellequer, J. L., Xu, X. et al.:** An engineered interdomain disulfide bond stabilizes human blood coagulation factor VIIIa. Interdomain engineered disulfide bond permitting elucidation of mechanisms of inactivation of coagulation factor Va by activated protein C. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, 1, s. 1966-1971.
  15. **Pipe, S. W., Kaufman, R. J.:** Characterization of a genetically engineered inactivation-resistant coagulation factor VIIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, s. 11851-11856.
  16. **Brettler, D. B., Forsberg, A. D., Levine, P. H. et al.:** The use of porcine factor VIII concentrate (Hyate:C) in the treatment of patients with inhibitor antibodies to factor VIII. A multicenter US experience. *Arch. Intern. Med.*, 1989, 149, s. 1381-1385.
  17. **Barrow, R. T., Healey, J. F., Gailani, D. et al.:** Reduction of the antigenicity of factor VIII toward complex inhibitory antibody plasmas using multiply-substituted hybrid human/porcine factor VIII molecules. *Blood*, 2000, 95, s. 564-568.
  18. **Parker, E. T., Healey, J. F., Barrow, R. T. et al.:** Reduction of the inhibitory antibody response to human factor VIII in hemophilia A mice by mutagenesis of the A2 domain B-cell epitope. *Blood*, 2004, 104, s. 704-710.
  19. **Schuettrumpf, J., Herzog, R. W., Schlachterman, A. et al.:** Factor IX variants improve gene therapy efficacy for hemophilia B. *Blood*, 2005, 105, s. 2316-2323.
  20. **Gringeri, A., Tagliaferri, A., Tagariello, G. et al.:** Efficacy and inhibitor development in previously treated patients with haemophilia A switched to a B domain-deleted recombinant factor VIII. *Br. J. Haematol.*, 2004, 126, s. 398-404.
  21. **Battle, J., Lopez, M. F., Brackmann, H. H. et al.:** Induction of immune tolerance with recombinant factor VIII in haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia*, 1999, 5, s. 431-435.
  22. **Mariani, G., Siragusa, S., Kroner, B. L.:** Immune tolerance induction in hemophilia A: a review. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2003, 29, s. 69-76.
  23. **Kisker, C. T., Eisberg, A., Schwartz, B.:** Prophylaxis in factor IX deficiency product and patient variation. *Haemophilia*, 2003, 9, s. 279-284.
  24. **Soukharev, S., Hammond, D., Ananyeva, N. M. et al.:** Expression of factor VIII in recombinant and transgenic systems. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002, 28, s. 234-248.
  25. **Hwang, G., Muller, F., Rahman, M. A. et al.:** Fish as Bioreactors: Transgene Expression of Human Coagulation Factor VII in Fish Embryos. *Mar. Biotechnol.*, 2004, 29, s. 29.
  26. **Paleyanda, R. K., Velandar, W. H., Lee, T. K. et al.:** Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat. Biotechnol.*, 1997, 15, s. 971-975.
  27. **Lindsay, M., Gil, G. C., Cadiz, A. et al.:** Purification of recombinant DNA-derived factor IX produced in transgenic pig milk and fractionation of active and inactive subpopulations. *J. Chromatogr. A.*, 2004, 1026, s. 149-157.
  28. **Hiripi, L., Makovics, F., Halter, R. et al.:** Expression of active human blood clotting factor VIII in mammary gland of transgenic rabbits. *DNA Cell Biol.*, 2003, 22, s. 41-45.
  29. **Niemann, H., Halter, R., Carnwath, J. W.:** Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic. Res.*, 1999, 8, s. 237-247.
  30. **Lu, W., Mant, T., Levy, J. H., Bailey, J. M.:** Pharmacokinetics of recombinant transgenic antithrombin in volunteers. *Anesth. Analg.*, 2000, 90, s. 531-534.
  31. **Lozier, J.:** Gene therapy of the hemophilias. *Semin. Hematol.*, 2004, 41, s. 287-296.
  32. **Margaritis, P., Arruda, V. R., Aljamali, M. et al.:** Novel therapeutic approach for hemophilia using gene delivery of an engineered secreted activated Factor VII. *J. Clin. Invest.*, 2004, 113, s. 1025-1031.
  33. **Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M. et al.:** LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003, 302, s. 415-419.
  34. **Kren, B. T., Bandyopadhyay, P., Steer, C. J.:** In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat. Med.*, 1998, 4, s. 285-290.
  35. **Baru, M., Axelrod, J. H., Nur, I.:** Liposome-encapsulated DNA-mediated gene transfer and synthesis of human factor IX in mice. *Gene*, 1995, 161, s. 143-150.
  36. **Yamada, T., Iwasaki, Y., Tada, H. et al.:** Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21, s. 885-890.
  37. **Wilcox, D. A., Shi, Q., Nurden, P. et al.:** Induction of megakaryocytes to synthesize and store a releasable pool of human factor VIII. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, 1, s. 2477-2489.
  38. **Herzog, R. W.:** Recent advances in hepatic gene transfer: more efficacy and less immunogenicity. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, 2005, 8, s. 199-206.
  39. **Hough, C., Lillicrap, D.:** Gene therapy for hemophilia: an imperative to succeed. *J. Thromb. Haemost.*, 2005, 3, s. 1195-1205.
  40. **Lu, D. R., Zhou, J. M., Zheng, B. et al.:** Stage I clinical trial of gene therapy for hemophilia B. *Sci. China B.*, 1993, 36, s. 1342 až 1351.
  41. **Roth, D. A., Tawa, N. E., Jr., O'Brien, J. M. et al.:** Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344, s. 1735-1742.
  42. **Powell, J. S., Ragni, M. V., White, G. C. et al.:** Phase 1 trial of FVIII gene transfer for severe hemophilia A using a retroviral construct administered by peripheral intravenous infusion. *Blood*, 2003, 102, s. 2038-2045.
  43. **Manno, C. S., Chew, A. J., Hutchison, S. et al.:** AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood*, 2003, 101, s. 2963-2972.
  44. **Kay, M. A., Manno, C. S., Ragni, M. V. et al.:** Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat. Genet.*, 2000, 24, s. 257-261.
  45. **Marshall, E.:** Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 1999, 286, s. 2244-2245.
  46. **Buckley, R. H.:** Gene therapy for SCID--a complication after remarkable progress. *Lancet*, 2002, 360, s. 1185-1186.
  47. **Zhang, Z., Eriksson, M., Blomback, M., Anvret, M.:** A new approach to gene therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1997, 8, s. S39-S42.
  48. **Chao, H., Mansfield, S. G., Bartel, R. C. et al.:** Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat. Med.*, 2003, 9, s. 1015-1019.
  49. **Giangrande, P. L.:** Gene therapy for hemophilia? *No. J. Thromb. Haemost.*, 2004, 2, s. 1236-1237.c

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZČR VZ 002373601.

Děkuji MUDr. Zdeně Vorlové, CSc., MUDr. Peteru Salajovi a prof. MUDr. Vladimíru Vonkovi, DrSc. za přečtení rukopisu a kritické

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

# Psychosomatické přístupy v dermatovenerologii

Pánková R.

*Dermatovenerologická klinika I. LF UK a VFN, Praha*

SOUHRN

Psychosomatická dermatovenerologie je součástí psychodermatologie – psychocutaneous medicine, která zahrnuje celostní přístup k člověku ve zdraví i v nemoci a biopsychosociální jednotu člověka. Dělení nemocí na psychosomatické a somatické nahrazuje biopsychosociálním modelem onemocnění. Vědecké poznatky o neurogení modulaci kožního zánětu a častý výskyt psychosociálních vlivů i poruch chování u kožních pacientů, vyvolávají zvýšený zájem dermatovenerologů o psychosomatický přístup a mezioborovou spolupráci. Cílem Psychodermatologické sekce Dermatovenerologické společnosti ČLS JEP, která byla ustavena v září 2004, je zlepšení léčebné péče v dermatovenerologii a zvýšení kvality života kožních pacientů.

**Klíčová slova:** psychodermatologie, psychosomatický přístup k dermatovenerologickým pacientům, ustavení Psychodermatologické sekce ČDS ČLS JEP, mezioborová spolupráce.

SUMMARY

*Pánková R.: Psychosomatic Approach in Dermatovenerology*

Psychosomatic approach is a component of psychodermatology, which accentuates a holistic principle and psychosocial unity of man. Research data concerning the neurogenic modulation of skin inflammations, together with the prevalence of psychosocial influences in dermatological patients, motivate an increased interest of dermatovenerologists in psychodermatology and in the interdisciplinary cooperation with clinical psychologists, psychiatrists and other pertinent specialists. The Section of the Psychodermatology of the Czech Dermatovenerological Society was established in September 3rd 2004, in order to improve dermatovenerological care and the quality of life in dermatological patients.

**Key words:** psychodermatology, psychosomatic approach in dermatovenerology, foundation of the Section of Psychodermatology of the Czech Dermatovenerological Society, interdisciplinary cooperation. *Pá.*

*Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 112–115.*

MOTTO:

*„Kůže je zrcadlem naší emoční pohody. Často se však rozhodneme nevšimnout si psychologicko-etnologického pozadí a léčíme pouze kožní změny. Divíme se pak, proč je naše léčba neúčinná?“*

*G. Lazarus, 1986*

**O** psychosomatické věděli lékaři více než před 2000 lety (1, 2). Psychosomatická dermatovenerologie je součástí psychodermatologie – psychocutaneous medicine, která zahrnuje celostní přístup k člověku ve zdraví i v nemoci a biopsychosociální jednotu člověka. Dělení nemocí na psychosomatické a somatické nahrazuje biopsychosociálním modelem onemocnění. Ve výzkumu, léčbě a prevenci kožních nemocí využívá mezioborovou spolupráci (3).

Sledováním psychických vlivů na vztahy kůže a lidské psychiky se zabývali mnozí dermatologové. Klasifikaci „psychodermatóz“ publikovali: Stern (1922), Sack (1933), Stokes (1940), Šamberger (1944), Becker a Obermyer (1947), Sulzberger (1948), Wittkower (1948), Alexander (1951), Gay Prieto (1951), Duverne a Gaté (1952), Torr (1952), Pillsbury (1953), Borrelli (1969), Rook a Wilkinson (1972), Koblenzerová (1983) a jiní. Rozdělení „psychoder-

matóz“ představuje četná úskalí. Z klinického hlediska je vhodné rámcově rozlišení na čtyři, ne zcela přesně vymezené skupiny, které se mohou částečně překrývat. Rook například považoval **všechna kožní onemocnění** do jisté míry za „psychosomatická nebo somatopsychická“ (4).

Skupinu dermatóz multifaktoriální etiologie, u nichž **emoční a sociální zátěže výrazně ovlivňují klinický průběh i chování pacientů** představují: psoriáza, atopická dermatitida, urtikarie, seboroická dermatitida, rosacea, acne vulgaris, periorální dermatitida, areatní alopecie, telogenní deffluvium, recidivující infekce herpes simplex virem 1,2, pemfigus, vitiligo, lichen planus, dermatitis herpetiformis, ano-genitální pruritus, hyperhidróza a některé sexuálně přenosné infekce. Poznatky vyplývají z vědeckých nálezů na molekulární úrovni a ze závěrů klinických studií (5–12).

U dermatóz se závažným klinickým průběhem se mohou vyvinout **sekundární psychické poruchy**: u pacientů s acne cystica a conglobata, generalizovaným atopickým ekzémem, periorální dermatitidou, rosaceou, erythrodermií, maligním melanomem. Subjektivní prožívání nemocného však nebývá přímo úměrné závažnosti kožního onemocnění nebo sexuálně přenosné infekci. Pacient „překvapivě“ vnímá minimální klinické projevy jako velmi závažné. Individuální rozdíly jsou značné a souvisí s dobou trvání

doc. MUDr. Růžena Pánková, CSc.  
128 08 Praha 2, U Nemocnice 2  
fax: +420 224 923 759, e-mail: ruzena.pankova@lf1.cuni.cz



a lokalizací kožních změn, věkem pacienta, osobnostními faktory, rodinným a sociálním zázemím a schopnostmi adaptace. Pacienti trpí úzkostně depresivní poruchou, narušeným vnímáním vlastního těla (13–15).

Dermatitis artefacta, bludné představy související s kůží, onychofagie, glossodynie a glossopyrosis, psychogenní erytémový syndrom, dysmorfofobie, trichotillomanie, neurotické exkoriace, skin picking, acne excoriée jsou stavy, které se vyskytují u pacientů s **primárními psychickými změnami a poruchami osobnosti** (16–19). Příčinou bývají somatoformní, depresivní a obsesivně kompulzivní poruchy. U některých psychodermatologických pacientů se vyskytuje syndrom poruchy senzorického vnímání kůží (20).

Rozvoj současně psychosomatické dermatovenerologie je důsledkem: vědeckých poznatků o ultrastruktuře kůže; klinických zkušeností dermatovenerologů se selháním somatických léčebných postupů; snahy o zkvalitnění dermatovenerologické péče o nemocné a mezioborovou spolupráci.

Na znovuoživení zájmu dermatovenerologů o **neurogenní modulace kožního zánětu** se podílejí současné nálezy na molekulární úrovni a psychoneuroimunologie (21, 22).

Neuropeptidy, neurotransmitery, neurotrofiny a neurohormony se zúčastňují imunomodulačních reakcí akutní, chronické i regenerační fáze kožního zánětu (23).

Za fyziologických podmínek jsou kožní buňky schopny uvolňovat neuropeptidy. Vazebná místa pro neuromediátory mají keratinocyty, fibroblasty, žírné, Merkelovy a Langerhansovy buňky, endotelie drobných cév a leukocyty (24).

Interakce mezi periferními nervy a imunitním systémem je zajišťována různými typy kožních nervových vláken, uvolňujících neuromediátory a aktivujících specifické receptory na cílových buňkách v kůži. Tyto interakce ovlivňují různé fyziologické, ale i patofyziologické funkce včetně vývoje buněk, růstu, diferenciaci, imunity, cévní regulace, mobilizace leukocytů, pruritu, hojení ran a vzniku dermatóz (25).

Nejznámější neuropeptidy v kůži jsou substance P (SP), neurokinin A (NKA), kalcitoninu genově příbuzný peptid (CGRP), vazomotorický peptid (VIP), neurotensin, polypeptid aktivující hypofyzární adenylátcyklázu (PACAP), peptid histidin-izoleucin a histidin-methionin (PHI/M), somatostatin (SOM), beta-endorfin, enkefalin, galanin, atriální natriuretický peptid, alfa-melanocyty stimulující hormon (MSH), hormon uvolňující kortikotropin (CRH), pro-opiomelanokortinové peptidy (POMC).

Zdrojem nepeptidových neurotransmiterů acetylcholinu, adrenalinu a noradrenalinu jsou kožní autonomní cholinergní a adrenergní nervy, keratinocyty, lymfocyty a melanocyty. Fyziologická kontrola buněčných reakcí na různé zánětlivé podněty vyžaduje regulaci na více úrovních. Dysregulace těchto procesů může vést k onemocnění nebo nekontrolovanému zánětu, zvýšené permeabilitě cév, hyperalgezií, analgezií nebo pruritu (26).

**Specifická neuronová dráha pro svědění**, která je **odlišná od dráhy pro zpracování bolesti**, navazuje na vzájemně propojení volných nervových zakončení senzorických C-vláken v papilární dermis a epidermis s dorzálními ganglii v míše a centrálním nervovým systémem (CNS) v thalamu. Mezi oběma dráhami existuje **složitá interakce** (27).

Z hlediska neurogenní modulace zánětu je významné, že kožní buňky uvolňováním lymfokinů a interleukinu jedna (IL-1) aktivují osu centrální nervový systém (CNS) – hormon uvolňující kortikotropin (CRH) – adrenokortikotropní hormon (ACTH) – kortikoidy, která převádí **lokální zánětlivý proces v systémovou reakci organismu**. Receptory lymfocytů přijímají signály z nervového a endokrinního systému a CNS zachycuje signály vysílané systémem imunitním. Experimentální i klinické studie potvrzují vliv chování na imunitu a změny imunity ovlivňují chování člověka (28).

## JAKÉ BÝVAJÍ PŘÍČINY KLINICKÝCH ZKUŠENOSTÍ DERMATOVENEROLOGŮ S MOŽNÝM SELHÁNÍM SOMATICKÉHO LÉČEBNÉHO POSTUPU?

Příčinou neúspěšnosti dermatologické léčby lege artis, u některých kožních pacientů, bývají primární nebo sekundární psychosociální vlivy a poruchy chování. Zůstávají v pozadí zájmu somaticky zaměřených přístupů k pacientům a nebývají diagnostikovány a léčebně ovlivněny. Musíme se proto rozhodnout, zda-li budeme hovořit se svými pacienty i o jiných, než kožních problémech (29).

U více než 30 % kožních pacientů pozorujeme obtíže psychosociální, poruchy chování a nízkou kvalitu života. Psychosomatický přístup umožňuje subjektivní obtíže a kožní projevy pacienta řešit současně (30, 31).

Četné a rozsáhlé klinické studie věnované kvalitě života nemocných byly provedeny u pacientů s psoriázou. Lupénka, jejíž výskyt je v České republice srovnatelný s výskytem cukrovky, výrazně ovlivňuje kvalitu života nemocných. Závěry jsou srovnatelné s onkologickými pacienty, nemocnými kloubními záněty, hypertenzí, kardiologickými obtížemi typu anginy pectoris, diabetem a depresivní poruchou (32, 33).

**U kožních pacientů pozorujeme:** snížené sebehodnocení, pocity viny a zklamání, vážnou slovní kontakt, zvýšené sebezpozorování, narušené vnímání vlastního těla, poruchy sexuality, somatizaci psychických problémů (netypické zdravotní obtíže bez závažného somatického nálezu), alexithymii (neschopnost rozpoznávat, sdělovat a usměrňovat emoce), hostilitu (nevráživost vůči okolí), poruchy úzkostné, depresivní i obsedantně-kompulzivní, obavy ze sociální izolace, mnozí kožní pacienti žijí v sociální izolaci dlouhodobě, někteří i „uprostřed rodiny“. V důsledku kožního onemocnění bývají narušené mezilidské vztahy v rodině, ve škole, na pracovišti a snížená sociální aktivita pacienta se může podílet i na ztrátě zaměstnání. Riziková psychodermatologičtí pacienti trpí, halucinacemi, bludy, suicidálními myšlenkami (34).

## SNAHA DERMATOVENEROLOGŮ O ZLEPŠENÍ PÉČE O PACIENTY A MEZIOBOROVOU SPOLUPRÁCI

Rozhovor s nemocným je hlavním nástrojem psychosomatického přístupu. Setkání s pacientem začínáme vstřícným přijetím a výzvou, aby pacient sám sdělil, proč přichází, co si o kožních obtížích myslí a jaký má názor na své kožní onemocnění. Snažíme se udržet rozhovor: aktivně mluvící pacient a se zájmem naslouchající lékař.

První setkání nemocného s lékařem je pro něho jedinečným a neopakovatelným zážitkem a ovlivňuje celý další průběh nemoci (35).

Psychosomatickou anamnézou začínáme vytvářet osobní vztah k pacientovi, který by měl vyústit v léčebné spojení. Hledáme odpovědi na řadu otázek. Znalost odpovědí je důležitá k doplnění obrazu objektivních symptomů o prožitkovou stránku onemocnění. Diagnosticky cenný je výraz v obličejí pacienta, gestikulace, způsob prezentace kožních projevů, zda-li se pacient své kůže dotýká nebo, zda-li se naopak dotyku vyhýbá. Důležitý je nejen obsah sdělení, ale i zvolená forma vyjadřování.

Dermatolog by měl projevit ochotu pomoci, empatii, schopnost naslouchat obtížím, povzbudit pacienta, ocenit aktivní spolupráci a uvědomovat si i vlastní pocity vůči nemocnému.

Zkvalitnění dermatovenerologické péče o nemocné spočívá v rozpoznání vlivu psychosociálních činitelů na vzniku, průběhu nebo exacerbaci dermatózy, ale i naopak v rozpoznání zpětného

účinku kožního onemocnění v psychosociálních postojích a chování pacientů. Cílem se stává komplexní léčba, mezioborová spolupráce a zvýšení kvality života kožních pacientů.

Mezioborová spolupráce dermatovenerologů, klinických psychologů a psychiatrů konzultantů rozšiřuje léčebné možnosti dermatovenerologie:

- využití psychofarmak i v nepsychiatrické indikaci – antidepresiva působí primárně analgeticky a antipruriginózně;
- psychoterapie, která cíleně ovlivňuje duševní i tělesný stav pacienta psychologickými prostředky: individuální, rodinnou a kognitivně behaviorální;
- relaxační postupy, které snižují emoční zátěž – autogenní trénink, relaxační cvičení;
- vytváření nových podpůrných skupin pacientů – osvědčily se u pacientů s lupénkou, atopickým ekzémem, alergií, areatní alopecie a některými genodermatózami.

Účinnou se tato spolupráce stává na základě dlouhodobé aktivní vzájemné komunikace, která je podmíněna vytvořením společného odborného jazyka a kultivací vzájemných vztahů (36).

Pro dermatovenerology jsou přínosné postgraduální kurzy IPVZ v psychosomatickém vzdělávání a odborná mezioborová setkávání s praktickými lékaři, alergology, gynekology, geriatry, imunology, klinickými psychology, neurology, onkology, rehabilitačními lékaři, pediatry, psychiatry, urology, sociology i filozofy (37).

Spolupráce dermatovenerologa s klinickým psychologem a psychiatrem konzultantem byla zahájena na 1. kožní klinice v roce 1975 a pokračuje v rámci psychosomatické ambulance na Dermatovenerologické klinice I. LF UK a VFN.

### ZÁVĚRY

Skutečnost, že včasná diagnóza psychosociálních a behaviorálních poruch u pacientů, kteří vyhledají primárně pomoc dermatovenerologa, podstatně snižuje nadbytečný počet laboratorních a diagnostických vyšetření a rozšiřuje léčebné možnosti o psychoterapii a cílenou léčbu psychofarmaky, zůstává nedoceněna.

Zatěžování jsou i nadále nemocní, zdravotníci i zdravotní pojišťovny bez ohledu na etické a ekonomické důsledky. Možnost vykazování kódů zdravotním pojišťovnam zůstává v psychosomatické ambulanci prozatím nevyřešena a podmínky dermatologů pro rozvoj psychosomatického přístupu k nemocným nejsou příznivé. Tato skutečnost je v rozporu s Mezinárodní klasifikací nemocí 10. revize (MKN 10) viz Kategorie F54 – „Psychické a behaviorální faktory spojené s poruchami nebo nemocemi klasifikovanými jinde“, která uvádí dermatitidy, ekzémy a urtikarie jako příklady nemocí do této kategorie zařazených.

Zlepšit současnou situaci pro psychosomaticky zaměřené dermatovenerology, a tím i jejich pacienty, je jedním z cílů Psychodermatologické sekce České dermatovenerologické společnosti ČLS JEP, která byla ustavena v září 2004, na I. moravskoslezském sympoziu o atopické dermatitidě a psychodermatologii s mezinárodní účastí, [www.psychodermatologie.cz](http://www.psychodermatologie.cz) (38).

#### Zkratky

ACTH	– adrenokortikotropní hormon
CGRP	– kalcitoninu genově příbuzný peptid
CNS	– centrální nervový systém
CRH	– hormon uvolňující kortikotropin
IL-1	– interleukin 1
MSH	– alfa-melanocyty stimulující hormon
NKA	– neurokinin A
P (SP)	– substance
PACAP	– polypeptid aktivující hypofyzární adenylátcyklázu
PHI/M	– peptid histidin-izoleucin a histidin-methionin

POMC	– pro-opiomelanokortinové peptidy
SOM	– somatostatin
VIP	– vazoaktivní peptid

### LITERATURA

1. **Charvát, J.:** Život, adaptace a stres. Praha, SZdN, 1969, 163 s.
2. **Baštecký, J.:** Psychosomatika. Prakt. Lék., 1983, 63, s. 154-156.
3. **Koo, J., Lee, Ch. S.:** General Approach to Evaluating in Psychodermatological Medicine. In: Koo, J., Lee, Ch., S. (Eds.): Psychocutaneous Medicine. New York, Marcel Deker, 2003, s. 1-12.
4. **Rook, A., Wilkinson, D. S.:** Psychocutaneous Disorders. In: Rook, A. et al., Textbook of Dermatology. 3. Ed. Oxford, Blacwell Sci Publ., 1979, s. 2023-2035.
5. **Garg, A., Chren M. M., Sands, L. P. et al.:** Psychological Stress Pertubs Epidermal Permeability Barrier Homeostasis. Implications for the Pathogenesis of Stress – Associated Skin Disorders. Arch. Dermatol., 2001, 137, s. 53-59.
6. **Koblenzer, C. S.:** Psychosomatics Concepts in Dermatology. Arch. Dermatol., 1983, 119, s. 501-512.
7. **Pánková, R.:** Emocionální faktory v dermatologii. Čs. Derm., 1977, 52, s. 329-331.
8. **Vendyšová, E., Pánková, R.:** Úzkostné reakce u psoriaticků. Čs. Psychol., 1982, 26, s. 62-67.
9. **Mikšík, O., Břicháček, V., Pánková, R., Vendyšová, E.:** Psychické zátěže a osobnostní struktura nemocných lupénkou. Čs. Derm., 1978, 53, s. 148-156.
10. **Barták, P.:** Atopická dermatitida – problém také psychoneurotický. Prakt. Lék., 2005, 85, s. 10-12.
11. **Buchvald, J.:** Vitiligo – současné názory na patogenézu a terapiu. Derma, 2005, V, s. 7-11.
12. **Kykalová, K., Pánková, R., Kaštánková, V.:** Rizikové sexuální chování a koincidence pohlavně přenosných infekcí. Čs. Derm., 1999, 74, s. 180-182.
13. **Pánková, R., Kuklová, I.:** Psychosociální souvislosti acne vulgaris. Referátový výběr z Dermatovenerologie, Speciál II – 2004, 46, s. 32-35.
14. **Fawzy, F. L., Fawzy, N. W., Huyn, C. S. et al.:** Malignant melanoma: effects of an early structured psychiatric intervention, coping, and affective state on recurrence and survival 6 years later. Arch. Gen. Psychiatry, 1993, 50, s. 681-689.
15. **Honzák, R.:** Psychosociální důsledky porušení tělesné integrity. Prakt. Lék., 2005, 85, s. 305-309.
16. **Pánková, R., Macháčková, J., Malá, H.:** Neobvyklý obraz kožního artefaktu. Čs. Derm. 1984, 59, s. 157-161.
17. **Pánková, R., Malá, H.:** K problematice neurotických exkoriací. Čs. Derm., 54, 1979, s. 271-273.
18. **Honzák, R., Krizek, G. O.:** Acne excoriée. XI. sympozium Prakt. Lék. Kůže zrcadlo organismu. 2005, 85 (Suppl. 1), s. 5-6.
19. **Vacek, J.:** Syndrom bludové parazitózy (akarofobie). Čs. Derm., 57, 1982, s. 94-102.
20. **Bosse, K. A., Gieler, U.:** Seelische Faktoren bei Hautkrankheiten. Toronto, H. Huber, 1997, 88 s.
21. **Barták, P.:** Bariéra epidermální permeability a její funkce v imunitní reakci. Čas. Lék. čes., 2001, 140, s. 259-261.
22. **Niemeier, V., Kupfer, J., Al Albesie, S. et al.:** Hauterkrankungen zwischen psychoneuroimmunologischer Forschung und psychosomatischer Therapie. Zeitschrift f. Dermatologie, 1999, 185, s. 62-66
23. **Lottí, T., Hautmann, G., Panconesi, E.:** Neuropeptides in skin. J. Am. Acad. Dermatol., 1995, 33, s. 482-496.
24. **Arenberger, P., Jírová, M.:** Mediátory v kůži. Czechopress Agency, s. r. o., Praha, 2001, 86 s.
25. **Steinhoff, M., Staender, S., Seeliger, S. et al.:** Modern Aspects of Cutaneous Neurogenic Inflammation. Arch. Dermatol., 2003, 139, s. 1479-1488.
26. **Zane, L. T.:** Psychoneuroendocrinimmunodermatology – Pathophysiological Mechanisms of Stress in Cutaneous Diseases. In: Koo, J., Lee, Ch. S. (Eds.): Psychocutaneous Medicine. New York, Marcel Deker, 2003, s. 65-95.
27. **Ikoma, A., Rukwied, R., Stander et al.:** Neurophysiology of Pruritus., Interaction of Itch and Pain. Arch. Dermatol., 2003, 139, s. 1475-1478.

28. **Honzák, R.:** Behaviorální medicína, In: Hoeschl et al.: Psychiatrie, 2. vyd. Praha, TIGIS s. r.o., 2004, s. 606-608.
29. **Pánková, R., Balcar, K.:** Psychosomatická dermatologie. In: Novotný et al.: Obecná dermatologie. 1. vyd., Praha, Avicenum, 1989, s. 266-270.
30. **Kuklová, I., Pánková, R.:** Psychoterapie v dermatovenerologii. Čs. Derm., 1994, 69, s. 214-215.
31. **Poněšický, J.:** Neurózy, psychosomatická onemocnění a psychoterapie. Praha, Triton, 1999, 207 s.
32. **Semrádová, V., Balašík, D.:** Možnosti hodnocení kvality života nemocných psoriázou. Čes.-slov. Derm, 2003, 78, s. 228-231.
33. **Rapp, S., Feldmann, S. R., Excum, M. L et al.:** Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. J. Am. Acad. Dermatol., 199, s. 401-407.
34. **Gupta, M. A., Gupta, A. K.:** Psychodermatology. An update. J. Am. Acad. Dermatol., 1996, s. 1030-1046.
35. **Šavlík, J., Hnízdil, J.:** Psychosomatika v současné době. Čas. Lék. čes., 143, 2004, s. 31-33.
36. **Chvála, V., Moos, P.:** Naše zkušenosti s léčbou psychosomatických pacientů v letech 1197–2002. 9. symposium Prakt. Lék., s. 24-28.
37. **Beran, J.:** 10. celostátní konference psychosomatické medicíny. Liberec 16.–18. září 2004, Prakt. Lék., 2005, 85, s. 365-366.
38. I. moravskoslezské symposium o atopické dermatitidě a psychodermatologii s mezinárodní účastí. Zámek Kunín u Nového Jičína, 3. září 2004. Abstrakta. Čes.-slov. Derm., 2005, 80, s. 104-111.

## KOMENTÁŘ

# Komentář k článku R. Pánkové „Psychosomatické přístupy v dermatovenerologii“

Název psychosomatika je starý téměř 200 let, ale Heinrothovy představy předcházela medicína Hippokratovská a medicína několika následujících tisíciletí, která vždy úměrně k současným možnostem poznání spojovala tělesnou chorobu s oblastí psychickou. Zajímavé je, že ono původní pojetí, asi 5000 let staré, je veskrze holistické, zatímco virchoviánské poznání je pohříchu dualistické. Právě dualismus umožnil dokonale poznat jednotlivosti, aby mohla přijít druhá polovina 20. století již se stále rostoucím návratem k medicíně celostní, ovšem již se všemi molekulárními a ultrastrukturálními podrobnostmi. I ty den ode dne narůstají a díky lékařům, jako je autorka předložené stati, docentka Pánková, primářka Selerová z Nového Jičína nebo psychiatr kolega Honzák se budoucnost psychosomatiky a speciálně psychodermatologie zdá být světlá a slibná.

Speciálně dermatologie ještě nedávno nepatřila do EBM medicíny, tedy založené na důkazech. Pak však přišlo spojení s ekonomicky nadmíru zdatnou kosmetikou a s její neodbytnou potřebou vysvětlit podstatu kožní hydratace, a tím i podstatu krásy a nestárnutí. Takřka přes noc se stala dermatologie špičkovým interním oborem, který je nejen sám založen na virchoviánských důkazech, ale byl schopen poskytovat důkazy i mnoha dalším oborům právě skrze kůži.

Bylo by nošením dříví do lesa, kdybych svým komentářem chtěl cokoli přidat k práci kolegyně Pánkové. Jen doporučuji porovnat každou její větu s denní praxí a pak již nebude třeba zdůrazňovat důležitost psychosomatiky v celé medicíně a v dermatologii zvláště.

prof. MUDr. Pavel Barták, CSc.  
Centrum elektronové mikroskopie SZÚ  
186 00 Praha 8, Jirsíkova 4  
fax: +420 224 818 700, e-mail: pbartak@volny.cz

### Komplement a autoimunita

Komplement je hlavním efektozem přirozené innate imunity. Je to fylogeneticky nejstarší zařízení na obranu organismu proti infekci. Činí až 5 % plazmatické bílkoviny. Aktivace jde: cestou nezávislou na protilátce; nedávno poznanou lektinovou cestou pomocí mannan binding lectinu a nejznámější cestou je C1q, jejímž ligandem jsou Fc regiony na IgG a IgM v imunních komplexech.

Výsledkem aktivace kterékoliv cesty je

generace C3 a C5 konvertázových enzymů, které zase generují prozánětlivé C3a a C5a anafylotoxiny a katalyzují formování porézního membránového komplexu (C5-9), který vniká do celulárních membrán a působí jejich destrukci.

U fotosenzitivního systémového erytematodu je kongenitální deficeience C1q extrémním rizikem. Proto by měla být i subtilní variace C1q důsledně sledována a hodnocena. Zejména jeho vazba ke keratinocytovým apoptotickým troskám po UV záření aktivuje klasickou kom-

plementovou cestu a cestou intersticiálních dendritických buněk indukuje autoantigeny; pak prezentace T buněk skončí ve ztrátě imunitolerance.

#### Literatura:

**Sontheimer, R. D. et al.:** C1q: its function within the innate and adaptive immune response and its role in lupus autoimmunity. J. invest. Dermatol., 2005, 125, s. 14-23.

P. Barták

KOMENTÁŘ

## Komentář k článku R. Pánkové „Psychosomatické přístupy v dermatovenerologii“

„Život je krátký, cesta umění dlouhá, okamžik prchavý, zkušenost klamná, soud obtížný. Proto musí nejenom lékař všeho využít, ale i nemocný a jeho rodina a všechny vnější okolnosti musí být využity.“ Tak to řekl na počátku historie evropské medicíny Hippokrates, který vypudil z oboru ocitajícím se „mezi vědou a uměním“ bohy, duchy a strašidla a nemoc (včetně „svaté nemoci“ – epilepsie) vyvozoval z přirozených příčin. Člověka však vnímal v jeho celistvosti a rozhodně ho nepoltil.

S tím začal až 400 let po něm Galenos pod vlivem Platonova učení a odkázal příštím generacím složitou dualitu těla a duše. Nabádal sice své žáky (je mimo jiné autorem výroku: „veselé ženy nikdy neonemocní rakovinou prsu; rakovina prsu je melancholická diathesa“), aby se oběma složkám věnovali rovnoměrně, ale to se nenaplnilo. V době, kdy medicína zatoužila stát se vědou, posvětil nešťastné rozdělení francouzský matematik a filozof René Descartes<sup>1</sup>, který jejím představitelům doporučil, aby medicína pojednávala člověka „jako rozumný stroj, nemoc jako poruchu tohoto rozumného stroje a lékaře jako odborníka, který poruchu diagnostikuje a dle možnosti odstraní.“

Tímto pojetím měla předejít handrkování s církevními autoritami, jimž byla duše ponechána v kompetenci. Tak byl položen základ **bio-medicínského** modelu charakterizovaného pozitivistickou filozofií a doloženého opakovatelnými objektivními nálezy. Klenákem v klenbě tohoto oblouku byl Wirchovův verdikt (patolog přece vždy stanovuje konečnou diagnózu), že nemoc je „poruchou buněk, tkání a orgánů.“ Diadémem na něm je výkřik: jeden gen – jedna nemoc. Medicínský konstrukt „nemoci“ tak zcela zastínil „nemocného člověka“ (1). V péči Galenových následovníků nakonec duše zcela ostrouhala.

První systematickou snahou po její rehabilitaci a reintegraci do medicíny bylo **psychosomatické hnutí** vedené Franzem Alexandrem (zakladatelem časopisu Psychosomatic Medicine, 1939) a Flanders Dunbarovou. V duchu kyvadla, jež se přechyluje až na zcela extrémně opačnou polohu, pojali zakladatelé některé nemoci („psychosomatické choroby“ – esenciální hypertenze, hypertyreóza, astma, vředová choroba, ulcerativní kolitida, atopický ekzém a revmatoidní artritida) jako primárně psychogenní (teorie psychogeneze) a vyvolané specifickým intrapsychickým konfliktem (teorie specificity). Autoři sami podrobili tyto hypotézy kritickému rozboru a zjistili jejich neplatnost (2).

Práce o stresu přinesly myšlenkové obohacení psychosomatického modelu, který po zapracování Selyeho myšlenek vedl ke změně původního paradigmatu: specifický intrapsychický konflikt  $\wedge$  specifické psychosomatické onemocnění na paradigma: intrapsychický konflikt + biologická vulnerabilita + stres  $\wedge$  psychosomatické onemocnění (3). Stresové mechanismy zůstávají v koncepci „psychosomatických“ nemocí dodnes.

Po druhé světové válce Engel v USA zahajuje projekt „konzultační/liaison“ psychiatrie (4), který v téže zemi byl v loňském roce uznán jako samostatná psychiatrická disciplína v podobě tzv. „psychiatrie pro nemocné“. Od rigidní psychosomatické koncepce se dostávají požadavky na integraci psychiky do obecnější polohy a jsou v 80. letech minulého desetiletí definovány Lipovským (5), který deklaruje, že **současný psychosomatický (bio-psycho-sociální) přístup** je vědeckou a klinickou disciplínou zabývající se:

- studiem vztahů mezi specifikovanými psychosociálními faktory a normálními a abnormálními fyziologickými funkcemi;
- studiem interakcí mezi psychologickými, sociálními a biologickými faktory v etiologii, načasování začátku onemocnění, průběhem a vyústěním **u všech nemocí**;

prosazováním celostního biopsychosociálního přístupu v péči o nemocné;

aplikací psychiatrických, psychologických a behaviorálních metod v prevenci, léčbě a rehabilitaci somatických nemocí (5).

V souladu s pragmatickým americkým pohledem na psychiatrii/psychologii pro somaticky nemocné se v jednotlivých oborech konstituují „psycho“ – podobory. Jednou z prvních byla psychonefrologie (po zavedení dialyzační léčby se u pacientů objevila nečekaně vysoká sebevražednost, převyšující dokonce suicidalitu depresivní populace; tyto lidé totiž nijak nestáli o život „zachráněný“, toužili po životě kvalitním, a tak byli povoláni specialisté). Významný integrující obor představuje psychoneuroimunologie, díky jejímž představitelům byla rozpoznána řídicí funkce imunitního systému (6).

Práce docentky Pánkové představuje psychodermatologii nejen v její ideové (kůže jako zrcadlo emocí, bariérový orgán s ochrannou i prezentační funkcí), ale bohudík již také v institucionalizované podobě. Její příspěvek je skromnou inventurou neuvěřitelně tvrdé a hou-

<sup>1</sup>Descartes, René: Filozofický „kmoť“ v 17. století vznikající vědecké medicíny, zastával názor, že existují dva zcela odlišné, neslučitelné a protikladné principy: duchovní a hmotný. Bůh je bytost pouze duchovní, zvířata duchovní podstatu postrádají a mají jen podstatu hmotnou, zatímco člověk se skládá jak z podstaty hmotné, tak z podstaty duchovní, které se setkávají v šišince. A jenom člověk, jako jediná bytost z přírody, která je nadaná rozumem, může trpět. „Když biješ psa, nemysli, že trpí. A jestliže nařiká, je to totéž, jako bys tloukl do piana a ono vydávalo zvuky“, pravil tento barokní humanista a otevřel tak dokořán dveře sadistické zábavě nazývané vivisekce (my ho nazýváme barokním prasetem s křišťálovým charakterem, neb po dlouhodobé spolupráci s katolíky přeběhl údajně z ideových, ve skutečnosti však z pekuniárních důvodů ke královně Kristýně, a to ještě netušil, že ji ve Vinohradském divadle bude hrát jako svou derniéru Dagmar Veškrnová posléze Havlová). Jeden z jeho dnešních životopisců píše: Říká se, že Descartes byl zavražděn; bohužel nebyl.

**Citováno:** Honzák, R.: Slovník psychoterapie. Praha.

MUDr. Radkin Honzák  
Ústav všeobecného lékařství 1. LF UK  
128 00 Praha 2, Albertov 7  
e-mail: honzak@prahapublishing.cz  
e-mail: raho@volny.cz



ževnaté práce. Zatímco v době reálného socialismu se nám dařilo pozvolna infiltrovat „psycholidmi“ jednotlivé obory a vytvářet původně nesystemizovaná, ale velmi užitečná pracovní místa liaison/konzultačních psychiatrů a psychologů na pracovištích, kde psychiatři a psychologové měli svým somatickým kolegům skutečně co nabídnout, současné finanční nastavení zdravotní péče vedlo k jejich systematické likvidaci. „Dost bylo psycholidů!“ zatroubil dokonce bojovně jeden z děkanů jedné z lékařských fakult, „potřebujeme více počítačů!“

Psychické problémy lidí postižených kožními chorobami, a tedy i defekty „vzhledu“ jsou známy od starověku. Homér popsal Thresista, nejošklivějšího muže před Trójou, jako člověka, který má ohavnou duši v ohavném těle – odtud vzal své jméno i Thresistův komplex, kterým trpí lidé postižení akné, lupenkou, ekzémy a dalšími kožními chorobami. Naše JÁ je vždy tělesné JÁ a nejistoty somatické a psychické se nesčítají, ale násobí. Kvalita života lidí trpících psoriázou je stejně špatná jako kvalita života lidí po infarktu. A to nevyřeší oprava porouchaného stroje, protože stroj se rouchá dál a dál působením psychiky, s níž biomedicínský model nepočítá. Přitom již před více než 30 roky spočítali úředníci pojišťoven v USA, že konziliární psychiatr vrátí zařízení, ve kterém působí, svůj plat v pětinasobku, navíc jeho práce vrací pacienty domů, nikoli do pečovatelských institucí (7).

Integroující přístupy jsou blahodárnými faktory pro nemocné. Je zde však otázka, zda jsou blahodárné též pro mocné: ministerské úředníky a je platící farmaceutické firmy. Jednodušší léčení pro ně totiž přináší menší kšefty. To může být také mocným hybatelem byrokratické zdravotní politiky a nevráživosti vůči aplikaci biopsychosociálního modelu (většina farmakoekonomických údajů byla vyhlášena ministerstvem zdravotnictví za TAJNÉ, transparentnost financování je tak pro jakoukoli analýzu v ... nivči). V této konspirativní atmosféře se mi jeví výsledky docentky Pánkové o to cennější a jest jen doufat, že ve službách byrokracie tomuto úspěšnému výhonku teoretické i klinické medicíny nějaká vyhláška nezakroučí krkem.

## LITERATURA:

1. Reiser, S. J.: The era of the patient. Using the experience of illness in shaping mission of health care. JAMA, 1993, 269, s. 1012-1017.
2. Alexander, F.: Psychosomatic Medicine. London, Norton, 1950.
3. Weiner, H.: Psychobiology and human diseases. New York-Oxford-Amsterdam, Elsevier, 1977.
4. Engel, G. L.: The need for a new medical model: A challenge for biomedicine. Science, 1977, 196, s. 129-136.
5. Lipowski, Z. J.: Psychosomatic Medicine: Past and Present. Can. J. Psychiat., 1986, 31, s. 2-21.
6. Ader, R., Cohen, A.: Psychoneuroimmunology: Interactions between the nervous system and the immune system. Lancet, 1995, 345, s. 99-104.
7. Honzák, R.: Ekonomický přínos plynoucí z psychosociálně orientované intervence u nemocných somatických oborů. Prakt Lék, 1989, 69, s. 95-97.

## Perrez, M., Baumann, U. (Hrsg.): LEHRBUCH KLINISCHE PSYCHOLOGIE – PSYCHOTHERAPIE

Bern, Verlag Hans Huber, Hogrefe AG, 3. přepracované vydání, 2005, 1220 s., cena 79,95 euro. ISBN 3-456-84241-4.

Recenzovaná kniha je učebnicí klinické psychologie a psychoterapie a vychází v nakladatelském programu nesoucím název „učebnice psychologie.“ Klinická psychologie a psychoterapie jsou v práci uvažovány jako dva samostatné interdisciplinární obory. Na jejím sepsání se podílelo 56 převážně psychologek a psychologů činných vesměs na univerzitách v Německu (38 autorek a autorů), Švýcarsku (13 autorek a autorů), čtyři dále pracují v Rakousku. Vydavateli učebnice jsou prof. Meinrad Perrez z univerzity ve švýcarském Fribourgu a prof. Urs Baumann činný na univerzitě v rakouském Salzburgu. Je třeba upozornit, že se jedná o třetí přepracované a aktualizované vydání, přičemž první vyšlo v roce 1990. Oproti poslednímu vydání z roku 1998 je kniha rozšířena o interkulturální a vývojově psychologické aspekty klinické psychologie a psychoterapie, dále je zde zohledněna terminologie poslední Mezinárodní klasifikace nemocí (ICD – 10 a DSM-IV-TR).

Vydavatelé učebnice rozdělili do dvou obsáhlých celků a osmi částí. Kontaktní spojení a seznam spoluautorek a spoluautorů je uveden hned v úvodu knihy, jmenový a věcný rejstřík pak nalezneme na konci tohoto rozsáhlého díla. Použitá literatura má své místo za každou kapitolou zvlášť.

Obsah učebnice lékařské psychologie a psychoterapie je následující (volný překlad).

## KNIHY

### Obecná část (jdoucí za jednotlivé poruchy zdraví)

1. *Obecné základy* (základní pojmy – úvod, vědecko teoretické základy: klasifikace, etiologie a diagnostika, klinicko psychologické intervence, etika v klinické psychologii).

2. *Klasifikace, diagnostika: obecné základy* (klasifikace, klinicko psychologická diagnostika, obecné přístupy).

3. *Epidemiologie* (epidemiologie).

4. *Etiologie, analýza podmínek: obecné základy* (etiologie, analýza podmínek: metodická hlediska, genetické faktory, biologické faktory, psychologické faktory: socializace a přizpůsobivé chování, stres, coping, sociálně psychologické a evolučně psychologické faktory, transkulturální faktory).

5. *Intervence* (systematická klinicko psychologická intervence, zdravotní péče, metodika klinicko psychologického výzkumu intervence, prevence, psychoterapie – systematika a faktory jdoucí za jednotlivé metody, východisko vztah terapeut – pacient: psychoanalyticky orientovaná psychoterapie, rogersovsky orientovaná psychoterapie, východisko prožívání, chování: behaviorálně orientovaná psychoterapie, východisko kultura: transkulturálně orientovaná psychoterapie, rehabilitace, psychofarmakoterapie).

### Speciální část (týkající se poruch zdraví)

Jednotlivé části mají jednotnou osnovu, kdy je nejdříve pojednáno o klasifikaci a diagnostice určité poruchy, dále o její etiologii, následuje pak analýza podmínek a okolností výskytu a zásahů, možnosti intervence, léčby, nápravy, rozšiřující literatura.

6. *Poruchy psychických funkcí* (motorické poruchy, poruchy vnímání, poruchy paměti,

poruchy učení, poruchy spánku, poruchy příjmu potravy).

7. *Poruchy funkčních vzorců* (poruchy způsobené psychotropními látkami, schizofrenie, depresivní poruchy, úzkostné poruchy, somatoformní a disociativní poruchy – konverzní poruchy, posttraumatická stresová porucha, poruchy osobnosti, poruchy chování a vývojové poruchy u dětí a mládeže, poruchy ve stáří).

8. *Poruchy interpersonálních systémů* (partnerské poruchy, poruchy v rodině a poruchy rodiny)

Na učebnici je mimořádně cenné, že na tištěný text učebnice navazuje e-learning obsahující rozšiřující a prohlubující texty, dále pak cvičení a zkušební otázky sloužící ke kontrole osvojení textu. Tuto část nalezneme na internetu. Potěšující je i informace o tom, že v tomto roce vyjdou v knižní tištěné podobě kazuistiky doplňující učebnici. Podle mého názoru tak dostaneme do rukou celek mimořádné didaktické kvality. Již nyní se jedná o učebnici vskutku doporučené, vydavatelé Meinrad Perrez a Urs Baumann odvedli výbornou práci.

**Recenzovanou práci lze rozhodně doporučit studentům, praktikům i vědeckým pracovníkům z řad psychologů a lékařů. I druzí jmenovaní (pokud samozřejmě ovládají německý jazyk) si ji přečtou s porozuměním, ke kterému jim postačí teoretické znalosti z předmětu lékařská psychologie a psychoterapie, jež je po řadu let součástí curricula studia na lékařských fakultách v České republice.**

Jan Vymětal  
128 00 Praha 2, Karlovo náměstí 40

PŮVODNÍ PRÁCE

# Cholesterol, násilí a sebevražednost – příběh plný omylů

Vevera J.

Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN, Praha

## ABSTRAKT

**Východisko.** Práce se zabývá vztahem mezi psychickým poruchami, násilím, sebevražedností a snižováním koncentrací cholesterolu přinášející protikladné výsledky. Biologické vysvětlení tohoto vztahu se pokusila přinést Engelbergova hypotéza. Cílem naší práce je podat přehled biologických prací, které se pokoušely experimentálně tuto hypotézu testovat.

**Metody a výsledky.** V databázi Web of Knowledge jsme vyhledali všechny práce které do 31. července 2005 citovaly Engelbergovu hypotézu (N=207). Dále jsme do přehledu zařadili 5 prací, které hypotézu necitují, ale bezprostředně s ní souvisí. Nalezli jsme pouze 20 prací, které se dají použít k jejímu testování a z nich pouze 7 prací hypotézu podporuje. Dále ukazujeme, že dosud publikované asociativní studie nemohou vzhledem k preselekcii pacientů odhalit, zda vztah mezi cholesterolem, suicidalitou a depresivitou není pouze artefaktem. Je pozoruhodné, že ze 43 epidemiologických asociativních studií publikovaných v psychiatrických časopisech 77 % nálezů podporovalo Engelbergovu teorii, zatímco opačné nálezy jsou publikovány v časopisech, zaměřených na interní medicínu – z 11 prací 82 % publikací nepodporovalo tuto teorii.

**Závěry.** Navzdory dostupným poznatkům založených na důkazech slouží i nadále překonané teorie k interpretaci kontroverzních nálezů.

**Klíčová slova:** cholesterol, serotonin, deprese, suicidalita, násilí.

## ABSTRACT

*Vevera J.: Cholesterol, Violence and Suicidality – History of Errors*

**Background.** Studies examining the associations between psychiatric disorders, violence, suicidality and lowering cholesterol levels bring contradictive results. A biological mechanism for this relation is offered by the Engelberg's theory. The aim of our study is to review all biological studies, trying to test this hypothesis.

**Methods and Results.** The Engelberg's theory was cited in 207 articles indexed in the Web of Science – 31.7.2005. Five other articles, not citing the theory but closely related to this topic were also included into the review. Only 20 biological studies examining the hypothesis were found, and only 7 of them supported it. Further we demonstrate that because of selection bias, association studies cannot be used to test this hypothesis. Interestingly from 43 associative studies published in psychiatric journals, 77 % findings supported the Engelberg theory while studies demonstrating the opposite results are published mostly in journals targeted to internal medicine- from 11 papers 82 % publications did not supported the theory.

**Conclusions.** Though the evidenced based knowledge is widely accessible, outdated hypothesis is used to explain controversial results.

**Key words:** cholesterol, serotonin, depression, suicidality, violence.

Ve.

Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 118–122.

V posledních letech byla věnována pozornost psychickým poruchám vyskytujícím se při snižování koncentrací cholesterolu (1, 2). Stovky převážně epidemiologických publikací přinášející protikladné výsledky (3–6). Biologický podklad tohoto vztahu nebyl uspokojivě objasněn. Nejčastěji používaným vysvětlením se stala Engelbergova hypotéza z roku 1992, podle které změny v hladinách plazmatického cholesterolu mohou vést ke změnám v množství cholesterolu obsaženého v plazmatických membránách, a tak vést ke změnám jejich viskozity. Tyto změny mohou ovlivnit funkci proteinů obsažených v plazmatických membránách a následně i serotoninergní transmissi. Serotoninergní systém se uplatňuje při inhibici impulzivního chování a impulzivita je jedním z výrazných prediktorů násilného chování. Snižování serotoninergní transmise tak může vést k zestupu impulzivního chování, a tím ke zvýšení pravděpodobnosti auto- i heteroagresivního jednání (7).

Autor sám hypotézu nikdy experimentálně netestoval a i když byly bezprostředně po uveřejnění publikovány práce, které ji zpochybňovaly, stala se až do současnosti nejčastěji používaným biologickým vysvětlením pro vztah mezi cholesterolem a poruchami nálady a chování.

Cílem naší práce je podat přehled biologických prací, které se pokoušely experimentálně tuto teorii testovat a objasnit, proč do současnosti provedené epidemiologické studie nemohou na tuto otázku přinést uspokojivou odpověď.

## SOUBOR PRACÍ A POUŽITÉ METODY

V databázi Web of knowledge jsme vyhledali všechny práce, které do 31. 7. 2005 citovaly Engelbergovu teorii (N=207). Tato databáze obsahuje texty z impaktovaných i části neimpaktovaných časopisů, procházejících recenzním řízením.

Dále jsme do přehledu zařadili 3 animální experimenty, prováděné Muldonovou skupinou (8–10), protože i když Engelbergovu hypotézu necitují, mají k jejímu obsahu bezprostřední vztah, a dále Heronovu (11) a Hershkowitzovu (12) práci, ze které teorie vycházela.

Data, která mohou sloužit k testování této teorie, přináší 89 studií. Ostatní jsou komentáře, souhrnné články, nebo práce, které teorii citují, ale nepřinášejí data, která by ji umožňovala testovat.

Studie jsou dále rozděleny na epidemiologické, které porovnávají koncentrace cholesterolu u sebevražděných či depresivních pacientů s jinými pacienty, či kontrolní zdravou populací (N=69). Jako biologické jsme označili takové práce, které kromě koncentrace cholesterolu měří ještě další biologický parametr, který má vztah k serotoninergní transmissi (N=20).

## VÝSLEDKY

### *Epidemiologické studie – limity na důkazech založené medicíny*

Engelbergovu teorii se zabývalo celkem 69 epidemiologických studií. V časopisech zaměřených na psychiatrickou problematiku bylo publikováno 43 prací. Je zajímavé, že 77 % (N=33) z nich nalezlo negativní asociaci mezi hladinami cholesterolu a poruchami nálady, zvýšenou impulzivitou či hostilitou.

V časopisech zaměřených na interní lékařství je tomu naopak, z 11 prací jich 82 % (N=9) nenalezlo žádný vztah mezi snížením hladin cholesterolu a psychickým stavem, nebo popisují dokonce zlepšení nálady, kladené do souvislosti se zlepšeným zdravotním stavem. Pouze dvě práce našly asociaci mezi sníženými hladinami cholesterolu a poklesem nálady. Zbývajících 15 prací bylo publikováno ve všeobecných lékařských časopisech (Epidemiology, BMJ, Lancet) z toho 40 % (N=6) nalezlo asociaci mezi sníženými hladinami cholesterolu a zhoršením nálady či nárůstem impulzivitu a 60 % (N=9) nikoliv.

Epidemiologické studie nemohou přesně objasnit kauzalitu vztahu cholesterolu a poruch nálady, násilí či sebevražděnosti, dalo by se ale předpokládat, že mohou alespoň rozhodnout o tom, zda tento vztah existuje či nikoliv. Bohužel, neumožňují ani to. Právě na příkladu násilného chování a suicidality je nejlépe **vidět omezenost současné na důkazech založené medicíny**. I když jsou studie randomizované, dvojitě slepé a placebem kontrolované, pořád ještě se **zabývají vysoce preselektovanou populací**, právě s ohledem na násilí, nehody a sebevražděnost. První filtr je totiž ještě před randomizací. Je jisté v souladu se zkušeností každého lékaře, který se účastnil farmaceutické studie, že účast obvykle není nabízena osobám s antisociálními rysy (u kterých je vyšší pravděpodobnost násilné smrti a úrazu) či pacientům s psychickými problémy (kde je vyšší pravděpodobnost suicidia). Tím spíše, když před tím byly publikovány studie, nalézající zvýšenou sebevražděnost u hypolipidemických intervencí. Není pak jisté překvapením, že osoby zařazené do studií, umírají v důsledku příčin nesouvisejících s kardiovaskulárními problémy (např. vraždy, sebevraždy, autonehody) výrazně méně než studovaná populace. V Muldoonově metaanalýze je uvedeno, že mortalita nesouvisející s kardiovaskulárním onemocněním byla u osob, zařazených do jedné ze studií třetinová oproti datům z běžné populace (13).

Jistou roli by zde mohla hrát i tzv. Publikáční Bias – je pravděpodobnější, že studie bude otištěna pokud něco našla než studie nanalézající žádný vztah.

### *Animální modely*

Zvýšené množství cholesterolu v plazmatické membráně vede k větší rigiditě této struktury, a tedy k její vyšší mikroviskozitě. Hypotéza o vlivu cholesterolu na serotoninergní transmissi vycházela z experimentálních poznatků, které demonstrovaly, že i malé (10%) změny fluidity membrány mají význam pro aktivitu v ní

obsažených struktur (přehled viz 5) a Heronova experimentu, ve kterém ukázal, že když byla *in vitro* přidáním cholesterolu zvýšena mikroviskozita synaptických membrán myšičího mozku, zvýšilo se množství 5HT, vázaného na tyto struktury (11). Fluidizace leciti- nem (snížení viskozity) naopak způsobila malý pokles počtu vazebných míst pro serotonin.

Tyto výsledky ale nebyly potvrzeny *in vivo* studií prováděnou na pískomilech mongolských, kterým byl pomocí dietních úprav měněn příjem cholesterolu. Nebyly ale zaznamenány žádné změny v 5-HIAA, serotoninu nebo syntéze tryptofan hydroxylázy (rozhodujícího enzymu při syntéze serotoninu) v kortexu, hypothalamu a mozkovém kmeni. Rovněž koncentrace tryptofanu nebyly změněny (14).

Snížení hladin cholesterolu také nepřineslo změny v behaviorálních charakteristikách zprostředkovaných 5-HT<sub>1A</sub> (panáčkování) nebo 5-HT<sub>2A</sub> receptory (kývání hlavou) u krys kmene Wistar (15).

Lze tedy shrnout, že nálezy na hlodavcích přinášejí rozporné údaje a *in vivo* prováděným experimenty Engelbergovu teorii nepotvrzují. Vzhledem k tomu, jak často bylo toto téma studováno u lidí, je to zarážející.

Tři studie dokumentují vztah hladin cholesterolu a agresivního chování u opic makaků jávkých (*Macaca fascicularis*).

V první práci byly opice krmené potravou s nízkým obsahem tuků a s nízkými koncentracemi cholesterolu (průměr 3,76 mmol/l) agresivnější než opice krmené potravou s vysokým obsahem tuků, u kterých byla průměrná hladina cholesterolu 12,1 mmol/l (8). V další studii (9) ve stejné skupině opic měla zvířata s nižší hladinou cholesterolu sníženou prolaktinovou odpověď na stimuly. Výsledky autoři interpretovali jako snížení centrální serotoninergní aktivity. Ve třetí studii tohoto týmu (10) byly dospívající opice (8 samic a 9 samců) živěny dietou s nízkým a s vysokým obsahem cholesterolu. Autoři pozorovali jejich chování v průběhu 8 měsíců. Po 4 a 5,5 měsících jim byly změněny koncentrace plazmatických lipidů (cholesterol a HDL-cholesterol) a koncentrace metabolitů serotoninu (5-hydroxyindolooctová kyselina), noradrenalinu (3-metoxi-4-hydroxy phenylglykol) a dopaminu (homovanilová kyselina). Opice živěné dietou s nízkým obsahem cholesterolu byly agresivnější a měly nižší koncentrace 5-HIAA v moku. U opic byla také sledována frekvence agresivních činů, frekvence submisivních činů a pasivní tělesný kontakt. Výsledky ukazují, že vztah mezi hladinou cholesterolu, chováním a mozkovým metabolismem je reverzibilní a ovlivnitelný pomocí diet a farmakologické manipulace.

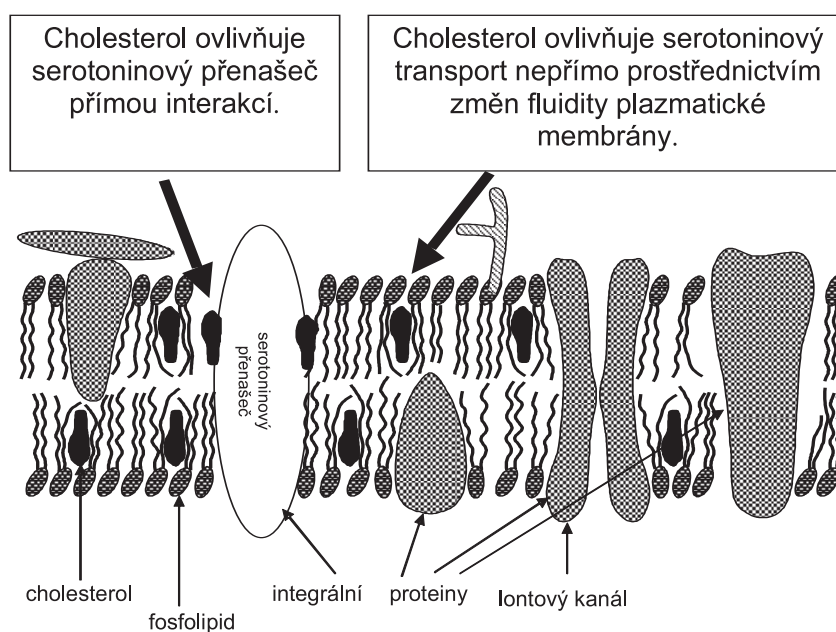
### *Přímé měření viskozity plazmatické membrány*

Skutečnost, že cholesterol ovlivňuje fluiditu plazmatické membrány, je prokázána mnoha studiemi a je známo, že i relativně malé krátkodobé změny viskozity membrány mají fyziologický důsledek pro dostupnost a aktivitu v ní obsažených struktur (např. 12). Pro Engelberga měla klíčový význam studie, která *in vitro* dokumentovala, že po zvýšení viskozity myšičí synaptické membrány přidáním cholesterolu došlo k 5násobnému zvýšení vazby serotoninu, což poukazuje na možnost zvýšeného uptake 5HT do buněk (11).

Není ovšem jasné, jak by například dietou vyvolaná koncentrace krevního cholesterolu mohla ovlivňovat CNS, protože cholesterol nepřechází hematoencefalickou bariérou a dochází k jeho syntéze dle potřeby *in situ* v CNS. Tento problém je ve většině asociáčních studií ignorován.

K poklesu syntézy cholesterolu v mozku by ovšem mohlo dojít vlivem cholesterol snižující medicíny, která prochází hematoencefalickou bariérou. Morita dokumentoval *in vitro*, že podávání simvastatinu vede nejen ke snižování plazmatického, ale i membránového cholesterolu (16).

V naší nedávné práci jsme v průběhu hypolipidemické terapie kolísání viskozity plazmatické membrány nezaznamenali, navzdory podstatnému snížení koncentrací plazmatického cholesterolu sim-



**Obr. 1.** Vliv cholesterolu na serotoninový přenašeč

V naší dřívější práci jsme prokázali, že cholesterol ovlivňuje uptake serotoninu opačně, než se dosud předpokládalo. Popsali jsme vzestup, nikoliv pokles uptake serotoninu. Novým nálezem rovněž je, že tyto změny jsou časově ohraničené na první 2 měsíce terapie.

vastatinem (17). Přesto došlo k ovlivnění serotoninergního transporteru. Již dříve bylo popsáno (18), že aktivita SERT je ovlivněna nejen viskozitou, ale i přímou vazbou cholesterolu na SERT (obr. 1). **Uptake serotoninu byl v našem sledování ovlivněn opačně než Engelbergova teorie předpokládala – popsali jsme vzestup, nikoliv pokles uptake serotoninu.** Významnou změnu jsme zde zaznamenali jen po 4. týdnu. Velmi překvapivé bylo, že po více než roce léčby se koncentrace membránového cholesterolu a aktivita serotoninového transporteru vrátili na hodnoty před počátkem léčby. Předpokládáme, že se zde uplatňoval efekt zatím neznámých homeostatických mechanismů. Tyto nálezy mají teoretické a praktické implikace. Pacienti během prvního měsíce snižování cholesterolu mohou být náchylnější k depresivitě nebo agresivnímu či suicidálnímu chování. Biochemické a behaviorální studie by měly být prováděny v prvním měsíci léčby, protože pozdější změny už nemusí být patrné.

#### Studie sledující metabolity serotoninu v likvoru

Metabolismus 5HT v CNS lze nejpřesněji studovat pomocí jeho metabolitu 5-HIAA v mozkomíšním moku. Z pěti prací (19–23), které byly na toto téma publikovány (tab. 1) žádná studie nenalezla asociaci mezi hladinami celkového cholesterolu a HIAA.

Z těchto prací má pouze jedna malá, krátkodobá studie experimentální design v tom smyslu, že sledují stav před a po intervenci – Eriksson et al. (23) podával 10 zdravým mužům 14 dnů 40 mg simvastatinu. Nalezl pouze trend ke snížení HIAA v CSM, ale žádné statisticky významné změny v metabolitech HT, dopaminu a noradrenalinu. Po terapii bylo ale zaznamenáno zvýšení anxiogenního peptidu cholecystokininu (CCK 4). Koncentrace cholesterolu v CSM těchto mužů se před léčbou a po léčbě simvastatinem nelišily, což nepodporuje Engelbergovu teorii.

#### Neuroendokrinní testy

Další možností jak studovat centrální serotoninergní transmisí poskytují neuroendokrinní testy. Serotoninergní transmisí v CNS ovlivňuje mimo jiné i výdej prolaktinu a prostřednictvím ACTH také kortizolu. Tyto látky jsou detekovatelné v periferní krvi. Jednorázově podaný serotoninový agonista či antagonistu způsobí

změnu plazmatické koncentrace hormonu. Změna plazmatické hodnoty hormonu následně odráží centrální aktivitu serotoninu.

#### Neuroendokrinní testy u osob bez psychiatrické poruchy

Terao et al. (24, 25) našel pozitivní asociaci mezi hladinami cholesterolu a kortizolovou odpovědí na podání serotoninergního agonisty meta-chlorofenylpiperazinu u 20 mužů a 10 žen. V jiné studii, která využívala d-fenfluraminový test, autoři nenalezli změny v prolaktinové odpovědi u 20 pacientů léčených pro hypercholesterolemii (26) oproti pacientům z kontrolní skupiny. Mnohem zajímavější by ovšem bylo, kdyby autoři sledovali změny, ke kterým dojde u pacientů před léčbou a po léčbě.

#### Neuroendokrinní testy u psychiatrických pacientů

Dvě studie sledovaly vztah cholesterolu a markery serotoninergní transmisí u psychiatrických pacientů. Sarchiapone et al. (27) zjistil, že i když koncentrace cholesterolu byly u depresivních pacientů (N=12) nižší než u kontrolní skupiny (N=6), kortizolové ani prolaktinové odpovědi na d-fenfluraminový test nekorelovaly s hladinami cholesterolu.

Naproti tomu u mužů, závislých na kokainu (N=38) byly nalezeny nižší koncentrace cholesterolu a HDL u pacientů s agresivním chováním v anamnéze a tyto korelovaly s opožděnou kortizolovou odpovědí na m-CPP (28).

Dvě práce (25, 28) tedy přinášejí evidenci o vztahu cholesterolu a serotoninergní transmisí (Terao publikoval sice dvě práce (24 a 25), ale první studie je součástí druhé), a dvě ji nenacházejí (26, 27).

#### Periferní serotoninové markery

Několik prací hledalo asociaci mezi metabolity 5-HIAA v plazmě či v trombocytech a koncentracemi celkového cholesterolu (29, 30). Základním problémem ale je, o čem takové práce vlastně svědčí? Většina serotoninu nebo jeho metabolitů na periférii nepochází z CNS, ale opět z periférie (GIT, trombocyty). K měření serotoninergní transmisí v CNS nejsou periferní markery vhodné a testovat takto Engelbergovu teorii je zavádějící a nepřínosné. Trombocyty mohou ale být použity jako izolovaný model pro studium funkce HT transportéru.



**Tab. 1.** Studie sledující metabolity serotoninu v likvoru

Autor	studovaná skupina	kontrolní skupina	korelace mezi 5-HIAA a celkovým cholesterolem
Hibbeln (2000)	127 alkoholiků, 27 násilníků	49 31 bez násilného chování	po korelaci na věk 0
Virkkunen (1996)	114 alkoholiků a podpalovačů	0	ne
Ringo (1994)	96, pacienti trpící schizofrenií, schizoafektivní poruchou a depresi	16	ne
Engstrom (1995)	72 osoby po sebevražedném pokusu	ne	ne, byla ale nalezena pozitivní korelace s HDL
Eriksson (1996)	10 zdravých mužů před a po experimentálním podání simvastatinu	sami sobě kontrolou	ne

## DISKUZE

Práce nacházející vztah mezi nízkou hladinou cholesterolu a sebevražedností, násilným chováním či depresivitou jsou většinou publikovány v časopisech zaměřených na psychiatrickou veřejnost. Studie, které tento vztah nenacházejí, nebo potvrzují zlepšené náladu, jsou naopak publikovány převážně v časopisech zaměřených na internisty. Vzhledem k preselekcii pacientů vysvětlení tohoto jevu zatím neumožňují.

Vysvětlení tohoto vztahu mohou poskytnout pouze biologické studie. Nejčastěji používaným biologickým vysvětlením je Engelbergova teorie. Nalezli jsme jen 15 biologických prací (a 5 prací, ze kterých teorie vycházela), které tuto studii testovaly a jejich výsledky teorii většinou nepotvrzují. Žádná z prací prováděná na vzorku psychiatrických pacientů, splňujících kritéria pro „velkou depresi“ nepřinesla data potvrzující Engelbergovu teorii, podporu přináší pouze dvě malé studie, využívající odpovědi v neuroendokrinních testech u zdravých osob a u osob závislých na heroínu. Nej přesnější informací o metabolismu serotoninu v CNS přináší studie 5-HIAA v moku. Žádná z těchto prací, ať už prováděná na vzorku psychiatrických pacientů, či zdravých osob, nepřinesla údaje podporující Engelbergovu teorii. Hlavními argumenty proti této teorii je skutečnost, že cholesterol neprochází hematoencefalickou bariérou, u experimentů *in vivo* nedochází k významným změnám fluidity plazmatické membrány a nedochází k poklesu, ale naopak ke zvýšení serotoninergní transmise. Kromě toho nedávné práce českých autorů ukazují, že koncentrace cholesterolu se mohou rychle měnit v závislosti na okolních stresujících faktorech – například na bolesti (31).

Nejsilnější podpora této teorie pochází ze studií na opicích, replikovaných ovšem tím samým týmem autorů. U těchto 3 prací byla zpochybnována vhodnost zkoumaných zvířat, protože se jednalo o převážně býložravé opice (dle 32).

Vztah mezi sníženými hladinami cholesterolu a depresivitou či suicidalitou lze vysvětlit i jinak než změnami fluidity plazmatické membrány či přímou vazbou cholesterolu na serotoninový transporter (18). Při změnách v příjmu či zpracování cholesterolu může docházet ke snížení spotřeby nenasycených mastných kyselin. Depence omega 3 nenasycených mastných kyselin je delší dobu dáována do souvislosti s depresivitou (33), která je nejdůležitějším rizikovým faktorem sebevražednosti. Spekuluje se o tom, že dietní změny, ke kterým došlo v průběhu 20. století, především pokles příjmu nenasycených mastných kyselin a rostoucí spotřeba cukrů – by se mohly podílet na nárůstu depresivity a suicidality či horším průběhu schizofrenie v rozvinutých zemích (34).

Jinou možností je, že snížení syntézy cholesterolu vede ke snížení tvorbě steroidních hormonů, jejichž je cholesterol prekurzorem.

Předpokládá se, že snížení koncentrací pohlavních hormonů se podílí na etiologii depresivní poruchy (35–37).

## ZÁVĚR

Zjistili jsme, že ačkoliv je Endelbergova hypotéza nejčastěji užívaným vysvětlením pro vztah mezi snižováním hladin cholesterolu, depresivitou, násilím a suicidalitou, pouze několik studií se jí pokusilo laboratorně testovat. Většina z těchto prací nalezla výsledky, které Engelbergově práci odporují. To však její využití k vysvětlení metodicky komplikovaných asociačních studií příliš neovlivnilo. Navzdory dostupnosti na důkazech založených poznatků slouží i nadále překonaná teorie k interpretaci diskutabilních nálezů.

## Zkratky

ACTH	– adrenokortikotropní hormon
CCK 4	– cholecystokinin
CNS	– centrální nervová soustava
CSM	– cerebrospinální mok
GIT	– gastrointestinální trakt
HIAA	– kyselina hydroxyindolactová (hydroxyindole acetic acid)
5HT	– serotonin
m-CPP	– m-chlorfenylpiperazin
SERT	– serotoninový přenašeč
TS	– sebevražedný pokus

## LITERATURA

1. **Vevera, J.:** Sebevražednost, impulsivita a terapie statiny. Čas. Lék. čes., 2004, 5, s. 360.
2. **Vítek, L.:** Statiny versus psychické poruchy. Čas. Lék. čes., 2004, 5, s. 361.
3. **Vevera, J., Žukov, I., Morcinek, T., Papežová, H.:** Cholesterol concentrations in violent and non-violent women suicide attempters. Eur. Psychiatry, 2003, 18, s. 23-27.
4. **Žukov, I., Vevera, J., Morcinek, T.:** Nižší hladiny cholesterolu u delikventů s afektivně násilným trestným činem v porovnání s delikventy bez násilného trestného činu a kontrolní skupinou. Čs. Psychiatrie, 2001, 97, s. 414-417.
5. **Vevera, J., Papežová, H., Žukov, I., Linhartová, L.:** Cholesterol a násilné chování. Čs. Psychiatrie, 2001, 97, s. 69-73
6. **Tanskanen, A.:** Violent suicide linked to high serum cholesterol levels. Am. J. Psychiatry, 2001, 157, s. 648-650.
7. **Engelberg, H.:** Low serum cholesterol and suicide. Lancet, 1992, 339, s. 727-729.
8. **Kaplan, J., Manuck, S., Shively, C.:** The effects of fat on cholesterol on social behaviour in monkeys. Psychosom. Medicine, 1991, 53, s. 634-642.

9. **Muldon, M., Kaplan, J., Manuck, S., Mann, J.:** Effects of a low fat diet on brain serotonergic responsivity in cynomolgus monkeys. *Biol. Psychiatry*, 1992, 31, s. 739-742.
10. **Kaplan, J., Shinely, C., Fontenot, B. et al.:** Demonstration of an association among dietary cholesterol, central serotonergic activity and social behavior in monkeys. *Psychosom. Medicine*, 1994, 56, s. 479-484.
11. **Heron, D. S., Shinitzky, M., Hershkowitz, M., Samuel, D.:** Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, s. 7463-7467.
12. **Hershkowitz, M., Heron, D., Samuel, D., Shinitzky, M.:** The modulation of protein phosphorylation and receptor binding in synaptic membranes by changes in lipid fluidity: implications for ageing. *Prog. Brain Res.*, 1982, 56, s. 419-434.
13. **Muldoon, M., Barger, S., Ryan C. et al.:** Effects of lovastatin on cognitive function and psychological well-being. *Am. J. Med.*, 2000, 108, s. 538-547.
14. **Fernstrom, M. H., Verrico, C. D., Ebaugh, A. L., Fernstrom, J. D.:** Diet-induced changes in serum cholesterol concentrations do not alter tryptophan hydroxylation rate or serotonin concentrations in gerbil brain. *Life Sci.*, 1996, 58, s. 1433-1444.
15. **McCreary, A., Handley, S. L.:** Chronic administration of the cholesterol reducing drug gemfibrozil fails to alter 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> mediated receptor behaviours in rats. *J. Psychopharmacol.*, 2000, 14, s. 280-283.
16. **Morita, I., Sato, I., Ma, L., Murota, S.:** Enhancement of membrane fluidity in cholesterol-poor endothelial cells pre-treated with simvastatin. *Endothelium*, 1997, 5, s. 107-113.
17. **Vevera, J., Fišar, Z., Kvasnička, T. et al.:** Cholesterol lowering therapy evokes time-limited changes in serotonergic transmission. *Psychiatric Research*, 2005, 133, s. 197-203.
18. **Scanlon, S. M., Williams, D. C., Schloss, P.:** Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. *Biochemistry*, 2001, 3, s. 10507-10513.
19. **Hibbeln, J. R., Umhau, J. C., George, D. T., et al.:** Plasma total cholesterol concentrations do not predict cerebrospinal fluid neurotransmitter metabolites: implications for the biophysical role of highly unsaturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutrition*, 2000, 71 (Suppl. 1), s. 331S-338S.
20. **Engstrom, G., Alsen, M., Regnell, G., Traskman-Bendz, L.:** Serum lipids in suicide attempters. *Suicide and Life Threatening Behavior*, 1995, 25, s. 393-400.
21. **Ringo, D. L., Lindley, S. E., Faull, K. F., Faustman, W. O.:** Cholesterol and serotonin: seeking a possible link between blood cholesterol and CSF 5-HIAA. *Biol. Psych.*, 1994, 35, s. 957-959.
22. **Virkkunen, M., Eggert, M., Rawlings, R., Linnoila, M.:** A prospective follow-up study of alcoholic violent offenders and fire setters. *Archives of Gen. Psych.*, 1996, 53, s. 523-529.
23. **Eriksson, M., Eklundh, T., Sjöberg, S. et al.:** Cholesterol lowering and cerebrospinal fluid neurotransmitters: increased levels of the anxiogenic cholecystokinin-tetrapeptide during simvastatin administration to healthy male volunteers. *Biol. Psychiatry*, 1996, 40, s. 302-304.
24. **Terao, T., Nakamura, J., Yoshimura, R. et al.:** Relationship between serum cholesterol levels and meta-chlorophenylpiperazine-induced cortisol responses in healthy men and women. *Psychiatry Res.*, 2000, 96, s. 167-173.
25. **Terao, T., Yoshimura, R., Ohmori O. et al.:** Effect of serum cholesterol levels on meta-chlorophenylpiperazine-evoked neuroendocrine responses in healthy subjects. *Biol. Psychiatry*, 1997, 41, s. 974-978.
26. **Delva, N. J., Matthews, D. R., Cowen, P. J.:** Brain serotonin (5-HT) neuroendocrine function in patients taking cholesterol-lowering drugs. *Biological Psychiatry*, 1996, 39, s. 100-106.
27. **Sarchiapone, M., Camardese, G., Roy A. et al.:** Cholesterol and serotonin indices in depressed and suicidal patients. *J. Affect Disord.*, 2001, 3, s. 217-219.
28. **Buydens-Branchey, L., Branchey, M., Hudson, J., Ferguson P.:** Low HDL cholesterol, aggression and altered central serotonergic activity. *Psychiatry Research*, 2000, 93, s. 93-102.
29. **Stegmans, P. H., Hoes, A. W., Bak, A. A. et al.:** Higher prevalence of depressive symptoms in middle-aged men with low serum cholesterol levels. *Psychosomatic Medicine*, 2000, 62, s. 205-211.
30. **Alvarez, J. C., Cremniter, D., Lesieur, P. et al.:** Low blood cholesterol and low platelet serotonin levels in violent suicide attempters. *Biol. Psychiatry*, 1999, 45, s. 1066-1069.
31. **Krikava, K., Kalla, K., Yamamotova, A., Rokyta, R.:** Blood serum changes in patients with pain during bone fractures and acute pancreatitis. *Neuroendocrinology Letters*, 2004, 25, s. 62-69.
32. **Hillbrand, M., Foster, H.:** Serum cholesterol levels and severity of aggression. *Psychological Reports*, 1993, 2, s. 270.
33. **Peet, M., Murphy, B., Shay, J., Horrbins, D.:** Depletion of omega 3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol Psychiatry*, 1998, 43, s. 315-319.
34. **Peet, M.:** International variations in the outcome of schizophrenia and the prevalence of depression in relation to national dietary practices: an ecological analysis. *Br. J. Psychiatry*, 2004, 184, s. 404-408.
35. **Seidman, S. N., Araujo, A. B., Roose, S. P., McKinlay, J. B.:** Testosterone level, androgen receptor polymorphism, and depression symptoms in middle-aged men. *Biol. Psychiat*, 2001, 50, s. 371-376.
36. **Allolio, B., Arlt, W.:** DHEA treatment: myth or reality? *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2002, 13, s. 288S-294S.
37. **Hyypä, M. T., Kronholm, E., Virtanen, A. et al.:** Does simvastatin affect mood and steroid hormone levels in hypercholesterolemic men? A randomized double-blind trial. *Psychoneuroendocrinology*, 2003, 28, s. 181-194.

### Extrémní nezralost – pokračující dilema

Velké pokroky v neonatologii způsobily, že nezralí novorozenci mohou přežít i v gestačním věku 22–25 týdnů. Podle současných směrnic Americké pediatrické akademie se nedoporučuje zahájit resuscitaci u nedonošenců mladších 23 týdnů nebo u těch, jejichž porodní hmotnost je menší než 400g, vzhledem ke špatné prognóze. Podle autorů článků jsou tyto směrnice kontroverzní a skutečně rodiny někdy vytvářejí tlak na porodníka, aby se snažil udržet při životě nedonošence ve stáří 21–22 týdnů. Důvodem tohoto nátlaku jsou narůstající počty předčasných porodů, zvyšující se věk rodiček a informace z masmédií o přežití extrémně nezralých nedonošenců.

Marlow et al. vyšetřili v Británii a v Irsku 308 dětí s věkovým mediánem 6 let, které přežily extrémní nezralost pro nízký gestační věk.

Přežití nedonošenců v gestačním věku 22 týdnů bylo 1 %, ve věku 23 týdnů 11 %, ve věku 24 týdnů 26 % a 44 % ve věku 25 týdnů. Pokud jde o přežití do šesti let věku bez známek poškození organismu jsou výsledky ještě smutnější: 0 % dětí porozených v gestačním věku 22 týdnů, 1 % ve věku 23 týdnů, 3 % ve věku 24 týdnů a 8 % ve věku 25 týdnů.

Nedonošené děti ve věku 22–25 týdnů jsou fragilní a vulnerabilní, s nezralými orgánovými systémy. Jejich kůže je gelatinózní, děti dýchají pomocí terminálních bronchiolů, neboť jejich alveoly nejsou ještě vyvinuty. Čelí vysokému riziku poškození mozku vlivem hypoxie, ischemie a podvýživy. Jsou vystaveni riziku sepse, která nastartuje kaskádu procesů, které zvyšují riziko mozkového krvácení, poškození bílé hmoty mozkové a následující poškození vývoje nervové soustavy. Rozvoj mozku je dokončován během druhého a třetího trimestru s neurogene-

zí, neuronální migrací, maturací, apoptózou a synaptogenezí. Nezralost mozku v gestačním věku 22–25 týdnů činí tyto nedonošence extrémně zranitelné. Zobrazení magnetickou rezonancí v osmém roce věku těchto nedonošenců ukazuje zmenšený mozkový tkáňový objem, regionální mozkové abnormality a sníženou komplexitu kortikální oblasti. Ve školním věku jsou u dětí, které se narodily jako extrémně nezralé, častá kognitivní a neurologická poškození. Na druhé straně existují důkazy, že výsledky kognitivních funkcí se za určitých okolností mohou zlepšit.

#### Literatura:

**Vohr, B. R., Allen, M.:** Extreme Prematurity – The Continuing Dilemma. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352, s. 71-72.

O. Louthan

## K článku J. Vevery „Cholesterol, násilí a sebevražednost – příběh plný omylů“

Vztahy mezi koncentrací cholesterolu v séru a násilným či sebevražedným chováním jsou předmětem lékařských výzkumů již řadu let. Přesto možné mechanismy, které tyto jevy spojují, stále nejsou objasněny. Jedna z hypotéz předpokládá, že pokles hladiny cholesterolu v séru koreluje se změnami nálady, iritabilitou, hostilitou, depresí i sebevražedným jednáním v důsledku změn v metabolismu serotoninu.

Serotonin je jedním z nejvýznamnějších mediátorů v CNS. Je zajímavé, že odchylky v metabolismu tohoto přenašeče hrají roli nejen v patogenezi poruch z oblasti psychiatrie, jako je například úzkost, agresivní chování, obsedantní jednání, ale zřejmě také v patogenezi řady různých vnitřních onemocnění (1), jako je obezita, hypertenze, poruchy glukózové tolerance, které patří mezi komponenty tzv. metabolického syndromu. Metabolický syndrom patří mezi nejvýznamnější prediktory kardiovaskulární morbidity a mortality, přičemž význam zde má mimo jiné i přítomnost tzv. aterogenního lipoproteinového fenotypu (zvýšená koncentrace plazmatických triglyceridů, pokles cholesterolu v lipoproteinech HDL a zvýšený podíl tzv. malých denzních částic LDL a zvýšená koncentrace apolipoproteinů B, která odpovídá zvýšenému počtu částic LDL, které jsou hlavním nositelem plazmatického cholesterolu) (2). Koncentrace celkového plazmatického cholesterolu většinou nebývá zvýšena, rozhodně však není snížena. V posledních několika letech se objevuje řada prací, které poukazují na úzké vztahy mezi metabolickým syndromem, obezitou, diabetes mellitus 2. typu na jedné straně a depresivní poruchou na straně druhé, přičemž ovšem kauzální vztahy nejsou vůbec jasné (3, 4).

Serotonin, tvořený v mozkových neuronech, je uchováván ve vezikulách a po uvolnění reaguje s několika typy postsynaptických receptorů (5HT1, 5HT2, 5HT3 a 5HT4). Po interakci s receptorem je serotonin odstraňován zpět do presynaptického neuronu specifickým membránovým transportérem. Zbývající serotonin je metabolizován a inaktivován monoaminoxidázou a aldehyd dehydrogenázou na 5-hydroxyindolactovou kyselinu (5-HIAA) (5). Tento metabolit je nejčastěji používán jako marker při hodnocení metabolismu serotoninu u suicidálního chování. Nejpravděpodobnější odchylkou serotoninového systému u suicidálního jednání je pokles serotonergní transmise. Tato může vzniknout v důsledku poklesu dosažitelnosti neuropřenašeče s případnými následnými kompenzatorními změnami receptorů nebo poklesem signální transdukce v důsledku vrozeného defektu receptoru.

Při zkoumání vztahu serotoninu a suicidálního byl zjištěn pokles vazby k presynaptickému serotoninovému transportéru a současný vzestup hladiny postsynaptické vazby 5-HT1 v prefrontálním kortexu obětí suicidia (6). Někteří autoři předpokládají, že k suicidálnímu chování přispívá právě serotonergní dysregulace v prefrontálním kortexu.

Podle hypotézy cholesterol – serotonin je nízká koncentrace cholesterolu v séru, nebo její významný pokles po léčbě, spojena s nízkou serotonergní aktivitou a může přispívat k sebevražednému a násilnému chování. V řadě epidemiologických studií byly prokazovány negativní korelace hladiny cholesterolu a úmrtností v důsledku suicidia. Epidemiologické a klinické studie popisují asociace mezi nízkými koncentracemi celkového cholesterolu (TC) v séru a zvýšeným rizikem sebevraždy, které nelze vysvětlit malnutricí a váhovým úbytkem u depresivních jedinců. Epidemiologické studie na velkých souborech dlouhodobě sledovaných probandů potvrdily korelace mezi koncentracemi TC a rizikem suicidia (7, 8). Na druhou stranu velké studie statinové (9) neprokázaly vzestup rizika suicidia v důsledku snižování koncentrace cholesterolu v séru. Vliv na výsledky intervenčních studií může mít i selekce nemocných, jak je diskutováno v článku, v řadě studií nebylo sledováno složení diety, což omezuje možnost průkazu kauzálních souvislostí.

Předpokládá se, že složení lipidů v dietě ovlivňuje obsah lipidů v mozku a/nebo monoaminoergní funkce, což vede ke změnám chování (10). Tyto vztahy bude nutné objasnit, protože součástí lékařských doporučení týkajících se prevence rozvoje aterosklerózy a jejích kardiovaskulárních komplikací je mimo jiné právě doporučení omezit množství nasycených tuků a cholesterolu v potravě. V posledních 100–150 letech došlo ve světě k významným změnám ve složení potravy ve smyslu vyšší spotřeby celkových kalorií, nasycených mastných kyselin, trans mastných kyselin, glycidů a snížené spotřeby PUFA, zejména PUFA n-3, obsaženými v rybích olejích (11). Hlavními představiteli PUFA n-3 jsou kyselina eikosapentaenová, EPA a dokosahexaenová, DHA. V průběhu fylogeneze se podstatně zvýšil poměr PUFA n-6/n-3, ve stravě, který činil u paleolitických lidí asi 2:1, zatímco ve stravě západní civilizace dnes činí asi 20–30:1. PUFA n-3 snižují dostupnost některých jaderných transkripčních faktorů, nebo jejich vazbu na DNA v jádře (12). Jejich zastoupení v buněčných membránách významným způsobem ovlivňuje jejich fluiditu a současně také funkce faktorů v nich obsažených. Je možné, že změny koncentrací PUFA přispívají ke změnám funkce biologických membrán více než cholesterol (13). PUFA n-3 tvoří podstatnou část tukové složky mozku a úměrně tomu hrají zde významnou strukturální a funkční roli (14). Byly prokázány souvislosti mezi PUFA n-3 a výskytem depresivních a schizoafektivních poruch, poruch chování a nálady (15). Národy, které mají vysokou spotřebu ryb, mají významně nižší výskyt deprese (16). U depresivních nemocných byly nalezeny snížené koncentrace PUFA n-3 ve fosfolipidech a cholesterylesterech séra, v membránách erytrocytů, snížený obsah DHA v tukové tkáni u depresivních pacientů byla popsána negativní korelace EPA v erytrocytech se závažností deprese (17, 18). Koncentrace PUFA v lipidových třídách plazmy a membránách erytrocytů na jedné straně a ve fosfolipidech mozkové tkáně spolu významně pozitivně korelují (14). Dlouhodobá deficience PUFA n-3 vedla v experimentu ke změnám v metabolismu dopaminu v mozkové kůře krys i k dysfunkci mezokortikolimbické dopaminergní dráhy (10). V mozku snižují PUFA n-3 sekreci zánětlivých cytokinů s následným příznivým ovlivněním neurotransmise a osy hypothalamus-hypofýza-nadledvina. PUFA n-3 ovlivňují fluiditu membrán s následným příznivým ovlivněním struktury. Podávání PUFA n-3 zlepšuje adaptaci na stres. Příčiny snížené koncentrace PUFA n-3 ve tkáních u nemocných s depresivní poruchou nejsou jasné. Jednou z možností je snížený dietní přísun v důsledku změných

MUDr. Miroslav Zeman, CSc.  
IV. interní klinika 1. LF UK a VFN  
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2  
fax: +420 224 963 524, e-mail: zemanm@vfn.cz

dietních návyků v moderních industriálních společnostech (tzv. westernizace diety) se zvýšeným celkovým přísunem tuků, zejména nasycených a podstatně zvýšený poměr PUFA n-6/PUFA n-3 (19). Změny složení mastných kyselin ve smyslu poklesu PUFA mohou být také způsobeny jejich zvýšenou oxidací.

Je možné, že k objasnění vztahů mezi obsahem cholesterolu ve stravě, jeho koncentrací v séru, funkcemi biologických membrán, metabolismem neuropřenašečů a depresemi, agresí a suicidálním jednáním přispěje v současné době intenzivně prováděný výzkum metabolismu PUFA a jejich zásahu do funkce membrán i metabolismu neurotrofních faktorů.

#### Zkratky

- DHA – kyselina dokosaheptaenová  
 EPA – kyselina eikosaheptaenová  
 PUFA – vícenenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)  
 PUFA n-3 – vícenenasycené mastné kyseliny řady n-3

#### LITERATURA

1. **Muldoon, M. F., Mackey, R. H., Williams, K. V. et al.:** Low central nervous system serotonergic responsivity is associated with the metabolic syndrome and physical inactivity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004, 89, s. 266-271.
2. **Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z.:** The metabolic syndrome. *Lancet*, 2005, 365, s. 1415-1428.
3. **Everson-Rose, S. A., Meyer, P. M., Powell, L. H. et al.:** Depressive symptoms, insulin resistance, and risk of diabetes in women at midlife. *Diabetes Care*, 2004, 27, s. 2856-2862.
4. **Licinio, J., Yildiz, B., Wong, M.-L.:** Depression and cardiovascular disease.: co-occurrence or shared genetic substrates? *Mol. Psychiatry*, 2002, 7, s. 1031-1032.
5. **Reisler, K. J., Nemeroff, C. B.:** Role of serotonergic and noradrenergic systems in pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depres. Anxiety* 2000, 12 (Suppl.1), s. 2-19.
6. **Arango, V., Underwood, M. D., Boldrini, M. et al.:** Serotonin 1A Receptors, Serotonin Transporter Binding and Serotonin Transporter mRNA Expression in the Brainstem of Depressed Suicide Victims. *Neuropsychopharmacology*, 2001, 25, s. 892-903.
7. **Ellison, L. F., Morrison, H. I.:** Low serum cholesterol concentration and risk of suicide. *Epidemiology*, 12, 2001, s. 168-172.
8. **Stegmans, P. H. A., Hoes, A. W., Bak, A. A. et al.:** Higher prevalence of depressive symptoms in middle-aged men with low serum cholesterol levels. *Psychosom. Med.*, 2000, 62, s. 2045-2211.
9. **Heart Protection Study Collaborative Group.** MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2002, 360, (9326), s. 7-22.
10. **Zimmer, L., Vancassel, S., Cantagrel, S. et al.:** The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, 75, s. 662-667.
11. **Simopoulos, A. P.:** N-3 fatty acids and human health: defining strategies for public policy. *Lipids*, 2001, 36 (Suppl.), s. S83-S89.
12. **Clarke, S. D.:** Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.*, 2001, 131, s. 1129-1132.
13. **Ryback, R.:** Bioelectrical modulators and the cell membrane in psychiatric medicine. *Psychopharmacol. Bull.*, 2001, 35, s. 5-44.
14. **Bourre, J. M., Dumont, O., Durand, G.:** Brain phospholipids as dietary source of (n-3) polyunsaturated fatty acids for nervous tissue in the rat. *J. Neurochem.*, 1993, 60, s. 2018-2028.
15. **Nemets, B., Stahl, M., Belmaker, R.:** Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. *Am. J. Psychiatry*, 2002, 150, s. 477-479.
16. **Hibbeln, J. R.:** Fish consumption and major depression. *Lancet*, 1998, 351, s. 1213.
17. **Maes, M., Christophe, A., Delanghe, J. et al.:** Lowered omega3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. *Psychiatry Res.*, 1999, 85, s. 175-291.
18. **Peet, M., Murphy, B., Shay, J., Horrobin, D.:** Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol. Psychiatry*, 1998, 43, s. 315-319.
19. **Storlien, L. H., Kriketos, A. D., Calvert, G. D. et al.:** Fatty acids, triglycerides and syndromes of insulin resistance. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 1997, 57, s. 379-385

#### Šíře činnosti proteáz

Zink-metalloproteázy jako neutrální endopeptidáza NEP a angiotenzin-konvertující enzym ACE kontrolují biodostupnost peptidových mediátorů, které jsou uvolňovány ze senzitivních nervů, z imunitních kožních buněk během kožní odpovědi na endo- i exogenní podněty. Jejich inaktivace přechodnou nebo i permanentní inhibicí genomické delece má za následek relativní zmožnění substance P a bradykininu.

To zvětší u myši kontaktní alergickou dermatitidu jak senzitivizaci, tak elicitaci, a to i cestou dendritických buněk a T buněk. Obě endopeptidázy jsou regulovány též UV radiací a jsou schopné zpracovat neuroendokrinní hormony (ACTH a  $\alpha$ -MSH).

Tedy tyto proteázy proteolytickým štěpením peptidových mediátorů a růstových faktorů fungují v kontrole zánětů, například psoriázy a alergie, ale může působit i na pigmentaci, přežití buněk, hojení a regeneraci tkání

#### Literatura:

**Scholzen, T. E., Luger, A. T.:** Neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme – key enzymes terminating the action of neuroendocrine the action of neuroendocrine mediators. *Experimental Dermatology*, 2004,13, s. 22-26.

P. Barták



KOMENTÁŘ

## K práci Vevera J. „Cholesterol, násilí a sebevražednost – příběh plný omylů“

Databáze MEDLINE vykazuje v současné chvíli na 200 titulů po zadání kombinace cholesterol, deprese, suicidium. Je sympatické, že na prvním místě je citace našich autorů Vevera J., Fisar Z., Kvasnička T. et al.: Cholesterol-lowering therapy evokes time-limited changes in serotonergic transmission. *Psychiatry Res. (Ireland)*, 2005, 133(2–3), s. 197-203.

Autor článku se nespokojil pouze s vlastní experimentální prací, která se čestně zařadila do série mnoha dalších na dané téma, ale provedl navíc metaanalýzu 207 prací, v nichž autoři použili k vysvětlení souvislosti mezi celkovou hladinou cholesterolu v krvi a náchylností k depresi a sebevražednosti hypotézu H. Engelberga z roku 1992, publikovanou v *Lancetu*. Publikace *Lancetu* jsou vždy předmětem zájmu a bývají vesměs a priori přijímány jako prestižní výzva k ověřování. Navíc nelze opomenout, že začátek devadesátých let 20. století se ocitl v oblasti nejenom psychiatrie, ale i mnoha dalších neurovědních disciplín, ve znamení entuziasmu po nezpochybnitelných důkazech protidepresivního působení selektivních inhibitorů reuptaku serotoninu (SSRI). První z nich, fluoxetin, byl syntetizován v roce 1987 (Prozac) a byl následován několika dalšími, relativně velmi úspěšnými při léčbě nejen depresivních, ale také úzkostných a některých dalších duševních poruch. Serotonin se tak dostal znovu (poněkoliakrát již v druhé polovině 20. století) do popředí bádání a začal být bedlivě sledován každý činitel, který by mohl souviset se změnami množství tohoto neuromediátoru na vazebných místech neuroreceptorů, jeho hladin a hladin jeho metabolitů v séru, mozkomíšním likvoru apod. Engelbergova hypotéza o souvislostech hladiny celkového cholesterolu a vazebných místech pro serotonin na membránách neuronů CNS takovou možnost nabízela. Byla vítaným východiskem pro studie vztahu deprese, suicidalitu a agresivního chování k hladinám celkového sérového cholesterolu. Je pozoruhodné, jak relativně malé množství autorů prací na toto téma se nad samotnou hypotézou hlouběji zamyslelo. Autor rozkrývá velmi zřetelně některé zcela elementární rozporny této hypotézy (např. neprostupnost cholesterolu hematoencefalickou bariérou). Všimá si současně i řady sporných metodologických faktorů, které, pokud nejsou pečlivě váženy, příslušné studie prakticky zcela znehodnocují. Autor dokládá kritickým rozbořem řady studií známost, stále až neuvěřitelně často opomíjenou skutečnost, že k nejdůležitějším atributům každé vědecké studie patří pečlivý a kritický výběr experimentálního materiálu, resp. objektů zkoumání. V oblasti biologických studií hraje často kruciólní roli od samého počátku charakter biologického materiálu (např. studie *in vivo* versus *in vitro*), zkoumaného živočišného druhu (např. výběr druhu experimentálního zvířete), ale také úhel pohledu samotného výzkumníka na experimentální objekt (zde například psychiatr versus internista). Záplava studií, testujících problematický experimentální soubor na základě v jádru taktéž problematické hypotézy, tyto studie nejenom znehodnocuje, ale může navíc vést i k pozvolnému „optickému klamu“, jehož výsledkem je pozitivnější hodnocení věrohodnosti sporné hypotézy, než si tato ve skutečnosti zaslouží. Na konci takového nenápadného procesu mohou být dokonce studie, které původně předloženou hypotézu považují již za prokázanou skutečnost a používat ji jako pevný axiom. O to cennější je v jakémkoli stadiu tohoto mnohdy téměř neviditelného šílivého procesu kritické zamyšlení se nad podstatou vstupní hypotézy a stejně tak i kritické vyhodnocení prací, které ji ověřují.

Autor článku provedl obojí a zaslouží si proto naše uznání. Jeho metaanalýza je jen dalším důkazem nezbytnosti zdravé vědecké skepse při přijímání výsledků vědeckých studií byt i renomovaných výzkumných pracovišť, publikovaných v prestižních odborných časopisech.

doc. MUDr. Petr Smolík, CSc.  
Psychiatrická klinika LF UK a FN  
500 05 Hradec Králové  
fax: +420 495 511 677, e-mail: smolikip@lfhk.cuni.cz

### Serinové proteázy a epidermální bariéra

Krátkodobý vzestup pH ve stratum corneum (SC) je spojen s malými změnami homeostázy v permeabilní epidermální bariéře a změnou koheze/integrity v SC. Protože prodloužená neutralizace SC lépe odráží klinickou situaci (neonatální kůže, profesionální dermatitidy) byla v pokusu aplikována dlohodobě 1,1,3,3-tetrametyl-guanidine superbáze k provokaci hlubších změn ve funkci SC. Neutralizace SC změnila nejen kinetiku obno-

vení bariéry, ale také její bazální funkce. Tyto abnormality souvisely s poklesem  $\beta$ -glucoce-rebrosidázy ( $\beta$ -GlcCer'ase) a s katalyickou aktivitou kyselých sphingomyelinázy (aSMase) a enzymatickou degradací, následující po obnovené aktivitě serinové proteázy, jak byla navozena změnou pH. Význam serinové proteázy byl potvrzen normalizací enzymové aktivity, resp. obsahu při aplikaci proteázových inhibitorů. Prodloužení neutralizace vyvolává ve funkci rohové vrstvy závažné abnormality ve vztahu k aktivitě serinové proteázy, jež jsou navozeny vyšším pH a naopak

vzhledem k indukci enzymů, které degradují lipidy a CD proteiny.

#### Literatura:

**Hachem, J.-P. et al.:** Sustained Serine Proteases Activity by Prolonged Increase in pH Leads to Degradation of Lipid Processing Enzymes and Profound Alterations of Barrier Function and Stratum Corneum Integrity. *J. Inv. Dermatol.*, 2005, doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23838.x.

P. Barták

PŮVODNÍ PRÁCE

## Analýza HLA-DPB1 genu u transplantací hematopoetických kmenových buněk

Vraná M., Dobrovolná M., Cetkovský P., Nazarová S., Vondráčková H.,  
<sup>1</sup>Sedláček P.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

<sup>1</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FNM, Praha

### ABSTRAKT

**Východisko.** Ke genům HLA II. třídy, které ovlivňují transplantaci hematopoetických kmenových buněk, patří pravděpodobně i HLA-DPB1. Cílem studie bylo analyzovat HLA-DPB1 gen a jeho shody/neshody u pacientů transplantovaných od nepříbuzných dárců HSC. Byla použita metoda PCR-SSP.

**Metody a výsledky.** Celkově bylo hodnoceno 201 dvojic pacientů a jejich nepříbuzných dárců HSC. Shoda v lokusech HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 a -DQB1 (tedy 10/10) byla nalezena u 81 dvojic. U takto shodných dvojic byla provedena genotypizace HLA-DPB1. Celkově bylo v souboru nalezeno 18 různých HLA-DPB1 alel. Z celkového souboru 201 párů byla kompletní shoda 12/12 nalezena pouze u 3 %.

**Závěry.** Vzhledem k vysokému stupni neshod a malé dostupnosti předchozích výsledků HLA-DPB1 typizací by snaha o dosažení shody 12/12 výrazně snížila pravděpodobnost nalezení vhodného dárce.

**Klíčová slova:** transplantace hematopoetických kmenových buněk, hlavní histokompatibilní systém, genotypizace alel HLA I. třídy a HLA II. třídy, lokus, polymorfismus, haplotyp.

### ABSTRACT

*Vraná M., Dobrovolná M., Cetkovský P. et al.: HLA-DPB1 Gene Analysis in Haematopoietic Stem Cell Transplantations*

**Background.** The HLA-DPB1 gene is probably one of HLA class II genes affecting the haematopoietic stem cell transplantation. The aim of the study was to analyse the HLA-DPB1 gene and its match/mismatch in patients transplanted from unrelated HSC donors. The PCR-SSP method was used for the typing of the HLA system.

**Methods and Results.** The cohort consisted of 201 pairs of patient/unrelated HSC donor. Match in HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 and -DQB1 (e.g. 10/10 match) was found in 81 pairs. The HLA-DPB1 was tested in them. 18 different HLA-DPB1 alleles were identified in this cohort. Complete match (e.g. 12/12) was detected in 3% of the 201 analysed pairs only.

**Conclusions.** The probability of finding 12/12 matching unrelated HSC donor is limited due to the high percentage of mismatches and inaccessibility of previous HLA-DPB1 results.

**Key words:** haematopoietic stem cell transplantation, major histocompatibility system, HLA class I and HLA class II genotyping, locus, polymorphism, haplotype. Vr.

Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 126–129.

Geny hlavního histokompatibilního systému člověka (HLA – human leukocyte antigens) jsou lokalizovány na krátkém raménku 6. chromozómu (6.p21) a tento systém zaujímá přibližně jednu tisícinu lidského genomu. HLA systém je nejvíce polymorfni oblastí lidského genomu. V současnosti je popsáno více než 2000 alel (1). Dědičnost HLA je autozomálně dominantní. Vzhledem k lokalizaci v jedné oblasti genomu jsou HLA geny většinou děděny jako celek, tedy každý jedinec dědí po jednom haplotypu od každého z rodičů. Rekombinace jsou udávány přibližně v 1 % případech.

Shoda mezi pacientem a dárcem v HLA systému má klíčovou roli v úspěchu transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT). Obecně je za nejdůležitější považována shoda v genech HLA I. třídy v lokusech HLA-A, -B a v genech HLA II. třídy v lokusu HLA-DRB1. Za další významné geny ovlivňující potransplantační průběh jsou považovány HLA-Cw (I. třída) a HLA-DQB1 (II. třída). V těchto pěti lokusech je vzhledem k počtu známých alel teoreticky možných cca  $29 \times 10^9$  vzájemných kombinací,

ale v různých populacích se zastoupení jednotlivých alel i haplotypů liší (2, 3).

Ke genům HLA II. třídy, které ovlivňují HSCT, patří pravděpodobně i HLA-DPB1 (4). V recentních studiích, kde byly použity soubory pacientů typizovaných na úrovni alel ve všech studovaných lokusech, je většinou prokázán vliv neshod HLA-DPB1 na GvHD (graft versus host disease) a přežití po transplantaci (5–7). Nejnovější studie (8) uvádí vliv inkompatibilit v HLA-DPB1 na zvýšení rizika GvHD, ale současně na snížení rizika relapsu hematologických onemocnění u T-depletovaných štěpů od nepříbuzných dárců.

Mezi jednotlivými alelami lokusů HLA I. i II. třídy existuje vazebná nerovnováha, která je zvláště silná mezi lokusy HLA-DRB1 a HLA-DQB1. Mezi HLA-DRB1/DQB1 a HLA-DPB1 tato vazba nalezena nebyla. Mezi HLA-DQB1 a HLA-DPB1 jsou známa tři rekombinační místa, a to mezi geny HLA-DNA a RING3, DQB3 a DQB1 a uvnitř TAP2 (9). Retrospektivní studie párů pa-

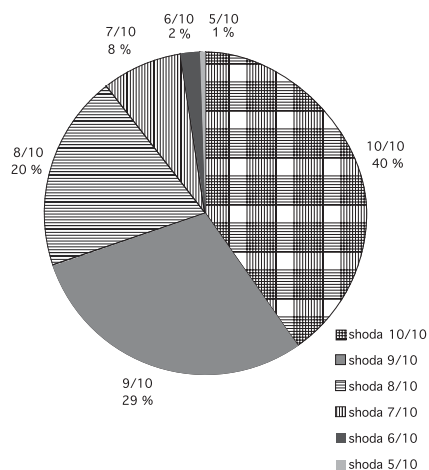
ing. Milena Vraná  
 128 20 Praha 2, U Nemocnice 1  
 fax: +420 221 977 371, e-mail: milena.vrana@uhkt.cz

cient/nepříbuzný dárce, původně deklarovaných jako shodných ve II. třídě HLA, udávají neshodu v lokuse HLA-DPB1 cca v 75 % případů (6–8).

### CHARAKTERISTIKA HLA-DPB1 GENU

HLA-DP je klasický glykoprotein HLA II. třídy, složený z řetězců alfa (kódovaný HLA-DPA1 genem) a beta (kódovaný

HLA-DPB1 genem). V současnosti je známo 119 alel HLA-DPB1 kódujících 106 různých proteinových řetězců a 23 alel HLA-DPA1 kódujících 14 různých proteinových řetězců (1). Vliv inkompatibilit HLA-DPA1 na potransplantační průběh nebyl prokázán. Alely tohoto lokusu jsou v silné genetické vazbě s HLA-DPB1. Při neshodě v HLA-DPA1 je většinou i neshoda i v HLA-DPB1 (6, 10, 11). Proto byl pro testování vybrán pouze více polymorfní HLA-DPB1 gen.



Graf 1. Rozdělení souboru podle stupně shody v lokusech HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 a -DQB1

### CÍL STUDIE

Cílem studie bylo zjistit, jaké alely HLA-DPB1 genu se vyskytují u českých pacientů, kterým byly transplantovány hematopoetické kmenové buňky od nepříbuzných dárců. Zároveň jsme sledovali výskyt jednotlivých HLA-DPB1 alel u nepříbuzných dárců HSC a vzájemnou shodu mezi dárce a pacientem v tomto lokusu. Naší snahou bylo stanovit, zda je reálné hledat pro pacienty indikované k nepříbuzenské transplantaci hematopoetických kmenových buněk dárce shodné nejen v HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 a -DQB1 jako dosud, ale i se shodou v alelách HLA-DPB1 lokusu.

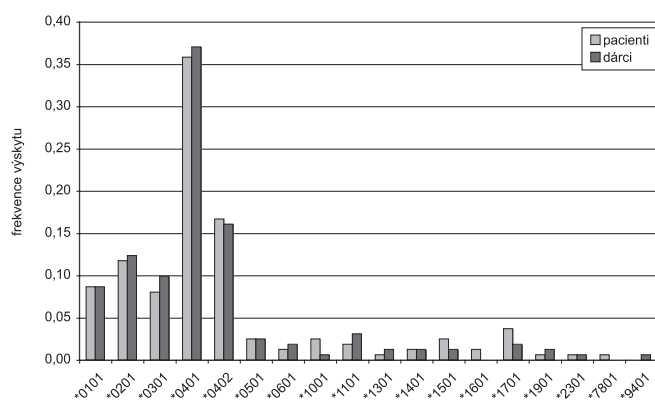
### SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODY

Izolace DNA z periferní krve pacientů a nepříbuzných dárců byla provedena modifikovanou metodou dle Millera (12).

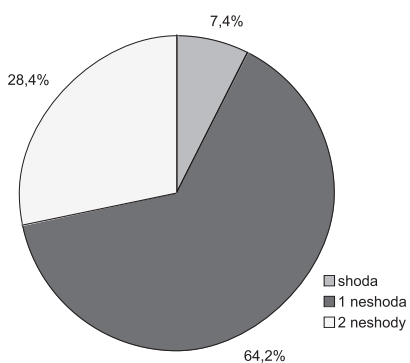
Pro typizaci HLA systému byly použity kity firmy GenoVision založené na metodě řetězové polymerázové reakce se sekvenčně specifickými prime-

Tab. 1. Výsledky testování HLA-DPB1 lokusu

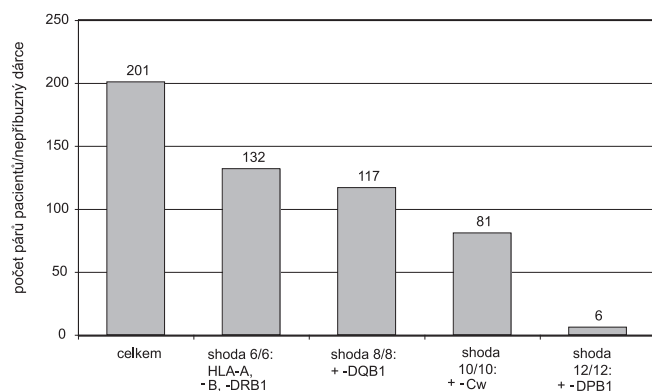
Alela	celkový počet (pacienti/dárci)	z toho homozygoti (pacienti/dárci)	výskyt (pacienti/dárci)**
<b>*0101</b>	27 (14/13)	1 (0/1)	8,6%
*0101 MR*	1 (0/1)	0	
<b>*0201</b>	35 (17/18)	1 (1/0)	12,0%
*0201 MR*	4 (2/2)	0	(11,7 / 12,3)
<b>*0301</b>	21 (10/11)	0	9,0%
*0301 MR*	8 (3/5)	0	
<b>*0401</b>	102 (51/51)	20 (10/10)	36,4%
*0401 MR*	16 (7/9)	1 (0/1)	(35,8 / 37,0)
<b>*0402</b>	42 (23/19)	5 (3/2)	16,4%
*0402 MR*	11 (4/7)	2 (1/1)	(16,7 / 16,0)
<b>*0501</b>	7 (4/3)	0	2,5%
*0501 MR*	1 (0/1)	0	
<b>*0601</b>	5 (2/3)	0	1,5%
<b>*1001</b>	5 (4/1)	0	1,5%
<b>*1101</b>	8 (3/5)	0	2,5%
<b>*1301</b>	3 (1/2)	0	0,9%
<b>*1401</b>	4 (2/2)	0	1,2%
<b>*1501</b>	6 (4/2)	1 (1/0)	1,9%
<b>*1601</b>	2 (2/0)	0	0,6%
<b>*1701</b>	9 (6/3)	0	2,8%
<b>*1901</b>	2 (0/2)	0	0,9%
*1901 MR*	1 (1/0)	0	
<b>*2301</b>	1 (1/0)	0	0,6%
*2301 MR*	1 (0/1)	0	
<b>*7801</b>	1 (1/0)	0	0,3%
<b>*9401</b>	1 (0/1)	0	0,3%
<b>celkem</b>	<b>324 (162/162)</b>	<b>31 (16/15)</b>	



Graf 2. Frekvence výskytu HLA-DRB1 alel v testovaném souboru



Graf 3. Rozdělení souboru se shodou 10/10 podle stupně shody v HLA-DRB1 lokusu



Graf 4. Rozdělení shody podle počtu sledovaných lokusů

ry (PCR-SSP). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwaru SCORE™, který je pravidelně doplňován v návaznosti na mezinárodní databázi sekvencí HLA alel IMGT/HLA databáze (1).

Pro upřesnění výsledků PCR-SSP v lokusech HLA-A, -B a -Cw byla použita metoda přímého sekvenování (SBT) s komerčně vyráběnými kity firmy Abbott na sekvenátoru ABI 310 a MEGABACE™. Elektrofogramy a identifikace alel byly hodnoceny pomocí softwaru MatchMaker™ a Assign™.

#### Testovaný soubor

Celkově bylo hodnoceno 201 dvojic pacientů a jejich nepřibuzných dárců HSC, z toho 123 dospělých transplantovaných v ÚHKT a 78 dětí transplantovaných v KDHO Motol.

U celého souboru byla v rámci předtransplantačního vyhledání vhodného dárce HSC provedena genotypizace na úrovni určení alel (high, případně medium resolution) v lokusech HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 a -DQB1. Po vzájemném porovnání výsledků genotypu pacienta a jeho dárce byl stanoven stupeň vzájemné shody. Maximální možný stupeň shody v obou alelách všech pěti testovaných lokusů byl označen 10/10.

U 81 dvojice s kompletní shodou mezi pacientem a jeho dárce v HLA-

A, -B, -Cw, -DRB1 a -DQB1 (tedy 10/10) byla provedena genotypizace HLA-DPB1 lokusu metodou PCR-SSP (viz výše) stejným postupem jako u ostatních testovaných lokusů. V této části souboru bylo 31 dárců z českých registrů, 38 z ostatních evropských a 12 z amerických registrů, převážně z USA. U testovaných dárců nebyla předem známá typizace HLA-DPB1 lokusu.

Shoda v HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, -DQB1 i v HLA-DPB1 byla označena 12/12.

## VÝSLEDKY

Rozdělení souboru podle počtu nalezených neshod je uvedeno v grafu 1. Z celkového počtu 201 testovaných dvojic byla kompletní shoda 10/10 nalezena v 40,9 % případů, tedy u 81 dvojice, kde byl dále testován HLA-DPB1 lokus (tab. 1). U těchto 162 jedinců použitá metoda umožnila jednoznačnou identifikaci HLA-DPB1 alely v 87,7 % případů z 324 výsledků (dvě alely u každého testovaného jedince). V této skupině bylo 28 homozygotních jedinců. Výsledek na úrovni medium resolution (tedy dvě a více možností) byl ve zbylých 43 případech, třikrát v homozygotním stavu.

Celkově bylo nalezeno pouze 18 různých HLA-DPB1 alel ze 119 v současnosti známých (1). Nami nalezené populační frekvence alel uvádí graf 2. Ten je rozdělen na pacienty (černé sloupce) a dárcy (bílé sloupce). V obou skupinách byla nejvíce zastoupena alela HLA-DPB1\*0401 s populační frekvencí více než 36 % v celkovém souboru (35,8 % u pacientů a 37,0 % u dárců (tab. 1), z toho u 21 osob (13,0 % z celkově testovaných 162 jedinců) v homozygotním stavu a u 16 výsledků medium resolution (tj. 37,2 % ze 43 výsledků medium resolution) (tab. 1). Další alely nalezené s frekvencí větší než 10 % byly HLA-DPB1\*0201 a \*0402. Nejvyšší frekvence výskytu alel HLA-DPB1\*0201, \*0401 a \*0402 je v souladu s dříve publikovanými studii provedenými na české (13, 14) a slovenské (15) populaci zdravých jedinců. Zastoupení nalezených alel se u pacientů výrazně nelišilo od dárců.

Graf 3 znázorňuje rozdělení souboru se shodou 10/10 podle nalezené shody/neshody v HLA-DPB1 lokusu. Pouze 7,4 % ze všech testovaných dvojic bylo shodných. Více než polovina párů (64,2 %) měla rozdíl v jedné alele a u zbylých 28,4 % byla nalezena neshoda v obou alelách tohoto lokusu.

Za lokusy, které nejvíce ovlivňují HSCT, jsou obecně považovány HLA-A, -B a -DRB1. Proto je v mezinárodních registrech nepřibuzných dárců nejčastěji dostupná typizace dárců v těchto lokusech a podle nich jsou i dárci vybíráni. V grafu 4 je uvedeno rozdělení souboru podle nalezené shody v jednotlivých lokusech a ukazují postupně se snižující procento shody při přidání dalšího testovaného lokusu. Rozdílné snížení počtu nalezených shodných dárců pro různé lokusy HLA je způsobeno různou silnou vzájemnou vazebnou nerovnováhou těchto lokusů.

## DISKUZE

Jak vyplývá i z této studie, snaha o maximalizaci HLA shody mezi pacientem a jeho dárce HSC vede k výraznému snížení pravděpodobnosti nalezení vhodného dárce. Toto snížení je zvláště výrazné u HLA-DPB1 díky slabé vazebné nerovnováze mezi tímto lokusem a ostatními lokusy HLA II. třídy. (Z celkového počtu 201 párů byla kompletní shoda 12/12 nalezena pouze u šesti párů, tedy ve 3 % případů.) Vyžadování kompletní shody tedy není účelné, je třeba změnit přístup směrem k hledávání tolerovatelných neshod. Definování permisivních neshod zatím není uspokojivě dořešeno, neboť je spojeno s mnoha obtížemi. Velkým problémem je polymorfnost HLA, a tedy velká heterogenita neshod mezi pacientem a dárce. Posouzení vlivu konkrétní neshody je třeba sledovat na



pozadí kompletní shody v ostatních lokusech. Pro komplexní zhodnocení je nutné zohlednit i non-HLA vlivy na GvHD a mortalitu-morbiditu (přípravný režim, CMV sérologie dárce, věk dárce, pohlaví dárce, počet gravidit dárce, prevence GvHD, druh štěpu atd.).

K vyjasnění problému tolerovatelných neshod HLA systému by měla přispět mezinárodní studie IHWG, která v projektu Hematopoietic Cell Transplantation shromažďuje v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information) data ze všech světových pracovišť (16).

### ZÁVĚR

Vzhledem k vysokému stupni neshod v HLA-DPB1 lokusu a malé dostupnosti předchozích výsledků HLA-DPB1 typizací by snaha o nalezení shody 12/12 výrazně snížila pravděpodobnost nalezení vhodného dárce. Do doby konečného zhodnocení vlivu konkrétních neshod v HLA-DPB1 je možné tento požadavek uplatňovat pouze tam, kde jsou předem z registru dostupná data o typizaci v tomto lokusu.

#### Zkratky

GvHD	– nemoc štěpu proti hostiteli (graft versus host disease)
HLA	– hlavní histokompatibilní systém člověka (human leukocyte antigens)
HSC	– hematopoetické kmenové buňky (hematopoietic stem cells)
HSCT	– transplantace hematopoetických kmenových buněk (hematopoietic stem cell transplantation)
PCR-SSP	– polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery (polymerase chain reaction with sequence specific primers)
SBT	– metoda přímého sekvenování (sequencing-based typing)

### LITERATURA

1. **Robinson, J., Waller, M. J., Parham, P. et al.:** IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31, s. 311-314.
2. **Terasaki, P. I., Gjertson, D. W. (eds.):** HLA 1997. USA. UCLA Tissue Typing Laboratory, 1997, s. 171-460.

3. **Terasaki, P. I., Gjertson, D. W. (eds.):** HLA1998. USA. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 1998, s. 103-450.
4. **Petersdorf, E. W., Kollman, C., Hurley, C. H. et al.:** Effect of HLA class II gene disparity on clinical outcome in unrelated donor hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukaemia: the US National Marrow Donor Program Experience. *Blood*, 2001, 10, s. 2922-2929.
5. **Loiseau, P., Espérou, H., Busson, M. et al.:** Unrelated donor transplants DPB1 disparities contribute to severe GVHD and reduce patient survival after unrelated donor bone marrow transplantation. *BMT*, 2002, 30, s. 497-502.
6. **Varney, M. D., Lester, S., McCluskey, J. et al.:** Matching for HLA DPA1 and DPB1 in Unrelated Bone Marrow Transplantation. *Human Immunology*, 1999, 60, s. 532-538.
7. **Petersdorf, E. W., Gooley, T., Malkki, M. et al.:** The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *Br. J. Haematol.*, 2001, 112, s. 988-994.
8. **Shaw, B. E., Potter, M. N., Mayor, N. P. et al.:** The degree of matching at HLA-DPB1 predicts for acute graft-versus-host disease and disease relapse following haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2003, 31, s. 1001-1008.
9. **Cullen, M., Noble, J., Erlich, H. et al.:** Characterisation of Recombination in the HLA class II Region. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, 60, s. 397-407.
10. **Tongio, M. M. et al.:** ASH#18: HLA-DPA1-DPB1. In: *Genetic Diversity of HLA. Functional and Medical implications*. Ed. Charron, D. Publ: EDK, France, 1997, s. 134.
11. **Al Dacak, R. et al.:** Gene polymorphism of HLA-DPB1 and -DPA1 loci in Caucasoid population: frequencies and DPB1-DPA1 association. *Human Immunology*, 1991, 31, s. 277-285.
12. **Loudová, M., Brdička, R.:** Získávání DNA – rychle, kvalitně, ekologicky, FONS, červenec 1993, s. 44.
13. **Loudová, M., Šrámková, I., Cukrová, V. et al.:** Population frequencies of HLA-DRB1, -DQB1 and -DPB1 alleles in Czech population. *Folia Biologica*, 1999, 45, s. 27-30.
14. **Loudová, M., Šrámková, I., Brdička, R.:** Caucasian Czech Normal. In: *HLA1998*. Eds. Terasaki, P.I., Gjertson, D.W. USA. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 1998, s. 128.
15. **Cechová, E., Fazekasová, H., Ferenčík, S., Buc, M.:** HLA-DRB1, -DQB1 and -DPB1 polymorphism in the Slovak population. *Tissue Antigens*, 1998, 51, s. 574-576.
16. **Wheeler, D. L. et al.:** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33 (Database issue), s. 39-45.

*Studie byla podpořena grantem IGA MZ, No. NR/7984-3.*

PŮVODNÍ PRÁCE

## Prenatální diagnostika tuberózní sklerózy založená na znalosti kauzální mutace

Vrtěl R., Vodička R., Šantavá A., Šantavý J., Krejčíříková E.  
*Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny FN a UP, Olomouc*

### ABSTRAKT

**Východisko.** Tuberózní skleróza je autozomálně dominantní onemocnění charakterizované tvorbou novotvarů – hamartomů v různých orgánových systémech. Příčinou je mutace jednoho ze dvou tumor supresorových genů TSC1 nebo TSC2. Odhalování kauzálních mutací je vzhledem k jejich náhodné distribuci velmi náročné.

**Metody a výsledky.** Práce referuje o provedení první prenatální diagnostiky tuberózní sklerózy v České republice založené na znalosti příčinné mutace. U těhotné ženy z rodiny s mutací Q435X byla provedena ve 13. týdnu gravidity denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) vzorku fetální DNA.

**Závěry.** Vyšetření vyloučilo přítomnost sledované poruchy TSC1 genu u potomka.

**Klíčová slova:** tuberózní skleróza, prenatální diagnostika, denaturační gradientová gelová elektroforéza.

### ABSTRACT

*Vrtěl R., Vodička R., Šantavá A. et al.: Prenatal Diagnostics of Tuberous Sclerosis Based on Causal Mutation Knowledge*

**Background.** Tuberous sclerosis is an autosomal-dominant disease characterised by development of benign growth - hamartomas in different organs. Disorder is caused by mutations affecting either of the tumor-suppressor genes, TSC1 or TSC2. Quest for causing mutations is very difficult due to their random distribution over the genes.

**Methods and Results.** Article refers on accomplishment of the first tuberous sclerosis prenatal diagnostics in Czech Republic based on knowledge of causing mutation. Foetal DNA sample, obtained in 13th week from Q435X family pregnant woman, was analyzed by DGGE method.

**Conclusions.** Examination excluded presence of tested TSC1 gene defect in an offspring.

**Key words:** tuberous sclerosis, prenatal diagnostics, DGGE.

Vr:

*Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 130–132.*

Tuberózní skleróza (TSC) je autozomálně dominantní dědičné onemocnění charakterizované vznikem benigních novotvarů (hamartomů) postihujících kůži, mozek, srdce, ledviny a další orgány. Závažnými projevy mohou být epizody tonicko-klonických křečí, mentální retardace, funkční poškození orgánů a náhlé masivní krvácení z abnormálně vaskularizovaných hamartomů (1). Onemocnění je klinicky extrémně variabilní nejen mezi jednotlivými TSC rodinami, ale i mezi sledovanými pacienty téže rodiny (2, 3). Klasická klinická triáda: epizody tonicko-klonických křečí, mentální retardace a faciální angiofibromy se vyskytuje jen asi u třetiny pacientů. Frekvence TSC je nyní uváděna pro celkovou populaci až 1:10000 a odhadovaná incidence u novorozenců může být až 1:6000. Přibližně u dvou třetin se jedná o tzv. sporadické případy, které vznikají v důsledku nových dominantních mutací (4). Za vznik onemocnění je zodpovědná porucha jednoho ze dvou specifických tumor supresorových genů (5, 6). TSC1 gen, lokalizovaný na chromozómu 9q34, kóduje protein hamartin a TSC2 gen, lokalizovaný na chromozómu 16p13, kóduje protein tuberin. Oba proteiny modulují buněčnou proliferaci, diferenciaci a intracelulární signalizaci (7, 8). Mezi těmito proteiny existuje vzájemná interakce, což je v souladu s prakticky shodným spektrem symptomů v rodinách s TSC1 a TSC2 germinálními mutacemi (9–13). U genu TSC2, který má 41 exonů na přibližně 45 kb genomické DNA, byly popsány jak bodové mutace nesmyslné i záměno-

vé, tak rozsáhlé delece, inserce a přestavby. TSC1 gen zaujímá v genomické DNA rovněž přibližně 45 kb. V jeho 21 kódujících exonech jsou příčinnými mutacemi nejčastěji drobné mutace vedoucí ke zkrácení kódovaného proteinu. Žádná z kódujících oblastí zodpovědných genů neobsahuje „horké místo“ s četnějším výskytem mutací.

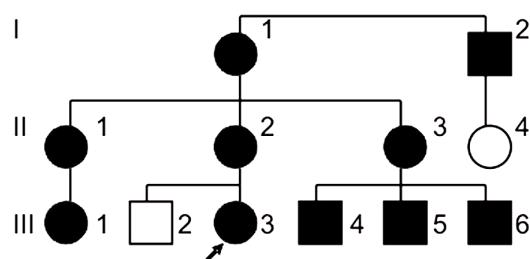
Na našem pracovišti je již třetím rokem zavedeno rutinní vyšetřování TSC1 genu, u něhož většina příčinných poruch patří do skupiny bodových mutací. V případě TSC2 genu je situace komplikovanější, neboť spektrum kauzálních mutací je širší (od bodových mutací až pro rozsáhlé delece a chromozomální přestavby).

Původní skřínková metoda – SSCP, používaná k vyhledávání neznámých mutací, měla relativně nízkou účinnost pohybující se mezi 50 až 80 % (14). Na podkladě zkušeností spolupracujícího pracoviště na Erasmově univerzitě v Rotterdamu byla původní SSCP metoda nahrazena denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (DGGE), která by měla mít záchytnost vyšší.

### PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA TUBERÓZNÍ SKLERÓZY

Prenatální diagnostika může být částečně založená na detailní fetální ultrasonografii. Fetální echokardiografií byly detekovány

rhabdomyomy v srdečním svalu již ve 22. týdnu (15) a tumor centrální nervové soustavy (CNS) byl odhalen u plodu ve 25. týdnu (16). Navrhované fetální vyšetření nukleární magnetickou rezonancí (NMR), po premedikaci redukující pohyby plodu, může detekovat typické mozkové léze u významného počtu případů (17). Ovšem tyto studie byly prováděny ve 30. až 34. týdnu těhotenství. Využití informace o závažném zdravotním stavu plodu v pokročilém stadiu gravidity je však již značně problematické. DNA analýza je pro prenatalní diagnostiku použitelná pouze v rodinách s vícečetným výskytem s prokázanou vazbou na jeden ze zodpovědných genů, nebo v případech, kde v dané rodině již byla odhalena kauzální mutace.



Obr. 1. Výskyt mutace Q435X v rodokmenu

Tab. 1. Klinická data zjištěná u probandky (III/3), její matky (II/2) a babičky (I/1) – nositelky mutace Q435X

	Pacientka I/1	pacientka II/2	pacientka III/3
kůže			
faciální angiofibromy	+	+	+
ungvální fibromy	+	+	+
fibrózní plaky čela	+	+	+
hypomelanotické skvrny	+	+	+
šagrenové skvrny	+	0	+
CNS			
drobné kalcifikace	n	n	n
subependymální noduly	n	n	n
hamartomy	n	n	n
sítnice			
depigmentace	n	0	0
fakomy	n	0	0
srdce			
rhabdomyomy	n	n	n
ledviny			
angiomyolipomy	+ krvácení	0	0
cysty	+	+ selhání, transplantace	0
pľíce			
lymphangioliomyomy	n	n	n
ústa			
gingivální fibromy	0	0	+
mnohočetné dentální jamky	0	0	0
epilepsie	0	0	motorické záškuby
mentální retardace	0	0	0

+ – přítomen, 0 – nepřítomen, n – nevyšetřováno

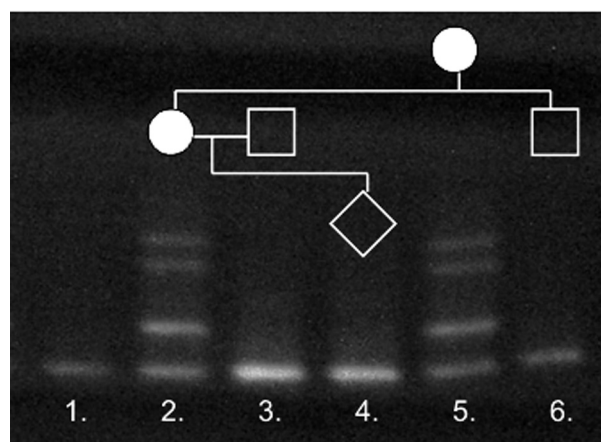
### SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODY

Jedná se o třetí rodinu, u níž byla provedena prenatalní diagnostika TSC v České republice a vůbec první založená na přímé detekci bodové mutace. V předchozích případech se jednalo o vyloučení rozsáhlé delece TSC2 genu a využití DNA markerů při vazebné analýze pacientů s TSC1 mutací. V námi referovaném případě s provedenou cílenou prenatalní diagnostikou šlo o rodinu, o které bylo pojednáno v Časopisu lékařů českých v roce 2000 (3). U probandky byla tehdy jednočetným konformačním polymorfismem (SSCP) odhalena změna ve 13. exonu TSC1 genu a sekvenací byla zjištěna mutace Q435X. Metodou hybridizace s alelově specifickými oligonukleotidy (ASO) byla později odhalena u 10 osob (obr. 1). V této rodině byla pozorována extrémní variabilita klinických příznaků u jednotlivých nositelů mutace, kde tatáž kauzální mutace je ve svém fenotypovém projevu patrně ovlivňována genovým pozadím v jejich genomech. Klinická data zjištěná u probandky (III/3), její matky (II/2) a babičky (I/1) jsou uvedena v tabulce 1.

Pacientka III/3 se obrátila na naše oddělení se žádostí o provedení prenatalní diagnostiky. Ve 13. týdnu gravidity byl u ní odebrán vzorek choriových klků.

### VÝSLEDKY

Metodou DGGE byla vyšetřena DNA 13. exonu TSC1 genu u těhotné, jejího partnera, postižené matky, zdravého bratra a plodu (obr. 2). Vyšetření jednoznačně prokázalo přítomnost aberantního vzorku u obou nosiček mutace a nepřítomnost této změny v DNA plodu.



Obr. 2. DGGE prenatalní diagnostika mutace Q435X  
1. zdravá kontrola, 2. těhotná probandka (osoba III/3), 3. probandčín partner, 4. plod, 5. probandčína matka (osoba II/2), 6. probandčín zdravý bratr

### ZÁVĚR

Jestliže je u probanda odhalena kauzální mutace, je možno v případě plánu gravidity nabídnout včasnou prenatalní diagnostiku již v 11. až 13. týdnu gravidity na podkladě DNA analýzy ze vzorku choriové tkáně. Toto vyšetření je možno provést velmi

rychle (během několika dnů). Naopak prenatální diagnostika není reálná v případě, kdy je kauzální mutace neznámá a ani vazebnou analýzou nelze určit, který z chromozómů je za onemocnění zodpovědný.

Možnost řešení takovýchto případů využitím odhalené ztráty heterozygosity markerů (LOH) v hamartomu probanda pro účely prenatální diagnostiky jsme již diskutovali na stránkách Časopisu lékařů českých dříve (18).

#### Zkratky

- ASO – alelově specifické oligonukleotidy
- CNS – centrální nervová soustava
- DGGE – denaturační gradientová gelová elektroforéza
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- LOH – ztráta heterozygosity (loss of heterozygosity)
- NMR – nukleární magnetická rezonance
- SSCP – jednořetězcový konformační polymorfismus
- STR – krátké tandemové repetice (short tandem repeats)
- TSC – komplex tuberózní sklerózy

### LITERATURA

1. **Roach, E. S., Gomez, M. R., Northrup, H.:** Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria. *J. Child. Neurol.*, 1998, 13, s. 624-628.
2. **Verhoef, S., Vrtěl, R., van Essen, T. et al.:** Somatic mosaicism and clinical variation in tuberous sclerosis complex. *Lancet*, 1995, 345, s. 202.
3. **Vrtěl, R., Šantavá, A., Šantavý, J. et al.:** DNA diagnostika u českých pacientů s tuberózní sklerózou. *Čas. Lék. čes.*, 2000, 139, s. 203-207.
4. **Osborne, J.C.P., Fryer, A., Webb, D.:** Epidemiology of tuberous sclerosis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1991, 615, s. 125-127.
5. **Carbonara, C., Longa, L., Grosso, E. et al.:** 9q34 loss of heterozygosity in a tuberous sclerosis astrocytoma suggests a growth suppressor-like activity also for the TSC1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, 1994, 3, s. 1829-1832.
6. **Henske, E. P., Neumann, H. P., Scheithauer, B. W. et al.:** Loss of heterozygosity in the tuberous sclerosis (TSC2) region of chromosome band 16p13 occurs in sporadic as well as TSC-associated renal angiomyolipomas. *Genes Chromosomes Cancer.*, 1995, 13, s. 295-298.
7. **van Slegtenhorst, M., Neklást, M., Nagelkerken, B. et al.:** Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum. Mol. Genet.*, 1998, 7, s. 1053-1057.
8. **Plank, T. L., Yeung, R. S., Henske, E. P.:** Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer Res.*, 1998, 58, s. 4766-4770.
9. The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium: Identification and Characterization of the Tuberous Sclerosis Gene on Chromosome 16. *Cell*, 1993, 75, s. 1305-1315.
10. **Green, A. J., Smith, M., Yates, J. R. W.:** Loss of heterozygosity on chromosome 16p13.3 in hamartomas from tuberous sclerosis patients. *Nature Genet.*, 1994, 6, s. 193-196.
11. **van Slegtenhorst, M., de Hoogt, R., Hermans, C. et al.:** Identification of the Tuberous Sclerosis Gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science*, 1997, 277, s. 805-808.
12. **Nellist, M., van Slegtenhorst, M., Goedbloed, M. A. et al.:** Characterization of the cytosolic tuberin-hamartin complex: tuberin is a cytosolic chaperone for hamartin. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, s. 35647 až 35652.
13. **Nellist, M., Goedbloed, M. A., de Winter, C. et al.:** Identification and characterization of the interaction between tuberin and 14-3-3zeta. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, s. 39417-39424.
14. **Ali, J. B. M., Sepp, T., Ward, S. et al.:** Mutations in the TSC1 gene account for a minority of patients with tuberous sclerosis. *Journal of Medical Genetics*, 1998, 35, s. 969-972.
15. **Reece, E. A., Gimovsky, M. L., Petrie, R. H.:** Tuberous sclerosis in pregnancy. *J. Obstet. Gynecol.*, 1981, 141, s. 467-468.
16. **Muller, L., de Jong, G., Falck, V.:** Antenatal ultrasonographic findings in tuberous sclerosis: report of 2 cases. *South. Afr. Med. J.*, 1986, 69, s. 633-638.
17. **Werner, H. Jr., Mirlesse, V., Jacquemard, F.:** Prenatal diagnosis of tuberous sclerosis: use of magnetic resonance imaging and its implications for prognosis. *Prenatal Diagn.*, 1994, 14, s. 1151-1154.
18. **Vrtěl, R., Vodička, R., Šantavá, A. et al.:** Angiomyolipomy – přínos jejich vyšetření v prenatální diagnostice tuberózní sklerózy. *Čas. Lék. čes.*, 2004, 143, s. 195-197.

#### Zavoral, M. et al.: KARCINOM PANKREATU

*Praha, Galén a Karolinum 2005, 287 s. Vydání první, formát 298x195 mm, vázané, černobílé i barevné obrázky, cena 900 Kč. ISBN 80-7262-348-6 (Galén) a 80-246-1083-3 (Karolinum).*

Toto téma bylo tématem habilitační práce doc. MUDr. Miroslava Zavorala, Ph.D. Nyní se k němu po třech letech znovu vrací, zpracovává je ale daleko šířeji, podrobněji a vydává jako monografii. Ta nepochybně obohatí gastroenterologickou i onkologickou literaturu o již dlouho nezpracované téma. A je nutné hned dodat, že o téma závažné. Je, bohužel, klinickou zkušeností, že přes všechny pokroky v diagnostice i léčbě, zůstává karcinom pankreatu jedním z nejzávažnějších nádorových onemocnění především pro jeho nepříznivou prognózu i při časné diagnostice. Proto také ve všech rozvinutých zemích narůstá jeho incidence a neklesá letalita.

### KNIHY

Doc. MUDr. M. Zavoral si přizval k spolupráci dalších 17 spolupracovníků. Jsou mezi nimi genetikové, biologové, chirurgové, onkologové, pracovníci oddělení zobrazovacích metod i další gastroenterologové. Bylo to nezbytné, protože jen takováto skupina specialistů různých oborů mohla realizovat multidisciplinární koncepci knihy.

Knihy je rozdělena do 11 kapitol. Od epidemiologie a rizikových faktorů (17 s.), přes molekulární genetiku (14 s.), vztah hereditární pankreatitidy a karcinomu pankreatu (14 s.), patologii a morfologickou klasifikaci (32 s.), k pilířovým kapitolám o klinickém obraze, diagnostice (48 s.), zobrazovacích metodách (14 s.), stagingu (5 s. – pro samostatná kapitola ?), ke kapitolám o možnostech terapie (endoskopická, chirurgická, paliativní, celkem 112 s.). Literatura je uváděna vždy za jednotlivými kapitolami, je přiměřeného rozsahu, moderní, (odkazuje na práce s vročením 2003). Soubor zkratk a rejstřík středního rozsahu knihu ukončují. Vlastní text je doplněn 52 tabulkami a ilustrován 134(!)

barevnými obrázky velmi dobré kvality (škoda, že u mikrofotografií MUDr. Evy Honsově není nikde uváděno zvětšení).

Po formální stránce je kniha na výborné úrovni, nakladatelství Galén – Karolinum ji vypravily opravdu velmi pečlivě. Oceňuji mj. naprostou bezchybnost textu a věrnou reprodukci barev.

**Téma knihy nejen že doplňuje řadu onkologických monografií, ale i připomíná naši dlouholetou tradici pankreatologie, kterou téměř před sedmi desítkami let zahájil prof. Karel Herfort, DrSc. a v níž pak pokračoval jeho žák prof. MUDr. Přemysl Fryč, DrSc. Ačkoliv nejsem specializací gastroenterolog, četl jsem v knize s velkým zájmem a v mnohém jsem se poučil.**

**Místo formálního hodnocení si dovoluji napsat, že pan profesor Herfort by z ní měl určitě velkou radost.**

*Jan Petrášek  
128 08 Praha 2, U Nemocnice 1*



PŮVODNÍ PRÁCE

## Analýza volné fetální DNA v maternální plazmě s využitím STR lokusů

Vodička R., Vrtěl R., <sup>1</sup>Procházka M., Šantavá A., <sup>2</sup>Dušek L., Vrbická D., Singh R., Krejčířiková E., Schneiderová E., Šantavý J.

*Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny FN, Olomouc*

<sup>1</sup>*Gynekologicko-porodnická klinika FN, Olomouc*

<sup>2</sup>*Centrum biostatistiky a analýz LF MU, Brno*

### ABSTRAKT

**Východisko.** Problematika rozlišení genotypů matky a plodu v maternální plazmě těhotných žen je v současnosti řešena většinou pomocí real-time systémů. V těchto případech je rozpoznání genotypů možné použitím specifických sond, rozlišující jednotlivé genotypy. Nejčastější možností se nabízí u gonozomálních sekvencí, kdy plod je mužského pohlaví. Tato práce popisuje možnosti detekce a kvantifikace fetální DNA pomocí analýzy STR lokusů.

**Metody a výsledky.** K testování kvantifikačních možností kapilární elektroforézy (KE) byly použity arteficiální směsi genotypů v rozsahu 0,2 % - 100 %, které imitují genotyp matky a plodu. K detekci fetální DNA v maternální plazmě bylo použito 27 vzorků DNA těhotných žen v různém týdnu gravidity (t.g.). Genotyp plodu byl potvrzován genotypizací biologického otce. Detekce byla prováděna v STR lokusech z 21. chromozómu z oblasti zodpovědné za Downův syndrom (DS) metodikou inovované (I)QF PCR, která umožňuje zachytit a kvantifikovat i velmi vzácné mozaiky. Kvantifikace STR lokusů na KE byla posouzena na arteficiálních mozaikách a rozlišitelnost jednotlivých mozaik byla na úrovni několika procent. Fetální DNA byla detekována u 74 % testovaných vzorků.

**Závěry.** Využití IQF PCR ke kvantifikaci a rozlišení maternálního a fetálního genotypu pomocí STR lokusů by mohlo mít význam v neinvazivní prenatalní diagnostice jako další možný marker pro výpočet rizika DS.

**Klíčová slova:** volná fetální DNA, kvantifikace STR, QF PCR.

### ABSTRACT

*Vodička R., Vrtěl R., Procházka M. et al.: Analysis of Free Foetal DNA in Maternal Plasma Using STR Loci*

**Background.** Problems of maternal and foetal genotype differentiation of maternal plasma in pregnant women are solved generally by real-time systems. In this case the specific probes are used to distinguish particular genotype. Mostly gonosomal sequences are utilised to recognise the male foetus. This work describes possibilities in free foetal DNA detection and quantification by STR.

**Methods and Results.** Artificial genotype mixtures ranging from 0,2 % to 100 % to simulate maternal and paternal genotypes and 27 DNA samples from pregnant women in different stage of pregnancy were used for DNA quantification and detection. Foetal genotype was confirmed by biological father genotyping. The detection was performed in STR from 21st chromosome Down syndrome (DS) responsible region by innovated (I) QF PCR which allows to reveal and quantify even very rare DNA mosaics. The STR quantification was assessed in artificial mixtures of genotypes and discriminability of particular genotypes was on the level of few percent. Foetal DNA was detected in 74 % of tested samples.

**Conclusions.** The IQF PCR application in quantification and differentiation between maternal and foetal genotypes by STR loci could have importance in non-invasive prenatal diagnostics as another possible marker for DS risk assessment.

**Key words:** free foetal DNA, STR quantification, QF PCR.

Vo.

*Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 133-137.*

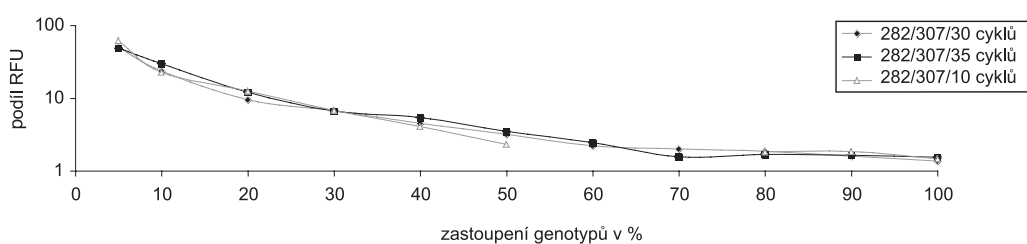
Využití nových diagnostických postupů (např. fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a kvantitativní fluorescenční PCR (QF PCR)) v prenatalní diagnostice nejčastějších aneuploidií a mnoha dalších geneticky podmíněných onemocnění významně upřesnilo a urychlilo vyšetření a umožnilo zahájit časnější a cílenější terapeutický postup.

Snahu posunout prenatalní vyšetření do nejranějších fází gravidity doplňuje preimplantační diagnostika a velice intenzivně i přesná neinvazivní prenatalní diagnostika fetálních molekul v maternálních tkáních.

K diagnostice fetálních molekul se používají fetální jaderné buňky nebo volná extracelulární deoxyribonukleová kyselina (DNA), popřípadě vázaná ribonukleová kyselina (RNA). Koncentrace fetální DNA ve volné formě je téměř 1000x větší než DNA v intaktních fetálních buňkách cirkulujících v maternální periferní krvi (1, 2). Posun od diagnostiky volné DNA jako tumor markeru k jejímu dalšímu využití je detekce fetální DNA v maternální krvi (1). Původ a mechanismus uvolnění DNA pocházející z plodu nebo jeho obalů je prozatím nejasný, stejně jako způsob vlivu aneuploidie na zvýšenou koncentraci DNA. Předpokládá se, že volná DNA se uvolňuje

**Tab 1.** Teoreticky možné kombinace STR alel v plazmě těhotné ženy, kde A1/A1 nebo A1/A3 je genotyp matky a alely a1, a2, a4 představují genotyp otce:  
 1. kombinace genotypů matky (Mater DNA) a dizomického plodu (fetal DNA);  
 2. kombinace genotypů u trizomického plodu v případě maternálního původu trizomie (fet DNA/DSM);  
 3. kombinace genotypů u trizomického plodu v případě paternálního původu trizomie (fet DNA/DSP).

<b>1. MaterDNA/fetalDNA</b>	A1/A1	a2	A3	
	A1/A1/A1	a2		
	A1/A1/a1		A3	
	A1/A1/A1/a1			
	A1/A1/a1		A3	
	A1	a2	A3/A3	
	A1		A3/A3	a4
	A1/A1/A1			a4
	A1/A1		A3	a4
<b>2. MatDNA/fetDNA/DSM</b>	A1/a1		A3/A3	
	A1/A1	a2	A3/A3	
	A1/A1		A3/A3	a4
	A1/A1	a2	A3/A3	
	A1/A1/A1/A1	a2		
	A1/A1/A1/A1	a2		
	A1/A1/a1		A3/A3	
	A1/A1		A3/A3	a4
	A1/A1/A1/A1/a1			a4
<b>3. MatDNA/fetDNA/DSP</b>	A1/A1	a2	A3	a4
	A1	a2	A3/A3	a4
	A1/A1	a2/a2	A3	
	A1	a2/a2	A3/A3	
	A1/A1/A1	a2		a4
	A1/A1/A1	a2/a2		
	A1/A1/a1		A3	a4
	A1/a1		A3/A3	a4
	A1/A1/A1/a1			a4
	A1/A1/a1/a1		A3	
	A1/a1/a1		A3/A3	



**Graf 1.** Vliv zastoupení genotypů 282/282 a 307/307 (5%, 10% až 100%) na podíl RFU daných genotypů v 30., 35. a 40. cyklu v lokusu D21S1411

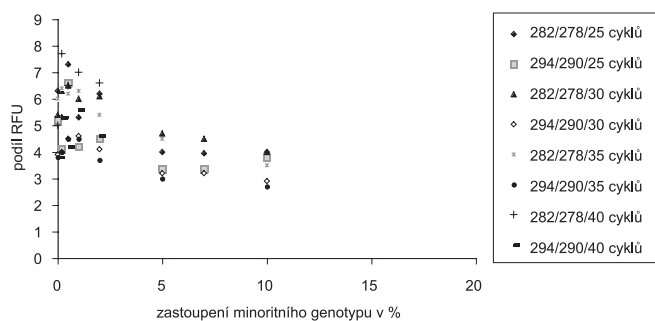
působením apoptózy (3). Zdrojem volné DNA mohou být fetální buňky, které procházejí placentou. Působením imunitního systému matky na tyto buňky je fetální DNA apopticky uvolňována do maternální plazmy (4). Apoptické fetální buňky byly objeveny v detekovatelné koncentraci také přímo v plazmě (5).

Rozpoznání fetální DNA a její přesná kvantifikace jsou pro diagnostické účely rozhodující. Záhyt a kvantifikace fetálních molekul DNA (RNA) jsou omežovány a ztěžovány jednak limitním množstvím fetálních buněk kolujícím v maternálním krevním oběhu a jednak 50% shodou genotypu matky a plodu.

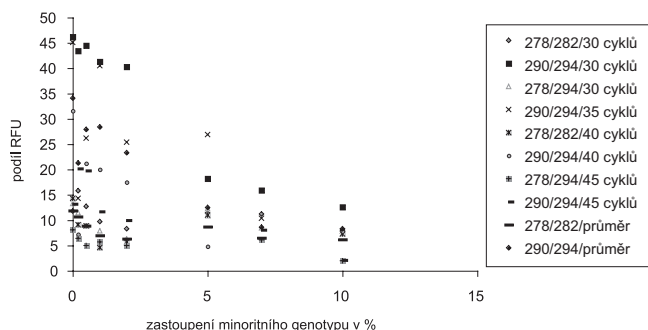
Doposud nejčastější a relativně nejjednodušší pro analýzu fetální DNA bylo využití Y specifických sekvencí u plodů mužského pohlaví. Metodami real-time polymerázové řetězové reakce (PCR) lze tyto sekvence kvantifikovat. Metodika stanovení fetálního pohlaví z maternální plazmy je dobře rozpracovaná a je již poměr-

ně spolehlivá (2, 6–8). Diagnostika aneuploidií pomocí Y specifických sekvencí kvantitativní analýzou prokázala statisticky významně zvýšenou hladinu fetální DNA u trizomických plodů jak v případě izolace DNA z čerstvé maternální plazmy (6, 9), tak i v případě archivovaného zamraženého maternálního séra (10, 11). Některé další práce zvýšenou hladinou Y specifických sekvencí v plazmě matky u trizomického plodu neprokázaly (12, 13). Cílená molekulární analýza aneuploidií z maternální plazmy (séra) je však komplikovanější a použitelné odstínění maternální a fetální DNA požadovaného chromozómu nebylo doposud systematicky studováno.

Cíl této práce byl: 1. posouzení možnosti detekovat a kvantifikovat volnou fetální DNA na arteficiálních mozaikách aplikací metody IQF PCR na STR lokusy z 21. chromozómu a 2. vlastní detekce fetální DNA.



**Graf 2.** Vliv 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 5% a 10% zastoupení minoritního genotypu (278/290) na podíl RFU daných genotypů ve 25., 30., 35. a 40. cyklu v lokusu D21S1411  
Alely minoritního genotypu zasahují do „stutter“ píku genotypu majoritního (282/294).



**Graf 3.** Vliv 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 5% a 10% zastoupení minoritního genotypu (282/294) na podíl RFU daných genotypů ve 30., 35., 40. a 45. cyklu v lokusu D21S1411  
Alely minoritního genotypu nezasahují do „stutter“ píku genotypu majoritního (278/290).

**SOUBOR VZORKŮ A POUŽITÉ METODY**

Arteficiální DNA směsi genotypů v rozmezí 0,2 % až 100 % suplující genotyp plodu a matky byly vytvořeny poměrným ředěním genotypicky vhodných vzorků DNA o koncentraci 100 ng/μl.

Použito bylo 27 vzorků DNA izolovaných z maternální plazmy a periferní krve u žen v různých týdnech gravidity v rozmezí 9 t.g. – 34 t.g. a 27 vzorků DNA izolovaných z periferní krve biologických otců. Všechny vzorky byly vyšetřeny po informovaném souhlasu schváleného etickou komisí FN Olomouc.

**Izolace DNA**

Periferní krev: vysolovací metoda podle Millera (14).

Plazma: dvojnásobná centrifugace plné krve 10 min při 1500 otáček za minutu (RPM) a poté 20 min při 2500 RPM. Vzorky byly zamrazeny do dalšího zpracování při -20 °C. Následovala izolace DNA kitem QiaAmp DNA mini kit (Qiagene).

Použité STR lokusy: D21S1411, D21S1414, D21S1435, D21S1446, PentaD. Sekvence primerů a jejich lokalizace jsou volně dostupné na www.gdb.org.

Amplifikace DNA směsí genotypů a vzorků DNA určených ke genotypizaci:

25 μl PCR směs obsahovala 2,5 μl pufru, 0,3 μl 5U polymerázy (Fermentas), 0,5 μl 10 mM dNTPs, 0,3 μl 10 pM primery, 1 μl templátové DNA, 2,5 μl 50 MgCl<sub>2</sub>, 17,6 μl deionizované vody. Podmínky PCR: 4 min úvodní denaturace při 94 °C, (denaturace 94 °C 48 s, 48 s annealing při 60 °C, extenze při 72 °C 1 min) 20–45x, finální extenze při 72 °C po dobu 5 minut.

**Amplifikace volné DNA izolované z maternální plazmy**

50 μl PCR směs obsahovala (5 μl pufru, 1 μl 5U polymerázy (Fermentas), 1 μl 10 mM dNTPs, 1 μl 10 pM primery, 20 μl templátové DNA, 5 μl 50mM MgCl<sub>2</sub>, 17 μl deionizované vody).

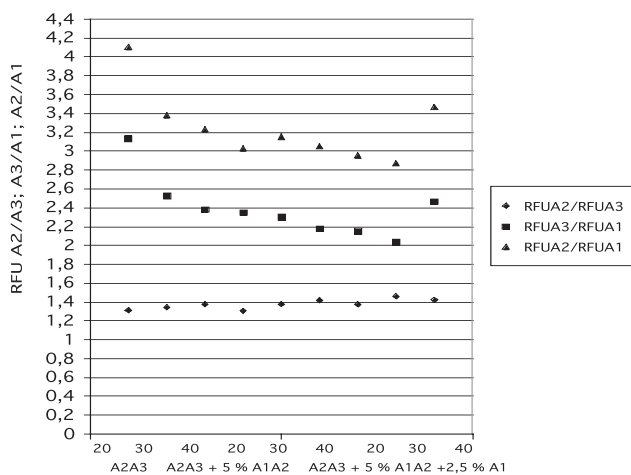
4 min úvodní denaturace při 94 °C, (denaturace 94 °C 48 s, 48 s annealing při 60 °C, extenze při 72 °C 1 min) 20–60x, finální extenze při 72 °C po dobu 5 minut.

**Separace v kapiláře**

Pro separaci v kapiláře byl využit genetický analyzátor ABI PRISM 310. Jako separační gel byl použit polymer POP4 TM (Applied Biosystems). Separace probíhala ve 47 cm dlouhé kapiláře o průměru 50 μm.

**Podmínky elektroforézy**

Nasátí vzorku: 3–15 kV po dobu 5–15 s. Vlastní elektroforéza: 25 min při teplotě 60 °C při napětí 15 kV. Pro stanovení velikosti jednotlivých fragmentů byly analyzované vzorky smíchány s velikostním standardem Tamra 500. Ke snímání a digitalizaci hrubých dat fluorescence byl používán software ABI PRISM 310 Data Collection. K vlastní analýze snímaných dat byl využíván software 310 GeneScan 3.1.2 (Applied Biosystems). Ke kvantitativním analýzám byl použit parametr RFU (relativní fluorescenční jednotka) vyjádřený výškou píku.



**Graf 4.** Závislost genotypů simulujících genotyp 302/306 bez příměsí (A2/A3), genotyp s 5% příměsí genotypu 298/302 (A1/A2) a genotyp předešlý s 1,25% příměsí genotypu 298/298 (A1/A1) na podílu RFU daných genotypů u lokusu D21S1411

**VÝSLEDKY**

V tabulce 1 jsou znázorněny teoreticky možné kombinace STR alel v maternální plazmě v případě, že maternální genotyp se liší od paternálního v obou alelách je homozygot A1/A1 nebo heterozygot A1/A3 a paternální alela je a2/a2 nebo a2/a4 alel. Tabulka 1 znázorňuje situaci, kdy je plod dizomický, trizomický s trizomií maternálního původu a trizomický s trizomií paternálního původu.

**Posouzení kvantifikačních možností KE u arteficiálních mozaik**

Nejdříve byly posuzovány 5%, 10% -100% směsi 2 genotypů po 30, 35 a 40 cyklech amplifikace (graf 1). Z výsledků vyplývá, schopnost metodiky rozlišit od sebe genotypy, které se liší o 5–10 %.

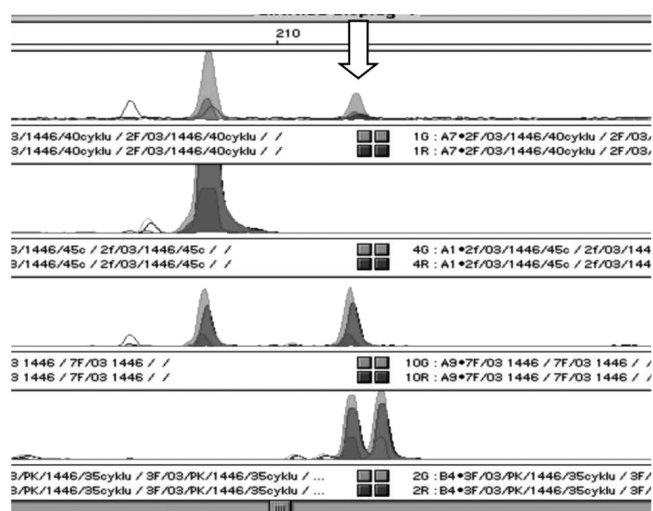
Možnost kvantitativně od sebe rozlišit jednotlivé genotypy byla dále posuzována v 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10% směsích. (graf 2, 3). Graf 2 znázorňuje případ, ve kterém minoritní linie zasahuje do „stutter“ píku, graf 3 posuzuje genotypy, které si nezasahují do „stutter“ píku.

Z grafů 2 a 3 lze usuzovat na potenciál metody kvantifikovat a rozlišit od sebe i genotypy lišící se několika procenty.

K dalšímu posouzení byly uměle sestrojeny směsi 2 genotypů simulující příměs 5% fetální DNA, která představovala dizomický plod, dále byla k této linii přidána linie, která je homozygotní tak, aby byla jedna z minoritních alel zastoupena v dvojnásobku. Tento

**Tab. 2.** Shrnutí výsledků detekce fetální DNA u 27 případů  
Šedá výplň znázorňuje nezdařenou detekci fetální DNA.

Vzorek	týden gravidity	vhodné lokusy	maternální genotyp	paternální genotyp	detekce fetálního genotypu v maternální plazmě	RFU jednotlivých genotypů
220fp/04	18	46	214/218	210/222	214/218/210	1077/880/64
213fp/04	21	pD, 35, 46	172/172	176/180	172/172/180	63000odhad/4326
<b>217fp/04</b>	<b>19</b>	<b>pD, 35, 46</b>	<b>168/172</b>	<b>180/180</b>	<b>168/172/nic</b>	
210fp/04	17	pD, 35, 46	415/420; 172/178; 205/205;	400/410; 172/183; 205/214	415/420/400; 172/178/183 205/205/214	1013/514/76; 6238/3237/82; 381/33
207fp/04	31	pD, 46	209/213	205/217	209/213/205	3878/6203/294
204fp/04	18	pD, 35, 46	172/172	172/180	172/172/180	25100odhad/18
<b>192fp/04</b>	<b>10</b>	<b>pD, 35</b>	<b>400/420; 176/180</b>	<b>415/420; 172/172</b>	<b>nevyšlo</b>	
195fp/04	18	pD, 46	200/218	204/204	200/218/204	174/378/377
154fp/04	12	pD, 46	401/406;	411/416;	401/406/411;	5324/3915/160;
192fp/04	10	pD, 46	205/219	207/219	205/219/207	357/740/128
<b>187fp/04</b>	<b>19</b>	<b>pD, 35</b>	<b>411/411; 168/172</b>	<b>415/420; 172/180</b>	<b>168/172/180</b>	<b>1491/3708/2277</b>
184fp/04	19	pD, 46	205/205	205/218	205/205/218	27000/44
<b>180fp/04</b>	<b>26</b>	<b>46</b>	<b>205/205</b>	<b>205/218</b>	<b>205/205/205</b>	<b>nelze hodnotit</b>
<b>177fp/04</b>	<b>34</b>	<b>pD, 46</b>	<b>205/205</b>	<b>205/218</b>	<b>205/205/205</b>	<b>nelze hodnotit</b>
172fp/04	15	pD, 46	212/212	205/209	212/212/209	727/37
<b>166fp/04</b>	<b>9</b>	<b>35,14,46</b>	<b>172/176; 343/346; 213/219</b>	<b>160/172; 350/353; 205/205</b>	<b>nevyšlo</b>	
140fp/04	17	pD, 35	411/416	401/411	411/416/416	1627/587
169fp/04	15	pD, 46	411/416	396/411	411/416/411	3512/1666
134fp/04	18	pD, 46	400/410	405/410	400/410/405	6748/2573/177
137fp/04	17	14, pD	349/353; 410/420;	405/410	410/420/405	15500odhad/0/653
<b>62fp/04</b>	<b>20</b>	<b>pD, 46</b>	<b>410/415; 205/205</b>	<b>400/405;223/223</b>	<b>nevyšlo</b>	
<b>67fp/04</b>	<b>16</b>	<b>pD, 46</b>	<b>400/405</b>	<b>410/410</b>	<b>nevyšlo</b>	
47fp/04	23	pD, 46	224/224	213/215	224/224/215	4552/131
3fp/05	20	35	168/172	175/179	168/172/175	9095/5992/170
1f/03	20	46	206/210	*/222	206/210/222	403/310/17
2fp/03	19	46	205/205	215/217	205/205/215	2084/12
8fp/03	16	35, 46	167/171; 200/205	*/180; 205/218	167/171/180; 200/205/218	278/357/13; 7574/7901/746



**Obr. 1.** PCR produkt z lokusu D21S1446 po amplifikaci DNA z maternální plazmy u těhotné ženy (19 tg) (1. vzorek), z periferní krve matky (2. vzorek), z plodové vody (3. vzorek) a z periferní krve otce (4. vzorek)  
Fetální DNA v maternální plazmě je označena šipkou.

vzorek reprezentoval trizomický plod. Výsledky jsou znázorněny v grafu 4. U posuzovaných mozaik došlo vždy v určitých cyklech k nárůstu (pokud byly RFU alel minoritní mozaiky při výpočtu podílu v čitateli) resp. poklesu (pokud byly RFU alel minoritní

mozaiky při výpočtu podílu ve jmenovateli) jednotlivých podílů RFU.

#### Analyza fetální DNA v maternální plazmě

Na základě genotypizace rodičů byly nejprve vybrány nejvhodnější markery tak, aby se genotypy neshodovaly alespoň v jednom z markerů. Vlastní detekce fetální DNA byla provedena na souboru 27 vzorků (tab. 2). Fetální DNA se podařilo detekovat vždy alespoň v jednom z testovaných lokusů u 74 % vzorků. Obrázek 1 ukazuje příklad detekce fetální DNA a porovnání maternálního a paternálního genotypu. Součástí obrázku (3. vzorek shora) je i amplifikovaná DNA izolovaná z plodové vody, která potvrdila genotyp plodu.

#### DISKUZE

Metodika IQF PCR byla původně určená ke kvantifikaci gonozomálních mozaik. Je podrobně popsána v Časopisu lékařů českých 6/2004 (15). Testování směsí různých genotypů lišících se v délce STR lokusů prokázalo další možnosti využití metody v diagnostice a kvantifikaci volné fetální DNA. Modelové směsi genotypů představující fyziologický „dizomický plod“ (5 %) a „trizomický plod“ (5 % + 2,5 %) se vždy v určitých PCR cyklech lišily. Rozlišitelnost na úrovni několika procent je limitována počtem cyklů. Počet cyklů, ve kterých je analýza neoptimálnější, nelze jednoznačně určit vzhledem k různému profilu PCR reakce, který je závislý na koncentraci a kvalitě templátu. Obecně se vzrůstajícím počtem cyklů



klesá u genotypů lišících se o několik procent citlivost. Jak lze vyvodit z grafu 3, například u genotypu 278/282, kde se částečně nezdařila kvantifikace ve 45. cyklu, a z grafu 4, kde selhala kvantifikace ve 40. cyklu.

Fetální DNA se podařila zachytit i v 10. t.g., naproti tomu v 1 případě nedošlo k průkazu DNA u vzorku z 34. t.g.

Lepší výtěžnost detekce fetální DNA je závislá především na kvalitě izolačních postupů a na nastavení nevhodnějších parametrů PCR tak, aby tvorba nespecifických produktů byla minimální a výtěžnost a exponenciální průběh reakce optimální.

Pro vlastní přesnost kvantifikace fetální DNA je účelné zachytit fetální DNA co nejdříve vzhledem k velké disproporcii v zastoupení maternálního a fetálního genotypu. V případě, kdy fetální DNA byla prokázána až tehdy, kdy maternální linie byla amplifikována již ve velkém nadbytku, lze využít přepočítání pomocí vzorce:

$$M = 1/k \cdot RFUFm/RFUMn \cdot 1/p^{m-n}$$

$M$  je mozaika vyjádřená v procentuálním zastoupení fetální DNA,  $k$  je směrnice kalibrační regresní přímky,  $m$  je počet cyklů pro RFU fetální DNA ( $F$ ),  $n$  je počet cyklů pro RFU maternální DNA ( $M$ ),  $p$  je v ideálním případě dvě, ve skutečnosti se pohybuje v rozmezí 1,6–1,9 a kopíruje efektivitu a reálnou exponencialitu PCR. Další možnost je využít hrubých dat k analýze a empiricky odhadnout RFU pomocí maticí neodstíněných „podpíků“, které se chovají jako zlomky skutečných RFU. Například v případě značení pomocí TET fluorescenční značkou je červený pík v hrubých datech v 1/3 píku zeleného, pokud použijeme filtr C. Vlastní kvantifikace fetální DNA je možná již nyní, ale posouzení hodnot vzhledem ke kalibrační křivce lze provádět až na základě vyšetření rozsáhlejšího souboru.

Výhody metody oproti klasickým „real-time“ kvantifikacím spočívají v relativně snadno dostupném rozlišení genotypů, v možnosti kvantifikovat cíleně požadované regiony v genomu, ve velké citlivosti a reprodukcibilitě. Metodiku lze navíc přizpůsobit velice snadno pro další využití (kvantifikace repetitivních genů, analýza chimerismů u pacientů po transplantaci kostní dřeně).

Naproti tomu poměrně náročná standardizace s nutností použít početné soubory ke kalibraci, výskyt „stutter“ píků a jejich eliminace na úkor efektivity PCR lze považovat za nevýhody.

## ZÁVĚR

Průkaz fetální DNA v maternální plazmě a její kvantifikace na úrovni analýzy STR lokusů z 21. chromozómu by mohlo přispět ke zpřesnění předpovědi rizika DS u těhotných žen a omezit tak invazivní zákroky v prenatalní diagnostice.

### Zkratky

DNA	– deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DS	– Downův syndrom
FISH	– fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
IQF PCR	– inovovaná kvantitativní fluorescenční PCR (quantitative fluorescent PCR)

KE	– kapilární elektroforéza
PCR	– polymerázové řetězové reakce
RFU	– jednotka relativní fluorescence (relative fluorescent unit)
RNA	– ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RPM	– otáčky za minutu
STR	– krátká tandemová repetice (short tandem repeat)
t.g.	– týden gravidity

## LITERATURA

- Lo, Y. M. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F. et al.: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 1997, 350, s. 485-487.
- Lo, Y. M. D., Tein, M. S., Lau, T. K. et al.: Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 1998, 62, s. 768-775.
- Sekizawa, A., Samura, O., Zhen, D. K. et al.: Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat. Diagn.*, 2000, 20, s. 886-889.
- Pertl, B., Sekizawa, A., Samura, O. et al.: Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum. Genet.*, 2000, 106, s. 45-49.
- van Wijk, I. J., de Hoon, A. C., Jurhawan, R. et al.: Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. *Clin. Chem.*, 2000, 46, s. 729-731.
- Zhong, X. Y., Burk, M. R., Troeger, C. et al.: Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat. Diagn.*, 2000, 20, s. 795-798.
- Wei, C., Sailer, D. N., Sutherland, J. W.: Detection and quantification by homogeneous PCR of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.*, 2001, 47, s. 336-338.
- Honda, H., Mihar, N., Ohashi, Y. et al.: Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum. Genet.*, 2002, 110, s. 75-79.
- Lo, Y. M. D., Lau, T. K., Zhang, J. et al.: Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin. Chem.*, 1999, 45, s. 1747-1751.
- Lee, T., LeShane, E. S., Messerlian, G. M. et al.: Down syndrome and cell-free fetal DNA in archived maternal serum. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2002, 187, s. 1217-1221.
- Farina, A., Caramelli, E., Concu, M. et al.: Testing normality of fetal DNA concentration in maternal plasma at 10-12 completed weeks' gestation: a preliminary approach to a new marker for genetic screening. *Prenat. Diagn.*, 2002, 22, s. 148-152.
- Ohashi, Y., Mihar, N., Honda, H. et al.: Quantitation of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies. *Hum. Genet.*, 2001, 108, s. 123-127.
- Hromadníková, I., Houbová, B., Hridelová, D. et al.: Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth.*, 2002, 2, s. 4.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.*, 1988, s. 16, s. 1215-1216.
- Vodička, R., Vrtěl, R., Dušek, L. et al.: Možnosti a využití inovované kvantitativní fluorescenční PCR (IQF PCR) v analýze genetického mozaicismu pomocí gonozomálních sekvencí. *Čas. Lék. čes.*, 2004, 143, s. 385-388.

Práce vznikla za podpory grantu IGA MZ ČR NR/7817-3.

PŮVODNÍ PRÁCE

## Zvýšené riziko malignit u heterozygotů v rodinách pacientů s Nijmegen breakage syndromem

Seemanová E., <sup>1</sup>Jarolím P., <sup>2</sup>Seeman P., <sup>3</sup>Varon R., <sup>3</sup>Sperling K.

*Oddělení klinické genetiky, Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK, Praha*

*<sup>1</sup>Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

*<sup>2</sup>DNA laboratoř Kliniky dětské neurologie, 2. LF UK a FNM, Praha*

*<sup>3</sup>Institut für Humangenetik der Humboldtuniversität zu Berlin, SRN*

### ABSTRAKT

**Východisko.** Autozomálně recesivně dědičný syndrom chromozomální instability Nijmegen breakage syndrom (NBS) způsobený mutací v NBS1 genu na 8q21 je spojen s vysokým výskytem lymforetikulárních malignit v důsledku poruchy reparace DNA (double strand breaks). Ve slovanské populaci je většina pacientů homozygoty tzv. „slovanské mutace“ 657del5 v exonu 6. Zvýšený výskyt maligních solidních tumorů v rodinách pacientů s NBS byl popsán již před identifikací odpovědného genu a zvýšené riziko malignit heterozygotů bylo tak hypotetické. Možnost odlišit v rodinách nositele mutace a normální homozygoty dovoluje tuto hypotézu ověřit.

**Metody a výsledky.** Molekulárně genetickým vyšetřením prarodičů a prvostupňových příbuzných se nám nyní ve 28 rodinách našich 39 pacientů podařilo stanovit genotyp 79 ze 112 prarodičů a 54 jejich rodičů a sourozenců. Jediná rodina měla postižené děti v důsledku compound heterozygosity mutace 657del5 a mutace R215W ve stejném exonu NBS1 genu. Rodiny byly vyšetřovány genealogicky tak, aby byla získána data o příbuzných probanda ve 4 generacích. Anamnesticky získané údaje byly opakovaně doplňovány a objektivně ověřovány v matrikách a zdravotní dokumentaci. Sedm rodin je sledováno 20–30 let, 6 rodin 10–20 let a 15 rodin 1–10 let. Z 28 rodin se u obou prarodičů podařilo vyšetřit genotyp v 18 rodinách, přičemž jednou byla zjištěna non-paternita a jednou mutace R215W, v 5 rodinách jen u jedné prarodičů, v 5 rodinách se nepodařilo stanovit genotyp žádného z prarodičů. Mezi 40 prarodiči – normálními homozygoty se vyskytla malignita u 3 (7,4 %), zatímco mezi 39 heterozygoty mutace 657del5 v NBS1 genu byl výskyt malignit dokumentován u 15 (38,2 %). Průměrný věk manifestace malignity ve skupině heterozygotů byl 59,3 let (rozptyl 47–72 let), ve skupině homozygotů 52,6 let (rozptyl 44–62 let). Devět prarodičů zemřelo na malignitu před objevením NBS1 genu a jejich genotyp byl odvozen u 7 genealogicky na základě genotypu manželky a dětí, u dvou ze zachované DNA. Z nich od 3 na malignitu zemřelých prarodičů se podařilo získat nádorovou tkáň pro molekulárně genetické vyšetření, cílené na LOH či amplifikaci NBS1 genu. U dalších 5 prarodičů – heterozygotů se malignita manifestovala až po stanovení genotypu molekulárně genetickým vyšetřením a následně také od 3 nádorová tkáň byla získána pro molekulárně genetické vyšetření.

**Závěry.** Věkové rozložení i socioekonomický status obou skupin prarodičů se nelišil, poměr pohlaví byl lehce posunut ve prospěch ženského pohlaví ve skupině prarodičů homozygotů (22 žen a 18 mužů) a ve skupině heterozygotů ve prospěch mužského pohlaví (21 mužů a 18 žen). Poměr pohlaví mezi heterozygotními prarodiči s malignitou byl rovněž posunut ve prospěch mužského pohlaví (11 mužů a 4 ženy), ve skupině prarodičů homozygotů byly malignitou postiženy 2 ženy a 1 muž. Ze zdravotnické a matriční dokumentace ověřený výskyt malignit byl významně častější mezi prarodiči heterozygoty mutace NBS1 genu než mezi zdravými homozygoty. Také mezi sourozenci a rodiči prarodičů byl rozdíl ve frekvenci malignit u heterozygotů signifikantně vyšší (5 z 18, tj. 27,7 %) oproti frekvenci malignit u zdravých homozygotů (2 z 36, tj. 5,5 %).

**Klíčová slova:** autozomálně recesivní dědičnost, porucha reparace DNA, chromozomální instabilita, hyperradiosenzitivita, genealogická studie, frekvence malignit u heterozygotů NBS a normálních homozygotů, detekce mutace 657del5 v NBS1 genu.

### ABSTRACT

*Seemanová E., Jarolím P., Seeman P. et al.: Increased Risk of Malignancies in Heterozygotes in Families of Patients with Nijmegen Breakage Syndrome*

**Background.** The autosomal recessive chromosomal instability and hyperradiosensitivity Nijmegen breakage syndrome (NBS) in consequence of a mutation in the NBS1 gene at 8q21 is associated with high occurrence of lymphoreticular malignancies due to deficient DNA reparation (double strand breaks). In the Slavic population the majority of patients are homozygotes of the so-called “Slavic mutation” 657del5 in exon 6. Increased occurrence of malignant solid tumors (1) in families of NBS patients has been described already prior to the identification of the responsible gene, and the increased risk of malignancies in heterozygotes was thus hypothetical.

**Methods and Results.** The possibility of discerning mutation carriers in families from normal homozygotes enables verification of that hypothesis. Through molecular genetics investigations of grandparents and immediate relatives, we have been successful in determining the genotype in 79 of 112 grandparents in 28 families of our 39 patients and 54 their parents and siblings. A single family had affected children in consequence of compound heterozygosity of the 657del5 and R215W mutations in the same exon of the NBS1 gene. The proband's families were investigated genealogically and data on relatives were obtained over four generations. Obtained data were repeatedly supplemented and objectively verified in church books and in healthcare documentation. Seven families have been followed up for 20–30 years, six families for 10–20 years, and 15 families for 1–10 years. Out of 28 families we were successful in examining the genotype of both grandparents in 18 families, there having been revealed one non-paternity; in five families only one

of the grandparents has been examined; in five families we were not successful in examining any grandparent. Among 40 grandparents – normal homozygotes, there has appeared a malignancy in three (7.4 %), while among 39 heterozygotes of mutation 657del5 in the NBS1 gene malignancies were documented in 15 (38.2 %). Mean age of NBS heterozygotes at manifestation of malignancy was 59.3 year (range 47–72 years), in the group of homozygotes it was 52.6 years (range 44–62 years). Nine grandparents died of malignancy prior to the discovery of the NBS1 gene and their genotype has been deduced genealogically in seven on the basis of the genotype in the spouse and children, in two from preserved DNA. Out of that number, from three grandparents that had died of malignancies we were successful in obtaining neoplastic tissue for molecular genetics investigation, aimed at LOH or amplification of the NBS1 gene. In another seven grandparents – heterozygotes, malignancies were manifested after determination of their genotype by DNA analysis, and consequently also from tumor tissue that has been obtained from three of them for molecular genetic investigation.

**Conclusions.** The age distribution and socio-economic status of both groups of grandparents did not differ, the sex ratio was slightly shifted towards females in the group of homozygotic grandparents (22 females and 18 males), and in the group of heterozygotes it was towards males (21 males and 18 females). The sex ratio between heterozygotic grandparents with malignancies was likewise shifted towards the male gender (11 males and 4 females), in the group of homozygotic grandparents malignancy affected one male and two females. As verified in healthcare and church books documentation, the occurrence of malignancies was significantly more frequent among grandparents heterozygotic for NBS1 mutation than in healthy homozygotes. Among sibs of grandparents and great-grandparents was found significant difference in frequency of malignancies in heterozygotes (5/18 = 27.7 %) and healthy homozygotes (2/36 = 5.5 %), too.

**Key words:** autosomal recessive heredity; DNA repair disorder, chromosomal instability; hyper-radiosensitivity; genealogy study; frequency of malignancies in NBS heterozygotes and normal homozygotes; 654del5 mutation in NBS1 gene. Se.

Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 138–143.

**S**yndromy chromozomální instability jsou provázeny vysokým rizikem vzniku malignit u homozygotů (1, 2) (30–40 % pro Fanconioho anémii (FA), Bloomův syndrom (BS) a ataxia telangiectasia (AT), téměř 100 % pro Nijmegen breakage syndrom (NBS) a Xeroderma pigmentosum (XP)). Zvýšené riziko manifestace malignit bylo uvažováno i pozorováno u jejich příbuzných, z nichž u některých byla heterozygosita potvrzena, jiní byli pravděpodobnými heterozygoty (2–8). Identifikace mutace v genech FANC a XP je ztížena genetickou heterogenií, v genu ATM více než 600 možnými mutacemi. Bloomův syndrom a Nijmegen breakage syndrom mají mimo židovskou (BS) a slovanskou (NBS) populaci nízkou populační incidenci, avšak genetická heterogenie není známa a počet mutací je nízký (2). U téměř všech NBS pacientů ve slovanské populaci je přítomna zakladatelská mutace 657del5, a tedy identifikace heterozygotů v rodinách pacientů i v populaci je bezproblémová (9, 10, 17). NBS je důsledkem mutace v nedávno identifikovaném genu NBS1 (11), který kóduje produkci nibrinu, proteinu, jehož absence je spojena s buněčnou i chromozomální hyperradiosenzitivitou (12, 13). Porucha reparace DNA predisponuje všechny NBS homozygoty k vývoji malignity v mladém věku. Vysoký výskyt malignit u NBS homozygotů vyvolává otázku rizika malignit pro NBS heterozygoty (14). Swift referoval o lehce zvýšeném výskytu solidních tumorů u heterozygotů AT (6, 7), jejíž celulární charakteristiky jsou identické s NBS, a proto byl do objvu odpovědného genu NBS1 zván AT – varianta. Analýza rodokmenových dat našich NBS pacientů ukázala vysoký výskyt malignit u blízkých příbuzných (3). Výskyt malignit ve dvou a více generacích v přímé linii a manifestace malignity ve středním dospělém věku splňují kritéria rodin se zvýšeným rizikem maligních tumorů.

## SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODY

V roce 1979 jsme prvně diagnostikovali v bývalém Československu 6 pacientů s NBS (dvoje sourozence a dva jednotlivce). Diagnóza byla potvrzena nálezem mutace u obou jejich rodičů o mnoho let později. Do současnosti jsme diagnostikovali NBS u 24 dětí ze 16 rodin narozených v České republice a u 15 dětí ze 12 rodin, narozených ve Slovenské republice v letech 1960–2004 (tab. 1). V období před 1–30 lety byly sestaveny čtyřgenerační rodokmeny ve 28 rodinách probandů v době, kdy diagnóza NBS dosud nebyla potvrzena, a tedy pozornost na výskyt malignit nebyla soustředěna. I u osob léčených na malignitu v době vyšetření byl genotyp NBS stanoven teprve následně.

## Genealogická studie

Čtyřgenerační rodokmen s oběma rodiči a nejméně jedním z maternálních a jedním z paternálních prarodičů sestavovala jedna osoba (ES). Data byla pravidelně, nejméně jednou ročně doplňována během genetické péče o probanda a jeho rodinu, od roku 2000 i při setkáních Společnosti syndromů chromozomální instability. Cíleně jsme sledovali výskyt sterility, spontánních potratů, porodů vícercát, vrozených vad, endogamie a konsanguinity. Prarodiče byli kontaktováni a pokud s vyšetřením souhlasili, byl od nich získán krevní vzorek pro molekulárně genetické vyšetření. Při odběru krve byli příbuzní dotazováni na pracovní historii a současné zaměstnání, styk se škodlivinami včetně kouření a abúzu alkoholu a na osobní anamnézu prodělaných chorob, rentgenových vyšetření a současný zdravotní stav. Prakticky ve všech rodinách jsme sice získali genealogická a anamnestická data přímo od prarodičů, někteří z nich se však již nedožili objevu NBS a možnosti stanovení genotypu DNA analýzou. Troji prarodiče DNA vyšetření odmítli, jeden z nich mohl být na podkladě potvrzení mutace u manželky identifikován jako homozygot. Ze 112 prarodičů byl genotyp stanoven u 80, přičemž jeden děd byl vyloučen pro non-paternitu. Mezi rodiči a sourozenci prarodičů jsme mohli vyšetřit genotyp u 54, z nich 18 bylo heterozygoty a 36 zdravými homozygoty.

## Molekulárně genetické vyšetření slovanské mutace 657del5 v NBS1 genu na 8q21

Genomická DNA byla připravena z nesrážlivé periferní krve za použití QIAamp Blood Kit a mutace 657del5 stanovena, jak již popsáno (15).

## VÝSLEDKY

### Genealogická data

Průměrný věk 111 prarodičů při posledním kontaktu nebo při úmrtí byl 58 let (rozptyl 44–85 let). Malignita byla udávána u 24 prarodičů (16 mužů, 8 žen), z nichž u 6 (5 mužů a 1 žena) se genotyp nepodařilo stanovit ani genealogicky (tab. 2).

Genotypy 18 prarodičů s malignitou byly u 8 stanoveny genealogicky a v 10 případech DNA analýzou. Z nich bylo 15 nositelů 657del5 mutace (z toho 8 zjištěno DNA analýzou a u 7 genealogicky); 54 sourozenců a rodičů prarodičů mohlo být vyšetřeno DNA analýzou, 18 bylo heterozygoty 657del5 mutace a u 36 byla mutace vyloučena.

Genotyp se podařilo stanovit u 79 prarodičů, z toho u 65 přímou detekcí mutace 657del5 a u 14 na základě vyšetření příbuzných, manžela/ky a dětí. Mezi 39 heterozygoty byl zjištěn maligní tumor u 15, z toho od 6 byly získány histologické preparáty maligních tumorů jednak k ověření nádoru, jednak k molekulárně genetické-

Tab. 1. NBS pacienti a malignity

Rodina	pacient	etnikum	pohlaví	narození	malignita	věk malignity	úmrť	příčina smrti
28	MK	C	F	1960		0	1961	enterocolitis
28	AK	C	M	1961		0	1962	pneumonie
8	DM	S	F	1969	lymfogranulom	9	1979	lymfogranulom
7	JP	C	M	1970	ALL	9	1980	ALL
9	MD	C	F	1971	NHL	18	1993	pneumonie
23	SV	S	F	1973		0		
11	ZZ	S	F	1973	gonadoblastoma	18	1994	gonadoblastoma
4	JC	C	F	1975	NHL B, NHL	26, 29	2004	synkopa
9	DD	C	M	1977	lymfosarcoma	1,5	1979	lymfosarcoma
7	EP	C	F	1978	ALL	1	1979	ALL
4	RC	C	F	1979	Ewing sarcoma	13	1995	renal insuficience
6	RZ	C	F	1979	malig.meningeom	12		
1	PA	C	M	1980	ALL, Hodgkin lymfom	13, 17		
2	LZ	C	F	1980		0	1980	pneumonia
2	JZ	C	M	1981	NHL B	8	1991	NHL
18	JP	G-S	F	1983	meduloblastoma	6	1990	meduloblastoma
12	MH	S	M	1984	0			
2	N	C	M	1984	0			prenat.diag
16	JS	S	F	1985	NHL B	16		
3	LD	G-C	F	1986	NHL B	6	1996	respir insuficience
5	MC	C	M	1988	NHL B	6		
12	LH	S	M	1989	ALL	5	2003	ALL
14	MO	S	M	1989	NHL B	10	2005	NHL
10	MF	S	F	1989		0		
13	JH	C	M	1991	NHL B	6	1998	NHL
15	JS	C	M	1992	ALL	6	1999	ALL
2	N	C	F	1992		0		prenat. diag
21	AD	S	F	1996		0		
17	MG	S	F	1999		0		
22	MF	S	M	2000		0	2000	hydrocefalus cong
19	DU	C	M	2001		0		
21	MD	S	M	2001	rhabdomyosarcom	0,5		
20	TG	C	M	2002		0		
22	N	S	F	2002		0		prenat. diag
26	MS	S	M	2002		0		
24	NR	C	F	2002		0		
25	JR	C	M	2003		0		
25	PR	C	M	2003		0		
27	MN	C	F	2004	0			
28 rodin		16 C	19M		20 + 2			průměrný věk manifestace malignity 9 let
		10 S	20 F		rozptyl 0,5–26 let			
		2 G						

MK, AK a další až po MN jsou monogramy pacientů.

C – české etnikum, S – slovenské etnikum, GC – romské české etnikum, GS – romské slovenské etnikum, F – žena, M – muž, NHL – non Hodgkinský lymfom, ALL – akutní lymfoblastická leukémie

mu vyšetření LOH či amplifikace alely germinální mutace. U dalších 6 prarodičů byla malignita ověřena z úmrtního listu a jen u 3 prarodičů byl údaj anamnestický, dále již neověřitelný. Mezi 40 prarodičů byla nepřítomnost mutace 657del5 ověřena u 35 přímou DNA analýzou a v 5 případech na základě genealogie (vyšetření manžela/ky). Jeden děd byl heterozygotem pro R215W mutaci. Maligní tumor byl zjištěn u 3 z nich, jednou z úmrtního listu a u 2 žijících ze zdravotnické dokumentace. Ve skupině heterozygotů se tak malignita dala dokumentovat ve 38,2 %, zatímco ve skupině neheterozygotů jen v 7,5 %, rozdíl je statisticky signifikantní (chí kvadrát test ukázal P menší než 0,01). Mezi 28 prarodičů, jejichž genotyp se nepodařilo stanovit ani genealogicky, byla udávána malignita jako příčina úmrť v 6 případech (1x plic, 2x žaludku, 2x kolorektální, 1x vesicae urinarie).

Průměrný věk všech prarodičů při manifestaci malignity či úmrťí byl 60,5 let, ve skupině heterozygotů 59,3 let a ve skupině homozygotů 52,6 let. Rozdíl není odlišný.

Mezi 54 sourozenci a rodiči prarodičů bylo ve skupině 18 heterozygotů zjištěno 5 s malignitou (1x lymfom, 1x mnohočetný myelom, 1x gynekologická, 1x pankreatu a 1x Merkelův karcinom a následně za 6 let po radioterapii pro původní malignitu karcinom prsu). Pouze 2 malignity byly zjištěny mezi 36 homozygoty (1x colon, 1x ovarium). Rozdíl je signifikantní na hladině p je menší 0,01.

Tumory heterozygotů mutace 657del5 se vyskytovaly bez predispozice. U ověřených malignit prarodičů – heterozygotů se jednou jednalo o lymfom žaludku, dvakrát o gynekologický nádor, 3x o karcinom žaludku (2 muži, 1 žena), 3x colon karcinom (3 muži),



Tab. 2. Anamnéza prarodičů NBS pacientů před DNA analýzou

Rodina	paternální prarodiče	pohlaví	věk	malig.	posl.kont.	maternální prarodiče	pohlaví	věk	malign.	posl.kont.
1	VA 1927	M	78	ne	2005	AB 1931-1999 iktus	M	68	ne	
2	LA 1927-1999 iktus	F	72	ne		JB 1934	F	71	ne	2005
	ZZ 1919-1967 lymfom ventr.	M	48	ano		OM 1926	M	79	ne	2005
3	AZK 1927	F	78	ne	2005	EM 1930	F	75	ne	2005
	VD 1932	M	71	ne	2003	JH 1934	M	69	ne	2003
4	ID 1935-1985 gyn.ca	F	49	ano		OH 1945	F	58	ne	2003
	VČ 1921-1992 iktus	M	71	ne		JM 1931	M	73	ne	2004
5	LČ 1923	F	81	ne	2004	HM 1928	F	76	ne	2004
	MČ 1944	M	60	ne	2004	FK 1931-2004 iktus	M	73	ne	
6	AC 1945	F	59	ne	2004	EK 1935	F	69	ne	2004
	IZ 1902-1990 věk	M	88	ne		ZO 1928-1996 ca prost	M	68	ano	
7	HZ 1913	F	86	ne	2000	VO 1929	F	74	ne	2003
	JP 1912-1983 ca pulm	M	71	ano		JCh 1922	M	70	ne	1992
8	MP 1912-1985 iktus	F	63	ne		HCh 1923	F	69	ne	1992
	MM 1896-1974 iktus	M	78	ne		FS 1917 tumor cerebri 1979	M	84	ano	2002
9	AM 1906-1972 gyn.ca	F	66	ano		AS 1925-1979 iktus	F	54	ne	
	JD 1926-1996 ca ventr.	M	69	ano		JF 1926-1995 ca ventric	M	68	ano	
10	MD 1927	F	74	ne	2001	LF 1928	F	73	ne	2001
	JF 1929	M	74	ne	2003	MŽ 1943	M	60	ne	2003
11	IF 1927-2000 ca ventr.	F	72	ano		AŽ 1945	F	58	ne	2003
	IP 1930-1987 ca pulm	M	56	ano		GL 1936	M	63	ne	1999
12	IP 1933	F	66	ne	1999	IL 1939-1983 gynek ca	F	44	ano	
	SC 1925	M	75	ne	2000	LR 1927	M	73	ne	2000
13	AC 1927	F	73	ne	2000	PR 1930	F	70	ne	2000
	JH 1935	M	70	ne	2005	LR 1947-1981 suicidium	M	34	ne	
14	LH 1940	F	65	ne	2005	MR 1950	F	55	ne	2005
	JO 1940	M	60	ne	2000	JP 1931	M	74	ne	2005
15	MO 1942	F	58	ne	2000	AP 1932	F	73	ne	2005
	JS 1948	M	52	ne	2000	JŠ 1942	M	58	ne	2000
16	OS 1948	F	52	ne	2000	JŠ 1946	F	54	ne	2000
	AS 1936-1986 ca renum	M	49	ano		AB 1925	M	80	ne	2005
17	SS 1942	F	63	ne	2005	MB 1937	F	68	ne	2005
	MG 1950, 2005 NHL	M	54	ano	2005	ŠB 1942	M	62	ne	2004
18	DG 1950	F	54	ne	2005	VB 1952-2000 ca mammae	F	47	ano	
	MH 1932 ca ventriculi	M	66	ano	1998	FM 1930 ca recti	M	68	ano	1998
19	TH 1930	F	68	ne	1998	VM 1933	F	65	ne	1998
	JU 1951	M	54	ne	2005	SN 1948-1992 ca ventric	M	44	ano	
20	TU 1953	F	51	ne	2005	JN 1952	F	53	ne	2005
	VG 1943	M	62	ne	2005	VA 1938 ca colon 2003	M	67	ano	2005
21	MG 1948	F	57	ne	2005	IA 1945	F	60	ne	2005
	ŠF 1947-1998 iktus	M	51	ne		JM 1945	M	58	ne	2003
22	BF 1949	F	54	ne	2003	JM 1945	F	58	ne	2003
	VD 1940	M	65	ne	2005	OK 1942	M	64	ne	2004
23	ED 1942	F	63	ne	2005	MK 1945	F	59	ne	2004
	VŘ 1946	M	59	ne	2005	???				
24	VŘ 1949	F	56	ne	2005	Non-paternita JJ 1948	F	57	ne	2005
	JV 1915-1995 iktus	M	80	ne		MA 1915-1981 ca ves.urinaria	M	66	ano	
25	VV 1916-1997	F	81	ne		AA 1920-1997 ca colon	F	77	ano	
	R215W mutace					JP 1952	M	53	ne	2005
26	KŠ 1927 colon ca 2004	M	78	ano	2005	AP 1948	F	57	ano	2005
	JŠ 1931	F	74	ne	2005	basaliom 2001 JP 1945	M	60	ne	2005
27	JN 1937-2000 ca pulmonum	M	63	ano		LP 1949	F	56	ne	2005
	HN 1941 ca mamma2003	F	64	ano	2005	JP 1947	M	58	ne	2005
28	AK 1910-1965 iktus	M	55	ne		AP 1948	F	57	ne	2005
	MK 1911-1990	F	79	ne		JN 1910-1973 ca ventriculi	M	62	ano	
suma	54			13ca		55		12ca		

Vysvětlivky:

VA a AZK (2x vdaná, tedy 2 jména) a další jsou monogramy prarodičů (druhý sloupec otcovských, sedmý maternálních), F – žena, M – muž

jednou o tumor mozku (muž), jednou o karcinom prsu, jednou o karcinom prostaty, dvakrát o karcinom plic (2 muži) jednou o NHL.

Mezi neheterozygoty se vyskytl jednou karcinom žaludku, jednou karcinom prsu a jednou basaliom u ženy, která 40 let pracovala jako rtg laborantka.

**Tab. 3.** Výskyt malignit u prarodičů a praprarodičů po stanovení genotypu

Výskyt malignit u prarodičů probandů		
	heterozygoti NBS	homozygoti
počet osob	39	40
M:F	21:18	18:22
prům. věk	61,1 roku	63,9 roku
genotyp DNA	30	35
genotyp geneal	9	5
počet malignit	15	3
M:F	11:4	1:2
frekvence malig.	38,20 %	7,40 %
prům. věk malig.	59,3 roku	52,6 roku
rozdíl signifikantní p větší než 0,01		
Výskyt malignit u praprarodičů a prastrýců/tet podle genotypu		
Heterozygoti NBS		
počet osob	18.	36.
M:F	10:8	24:12
genotyp DNA	18	36
průměr. věk	63,9 roku	73,2 roku
počet malignit	5	2
M:F	2:3	0:2
prům. věk malig	66,2 roku	45,0 roku
frekvence malig	27,70 %	5,50 %
rozdíl signifikantní p větší než 0,01		

v populaci pak dosud nemožná. Etiologie NBS je ve slovanské populaci homogenní, a tedy identifikace heterozygotů je v rodinách pacientů i v populaci bezproblémová.

Frekvence heterozygotů 657del5 mutace ve slovanských populacích byla zjištěna 0,5–1% (17). Jejich vysoké riziko manifestace maligních tumorů ve středním věku může představovat významný podíl mezi onkologickými pacienty (18). Hyperradiosenzitivita heterozygotů 657del5 byla opakovaně prokázána (11–13) zvýšením chromozomálních a chromatidových zlomů po expozici ionizačnímu záření *in vitro*. Hyperradiosenzitivita heterozygotů by měla být respektována při terapii tumorů a pro prevenci sekundárních malignit, především však v prevenci primárních tumorů. Vysoký výskyt malignit v souboru našich heterozygotních prarodičů může být výsledkem genotypu a vysoké expozice ionizací české populaci v období sjednoceného zdravotnictví v letech 1952–1992, kdy bylo z preventivních důvodů plošně využíváno rentgenových vyšetření pro detekci dysplazií kyčlí kojenců a depistáž tuberkulózy dětí i dospělých. Rovněž naše geografická poloha v okolí uranových dolů Jáchymova, Příbrami, Rožinky může přispívat k vyšší expozici ionizujícímu záření české populace v porovnání s jinými i slovanskými populacemi. Souhra genotypu a zevních faktorů při manifestaci nádorů u heterozygotů 657del5 mutace tím nabízí účinnou prevenci zvýšeného rizika malignit heterozygotů. Zlepšení fenotypických projevů lze očekávat od ochrany před ionizací a dostatečné dodávky antioxidant.

**Zkratky**

- AT – ataxia telangiectasia
- BS – Bloomův syndrom
- FA – Fanconioho anémie
- NBS – Nijmegen breakage syndrom
- XP – xeroderma pigmentosum

Výsledky studie podporují hypotézu, že heterozygizita NBS1 mutace je spojena s 38% rizikem manifestace maligního tumoru do 75 let věku, což je signifikantně vyšší pravděpodobnost než u prarodičů – neheterozygotů NBS (7,4 %) i než v obecné populaci (v roce 1993 bylo hlášeno 22 671 nádorů mezi 5,013 000 muži (0,04 %) a 21 820 nádorů mezi 5,310000 žen (0,04 %), mezi osobami nad 60 let pak 1,5 % (16). Signifikantní rozdíl ve výskytu malignit jsme zjistili také mezi heterozygotními a homozygotními sourozenci, případně rodiči prarodičů NBS pacientů.

**DISKUZE**

Výskyt maligních tumorů je v populaci častý a jen asi v 10 % je rozpoznána genetická etiologie (germinální mutace onkogenu nebo tumor suppressor genu). V našem souboru prarodičů a praprarodičů pacientů se syndromem chromozomální instability NBS, jejichž věkové rozložení, sociální prostředí a expozice k mutagenům byly srovnatelné, byl výskyt malignit signifikantně vyšší ve skupině heterozygotů NBS než mezi homozygoty normální alely. Výsledky podporují hypotézu, že heterozygizita 657del5 mutace je spojena se signifikantně zvýšeným rizikem manifestace maligního tumoru do 70 let věku ve srovnání s neheterozygoty *NBS1* i v porovnání s obecnou populací (16). Soudíme, že se podařilo prokázat, že také heterozygoti slovanské mutace 657del5 v *NBS1* genu mají riziko malignity – vesměs solidních tumorů – bez speciální predispozice, významně zvýšeno.

Zvýšené riziko malignit u heterozygotů syndromů chromozomální instability bylo opakovaně předpokládáno i ověřeno zejména u nositelů mutace v *ATM* genu (6–8) jako důsledek poruchy reparace DNA (12, 14). Avšak u afekcí s genetickou či genovou heterogenií je identifikace heterozygotů i v rodinách pacientů obtížná,

**LITERATURA**

1. Chaganti, R. S. K., German, J. L.: Genetics in clinical oncology. New York, Oxford University Press, 1985, s. 211-221.
2. Seemanová, E., Seeman, P., Jarolím, P.: Význam syndromů chromozomální instability. Čas. Lék. čes., 2002, 141, s. 16-22.
3. Seemanová, E.: An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability. Mutat. Res., 1990, 238, s. 321-324.
4. Seemanová, E., Jarolím, P., Varon, R. et al.: Cancer risk in NBS heterozygotes from the Czech Republic. Čas. Lék. čes., 2002, 141, č. 8 – příloha s. X.
5. Chrzanowska, K. H., Piekutowska-Abramczuk, D., Varon, R. et al.: Cancer risk and fertility of NBS heterozygotes in Poland. Čas. Lék. čes., 2002, 141, č. 8 – příloha s. X.
6. Swift, M., Reitnauer, P. J., Morrell, D., Chase, C. L.: Breast and other cancers in families with ataxia telangiectasia. N. Engl. J. Med., 1987, 316, s. 1289-1294.
7. Swift, M., Morrell, D., Massey, R. B., Chase, C.L.: Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia- telangiectasia. N. Engl. J. Med., 1991, 325, s. 1831-1836.
8. Thompson, D., Duedal, S., Kirner, J. et al.: Cancer risks and mortality in heterozygous *ATM* mutation carriers. J. Natl. Cancer Inst., 2005, 97, s. 813-822.
9. International Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) Study Group Nijmegen Breakage Syndrome. Arch. Dis. Child, 82, 2000, s. 400-406.
10. Seemanová, E., Pohanka, V., Seeman, P. et al.: Nijmegen breakage syndrom na Slovensku. Čas. lék. čes., 2004, 143, s. 538-541.
11. Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M. et al.: Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen Breakage Syndrome. Cell, 1998, 93, s. 467-476.
12. Digweed, M., Reis, A., Sperling, K.: Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. BioEssays, 1999, 21, s. 649-656.

13. **Neubauer, S., Arutyunyan, R., Stumm, M. et al.:** Radiosensitivity of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome homozygotes and heterozygotes as determined by three-color FISH chromosome painting. *Radiat. Res.*, 2002, 157, s. 312-321.
14. **Tanzanella, C., Antoccia, A., Spadoni, E. et al.:** Chromosome instability and nibrin protein variants in NBS heterozygotes. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2003, 11, s. 297-303.
15. **Seeman, P., Gebertová, K., Paděrová, K. et al.:** Nijmegen breakage syndrome in 13% age-matched Czech children with primary microcephaly. *Pediatr. Neurology*, 2004, 30, s. 195-200.
16. *Statistická ročenka. Praha, ÚZIS, 1993.*
17. **Varon, R., Seemanová, E., Chrzanowska, K. et al.:** Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation 657del5, in three Slav populations. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2000, 8, s. 900-902.
18. **Seemanová, E., Jarolím, P., Seeman, P. et al.:** Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 founder mutation. *NEJM* submitted.

*Práce byla podpořena grantem Sanderstiftung č. 1198-049-1 a IGA-NH/6439-3 a IGA MZ-NR/7916-4.*

## OSOBNÍ ZPRÁVY

### PROF. MUDr. MILOŠ GRIM, DrSc. – 65 LET

Pln energie a neutuchajícího elánu oslavil 18. ledna t.r. 65. narozeniny prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc., přednosta Anatomického ústavu 1. LF UK. Miloš Grim se narodil v Rychnově nad Kněžnou 18. ledna 1941; oba jeho rodiče byli učitelé. Po dětství a středoškolských studiích v rodném kraji nastoupil na Fakultu všeobecného lékařství, dnešní 1. LF UK v Praze, kde roce 1963 promoval. Již za studií pracoval v Anatomickém ústavu jako asistent – student (1961–1963), po promoci zůstal v ústavu jako asistent (1963–1966) a jako odborný asistent (1966–1988). Kandidátskou práci s názvem „Vývoj a fyziologický zánik svalových buněk v lidské ruce“ obhájil v roce 1977. Docentem pro obor normální anatomie byl z politických důvodů jmenován až v roce 1988 a po habilitačním řízení podle nových předpisů na základě práce „Vývojová a experimentální morfologie svalů“ znovu jmenován k 1. červenci 2002. Doktorát lékařských věd v oboru anatomie, histologie a embryologie obhájil v říjnu 2001 na základě dizertační práce „Interakce migrujících a lokálních buněčných populací za vývoje končetin a žaberních oblouků“; profesorem pro obor normální anatomie byl jmenován v roce 2003. V letech 1993–1999 byl proděkanem fakulty pro vědu a výzkum, od roku 1997 je přednostou Anatomického ústavu 1. LF UK.

V anatomickém ústavu se prof. Grim za 45 let svého pedagogického působení podílel na všech formách pregraduální výuky: Vedl praktická a pítevní cvičení, přednášel, zkoušel. Podstatným způsobem modernizoval výuku anatomie a akcentoval její zaměření k praktické problematice medicíny. Ve velkém rozsahu působí i v postgraduální výuce: Školil a školil celkem 6 postgraduálních studentů, z nichž 3 již obhájili titul Ph.D. Je také autorem čtyř učebnic a podílel se na doplnění a úpravě 2. vydání třídílné učebnice anatomie. Přednášky prof. Grima jsou u studentů velmi oblíbené a jeho přístup ke studentům je vlídný, s rozumnou, ale nekompromisní mírou požadavků u zkoušek. Pro jeho pedagogické i vědecké zkušenosti byly také velmi cenné dlouhodobé pobyty na anatomických ústavech v zahraničí (Hamburk, Ann Arbor Michigan, Freiburg i. Br., Curych, Vídeň, Bochum, Milwaukee).

Ve vědecko-výzkumné práci a v publikacích prof. Grima se trvale prolíná několik témat, jejichž základním rysem je vývoj chápaný jako dynamická složka morfologie a zkoumaný ces-



tu experimentální a buněčné embryologie; klíčovými tématy zde je vývoj svalů, vztah nervů a svalů za vývoje, role materiálu neurální lišty za vývoje struktur pohybového aparátu, vývoj cévního řečiště a stavba a původ materiálu ve složkách některých nervových receptorů. Vznikla přitom řada priorit, které změnily názor na základní otázky vývoje těchto struktur. Svými výzkumy v posledních 10 letech zavedl Grim do embryologie metody molekulární biologie a jako první u nás začal studovat organogenezi jako děj podmíněný expresí specifických genů a jimi kodovaných transkripčních faktorů a signálních molekul, které přímo spouštějí a řídí morfogenetické procesy. Pohled na morfogenetické mechanismy se na základě těchto prací stává kauzálním a posunuje vývojovou morfologii do moderního kontextu s vývojovou biologii a s genetikou. Proto jsou Grimovy práce uznávané ve světě a bohatě citované. Prof. Grim ale neopomíjel ani podíl a spolupráci anatoma v klinické problematice, např. v rekonstrukční chirurgii, v urologii a v rehabilitačním lékařství. Je autorem 269 publikací, z toho je 82 původních prací, 13 kapitol v monografiích, 4 učebnice a spolupráce na 3 dalších. Na základě kontaktů Anatomického ústavu se zahraničními pracovišti stejného výzkumného zaměření v průběhu 70. a 80. let mohl prof. Grim již tehdy spolupracovat se zahraničními partnery v USA a v SRN a publikovat ve významných časopisech. Tyto spolupráce trvají dodnes. Součet hodnot IF časopisů, v nichž je publikováno 62 jeho prací, je 112, 5. Grimovy práce mají také rozsáhlý citační ohlas. Podle SCI bylo v 793 citacích citováno 75 prací, 2 z nich více než 100x. Další 40 citací je v monografiích. Prof. Grim přednesl také kolem 255 přednášek na kongre-

sech, sympoziích a na samostatných seminářích, z toho cca 85 přednášek v zahraničí (Maďarsko, Slovinsko, Německo, Rakousko, Švýcarsko, Španělsko, Anglie, Itálie, USA, Japonsko).

Při výčtu aktivit prof. Grima nelze opomenout jeho činnost organizační, jejímž výsledkem je – mimo jiné – rekonstrukce budovy a prostorů anatomického ústavu. Prof. Grim je člen a od roku 2002 předseda České anatomické společnosti, člen ČLS JEP, České společnosti pro neurovědy, člen výboru České společnosti histochemické a cytochemické, člen Československé biologické společnosti, člen Anatomische Gesellschaft, člen American Association of Anatomists, člen rady České lékařské akademie, člen předsednictva Spolku lékařů českých v Praze, člen Vědecké rady Univerzity Karlovy, člen Vědecké rady 1. LF UK, člen oborové rady lékařských věd GAČR, předseda podoborové rady morfologie a experimentální chirurgie GA ČR, člen oborové komise grantové agentury MZD ČR, člen oborové rady vývojové biologie doktorandského studia biomedicíny, člen oborové rady experimentální chirurgie doktorandského studia biomedicíny, člen redakční rady *Arch. Histol. Cytol.* a člen redakční rady *Eur. J. Morphol.*

Prof. Grim je nositelem ceny Čs. anatomické společnosti za roky 1983 a 1989, Pamětní medaile UK (1998), pamětní medaile 1. LF UK (1998) a spolunositel ceny MZD ČR (2000).

Ke všem předchozím skutečnostem je třeba dodat, že prof. Miloš Grim je výrazná osobnost, jejíž osobní vlastnosti byly bezesporu ovlivněny dokonalou výchovou v rodině prodchnuté kulturou, působením kouzla rodného kraje, vlastním talentem, pílí a cilevědomostí. To vše je spojeno s dokonalým vystupováním, s brilantním psaným i mluveným projevem (což dnes ve slangu vědeckých přednášek začíná být vzácnost), s vlídným vztahem k okolí, s láskou ke kultuře a k umění, s osobní skromností a s charizmatem přitahujícím žáky. Měl jsem příležitost orientovat v roli učitele volbu tematiky a směr vědecké práce prof. Grima na počátku jeho vědecké dráhy, v době, kdy hledal své místo v současné anatomii a v anatomickém výzkumu. Přáním každého učitele by mělo být, aby jeho žák došel v oboru dále a výše než on sám. Toto přání prof. Grim splnil více než dokonale. Přeji mu do mnoha dalších let zdraví, úspěchy, radost z vykonané práce a každého žáka tak vynikajícího, jako byl on.

*prof. MUDr. Radomír Čihák, DrSc.  
128 00 Praha 2, U Nemocnice 3*

PŮVODNÍ PRÁCE

## Asociace variant polymorfismů v genu pro endotelin-1 (EDN1) s terapií u pacientů s kožními T lymfomy

Vašků V., <sup>1</sup>Bienertová-Vašků J., <sup>1</sup>Pávková-Goldbergová M.,  
Semrádová V., <sup>1</sup>Vašků A.

*I. dermatovenerologická klinika LF MU a FN u sv. Anny, Brno*

*<sup>1</sup>Ústav patologické fyziologie LF MU, Brno*

### ABSTRAKT

**Východisko.** Kožní T lymfomy jsou onemocněními charakterizovanými přítomností kožních infiltrátů s maligními, klonálně expandujícími T lymfocyty. Protože individuální genetická determinovanost angiogenních a antioxidačních vlastností cév se může u pacientů s kožními T lymfomy podílet na odpovědi kůže na fototerapii, testovali jsme asociaci dvou populačně četných polymorfismů v genu pro endotelin-1 s touto léčbou.

**Metody a výsledky.** Do studie jsme zařadili 77 pacientů s kožními T lymfomy, diagnostikovanými a léčenými na I. dermatologické klinice LF MU ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně (46 mužů a 31 žen, medián věku 62 (28–82) let. Diagnóza stanovená podle klinického obrazu byla potvrzena histologicky. Srovnali jsme distribuce genotypů a frekvence alel polymorfismů -3A/-4A v G8002A v genu pro endotelin-1, stanovené polymerázovou řetězovou reakcí a restriční analýzou mezi pacienty s fototerapií a bez ní. Genotyp 4A4A polymorfismu -3A/-4A v genu pro endotelin-1 se vyskytoval častěji u pacientů s fototerapií (8/30 vs. 1/38, OR=10,13, P=0,01). Genotypy GA a AA polymorfismu G8002A byly častější u pacientů s kožními T lymfomy léčenými fototerapií ve srovnání s pacienty bez fototerapie (15/23 vs. 7/32, OR=2,98; P=0,03).

**Závěry.** Některé genotypy polymorfismů v genu pro endotelin-1 jsou výhodné z hlediska efektivity fototerapie u pacientů s kožními T lymfomy.

**Klíčová slova:** endotelin-1, genetický polymorfismus, terapie, fototerapie, steroidy, kožní T lymfomy.

### ABSTRACT

*Vašků V., Bienertová-Vašků J., Pávková-Goldbergová M. et al.: Association of Polymorphic Variants in Endothelin-1 (EDN1) Genes with the Therapy of Patients with Cutaneous T-cell Lymphomas*

**Background.** The cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) are diseases characterised by cutaneous infiltrates of malignant, clonally expanded T-cells. Because individual genetic determination of angiogenic and antioxidant properties of blood vessels could take part in responsibility to phototherapy in CTCL patients, the association of two frequent polymorphisms in endothelin-1 gene with phototherapy was tested.

**Methods and Results.** 77 patients with CTCL, diagnosed and treated at the First Dermatological Clinic of St. Ann's Faculty Hospital Brno (46 men and 31 women, median age 62, range 28-82 years) were included in the study. Diagnosis of CTCL according to the clinical picture was verified histologically. The genotype distributions and allelic frequencies between CTCL with phototherapy and those without phototherapy were compared. The 4A4A variant of -3A/-4A EDN1 is more frequent in patients treated with phototherapy (8/30 vs. 1/38, OR=10.13; P=0.01). The GA and AA genotypes of G8002A EDN1 polymorphism are more frequent in CTCL patients treated with phototherapy compared to those without it (15/23 vs. 7/32, OR=2.98; P=0.03).

**Conclusions.** Some polymorphic variants in EDN1 genes, a homozygote -4A-4A in -3A/-4A EDN1 and genotypes GA and GG in G8002A EDN1 seem to carry an advantage for phototherapy effectiveness in patients with CTCL.

**Key words:** endothelin-1, genetic polymorphism, therapy, phototherapy, steroids, cutaneous T-cell lymphoma.

Va.

*Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 144–147.*

V následujících desetiletích se očekává revoluční vstup individualizované, tj. na individuálních genetických předpokladech založené, medicíny do praxe většiny medicínských oborů. Od tohoto přístupu se očekává zvýšení efektivity léčby pacienta s ohledem na jeho vlastní genetický profil. Při realizaci tohoto záměru bude využita metodologie rychle se rozvíjející nové mezioborové disciplíny – farmakogenetiky (1). Zdrojem dat pro farmakogenetické studie se velmi dobře mohou stát dobře provedené asociační genetické studie, které umožňují asociovat genetickou variabilitu s různými aspekty

efektivity terapie, a to jak v retrospektivním, tak v prospektivním režimu.

Kožní T lymfomy jsou primárně kožní onemocnění, charakteristická přítomností maligních, klonálně expandujících T lymfocytů, které infiltrují kůži. Progrese těchto tumorů významně závisí na stavu jejich vaskularizace. V průběhu expanze tumoru dochází k procesu označovanému jako angiogenní „rozsvícení“, které je dáno postupně se rozvíjející převahou proangiogenních faktorů oproti antiangiogennímu v místě růstu tumoru. Tuto rovnováhu ovlivňují jak vlastní nádorové

doc. MUDr. Vladimír Vašků, CSc.  
656 91 Brno, Pekařská 53  
fax: +420 543 182 793, e-mail: vladimir.vasku@fnusa.cz



buňky, tak ostatní buňky přítomné v místě rostoucího tumoru. Maligní T lymfocyty jsou schopny akcelerovat angiogenezi produkcí endoteliálních růstových faktorů a uvolňováním matrix metaloproteináz (MMP), které se účastní novotvorby kapilár. Monocyty/makrofágy produkují další přímé i nepřímé induktory i inhibitory angiogeneze, jako je například angiostatin, chemokiny a trombospodin (2).

Cévní endotel dnes všeobecně považujeme za integrální část imunitního systému. Kultivované lidské endoteliální buňky jsou schopny prezentovat antigen T lymfocytům. Uskutečňují to prostřednictvím kostimulátorů. Celý proces vede k efektivní aktivaci T buněk. Endoteliální buňky venul jsou pak například schopny v místech reakce opožděné přecitlivělosti přímo prezentovat antigen cirkulujícím paměťovým T lymfocytům (3). Lidské endoteliální buňky vystavují antigeny třídy I. a II. systému HLA a vstupují pravidelně do kontaktu s cirkulujícími T lymfocyty. Předkládají paměťovým T lymfocytům patrně i mikrobiální superantigeny. Aktivované T lymfocyty zase symetricky ovlivňují pomocí solubilních faktorů i kontaktních signálů funkci endoteliálních buněk včetně tvorby a remodelace cév, regulace průtoku, fluidity krve, udržování selektivní propustnosti, chemotaxe neutrofilů aj. Interakce T lymfocytů s endoteliálními buňkami je tedy obousměrná (4).

Endoteliální buňky v dermální mikrocirkulaci vytvářejí buněčnou linii, která normálně zabráňuje krevním T lymfocytům vstupovat do kůže. Tyto buňky však v reakci na cizí antigen mění spektrum svých povrchových antigenů, což vede k aktivaci a akumulaci cirkulujících T lymfocytů v dermis. Tyto buňky jsou patrně také schopny iniciovat kožní imunitní reakce na známý antigen jeho prezentací cirkulujícím paměťovým T lymfocytům. Po kontaktu s aktivovanými T lymfocyty nebo s produkty, které uvolňují zejména cytokiny, se dermální endoteliální buňky aktivují, což zvyšuje jejich kapacitu povolávat populace paměťových a efektorových buněk, a to způsobem nezávislým na prezentaci antigenu (5).

Fototerapie se užívá již desetiletí při léčbě mnohých dermatóz včetně kožních T lymfomů. Účinnost ultrafialového světla pásma B (UVB) se omezuje na časná stadia fototerapie, zatímco psoraleny v kombinaci s UVA-PUVA jsou někdy účinné i v časném tumorózním stadiu. Fototerapii je někdy vhodné kombinovat s další terapií, jako jsou interferony, retinoidy nebo radioterapie pomocí rychlých elektro- (6).

Ultrafialové záření (UVA-1) (340–400 nm) je vysoce efektivní v indukci apoptózy T buněk, které pronikají do kůže, a proto je účinné u pacientů s kožními nemocemi modulovanými T buňkami. Maligní T lymfocyty CD4+ kultivované z kůže pacientů s T buněčnou leukémií dospělých a se Sézaryho syndromem jsou vnímavější vůči proapoptickým účinkům UVA-1 za 4 hodiny (časná apoptóza) i za 24 hodin (pozdní apoptóza) po expozici oproti normálním T lymfocytům CD4+. Apoptóza T buněk indukovaná UVA-1 je iniciovaná tvorbou volných kyslíkových radikálů. Tato skutečnost je v souladu s pozorováním, že stimulace neozářených buněk systémem tvořícím volné kyslíkové radikály indukuje rozsáhlejší apoptózu maligních buněk ve srovnání s buňkami normálními. Vnímatost lidských T buněk vůči apoptóze navozené ozářením pomocí UVA-1 je ve vztahu k dostupnosti apoptotických enzymů – kaspáz, zejména kaspázy 3. Léčebné strategie, které vedou ke zvýšeným hladinám těchto enzymů v oblasti nádorů, mohou zvýšit účinnost fototerapie pomocí UVA-1 (7).

Endoteliny jsou mocnými vazokonstriktory s mitogenními účinky na cévní stěnu a účastní se v patogenezi různých malignit. Endotelin-1 je růstovým faktorem u několika typů tumorů, zejména karcinomu prostaty, ovárií, kolon, děložního čípku, prsu, ledvin, plic, mozku, melanomu či Kaposiho sarkomu. Účastní se řady procesů, významných v průběhu kancerogeneze, jako je buněčná proliferace, inhibice apoptózy, remodelace extracelulární matrix, remodelace kostí a metastázování (8). Endoteliny působí také jako angiogenní faktory. Mitogeneze endoteliálních buněk je ovlivněna prostřednictvím recep-

torů ET<sub>B</sub>, zatímco mitogeneze hladkých svalových buněk a pericytů převážně receptory ET<sub>A</sub> (9). Endotelin-1 v neposlední řadě moduluje melanogenezi lidských melanocytů a účastní se v jejich odpovědi na ultrafialové záření. Lidské melanocyty exprimují receptory pro endotelin-1 typu ET<sub>B</sub>. Expozice UV záření umožňuje těmto buňkám okamžitě překročit zástavu růstu ve fázi buněčného růstu G1 (10).

Gen pro endotelin-1 je tedy možno asociovat jak s angiogenezí, tak s antioxidačními vlastnostmi cév během progresu kožního T lymfomu. Polymorfní varianty tohoto genu mohou být výhodné nebo naopak nevýhodné pro očekávaný přínos terapie UV zářením během terapie těchto nádorů. Proto jsme se rozhodli testovat u pacientů s kožním T lymfomem asociaci dvou vybraných, v populaci dostatečně četných polymorfismů v genu pro ednothelin-1 (EDN-1) s aplikovanou UV terapií.

## SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODY

### Pacienti

Do studie bylo zařazeno 77 pacientů s kožními T lymfomy, (stadium I=35, stadium II=28, stadium III=14), diagnostikovaných a léčených na I. dermatovenerologické klinice LF MU ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně. Soubor zahrnoval 46 mužů a 31 žen s mediánem věku 62 let (od 28 do 82 let). Klinická diagnóza kožních T lymfomů byla potvrzena histologicky a imunofenotypicky. Pacienti byli léčeni místně (steroidy ve 40 případech, cytostatiky v 1 případě, steroidy a cytostatiky v kombinaci v jednom případě, dehtem v 1 případě), celkově (steroidy v 1 případě, interferonem alfa 2b ve 4 případech, retinoidy v 7 případech, kombinací retinoidů a interferonu alfa 2b v 1 případě) a fototerapií v podobě celotělového ozáření (PUVA ve 29 případech, UVB v 9 případech) (tab. 1). V době odběru krevních vzorků na DNA byli všichni pacienti v částečné nebo úplné remisi onemocnění.

Studie byla schválena Komisí pro etiku lékařských experimentů na člověku na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity v Brně (64/93, 1993). Podepsaný informovaný souhlas všech pacientů je archivován.

Tab. 1. Demografická data

Počet pacientů s kožními T lymfomy, muži/ženy	77, 46/31
věk (medián, rozsah, roky)	62 (28–82)
fototerapie celotělová (UVB, PUVA)	38/39 (49 %)
terapie steroidy místně	41/36 (53 %)
terapie interferonem celkově	5/72 (6 %)
terapie retinoidy celkově	8/69 (10 %)
terapie kombinovaná (více než jeden typ terapie)	27/50 (35 %)

### Genotypizace

Genomická DNA byla izolována ze vzorků periferní venózní krve standardní metodikou pomocí proteinázy K.

Polymorfismus -3A/-4A (inzerčně deleční v poloze -138) v genu pro endotelin-1 byl detekován pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR) (5'-primer 5'-GCT GCT TTT CTC CCC GTT AA-3' a 3'-primer 5'-CAA GCC ACA AAC AGC AGA GA-3') s následnou restrikční analýzou restrikčním enzymem BsiYI (rozpoznávací místo CCNNNNNN ↓ NNGG). Jednotlivé genotypy byly detekovány ve 2% elektroforetickém gelu s etidium bromidem v UV světle jako -4A/-4A: 195 párů bází ; -4A/-3A: 176, 195, 19 párů bází a -3A/-3A: 176 a 19 párů bází.

Polymorfismus G (8002) A ve 4. intronu genu pro endotelin-1 jsme detekovali podle našeho vlastního protokolu. Produkty PCR (primery 5'-CAA ACC GAT GTC CTC TGT A-3 a 5'-ACC AAA CAC ATT TCC CTA TT-3') byly následně inkubovány s restrikčním enzymem *Taq I* (rozpoznávací místo T ↓ CGA). Při gelové elektroforéze s etidium bromidem jsme identifikovali 3 genotypy GG: 150 a 208 párů bází; GA: 358, 150 a 208 párů bází a AA: 358 párů bází (11).

### Statistické metody

Rozdíly v genotypových distribucích (Pg) a shoda s Hardy-Weinbergovým ekvilibriem jsme testovali pomocí testu  $\chi^2$ .

Rozdíly v alelických frekvencích (Pa), poměry genotypů a signifikance odds ratio se počítaly pomocí testu Fisher exact.

Pro korekci hodnot P na mnohonásobné srovnání (Pcorr) jsme ve vhodných případech používali Holmův test.

### VÝSLEDKY

Prokázali jsme rozdíl v distribuci genotypu -3A/-4A EDN1 mezi pacienty, kteří byli nebo nebyli léčeni fototerapií (Pg=0,04) (tab. 2). Genotyp 4A4A polymorfismu -3A/-4A EDN1 se vyskytuje signifikantně častěji u pacientů léčených fototerapií (8/30 vs. 1/38, odds ratio = OR=10,13, 95% konfidenční interval 1,20–85,55, P=0,01).

Dále jsme pozorovali rozdíl v alelických frekvencích polymorfismu G8002A EDN1 mezi pacienty léčenými a neléčenými fototerapií (Pa=0,04) (tab. 3). Genotypy GA a AA se vyskytovaly častěji u pacientů léčených fototerapií (15/23 vs. 7/32, OR=2,98, 95% konfidenční interval 1,05–8,48, P=0,03).

Asociovaný genotyp („dvougenotyp“) 4A4AGG jsme prokázali signifikantně častěji u pacientů léčených fototerapií (8/30 vs. 1/38, OR=10,13, 95% konfidenční interval 1,20–85,55, P=0,01, Pcorr=0,05).

U pacientů léčených místně steroidy jsme prokázali signifikantní rozdíl v distribucích genotypů polymorfismu -3A/-4A EDN1 (Pg=0,03). U pacientů s touto terapií se vyskytuje častěji heterozygotní varianta tohoto polymorfismu (OR= 2,90, 95 % konfidenční interval 1,13–7,43, P=0,02) (tab. 4).

U pacientů, kteří byli léčeni zároveň fototerapií a místně steroidy, jsme prokázali ve srovnání s ostatními pacienty signifikantní rozdíl ve frekvenci alel polymorfismu G8002A (Pa=0,01). Pacienti se steroidy a fototerapií byli častěji nositeli genotypů GA + AA (9/10 vs. 13/45, OR=3,12, 95% konfidenční interval 1,05–9,28, P=0,04).

Celkově je tedy možno říci, že pacienti s fototerapií byli častěji nositeli genotypu 4A4A v polymorfismu -3A/-4A a genotypů GA a AA v polymorfismu G8002A v genu pro endotelin, pokud jsou tyto polymorfismy hodnoceny separátně jako nezávislé. Pokud budeme posuzovat rozdíly ve frekvencích asociovaného genotypu, pak signifikantně častějším genotypem u pacientů s fototerapií je i po statistické korekci 4A4AGG.

### DISKUZE

Ve studii jsme zjistili výhodné genetické varianty v genu pro EDN-1 (6p24-p23) pro úspěšnou fototerapii u pacientů s kožními T lymfomy. Je však velmi obtížné vysvětlit vztah mezi variabilitou v genu pro endotelin-1 a aplikovanou fototerapií u těchto pacientů. Vzhledem k funkčním vlastnostem genotypů obou polymorfismů *in vitro* byla prokázána na tkáňových kulturách dvou buněčných linií (COS1 a HepG2) vyšší exprese endotelinu-1 u varianty -4A proti variantě -3A, což má patrně za následek různou regulaci tonusu cévní stěny u nositelů jednotlivých genotypů (12). Pro intronový polymorfismus G8002A jsme podobnou studii funkčních vlastností jednotlivých alel nebo genotypů v literatuře nenašli.

**Tab. 2.** Polymorfismus -3A/-4A v genu pro endotelin-1 (EDN-1) u pacientů s kožními T lymfomy – fototerapie

genotypy a alely	-3A/-4A EDN1			Pg	3A	4A	Pa
	3A3A	3A4A	4A4A				
pacienti s kožními T lymfomy a fototerapií (n=38)	16 (42 %)	14 (37 %)	8 (21 %)	*0,04	0,605	0,395	*0,139
pacienti s kožními T lymfomy bez fototerapie (n=39)	18 (46 %)	20 (51 %)	1 (3 %)		0,718	0,282	

Pg – pravděpodobnost rozdílu v distribuci genotypů, Pa – pravděpodobnost rozdílu v alelických frekvencích, \* – pravděpodobnost rozdílu mezi pacienty léčenými a neléčenými fototerapií

**Tab. 3.** Polymorfismus G8002A v genu pro endotelin-1 (EDN1) u pacientů s kožními T lymfomy – fototerapie

genotypy a alely	G8002A EDN1			Pg	G	A	Pa
	GG	GA	AA				
pacienti s kožními T lymfomy a fototerapií (n=38)	23 (61 %)	13 (34 %)	2 (5 %)	*0,112	0,776	0,224	*0,04
pacienti s kožními T lymfomy bez fototerapie (n=39)	32 (82 %)	6 (16 %)	1 (2 %)		0,897	0,103	

Pg – pravděpodobnost rozdílu v distribuci genotypů, Pa – pravděpodobnost rozdílu v alelických frekvencích, \* – pravděpodobnost rozdílu mezi pacienty léčenými a neléčenými fototerapií

**Tab. 4.** Polymorfismus -3A/-4A v genu pro endotelin-1 (EDN1) u pacientů s kožními T lymfomy – místní terapie steroidy

genotypy a alely	-3A/-4A EDN1			Pg	3A	4A	Pa
	3A3A	3A4A	4A4A				
pacienti s kožními T lymfomy a steroidy místně (n=41)	16 (39 %)	23 (56 %)	2 (5 %)	*0,03	0,671	0,329	*0,814
pacienti s kožními T lymfomy bez steroidů místně (n=36)	18 (50 %)	11 (31 %)	7 (19 %)		0,853	0,347	

Pg – pravděpodobnost rozdílu v distribuci genotypů, Pa – pravděpodobnost rozdílu v alelických frekvencích, \* – pravděpodobnost rozdílu mezi pacienty léčenými a neléčenými fototerapií

Endotelin-1 je dnes považován za zdaleka nejen za mocný vazokonstriktor, ale především za faktor imunomodulační, ovlivňující základní buněčné funkce, jako je přežití buňky, proliferace a remodelace extracelulární matrix. V poslední době se v těchto souvislostech akcentuje vliv autokrinních a parakrinních smyček endotelinu -1 a jeho receptorů ET<sub>A</sub> a ET<sub>B</sub> na dendritické buňky (13). Bylo prokázáno, že endotelin-1 je při hypoxii v tumorózních buňkách zvýšeně produkován (14). Je také známo, ET-1 má přímý vliv na endoteliální a perivaskulární buňky. Nepřímou aktivuje významnou angiogenní látku – vascular endothelial growth factor (VEGF), prostřednictvím hypoxií indukovatelného faktoru-1 (HIF-1). Nepřímou také stimuluje angiogenezi stimulací fibroblastů a tumorových buněk k produkci proangiogenních proteáz (15). Indukce exprese VEGF prostřednictvím HIF-1 $\alpha$  pod vlivem endotelinu pravděpodobně odpovídá za spuštění tumorové neoangiogeneze, která se rozvíjí v důsledku tkáňové hypoxie během růstu tumoru (16).

Při diskuzi nad výsledky studie je nutno zdůraznit, že rozhodování o terapii pacientů se závažnou diagnózou kožního T lymfomu nemohlo být ovlivněno znalostí genotypů v genu pro endotelin-1, protože genotypizace se prováděla retrospektivně. Přesto se zdá, jako by tato informace byla zohledněna, čili že fototerapie byla do jisté míry aplikována „podle genotypu“ v polymorfismech genu pro endotelin-1. Tato skutečnost je pro lékaře velmi povzbudivá, protože svědčí o kvalitě klinické práce přes časté pochybnosti o jejím vědecky zdůvodněném podkladu.

#### Zkratky

CD4+	– cluster of differentiation 4+
CTCL	– cutaneous T-cell lymphoma
EDN-1	– gen pro lidský preproendotelin
ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	– receptory pro endotelin
HIF-1	– hypoxií indukovatelný faktor-1 (hypoxia inducible factor-1)
HLA	– human leukocyte antigen
MMP	– matric metaloproteináza
Pa	– pravděpodobnost rozdílu v alelických frekvencích
Pcorr	– korekce P na mnohonásobné srovnání
Pg	– pravděpodobnost rozdílu v distribuci genotypů
PUVA	– kombinace psoralenů a UVA
UV	– ultrafialový
UVB	– ultrafialové světlo pásma B
VEGF	– cévní endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

#### LITERATURA

1. **Gurwitz, D., Lunshof, J. E., Dedoussis, G. et al.:** Pharmacogenomics education: International Society of Pharmacogenomics recom-

mendations for medical, pharmaceutical, and health schools deans of education. *Pharmacogenomics J.*, 2005, 5, s. 221-225.

2. **Strasly, M., Cavallo, F., Geuna, M. et al.:** IL-12 Inhibition of Endothelial Cell Functions and Angiogenesis Depends on Lymphocyte-Endothelial Cell Cross-Talk. *Journal of Immunol.*, 2001, 166, s. 3890 až 3899.

3. **Pober, J. S., Citran, R. S.:** Immunologic interactions of T lymphocytes with vascular endothelium. *Adv. Immunol.*, 1991, 50, s. 261-302.

4. **Choi, J., Enis, D. R., Koh, K. P. et al.:** T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, 22, s. 683-709.

5. **Pober, J. S., Kluger, M. S., Schechner, J. S.:** Human endothelial cell presentation of antigen and the homing of memory/effector T cells to skin. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2001, 941, s. 12-25.

6. **Baron, E. D., Stevens, S. R.:** Phototherapy for cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatos. Ther.*, 2003, 16, s. 303-310.

7. **Yamauchi, R., Morita, A., Yasuda, Y. et al.:** Different susceptibility of malignant versus nonmalignant human T cells toward ultraviolet A-1 radiation-induced apoptosis. *J. Incest. Dermatol.*, 2004, 122, s. 477-483.

8. **Bagnato, A., Natali, P. G.:** Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J. Transl. Med.*, 2004, 2, s. 16.

9. **Salani, D., Taraboletti, G., Rosano, L. et al.:** Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization *in vivo*. *Am. J. Pathol.*, 2000, 157, s. 1703-1711.

10. **Tada, A., Suzuki, I., Im, S. et al.:** Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in the responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ.*, 1998, 9, s. 575-584.

11. **Vašků, A., Špinarová, L., Goldbergová, M. et al.:** The double heterozygote of two endothelin-1 gene polymorphisms (G8002A and -3A/-4A) is related to big endothelin levels in chronic heart failure. *Exp. Mol. Pathol.*, 2002, 73, s. 230-233.

12. **Popowski, K., Sperker, B., Kroemer, H. K. et al.:** Functional significance of a hereditary adenine insertion variant in the 5'-UTR of the endothelin-1 gene. *Pharmacogenetics*, 2003, 13, s. 445-451.

13. **Guruli, G., Pflug, B. R., Pecher, S. et al.:** Function and survival of dendritic cells depend on endothelin-1 and endothelin receptor autocrine loops. *Blood*, 2004, 104, s. 2107-2115.

14. **Gupta, R. A., Tejada, L. V., Tong, B. J. et al.:** Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2003, 63, s. 906-911.

15. **Knowles, J., Loizidou, M., Taylor, I.:** Endothelin-1 and angiogenesis in cancer. *Curr. BASF. Pharmacol.*, 2005, 3, s. 309-314.

16. **Spinella, F., Rosano, L., Di Castro, V. et al.:** Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in ovarian carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, s. 27850-27855.

*Studie byla financována z prostředků výzkumného záměru CEZ J07/98:141100002 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.*

PŮVODNÍ PRÁCE

## Příspěvek k farmakogenetice chronického srdečního selhání – betablokátory

Vašků A., <sup>1</sup>Špinarová L., Pávková-Goldbergová M., <sup>2</sup>Špinar J., <sup>3</sup>Souček M.,  
<sup>1</sup>Vítovec J.

Ústav patologické fyziologie LF MU, Brno

<sup>1</sup>I. interní kardiologická klinika LF MU a FN u sv. Anny, Brno

<sup>2</sup>Interní kardiologická klinika LF MU a FN, Brno

<sup>3</sup>II. interní klinika LF MU a FN u sv. Anny, Brno

### ABSTRAKT

**Východisko.** Aktivace sympatického nervového systému a systému renin-angiotenzin-aldosteron (RAS) zhoršuje progresi chronického srdečního selhání. Se zvýšenou aktivací tohoto systému byla asociována deleční alela D inserčně delečního polymorfizmu v genu pro angiotenzin I konvertující enzym (I/D ACE). Cílem této práce bylo testovat farmakogenetické asociace genotypu I/DACE s terapií betablokátory u pacientů s chronickým srdečním selháním.

**Metody a výsledky.** Do studie jsme zařadili celkem 241 s chronickým srdečním selháním, z nichž 63 % dostávalo betablokátor, 37 % pacientů beta blokátor nedostávalo. Pomocí metody polymerázové řetězové reakce jsme detekovali genotyp polymorfizmu I/D ACE na 2 % agaróze v UV světle. Pacienti s chronickým srdečním selháním a genotypem II v polymorfizmu I/D ACE byli mladší, dostávali častěji betablokátory a diuretika, méně často aspirin, měli nižší glykémii a hladinu TNF $\alpha$  v krvi. Prokázali jsme signifikantní rozdíl v distribuci genotypů i frekvenci alel polymorfizmu I/D ACE mezi pacienty s doporučenou dávkou betablokátorů a pacienty bez terapie betablokátory. Pokud jsme hodnotili současně terapii inhibitory ACE a betablokátory, zaznamenali jsme pokles genotypů ID+DD u pacientů s nižším než 50% dávkováním pro obě skupiny léků současně oproti všem ostatním

**Závěry.** U pacientů s chronickým srdečním selháním jsme prokázali interakci mezi genotypem I/D ACE a podáváním a dávkováním betablokátorů a jeho farmakologickou interakci s inhibitory ACE.

**Klíčová slova:** I/D ACE-polymorfismus-terapie-betablokátory-inhibitory ACE-farmakogenetika.

### ABSTRACT

*Vašků A., Špinarová L., Pávková-Goldbergová M. et al.: Pharmacogenetics of Chronic Heart Failure – Beta Blockers*  
**Background.** Activation of the renin-angiotensin (RAS) cascade and sympathetic nervous systems adversely affect heart failure progression. ACE deletion allele (ACE D) of insertion /deletion polymorphism in the gene coding for angiotensin-I converting enzyme is associated with increased renin-angiotensin activation. The aim of the study was to test pharmacogenetic associations of I/D ACE genotype with beta blockers therapy in patients with chronic heart failure.

**Methods and Results.** A total of 241 patients were included in the study, 63% with betablocker therapy and 37% without it. Using polymerase chain reaction (PCR) method, I/D genotype was detected in 2% agarose electrophoretic gel in UV light. Patients with chronic heart failure and with the II genotype of polymorphism I/D ACE were younger, with more frequent administration of betablockers and diuretics, with less regular administration of aspirin and with lower glycemia and plasma TNF $\alpha$  level. A significant difference in genotype distribution and allele frequency between patients with recommended dose and patients without betablockers therapy was proved, when a decrease of the D allele in patients with betablockers had been observed. Contemporary evaluating of AC inhibitor and betablocker therapy, a decrease of ID+DD genotypes in patients with lower than 50% recommended dose compared with the others was found.

**Conclusions.** In this study, we proved statistically significant interactions between genotypes in I/D ACE polymorphism, betablocker administration, its dosing and pharmacogenetic interaction with ACE inhibitors in patients with chronic heart failure.

**Key words:** I/D ACE polymorphism, therapy with beta blockers, AC inhibitors, pharmacogenetics

Va.

Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 148–152.



Srdeční selhání patří mezi nejčastěji se vyskytující klinický syndrom v kardiologii s vážnou prognózou. Je jednou z nejčastějších příčin úmrtí z kardiovaskulárních příčin. Čím horší stupeň srdečního selhání, tím je mortalita větší – u pacientů ve funkční klasifikaci NYHA III a IV je jednoroční mortalita až 50 %. Kromě toho, že srdeční selhání významně ovlivňuje prognózu pacientů, ovlivňuje i kvalitu života.

Model srdečního selhání se v souvislosti s novými poznatky neustále upravoval a v současné době se používá tzv. **neurohumorální model**. Ten vysvětluje progresi srdečního selhání aktivací endogenních neurohumorálních systémů, které v konečném důsledku negativně ovlivňují hemodynamiku a mají přímé toxické účinky na myokard (1).

Čím těžší je srdeční selhání, tím horší je prognóza. Nezávislými prognostickými faktory jsou pokles komorové funkce (EF pod 20 %, nízký klidový minutový výdej), vysoká systémová cévní rezistence, nízká vrcholová spotřeba kyslíku (pVO<sub>2</sub> pod 14 ml/kg/min), hyponatrémie pod 135 mmol/l, věk, diagnóza ischemické choroby srdeční (ICHS), kardiotorakální index, poměr VE/VCO<sub>2</sub> a variabilita srdeční frekvence (2). Ještě vyšší výpovědní hodnotu mají neurohumorální ukazatele: vysoká hladina noradrenalinu, atriálního natriuretického peptidu či jeho prekursoru N terminálního fragmentu proANP, brain natriuretického peptidu BNP či jeho inaktivního fragmentu NT-proBNP. Jiným faktorem s negativní prediktivní hodnotou je hladina big endotelinu (3) a tumor necrosis faktoru alfa (TNF).

Plazmatické koncentrace big endotelinu korelují jak s echokardiografickými, tak s hemodynamickými parametry, zejména s tlakem v plicnici a v zaklínění, a to jak v klidu, tak při zátěži, s tlakem v plicnici a s plicní vaskulární rezistencí, s endsystolickým objemem levé komory, tedy s parametry, které jsou udávány jako významné prognostické markery (4). Naše studie ukazuje, že pacienti s těžkým srdečním selháním mohou být rozděleni na různé skupiny s rozdílným rizikem kardiálního úmrtí na podkladě plazmatických koncentrací big endotelinu, které tak mohou pomoci v rozhodování před zařazením pacientů na čekací list na srdeční transplantaci (5).

V terapii chronického srdečního selhání jsou základními lékovými skupinami, které zlepšují prognózu pacientů, inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEI) a betablokátory.

Betablokátory zlepšují u pacientů se srdečním selháním ejekční frakci levé komory a snižují srdeční mortalitu. Je však známo, že odpověď na tuto terapii se u jednotlivých pacientů liší (6). Úprava remodelace spočívající ve snížení masy myokardu a srdečních průměrů společně se zmenšením mitrální regurgitace je u podání betablokátorů daleko významnější než u ACE inhibitorů. Zlepšení energetiky systolické funkce a zmenšení diastolického diametru vede ke zlepšení ejekční frakce, v průměru o 9 %. To je příčinou zhruba dvojnásobného snížení dlouhodobé mortality proti ACE inhibitorům (38 % vs. 18 %, zejména také snížením náhlých smrtí), snížení morbidit a rehospitalizací. K léčení jsou indikováni nemocní se systolickým chronickým srdečním selháním NYHA I až IV. Věk nerozhoduje, prospěch je u všech stejný (7).

Aktivace sympatického nervového systému a systému renin-angiotenzin-aldosteron (RAS) zhoršuje progresi chronického srdečního selhání. Se zvýšenou aktivací tohoto systému se často spojuje deleční alela D inzerčně delečního polymorfismu v genu pro angiotenzin-I konvertující enzym (I/D ACE), která má u zdravých jedinců nejvyšší plazmatickou aktivitu, což jsme prokázali i na naší populaci (8). U 328 pacientů se systolickou dysfunkcí byla prokázána hraničně signifikantní asociace s délkou přežití bez transplantace, kdy nižší délka přežití byla zjištěna u nositelů alely D, pokud pacienti nebyli léčeni betablokátory. Pokud pacienti dostávali betablokátory, žádný efekt alely D

na přežití nebyl zjevný (9). Výsledky této studie vedly k hypotéze potenciální farmakogenetické interakce mezi polymorfismem I/D ACE a betablokátory u chronického srdečního selhání. V další studii nebyla interakce polymorfismu I/D ACE s ejekční frakcí levé komory ani jinými prognostickými parametry u pacientů s chronickým srdečním selháním potvrzena (10), takže dosavadní výsledky jsou, což je v oblasti asociačních studií častým jevem, kontraverzní. V současné době se dá říci, že nastala doba pro klinické vyšetřování genetickým ukazatelů, které mohou pomoci zvýšit odpověď nemocných na léčbu, protože každému pacientovi bude možno ordinovat stále přesněji „farmakoterapii na míru“. V současné době jsou k dispozici první souhrnné studie, které vysvětlují, jak variabilita v genech pro funkci endotelu a patogenezi chronického srdečního selhání může ovlivnit nejen vznik a rozvoj chronického srdečního selhání, ale také účinky léčby (11).

V naší studii jsme testovali potenciální farmakogenetické interakce terapie betablokátorů s populačně četným inzerčně delečním polymorfismem v genu pro angiotenzin-I konvertující enzym (I/D ACE).

## SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODY

### Pacienti

Do studie bylo zařazeno 241 pacientů s chronickým srdečním selháním, diagnostikovaných a léčených ve třech brněnských interních klinikách. Základní charakteristiky souboru nemocných uvádí tabulka 1. Tabulka 2 popisuje další farmakologickou léčbu u těchto pacientů.

Studie byla schválena Komisí pro etiku lékařských experimentů na člověku na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity v Brně (64/93, 1993). Podepsaný informovaný souhlas všech pacientů je archivován.

Tab. 1. Demografická data

počet (M/Ž)	241 (190/51)
věk (M/Ž, medián, rozsah)	54,5 (21–84)/58 (21–91)
DKMP	97 (40 %)
ICHS	144 (60 %)
hypertenze	100 (41 %)
angina pectoris	64 (27 %)
infarkt myokardu	125 (52 %)
chronická renální insuficience	28 (12 %)
ischemická choroba dolních končetin	12 (5 %)
diabetes mellitus, typ II	78 (32 %)

Tab. 2. Farmakologická léčba

inhibitory ACE A/N	241 (100 %)
beta blokátory A/N	150/91 (62 %)
ACEI + BB A/N	150/91 (62 %)
diuretika A/N	214/27 (89 %)
aspirin A/N	133/108 (55 %)
inhibitory Ca A/N	7/233 (3 %)
verospiron A/N	157/84 (65 %)
digoxin A/N	163/78 (68 %)
inzulín A/N	20/221 (8 %)
perorální antidiabetika A/N	46/195 (19 %)
antikoagulační terapie A/N	52/189 (22 %)
nitráty A/N	89/152 (37 %)
milurit	57/184 (24 %)
hypolipidemika	107/134 (44 %)

**Tab. 3.** Terapie betablokátory

Gen jméno BB	počet pacientů	50% doporučené dávky
carvediol	93 (39 %)	25/68 (27 %)
metoprolol	55 (23 %)	9/46 (16 %)
bisoprolol	2 (1 %)	1/1 (50 %)
bez terapie BB	91 (37 %)	
celkový součet	241	

**Genotypizace**

Genomická DNA byla izolována ze vzorků periferní venózní krve standardní metodikou pomocí proteinázy K.

Polymorfismus I/D ACE se stanovoval pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) podle Rigatové et al. (12). Produkty PCR se analyzovaly v gelové elektroforéze v přítomnosti ethidium bromidu v ultrafialovém světle jako úsek o délce 190 párů bází u deleční a 490 párů bází u inzerční alely.

**Statistické metody**

Rozdíly v genotypových distribucích (Pg) a shoda s Hardy-Weinbergovým ekvilibriem jsme testovali pomocí testu  $\chi^2$ .

Rozdíly v alelických frekvencích (Pa), poměry genotypů a signifikance odds ratio se počítaly pomocí testu Fisher exact.

K dalším výpočtům byl používán test Kruskal-Wallisův a Mann Whitney (Statistica, Verze 6).

**VÝSLEDKY**

Celkem jsme hodnotili 241 nemocných s chronickým srdečním selháním. Zastoupení jednotlivých generických forem podávaných betablokátorů udává tabulka 3. Třicet devět procent pacientů dostávalo carvedilol, 23 % metoprolol, 1 % bisoprolol a 37 % pacientů

nebyl betablokátor podáván. Část pacientů byla léčena nižší než 50% doporučenou dávkou, žádný pacient nedostával maximální dávku betablokátoru (=200 % doporučení dávky).

Z farmakogenetického hlediska jsme prokázali, že pacienti s chronickým srdečním selháním a genotypem II v polymorfismu I/D ACE byli mladší, dostávali častěji betablokátory a diuretika, méně často aspirin, měli nižší glykémii a hladinu TNF $\alpha$  v krvi (tab. 4).

Z různých hledisek je v klinické praxi velmi důležité posuzovat dávkování. Pokud jsme srovnali pacienty podle dávkování betablokátorů v dalších klinických a biochemických parametrech, našli jsme signifikantní rozdíly mezi těmito pacienty v srdeční frekvenci, hladinách reninu a TNF $\alpha$  v plazmě (tab. 5). Dále jsme prokázali signifikantní rozdíl v distribuci genotypů i frekvenci alel polymorfismu I/D ACE mezi pacienty s doporučenou dávkou betablokátorů a pacienty bez terapie betablokátory (tab. 6). Odds ratio pro genotypy ID a DD bylo 3,26 (95% konfidenční interval 1,55–6,88; P=0,001) ve skupině pacientů bez terapie betablokátory.

Pokud jsme hodnotili současně terapii inhibitory ACE a betablokátory, zaznamenali jsme pokles genotypů ID+DD u pacientů s nižším než 50% dávkováním pro obě skupiny léků současně oproti všem ostatním (tab. 7). Odds ratio pro II u pacientů s nižší než poloviční dávkou obou léků je 2,84 (22/38 vs. 30/147, 95% konfidenční interval 1,47–5,46; P=0,002).

Naše výsledky je tedy možno shrnout: Prokázali jsme rozdíly mezi pacienty s chronickým srdečním selháním podle toho, zda byli nositeli genotypu II nebo ID+DD. Rozdíly v dávkování betablokátorů projevující se v hodnotách srdeční frekvence, reninu a hladinách TNF $\alpha$  se promítly v tomto případě i do rozdílu v genotypových distribucích a alelických frekvencích polymorfismu I/D ACE. Frekvence alely D, která je všeobecně považována za kardiovaskulárně rizikovou, plynule stoupá od pacientů neléčených betablokátory přes pacienty s 50% doporučenou dávkou až k pacientům s doporučenou dávkou (tab. 6). Podobný trend je zřetelný i při současném hodnocení terapie inhibitory ACE a betablokátorů.

**Tab. 4.** Rizika genotypů polymorfismu I/D ACE u pacientů s chronickým srdečním selháním

	Polymorfismus I/D ACE		odds ratio	P
	ID+DD	II		
věk (medián, rozsah, roky)	57 (21–83)	51 (30–91)		0,002
betablokátory A/N	106/80	40/11	2,74 pro podávání betablokátorů u II	0,004
diuretika A/N	161/25	50/1	7,76 pro podávání diuretik u II	0,01
aspirin A/N	109/77	21/30	0,49 pro podávání aspirinu u II	0,02
glykémie (medián, rozsah, mmol/l)	6,0 (1,6–17,5)	5,5 (4,2–16,8)		0,0002
hladiny TNF $\alpha$ (medián, rozsah, ng/l)	70 (0,1–949,5)	2,2 (0,1–121,8)		0,03

P – pravděpodobnost rozdílu

**Tab. 5.** Signifikantní rozdíly v měřených ukazatelích v závislosti na dávce betablokátorů

	Srdeční frekvence (medián, rozsah, min <sup>-1</sup> )	renin ( $\mu$ mol/l)	hladiny TNF $\alpha$ v plazmě (ng/l)
pacienti s doporučenou dávkou	76 (48–95)	3,64 (0,02–30,1)	2,7 (0,1–279)
pacienti s nižší než 50% dávkou	78 (52–100)	8,13 (0,01–33,7)	2,6 (0,1–949)
pacienti bez terapie betablokátory	80 (60–130)	9,96 (0,1–229)	95,9 (0,1–291,6)
P	0,0004	0,004	0,001

P – pravděpodobnost rozdílu

**Tab. 6.** Rozdíly v distribuci genotypů a frekvence alel polymorfismu I/D ACE ve skupinách pacientů podle dávkování betablokátorů

	II	ID	DD	I/D ACE		Pg	Pa
				I	D		
pacienti s doporučenou dávkou (N=113)	35	49	29	0,527	0,473	0,005	0,002
pacienti bez terapie betablokátorů (N=91)	11	46	34	0,374	0,626		
pacienti s nižší než 50% dávkou (N=33)	6	17	10	0,439	0,561		

Pg – pravděpodobnost rozdílu v distribuci genotypu, Pa – pravděpodobnost rozdílu ve frekvenci alel

**Tab. 7.** Rozdíly v distribuci genotypů a frekvenci alel podle dávkování beta blokátorů současně s ACEI

	Pacienti s nižší než 50% dávkou BB a nižší než 50% dávkou ACEI (N=60)			ostatní (N=177)			Pg	Pa
	II	ID	DD	II	ID	DD		
I/D ACE	22 (37 %)	23 (38 %)	15 (25 %)	30 (17 %)	89 (50 %)	58 (33 %)	0,006	0,009

Pg – pravděpodobnost rozdílu v distribuci genotypu, Pa – pravděpodobnost rozdílu ve frekvenci alel

### DISKUZE

Je všeobecně známo, že odpověď na léčbu mnohých nemocí se u jednotlivých pacientů liší. V případě betablokátorů se nabízí k testování hypotéza, že zdrojem reakce nemocných na léčbu betablokátorů je variabilita genů pro adrenergní receptory.

Ve velkém souboru 199 pacientů se stabilním chronickým srdečním selháním byl sice prokázán signifikantní pokles srdeční frekvence a nárůst ejekční frakce levé komory, ale významná asociace mezi těmito dvěma parametry a 5 funkčními polymorfismy v genech pro beta1 (beta1ARGly389Arg, beta1ARSer49Gly) a beta2 adrenergní receptory (beta2ARGly16Arg, beta2ARGln27Glu a beta2ARThr164Ile) prokázána nebyla, a to ani před terapií, ani v důsledku terapie betablokátorů (6). V jiné studii byl prokázán signifikantní nárůst ejekční frakce u pacientů s chronickým srdečním selháním a s genotypem Arg389Arg v polymorfismu beta1ARGly389Arg, léčených betablokátorů. U pacientů s tímto genotypem došlo k signifikantně větší redukci enddiastolického a endsystolického průměru levé komory ve srovnání s homozygoty Gly389. K větší redukci těchto průměrů došlo také u pacientů s variantou Gly49 v polymorfismu beta1ARSer49Gly. U těchto dvou genetických variant beta1 adrenergního receptoru můžeme tedy očekávat větší remodelační efekt betablokátorů (13). Rozdíly v parametrech odrážejících remodelaci levé komory po terapii betablokátorů mezi nositeli genotypu beta1ARArg389Arg a nositeli obou dalších genotypů tohoto polymorfismu (beta1ARArg389Gly a beta1ARGly389Gly) prokázali také Stanton et al. (14). Autoři další práce testovali hypotézu, že genotyp beta2-adrenergního receptoru, který může ovlivnit odpověď pacienta na terapii carvedilolem. Mezi pacienty s oběma alelami Gln27 v polymorfismu beta2ARGln27Glu byl nalezen signifikantně nižší počet těch, kteří dobře odpovídali na terapii betablokátorů, oproti heterozygotům a homozygotům Glu27 (15).

Také jiné geny, například ovlivňující angiogenezi, mohou být považovány za kandidátní pro chronické srdeční selhání, respektive jeho reakci na léčbu. Polymorfismy v promotoru genu pro vaskulární endoteliální růstový faktor v pozici +405 a -460 byly vyšetřeny u 596 pacientů s chronickým srdečním selháním, kteří byly sledováni ve studii MERIT-HF (Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in Heart Failure (MERIT-HF)). Genotyp CC v pozici +405 CC byl u pacientů s chronickým srdečním selháním

asociován s horším klinickým průběhem a nižšími plasmatickými hladinami VEGF (16).

Podle našich zkušeností jsou také geny v systému renin angiotenzin aldosteron bez ohledu na terapii asociovány s chronickým srdečním selháním, ale zřejmě v komplikovanějších interakčních vztazích. Prokázali jsme například zvýšenou incidenci asociovaného genotypu GGMT v genu pro angiotenzinogen (polymorfismy A(-6)G a M235T) u pacientů s chronickým srdečním selháním, zejména žen (17). Složitější vztahy mezi genetickou variabilitou, chronickým srdečním selháním a intermediálním fenotypem (hladinou cholesterolu) jsme zjistili v promotoru genu pro matrix metaloproteinázu 2 (MMP-2). Prokázali jsme, že heterozygotnost v polymorfismu -735C/T MMP-2 s sebou nese sedminásobné odds ratio pro muže, nehypertoniky s chronickým srdečním selháním s nižší hladinou cholesterolu (méně než 5 mmol/l) (18).

Terapeutický vliv betablokátorů v kombinaci s vysokou dávkou inhibitorů ACE byl zhodnocen jako nejvyšší u pacientů s genotypem DD. Má se za to, že vyšší dávky inhibitorů ACE snižují vliv alely D a že jsou v kombinaci s betablokátorů nejúčinnější právě u homozygotů DD (19). U našich pacientů se maximální dávky ACE inhibitorů podávali jen u 7 pacientů, proto nemůžeme činit signifikantní závěry. Všichni tito pacienti byli muži, 4 z nich dostávali betablokátorů (genotypy II:ID:2DD), 3 pacienti nedostávali betablokátorů (s genotypy ID:2DD). Frekvence alely D v této skupině (1 II:2 ID:4 DD) je zdaleka nejvyšší ze všech hodnocených skupin (0,714).

K diskuzi nad výsledky naší studie je nutno zdůraznit, že rozhodování o léčbě betablokátorů a o jejich dávkování se řídilo výhradně klinickými aspekty onemocnění jednotlivých pacientů a nemohlo být ovlivněno znalostí genotypů I/D ACE, protože kliničtí specialisté tuto informaci prospektivně neměli k dispozici.

### Zkratky

- ACE – angiotenzin-I konvertující enzym
- ACEI – inhibitory angiotenzin-I konvertujícího enzymu
- ANP – atriální natriuretický peptid
- BNP – mozkový natriuretický peptid
- EF – ejekční frakce
- I/D ACE – inzerčně deleční polymorfismus v genu pro angiotenzin-I konvertující enzym
- ICHS – ischemická choroba srdeční

MMP-2	– matrix metaloproteinázu 2
NT-proBNP	– aminoterminální zbytek natriuretického propeptidu typu B (N-terminal pro-brain natriuretic peptide)
Pa	– pravděpodobnost rozdílu ve frekvenci alel
PCR	– polymerázová řetězová reakce
Pg	– pravděpodobnost rozdílu v distribuci genotypu
PVO2	– vrcholová spotřeba kyslíku
RAS	– renin-angiotenzin-aldosteron
TNF	– tumor necrosis factor
VE/VCO2	– respirační účinnost

## LITERATURA

1. **Swedberg, K.:** Importance of neuroendocrine activation in CHF. Eur. J. Heart Fail., 2000, 2, s. 299-333.
2. **Špinar, J., Vítovec, J., Spáč, J. et al.:** Non invasive prognostic factors in chronic heart failure. One year survival of 300 patients with diagnosis of chronic heart failure due to ischemic heart disease or dilative cardiomyopathy. Int. J. Cardiol., 1996, 56, s. 283-288.
3. **Staněk, B., Frey, B., Hulsmann, M. et al.:** Validation of big endothelin plasma levels compared with established neurohumoral markers in patients with severe chronic heart failure. Transpl. Proc., 1997, 29, s. 595-596.
4. **Špinarová, L., Toman, J., Pospíšilová, J. et al.:** Humoral response in patients with chronic heart failure. Int. J. Cardiol., 1998, 65, s. 227-232.
5. **Špinar, J., Vítovec, J., Špinarová, L. et al.:** The value of big endothelin level and hemodynamic variables in heart transplant candidates. Cor Vasa, 2000, 42, s. 495-500.
6. **de Groot, P., Helbecque, N., Lamblin, N. et al.:** Association between beta-1 and beta-2 adrenergic receptor gene polymorphisms and the response to beta-blockade in patients with stable congestive heart failure. Pharmacogenet. Genomics, 2005, 15, s. 37-42.
7. **Špinarová, L., Špinar, J.:** Beta blokátory v léčbě chronického srdečního selhání. Vnitř. Lék., 1998, 44, s. 558-562.
8. **Cidl, K., Střelcová, L., Znojil, V., Vacha, J.:** Angiotensin I-converting enzyme (ACE) polymorphism and ABO blood groups as factors code-termining plasma ACE activity. Exp. Hematol., 1996, 24, s. 790-794.
9. **McNamara, D. M., Holubkov, R., Postava, L. et al.:** Pharmacogenetic interactions between angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. J. Am. Coll. Cardiol., 2004, 44, s. 2019-2026.
10. **de Groot, P., Helbecque, N., Lamblin, N. et al.:** Beta-adrenergic receptor blockade and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with chronic heart failure. Eur. J. Heart Fail., 2004, 6, s. 17-21.
11. **McNamara, D. M.:** Pharmacogenetics in heart failure: genomic markers of endothelial and neurohumoral function. Congest. Heart Fail., 2004, 10, s. 302-308.
12. **Rigat, B., Hubert, C., Corvol, P., Soubrier, F.:** PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). Nucleic Acids Res., 1992, 20, s. 1433.
13. **Terra, S. G., Hamilton, K. K., Pauly, D. F. et al.:** Beta1-adrenergic receptor polymorphisms and left ventricular remodeling changes in response to beta-blocker therapy. Pharmacogenet. Genomics, 2005, 15, s. 227-234.
14. **Stanton, T., Inglis, G. C., Padmanabhan, S. et al.:** Variation at the beta-1 adrenoceptor gene locus affects left ventricular mass in renal failure. J. Nephrol., 2002, 15, s. 512-518.
15. **Kaye, D. M., Smirk, B., Williams, C. et al.:** Beta-adrenoceptor genotype influences the response to carvedilol in patients with congestive heart failure. Pharmacogenetics, 2003, 13, s. 379-382.
16. **van der Meer, P., de Boer, R. A., White, H. L. et al.:** The VEGF +405 CC promoter polymorphism is associated with an impaired prognosis in patients with chronic heart failure: a MERIT-HF substudy. J. Card. Fail., 2005, 11, s. 279-284.
17. **Goldbergová, M., Špinarová, L., Špinar, J. et al.:** Association of two angiotensinogen gene polymorphisms, M235T and G(-6)A, with chronic heart failure. Int. J. Cardiol., 2003, 89, s. 267-272.
18. **Vašků, A., Goldbergová, M., Holla, L. I. et al.:** Two MMP-2 promoter polymorphisms (-790T/G and -735C/T) in chronic heart failure. Clin. Chem. Lab. Med., 2003, 41, s. 1299-1303.
19. **McNamara, D. M., Holubkov, R., Janosko, K. et al.:** Pharmacogenetic interactions between beta-blocker therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. Circulation, 2001, 103, s. 1644-1648.

Studie byla financována z prostředků výzkumného záměru CEZ J07/98:141100002 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a v rámci Výzkumného záměru MŠMT - MSM0021622402.

## KOMENTÁŘ

# K článku Vašků A. et al. „Příspěvek k farmakogenetice chronického srdečního selhání – betablokátory“ *Farmakogenetika srdečního selhání – okno do Pandořiny skříňky*

S každou novou léčbou jakéhokoli onemocnění se setkáváme s otázkou, proč léčba, která sice globálně a statisticky významně zlepšuje osud nemocných, u některých pacientů selhává. Jaké jsou příčiny intolerance, nemožnosti dosáhnout cílových dávek či absence očekávaného benefitu. Řadu důvodů lze nalézt v tradičních a dobře známých faktorech, zahrnujících například pohlaví, komorbiditu, konkomitantní léčbu nebo vlivy prostředí. Ukazuje se však, že u mnoha nemocných s těmito důvody nevystačíme. Nové pohledy na příčiny nerovnoměrné odpovědi na terapii přináší poznatky farmakogenetiky.

Genové polymorfismy jsou v populaci časté mutace, které mohou ovlivňovat funkci kódovaných proteinů. Dopady polymorfismů mohou kolísat od zcela zanedbatelných změn funkce až po její vážnou alteraci. Současný výzkum farmakogenomiky u srdečního selhání se soustředil nejen na systémy ovlivňující metabolismus jednotlivých farmak, ale především jejich cíle, tj. neurohormonální kaskády a receptory. Nesmíme opomenout ani polymorfismy v jiných regulačních systémech a buněčných mechanismech, které se podílí na patogenezi srdečního selhání. Ač nepředstavují přímý cíl farmak, mohly by i ony významně modifikovat odpověď nemocných na terapii. Za všechny jmenujme například nedávné práce dokumentující význam polymorfismů adenosin monofosfát deaminázy 1 či tumor necrosis faktoru  $\alpha$  právě u nemocných se srdečním selháním (1, 2).

prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc.  
II. interní klinika kardiologie a angiologie 1. LF UK a VFN  
128 08 Praha 2, U Nemocnice 2  
fax: +420 224 912 154, e-mail: ales.linhart@lf1.cuni.cz



U srdečního selhání se dnes považují za léčbu první volby ACE inhibitory a betablokatory. I zde platí výše řečené, nemocní neodpovídají na terapii uniformně a mnoho příčin lze nalézt právě v jejich genetické výbavě.

V případě betablokátorů je výskyt nežádoucích účinků častý a pohybuje se mezi 25–43 %, časté je i přerušení léčby, k němuž dochází v 8–25 %. Vysvětlení je často již na úrovni metabolické výbavy ovlivňující farmakokinetiku jednotlivých molekul. Například v případě metoprololu může být až 6násobný rozdíl mezi tzv. špatnými metabolizéry a extenzivními metabolizéry v závislosti na genotypu cytochromu CYP 2D6. Proto není s podivem, že někteří nemocní nemusí tolerovat ani velmi nízké dávky léku.

Další vysvětlení můžeme nalézt v polymorfismech cílových receptorů či enzymů. V případě betablokátorů jde například o polymorfismus  $\beta_1$  adrenergního receptoru ( $\beta_1AR$ ), který může ovlivnit terapeutickou odpověď. V populaci jsou vysoce prevalentní především dva polymorfismy genu kódujícího  $\beta_1AR$  – Gly49Ser a Gly389Arg. Oba dva se jeví funkčně významné. Například prevalence Gly389Arg je zásadně odlišná podle rasové příslušnosti a mohla by přispívat k odlišné odpovědi na léčbu (3).

V případě systému renin-angiotenzin-aldosteron byl prokázán například možný vliv polymorfismu v genu pro  $AT_1$  receptor na vznik diastolické dysfunkce (4). Avšak nepochybně nejvíce studován byl deleční – inserční polymorfismus angiotenzin – konvertujícího enzymu (I/D polymorfismus ACE).

Nemocní s D alelou a zejména DD genotypem mají vyšší aktivitu ACE a význam této alely byl prokázán jak u nemocných s arteriální hypertenzí, tak se srdečním selháním. Efekt na prognózu nemocných po transplantaci byl studován i českými autory (5). U srdečního selhání byl prokázán prognostický dopad DD genotypu (6). Navíc byla dokumentována významná interakce mezi léčbou ACE inhibitory a betablokatory, kdy pacienti s DD genotypem, pokud betablokátor nedostávali, měli prognózu horší, než tomu bylo u genotypu II (7). Přes extenzivní studium I/D polymorfismu například u hypertenze jsou však data u srdečního selhání překvapivě chudá. V tomto čísle časopisu je publikována zajímavá studie brněnských autorů věnující se právě problematice interakce mezi genotypem a terapií nemocných se srdečním selháním. Jejich pozorování ukazují především na nutnost pečlivé korekce asocičních studií možnými vlivy konkomitantní léčby, která byla překvapivě u nemocných s DD genotypem častěji méně intenzivní. Jak sami autoři naznačují, je vysvětlení tohoto jevu pravděpodobně poměrně složité a odvíjí se od řady možných interakcí v genetické výbavě nemocných. Proto by předkládané pozorování mělo být impulzem pro další studie směřující k objasnění tohoto jevu.

## LITERATURA

1. **Kolek, M. J., Carlquist, J. F., Thaneemit-Chen, S. et al.:** The Role of a Common Adenosine Monophosphate Deaminase (AMPD)-1 Polymorphism in Outcomes of Ischemic and Nonischemic Heart Failure. *J. Card. Fail.*, 2005, 11, s. 677–683.
2. **Vadlamani, L., Iyengar, S.:** Tumor necrosis factor alpha polymorphism in heart failure/cardiomyopathy. *Congest Heart Fail.*, 2004, 10, s. 289–292.
3. **Terra, S. G., Pauly, D. F., Lee, C. R. et al.:** Adrenergic receptor polymorphisms and responses during titration of metoprolol controlled release/extended release in heart failure. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2005, 77, s. 127–137.
4. **Diez, J., Laviades, C., Orbe, J. et al.:** The A1166C polymorphism of the  $AT_1$  receptor gene is associated with collagen type I synthesis and myocardial stiffness in hypertensives. *J. Hypertens.*, 2003, 21, s. 2085–2092.
5. **Vančura, V., Hubáček, J., Málek, I. et al.:** Does angiotensin-converting enzyme polymorphism influence the clinical manifestation and progression of heart failure in patients with dilated cardiomyopathy? *Am. J. Cardiol.*, 1999, 83, s. 461–462.
6. **Andersson, B., Sylven, C.:** The DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with increased mortality in idiopathic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1996, 28, s. 62–67.
7. **McNamara, D. M., Holubkov, R., Janosko, K. et al.:** Pharmacogenetic interactions between beta-blocker therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 2001, 103, s. 1644–1648.

## Profylaxe proti vzteklině v USA

Vzteklina je akutní progresivní encefalitida vyvolaná RNA virem z rodiny lyssavirus. Všichni savci jsou vnímaví a mohou přenést virus lyssy, ale skutečnými rezervoáry jsou masožravci, zejména masožraví savci a dále *Chiroptera*, čili netopýři.

Lidská forma vztekliny je ve vyspělých zemích poměrně vzácná. S tím kontrastuje skutečnost, že lidská společnost je obklopena skutečným mořem vztekliny, která se udržuje mezi běžnou faunou. Enzootická ohniska jsou četná a není snadné je eliminovat. Hlavním rezervoárem jsou psi. Epidemiologické údaje v rozvojových zemích jsou značně podhodnoceny. V důsledku pokousání vzteklým psem dochází ve světě mimo vyspělé země každoročně k desítkám tisíc úmrtí a je nutno očkovat ročně miliony lidí. Profylaxe je efektivní a bezpečná, ale je nákladná a není vždy použita správně. Článek popisuje strategii, profylaktické postupy a zkušenosti z praxe ve Spojených státech amerických. Profylaxe po expozici virem se skládá ze tří kroků: z ošetření poranění, infiltrace rány rabickým imunním glo-

bulinem a podáváním vakcíny. Okamžité a důkladné omytí rány mýdlovým roztokem může významně snížit riziko infekce. Od roku 1979 nebyl v USA zaznamenán jediný případ selhání profylaxe.

V USA jsou registrovány 3 antirabické vakcíny, vážné reakce po jejich aplikaci se objevují vzácně. Moderní vakcíny získané z buněčných kultur vyvolávají reakce v menším procentu než vakcíny vyrobené z nervové tkáně. Nevýhoda spočívá ve faktu, že jejich imunita v průběhu času slabne. Po primární vakcinaci je nutná aplikace dodatečných booster dávek v případě, že dojde k nové expozici vůči vzteklině. Po této aplikaci dojde ke komplexní anamnestické odpovědi. Dojde ke stimulaci paměťových T-buněk, diferenciaci paměťových B buněk v buňky secernující protilátky a k uvolnění antigenních depot z lymfoidních germinálních center.

Důležitou součástí postexpoziční profylaxe je pasivní vakcinace virus-neutralizujícími protilátkami, která pokryje období, ve kterém teprve dojde k uplatnění pacientovy aktivní imunitní odpovědi. Došlo-li k viditelnému poranění, provede se infiltrace rány sérem. Moderní antirabic-

ká séra jsou velmi účinná. Preexpoziční vakcinace se doporučuje u osob, vystavených vysokému riziku (laboratorní pracovníci, veterináři, výzkumníci vztekliny, cestovatelé pohybující se oblastí s vysokým výskytem lyssy apod.). V případě expozice je pak třeba aplikovat nižší dávky vakcíny a není zapotřebí podávat antirabické sérum. Je třeba mít na paměti, že neexistují žádné absolutní protektivní hladiny virus-neutralizujících protilátek, proto u preventivně očkováných se doporučuje podávat po expozici dvě upomínací dávky bez ohledu na titer protilátek.

Profylaktické postupy v USA vycházejí ze směrnice a protokolů Poradního výboru pro imunizační praxi (ACIP). WHO shromažďuje informace o globální distribuci vztekliny a nabízí doporučení týkající postexpoziční vakcinace na své webové stránce.

### Literatura:

**Rupprecht, Ch. E., Gibbons, R. V.:** Prophylaxis against Rabies. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 2004, s. 2626–2635.

O. Louthan

PŮVODNÍ PRÁCE

## Konzultačná činnosť dvoch slovenských centier pri farmakoterapii v gravidite a laktácii

Tisoňová J., <sup>1</sup>Magulová L., <sup>1</sup>Göböová M., Wawruch M., Laššánová M.,  
Božeková L., Kriška M.

Farmakologický ústav LF UK, Bratislava  
<sup>1</sup>Oddelenie klinickej farmakológie FN, Nitra

### ABSTRAKT

**Východisko.** V práci prezentujeme analýzu na základe počtu a štruktúry konzultácií v oblasti užívania liekov v gravidite a laktácii v Liekovom informačnom centre v Bratislave a na Oddelení klinickej farmakológie v Nitre v období rokov 2000–2003.

**Metody a výsledky.** V oboch centrách otázky týkajúce sa gravidity a laktácie tvorili významnú časť z celkového počtu požadovaných informácií. Väčšina konzultovaných liekov je radená do kategórie C podľa FDA klasifikácie pre liečivá v gravidite. U týchto liekov štúdie na zvieratách preukázali riziko, ale údaje o podaní v tehotnosti nie sú dostupné a majú tak hraničnú použiteľnosť z hľadiska bezpečnosti. Rozhodovanie konzultantov centier o ich použití sa opiera o existujúce dostupné informačné zdroje. Závažným problémom je retrospektívny odhad liekového rizika v prípade, ak sa liečivo podávalo pred diagnostikovaním gravidity.

**Záver.** Hodnotenie rizika užitých liekov ženami vo fertilnom veku v skorej gravidite, riziko potreby dlhodobého podávania liečby počas gravidity a laktácie sa stáva čoraz viac potrebnou súčasťou odbornej činnosti v rámci klinickej farmakológie a klinickej farmácie v rámci budovania lokálneho systému „surveillance“ teratogénov.

**Kľúčové slová:** liek, teratogenicita, grávida, laktácia.

### ABSTRACT

*Tisoňová J., Magulová L., Göböová M., Wawruch M., Laššánová M., Božeková L., Kriška M.: Consultation Activity of Two Slovak Centres for Pharmacotherapy During Pregnancy and Lactation*

**Background.** In our paper we present analysis based on number and structure of consultations concerning drug used in pregnancy and lactation in the Drug Information Centre in Bratislava and at the Department of Clinical Pharmacology in Nitra during period 2000 to 2003.

**Methods and Results.** In both centres the questions related to pregnancy and lactation represented the significant part of total sum of the requested information. Vast majority of consulted drugs belonged to C category concerning FDA pregnancy drug risk classification. In these drugs animal studies have revealed a risk, but studies in pregnant women were not available and thus the drugs had limited applicability from view point of safety. Decisions of consultants regarding drug use were based on the availability of information sources.

A serious problem is the evaluation of retrospective drug risks in cases of drugs administered before pregnancy was confirmed.

**Conclusions.** The evaluation of drug risk in fertile age, especially in early pregnancy, long-term drug administration during pregnancy and lactation becomes indispensable within professional field of clinical pharmacy and pharmacology in developing local teratogen surveillance system.

**Key words:** drug, teratogenicity, pregnancy, lactation.

Ti.

Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 154–157.

Použitie liekov v gravidite a laktácii patrí stále k najrizikovejším terapeutickým postupom a je pod prísnyim etickým dohľadom. Indikáciou farmakoterapie pritom býva spravídla ochorenie matky a plod/dieťa býva len nežiadaným akceptorom lieku a s ním spojeného rizika. Rozsah a forma možného poliekového poškodenia sú nezriedka ťažko predvídateľné, nakoľko závisia od celého radu faktorov a ich súhry v čase (vlastnosti a kinetika lieku, zdravotný stav matky/plodu, enviromentálne faktory – biologické, fyzikálne, chemické a pod.). V súčasnosti vo svete, najmä vo vyspelých krajinách, užíva vysoké percento žien v priebehu gravidity farmaká. Udáva sa, že viac ako 40 % žien užíva v tomto období minimálne jeden liek okrem prípravkov s obsahom železa a vitamínov (1). Na Slovensku (resp.

v bývalom Československu) v minulosti predstavovala preskripcia liekov v gravidite jednu z najnižších v Európe, no v poslednom čase sa podstatne zvýšila k európskemu priemeru (2–4).

Hodnotiť riziko podania liekov v gravidite je potrebné v mnohých situáciách. Typické situácie v klinickej praxi sú:

1. Výber bezpečného lieku alebo liekov pre gravidnú pacientku na liečbu chronického ochorenia alebo ochorenia vzniknutého počas gravidity (diabetes mellitus, epilepsia, hypertenzia a pod.)

2. Časový odhad rizika následnej gravidity pre pacientku, ktorá absolvovala nejakú liečebnú kúru alebo krátkodobejšie ochorenie (napr. po liečbe akné isoretinoidmi, po cytostatickej liečbe, po liečbe psychózy a pod.).

MUDr. Jana Tisoňová, PhD.  
813 72 Bratislava, Sasínkova 4, SR  
fax: +421 59 357 508, e-mai: tisonova@yahoo.com

3. Retrospektívne stanovenia rizika užitia lieku vo fertílno-  
m veku v čase pred zistením gravidity v prípade pochybností pri roz-  
hodovaní o predčasnom ukončení gravidity.

Obdobne laktácia predstavuje ďalší vážny problém výberu lieku  
u kojacej matky vzhľadom k preferencii materského mlieka ako  
prirodeného spôsobu výživy novorodenca. Hladiny viacerých lie-  
kov môžu totiž dosiahnuť v určitých situáciách nebezpečnú toxickú  
hladinu pre dojča, ktoré má ešte obmedzené možnosti eliminácie  
lieku.

Hodnotenie rizika podávania liekov počas gravidity a laktácie sa  
stáva čoraz viac potrebnou súčasťou odbornej činnosti špecializova-  
ných pracovísk klinickej farmakológie a klinickej farmácie, ako  
napríklad pracoviská klinickej farmakológie, resp. špecializované  
centrá liekových informácií. Dôvodom je nielen neustále sa zvy-  
šujúci počet liekov používaných v humánnej medicíne, ale aj  
samotný nárast percepcie liekového rizika medicínskymi profesio-  
nálmi-predpisovateľmi liekov.

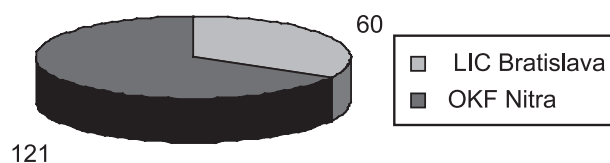
### SÚBOR A POUŽITÉ METÓDY

V dvoch slovenských centrách – Liekovom informačnom centre (LIC)  
v Bratislave a na oddelení klinickej farmakológie (OKF) krajskej nemocni-  
ce v Nitre sme analyzovali konzultácie týkajúce sa užitia liekov počas gra-  
vidity, pri plánovaní gravidity a počas dojčenia za 4-ročné obdobie (roky  
2000–2003). Konzultácie školených pracovníkov liekových centier boli  
poskytované väčšinou na základe telefonického požiadavky, bezplatne,  
výlučne ošetrovujúcim lekárom pacientok. Informácie o liekovom riziku sa  
opierali o relevantné literárne zdroje (databázy Micromedex, AISLP, SPC,  
PDR, internetové databázy, monografická literatúra). Porovnali sme roz-  
vrstvenie konzultácií do hlavných farmakologických skupín v oboch lieko-  
vých centrách.

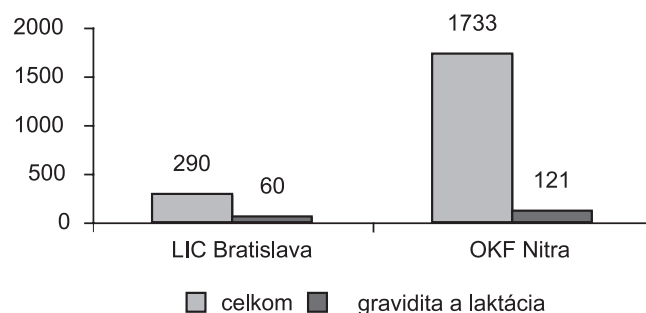
### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkový počet konzultácií v oboch centrách udáva graf 1. V prie-  
behu hodnotených 4 rokov (2000–2003) sa spolu poskytlo 181  
informácií o užívaní liečiv v gravidite a v laktácii; z toho 60 v LIC

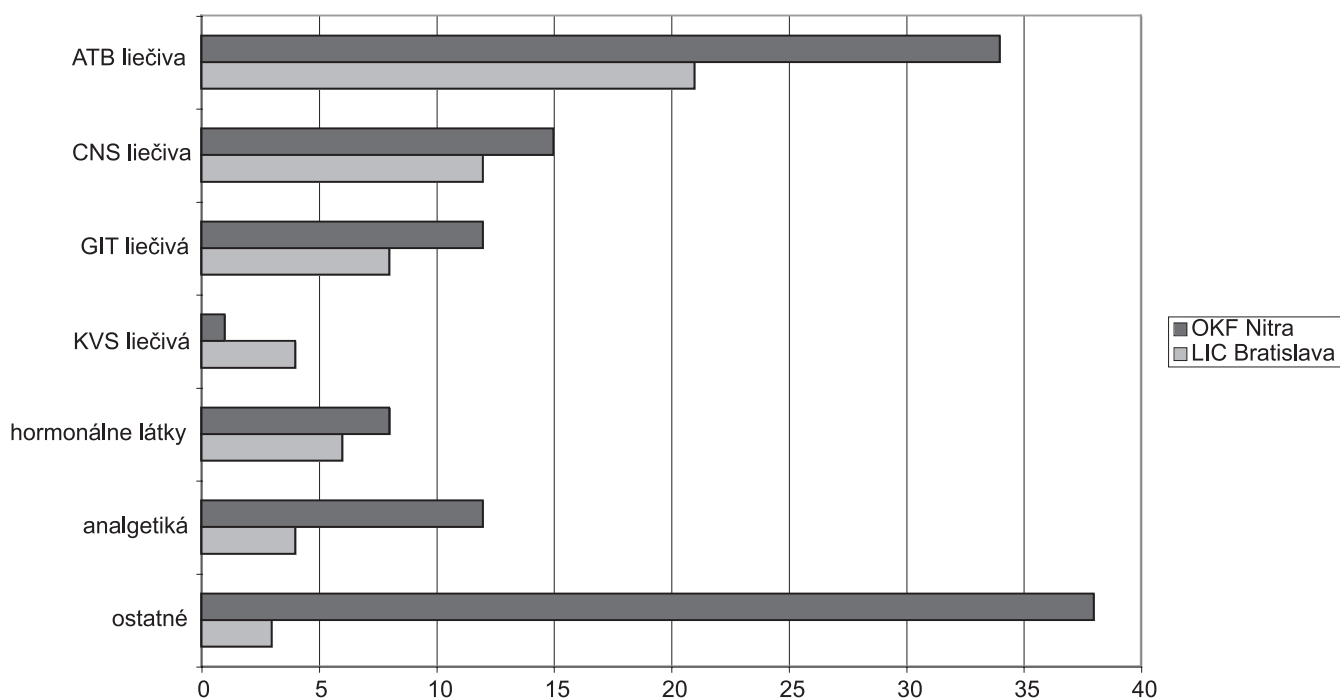
Bratislava a 121 na OKF v Nitre. Z celkového počtu konzultácií  
oboch centier predstavujú konzultácie o podaní liečiv v gravidite  
a laktácii 9% podiel. Podiel konzultácií týkajúci sa bezpečnosti uži-  
tia liečiv v gravidite a v laktácii bol v Bratislave až 3-násobne vyš-  
ší ako v Nitre (21 % vs. 7 %) k celkovému počtu klinicko-farmako-  
logických informácií. Absolútne čísla udáva graf 2. Konzultácie  
sme rozvrstviли podľa 6 najčastejšie použitých farmakodynami-  
ckých skupín – antiinfekčné látky (ATB), liečivá centrálného nervo-  
vého systému (CNS), liečivá gastrointestinálneho traktu (GIT), kar-  
diovaskulárne liečivá (KVS), hormonálne prípravky, analgetiká.  
V sledovanom spektre farmakodynamických skupín predstavovali



Graf 1. Konzultácie v gravidite a v laktácii v sledovaných centrách v rokoch 2000–2003



Graf 2. Podiel konzultácií v gravidite a v laktácii v sledovaných centrách v rokoch 2000–2003



Graf 3. Rozvrstvenie konzultácií v gravidite a v laktácii v sledovaných cenrách v rokoch 2000–2003

**Tab 1.** Klasifikácia rizikových kategórií v gravidite podľa FDA

<b>Kategória A:</b>	Chýbajú kontrolované štúdie u tehotných žien demonštrujúce riziko pre plod v 1. trimestri, nie je dôkaz o riziku v ďalších trimestroch; minimálne pravdepodobnosť poškodenia plodu.
<b>Kategória B:</b>	Na limitovanom počte tehotných žien sa nepreukázalo riziko.
<b>Kategória C:</b>	Štúdie na zvieratách ukázali riziko, ale údaje u gravidných žien chýbajú; indikácia ak je prínos liečby väčší ako riziko fetálneho poškodenia.
<b>Kategória D:</b>	Pozitívny dôkaz fetálneho rizika, liek sa môže použiť v ohrození života matky.
<b>Kategória X:</b>	Dokázané fetálne riziko, ktoré prevažuje nad prínosom, liek je kontraindikovaný v tehotenstve.

**Tab. 2.** Lieky a ich vplyv na embryo, modifikácia dľa (11)

Liek/skupina	efekt
ACE inhibítory	renálna tubulárna dysgenéza, renálne zlyhanie, znížená osifikácia lebky
anticholinergiká	neonatólny mekóniový ileus
antidiabetiká	neonatólna hypoglykémia
antityreoidálne liečivá	fetálna a neonatólna struma, hypotyreóza
thiamazol	aplázia kože
cyklofosfamid	CNS malformácie, sekundárne malignity
danazol, antiandrogény	maskulinizácia ženského plodu
dietylstilbestrol	genitourinárne defekty, vaginálny karcinóm,
fenytoín	defekty neuronálnej trubice
karbamazepín	defekty CNS, rastová retardácia
lítium	Ebsteinova anomália
metotrexát	malformácia končatín, CNS
misoprostol	Moebiusova sekvencia
nesteroidové antiflogistiká	konstrikcia ductus arteriosus, nekrotizujúca enterokolitída
psychoaktívne látky (barituráty, opioidy, benzodiazepíny) – neskorá gravidita	neonatólny syndróm z vysadenia,
retinoidy (isotretinoin, etretinát)	CNS, kraniofaciálne, kardiovaskulárne a iné defekty
tetracyklíny	anomálie kostí a zubov
talidomid	fokomélie, defekty vnútorných orgánov
trimetadión	tvárové a CNS defekty
valproová kyselina	defekty neuronálnej trubice
warfarín	defekty CNS, skeletu, Dandy-Walkerov syndróm

konzultácie ohľadom bezpečnosti antibiotickej liečby najpočetnejšiu skupinu (30 %). V spomínanom období na Slovensku utilizácia tejto skupiny v gravidite kolísala v rozmedzí 2–7% (2, 4). V početnosti konzultácií nasledovali liečivá CNS (antikonvulzíva, anxiolytiká, antipsychotiká) a gastrointestinálne liečivá. Konzultácie ohľadne výberu a použitia analgetík tvorili 9 % otázok, aj keď preskripcia tejto skupiny bola v sledovanom období v oboch centrách pomerne vysoká – až 16 % (2, 4). Podanie analgetík, najmä nesteroidových antiflogistik, sa všeobecne predpokladá pre riziko vzniku krvácajúcich komplikácií za rizikovejšie v 3. trimestri (hlavne tesne pred pôrodom) ako v prvom trimestri, kde sú zväčša analgetiká zaradené do B-kategórie (5).

Do kategórie „ostatné“ sa zahrnulo užívanie prípravkov s obsahom magnézia, antihistaminík, perorálnych antidiabetík, nízkomolekulových heparínov a anorektík. Rozvrstvenie konzultácií v oboch centrách udáva graf 3. Najčastejšie informáciu o lieku požadovali gynekológovia, klinickí farmakológovia a internisti. Významná časť liekov sa týkala problému stanoviska k riziku už užívaného lieku pred diagnostikovaním gravidity (52 % Bratislava, 28 % Nitra).

Väčšina z už podaných liekov počas gravidity v oboch centrách patrila do kategórie C (t. j. štúdie na zvieratách preukázali riziko, ale údaje o podaní v tehotnosti chýbajú). Rozhodovanie o ohrození plodu je v takomto prípade ťažké, keďže užitie lieku z tejto kategórie nemusí viesť v každom prípade k poškodeniu plodu.

Analýza poukazuje na význam konzultácií týkajúcich sa gravidity a laktácie v oboch centrách. Keďže klinické skúšanie nových liekov bolo u gravidných a dojčiacich žien z etického i odborného hľadiska donedávna neprípustné, informácie týkajúce sa stanovania rizika lieku pre dieťa pri podávaní v gravidite, resp. pri laktácii, sú kvantitatívne aj kvalitatívne limitované. Pri liekovom poradenstve je možné sa opierať o výlučne existujúce relevantné zdroje informácií. V prípade očakávaného fetálneho rizika lieku sa informácie o podaní (v prípadoch, ak riziká neliečeného ochorenia prevýšili očakávané riziko lieku) jednotlivých liekov u žien sumarizujú na základe publikovaných kauzistík, hlásení do národných centier pre bezpečnosť liekov a iných signálov po zvážení monografickej literatúry a informačných databáz



(MICROMEDEX, AISLP, internetové databázy). Metodicky pomáha klasifikácia na základe prijatého konsenzu odborných spoločností.

V súčasnosti vo svete existuje niekoľko systémov klasifikácie vyjadrujúcich riziká liekov počas gravidity. Najznámejšia americká klasifikácia vytvorená Food and Drug Administration (FDA) klasifikuje 645 liekov do 5 kategórií A-X (tab. 1) (6). Austrálska klasifikácia Australian Drug Evaluation Committee (ADEC) bezpečnosti rozvrstvuje 446 liekov do 7 skupín a švédsky katalóg – Swedish Catalogue of Approved Drugs (FASS) zahŕňa 527 liekov (7, 8). Len 61 liekov z 236 vyskytujúcich sa vo všetkých klasifikáciách je zaradených v rovnakej rizikovej skupine (9). V „najbezpečnejšej“ kategórii A je však iba minimálne percento liečiv, napríklad tiamín (B1) či kyselina nikotínová v nízkych dávkach (indikácia vyšších dávok ak kyselinu nikotínovú zaraďuje do kategórie C) (10). Pre posúdenie rizika je tak okrem kategórie rozhodujúca aj veľkosť dávky, celková dĺžka expozície, ale i jeho riziku vo vzťahu k času podania v jednotlivých trimestroch gravidity.

Riziko liekov v gravidite by sa nemalo podceňovať, avšak namiesto nie je ani nadhodnocovanie rizika. Odhaduje sa, že až v 90 % prípadov po expozícii známym teratogénom v prvom trimestri sa neprejaví škodlivé pôsobenie noxy (10). Dokázateľne teratogénnymi pre ľudský plod je približne 20 liekov alebo liekových skupín (11) (tab. 2). V liekovom poradenstve je obzvlášť problematické a chýlostivé rozhodovanie o riziku poškodenia plodu pri predchádzajúcej expozícii lieku, ak gravidita nebola včas diagnostikovaná. Spravidla ide o obdobie do 6. týždňa gestácie, kedy prebieha kľúčová časť organogenézy. Na konci tohoto obdobia je prakticky ukončený vývoj CNS, očí, uší (12).

Požiadavka absolútneho vyhýbania sa medikácii v gravidite je v praktickom živote nerealistická. Naviac je potrebné brať do úvahy aj riziká vyplývajúce z neliečenej choroby alebo nevhodne liečenej choroby matky pre zdravotný stav matky a vývojový program plodu (13). V tejto oblasti je potrebné, aby lekár už pri ordinácii liekov žene vo fertilnom veku volil lieky s najmenším rizikom pre prípad nečakaného otehotnenia. U žien s chronickým ochorením (hypertenzia, epilepsia, diabetes a pod.) je ideálne včasné nastavenie liečby na najmenej rizikový pre vývoj plodu už pri plánovaní gravidity, napríklad vysadenie ACE inhibítora u mladých hypertoničiek a voľba inej, bezpečnejšej skupiny (14). Základným predpokladom pre minimalizáciu liekového rizika tímová je spolupráca odborníkov pri plánovaní gravidity a koordinácii farmakoterapie.

O možnom liekovom riziku sa má matka informovať náležite ohľaduplným spôsobom, zohľadňujúcim jej psychosociálnu a emočnú úroveň v rámci individuálneho prístupu k pacientke. Farmaceut v súčasnosti môže významnou mierou prispieť k zníženiu rizika, ktoré ženu vystavuje zbytočnému psychickému stresu a obavy ohľadom možného poškodenia pri expedícii voľnopredajných alebo na predpis viazaných liekov (napr. tetracyklínových antibiotík, chinolónov, benzodiazepínov). Zvýšená pozornosť sa vyžaduje napríklad v prípade uroinfektov, ktoré v mnohých prípadoch bývajú spojené so začiatkom tehotnosti. Lekári, farmaceuti aj pacientky majú možnosť získať veľa dôležitých informácií z klinicko-farmakologických informačne orientovaných pracovísk na Slovensku. Naviac spolu-

práca s týmito pracoviskami je predpokladom budovania lokálneho systému „surveillance“ teratogénneho potenciálu liekov.

## ZÁVER

Predikcia rizika liekov v gravidite patrí k jedným najzložitejších problémov riešených v rámci medziodborových konzultácií. Riešenie situácií v tejto oblasti je vždy kompromisom medzi zvážením prínosov a rizík pre matku a plod a nezriedka prichádzajú k slovu aj dilemy etické a kultúrno-konfesijné. Pri ordinácii lieku každej žene vo fertilnom veku by mal lekár brať do úvahy možnú graviditu, resp. upozorniť pacientku primeraným spôsobom o vhodnosti lieku v prípadnej tehotnosti. Obdobne farmaceut pri expedícii liekov by mal automaticky poskytnúť takúto informáciu. Lekári, farmaceuti, ale pacientky majú možnosť získať veľa dôležitých informácií z klinicko-farmakologických informačne orientovaných pracovísk na Slovensku.

## Zkratky

ACE	– angiotenzín konvertujúci enzým
AISLP	– automatizovaný informačný systém liečivých prípravkov
ATB	– antiinfekčné látky
CNS	– centrálny nervový systém
GIT	– gastrointestinálny trakt
KVS	– kardiovaskulárne liečivá
PDR	– physicians desk reference
SPC	– summary of product characteristics (súhrn údajov o prípravku)

## LITERATÚRA

1. Reid, J. L., Rubin, P. C., Whiting, B.: Clinical Pharmacology, 6. ed. Oxford Blackwell Science Ltd., 2001, s. 37-42.
2. Lukáčová, I., Kriška, M., Božeková, L.: The utilization of drugs in pregnancy in Slovak Republic. BJCP, Abstracts of CPT 2000, Florencia, 2000, s. 141.
3. Magulová, L., Göbšová, M., Sirotiaková, J. et al.: Consultations on safe drugs use in pregnancy and lactation. Book of Abstracts of 33. European Symposium on Clinical Pharmacy, Praha, 2004; s. 38.
4. Ďurišová, A., Magulová, L.: Drug use problem in pregnancy. Bratisl. Lek. Listy, 2004, 105, s. 123-124.
5. Webster W. S., Freeman, J. A. D.: Prescription drugs and pregnancy. Expert. Opin. Pharmacother., 2003, 3, s. 949-961.
6. www.fda.gov
7. Janekova, E.: Stanovenie bezpečnosti farmakoterapie v gravidite. Interná Med., 2002, 2, s. 316-317.
8. FASS 2002 (The Swedish catalogue of approved medical products)
9. www7.health.gov.au/tga/docs/html/adec/adec.htm
10. Levine, G. L.: Pocket guide to commonly prescribed drugs, 3. ed. Appleton&Lange, 1999, 422 s.
11. Irl, C., Hasford, J.: Assessing the safety of drugs in pregnancy. Drug Safety, 2000, 22, s. 169-177.
12. Vallance, P.: Drugs and the fetus. BMJ, 1996, 312, s. 1053-1054.
13. Kriška, M.: Vybrané kapitoly z farmakológie. Fetálna a neonatálna farmakológia. Polygrafické stredisko UK, 1992, 49 s.
14. Suchopár, J.: Léky v těhotenství. Praha, Panax, 2000, 70 s.

KOMENTÁŘ

## K článku autorů Tisoňová J. et al. „Konzultačná činnosť dvoch slovenských centier pri farmakoterapii v gravidite a laktácii“

Farmakologická léčba v těhotenství ovlivňuje nejenom základní onemocnění matky, ale i plod. Správné a indikované léčení matky zlepšuje podmínky vývoje plodu, ale někdy může naopak vyvolat komplikace. Nejrizikovější etapou těhotenství je první trimestr, zejména období 3.–11. týdne, ve kterém mohou vzniknout kongenitální malformace. Ve druhém a třetím trimestru mohou léčiva nepříznivě ovlivnit růst a funkční vývoj, nebo působit toxicky na tkáň plodu. Léčiva podaná těsně před porodem mohou někdy nežádoucím způsobem ovlivnit jeho průběh, případně poškodit novorozence po porodu.

Rozhodnutí o použití léčiva v těhotenství je velice závažné. Lze ocenit konziliární činnost v uvedené oblasti, která přispívá k racionálnímu použití léčiv v těhotenství. Konzultační činnost musí vždy vycházet ze zhodnocení závažnosti základního onemocnění matky současně s kritickým zhodnocením rizika farmakologické léčby pro plod. Obtížné řešení této otázky často souvisí s neúplnými informacemi o účincích léků v těhotenství. Údaje z experimentálního preklinického výzkumu mohou být zavádějící. Dalším komplikujícím faktorem jsou rozdíly v hodnocení stupně rizika v informačních zdrojích, které se někdy odlišují od firemního doporučení obsaženého v SPC (Souhrn údajů o přípravku).

Tabulka 1 shrnuje příklady nejběžnějších léčiv s relativně malým rizikem pro plod, se kterými jsou dlouhodobé zkušenosti (1, 2). Doporučuje se používat vždy nejnížší již účinnou dávku.

Je třeba vzít v úvahu fakt, že žádný lék není bezpečný v časném období těhotenství a že absence léčiva v seznamu nedoporučených léčiv automaticky neznamená jeho bezpečnost.

Z běžných škodlivin je nutné zdůraznit nebezpečí alkoholu, který způsobuje zpoždění růstu plodu. Obdobně rizikové je kouření (3).

Toxicita léčiv se u kojeneho dítěte projevuje pouze tehdy, když léčiva přestupují ve větším množství do mateřského mléka. Podání některých látek – například ergotaminu – může poškodit kojence, zatímco užívání digoxinu má pouze malý účinek.

Předpis léčiva je možný pouze tehdy, jestliže je přínos farmakologické léčby větší než riziko pro vývoj plodu a kojence.

Tab. 1. Příklady relativně bezpečné farmakologické léčby v těhotenství

Skupina	relativně bezpečná léčiva	poznámka
analgetika	paracetamol	
antiastmatika	inhalační kortikosteroidy kromolyny selektivní β <sub>2</sub> -sympatomimetika	upřednostnit inhalační aplikaci, nekouřit
antibiotika	amoxicillin ampicillin azithromycin cefalosporiny erythromycin oxacillin inzulín	
antidiabetika		
antiemetika	metoclopramid	
antihypertenziva	labetalol	diastolický tlak >105–110/mm Hg
	methyldopa magnézium sulfát	prevence křečů, eklampsie
antitrombotika	heparin nízkomolekulární hepariny	
gastrointestinální léčiva	antacida ranitidin metoclopramid psyllium	

### LITERATURA

1. British medical association: Appendix 4 Pregnancy. In: British national formulary, Oxon, Pharmaceutical Press, 2005, s. 738-754.
2. **Brown, A. L.:** Medical therapeutics of pregnancy. In: The Washington manual of ambulatory therapeutics. Philadelphia, Lippincot Williams and Wilkins, 2002, s. 657-663.
3. **Králíková, E., Himmerová, V.:** Kouření a reprodukce 2. část: Kouření a těhotenství. Čas. Lék. čes., 2004, 143, s. 270-273.

prof. MUDr. František Perlík, DrSc.  
Farmakologický ústav 1. LF UK  
128 00 Praha 2, Albertov 4  
fax: +420 224 968 149, e-mail: fperl@lf1.cuni.cz

KOMENTÁŘ

## K článku autorů Tisoňová J. et al. „Konzultačná činnosť dvoch slovenských centier pri farmakoterapii v gravidite a laktácii“

Rozvoj farmakoterapie v posledních letech a zavedení nových účinných skupin léků do praxe může podstatným způsobem ovlivnit biologické děje v organismu těhotné ženy. Nová léčiva na jedné straně zdokonalila léčebné možnosti, na druhé straně se objevují nežádoucí vedlejší účinky. Klinické studie léků prospektivního charakteru jsou nesmírně nákladné a pracné, vyžadují dobrou spolupráci velkého týmu odborníků – porodníků, pediátrů i praktických lékařů. Dosavadní zkušenost o účincích farmak na reprodukci ukazují, že je poměrně málo léků, o kterých můžeme říci, že jsou pro člověka teratogenní. Na druhé straně je ovšem také málo léků, o kterých můžeme říci s naprostou jistotou, že jejich podání v těhotenství je zcela bezpečné.

Lék se dostává do plodu přes placentární bariéru buď v nezměněné formě, nebo jako metabolit. Prochází cestou v. umbilicalis do levé v. portae a odtud do jater plodu. Prostřednictvím ductus venosus Arantii může lék obejít jaterní tkáň a dostat se přímo do systémového oběhu plodu. Rozdělení krve mezi tyto dvě cesty určuje množství léku, který projde játry, kde může být biotransformován, a množství, které projde přímo do oběhu plodu. Má to význam při bolusových nárazových aplikacích a při opakovaných dávkách, kdy se vytvoří mezi matkou a plodem rovnovážný stav. Dá se tedy předpokládat, že větší množství látek projde přímo do plodu, zejména CNS, v nemetabolizované formě. To je hlavní součást výzkumu, zejména na ovcích. Bližší analýza ukázala, že průnik cestou ductus venosus je nižší než 40 %. Při posuzování metabolické aktivity plodu je třeba si uvědomit, že tato činnost je koordinována s podobnou aktivitou v placentě. Proto je třeba hodnotit metabolickou funkci fetoplacentární jednotky vždy komplexně.

Většina těhotných 40–90 % užívá v těhotenství nějaký lék: vitaminy, minerály, antibiotika, laxativa, antiemetika, sedativa, anacida apod. Teratogenní efekt je nejzávažnější v době organogeneze (embryonálního období) tj. 2.–8. týden postkoncepčního období. Je důležité rozlišovat embryonální stáří plodu a menstruační stáří, které je o dva týdny delší. Teratogen je nejvíce penetrantní v období embryonálním. Období fetální je počítáno od 9. postkoncepčního týdne do porodu. Většinou se orientujeme podle menstruačního stáří plodu, neboť koncepční stáří je nejisté. Embryo je relativně rezistentní v prvních dvou týdnech po koncepci, tj. 3.–4. menstruační týden. Pokud je inzult významný, dojde k potratu. Pokud je vliv teratogenu střední, embryo ve vývinu dále pokračuje, ale mohou se objevit různé malformace. Nejvíce zranitelné období pro plod je 5.–12. menstruační týden, kdy je největší orgánová diferenciací. Nejcitlivější období na vliv radiace je 10.–17. menstruační týden, který koresponduje s maximem proliferace neuronů a vývoje mozkového kortexu. Po období maximální senzitivity k teratogennímu efektu je jeho vliv spojen s porodem plodu, který souvisí s intrauterinní růstovou restrikcí (IUGR). Z uvedeného vyplývá, že by měl každý lékař zvážit u těhotné uvažovanou léčbu a pokud to jde, v I. trimestru gravidity těhotné raději žádný lék nepodávat. Samozřejmě jsou situace, kdy naopak nepodání léku může způsobit vážné ohrožení matky a následně i plodu. Proto je důležité tak závažnou léčbu konzultovat s centrem farmakoterapie nebo s genetikem, či s centrem antibiotické léčby.

Léky jsou řazeny do skupin podle závažnosti jejich vlivu na plod. V České republice používáme rozdělení na léky s jednoznačně prokazatelným teratogenním účinkem (cytostatika, warfarin, kokain), s pravděpodobným teratogenním účinkem (např. antiepileptika) a s možným teratogenním účinkem (např. hormony, inhibitory enzymové aktivity, sedativa) a na léky, kde teratogenní efekt nelze vyloučit. Celosvětově se užívá americká klasifikace, kdy léky jsou uvedeny v pěti kategoriích A–X, jak je v článku uvedeno. Kategorie X uvádí léky, které v animálních pokusech i při použití u lidí prokázaly jednoznačný teratogenní vliv a riziko pro plod jednoznačně převyšuje výhodu léku pro matku. Tyto léky jsou v průběhu těhotenství kontraindikovány.

Těhotné by měly být poučeny o užívání léků, radit se s lékařem, zejména při virových chorobách v těhotenství. Léky by měly být podány v graviditě pouze tehdy, je-li to nezbytně nutné. Vždy by mělo být zhodnocené riziko léčby a terapeutický efekt. Pokud je možné, měl by být lék podán v nejnižší účinné dávce. V každém případě je každá aplikace farmak v průběhu gravidity rizikem.

### LITERATURA

1. **Elis, J., Elisová, K.:** Léky v těhotenství. Praha, Avicenum, 1989.
2. **Hájek, Z.:** Základní principy farmakoterapie v těhotenství. Moderní gynekologie a porodnictví, 2004, 13, s. 152-155.
3. **Little, B. B.:** Medication during pregnancy. In: James, D. K. et al. (eds.): High Risk Pregnancy. Management Options. London UK, Saunders, 2001, s. 617.
4. **Niebyl, J. R.:** Drugs in pregnancy and lactation. In: Gabbe, S. G. et al. (eds.): Obstetrics Normal and Problem Pregnancies. New York USA, Churchill Livingstone, 2002, s. 221.
5. **Witter, F. R.:** Principles of teratology of drugs and radiation. In: Winn, H. N., Hobbins, J. C. (eds.): Clinical Maternal fetal Medicine. New York USA, Parthenon, 2004, s. 813.

KAZUISTIKA

## Opakované embolizace do periferních tepen z plicní metastázy choriokarcinomu

Spáčil J., Hradec J., Král J.  
*III. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha*

SOUHRN

Popsali jsem pacientku s choriokarcinomem, pravděpodobně ovariálního původu, s plicní metastázou. Onemocnění se projevilo opakovanými embolizacemi do končetinových tepen. V práci je podán literární přehled problematiky.  
**Klíčová slova:** embolizace, tepny, choriokarcinom.

SUMMARY

*Spáčil J., Hradec J., Král J.: Recurrent Peripheral Arterial Embolism from Metastatic Lung Choriocarcinoma*  
 A case of patient with choriocarcinoma, most likely of ovarian origin, with lung metastasis is presented. The disease manifested by recurrent embolism into peripheral arteries. Publications on this topic are reviewed.  
**Key words:** peripheral embolism, choriocarcinoma.

Sp.

*Čas. Lék. čes, 2006, 145, pp. 160–161.*

**E**mbolie do končetinových tepen jsou poměrně častou náhlou příhodou cévní. Jejich zdrojem jsou obvykle trombózy v levé srdeční komoře při infarktu myokardu nebo předsíní při fibrilaci síní (1–4). Výjimečně se může jednat o paradoxní embolii nebo embolizaci trombotických a cholesterolových hmot z aorty (5). Embolizace tumorozních hmot jsou vzácné. Přehled problematiky byl publikován v roce 2000 (6). Nedávno jsme hospitalizovali nemocnou s opakovanou embolizací choriokarcinomu do končetinových tepen. Uvádíme její kazuistiku a přehled literatury z posledních let.

KAZUISTIKA

Žena 77 let, prodělala v 38 letech hysterektomii (bez adnexotomie) a v 55 letech cholecystektomii. Poslední dva roky, od smrti manžela, depresivní sklony, byla léčena fluvoxaminem. Před 4 měsíci byla vyšetřena na neurologii pro výpadky zorného pole, byla léčena pentoxifylinem a kyselinou acetylsalicylovou, stav se upravil. Kouřila 10–15 cigaret denně.

Pro náhle vzniklou bolest (před 3 hodinami) v levé horní končetině (LHK) a její nepohyblivost byla dcerou přivezena na neurologické oddělení (kde byla před tím vyšetřovaná) a pak poslána na ambulanci kliniky. Při vyšetření byl TK 140/89, srdeční akce pravidelná, 72/min, na LHK semiflexe v loketním kloubu, pohyblivost značně omezená, pulzace hmatné jen pod klíčkem, kůže ruky byla lividní, chladná. Ostatní fyzikální nález bez pozoruhodností. Na ekg zjištěn sinusový rytmus, PQ 140 ms, QRS 100 ms, ST úsek bez denivelací. Byla stanovena diagnóza akutního uzávěru levé arteria axilaris, byla zavedena kanylka do periferní žíly, aplikován fentanyl a heparin i.v., provedeny odběry krve na hematologická a biochemická vyšetření, objednána erymasa a nemocná byla převezena na

kliniku kardiovaskulární chirurgie. V lokální anestezii byla provedena embolektomie podle Fogartyho. Emboly měly vzhled starých trombů, nebylo možno vyloučit i myxom a byly poslány na histologické vyšetření. Nemocná byla přeložena zpět na naši kliniku. Bylo ihned patrné zlepšení, přestaly bolesti, obnovily se pulzace na a. radialis i na a. ulnaris a upravila se barva i teplota levé ruky. Byla zahájena antikoagulační léčba (enoxaparin, později warfarin) a pátráno po možném zdroji embolizace.

Krevní obraz, hemokoagulační vyšetření a základní biochemická vyšetření při přijetí byly normální. Oční vyšetření ukázalo jen angiosclerosis retinae oc. utr. Echokardiografie: 1. nezávětšená levá komora, bez hypertrofie, s normální kontrakcí, s normální klidovou systolicou funkcí, s lehkou diastolickou dysfunkcí. 2. nevýznamné degenerativní změny na mitrální chlopní. 3. levá síň nezávětšená (4,08 cm), bez známek trombózy. Ani transesofageální echokardiografie neprokázala jasný zdroj embolizace, na descendentní hrudní aorty byly nevýznamné sklerotické změny. Duplexní ultrasonografie karotid a podklíčkových tepen ukázala jen mírné sklerotické změny karotid. RTG plic a srdce ukázalo rozměrný plicní tumor na rozhraní pravého horního a středního plicního pole, na bočním snímku se promítal dorzálně. Průměr tumoru 5 cm. CT hrudníku potvrdilo uvedený tumor v dorzální části pravého horního laloku, velikost na příčném řezu až 8x6 cm, bez kalcifikací, bez rozpadu a bez zřetelné lymfadenopatie. Nebyl přítomen plurální výpotek ani zvětšení nadledvin.

Biopsie embolu: rozpadající se embolus velikosti 12x8 mm ve 3 částkách. Mikroskopicky je asi polovina materiálu nekrotická. Ve viabilní tkáni byly zastíženy struktury diferencovaného cyto a syncytiotrofoblastu s pozitivitou hCG. Jedná se o diferencovaný choriokarcinom.

Z provedených vyšetření bylo zřejmé, akutní uzávěr a. axilaris vlevo byl způsoben embolizací choriokarcinomu, nejspíše z plicní metastázy tohoto nádoru.

MUDr. Jiří Spáčil, CSc.  
 128 08 Praha 2, U Nemocnice 1  
 fax: +420 224 919 780, e-mail: spacil.jiri@vfn.cz



Začali jsem pátrat po primárním zdroji. Břišní ultrasonografie a mamografie byly negativní. Gynekologické vyšetření potvrdilo stav po hysterektomii bez adnexotomie. Během pobytu stoupl CRP z 15 na 72 mg/l. Tumorózní markery byly negativní, jen hCG byl značně zvýšen (763 j, norma pod 10j). Ke konci pobytu při účinné antikoagulační léčbě došlo k embolizaci do tepen LDK, která byla opět úspěšně řešena embolektomií tumorózních hmot z bércevého řečiště. Histologie opět prokázala, že trombus byl nádorový, tvořený diferenciovaným choriokarcinomem.

Nemocná byla přeložena na gynekologickou kliniku. Byl předpokládán teratogenní původ choriokarcinomu z ovaria. Na této klinice byla opakovaně hospitalizovaná a prodělala opakované kúry chemoterapie. Periferní embolizace se neopakovaly, embolektované tepny zůstaly průchodné při trvalé antikoagulační léčbě. Celkový stav se postupně výrazně zhoršoval a po roce již imobilní pacientka s dekubity vyžadovala trvalou péči v hospicu. O dalším průběhu onemocnění nemáme informace.

### DISKUZE

Karcinomy jsou často komplikovány trombózou v žilním řečišti a plicními embolizacemi. Plicní embolizace, způsobené tumorem nejsou běžné a obtížné se diagnostikují (7). Poměrně známé jsou embolizace do periferních tepen při myxomech a jiných nitrosrdečních tumorech.

Problematiku vzácných embolizací jiných tumorů do periferních tepen popsal a literární přehled udělal Xiromertris v roce 2000 (6). Uvádí z celosvětového písemnictví 104 pacientů. Naše pacientka odpovídá první pacientce s choriokarcinomem s tumorózní embolizací popsané již před 100 lety (6). V minulých letech byly popsány další případy periferních embolizací tumoru. U dvou pacientů s primárním plicním karcinomem došlo k tumorózní embolizaci krátce po plicní resekci (8), u dalšího nastala náhlá smrt před plánovanou operací (9). A toto je občas popisováno. Naši hrudní chirurgové takovou zkušenost nemají, snad proto, že zahajují operaci podvazem plicních žil (prof. P. Pavko, osobní sdělení). U dalšího nemocného s plicním karcinomem došlo k embolizaci do a. temporalis (10). Dále je popsána periferní embolizace při plicních metastázách při melanomu (11), chondrosarkomu (12) a tumoru ze zárodečných buněk (13). Také jsou popsány periferní embolizace u pacientů s primárním sarkomem aorty (14–16) a u pacienta s metastázou adenokarcinomu, neznámého původu, do hrudní aorty (17). Pokud přidáme uvedené pacienty i naší pacientku do přehledných tabulek Xiromertise (6), vidíme, že je popsáno nejméně 115 pacientů s embolizací tumorů do periferních tepen, 49 při primárním plicním karcinomem, 37 při metastázách nádorů do plic a 18 při tumorech aorty. Další ojedinělé možnosti zůstávají, jak je uvedeno. Plicní metastázy, vedoucí k periferním embolizacím, jsou nejčastěji způsobeny sarkomy (15 pacientů) a tumory ze zárodečných buněk (7 pacientů). Tumory embolizovaly do 141 oblastí: 47 % pacientů mělo postiženy tepny zásobující dolní končetiny, 6 % horní končetiny a 28 % mozkové tepny, 7 % arteria mesenterica superior. Ostatní tepny byly postiženy ojediněle.

Pacienti s akutním uzávěrem periferních tepen embolií vyžadují urgentní embolektomii a histologické vyšetření embolu může určit etiologii. Antikoagulační léčba je indikována, i když nelze očekávat úplné zabránění recidiv.

### Zkratky

CRP	– C-reaktivní protein
CT	– výpočetní tomografie
ekg	– elektrokardiogram
hCG	– ehorionogonadotropie
LDK	– levá dolní končetina
LHK	– levá horní končetina
PQ	– PQ interval na ekg
QRS	– kmit na ekg
RTG	– rentgenové vyšetření
ST	– úsek na ekg
TK	– krevní tlak

### LITERATURA

1. **Bartoš, J., Vančura, J.:** Chirurgická léčba tepenných embolií. *Rozhl. Chir.*, 1967, 46, s. 83-90.
2. **Vrtík, L., Žernovický, F., Kubis, J. et al.:** Embólie do arterií končatin. *Rozhl. Chir.*, 2001, 80, s. 465-469.
3. **Čupka, I., Brunčák, P., Pelc, J. et al.:** Akutné uzávěry tepien horných končatin – náš klinický materiál. *Rozhl. Chir.*, 2003, 82, s. 157-160.
4. **Torma, N., Vojtaník, P., Kubíková, M. et al.:** Akutný ischemický syndrom horných končatin. *Prakt. Flebol.*, 2004, 13, s. 78-79.
5. **Steiner, I., Ceral, J., Postlová, M., Nožička, Z.:** Ateromatózní (cholesterolová) embolizace. *Čes. patol.*, 2000, 36, s. 128-132.
6. **Xiromertis, N., Klonaris, C., Papas, S. et al.:** Recurrent peripheral arterial embolism from pulmonary cancer. *Int. Angiol.*, 2000, 9, s. 79-83.
7. **Roberts, K. E., Hamele-Bena, D., Saqi, A. et al.:** Pulmonary tumor embolism: a review of the literature. *Am. J. Med.*, 2003, 115, s. 228-232.
8. **el Hammami, S., Smati, B., Djilani-Horchani, H., Kilani, T.:** Acute arterial ischemie due to tumor embolism after pulmonary resection: report of two cases and review of the literature. *Tunis med.*, 2000, 78, s. 62-65.
9. **Morasch, M. D., Shanik, G. D.:** Tumor embolus: A case report and review of the literature. *Ann. Vasc. Surg.*, 2003, 17, s. 210-213.
10. **Bhatti, M. T., Furman, J., Gupta, S. et al.:** Superficial temporal artery biopsy diagnostic for lung carcinoma. *Am. J. Ophthalmol.*, 2001, 132, s. 135-138.
11. **Grazziotin, M. U., Turnipseed, W. D.:** Arterial tumor embolism caused by metastatic melanoma. Case report and literature review. *J. Vasc. Surg.*, 2002, 36, s. 191-193.
12. **Woodring, J. H., Bognar, B., van Wyk, C. S.:** Metastatic chondrosarcoma to the lung with extension into the left atrium via invasion of the pulmonary veins: presentation as embolic cerebral infarction. *Clin. Imaging*, 2002, 26, s. 338-341.
13. **Singh, A., Jenkins, D. P., Dahdal, M. et al.:** Recurrent arterial embolization from a metastatic germ cell tumor invading the left atrium. *Ann. Thorac. Surg.*, 2000, 70, s. 2166-2166.
14. **Pompilio, G., Tartara, P., Varesi, C., Biglioli, P.:** Intimal-type primary sarcoma of the thoracic aorta: an unusual case presenting with left arm embolization. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2002, 21, s. 574-576.
15. **Nishida, N., Yutani, C., Ishibashi-Ueda, H. et al.:** Histopathological characterization of aortic intimal sarcoma with multiple tumor embolization. *Pathol. Int.*, 2000, 50, s. 923-927.
16. **Akiyama, K., Nakata, K., Hasegawa, M. et al.:** Primary malignant tumor of the aorta. *Zentralbl. Chir.*, 2002, 127, s. 791-793.
17. **Tsuji, T., Kanemura, T., Ishii, A., Nagai, A.:** A case of arterial metastasis to the thoracic aorta and the lower extremities of an adenocarcinoma of unknown primary site. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*, 2001, 39, s. 615-619.

**DISKUZNÍ PŘÍSPĚVEK**

## Konfrontace s fenoménem IF

Lebl J.

*Klinika dětí a dorostu 3. LF UK a FNKV, Praha*

**P**řijměte prosím několik postřehů o impact faktoru (IF) od klinického pracovníka, který uveřejnil svůj první článek v „impaktovaném časopisu“ ve věku 38 let v roce 1993 a který má v současné době podle Web of Science 32 položek v časopisech s IF jako první autor nebo jako spoluautor. Celkový počet citací těchto článků podle Science Citation Index činí 144. Jinými slovy: Jedná se zřejmě o vcelku typickou průměrnou publikační kariéru klinického pracovníka české lékařské fakulty, který vyrůstal a začínal profesionálně působit v době totality, kdy o IF slyšeli jen ti opravdu zasvěcení.

Podle mého názoru představuje IF v biomedicíně jedno z mála, ne-li jediné, objektivní číselné hodnocení úspěšnosti jednoho konkrétního pracovníka. Není až tak podstatné, zda v dané chvíli využijeme základní IF nebo jeho modifikace – například tzv. vážený IF podle biomedicínských oborů. A právě pro nás v době, kdy usilujeme o dosažení úrovně srovnatelné se stejně lidnatými státy vyspělé Evropy, má podle mého názoru IF klíčový význam.

Když jsem v první polovině 90. let minulého století začínal pracovat v oborových komisích grantových agentur, setkával jsem se tam s názorem, že IF je neobjektivním kritériem, a to zejména proto, že čeští autoři mají do „impaktovaných časopisů“ omezený přístup. Tím se měla zdůvodnit skutečnost, že některé grantové projekty s problematicky položenou otázkou, nestandardními způsoby řešení a chabými publikačními výstupy byly vlastně velmi kvalitní, ale nedocenené. Těmto postojům se nebylo co divit: V některých případech se mohlo

jednat o grantové projekty právě z pracoviště předsedy oborové komise. V první polovině 90. let minulého století se naše články z klinické medicíny opravdu dostávaly do „impaktovaných časopisů“ obtížně nebo vůbec. Důvodem ale ve většině případů nebyla předpojatost hodnotitelů nebo redaktorů, ale malá zkušenost s jasnou formulací otázky, se standardními metodickými postupy a s interpretací závěrů, stejně jako velké problémy s angličtinou. Ty jsou ostatně pro mě osobně problémem dosud – i když hovořím anglicky poměrně dobře, psát pregnantní formulace anglicky mě stojí mnohonásobně větší úsilí než psát podobné formulace česky. Osobně jsem si vyzkoušel, že napsat slušnou českou monografii je pro mě snazší než napsat článek do časopisu s IF vyšším než 2.

Mezitím se situace u nás naštěstí začala měnit: Většina starších, kteří to ještě mysleli se svojí kariérou vážně, strávila nějaký čas na prestižních pracovištích v zahraničí, pro mladší generaci je to již zcela samozřejmý start do života. Na takové stáží člověk lépe porozumí principům aplikovaného výzkumu i publikační strategii. Pokud dnes někteří kolegové tvrdí, že jim články do časopisů s IF neberou, je podle mého názoru chyba na jejich straně.

Být konfrontován s fenoménem IF je pro jednotlivého pracovníka i pro každý časopis tvrdá škola, která má daleko k někdejší „pohodičce“ reálného socialismu. Je to součást výkonově orientované společnosti v globálním světě. Pokud v něm chceme obstát, musíme jeho pravidla přijmout. Anebo začít dělat něco úplně jiného.

prof. MUDr. Jan Lebl, CSc.  
100 81 Praha 10, Vinohradská 159  
e-mail: lebl@fnkv.cz

## VÝZVA REDAKCE

Apelujeme na všechny přispěvatele Časopisu lékařů českých, aby ve svých publikacích **neopomýjeli citovat domácí autory.**

Uvádění citací českých autorů je nejen v zájmu publikujících, ale v zájmu celé naší lékařské veřejnosti.

Děkujeme za porozumění a spolupráci.

*Redakční rada Časopisu lékařů českých*

**DISKUZNÍ PŘÍSPĚVEK**

## Víte ještě, co čtete? (inspirováno článkem doc. M. Špály)

Hořejší J.  
*Medical Tribune, Praha*

**K**aždý jednotlivec, každá společnost i lidstvo jako celek potřebuje ke svému životu informace stejně jako živiny nebo kyslík. Jde o otevřené systémy a informační metabolismus je tedy pro ně stejně nezbytný jako metabolismus energetický. Avšak jen pro jedinou oblast lidské aktivity jsou informace hlavním zdrojem a surovinou na počátku, hlavní pohonnou látkou v průběhu, a hlavním výstupem na konci každé práce. Touto oblastí je věda. Včetně vědy lékařské. Medicína je především práce s živým člověkem, jeho utrpením a nemocí, je to snaha utrpení zmírňovat a nemoci odstraňovat. Ale stejně tak je to práce s informacemi.

Kolébku, útočištěm i prostředkem kumulace, upřesňování, kritiky a ověřování těchto živých vědeckých a odborných informací jsou především *odborné časopisy*, geniální vynález pro soustavné syntetizování fragmentů vědecké práce bez ohledu na místo a čas jejich vzniku. Jak kdysi napsal v *Nature* J. Ziman: „typické vědecké sdělení nikdy nepředstíralo, že by bylo něčím víc než jen malým slůvkem v mnohem větší křížovce – slůvkem nevýznamným samo o sobě, leč významným jako prvek velkolepějšího nárysu. Skrze tuto techniku náboru mnoha skromných příspěvků pro zásobárnu lidského poznání ... dochází věda kvalit korporace, své kolektivní síly, která je mnohem větší než síla, jaké může dosáhnout kterýkoli jedinec“. *Odborné časopisy jsou jedním z nejdůležitějších prvků pro pokrok jakékoli disciplíny i vědy jako celku. Jsou to ruce podávané přes hranice a oceány, je to důmyslný a výkonný cévní systém, jímž proudí životodárný tok skutečně vědeckých informací.* Snad také právě proto si vědecké časopisy zachovávají i uprostřed současného žurnalistického světa plného nekompetentnosti, senzacechtivosti, falešné „investigativnosti“, předpojatosti a ideologických či komerčních nánosů některé tradiční rysy důvěryhodnosti, serióznosti a altruismu.

V posledních patnácti či deseti letech se však stále častěji objevují i pokusy především farmaceutických a přístrojových firem tuto integritu vědeckých časopisů narušit a udělat si z nich poslušné loutky. Obvykle se o zdravotnickém průmyslu hovoří v souvislosti s finanční krizí zdravotnictví, neb podle mínění mnohých odsává nekřesťanské peníze. Mnohem větším problémem však hrozí být krize komunikační. Když totiž spojení lékařské vědy a průmyslu ohrožuje důvěryhodnost odborné komunikace. Proto je na místě otázka: Víte ještě, co vlastně čtete? A na místě je i zamyšlení nad tím, proč k takovému vývoji dochází.

Investice farmaceutických firem stojí na dvou hlavních pilířích – jsou to investice do výzkumu a vývoje a investice do marketingu. Doba výzkumu a vývoje jednotlivých nových molekul se stále prodlužuje a náklady rostou (od roku 1990 čtyřikrát), produktivita a návratnost nikoli. A tak zatímco doba do uvedení nové molekuly na trh trvá až 16 let (patentová ochrana pouze 20) a náklady dosahují až miliardy dolarů, jen tři z deseti produktů dokáží vydělat vynaložené peníze zpět. Není tedy divu, jestliže se paralelně zvyšují i výdaje na marketing a propagaci, jejichž cílem je prodat v co

nejkratší době co nejvíce balení. Proto tak rychle roste počet „repů“ čili obchodních cestujících nabízejících léky lékařům a lékárníkům, a protože většina lékařů a lékárníků kupodivu stále ještě věří více odborným časopisům než repům, ještě rychleji sílí snahy o ovládnutí časopisů.

Proto Richard Horton, editor *Lancetu*, napsal v březnu 2004, že „odborné časopisy se mění na prádelny špinavých informací firem“, a Marcia Angell, editorka *New England Journal of Medicine*, konstatovala v témže roce, že „farmaceutický průmysl se stává výkonným marketingovým mechanismem, který pohltí nebo zničí vše, co se mu octne v cestě.“ O tom, jaký je rozsah problému, svědčí fakt, že průmysl sponzoruje dvě třetiny až tři čtvrtiny studií publikovaných v časopisech *Annals of Internal Medicine*, *JAMA*, *Lancet* a *NEJM* a třetinu studií publikovaných v *British Medical Journal*. Nejzřetelnějším projevem závislosti odborných časopisů na průmyslu je uveřejňování reklam – to je však současně projev nejméně nebezpečný a korumpující, protože časopis nepřebírá žádnou odpovědnost za to, co se v reklamě tvrdí, a je jen a jen na čtenáři, zda reklamě bude či nebude věnovat svou pozornost a bude či nebude jí věřit. Mnohem skrytějším projevem této závislosti je publikování výsledků nejrůznějších studií sponzorovaných firmami; jména renomovaných autorů a hlavička renomovaného časopisu jim totiž poskytují zdání objektivnosti vyjadřované pojmy „evidence based medicine.“ Čím vyšší je kvalita časopisu, v němž studie vyjde, tím většího zdání serióznosti se jí dostává.

### **Proč firmami sponzorované studie vždy přinesou pozitivní výsledky?**

- protože vždy kladou ty správné otázky a uveřejňují pouze správné odpovědi na ně;
- protože srovnávají nový lék s přípravkem méně účinným, více toxickým nebo ve větších dávkách (nežádoucí účinky);
- protože stanoví řadu hodnotících ukazatelů a publikují pouze výsledky těch, jež vyjdou;
- protože jsou prováděny ve více centrech a publikují se výsledky z těch nejlepších;
- protože se provádějí nejrůznější post-hoc subanalýzy a publikují pouze výsledky těch, jež vyjdou;
- protože se prezentují v nejimpresivnější formě – např. v relativním riziku namísto absolutního;
- a tak dále a tak podobně.

### **Proč jsou výsledky těchto studií tak dobře známy?**

- protože jsou označeny dobře zapamatovatelnými akronymy (PROVE-IT; CARE; HOPE, CHARM, LIFE, VALUE apod.);
- protože za jejich autory jsou vybíráni vědci zvučných jmen, jsou publikovány v časopisech zvučných názvů a prezentovány na zvučných kongresech mezinárodních i národních;

- protože jsou tištěny a distribuovány v tisících reprintů, eventuálně suplementech nejruznějších časopisů;
- protože jejich výsledky prezentují lékařské i laické veřejnosti zkušené agentury public relation;
- protože jsou šířeny elektronickou formou;
- a tak dále a tak podobně.

Odborné časopisy by se tomu měly ubránit, je to však stále těžší. Ptáte se, proč to časopisy nejen trpí, ale vítají? Protože není důsledně oddělena redakční a obchodní část listu, a protože je bezpečnější vytisknout výsledky studie a vydělat 100 000 USD nebo českých korun, než se na konci roku dozvědět, že pro nedostatek financí je třeba propouštět redaktory.

Co by se mělo dělat? Ideální by bylo, kdyby odborné časopisy tyto studie nepublikovaly, nýbrž komentovaly a kritizovaly. To by ovšem vyžadovalo zásadně změnit financování jak výzkumu, tak vydávání odborných časopisů. A protože toho se lze sotva nadít, měli bychom aspoň přemýšlet o tom, co, od koho a kde čteme.

Je skutečně zarážející, kolik článků nabízených dnes odborným časopisům je tak či onak sponzorováno průmyslem, ačkoli v záhlaví mají jména renomovaných autorů. V USA průmyslový sponzorování vědeckých studií převyšuje výši grantů udělovaných NIH (Národními ústavy zdraví). Pokud bychom však chtěli zcela diskreditovat veškerý výzkum realizovaný či sponzorovaný průmyslem, znehodnocovali bychom zároveň i poctivou práci tisíců výzkumníků, kteří objevují, vyvíjejí a testují nové léky a přístroje, jejichž hodnotu nemohou popít ani ti nejtvrďší kritici. Vylévat s vaničkou i dítě by tedy nespíše nebylo tím nejsprávnějším řešením. Musíme ovšem trvat na plné a otevřené informovanosti o vztazích autorů s jednotlivými firmami a samozřejmě na tom, aby všichni autoři měli plný a neomezený přístup ke všem datům a jejich analýzám.

Platí to samozřejmě i pro odborné časopisy české, byť těm žádosti mezinárodních firem o publikování výsledků velkých studií sotva hrozí. Jejich problémy spočívají jinde. Když ČLS JEP po krachu Avicena začala vydávat 30 časopiseckých titulů ve svém nově založeném Nakladatelském středisku, zdál se to být skvělý nápad. Bylo třeba zachránit „rodinné stříbro“ a začínalo se tedy prakticky od začátku, i když se navazovalo na dlouholeté tradice. A skutečně tím bylo pro záchranu kontinuity českých časopisů uděláno nesporně mnoho, a všem, kteří se o to zasloužili, patří za to dík. Ne všechny redakční rady si však položily otázku, kterou bylo a je nutno si klást trvale: Chceme dělat časopis pro čtenáře nebo pro autory? Bohužel, většina odborných časopisů nedokázala publikovat přehledové práce, prakticky zaměřené články a jiné užitečné materiály pro čtenáře, a nadále poskytovala své stránky originálními pracemi, které se neuplatnily na mezinárodním kolbišti. Bohužel, většina redakčních rad těchto odborných časopisů nadále klidně pospávala a pospává v iluzi, že postačilo změnit několik slov v názvu časopisu, a prohlašuje, že v nejbližší době „požádají o impact factor“ (sic!). Je tedy vidět, že vůbec nepochopily, co se kolem nich děje, a není jim tedy pomoci.

A tak se v českém publikačním rybníku postupně začaly objevovat nové štiky:

- časopisy odborných společností, které z ČLS odešly;
- časopisy „nespokojenců“ v oborech, které v ČLS i s časopisem zůstaly – nové typy časopisů;
- „pohledy do zahraničního zrcadla“ (české verze zahraničních časopisů);
- prakticky zaměřené tituly;
- časopisy založené (nebo přetřansformované) s jediným cílem – být „věšáky na reklamu“.

Nejvíce škod napáchaly a bohužel nadále páchají ty poslední. Nejprve na rok dopředu naplánují témata podle předpokládané-

ho zájmu inzerentů, pak nasmlouvají inzerci a nakonec k inzerátům shánějí články. Všechny tyto časopisy měly a mají – na rozdíl od seriálních odborných titulů – společnou jednu věc: Nabízely a nabízejí kvalitnější grafiku a tisk a také větší vstřícnost vůči inzerentům – a to až do těch poloh, které byly a jsou pro seriální časopisy nepřijatelné. Málo se ví, že právě tato cesta do slepé uličky byla zahájena někdejšími Zdravotnickými novinami, a protože vedla ke ztrátě důvěryhodnosti mezi čtenáři a nakonec i mezi inzerenty, vyústila v prodej titulu nakladatelství Mladá fronta.

Protože ovšem byl podán prst, začali vydavatelé od potenciálních inzerentů dostávat podivné otázky jako: Můžeme dostat plán témat na rok dopředu? Můžeme uveřejnit spolu s inzerátem článek toho a toho autora, nebo můžete dokonce takový článek sehnat a objednat? Nikoho z těch, kdo měli peníze, nezajímalo „rodinné stříbro“, a do popředí se dostávala „prodejná nekvalita“. Výsledkem jsou nedostatečné zdroje pro rozvoj (důstojné honoráře pro autory především přehledových článků, zlepšení grafiky a tisku) a nevyužití potenciálu toho, že právě časopisy odborných společností pokrývají 100% cílové populace a měly by být proto lákadlem i pro inzerenty. Navíc se u nás nepracuje s objektivními údaji o skutečné „hodnotě“ jednotlivých časopisů a nejsou dostupné auditované údaje o velikosti nákladů a počtu prodaných výtisků. Ochota firmy inzerovat vychází z ochoty toho či onoho časopisu zapomenout na všechna pravidla nezávislosti redakčního obsahu a inzerce, a ze schopnosti některých „nakladatelů“ nabízet vedle vydávání časopisů i další „služby“.

Řešení je přitom zřejmé:

- pokusit se na sjezdech jednotlivých společností prosadit, aby předplatné časopisu bylo součástí členského příspěvku (stoprocentní pokrytí cílové populace oboru je mimořádně zajímavé pro inzerenty);
- přiblížit obsahy časopisů čtenářům;
- změnit grafickou úpravu časopisů, kvalitu grafické úpravy, zlomu a tisku;
- nebát se, že se „ušpiníme“ od farmaceutických či přístrojových firem – nikde jinde dnes prostředky k dispozici nejsou; ovšem neustupovat jejich tlakům, nýbrž přesvědčit je, že je zcela neefektivní a dokonce nebezpečné inzerovat v časopisech, které jim nabízejí „nadstandardní služby“ a že jedině vysoká kvalita a čtenost těchto titulů je pro ně zárukou, že nabídka jejich produktů bude v tom jedině správném kontextu. Odpověď na otázku „jaký je váš ediční plán“ musí znít jen a jen – náš plán je dělat celý rok kvalitní časopis zajímavý pro naše čtenáře;
- přesvědčit potenciální inzerenty, že nemá cenu rozměňovat finanční prostředky mezi přibližně 140 časopisy, které dnes u nás vycházejí, ale svojí pozornost zaměřit na několik lékařských časopisů, které plní to, co od nich česká lékařská komunita očekává;
- ze získaných prostředků postupně dále zkvalitňovat podobu časopisů i honorování autorů (zejména za přehledové články). A především je třeba si stále klást některé otázky:
  - Jakou cenu mají časopisy bez ceny?
  - Proč by měly vycházet časopisy bez peer review?
  - Proč existují časopisy jako věšáky na reklamu?
  - Může spousta publikací se záporným znaménkem přinést něco kladného?

Člověk formuje své nazírání světa podle nástroje, kterým tohoto světa dobývá. Může tak činit prostřednictvím poznávání pravdy, anebo prostřednictvím peněz. Kde se peníze stávají důležitější než pravda, tam odumírají normální mezilidské kontakty a tedy i vzájemná odpovědnost. Jestliže si to vůbec může nějaký obor lidské činnosti dovolit, medicína to rozhodně není.



SJEZDY

# Novinky z 13. evropské konference o rakovině (ECCO-13)

Paříž, 30. října až 3. listopadu 2005

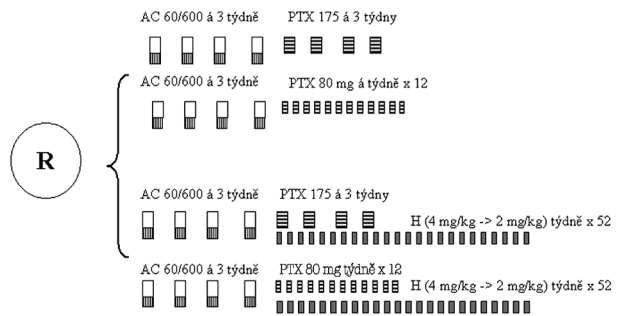
Na přelomu října a listopadu letošního roku se v Paříži konala pod záštitou Federace evropských onkologických společností (Federation of European Cancer Societies – FECS) 13. evropská konference o rakovině (ECCO-13, European Cancer Conference). V rámci odborného programu bylo prezentováno několik zásadních prací s přímým dopadem na každodenní praxi. V následující zprávě se budeme věnovat nejzásadnějším z nich.

## KARCINOM PRSU

V rámci slavnostního zahájení navázal profesor R. Peto na nedávno publikovanou metaanalýzu EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) týkající se vlivu pooperační léčby na 15leté přežití pacientek s časným karcinomem prsu (1). Profesor R. Peto prezentoval doposud nepublikovaná data týkající se vlivu radioterapie na 15leté přežití (2). Po 15 letech sledování je podstatný rozdíl v počtu lokálních recidiv a úmrtí ve prospěch pacientek, které byly ozařovány po mastektomii. Rozdíl v přežití je výraznější s délkou sledování. V případech prs zachovných výkonů jsou data obdobná. Ve skupině s radioterapií bylo pozorováno více kardiovaskulárních úmrtí, což ale nedosahovalo statistické významnosti.

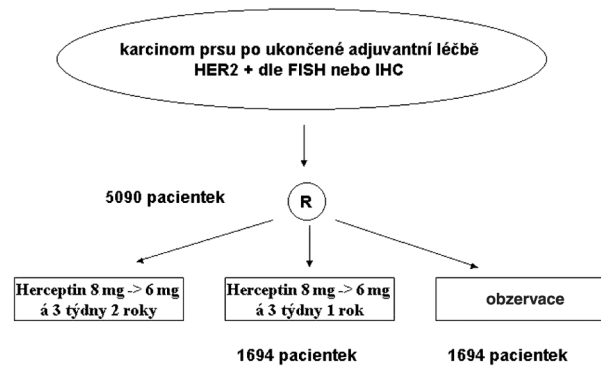
V sekci věnované adjuvantní léčbě pacientek s karcinomem prsu byla prezentována kombinovaná analýza studií NSABP B31 a NCCTG N9831 srovnávající chemoterapii AC-T (4 cykly doxorubicinu s cyklofosfamidem následované 4 cykly třítýdenního paklitaxelu nebo 12 cyklů týdně paklitaxelu) se stejnou chemoterapií doplněnou o roční podání Herceptinu, monoklonální protilátky proti onkoproteinu HER2/neu u pacientek s časným karcinomem prsu a jeho zvýšenou expresí (obr. 1). Celkem bylo hodnoceno více než 3300 zařazených žen s mediánem doby sledování 2 roky. Mezi oběma rameny byl znatelný rozdíl 18 %, co se týče doby do recidivy, a 4 %, co se týče celkového přežití. Takové výsledky nemají v historii adjuvantní chemoterapie karcinomu prsu obdoby (3). Evropská studie HERA srovnávala léčbu Herceptinem každé 3 týdny po dobu 1 nebo 2 let ve srovnání s observací po ukončení adjuvantní léčby v podobné skupině pacientek (obr. 2) (4). Výsledky byly opět velmi dobré, kdy při mediánu sledování 1 rok byl absolutní rozdíl mezi dobou do recidivy 8 % ve prospěch roční léčby Herceptinem. V celkovém přežití zatím nebyl pozorován rozdíl. Rameno s dvouletou léčbou Herceptinem zatím hodnoceno nebylo. Poslední velká studie s adjuvantní léčbou Herceptinem, která by měla být zveřejněna, je studie BCIRG 006 srovnávající režim AC-T (4 cykly doxorubicinu s cyklofosfamidem následované 4 cykly třítýdenního docetaxelu) s AC-TH (4 cykly doxorubicinu s cyklofosfamidem následované 4 cykly třítýdenního docetaxelu a léčbou Herceptinem po dobu 1 roku) a TCH (6 cyklů kombinace platinová sůl s docetaxelem a Herceptinem po dobu 1 roku). Oficiální prezentace výsledků je očekávána v San Antoniu v prosinci letošního roku. Nicméně již v Paříži bylo naznačeno, že léčba s Herceptinem vedla k redukcí rizika recidivy o 39–61 % (nepublikovaná data). Shrnutí výsledků všech adjuvantních studií s Herceptinem je uvedeno v grafu 1. Jelikož léčba Herceptinem je obecně dobře snášena, zůstává jediným možným problémem kardiotoxicita. Při srovnání dat ze všech 4 studií (NSABP B31, NCCTG N9831, HERA, BCIRG 006) byl v ramenech bez Herceptinu pozorován výskyt kardiálních symptomů NYHA III/IV v rozmezí 0–0,3 %. V ramenech s Herceptinem od 0,09 % v rameni TCH studie BCIRG006 do 3,3 resp. 3,4 % v ramenech s AC-TH ve studiích NSABP B31 a NCCTG N9831. Z toho vyplývá, že rameno bez antracyklinů (TCH) se podstatně nelišilo od srovnávacích ramen bez Herceptinu (5, 6). Do budoucna bude důležité, zda kardiotoxicita bude či nebude reverzibilní.

Přínos prodloužené hormonální adjuvantní léčby s inhibitory aromatázy letrozolem po dobu dalších 5 let po 5 letech tamoxifenu u postmenopauzálních pacientek s hormonálně dependentním časným karcinomem prsu byl prezentován již v roce 2003 (7). Letos na ECCO byly zveřejněny

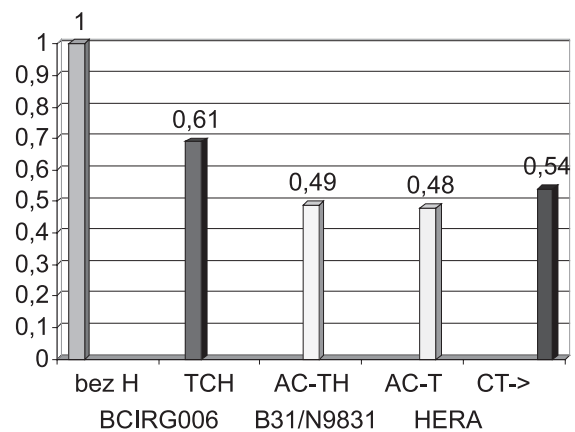


AC, doxorubicin/cyklofosfamid; PTX, paklitaxel; H, Herceptin

Obr. 1. Kombinovaná analýza NSABP B31 a NCCTG N9831 AC – doxorubicin/cyklofosfamid, PTX – paklitaxel, H – Herceptin



Obr. 2. Studie HERA



Graf 1. Srovnání relativních rizik v jednotlivých studiích s adjuvantní léčbou Herceptinem

explorativní analýzy studie MA17 za účelem vytipovat skupinu pacientek, kde je přínos letrozolu nejvýraznější. Na základě prezentovaných dat nelze potvrdit hypotézu generovanou ze studie ATAC (5 let anastrozolu vs. 5 let tamoxifenu vs. 5 let anastrozolu s tamoxifenem u postmenopauzálních žen

**Tab. 1.** Přehled studií fáze III u karcinomu pankreatu. Tučně jsou práce, kde výsledek dosahoval statistické významnosti

Lék	přežití kombinace s G (v měsících)	přežití G monoterapie (v měsících)
Kapecitabin (ASCO 05)	8,4	7,3
5FU + LV (ASCO 05)	5,85	6,2
5FU	6,7	5,4
cDDP	7,6	6
CPT 11	6,3	6,6
Exatekan	6,7	6,2
Pemetrexed	6,3	6,2
Marimastat	5,5	5,5
R115777	6,5	6
Oxaliplatin	9	7,1
<b>Erlotinib (ASCO 05)</b>	<b>6,37</b>	<b>5,91, P=0,025</b>
<b>Kapecitabin (ECCO 05)</b>	<b>7,4</b>	<b>6, P=0,026</b>

5FU – fluorouracil, LV – leukovorin

s časným karcinomem prsu a expresí hormonálních receptorů), že inhibitory aromatázy jsou neúčinnější u pacientek s expresí estrogenních receptorů a bez exprese progesteronových receptorů. Naopak letrozol v této skupině vycházel podstatně hůře než v ostatních podskupinách (8). Ohledně studie MA 17 byl zveřejněn statistický rozbor, který potvrdil, že přínos letrozolu neklesá s délkou podání. Ve světle těchto informací se další randomizace do ramene s prodlouženou hormonální adjuvancí nad 10 let jeví jako opodstatněná.

### KARCINOM TLUSTÉHO STŘEVA A KONEČNÍKU

V sekci věnované metastázujícímu karcinomu střeva bylo publikováno několik studií III. klinické fáze. Skandinávská skupina porovnávala bolusový režim FLIRI (fluorouracil, leukovorin, irinotekan) se standardním infuzním režimem FOLFIRI (též fluorouracil, leukovorin, irinotekan) (9). Celkem bylo zařazeno 567 nepředlčených pacientů. Oba režimy byly rovnocenné, co se týče účinnosti i překvapivě toxicity, přestože bolusové režimy jsou obecně považovány za toxickejší.

Německá skupina řešila otázku, zda kombinace novějších cytostatik irinotekanu a oxaliplatin s vynecháním fluorouracilu (kombinace IROX) je účinnější než obvyklá kombinace fluorouracilu, leukovorinu a irinotekanu v 1. linii léčby metastázujícího karcinomu tlustého střeva. Celkem bylo hodnoceno 478 pacientů. Tento předpoklad se nenaplnil. IROX v žádném z parametrů účinnosti režim FUFIRI (irinotekan v kombinaci s režimem AIO) nepřekonal a dokonce dosahoval mírně horších výsledků, které ale byly pod hranicí statistické významnosti (10). Toxicita byla akceptovatelná v obou ramenech.

Nejzajímavější prezentovanou prací byla studie fáze III srovnávající kombinaci FOLFIRI (fluorouracil/leukovorin/irinotekan) s kombinací FOLFOXIRI (fluorouracil/leukovorin/irinotekan/oxaliplatin) se zařazenými 244 pacienty s metastázujícím onemocněním (11). Výsledky byly ve všech sledovaných parametrech ve prospěch čtyřkombinace. Počet léčebných odpovědí dosahoval 60 % s FOLFOXIRI ve srovnání s 34 % u FOLFIRI, což je poněkud méně, než bychom očekávali na základě dříve publikovaných dat. Doba do progresu byla 9,8 měsíců u čtyřkombinace a 6,8 měsíců u FOLFIRI. Při mediánu sledování 14 měsíců není zatím celkové přežití plně vyhodnoceno, ale v rameni s FOLFOXIRI přežívá 48 % pacientů ve srovnání s 40 % u FOLFIRI. V rameni s FOLFOXIRI bylo také více R0 resekci, což dosahovalo statistické významnosti. Toxicita čtyřkombinace byla sice vyšší ve smyslu průjmů, zvracení a periferní neurotoxicity, ale akceptovatelná. Nevyskytlo se žádné toxické úmrtí. Pro srovnání nabízím 2 roky stará data ze studie IFL +/- bevacizumab. V účinnějším rameni s bevacizumabem byl pozorováno 44 % léčebných odpovědí, doba do progresu 10,6 měsíců a medián přežití 20,3 měsíců (12). Výsledky

s FOLFOXIRI jsou s kombinací bevacizumab/IFL plně srovnatelné. Navíc se zdá se, že tato čtyřkombinace by mohla být zajímavou alternativou pro pacienty, kde lze očekávat dosažení resekability po několika cyklech chemoterapie. Nelze opomenout, že FOLFOXIRI dosahuje obdobných výsledků v době do progresu jako kombinace IFL s bevacizumabem při pravděpodobně nižších finančních nákladech.

### KARCINOM PANKREATU

Půl roku po uveřejnění první studie prokazující přínos ve smyslu přežití při podání dvojkombinace gemcitabin/erlotinib ve srovnání s monoterapií gemcitabinem byla na ECCO 13 prezentována studie fáze III srovnávající gemcitabin s kombinací gemcitabin/kapecitabin, která také prokázala přínos ve smyslu přežití ve srovnání s monoterapií (7,4 měsíců vs. 6 měsíců) (13). Na studii participovalo 533 pacientů. Výsledek studie je nutné hodnotit opatrně obzvláště v kontextu před 6 měsíci publikované studie s obdobným designem a negativním výsledkem (14). Nicméně přežití i v této studii bylo obdobné, 7,4 vs. 5,9 měsíců ve prospěch dvojkombinace. Statistické významnosti nebylo dosaženo zřejmě kvůli menšímu počtu zařazených pacientů (232 pacientů). Přehled studií u karcinomu pankreatu je uveden v tabulce 1, kde si můžeme povšimnout, že největší optický rozdíl je mezi kombinací gemcitabinu a oxaliplatin (GEMOX) a monoterapií gemcitabinem (15). Nicméně výsledky nedosahovaly statistické významnosti. Je otázkou, zda to nebyl spíše problém designu studie s menším počtem zařazených nemocných.

### KARCINOM PLIC

Ze studií III. klinické fáze byla prezentována doktorem O'Byrnem ze St. James's Hospital v Dublinu studie Stellar 2 srovnávající preparát paklitaxel poliglumex (Xyotax®) s docetaxelem (současný standard) v 2. linii chemoterapie nemalobuněčného karcinomu plic (16). Celkem bylo zařazeno 849 pacientů. Je nutné zdůraznit, že na rozdíl od jiných prací, zde nebylo cílem prokázat ekvivalenci, ale lepší účinnost. V experimentálním rameni bylo použito rozdílných dávek pro pacienty ve výborném (210 mg/m<sup>2</sup>) a v horším klinickém stavu (175 mg/m<sup>2</sup>). Co se týče nežádoucích účinků bylo experimentální rameno méně toxické. Pacienti léčení Xyotaxem udávali výrazně méně častěji alopecii, únavu, astenii, dýchací obtíže, mukositu a gastrointestinální nežádoucí účinky. V rameni se Xyotaxem bylo výrazně více neuropatií, ačkoliv se to týkalo hlavně skupiny léčené dávkou 210 mg/m<sup>2</sup>. Xyotax lze na rozdíl od docetaxelu podávat bez premedikace kortikoidy v 10 minutové infuzi.

### ZÁVĚR

Po letošní konferenci ECCO-13 lze konstatovat na základě novinek z Oxfordské analýzy, že v současnosti používané léčebné modality v pooperační léčbě karcinomu prsu vedou k významné redukci rizika recidivy. Zásadním poselstvím je, že u pacientek s expresí onkogenu HER2/neu je významným přínosem doplnění klasické chemoterapie o monoklonální protilátku Herceptin. Přes velkou finanční náročnost tato léčba prokazatelně šetří životy. Naopak u pacientů s kolorektálním karcinomem bychom mohli finanční prostředky v některých případech (pacienti v dobrém stavu s nadějí na operaci při zmenšení nádoru) ušetřit a místo drahé monoklonální protilátky ordinovat kombinaci FOLFOXIRI.

### LITERATURA

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 2005, 365, s. 1687-1717.
2. **Peto, R.:** Worldwide meta-analyses of breast cancer treatment – EBCTCG 2005 – an update. *Eur. J. Cancer*, 2005, 3 (Suppl. 2), abstract 1.
3. **Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J. et al.:** Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 353, s. 1673-1684.

4. **Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B. et al.:** Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 353, s. 1659-1672.
5. **Slamon, D., Eirmann, W., Robert, N. et al.:** BCIRG 006: Superior cardiac safety of adjuvant docetaxel (T), carboplatin (C) and trastuzumab (H) compared to doxorubicin (A) and Cyclophosphamide (Cyc) followed by TH in patients with early stage breast cancer and altered HER2 gene. *Eur. J. Cancer*, 2005, 3 (Suppl. 2), abstract 265.
6. **Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J. et al.:** Doxorubicin and cyclophosphamide (AC) followed by paclitaxel (T) with or without trastuzumab (H) as adjuvant therapy for patients with HER2-positive operable breast cancer (BC): combined analysis of NSABP B-31 and NCCTG N9831. *Eur. J. Cancer*, 2005, 3 (Suppl. 2), abstract 263.
7. **Goss, P. E., Ingle, J. N., Martino, S. et al.:** A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 349, s. 1793-1802.
8. **Goss, P., Ingle, J., Dongsheng, T.:** Oral NCIC CTG MA 17: Disease free survival according to estrogen receptor and progesterone receptor status of the primary tumor. *Eur. J. Cancer*, 2005, 3 (Suppl. 2), abstract 267.
9. **Glimelius, B., Sorbye, H., Balteskard, L. et al.:** A randomised phase III multicenter trial comparing irinotecan in combination with either the Nordic bolus 5FU and folinic acid (5FU/FA) schedule (FLIRI) or the bolus/infused de Gramont schedule (FOLFIRI) in patients with metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer*, 2005, 3 (Suppl. 2), abstract 597.
10. **Fisher von Weikersthal, L., Schalhorn, A., Quietzsch, D. et al.:** Randomised comparison of 5-FU/folinic acid plus irinotecan (FOLFIRI) and irinotecan plus oxaliplatin (IROX) in first-line therapy of metastatic colorectal cancer (CRC): the fire-trial. *Eur. J. Cancer*, 2005, 3 (Suppl. 2), abstract 598.
11. **Falcone, A., Brunetti, I. M., Benedetti, G. et al.:** Improved activity with irinoteca, oxaliplatin and infusional 5-FU/LV (FOLFOXIRI) compared with FOLFIRI in metastatic colorectal cancer (MCRC): results of randomized Phase III trial by the Gruppo Oncologico Nord West (GONO). *Eur. J. Cancer*, 2005, 3 (Suppl. 2), abstract 599.
12. **Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W. et al.:** Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 350, s. 2335-2342.
13. **Cunningham, D., Chau, I., Stocken, D. et al.:** Phase III randomised comparison of gemcitabine (GEM) versus gemcitabine plus capecitabine (GEM-CAP) in patients with advanced pancreatic cancer. *Eur. J. Cancer*, 2005, 3 (Suppl. 2), abstract PS11.
14. **Hermann, R., Bodoky, G., Ruhstaller, T. et al.:** Gemcitabine (G) plus Capecitabine (C) versus G alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer. A randomized phase III study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) and Central European Cooperative Oncology Group (CECOG). *J. Clin. Oncol.*, 2005, 23 (Suppl. 16), abstract 4010.
15. **Louvet, C., Labianca, R., Hammel, P. et al.:** Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J. Clin. Oncol.*, 2005, 23, s. 3509-3516.
16. **O'Byrne K. J., Bonomi, P., Paz-Ares, L. et al.:** Paclitaxel poliglumex vs. docetaxel for the second-line treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC): the STELLAR 2 Phase III study. *Eur. J. Cancer*, 2005, 3 (Suppl. 4), abstract PS13.

*MUDr. Filip Janků a doc. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.  
Onkologická klinika I. LF UK a VFN  
128 08 Praha 2, U Nemocnice 2  
fax: +420 224 921 716, e-mail: janku.filip@vfn.cz*

## Prevence hepatitidy B pomocí vakcinace

Virus hepatitidy B je nejmenší známý virus v lidské virologii. U neimunních osob je velmi infekční. Inkubační doba je 45–160 dní, průměrně 90 dní. Primárním rezervoárem jsou chronicky nemocní lidé, není znám žádný zvířecí rezervoár. Riziko přechodu do chronického stavu je nepřímo úměrné věku v době infekce, takže například u novorozenců postihuje riziko chronicity až 90 % infikovaných. Prospektivní studie na Tajvanu ukázaly, že téměř 25 % osob, které se nakazily v časném dětství, zemře později na jaterní cirhózu či maligní hepatom. Úmrtnost se snižuje na 15 % u osob, které se nakazily v adolescentním věku. Infekce HBV je široce rozšířena po celém světě. V řadě oblastí světa, zejména v rozvojových zemích a v Číně, je onemocnění v podstatě endemické, kdy se lidé nakazí již v dětském věku a až 70 % dospělé populace vykazuje protilátkovou pozitivitu signalizující prodělanou infekci. V této populaci má 8–15 % chronickou HBV infekci. Z globálního pohledu lze říci, že až 2

miliardy lidí vykazuje protilátkovou pozitivitu jako doklad prodělané infekce, 350 miliónů lidí jsou chroničtí nosiči viru a zhruba 1 milion lidí ročně zemře na cirhózu či hepatocelulární karcinom. Rozsáhlý program imunizace, který probíhá již ve více 100 zemích, dramaticky snížil výskyt chronické HBV infekce nebo jejích důsledků, takže vakcinaci lze svým způsobem považovat za protinádorovou vakcínu. Ve Spojených státech amerických je prováděn skríning krve a krevních derivátů sérologickými testy detekujícími HBV, hepatitidu C, HIV a lidský T-cell lymfotropní virus, což razantně snížilo riziko přenosu. Vakcína proti hepatitidě B je v USA k dispozici od roku 1981. V letech 1991–1999 byla rozpracována a modernizována strategie rutinní imunizace, která snížila roční incidenci akutních HBV infekcí v USA na 2,8 na 100 000, tj. pokles o 67 % během 10 let. Na základě těchto výsledků WHO doporučila realizaci programu univerzální HBV imunizace pro děti a adolescenty. K roku 2003 přijalo program dětské imunizace proti HBV 79 % zemí ze 192 členů WHO. Vakcína se aplikuje ve třech dávkách intramuskulárně, přičemž druhá

dávka následuje jeden měsíc po první a třetí dávka šest měsíců po první dávce. K vakcinaci jsou indikovány všechny osoby mladší 18 let a dospělé osoby za určitých podmínek. Jde například o pracovníky v rizikových odvětvích (zdravotnictví apod.), pacienti v hemodialyzačním programu, nemocní léčení krevními deriváty, cestovatelé do velmi rizikových oblastí anebo i homosexuální i heterosexuální promiskuitní osoby a toxikomani. U těhotných žen je třeba provádět testy na HbsAg s cílem snížit riziko vertikálního přenosu infekce. Je-li výsledek pozitivní, je třeba dítěti po narození aplikovat hepatitis B imunoglobulin a vakcínu. Je rovněž nutno vyšetřit, zdali sexuální partner rodičky není zdrojem přenosu. Vakcinace je velmi bezpečná, nebyly popsány žádné demyelinizační procesy.

### Literatura:

**Poland, G. A., Jacobson, R. M.:** Prevention of Hepatitis B with the Hepatitis B Vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 351, s. 2332-2338.

*O. Louthan*

NEJVÝZNAMNĚJŠÍ OSOBNOSTI PRAŽSKÉ LÉKAŘSKÉ FAKULTY

**FRANTIŠEK BURIAN**

(1881–1965)

K největším inovačním počínům, které vzešly z lékařské fakulty Univerzity Karlovy, patří nepochybně dílo plastického chirurga profesora Františka Buriana. Narodil se 17. září 1881 v Praze. Po maturitě na malostranském gymnáziu absolvoval lékařskou fakultu české Karlo-Ferdinandovy univerzity v Praze, kde byl roku 1906 promován doktorem medicíny. Po nedlouhém demonstrátorském a asistentském působení v ústavu patologické anatomie u profesora Jaroslava Hlavy zakotvil na chirurgické klinice jako demonstrátor a později asistent profesora Otakara Kukuly. Praktickou školou válečné a posléze rekonstruktivní chirurgie se Burianovi, podobně jako řadě jeho vrstevníků, staly zkušenosti z bojišť balkánských válek v letech 1912–1913 a za první světové války, během nichž Burian působil postupně v Srbsku, Bulharsku a Rumunsku. Po návratu do Prahy s raněnými vojáky zůstal ve službách nové československé armády jako vedoucí chirurgického oddělení posádkové nemocnice na Hradčanech. Nově nabyté zkušenosti v oblasti rekonstruktivní léčby válečných poranění a zmrzačení postupně aplikoval i na civilní pacienty. Dlouhá léta pracoval v provizorních podmínkách a krok za krokem rozšiřoval sféru své působnosti – zdokonaloval operační metody a zvyšoval počet operací i ošetřených. Lůžka pro ně i možnost operovat nalezl nejprve v roce 1921 v sanatoriu Červeného kříže, později v roce 1925 v Jedličkově ústavu pro zmrzačené, operoval i v Pražském sanatoriu v Podolí a dětské pacienty v Krči. Jeho specializované pracoviště získalo poté, co byl koncem roku

1921 propuštěn z armádních služeb, statut Ústavu plastické chirurgie.

Přes nesporné úspěchy a priority měl Burian potíže s habilitací v oboru, který nebyl v Praze ani nikde jinde jako habilitační etablován. Když mu bylo znemožněno habilitovat se se svou specializací, nezbylo mu, než se habilitovat ze všeobecné chirurgie (10. 7. 1929) prací z chirurgie poraněných cév. Habilitační přednášku ovšem proslavil o plastické chirurgii. Také mimořádná profesura mu byla 14. 8. 1937 udělena z „estetické“, nikoliv plastické chirurgie (na tento obor mu byla profesura změněna až v únoru 1948). Rozhodujícím momentem se pro Buriana i jeho obor stal rok 1937, kdy se po jmenování mimořádným profesorem přestěhoval se svým ústavem do státní nemocnice na Královských Vinohradech. Ve vinohradské nemocnici vzrostl nejenom počet lůžek a lékařů, ale rozšiřoval se i okruh prováděných zákroků (například o traumatologii poranění ruky, chirurgii kožních onemocnění nebo léčbu popálenin). Druhým přelomovým obdobím se pro Buriana i plastickou chirurgii stal rok 1948, kdy byl jmenován řádným profesorem (9. září s účinností od 1. října) a kdy jeho vinohradský ústav konečně získal statut univerzitní kliniky (23. ledna) a Burian byl jmenován jejím přednostou (18. června). Na své klinice založil roku 1953 popáleninové oddělení, první svého druhu na evropském kontinentu. V roce 1955 se Burian stal řádným členem Československé akademie věd a ředitelem její Laboratoře plastické chirurgie. V laboratoři pracoval i po roce 1963, kdy odešel z funkce přednosty kliniky, až do smrti.

Profesor Burian je právem považován za zakladatele plastické a popáleninové chirurgie nejen v českém (československém), ale i prů-

kopníkem obou oborů ve světovém kontextu. V Československu byla plastická chirurgie uznána za samostatný lékařský obor již ve třicátých letech 20. století, za zakladatele oboru je uznáván například i v USA. Do světa se jeho metody dostávaly již ve 30. letech prostřednictvím zahraničních studentů, kteří v Praze navštěvovali jím speciálně organizované demonstrace, i během jeho vlastních návštěv mezinárodních kongresů. Od počátku koncipoval obor ve spolupráci s ostatními lékařskými disciplínami, uplatňoval originální pracovní metody a rekonstrukční postupy aplikoval prakticky po celém těle. Své koncepte komplexní a kontinuální péče uplatňoval jak v léčbě vrozených vad (především rozštěpů), tak v léčbě poranění (zvláště ruky a obličeje) a popálenin. Ve všech případech akcentoval nejenom medicínskou, ale i estetickou stránku léčby. Vybudoval nejenom vlastní pracoviště v Praze, ale byl také iniciátorem zřízení podobných ústavů v Brně a v Bratislavě. Publikoval řadu článků (více než 200) i několik monografií a studijních textů. Mezi monografiemi, které vycházely převážně až po druhé světové válce, vyniká jeho *Chirurgie rozštěpu rty a patra* z roku 1954 a *Plastická chirurgie* z roku 1959. Posmrtně vyšlo ve spolupráci se zahraničními nakladatelstvími jeho souhrnné dílo *Atlas of Public Surgery* z roku 1967.

Profesor Burian získal řadu vědeckých ocenění i státních vyznamenání (čestný doktorát Univerzity Karlovy, Řád republiky a další).

Zemřel 15. října 1965 v Praze.

*doc. PhDr. Petr Svobodný*  
Ústav dějin UK – Archiv UK  
116 36 Praha 1, Ovocný trh 3  
e-mail: petr.svobodny@ruk.cuni.cz



*Dříve, než se zítřek stane včerejškem,  
lidé často přehlédnou šance,  
které jim nabízí dnešek.*

ČÍNSKÉ PŘÍSLOVÍ