

ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH

ČAS. LÉK. ČES., 145
2006, č. 7, s. 509–592
CLC EAL 145 (4)
509–592 (2006)

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

ROČNÍK 145 / 2006, č. 7

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
Sokolská 581, 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 VFN
Sokolská 581, 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

Aktuální téma

- Vonka V., Hamšíková E.: Karcinom děložního čípku: od poznání etiologie k profylaktické vakcině 511

Přehledový článek

- Zima T.: Trendy v klinické biochemii a laboratorní diagnostice 522
 Jáchymová M., Masters B. S., Horký K., Zima T., Martásek P.: Syntázy oxidu dusnatého, typické hemoflavoproteiny a jejich komplikovaná enzymologie 526
 Michalová K., Zemanová Z.: Molekulární cytogenetika v diagnostice nádorových onemocnění 532
 Šenolt L.: Diagnostické a prognostické biomarkery časně revmatoidní artritidy 538
 Komentář Hrnčíř Z. 542
 Kašpárek T., Příkrýl R., Schwarz D., Kučerová H., Češková E.: Hipokampus, morfologie mozku a schizofrenie 544
 Komentář Smolík P. 548
 Martan A.: Novinky v medikamentózní léčbě inkontinence moči u žen 549
 Hořejší J.: Gynekologie dětí a dospívajících v ČR 554
 Seeman P., Šišková D.: Autozomálně recesivní etnické choroby českých Romů 557
 Komentář Zeman J. 561

Původní práce

- Dolínková M., Křížová J., Lacinová Z., Doležalová R., Housová J., Krajíčková J., Božanská L., Papežová H., Haluzík M.: Polymorfismy genů pro adiponektin a rezistin u pacientek s mentální anorexií a obezitou – pilotní studie 562
 Jedličková A., Hajíčková M., Olišarová P.: Výskyt kvasinek a vláknitých hub u hematologických pacientů v letech 2002 – VIII. 2005 567

- Fait T., Vrablík M., Košťířová M., Trnková B.: Vliv různých aplikačních forem estrogenní substituční terapie na hladiny C-reaktivního proteinu 571
 Komentář Zima T. 574
 Calda P., Višková H., Bezdíčková D., Zima T.: Prenatální diagnostika v prvním trimestru gravidity v klinické praxi 575
 Kosová H., Hořejší J., Martínek J., Veselá M.: Autoimunní poškození ovarií u dospívajících dívek 578

Speciální sdělení

- Brdička R., Dobrovolná M.: Nabídka diagnostických služeb v oblasti molekulární genetiky v České republice. Je to málo, moc, nebo akorát? 582
 Nešpor K.: Co nového v prevenci škod působených alkoholem, tabákem a jinými látkami u dětí a dospívajících 585

Dějiny lékařství

- Klík J.: Dobřany na konci devatenáctého století 587

Sjezdy

- Emmerová M.: Zamyšlení nad Postgraduálními lékařskými dny v Plzni 589

- Osobní zprávy 584, 590

- Zprávy 566

- Knihy 521

- Nejvýznamnější osobnosti pražské lékařské fakulty
 Svobodný P.: Hermann Hubert Knaus 592

CONTENTS

(No. 7, 7th July 2006) Journal of Czech Physicians

Topic

- Vonka V., Hamšíková E.: Cervical Cancer Uteri: From the Etiology to Prophylactic Vaccine 511

Review Articles

- Zima T.: Trends in the Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics 522
 Jáchymová M., Masters B. S., Horký K., Zima T., Martásek P.: Nitric Oxide Synthase, Typical Flavohemoprotein and Their Complicated Enzymology 526
 Michalová K., Zemanová Z.: Molecular Cytogenetics in Diagnostics of Malignant Diseases 532
 Šenolt L.: An Update on Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Early Rheumatoid Arthritis 538
 Commentary Hrnčíř Z. 542
 Kašpárek T., Příkrýl R., Schwarz D., Kučerová H., Češková E.: Hippocampus, Structure of the Brain and Schizophrenia 544
 Commentary Smolík P. 548
 Martan A.: News in the Pharmacological Treatment of Female Urinary Incontinence 549
 Hořejší J.: Paediatric and Adolescence Gynaecology in Czech Republic 554
 Seeman P., Šišková D.: Autosomal Recessive Ethnic Diseases of Czech Roma 557
 Commentary Zeman J. 561

Original Articles

- Dolínková M., Křížová J., Lacinová Z., Doležalová R., Housová J., Krajíčková J., Božanská L., Papežová H., Haluzík M.: Polymorphisms of Adiponectin and Resistin Genes in Patients with Obesity and Anorexia Nervosa 562
 Jedličková A., Hajíčková M., Olišarová P.: Occurrence of the Yeast and Filamentous Fungi in Haematological Patients during 2002 to August 2005 567

- Fait T., Vrablík M., Košťířová M., Trnková B.: Changes of hsCRP Levels Induced by Different Application Ways of Estrogene Replacement Therapy 571
 Commentary Zima T. 574
 Calda P., Višková H., Bezdíčková D., Zima T.: Prenatal Diagnostics During the First Trimester in the Clinical Praxis 575
 Kosová H., Hořejší J., Martínek J., Veselá M.: Autoimmune Ovarian Failure in Adolescent Girls 578

Special Articles

- Brdička R., Dobrovolná M.: Availability of Molecular Genetic Diagnostic Services in the Czech Republic. Is It too Much, too Less or Enough? 582
 Nešpor K.: School-based Prevention of Alcohol, Tobacco and Drug Problems: What is New? 585

History of Medicine

- Klík J.: Dobřany at the end of Nineteenth Century 587

Congresses

- Emmerová M.: Retrospection on the Postgradual Medical Days in Plzeň 589

Personal News

- News 566, 590
 Books 521

The Most Eminent Personalities of the Prague Medical Faculty

- Svobodný P.: Hermann Hubert Knaus 592

<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@abompkapa.sk.
 Vychází 12x ročně. Předplatné na rok 1152 Kč (1560 Sk), jednotlivé číslo 96 Kč (130 Sk).

Informace o předplatném podává a objednávky českých předplatitelů přijímá: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel.: 296 181 805 – Jana Špalová, e-mail: spalova@cls.cz

Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky 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 4. 5. 2005. Zasláné příspěvky se nevracejí, jsou archivovány ČSL JEP. Vydavatel získá otištěním příspěvku výlučné nakladatelské právo k jejich užití. Otištěné příspěvky autorů nejsou honorovány, autoři obdrží bezplatně jeden výtisk časopisu, Vydavatel a redakční rada upozorňují, že za obsah a jazykové zpracování inzerátů a reklam odpovídá výhradně inzerent. Žádná část tohoto časopisu nesmí být kopírována a rozmnožována za účelem dalšího rozšiřování v jakémkoliv formě či jakýmkoliv způsobem, ať již mechanickým či elektronickým včetně pořizování 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

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Karcinom děložního čípku: od poznání etiologie k profylaktické vakcíně

Vonka V., Hamšíková E.

Oddělení experimentální virologie – Ústav hematologie a krevní transfuze I. LF UK, Praha

SOUHRN

Autoři podávají stručný přehled bádání, které vedlo k odhalení lidských papillomavirů (HPV) jako původců karcinomu děložního čípku (KDC). Popisují vlastnosti HPV a cestu, která vedla k vývoji profylaktické vakcíny proti genotypům HPV, jež jsou nejčastěji v příčinném vztahu ke KDC. Shrnují dosavadní výsledky studií bezpečnosti a účinnosti vakcín proti HPV a doporučují její brzké zavedení do praxe. Současně však upozorňují na to, že zavedení očkování nesmí narušit současný systém preventivních gynekologických prohlídek, které nejméně po dvě desetiletí zůstanou nejúčinnější zbraní v boji proti KDC.

Klíčová slova: karcinomu děložního čípku, profylaktická vakcína.

SUMMARY

Vonka V., Hamšíková E.: Cervical Cancer Uteri: From the Etiology to Prophylactic Vaccine

The authors briefly summarize the history of the research on the cervical cancer (CC) which has resulted in the recognition of human papillomaviruses (HPV) as the key etiological factors in CC. They describe the HPV properties and the process leading to the development of prophylactic vaccines directed against HPV genotypes most frequently responsible for the development of CC. They summarize the results of the recent studies with these vaccines and strongly recommend their introduction. At the same time they stress that the vaccination programs must not disturb the present system of preventive gynecological check-ups. These will remain the most efficient weapon in the war against CC for at least two decades.

Key words: cervical cancer uteri, prophylactic vaccine.

Vo.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 511–521.

Karcinom děložního čípku (KDC) je ve světovém měřítku druhou nejčastější malignitou u žen (1). Každé dvě minuty umírá na toto onemocnění jedna žena. Česká republika je, bohužel, v jeho výskytu na jednom z předních míst v Evropě. Incidence KDC u nás je 20–22 na 100 000 žen. To znamená, že každoročně registrujeme 1000 až 1200 nových případů nemoci. Navzdory zlepšené léčbě ročně na ni umírá kolem 400 žen.

Z HISTORIE

Již hluboko v 19. století si italský lékař Rigoni-Stern (2) všiml, že KDC je častým onemocněním u prostitutek, zatímco se vůbec nevyskytuje u řádových sester, které se řídily přísnými předpisy klášterního života. Své pozorování publikoval. Na dlouhá léta byla jeho práce zapomenuta. Nevíme přesně, kdo a kdy ji v zaprášených regálech starých lékařských knihoven objevil. Začala být citována ve druhé polovině 20. století, kdy nesmírně oživil zájem o KDC. Dlouhá řada brilantních epidemiologických studií totiž postupně potvrdila souvislost mezi nemocí a stylem sexuálního života. Jako nejrizikovější faktory se ukázaly být počet sexuálních partnerů, vysoká intenzita sexuálního života a věk jeho počátku. To posléze vedlo k hypotéze, že jde o onemocnění infekčního původu a že předpokládané etiologické agens se přenáší pohlavním stykem.

V průběhu studií, které následovaly, byla postupně podrobena kritickému zkoumání všechna agens, o kterých se vědělo, že se přenášejí sexuálním stykem. Výsledky byly negativní či neurčité. Ke zlomu došlo na konci 60. let minulého století, kdy dvě skupiny v USA – A. Nahmiase v Atlantě (3) a J. L. Melnicka v Houstonu (4) – téměř současně publikovaly, že pacientky s KDC mají daleko častěji protilátky k viru herpes simplex typu 2 (HSV2) než zdravé kontrolní osoby. Tento objev zazářil jako světlo na dosud ztemnělé cestě a udal směr dalšímu bádání. Na vysvětlenou dodejme, že HSV2 (neboli genitální HSV) je blízký viru herpes simplex typu 1 (HSV1), známého to původce lézí na rtech či v dutině ústní. Oba viry se liší svými biologickými vlastnostmi, tropismem, způsobem šíření a částečně též svými antigenními vlastnostmi. Právě to dovolilo odlišit, byť ne s absolutní spolehlivostí, protilátky proti oběma virům a identifikovat osoby, které v minulosti prodělaly infekci virem HSV2.

V průběhu 70. let minulého století rychle přibývalo poznatků, které posilovaly hypotézu o etiologickém vztahu mezi HSV2 a KDC. Kdekoli se na světě pátralo po přítomnosti protilátek k HSV2, všude včetně naší studie (5) se potvrdilo původní pozorování o jejich podstatně vyšší prevalenci u nemocných než u kontrolních žen (viz přehled 6). Výskyt nemoci a šíření viru HSV2 měly stejné epidemiologické charakteristiky. V několika studiích včetně té, kterou provedl proslulý A. B. Sabin, byly v nádorových buňkách nalezeny virově specifické antigeny v nepřítomnosti

prof. MUDr. Vladimír Vonka, DrSc.
128 20 Praha 2, U Nemocnice 1
fax: +420 221 977 392, e-mail: vladimir.vonka@uhkt.cz

infekčního viru, což odpovídalo předchozím zkušenostem s dobře definovanými zvířecími nádorovými viry (7–9). A co bylo snad nejdůležitější, v experimentech na hlodavcích se prokázal onkogenní potenciál viru HSV2 (10, 11). V dalších pokusech na opicích se podařilo virem vyvolat prekancerózní změny na děložním čípku (12). Zdálo se, že vše nasvědčuje tomu, že HSV2 je dlouho hledanou příčinou KDC.

Analýza získaných poznatků však ukázala, že paralela ke zvířecím nádorovým virům není úplná a není bez problémů. Tak například virové antigeny, prokazované v nádorových buňkách, nebylo možné tak dobře charakterizovat jako známé T (tumour) antigeny v nádorech vyvolaných polyomaviry (jako je virus SV40 či myší polyomavirus) či adenoviry. Přitom se zdálo být zřejmým, že každý z těch, kteří uspěli při průkazu proteinů HSV v nádorových buňkách, hovoří o něčem jiném. Rovněž mnohým z provedených séroepidemiologických studií bylo možné leccos vytknout. Vesměš šlo o studie retrospektivní („case-control studies“) a v jejich převážné většině byl výběr kontrolních osob dosti volný. V úvahu se často bral jen věk a pohlaví. A byla tu i další nejasnost. Na rozdíl od nádorů vyvolaných polyomaviry a adenoviry u zvířat, v buňkách KDC se nedařilo vždy prokázat DNA HSV2. Pozitivní nálezy (např. 13, 14) byly spíše výjimkou než pravidlem. To se vysvětlovalo tím, že užívané testy nejsou dosti citlivé, a posléze tak, že mechanismus onkogenního účinku HSV2 by mohl být jiný než u zmíněných virů. Připouštělo se, že virová akce by byla nutná jen pro transformaci buňky, ale nikoli pro udržení stavu transformace (15, 16). Tedy nikoli „hit-and-stay“, typické pro virovou karcinogenezi, ale „hit-and-run“ typické pro chemické karcinogeny. A pro tuto smělou hypotézu byly poskytnuty závažné důkazy: byla prokázána mutagenní schopnost produktu jednoho genu HSV (17, 18). Pro ty, kteří byli přesvědčeni o tom, že HSV2 je klíčovým etiologickým faktorem v patogenezi KDC, poskytl tento objev poslední důkaz, protože racionálně vysvětlil výše zmíněné nedostatky.

VZTAH MEZI VIRY A NÁDORY

Kritický pohled na komplex výše uvedených nálezů přes jejich kompatibilitu s etiologickou hypotézou připouštěl tři možnosti výkladu: 1) HSV2 je původcem KDC, 2) KDC či prekanceróní stavy zvyšují vnímavost k infekci HSV2 anebo vedou k aktivaci latentní infekce, 3) infekce virem a KDC jsou dva na sobě nezávislé důsledky sexuální promiskuity a původcem nemoci je jiný agens.

Určit vztah mezi virem a nádorem je úkol obtížný. Všechny dosud známé nádorové viry jsou v přírodě velmi rozšířeny a nádory se vytvoří pouze u velmi malé části infikovaných. Z toho plyne, že virus, pokud je za vznik nádoru skutečně odpovědný, je podmínkou nutnou, ale nikoli dostačující. Do hry musí vstoupit další faktory, které z buňky „iniciované“, tj. geneticky alterované virem, udělají buňku s maligním potenciálem. Jde především o chemické, vzácněji o fyzikální karcinogeny. Nicméně ty jsou povětšinou neznámé a kritéria pro ustavení etiologického vztahu je jako konkrétní a dobře definované faktory neberou v úvahu. Každý, kdo se objasňováním vztahů mezi viry a nádory zabývá, musí volit multidisciplinární přístup a hodnotit při své výzkumné práci komplex epidemiologických, imunologických a molekulově-biologických nálezů, případně doplněných experimentálními poznatky, jak jsme se pokusili popsat jinde (19). Největší význam pro objasnění etiologických vztahů mají nálezy epidemiologické, z nich pak důkazy, že infekce předchází vzniku nemoci a že intervence proti předpokládanému příčinnému agens významně sníží nemocnost. Síla prvního z těchto důkazů je falzifikační. To, že virová infekce předchází vzniku nemoci, neznamená, že ji způsobuje, ale důkaz, že infekce nepředchází vzniku nemoci, roli viru při jejím vzniku vylučuje. Jak už řečeno, všechny séroepidemiologické studie vztahu HSV2 ke KDC

byly retrospektivní, to znamená, že obě události, tj. infekce virem a vznik nemoci, se udály v minulosti a jejich sled nebylo možné určit. Síla druhého z požadovaných důkazů je spíše verifikační. Potlačení nemocnosti vakcinací proti podezřivanému infekčnímu agens je potvrzením etiologického vztahu. Tato strategie je však v etiologických studiích, týkajících se lidských nádorů, těžko použitelná, protože inkubační doba mezi infekcí a vznikem nádoru trvá zpravidla několik desítek let. Navíc, vakcíny proti HSV2 nebyly v té době k dispozici. Nejvhodnějším způsobem, jak pokročit v objasňování etiologického vztahu, bylo určit, jaký je sled událostí. Jedinou cestou, jak jej bezpečně poznat, bylo provedení prospektivní studie, v jejímž průběhu bude zjišťována nemocnost u původně zdravých infikovaných a neinfikovaných žen. Je-li HSV2 příčinou KDC, pak by měla být nemocnost u dříve infikovaných žen podstatně vyšší než u neinfikovaných. Nebude-li mezi oběma skupinami rozdíl, pak není HSV2 v příčinném vztahu k onemocnění.

VYLOUČENÍ HSV2 JAKO ETIOLOGICKÉHO AGENS

V roce 1973 jsme se společně s Jiřím Kaňkou a jeho spolupracovníky rozhodli provést v Praze prospektivní studii, jejímž cílem bylo poskytnout „poslední chybějící důkaz“ (sic!) etiologického vztahu mezi HSV2 a KDC. Patřili jsme v té době k těm, a to byli téměř všichni, kdož se problematikou zabývali, kteří byli hluboce přesvědčeni o tom, že takový vztah skutečně existuje. Výrazem síly naší víry bylo i to, že jsme se současně začali zabývat vývojem očkovací látky proti HSV2, což byla práce náročná a ve vakcinologii inovační. Vzhledem k tomu, že šlo o předpokládaný nádorový virus, musela být vakcína prostá virové DNA. Taková vakcína proti nádorovým virům v té době nikde neexistovala. Obě studie jsme synchronizovali tak, že měly dosáhnout svých cílů současně. Prospektivní studii jsme zahájili po dvouleté přípravě v prosinci 1975, tedy přesně před třiceti lety, a dokončili na jaře 1983 sepsáním výsledků. Délka přípravy byla vynucena obtížemi spojenými s organizací studie. Spočítali jsme si, že k získání smysluplných výsledků musíme do projektu zahrnout alespoň 10 000 žen. To vyžadovalo vybudování nového zázemí včetně zřízení dvou nových gynekologických ordinací, doplnění a vyškolení personálu (např. vytvoření skupiny psychologů, kteří budou s to získat od vyšetřovaných žen údaje o intimních stránkách jejich života; to byla nezbytná podmínka pro správný výběr kontrol pro budoucí sérologická vyšetření), sehnání finančních prostředků na platy externistů atd. Při tom jsme naráželi na potíže charakteristické pro tehdejší dobu. Naštěstí se vždy podařilo nalézt někoho, kdo se dal přesvědčit a pomohl vyřešit zdánlivě nepřekonatelné problémy.

Studie, její průběh a výsledky, které jsme získali, jsou popsány jinde (20–22). Zde zmíníme jen to nejdůležitější, co z projektu vyplynulo. Sérologická vyšetření, která byla provedena po dokončení sběru materiálu, ukázala, že v sérech odebraných v době vstupu do studie je výskyt protilátek k HSV2 u žen, které onemocněly neoplazií děložního čípku, stejně častý jako u kontrolních žen, které zůstaly zdravé, ačkoli se shodovaly s nemocnými v hlavních rizikových faktorech (např. v počtu sexuálních partnerů). To jednoznačně vyloučilo, že HSV2 je původcem nemoci. Vyšetření sér od původně zdravých žen odebraných v době onemocnění neukázalo žádné významné změny v hladině protilátek ve srovnání s dříve odebranými séry (23), což naznačilo, že ani druhá interpretace předěšlých séroepidemiologických nálezů (uvedená sub 2), viz výše) nemá své oprávnění.

V následujících letech byly publikovány výsledky dvou dalších prospektivních studií provedených v USA (7) a ve Finsku (24), jež potvrdily naše výsledky.

Tab. 1. Důkazy pro etiologická spojení mezi lidskými papillomaviry a karcinomem děložního čípku**Přímé důkazy**1. *Epidemiologické*

- infekce HPV jsou častější u pacientů než u zdravých osob, toto spojení je silné, stálé a biologicky koherentní,
- výskyt HPV a KDC mají podobné epidemiologické charakteristiky,
- infekce HPV předchází vzniku KDC,
- podání HPV vakcíny zabraňuje vzniku prekancerózních lézí vyvolaných HPV.

2. *Imunologické*

- pacientky s KDC mají daleko častěji protilátky k onkoproteinům E6 a E7 HPV než zdravé infikované osoby,
- u pacientek je vztah mezi přítomností či hladinami protilátek k HPV onkoproteinům a jejich klinickým stavem.

3. *Molekulově-biologické*

- nádorové buňky obsahují HPV specifické makromolekuly

Nepřímé důkazy

- geny pro onkoproteiny E6 a E7 jsou schopny imortalizovat savčí buňky kultivované *in vitro*, transfekce jedním aktivovaným buněčným onkogenem rezultuje v získání onkogenního potenciálu,
- inaktivace virových onkogenů vede ke ztrátě maligního fenotypu,
- zvířecí papillomaviry vyvolávají nádory u zvířat.

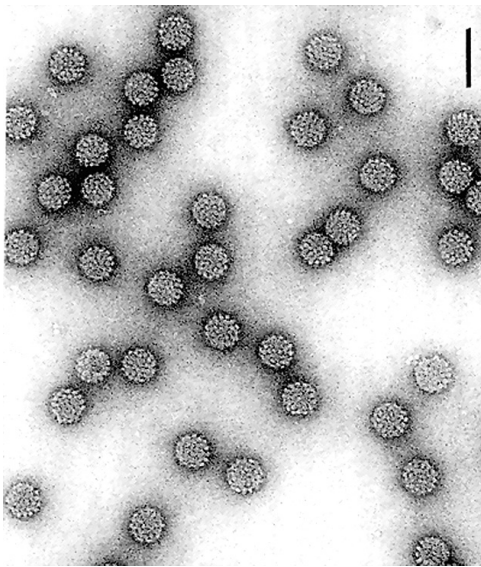
LIDSKÉ PAPILOMAVIRY A KDC

V době, kdy jsme dokončili náš projekt, se objevila první zpráva o tom, že původcem KDC by mohly být lidské papillomaviry (HPV). Zur Hausen a jeho spolupracovníci v DKFZ v Heidelbergu objevili v biopsích z KDC DNA nových genotypů papillomavirů (25–27), které označili čísly 16 a 18. Do té doby byly HPV považovány za víceméně nevinné původce bradavic. V následujících letech byly poznatky německých virologů potvrzeny v řadě jiných laboratořích. Přibýlo genotypů HPV, které byly postupně nalezeny v KDC, nicméně ony dva prvně zjištěné typy zůstávají ve světovém měřítku nejčastějším nálezem (28). Podle nedávno provedených metaanalýz více než 98 % KDC obsahuje HPV DNA. V jedné laboratoři, která asi představuje světovou špičku v oblasti diagnostiky HPV, byly výsledky pozitivní dokonce ve 100 % případů (29). Molekulově-biologické výsledky tedy silně svědčily pro etiologické spojení mezi HPV a KDC. Jak je uvedeno výše, pro ustavení etiologického vztahu jsou nutné i nálezy z dalších medicínských disciplín. Ty se v průběhu 90. let minulého století podařilo postupně získat. Nebylo to snadné, protože HPV nerostou na běžných typech tkáňových kultur a antigeny pro séroepidemiologické studie bylo nutné získat nekonvenčním způsobem. Prvními účinnými byly virové antigeny připravené pomocí genového inženýrství na bakteriích (30) a syntetické peptidy (31–34), připravené na základě znalosti sekvence DNA různých typů HPV a počítačových predikcí epitopů B. Provedené studie potvrdily, že přítomnost protilátek k antigenům HPV je podstatně vyšší u nemocných než u zdravých žen, že protilátky proti virovým onkoproteinům (viz níže) klesají při úspěšné léčbě (35–37), a naopak, že progresse onemocnění je spojena s jejich vzestupem (38). Na těchto úspěších se podílely desítky laboratoří po celém světě a potvrdily je rozsáhlé mezinárodní studie, na nichž jsme se podíleli (39–41). Náš další příspěvek k problematice vyšel z vyšetření sér z výše popsané prospektivní studie. Séra, jejichž testace vyloučila účast HSV2, poskytla důkazy o roli HPV. V sérech žen, které později onemocněly, byly protilátky k HPV přítomné významně častěji než u těch, které zůstaly zdravé, a jejich hladiny stoupaly v době mezi vstupem do studie a vznikem nemoci (většinou šlo o prekancerózní stavy) (42). Vyšetření materiálů z prospektivní studie přineslo ještě další důležitý důkaz. Cytologické stěry nabrané při vstupu do studie jsme vyšetřili na přítomnost HPV DNA, která je nesporným důkazem probíhající infekce. Zjistili jsme, že ženy, které v průběhu doby pozorování onemocněly, měly HPV DNA v cytologických stěrech odebraných při vstupu do studie 5x častěji než ženy, které zůstaly zdravé, což byl rozdíl statisticky vysoce významný (43). Nejdůležitější z epistemologického hlediska jsou samozřejmě výsledky vakcinace proti HPV, která je schopna zabránit vzniku prekanceróz, které předcházejí vývoji KDC (viz dále). Další důkazy, které ovšem lze považovat pouze za nepřímé, pocházejí z experimentálních studií. V několika laboratořích se podařilo prokázat transformační potenciál HPV pro buňky myši (44), krysy (45), křeččí (46) a lidské (47). V souhlasu s teoretickými předpoklady, samotné HPV buňky pouze imortalizují, tj., vybavují je neomezeným růstovým potenciálem *in vitro*. K tomu, aby transformované hlodavčí buňky získaly onkogenní vlastnosti, je potřeba dalších genetických změn, například aktivace onkogenu ras. Podobně jako lidské nádorové buňky, i transformované hlodavčí buňky obsahují virový genetický materiál a trvale tvoří virové onkoproteiny E6 a E7, které jsou nutné pro udržení jejich maligního fenotypu. Hlodavčí buňky transformované HPV jsou využívány jako nesmírně cenný model pro studium imunity proti nádorům vyvolaným HPV, zejména pak pro vývoj experimentálních terapeutických vakcín.

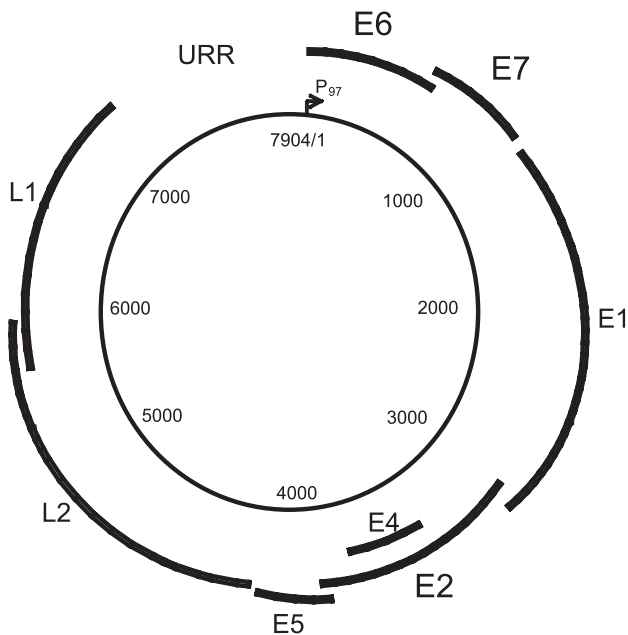
Souhrn výsledků dokazujících úlohu HPV v patogenezi KDC je v tabulce 1.

ZÁKLADNÍ VLASTNOSTI LIDSKÝCH PAPILOMAVIRŮ

Papillomaviry (PV) jsou malé neobalené DNA viry (obr. 1) s onkogenním potenciálem. Od roku 2000 jsou řazeny do samostatné čeledi *Papillomaviridae* (48). Infikují výhradně dlaždicové epitelové kůže a sliznic řady živočichů včetně člověka. Na základě tkáňové specifiky se dělí na kožní a slizniční a podle onkogenního potenciálu na nízkorizikové (low risk, LR) a vysokorizikové (high risk, HR) genotypy. Vstupní branou infekce jsou mikroskopická poranění kůže a sliznic. V současné době je známá alespoň částečná sekvence až 300 genotypů papillomavirů, z nichž více než 100 infikuje člověka. Jejich počet pravděpodobně není dosud konečný. Taxonomie PV je založena na fylogenetických algorit-



Obr. 1. Elektron-mikroskopický obrázek lidských papillomavirů



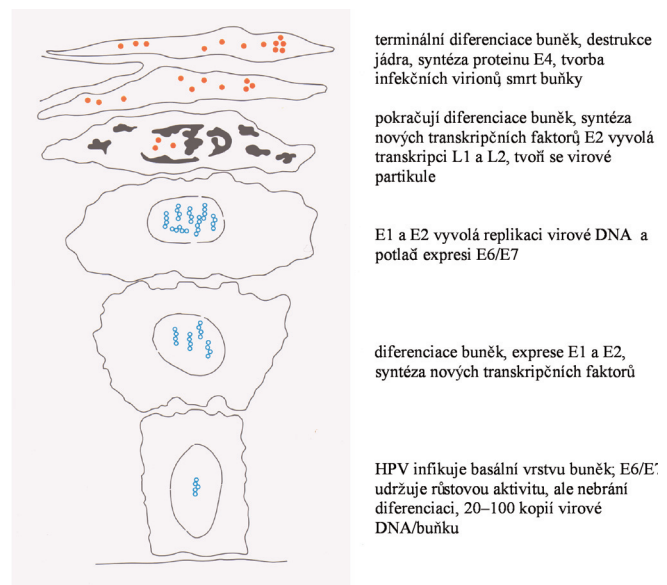
Obr. 2. Organizace genomu papillomavirů

mech, které analyzují podobnost mezi jejich genomy. Jednotlivé genotypy jsou definovány více než 10% odlišností v sekvenci L1 genu. Subtypy v rámci jednoho genotypu se liší o 2–10 % a varianty o méně než 2 %.

Přes značnou rozdílnost v biologických vlastnostech a striktní druhovou specifikou mají všechny PV stejně organizovaný genom (obr. 2). Je tvořen dvouřetězcovou, kovalentně uzavřenou molekulou DNA o délce přibližně 8000 párů bází. Dělí se do 3 funkčních částí. Časné geny (E1–E7) jsou kódovány oblastí E (early), strukturální proteiny virionu (L1 a L2) oblastí L (late). Zbývající část genomu tvoří nekódující zóna (URR – upstream regulatory region), nesoucí cis-elementy nezbytné pro replikaci a transkripci virové DNA. Všechny kódující sekvence jsou uloženy na jednom vlákně virové DNA.

Replikační cyklus papillomavirů je úzce spjat s diferenciací buněk. K infekci jsou vnímavé kmenové buňky v bazální vrstvě epitelu (obr. 3). V nich a jejich potomstvu, tzv. přechodně se pomno-

žujících buňkách, dochází pouze k omezené expresi časných genů a replikaci virového genomu. Ten se namnoží na 20–100 kopií na buňku (49). Při dozrávání buněk a jejich migraci k povrchu se exprimují další virové geny a kompletní viriony vznikají až v terminálně diferencovaných keratinocytech. Ty se patologicky mění a hynou. Označují se jako koilocyty. Pro ně je typické scvrklé jádro obklopené jakoby prázdňným prostorem („hallo“). V průběhu celého růstového cyklu perzistuje genom PV v infikované buňce ve formě epizómu. Někdy však infikované buňky dlouhodobě přežívají, aniž by v nich byl virový růstový cyklus dokončen. Z nich pak mohou vzniknout buňky s maligním fenotypem. Podkladem je zpravidla rozštěpení virové DNA a její integrace do buněčného genomu. K rozštěpení dochází v oblasti genu E2, jehož produkt při normální replikaci viru (kromě svých dalších funkcí) tlumí expresi genů E6 a E7. Inaktivací genu E2 se ztrácí kontrola nad geny E6 a E7.



Obr. 3. Životní cyklus papillomavirů

Produkty těchto genů fungují jako onkoproteiny a odpovídají za vznik maligního fenotypu buňky. Z pohledu viru je to však „nehoda“; transformovaná buňka se stává pro viry nepermissivní, to znamená, že netvoří infekční potomstvo.

Genitální trakt člověka infikuje asi 40 různých genotypů HPV, které jsou s dalšími HPV taxonomicky řazeny do skupiny alfa (48). Ve vyspělých zemích jsou HPV nejčastěji sexuálně přenášenými viry (50, 51). Až 80 % sexuálně aktivních lidí je v průběhu života infikováno alespoň jedním genotypem (52). Vedle přenosu sexuálního byl prokázán i přenos perinatální, transplacentární a kožním kontaktem (53).

Infekce genitálními typy HPV je u více než 80 % osob bezpříznaková a dá se detekovat pouze za použití molekulově-biologických metod (54). U zbývajících žen se první klinicky patrné léze objeví jeden až šest měsíců po infekci. V průběhu pomnožování viru se aktivuje nejprve buňkami zprostředkovaná imunitní odpověď. U značného podílu (asi 50 %) infikovaných se v průměru po 9 měsících objeví protilátky proti proteinům virové kapsidy. U imunokompetentních osob pak virus zpravidla vymizí (55, 56). Condylomata acuminata neboli genitální bradavice a laryngeální papilomy jsou klinickým projevem infekce LR genotypy HPV, mezi které se řadí především typy 6 a 11, v menší míře pak typy 42, 43, 44. LR viry se jen výjimečně nacházejí ve zhoubných nádorech. Subklinické virové infekce, jejichž výrazem je přítomnost koilocytů, a také formy latentní, kdy lze HPV infekci zjistit pouze za použití

molekulově-biologických metod, mohou za přispění dalších faktorů vyvolat vznik intraepiteliálních lézí. Lehké léze (LSIL – low-grade intraepithelial lesion), odpovídající ve starší nomenklatuře cervikálním intraepiteliálním neoplaziím 1. stupně (CIN1) a méně pokročilé části neoplazií 2. stupně (CIN2), se většinou spontánně odhojí. Takové léze jsou převážně pouze výrazem produktivní HPV infekce. Pouze malá část LSIL přechází do těžkých forem (HSIL – high-grade intraepithelial lesion), podle starší nomenklatury odpovídající pokročilejší části CIN2 a CIN3, mezi které zařazujeme i karcinom *in situ*. Těžké léze (HSIL), skutečný prekursor KDC, jsou definovány extenzivní proliferací nezralých buněk v nižších vrstvách epitelu, ve kterých se postupně kumulují další genetické změny. Produktivní HPV infekce v takových lézích je značně omezena (57). HSIL se spontánně vyhojí méně často a bez adekvátní léčby po různě dlouhé době perzistence mohou přejít v invazivní karcinom (58). Na regresi lézí se podílí především imunitní odpověď zprostředkovaná buňkami. O účasti imunologických mechanismů svědčí to, že imunosuprimované osoby (transplantovaní pacienti, pacienti s AIDS či jinak porušenou imunitou) mají často klinicky manifestní projevy infekce HPV (59–62). V závislosti na tíži léze se zužuje původní spektrum genitálních genotypů HPV. S KDC je spojeno více než 20 HR HPV typů, především typy 16 a 18 (celosvětově přibližně 70 % případů), vzácněji pak další typy jako 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58 a 59, které jsou častěji přítomné v prekancerózních lézích. Riziko onemocnění výrazně zvyšuje dlouhou perzistující infekce HR HPV, která je často spojena s přítomností velkého množství viru (63–65). Pravděpodobně nejdůležitější příčinou trvání virové infekce a následného rozvoje premaligních a maligních lézí je neschopnost imunitního systému účinně se s virovou infekcí vyrovnat (66, 67).

IMUNIZACE PROTI NÁDORŮM VYVOLANÝM PAPILOMAVIRY

Imunologická intervence proti nádorům vyvolaným HPV může být dvojího druhu. Prvním typem jsou vakcíny profylaktické, které obsahují proteiny virové kapsidy. Neutralizační protilátky, které takové vakcíny indukují, zabrání infekci anebo ji alespoň výrazně omezují. Druhý typ vakcín je určen k léčbě lézí spojených s HPV infekcí včetně již existujících nádorů. Ty jsou zaměřeny proti virovým onkoproteinům (E6 a E7), které jsou trvalou součástí nádorové buňky. Cílem imunizace je indukovat specifickou buněčnou imunitu, která je s to eliminovat z organismu patologicky pozměněné buňky. Terapeutické vakcíny jsou ve vývoji a prozatím nebylo s jejich pomocí dosaženo výraznějších úspěchů. Lze si představit i vakcíny kombinované, které by obsahovaly oba typy virových proteinů a mohly by zabránit HPV infekci a zároveň eliminovat infikované nebo už transformované buňky.

Příprava účinné profylaktické vakcíny byla spojena s nemalými potížemi. Jak už je uvedeno výše, HPV se nemnoží v obvyklých typech tkáňových kultur, což je dáno jejich biologickými vlastnostmi. Všechny papillomavirové vakcíny se připravují metodami genového inženýrství.

Vývoj profylaktických vakcín, kterým bude věnována zbývající část tohoto článku, byl počátkem 90. let minulého století umožněn poznáním, že samotný hlavní protein virové kapsidy, označovaný jako L1, je s to spontánně vytvářet útvary podobné virovým částicím (VLP – virus-like particles). Tvorba VLP byla pozorována po vnesení různých rekombinantních konstruktů do savčích (68, 69) či hmyzích buněk (70), ale i v geneticky zmanipulovaných kvasinkách (71) a bakteriích (72). Vzniklé částice jsou morfologicky nerozeznatelné od infekčních virionů, ale na rozdíl od nich nenesou virovou genetickou informaci a nejsou proto s to se ani množit, ani transformovat buňky. V experimentálních zvířecích modelech se

brzy zjistilo, že VLP jsou schopné vyvolat tvorbu vysokých hladin typově specifických neutralizačních protilátek, které příjemce chrání před následnou čelení vysokými dávkami příslušného zvířecího papillomaviru (73–75). Další pokusy ukázaly, že VLP se váží na myeloidní dendritické buňky, jsou jimi pohlcovány a vyvolávají jejich dozrávání a aktivaci. Na povrchích dendritických buněk se zvyšuje exprese molekul MHC I. a II. třídy a dalších molekul. Dendritické buňky produkují cytokiny, které favorizují Th1 specifickou imunitní odpověď (76, 77). VLP však neaktivují profesionální antigen-prezentující buňky epiteliálních tkání, i když jsou jimi pohlcovány stejně účinně jako myeloidními dendritickými buňkami (76). Tento jev, jehož příčiny nejsou známy, by mohl být jedním z mechanismů, které napomáhají HPV uniknout imunologickému dozoru.

Úspěchy dosažené na zvířecích modelech stimulovaly obdobnou výzkumnou práci s HPV. V prvních klinických studiích fáze I byly HPV VLP vakcínami nebo placebem očkovány zdravé dospělé ženy. Výsledky prokázaly téměř všeobecnou sérokonverzi ve skupině očkované vakcínou (78–80). Hladiny protilátek po parenterální aplikaci vakcíny byly mnohonásobně vyšší než hladiny protilátek po přirozené infekci. Při použití hydroxidu hlinitého jako adjuvans byly dosaženy hladiny protilátek nezávislé na velikosti prověřovaných dávek VLP. V *in vitro* testech buněčné imunity ženy očkované VLP odvozenými od HPV16 reagovaly pozitivně nejen s homologním antigenem (tj. VLP16), ale také s VLP odvozené od genotypů typu 18, 31 a 53 (81). To naznačilo, že obalový protein L1 viru HPV16 obsahuje T epitopy sdílené s povrchovými antigenními determinantami některých jiných genotypů. Vakcína rovněž indukovala tvorbu zánětlivých cytokinů stejně jako cytokinů vytvářených buňkami CD4+ Th1 a Th2 (82).

Výsledky první rozsáhlé kontrolované klinické studie, která měla prověřit účinnost HPV16 VLP monovakcíny u mladých žen, byly publikovány v roce 2002 (83). Studie byla provedena jako dvojité slepá a bylo do ní zařazeno 2392 negravidních žen ve věku 16–23 let, u kterých nebyly v minulosti zjištěny patologické cytologické změny a které neměly dosud více než 6 sexuálních partnerů. Ženy byly náhodně rozděleny do 2 skupin. Jedné byla aplikována vakcína v dávce 40 µg HPV16 VLP navázaných na 225 µg adjuvans (hydroxyfosforečnan hlinitý/síran hlinitý) v 0,5 ml a druhé pouze adjuvans ve stejném objemu. Kapsidy byly připraveny jako výzkumný produkt v kvasinkovém (*Saccharomyces cerevisiae*) expresním systému firmou Merck&Co. Vakcína (či placebo) byla aplikována intramuskulárně ve třech dávkách, a to v den 0 a 2 a šest měsíců po podání první dávky. Ženy byly sledovány průměrně 4 roky, a to cytologicky a virologicky (detekce HPV DNA, detekce specifických protilátek). Reaktogenost vakcíny byla srovnatelná s aplikací placeba; více než 90 % žen udávalo bolest v místě vpichu. Analýza účinnosti byla posléze provedena na souboru žen, které byly při vstupu do studie bez protilátek k HPV16 a u kterých nebyla prokázána HPV16 DNA v den 0 a 30 dní po poslední imu-

Tab. 2. Účinnost experimentální monovakcíny HPV16 VLP (firma Merck&Co)

End point	vakcína (no=768)	placebo (no=765)	účinnost (%)
HPV16+ (≥2 náběry, >4 m)	0	68	100
HPV16+ při posledním náběru	7	19	67
HPV16/CIN1	0	12	100
HPV16/CIN2/3	0	12	100
Persistentní HPV16 infekce nebo HPV16/CIN	7	111	94

nizační dávce (měsíc 7). V Tabulce 2 jsou shrnuty nejdůležitější získané výsledky, týkající se účinnosti. Je zřejmé, že aplikace vakcíny významně redukovala ustavení perzistentní HPV16 infekce. Všechny histologicky potvrzené případy CIN spojené s HPV16 byly nalezeny v kontrolní skupině, tj. účinnost vakcíny byla stoprocentní. Jeden měsíc po 3. dávce byl ve skupině vakcinovaných průměrný geometrický titer HPV16 specifických protilátek 1510, tj. více než 60x vyšší než u žen, které vytvořily protilátky po přirozené infekci virem HPV16.

HPV VAKCÍNY PŘIPRAVOVANÉ K ROZSÁHLÉMU POUŽITÍ

V přípravě komerčně dostupných profylaktických HPV vakcín nejdále pokročily firmy GlaxoSmithKline (produkt je označen jako CERVARIX) a Merck&Co. (s komerčním názvem GARDASIL). Obě vakcíny jsou v současnosti v klinických studiích III. fáze. V tabulce 3 jsou shrnuty základní vlastnosti obou vakcín. Je zřejmé, že vakcíny se v několika ohledech liší. Vakcína CERVARIX je divalentní, složená z VLP odvozených od genotypů HPV16 a 18, navázaná na adjuvans ASO4 (tab. 3). Je připravována pomocí bakulovirového expresního systému v tkáňových kulturách z hmyzích buněk. Výsledky klinických zkoušek II. fáze byly uveřejněny koncem roku 2004 (84). Studie byla provedena jako dvojité slepá, s cílem sledovat reaktogenost a účinnost vakcíny vzhledem k incidentní a perzistentní infekci typu HPV obsaženými ve vakcíně a při prevenci patologických cervikálních změn. Dalším sledovaným parametrem byla schopnost vakcíny vyvolat protilátkovou odpověď. Do studie bylo zahrnuto 1113 žen z 32 center v USA, Kanadě a Brazílii ve věku 15–25 let. Nebyly do ní zařazeny ženy, které měly v anamnéze patologický cytologický nálezn, ablativní nebo excizní ošetření děložního čípku či genitální bradavice a které udávaly více než 6 sexuálních partnerů. Devadesát dní před aplikací první dávky byly ženy cytologicky negativní, bez protilátek proti HPV16 a 18 a negativní na přítomnost DNA HPV16, 18 a dalších 12 HR typů. Ženy byly v rámci jednotlivých center nahodile rozděleny do 2 sku-

pin. Jedné skupině byla aplikována vakcína v celkovém objemu 0,5 ml/dávku, ženy ve druhé skupině dostaly placebo. První dvě dávky byly podány v měsíčním intervalu a třetí dávka za 6 měsíců po první. Ženy byly sledovány cytologicky průměrně 27 měsíců po ukončení vakcinace, v materiálech odebíraných v půlročních intervalech se zjišťovaly hladiny protilátek a přítomnost HPV DNA. Ženy s nálezem HSIL a opakovaným nálezem ASC nebo LSIL byly vyšetřeny kolposkopicky, případné léze byly ověřeny histologicky.

Účinnost vakcíny byla analyzována na skupině žen, ze které byly vyloučeny ty, které měly protilátky proti VLP16 či 18 v den 0 nebo byly pozitivní na HPV DNA v den 0 a při aplikaci poslední dávky, nesouhlasily se schématem očkování, neukončily z nějakých důvodů imunizační schéma nebo nedodržely dobu sledování. Reaktogenost vakcíny byla opět velice nízká. Účinnost vakcíny proti infekcím genotypy 16 a 18 a s nimi spojenými klinickými nálezy 27 měsíců po ukončení očkování je uvedena v tabulce 4. Je zřejmé, že očkování bylo s to zcela zabránit perzistentní infekci, která byla v této studii definována opakovaným nálezem HPV DNA ve dvou následujících odběrech v časovém intervalu alespoň 6 měsíců, a téměř zcela vzniku patologických cytologických nálezů (s účinností 93,5 %), vyvolaným HPV16 či 18. Sedm měsíců po aplikaci první dávky měly všechny sledované ženy protilátky proti genotypu 16 a 99,7 % žen proti genotypu 18. Po 18 měsících byly všechny očkované ženy séropozitivní proti oběma typům. Geometrický titer protilátek je uveden v tabulce 5; maximálních hodnot dosahuje 7 měsíců po první dávce. Ještě po 18 měsících byly titry protilátek proti HPV16 více než 15x vyšší a proti HPV18 více než 12x vyšší než titry protilátek u neočkovaných zdravých žen, které byly infikovány HPV.

Schopnost vakcíny zabránit perzistentní infekci a vzniku lézí asociovaných s genotypy HPV, které jsou příbuzné typu 16 (typ 31, 35, 33, 58, 52) a typu 18 (typ 45, 59, 70, 85, 39, 68) (85) byla analyzována na souboru dat získaných 18 měsíců po aplikaci první dávky. Z výsledků bylo zřejmé, že očkování alespoň částečně chrání proti perzistující infekci příbuznými genotypy HPV a proti rozvoji jimi vyvolaných lézí. To bylo určitým překvapením, protože se

Tab. 3. Základní parametry vakcín Cervarix a Gardasil

	CERVARIX (GSK)	GARDASIL (Merck&Co.)
typy HPV VLP	16, 18	6, 11, 16, 18
produkční systém	bakuloviry (hmyzí buňky)	kvasinky
adjuvans (placebo)	ASO4 (hydroxid hlinitý 500 µg + 3-deacylovaný monofosforyl lipid 50 µg)	hydroxyfosforečnan hlinitý/síran hlinitý (225 µg)
velikost užití dávky	20 µg VLP16, 20 µg VLP18	20 µg VLP6, 40 µg VLP11, 40 µg VLP16, 20 µg VLP18
imunizační schéma	den 0, m 1, m 6; i.m.	den 0, m 2, m 6; i.m.

Tab. 4. Účinnost vakcíny Cervarix

	typ HPV	vakcína (No=366)	placebo (No=355)	účinnost (%)
incidentní infekce	16	6	29	81,2
	18	6	16	65,1
perzistentní infekce	16	0	13	100
	18	0	4	100
patologické cytologické nálezy (HPV16/18)		1	15	93,5

dosud mělo za to, že VLP navozují pouze tvorbu typově specifických neutralizačních protilátek. Přes vysokou statistickou významnost nálezů je vzhledem k malému počtu žen infikovaných zmíněnými typy nutné ověřit vyvolání zkřížené imunity na větších souborech vakcinovaných.

Klinickými zkouškami II. fáze úspěšně prošla rovněž druhá vakcína, tetravalentní vakcína GARDASIL, která obsahuje VLP genotypů 6, 11, 16 a 18 (86) navázaných na amorfní směsi hydroxyfosforečnanu hlinitého/síranu hlinitého (tab. 3). VLP jsou připravovány v kvasinkovém expresním systému. Dvojitě slepá studie byla opět multicentrická, probíhala v Brazílii, USA a Evropě, zařazeno do ní bylo celkem 1158 negravidních žen ve věku 16–23 let, které neměly ve své anamnéze patologický cytologický nález a udávaly maximálně 4 sexuální partnery. Ženy byly náhodně rozděleny do 4 skupin. Tři skupiny po 277 ženách byly očkovány vysokou (VLP6/11/16/18 – 80/80/40/80 µg), střední (40/40/40/40 µg) nebo nízkou (20/40/40/20 µg) dávkou vakcíny. Čtvrtá skupina čítající 275 žen dostala placebo. Přítomnost HPV DNA a specifických protilátek byla monitorována v šestiměsíčních intervalech, vzorky na cytologickou analýzu byly od 12. měsíce odebírány v ročních intervalech. Případné léze byly vyšetřeny histologicky. Reaktogenost vakcíny byla nejnížší při podání nejnižších dávek VLP, přičemž sérologická odpověď byla srovnatelná při aplikaci všech tří dávek

Tab. 5. Protilátková odpověď proti jednotlivým typům HPV (vakcína CERVARIX)

	GMT	
	HPV16	HPV18
prevakcinační (den 0)	4	4
měsíc 7	5334	3365
měsíc 18	801	481

Tab. 6. Protilátková odpověď proti jednotlivým typům HPV (vakcína GARDASIL)

	GMT			
	HPV6	HPV11	HPV16	HPV18
měsíc 7	582	697	3892	801
měsíc 36	93	94	509	60

Tab. 7. Účinnost vakcíny GARDASIL

	vakcína (no=276)		placebo (no=275)		účinnost (%)
	No ¹	pozitivních	No ¹	pozitivních	
perzistentní infekce					
HPV6	214	0	209	13	100
HPV11	214	0	209	3	100
HPV16	199	3	198	21	86
HPV18	224	1	224	9	89
patologické cytologické nálezy					
asociované s HPV6/ 11/16/18	235	0	233	6	100
externí genitální léze ²	235	0	233	3	100
CIN	235	0	233	3	100

¹Čísla udávají počet negativních k danému genotypu HPV.

²condyloma accuminatum, vulvární intraepiteliální léze, vaginální intraepiteliální léze

vakcíny: jeden měsíc po třetí dávce byly všechny vakcinované ženy séropozitivní. Geometrický titer protilátek vakcinovaných žen (tab. 6) byl 1 měsíc po ukončení očkování výrazně vyšší než u žen z kontrolní neočkované skupiny, které byly při vstupu do studie séropozitivní po předchozí přirozené infekci (10x u HPV6, 7x u HPV11, více než 100x u HPV16 a 20x u HPV18). Po 36 měsících sledování titry protilátek výrazně poklesly, ale s výjimkou HPV11 byly stále vyšší než hladiny protilátek u neočkovaných séropozitivních žen. Největší rozdíl (více než 20násobný) byl u HPV16.

Účinnost vakcíny byla analyzována ve skupině žen, které byly v den 0 séronegativní na daný typ HPV, negativní na HPV DNA stejného typu v den 0 a 30 dní po poslední dávce a byly imunizovány 3 dávkami podle vakcinačního protokolu (VLP6/11/16/18 – 20/40/40/20 µg). V tabulce 7 jsou shrnuty výsledky analýzy účinnosti po 36 měsících sledování. Je z nich patrné, že účinnost vakcíny proti vzniku lézí asociovaných s vakcinačními genotypy HPV byla 100%. Perzistentní infekce, definovaná na rozdíl od předchozí studie jako opakovaný nález HPV DNA v odběrech v intervalu minimálně 6 měsíců nebo jednotlivým nálezem HPV DNA při posledním odběru, byla ve 13 případech (z toho 3x ve skupině vakcinovaných) detekována právě až v posledním odběru, tedy pouze jedenkrát. Účinnost vakcíny ve smyslu prevence perzistující infekce

byla u jednotlivých genotypů HPV obsažených ve vakcíně 86–100 %.

Projekt FUTURE II, který je součástí probíhajících klinických studií fáze III vakcíny GARDASIL, zjišťoval vliv vakcinace na rozvoj lézí CIN2/3 a adenokarcinomu *in situ* (87). Do studie byly zařazeny ženy ve věku 16–26 let ze 13 zemí Severní a Jižní Ameriky, Evropy a Asie. Celkem bylo 6082 žen očkováno vakcínou a 6075 žen dostalo placebo. Ženy byly sledovány od 7. měsíce po první dávce průměrně po 17 měsících. U žádné z 5301 vakcinovaných ale u 21 z 5258 kontrol se v průběhu pozorování vyvinula těžká cervikální léze (HSIL) spojená s HPV16 či 18 (P<0,0001).

Součástí III. fáze klinických studií je sledování protilátkové odpovědi u dětí. Tři dávky vakcíny byly podány přibližně 1000 děvčat a chlapců ve věku 10–15 let a skupině 500 mladých žen ve věku 16–23 let. Geometrické titry specifických protilátek 7 měsíců po první dávce byly u dětí ještě vyšší než u starších dívek.

Lokální vedlejší účinky, k nimž patří bolest, zarudnutí a zduření v místě vpichu, byly u vakcinovaných o něco častější než v kontrolní skupině. Systémové vedlejší účinky byly v obou skupinách srovnatelné, to znamená, že je vakcíny nevyvolaly.

Z dosavadních poznatků tedy vyplývá, že profylaktické vakcíny založené na VLP jsou bezpečné, jsou velice dobře snášeny a jsou

vysoce imunogenní. V klinických studiích III. fáze jsou v současné době desítky tisíc osob, kromě mladých žen a dětí rovněž ženy ve věkové skupině 24–45 let a mladí muži ve věku 16–24 let. Očekává se, že již v tomto roce bude alespoň jedna z vakcín komerčně dostupná.

OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY VAKCINACE

Tabulka 8 uvádí, jaké jsou podle matematických modelů předpokládané důsledky očkování současnými vakcínami. Především dojde k poklesu výskytu klinických onemocnění. Bude-li vakcína typově specifická, jak se před zahájením vakcinace domnívali její tvůrci, pak nás čeká pokles výskytu KDČ o cca 70 %. Potvrdí-li se předběžné výsledky o existenci funkční zkřížené imunity, pokles by mohl překročit 80 % a při doplnění vakcíny o dva či tři další HR genotypy by nebylo nereálné očekávat účinnost blížící se 90 %. Zatímco taková situace nastane za několik desítek let, už v relativně blízké budoucnosti se dá počítat s podstatnou redukcí patologických cytologických nálezů a prekanceróz. To by umožnilo snížit počet nutných kontrolních vyšetření, expertních kolposkopií, punkčních biopsií, histologických vyšetření a chirurgických výkonů. Znamenalo by to úsporu značné části finančních prostředků vynakládaných na prevenci KDČ. Neméně významným faktorem je odstranění či alespoň minimalizování rizik spojených s chirurgickou léčbou onemocnění, jako je například ztráta fertility u mladých žen a psychické trauma spojené s vlastním výkonem či se ztrátou partnera a nejistou prognózou onemocnění. Kromě poklesu výskytu neoplazií děložního čípku můžeme očekávat i redukcii výskytu dalších zhoubných nádorů spojených s infekcí HPV16

Tab. 8. Očekávané přínosy profylaktických vakcín – redukce nálezů

	KDČ	HSIL	LSIL
HPV16+18	70 %	50 %	20 %
HPV příbuzné typy (31, 33, 35, 45, 52)	12 %	20 %	20 %
celkem	82 %	70 %	40 %

a HPV18, tj. velké části anogenitálních a rovněž asi jedné čtvrtiny zhoubných nádorů hlavy a krku. Právě u nich rychle přibývá důkazů o etiologickém vztahu k HPV. Použití tetra vakcíny by kromě toho snížilo výskyt nepříjemných genitálních bradavic a laryngeální papillomatózy.

JAK POSTUPOVAT V ČESKÉ REPUBLICĚ?

Situace v České republice je pro brzké zahájení rozsáhlého očkování a jeho kontrolu mimořádně příznivá. Diagnostika infekcí HPV a výzkumná epidemiologická a imunologická práce s HPV je na velmi dobré mezinárodní úrovni a v zemi existuje několik klinických pracovišť, která se o výzkumnou práci s HPV intenzivně zajímají. Před zahájením vakcinačního programu v České republice je třeba učinit závažná strategická rozhodnutí, která se budou opírat o znalosti distribuce genotypů HPV v naší populaci, a to jak u žen s KDČ, tak i u zdravých osob. Také by měly být provedeny doporučení očekávaného snížení výskytu KDČ a prekanceróz, k němuž by mělo dojít v důsledku vakcinace v příštích desetiletích. Na základě získaných informací by se mělo rozhodnout, kdy a koho očkovat a jak a kdy vakcinace ovlivní organizovaný skríninkový program

prevence KDČ. S podporou Ministerstva zdravotnictví ČR vznikla pracovní skupina, která se přípravou vakcinačního programu začala zabývat. I když se zatím nedopracovala jednotných závěrů, vláde v ní shoda v tom, že Česká republika, zaujímající jedno z předních míst ve výskytu KDČ v Evropě, by měla být mezi prvními zeměmi, ve které se začne systematicky a ve velkém měřítku očkovat. Na popularitě vakcíně přirozeně ubírá to, že se její největší efekt, tj. výrazný pokles výskytu KDČ, projeví nejdříve za 15, ale spíše až za 20 či 30 let. Očkování bude velkou investicí do budoucnosti.

Pro HPV–VLP vakcínu platí tytéž zásady jako pro jiné vakcíny. Její použití by se mělo opírat o znalosti o patogenezí, imunogenezi a epidemiologii nemoci a samozřejmě o dosavadní zkušenosti s vakcínou. Jejími přednostmi je její téměř nulová reaktogenita a téměř stoprocentní účinnost. Jde zřejmě o jednu z nejdokonalejších vakcín, jaké kdy byly připraveny. Z toho, co víme o nemoci, a z toho, co víme o nové vakcíně, se jeví nejpřírozanější zaměřit se v první řadě na dívky před zahájením sexuálního života, nejvhodnější by asi byl věk 12 let. Měl by být naočkován celý ročník a takto by se mělo postupovat rok za rokem. Očkování prepubertálních dívek by mělo být podle autorů tohoto článku pilířem vakcinační politiky proti KDČ. V tomto názoru se shodují se zahraničními odborníky. Vedle plošného očkování dívek by se však mělo přistoupit i k selektivnímu očkování dospělých žen. Hlavním cílem by měly být ženy, které nebyly dosud infikovány genotypy HPV obsaženými ve vakcíně. Vzhledem k tomu, že víme, že infekce HPV je tím nebezpečnější, čím dříve k ní dojde, upřednostněny by měly být ženy mladší 25 let. Ale vakcína bude mít pravděpodobně příznivý efekt i u žen, které už byly infikovány a jsou zatím bez patologických nálezů. Možných přínosů je několik. Za první je to pravděpodobnost zkrácení doby infekce. Z předchozích epidemiologických studií se ví, že infekce HPV je tím nebezpečnější, čím déle trvá. Přerušení perzistující infekce by snížilo pravděpodobnost vzniku neoplazie. Za druhé, redukce lokální infekce sníží pravděpodobnost jejího rozšíření na transformační zónu, jež je z hlediska vzniku KDČ nejrizikovější oblastí děložního čípku. Za třetí, vyléčení infekce zabrání přenosu viru na příštího sexuálního partnera. Tím by se omezilo šíření viru v populaci.

Bez ohledu na to, že se do rukou veřejného zdravotnictví dostává vysoce účinná vakcína, existuje několik „caveat“, která jsou nepřehlédnutelná. Za první, ani jedna z obou vakcín, jež budou brzy komerčně dostupné, neskýtá ochranu proti všem onkogenním typům HPV. Dát se očkovat a vynechávat preventivní gynekologické prohlídky v domnění dokonalé ochrany před nebezpečnou infekcí by mohlo mít fatální následky. Za druhé, přes vysokou imunogenitu vakcín nelze prozatím očekávat, že ochrana bude celoživotní. Je pravděpodobné, že bude nutné přeočkování jednou dávkou za 5 či 10 let po primární imunizaci. Za třetí, bylo by tragickým omylem předpokládat, že vakcinace chrání před všemi pohlavně přenosnými chorobami.

Jak je uvedeno výše, blahodárny efekt vakcinace na výskyt KDČ se objeví za 15–20 let. Do té doby musí být hlavní linií boje s KDČ organizovaný skríninkový program pro prevenci KDČ. Proto je nutné podpořit veškeré snahy o jeho zásadní a nekompromisní z kvalitnění a usilovat, nejlépe intenzivní a přesvědčivou zdravotní propagandou, aby se ho účastnily všechny ženy ve věku, ve kterém je vysoké riziko vzniku nemoci. Součástí zdravotní osvěty by mělo být upozornění na faktory stylu života, které velmi výrazně zvyšují nebezpečí, že zdánlivě nevinná infekce se zvrhne v maligní proces. Jsou to zvláště zahájení sexuálního života v nízkém věku, větší počet sexuálních partnerů a kouření. Nepodaří-li se dostat ženy k preventivním prohlídkám a nebudou-li se tyto prohlídky kvalitně provádět, budeme navzdory sebeintenzivnějšímu očkování boj s KDČ nadále prohrávat.

ZÁVĚR

Na nedávné mezinárodní konferenci o vakcínách prohlásil jeden z pozvaných řečníků, že vývoj profylaktických vakcín proti KDC je největším přínosem lékařské vědy ženám v posledních sto letech. Nejsme si jisti, zda jeho, vlastně její, výrok přesně postihuje danou situaci. Zcela určitě však objasnění etiologie KDC a vývoj účinné profylaktické vakcíny představuje jeden z největších úspěchů virologického a onkologického výzkumu všech dob. Naskytá se možnost podstatně snížit a ve vzdálené budoucnosti snad úplně eradikovat jeden z nejčastějších a z neobávanějších zhoubných nádorů člověka. A protože přibývá důkazů o tom, že i další lidské zhoubné nádory jsou vyvolány HPV, spektrum nádorů, které by byla vakcína s to kontrolovat, se možná brzy rozšíří. Příležitost, kterou vakcína nabízí, by měla být využita, a to co nejdříve.

Zkratky

CIN	– cervikální intraepiteliální neoplazie
DNA	– deoxyribonukleová kyselina
HPV	– lidský papillomavirus
HSIL	– těžká skvamózní intraepiteliální léze (high-grade intraepithelial lesion)
HSV	– herpes simplex virus
KDC	– karcinom děložního čípku
LR	– low risk
LSIL	– lehká skvamózní intraepiteliální léze (low-grade intraepithelial lesion)
PV	– papillomaviry
URR	– nekódující zóna (upstream regulatory region)
VLP	– viru podobné částice (virus-like particles)

Poznámka

V době odevzdání korektury práce byly zveřejněny další výsledky dlouhodobého sledování účinnosti obou vakcín. Jsou jednoznačně příznivé. Přibližně pět let po vakcinaci nebyl mezi očkovanými ženami zjištěn ani jediný případ těžké cervikální léze vyvolané některým z typů HPV obsaženým ve vakcíně. Účinnost měřená zabráněním vzniku perzistující infekce týmiž typy byla více než 90%.

LITERATURA

1. **Parkin, D. M., Bray, F. I., Devesa, S. S.:** Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur. J. Cancer*, 2001, 37, s. S4-S66.
2. **Rigoni-Stern, D.:** *Gior. Service Prog. Pathol. Ther.*, 1842, 2, s. 507-517.
3. **Nahmias, A. J., Josey, W. E., Naib, Z. M. et al.:** Antibodies to Herpesvirus hominis types 1 and 2 in humans. II. Women with cervical cancer. *Am. J. Epidemiol.*, 1970, 91, s. 547-552.
4. **Rawls, W. E., Iwamoto, K., Adam, E. et al.:** Measurement of antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in human sera. *J. Immunol.*, 1970, 104, s. 599-606.
5. **Janda, Z., Kanka, J., Vonka, V. et al.:** A study of herpes simplex type 2 antibody status in groups of patients with cervical neoplasia in Czechoslovakia. *Int. J. Cancer*, 1973, 12, s. 626-630.
6. **Melnick, J. L., Adam, E.:** Epidemiological approaches to determining whether herpesvirus is the etiological agent of cervical cancer. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 1978, 21, s. 49-69.
7. **Adam, E., Kaufman, R. H., Adler-Storthz, K. et al.:** Prospective study of association of herpes simplex virus and human papillomavirus infection with cervical neoplasia in women exposed to diethylstilbestrol *in utero*. *Int. J. Cancer*, 1985, 35, s. 19-26.
8. **Aurelian, L., Schumann, B., Marcus, R. L. et al.:** Antibody to HSV-2 induced tumor specific antigens in serums from patients with cervical carcinoma. *Science*, 1973, 181, s. 161-164.
9. **Anzai, T., Dreesman, G. R., Courtney, R. J. et al.:** Antibody to herpes simplex virus type 2-induced nonstructural proteins in women with cervical cancer and in control groups. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1975, 54, s. 1051-1059.
10. **Duff, R., Rapp, F.:** Properties of hamster embryo fibroblasts transformed *in vitro* after exposure to ultraviolet-irradiated herpes simplex virus type 2. *J. Virol.*, 1971, 8, s. 469-477.
11. **Kutinova, L., Vonka, V., Broucek, J.:** Increased oncogenicity and synthesis of herpesvirus antigens in hamster cells exposed to herpes simplex type-2 virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1973, 50, s. 759-766.
12. **Palmer, A. E., London, W. T., Nahmias, A. J. et al.:** A preliminary report on investigation of oncogenic potential of herpes simplex virus type 2 in Cebus monkeys. *Cancer Res.*, 1976, 36, s. 807-809.
13. **Frenkel, N., Locker, H., Cox, B. et al.:** Herpes simplex virus DNA in transformed cells: sequence complexity in five hamster cell lines and one derived hamster tumor. *J. Virol.*, 1976, 18, s. 885-893.
14. **McDougall, J. K., Crum, C. P., Fenoglio, C. M. et al.:** Herpesvirus-specific RNA and protein in carcinoma of the uterine cervix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982, 79, s. 3853-3857.
15. **zur Hausen, H.:** Herpes simplex virus in human genital cancer. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 1983, 25, s. 307-326.
16. **Galloway, D. A., McDougall, J. K.:** The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a 'hit-and-run' mechanism. *Nature*, 1983, 302, s. 21-24.
17. **Schlehofer, J. R., Gissmann, L., Matz, B. et al.:** Herpes simplex virus-induced amplification of SV40 sequences in transformed Chinese hamster embryo cells. *Int. J. Cancer*, 1983, 32, s. 99-103.
18. **Schlehofer, J. R., Hausen, J. Z.:** Induction of mutations within the host cell genome by partially inactivated herpes simplex virus type 1. *Virology*, 1982, 122, s. 471-475.
19. **Vonka, V.:** Causality in medicine: the case of tumours and viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 2000, 355, s. 1831-1841.
20. **Vonka, V., Kaňka, J., Jelínek, J. et al.:** Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type-2 virus. I. Epidemiological characteristic. *Int. J. Cancer*, 1984, 33, s. 49-60.
21. **Vonka, V., Kaňka, J., Hirsch, I. et al.:** Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type-2 virus. II. Herpes simplex type-2 antibody presence in sera taken at enrollment. *Int. J. Cancer*, 1984, 33, s. 61-66.
22. **Vonka, V., Kaňka, J., Roth, Z.:** Herpes simplex type 2 virus and cervical neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, 1987, 48, s. 149-191.
23. **Krčmář, M., Suchánková, A., Kaňka, J. et al.:** Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex 2 virus. III. Presence of herpes simplex type 2 antibody in sera of subjects who developed cervical neoplasia later in the study. *Int. J. Cancer*, 1986, 38, s. 161-165.
24. **Lehtinen, M., Hakama, M., Aaran, R.-K. et al.:** Herpes simplex virus type 2 infection and cervical cancer: a prospective study of 12 years follow-up in Finland. *Cancer Caus. Control*, 1993, 3, s. 333-338.
25. **Dürst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. et al.:** A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, s. 3812-3815.
26. **Ikenberg, H., Gissmann, L., Gross, G. et al.:** Human papillomavirus type-16-related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis. *Int. J. Cancer*, 1983, 32, s. 563-565.
27. **zur Hausen, H., Gissmann, L., Schlehofer, J. R.:** Viruses in the etiology of human genital cancer. *Prog. Med. Virol.*, 1984, 30, s. 170-186.
28. **Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N. et al.:** Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1995, 87, s. 796-802.
29. **Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M. et al.:** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.*, 1999, 189, s. 12-19.
30. **Jochmus-Kudielka, L., Schneider, A., Braun, R. et al.:** Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1989, 81, s. 1698-1704.
31. **Krčňák, V., Vágner, J., Suchánková, A. et al.:** Synthetic peptides derived from E7 region of human papillomavirus type 16 used as antigens in ELISA. *J. Gen. Virol.*, 1990, 71, s. 2719-2724.
32. **Krčňák, V., Vágner, J., Suchánková, A. et al.:** Identification of seroreactive epitopes of human papillomavirus type 18 E7 protein by synthetic peptides. *Acta Virol.*, 1993, 37, s. 395-402.

33. **Dillner, J., Dillner, L., Utter, G. et al.:** Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the L1 and L2 open reading frame. *Int. J. Cancer*, 1990, 45, s. 529-533.
34. **Dillner, J.:** Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames. *Int. J. Cancer*, 1990, 46, s. 703-711.
35. **Hamšíková, E., Ludvíková, V., Tachezy, R. et al.:** Longitudinal follow-up of antibody response to selected antigens of human papillomaviruses and herpesviruses in patients with invasive cervical carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2000, 86, s. 351-355.
36. **di Lonardo, A., Marcante, M. L., Poggiali, F. et al.:** HPV 16 E7 antibody levels in cervical cancer patients: before and after treatment. *J. Med. Virol.*, 1998, 54, s. 192-195.
37. **Baay, M. F. D., Duk, J. M., Burger, M. P. M. et al.:** Humoral immune response against proteins E6 and E7 in cervical carcinoma patients positive for human papilloma virus type 16 during treatment and follow-up. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, 18, s. 126-132.
38. **Baay, M. F., Duk, J. M., Burger, M. P. et al.:** Follow-up of antibody responses to human papillomavirus type 16 E7 in patients treated for cervical carcinoma. *J. Med. Virol.*, 1995, 45, s. 342-347.
39. **Hamšíková, E., Novák, J., Hofmannová V. et al.:** Presence of antibodies to seven human papillomavirus type 16- derived peptides in cervical cancer patients and healthy controls. *J. Infect. Dis.*, 1994, 170, s. 1424-1431.
40. **de Sanjose, S., Hamšíková, E., Muñoz, N. et al.:** Serological response to HPV16 in CIN III and cervical cancer patients. Case-control studies in Spain and Colombia. *Int. J. Cancer*, 1996, 66, s. 70-74.
41. **Viladiu, P., Bosch, F. X., Castellsague, X. et al.:** Human papillomavirus DNA and antibodies to human papillomaviruses 16 E2, L2, and E7 peptides as predictors of survival in patients with squamous cell cervical cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1997, 15, s. 610-619.
42. **Vonka, V., Hamšíková, E., Kaňka, J. et al.:** Prospective study on cervical neoplasia. IV presence of HPV antibodies. *Int. J. Cancer*, 1999, 80, s. 365-368.
43. **Tachezy, R., Saláková, M., Hamšíková, E. et al.:** Prospective study on cervical neoplasia: presence of HPV DNA in cytological smears precedes the development of cervical neoplastic lesions. *Sex. Transm. Infect.*, 2003, 79, s. 191-196.
44. **Watts, S. L., Phelps, W. C., Ostrow, R. S. et al.:** Cellular transformation by human papillomavirus DNA in vitro. *Science*, 1984, 225, s. 634-636.
45. **Bedell, M. A., Jones, K. H., Laimins, L. A.:** The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and rat-1 cells. *J. Virol.*, 1987, 61, s. 3635-3640.
46. **Kitasato, H., Vonka, R., Bostik, P. et al.:** Properties of Syrian hamster cells transformed by human papillomavirus type 16. *Acta Virol.*, 1996, 40, s. 281-288.
47. **McDougall, J. K.:** Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1994, 186, s. 101-119.
48. **de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R. et al.:** Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004, 324, s. 17-27.
49. **Ruesch, M. N., Stubenrauch, F., Laimins, L. A.:** Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10. *J. Virol.*, 1998, 72, s. 5016-5024.
50. **zur Hausen, H.:** Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1288, s. F55-F78.
51. **Cates, W., Jr.:** Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. *Sex. Transm. Dis.*, 1999, 26, s. S2-S7.
52. **Koutský, L.:** Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am. J. Med.*, 1997, 102, s. 3-8.
53. **Mant, C., Cason, J., Rice, P. et al.:** Non-sexual transmission of cervical cancer-associated papillomaviruses: An update. *Papillomavirus Report*, 2000, 11, s. 1-5.
54. **Garland, S. M.:** Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology*, 2002, 34, s. 213-224.
55. **Evander, M., Edlund, K., Gustafsson, A. et al.:** Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J. Infect. Dis.*, 1995, 171, s. 1026-1030.
56. **Ho, G. Y., Bierman, R., Beardsley, L. et al.:** Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 338, s. 423-428.
57. **Middleton, K., Peh, W., Southern, S. et al.:** Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol.*, 2003, 77, s. 10186-10201.
58. **Peto, J., Gilham, C., Fletcher, O. et al.:** The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet*, 2004, 364, s. 249-256.
59. **Benton, E. C., Arends, M. J.:** Human papillomavirus in the immunosuppressed. In: Lacey, C.: *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*, Leeds, Leeds University Press, 1996, s. 271-279.
60. **Sillman, F. H., Sentovich, S., Shaffer, D.:** Ano-genital neoplasia in renal transplant patients. *Ann. Transplant.*, 1997, 2, s. 59-66.
61. **Ferenczy, A., Coutlee, F., Franco, E. et al.:** Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *CMAJ.*, 2003, 169, s. 431-434.
62. **Coleman, N., Birley, H. D., Renton, A. M. et al.:** Immunological events in regressing genital warts. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1994, 102, s. 768-774.
63. **Ho, G. Y., Burk, R. D., Klein, S. et al.:** Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1995, 87, s. 1365-1371.
64. **Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S. et al.:** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348, s. 518-527.
65. **Munoz, N., Bosch, F. X., Castellsague, X. et al.:** Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int. J. Cancer*, 2004, 111, s. 278-285.
66. **Tindle, R. W.:** Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr Opin Immunol*, 1996, 8, s. 643-650.
67. **Frazer, I. H.:** Immunology of papillomavirus infection. *Curr Opin Immunol.*, 1996, 8, s. 484-491.
68. **Hagensee, M. E., Yaegashi, N., Galloway, D. A.:** Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.*, 1993, 67, s. 315-322.
69. **Zhou, J., Sun, X. Y., Stenzel, D. J. et al.:** Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*, 1991, 185, s. 251-257.
70. **Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N. et al.:** Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, s. 12180-12184.
71. **Sasagawa, T., Pushko, P., Steers, G. et al.:** Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology*, 1995, 206, s. 126-135.
72. **Zhang, W., Carmichael, J., Ferguson, J. et al.:** Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Escherichia coli*: denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles in vitro. *Virology*, 1998, 243, s. 423-431.
73. **Breitburd, F., Kirnbauer, R., Hubbert, N. L. et al.:** Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J. Virol.*, 1995, 69, s. 3959-3963.
74. **Kirnbauer, R., Chandrachud, L. M., O'Neil, B. W. et al.:** Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology.*, 1996, 219, s. 37-44.
75. **Suzich, J. A., Ghim, S. J., Palmer-Hill, F. J. et al.:** Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, s. 11553-11557.
76. **Fausch, S. C., Da Silva, D. M., Rudolf, M. P. et al.:** Human papillomavirus virus-like particles do not activate langerhans cells: A possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. *J. Immunol.*, 2002, 169, s. 3242-3249.
77. **Fausch, S. C., Da Silva, D. M., Kast, W. M.:** Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells. *Cancer Res.*, 2003, 63, s. 3478-3482.
78. **Brown, D. R., Bryan, J. T., Schroeder, J. M. et al.:** Neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) by serum from women vacci-

- nated with yeast-derived HPV-11 L1 virus-like particles: correlation with competitive radioimmunoassay titer. *J. Infect. Dis.*, 2001, 184, s. 1183-1186.
79. **Evans, T. G., Bonnez, W., Rose, R. C. et al.:** A phase I study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J. Infect. Dis.*, 2001, 183, s. 1485-1493.
 80. **Harro, C. D., Pang, Y. Y. S., Roden, R. B. S. et al.:** Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J. Nat. Cancer Inst.*, 2001, 93, s. 284-292.
 81. **Pinto, L. A., Viscidi, R., Harro, C. D. et al.:** Cellular immune responses to L1 from heterologous HPV types following vaccination with HPV-16 L1 virus-like particles. In 21st International Papillomavirus Conference 2004, Mexico City, Mexico.
 82. **Pinto, L. A., Castle, P. E., Roden, R. B. et al.:** HPV-16 L1 VLP vaccine elicits a broad-spectrum of cytokine responses in whole blood. *Vaccine*, 2005, 23, s. 3555-3564.
 83. **Koutsky, L. A., Ault, K. A., Wheeler, C. M. et al.:** A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2002, 347, s. 1645-1651.
 84. **Harper, D. M., Franco, E. L., Wheeler, C. et al.:** Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2004, 364, s. 1757-1765.
 85. **Dubin, G., Colau, B., Zahaf, T. et al.:** Cross-protection against persistent HPV infection, abnormal cytology and CIN associated with HPV-16 and 18 related HPV types by a HPV 16/18 virus-like particle vaccine. In 22nd Papillomavirus Conference and Clinical Workshop 2005, s. 32. Vancouver, Canada.
 86. **Villa, L. L., Costa, R. L., Petta, C. A. et al.:** Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.*, 2005, 6, s. 271-278.
 87. **Lowndes, C. M., Gill, O. N.:** Cervical cancer, human papillomavirus, and vaccination. *BMJ*, 2005, 331, s. 915-916.

Práce je podporována grantem IGA MZ ČR NC/7548-3.

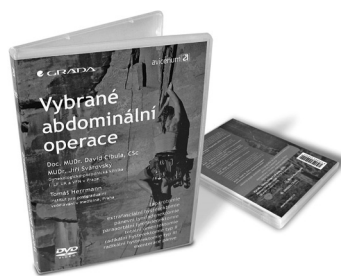
KNIHY

Cibula, D., Svárovský, J., Herrmann, T.: **VYBRANÉ ABDOMINÁLNÍ** **OPERACE – DVD**

Praha, Grada, 2005. 68 minut, cena 620 Kč.

Na český trh a především do rukou lékařské veřejnosti se dostává ojedinělé DVD, které představuje techniku nejčastějších operačních výkonů v onkogynekologii.

Laparotomické otevření dutiny břišní, hysterektomie, pánevní i paraaortální lymfadenektomie, radikální hysterektomie, omentektomie i raritní exenterace pánve jsou nejprve představeny na schématech znázorňujících anatomické a topografické vztahy v pánvi, aby vzápětí přesvědčily diváka originální videoprezentací vlastního operačního výkonu. Velmi dobře umístěná kamera snímá celé operační pole a nabízí divákovi stejný pohled do pánve, jako má operátér.



Se zájmem a obdivem sledujete skvělou operační techniku využívající všech výhod monoplární elektrokoagulace. Retroperitoneální prostor pánve je divákovi dokonale prezentován neobvyklým didakticko-topografickým pohledem operátéra.

Každý výkon je v úvodu přesně definován s uvedením hlavních indikací a s upozorněním

na jeho riziková místa či technická úskalí. Komentář zpracovaný i čtený přímo autorem filmu a operátérem v jedné osobě dokresluje střídmou věcnost a preciznost prezentované operační techniky.

Film je vhodný nejenom pro všechny gynekology a lékaře ve specializační přípravě, ale neměl by chybět na žádném chirurgickém či urologickém pracovišti zabývajícím se onkologickou problematikou. Je věcí ctí a prestiže každého onkologa i radioterapeuta, aby se v zájmu svých pacientů s touto problematikou alespoň orientačně seznámil.

MUDr. Vladimír Dvořák
předseda České gynekologicko – porodnické společnosti ČLS JEP
doc. MUDr. Vít Unzeitig, CSc.
člen Standing Committee on Training and Assessment UEMS/EBCOG

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Trendy v klinické biochemii a laboratorní diagnostice

Zima T.

Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Praha

SOUHRN

Obor klinické biochemie a laboratorní diagnostiky se v posledních letech velmi dynamicky rozvíjí především s rozvojem moderní analytické techniky, informačních technologií a novými poznatky v oblasti molekulární biologie. Podle statistických údajů ze Spojených států amerických 70–80 % lékařských rozhodnutí v nemocniční péči závisí na laboratorních testech při relativně nízkých nákladech, které činí 3–5 % nákladů na zdravotní péči. Ve světě existují tři základní modely přístupů k automatizaci a konsolidaci laboratoří. Tyto směry jsou reprezentovány Japonskem, USA a zeměmi EU. V Japonsku je vysoký stupeň úplné automatizace laboratorních činností od preanalytické fáze přes analytickou až po postanalytickou fázi s částečnou konsolidací oborů. Ve Spojených státech amerických je preferován vysoký stupeň konsolidací laboratoří s tzv. modulární automatizací. Země Evropské unie preferují vysoký stupeň modulární automatizace včetně preanalytického zpracování vzorku. Světové trendy v laboratorní diagnostice se projevují i v České republice a řada pracovišť je vybavena modulárními systémy, které zvyšují výkonnost laboratoří, a postupně je smazáván rozdíl mezi běžným a statimovým vyšetřením a rozvíjí se diagnostika pomocí molekulárně biologických technik. Rozvoj špičkových laboratorně diagnostických technologií a jejich ekonomická dostupnost jsou nutným předpokladem pro urychlení diagnostického a následně léčebného procesu, který tak může být kvalitnější, cílený, a tím také efektivnější.

Klíčová slova: klinická biochemie, laboratorní diagnostika, automatizace, akreditace, konsolidace.

SUMMARY

Zima T.: Trends in the Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics

Clinical biochemistry and laboratory diagnostics develops dynamically namely due to the advance of modern analytical techniques, information technologies and with new findings in the molecular biology. According to data from the USA, 70 to 80 % of medical decisions in the hospitals depend on comparatively not expensive laboratory tests which represent only 3 to 5 % of the health care costs. There are three essential approach models for the automation and consolidation of laboratories in the world. Japan, USA and countries of EU stand for prototype of those directions. Japan has a high level of total laboratory automation starting with the preanalytical phase, over the analytical phase to the postanalytical phase with the partial consolidation of the discipline. In the US the high degree of laboratory consolidation is preferred with so-called modular automation. EU countries prefer high degree of modular automation, including the preanalytical processing of samples. International trends in the laboratory diagnostics manifest in the Czech Republic by modular systems in several laboratories. They can increase the effectiveness of laboratories and subsequently erase differences between the routine and statim examination and develop of molecular-biological techniques. Development of laboratory diagnostic technologies and their economical accessibility are the compulsory condition of acceleration of the diagnostics and treatment, leading to high quality, focussed and finally effectiveness of health care.

Key words: clinical biochemistry, laboratory diagnostics, automation, accreditation, consolidation.

Po.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, pp. 522–525.

Obor klinické biochemie a laboratorní diagnostiky se v posledních letech velmi dynamicky rozvíjí především s rozvojem moderní analytické techniky, informačních technologií a novými poznatky v oblasti molekulární biologie. Podle statistických údajů ze Spojených států amerických 70–80 % lékařských rozhodnutí v nemocniční péči závisí na laboratorních testech při relativně nízkých nákladech, které činí 3–5 % nákladů na zdravotní péči.

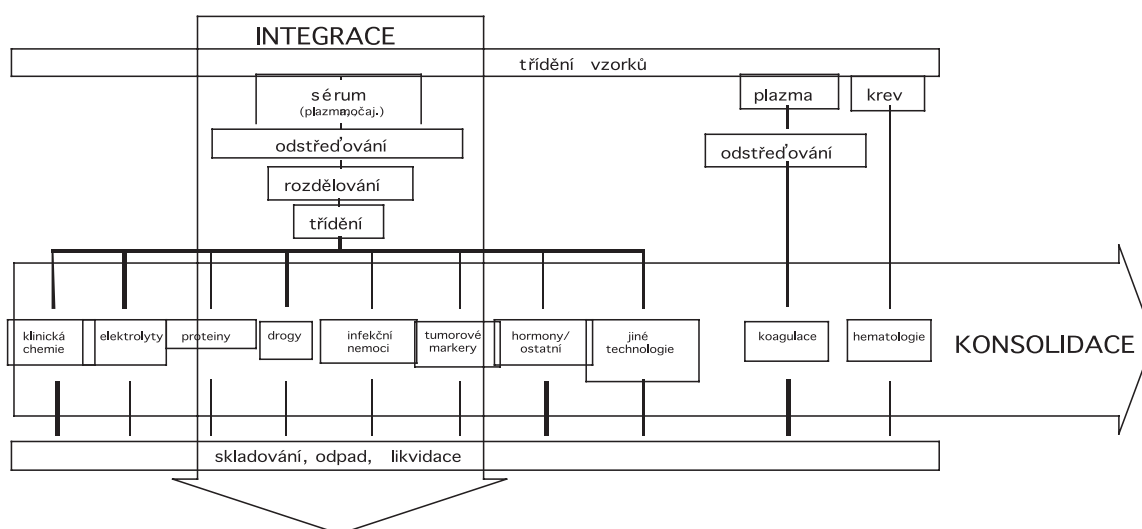
Z hlediska nákladů v oblasti *in vitro* diagnostik v roce 2003 největší podíl připadl na imunochemická (40 %) a klinicko-biochemická vyšetření (23 %), dále následuje oblast infekční imunologie (14 %) a náklady na přístroje (13 %) zbytek jsou náklady na hematologii, mikrobiologii a cytologii.

Z pohledů trendu růstu jednotlivých součástí laboratorní diagnostiky v posledních 5 letech lze pozorovat stagnaci či malý nárůst

do 5 % meziročně v klinické biochemii, hematologii, mikrobiologii, imunochemických vyšetřeních a statimových vyšetření. Nárůst 10–15 % u vyšetřování glukózy souvisí s celosvětovým nárůstem diabetu mellitus a také vyšetřením POCT. Molekulární biologie zaznamenává významný každoroční nárůst (25–35 %), který je dán rozvojem technologií – mikroarray čipy, ale také lepší dostupností a zaváděním těchto technik do běžné rutinní praxe – diagnostika hepatitid, vyšetřování mutací např. leidský faktor atd.

ZÁKLADNÍ TRENDY
V LABORATORNÍCH OBORECH

Laboratorních oborů se přímo dotýkají změny v pohledu na zdra-



Obr. 1. Laboratorní integrace a konsolidace

votnictví a zdraví člověka na počátku 21. století. Očekávané změny ve zdravotnictví směřují především k udržování zdraví populace, hodnocení výsledků léčby založených na důkazech (EBM – evidence based medicine), neustálému zdokonalování systému kvality péče a v ekonomické oblasti se jedná o přechod od prostého měření nákladů k jejich řízení a aktivnímu ovlivňování.

V laboratorní diagnostice můžeme očekávat preferování integrovaných laboratorních služeb spojením centralizovaných tzv. core laboratoří se systémy POCT (point of care testing) nebo NPT (near patient testing), které zrychlují diagnostiku nejen u lůžka nemocného, ale i v domácí péči. Vzniká také efektivní propojení laboratoří na různých místech s vytvářením interdisciplinárních týmů (biochemik, hematolog, imunolog, mikrobiolog, toxikolog, biolog). Postupně se přesouvají poznatky molekulární biologie z výzkumné roviny do rutinního běžného používání. V současné době se jedná především o vyšetřování virových onemocnění (hepatitidy, HIV) a polymorfismů genů souvisejících se závažnými chorobami. Všechny tyto činnosti se neobejdou bez výkonných informačních technologií a systémů.

Základní trendy v laboratořích můžeme shrnout do několika bodů:

- laboratorní automatizace a robotika
- konsolidace laboratoří
- akreditace laboratoří
- informační systémy
- molekulárně biologická diagnostika – mikroarray, čipy, proteomika
- POCT
- zobrazovací analýzy

Ve světě existují tři základní modely přístupů k automatizaci a konsolidaci laboratoří (obr. 1). Tyto směry jsou reprezentovány Japonskem, USA a zeměmi EU. V Japonsku je vysoký stupeň úplné automatizace laboratorních činností od preanalytické fáze přes analytickou až po postanalytickou fázi s částečnou konsolidací oborů. Plně automatizované systémy jsou velmi nákladné a relativně málo v flexibilitě (1).

Ve Spojených státech amerických existuje obor „clinical pathology“, který v sobě zahrnuje klasické obory laboratorní diagnostiky – biochemie, hematologie, mikrobiologie, toxikologie.

Je zde preferován vysoký stupeň konsolidací laboratoří s tzv. modulární automatizací.

Modulární automatizace znamená propojení nebo samostatnou práci jednotlivých vysoce výkonných analytických systémů. Země Evropské unie preferují vysoký stupeň modulární automatizace

včetně preanalytického zpracování vzorku. Konsolidace laboratorních oborů se liší v jednotlivých zemích EU. Úplná automatizace má své klady i zápory (2).

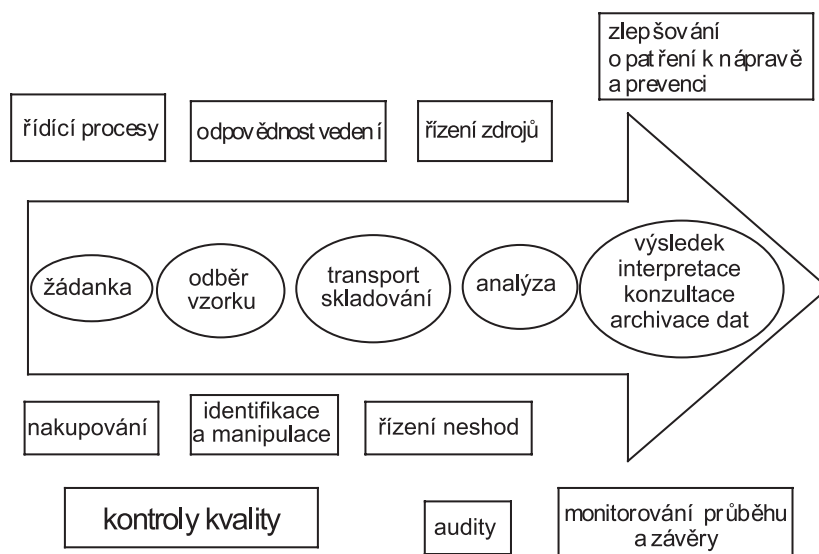
Mezi klady patří zpracování velkého množství vzorků definovanou rychlostí, omezení lidského faktoru s následným zvýšením spolehlivosti, snížením mzdových nákladů, relativně bezpečné pracovní prostředí a snadné programování testů a výstupů. Nevýhodou úplné automatizace je přerušování sérií statimovými požadavky, ztížený pohyb obsluhy, rozměrnost a relativní nepružnost automatizovaného systému, ale také ztráta profesionální zručnosti zdravotnického personálu. Odborníci z USA úplnou automatizaci hodnotí jako funkční, ale nákladnou. Proto je v USA preferována tzv. modulární automatizace, která snižuje mzdové náklady. Současně jsou několikanásobně sníženy chyby v preanalytické a analytické fázi a je zvýšená propustnost laboratoře. Velká pracoviště mají svůj provoz relativně přístrojově předimenzován a využití výkonnosti strojů se pohybuje mezi 30–40 %. Materiálové náklady se významně nemění, avšak při zavedení automatizované preanalytické linky se i tyto náklady snižují. Modulární automatizace zahrnuje v sobě několik „relativně samostatných modulů“ a je vhodná pro velké a středně velké laboratoře, kde se tato investice navrácí v průměru za 3 roky. Modulární automatizace zvyšuje prostupnost vzorků laboratoří až o 40 % a zkracuje také dobu analýzy vzorku (3).

Jako modelovou zemí EU nám mohou sloužit laboratoře v Německu. Většina laboratoří v SRN se podílí na výuce a kontinuálním vzdělávání, přibližně 15 % centrálních laboratoří zahrnuje v sobě i transfuzní stanici a zhruba polovina laboratoří má jako součást mikrobiologii. Základní laboratorní obory jsou integrovány do laboratorních celků a v některých velkých laboratořích nejen v Německu, ale i v dalších evropských zemích se využívá částečné nebo plné automatizace preanalytické fáze (4, 5).

Preanalytická fáze – období od rozvahy k indikaci vyšetření až po vlastní analýzu vzorku je z hlediska vzniku chyb nejrizikovější. V této fázi vzniká až 70 % chyb v laboratorním vyšetřování jak u indikujícího lékaře, tak v laboratoři. Úkolem laboratoří je organizovat a edukovat zdravotnické pracovníky s cílem eliminovat chyby.

Preanalytická fáze v laboratoři se skládá z několika částí a je možné tuto část u velkých laboratoří automatizovat. Systémové moduly se skládají z:

- označování zkumavek,
- centrifugačního modulu,
- odvíčkovacího modulu,
- tříděče zkumavek a označování zkumavek,
- alikvotační jednotky.



Obr. 2. Průběh laboratorního vyšetření – procesní přístup

Automatizovaná preanalytická fáze může být připojena na analytické systémy biochemické (klasické biochemické metody, imunochemické analyzátoři), tak na hematologické analyzátoři či analyzátoři vyšetřující moč (6, 7).

Některé systémy umožňují i automatické ukládání vzorků ke skladování (obr. 2).

KONSOLIDACE A AKREDITACE LABORATORNÍCH OBORŮ V ČESKÉ REPUBLICĚ

V naší zemi je velmi často diskutována otázka konsolidace laboratorních oborů, která má své zastánce i odpůrce. K této otázce je třeba přistupovat racionálně a na tento proces je nutno pohlížet ze dvou aspektů. V případě konsolidace je nutno zachovat identitu jednotlivých oborů laboratorní diagnostiky, kdy příslušní odborníci jsou schopni komentovat výsledky a poskytovat erudovanou expertní činnost. Na straně druhé při konsolidaci je možné využít analytické systémy a jejich propojení, kdy jeden analyzátor může poskytovat kvalitní výsledky pro více oborů. Konsolidace oborů také umožňuje jednotný příjem a zpracování materiálu i s nezanedbatelným etickým aspektem, kdy odběr do jedné zkumavky je možné využít pro více analytických systémů.

Konsolidace v malých nemocnicích již proběhla před mnoha lety, kde jsou laboratorní obory většinou spojeny do jednoho nebo dvou oddělení. Soukromé laboratoře, které se vytvořily zejména v polovině 90. let minulého století, již často vznikaly jako konsolidovaná pracoviště poskytující široké spektrum laboratorních metod, vzhledem nepřehlédnutelným ekonomickým výhodám tohoto způsobu práce.

Světové trendy v laboratorní diagnostice se projevují i v České republice a řada pracovišť je vybavena modulárními systémy, které zvyšují výkonnost laboratoří a postupně je smazáván rozdíl mezi běžným a statimovým vyšetřením. Řada pracovišť provádí molekulárně biologická vyšetření a jejich spektrum se neustále rozšiřuje, avšak u těchto analýz je nutno do budoucna uvažovat možnost provádět jednotlivá vyšetření v několika centrech v ČR při zajištění vysoké kvality a úrovně interpretace nálezu.

Většina zdravotnických zařízení používá uzavřené odběrové systémy, které zajišťují nejen bezpečný odběr pro pacienta, ale také ochranu nemocničního personálu.

Z hlediska rozvoje laboratorní diagnostiky je výkonný informační systém nezbytnou podmínkou nejen pro vlastní analytický pro-

ces, ale i z hlediska ekonomiky a řízení laboratoře. Laboratorní informační systémy jsou široce rozšířeny ve všech typech laboratoří a řada z nich je součástí nemocničních informačních systémů. Zavádění preanalytických systémů v České republice je nyní na počáteční fázi a pouze několik pracovišť má preanalytickou fázi částečně automatizovanou.

Velký důraz je v současné době kladen na zavádění systémů kvality do zdravotnictví včetně laboratoří. Z hlediska zdravotnictví jsou možné přístupy zaměřené na akreditaci celého zdravotnického zařízení (např. systém SAK, JCI) nebo na certifikaci (ISO 9001) či akreditaci jednotlivých částí zařízení. V oblasti laboratoří je několik možností – akreditace dle ČSN EN ISO 17025 – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří, která se zabývá problematikou akreditace zkušebních a kalibračních laboratoří, ze které vychází norma ČSN EN ISO 15189 – Zdravotnické laboratoře – Zvláštní podmínky na jakost a způsobilost. Norma ISO 15195 – Clinical laboratory medicine – requirements for reference measurement laboratories, která není dosud v České republice implementována. V některých zemích jsou možné akreditace dle národních standardů.

V případě akreditací laboratoří klinické biochemii i dalších odborností v Evropě vládne jednoznačný trend definovaný např. European Communities Confederation of Clinical Chemistry (EC4), který podporuje cestu akreditací v souladu a ve spolupráci s European Accreditation (EA) a postup dle ISO norem. Je však třeba si uvědomit, že akreditace je pouze prostředkem a nikoliv cílem, kterým je poskytování vysoce kvalitních služeb.

Organizace laboratoře má být vytvořena tak, aby uspokojovala potřeby „zákazníků“ – pacientů a lékařů, kteří vyžadují od laboratoře komplexnost služeb, možnost konzultací, vysokou kvalitu prováděných vyšetření a samozřejmě včasné a rychlé dodání výsledků.

Rozvoj špičkových laboratorně diagnostických technologií a jejich ekonomická dostupnost jsou nutným předpokladem pro urychlení diagnostického a následně léčebného procesu, který tak může být kvalitnější, cílený, a tím také efektivnější.

LITERATURA

1. Seaberg, R. S., Stallone, R. O., Statland, B. E.: The Role of Total Laboratory Automation in a Consolidated Laboratory Network. Clin. Chem., 2000, 46, s. 751-756.

2. **Bissell, M. G., Petersen, J. R.:** Automated Integration of Clinical Laboratories: A Reference. AACC Direct Products, Washington, 1998, 153 s.
3. **Sarkozi, L., Simson, E., Ramanathan, L.:** The effects of total laboratory automation on the management of a clinical chemistry laboratory. Retrospective analysis of 36 years. Clin. Chim. Acta, 2003, 329, s. 89-94.
4. **Young, D. S.:** Laboratory automation: smart strategies and practical applications. Clin. Chem., 2000, 46, s. 740-745.
5. **Hawker, C. D., Schlank, M. R.:** Development of standards for laboratory automation. Clin. Chem., 2000, 46, s. 746-750.
6. **Markin, R. S., Whalen, S. A.:** Laboratory Automation: Trajectory, Technology, and Tactics. Clin. Chem., 2000, 46, s. 764-771.
7. **Wing, A. K.:** Laboratory automation and optimization: the role of architecture. Clin. Chem., 2000, 46, s. 784-791.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZ ČR 00064165.

Hyperkalcémie u maligních tumorů

Hyperkalcémie se objevuje u 20–30 % nemocných s malignitou v některém období onemocnění. Hyperkalcémie vede k progresivnímu poškození mentálních funkcí včetně kómatu a k renálnímu selhání. Tyto komplikace jsou často terminální fází onemocnění. Průkaz hyperkalcémie u pacienta s malignitou obvykle signalizuje špatnou prognózu, neboť zhruba 50 % těchto nemocných zemře do 30 dní. Hyperkalcémie u neoplazií se klasifikuje do čtyř typů: a) hyperkalcémie způsobená maligní osteolýzou, vyskytující se ve 20 % případů; b) humorální hyperkalcémie u malignity (80 % případů); c) 1,25D-secernující lymfomy (<1 %); d) ektopický hyperparatyroidismus (<1 %). U hyperkalcémie vyvolané maligní osteolýzou je hyperkalcémie způsobena významným nárůstem osteoklastické kostní resorpce. Humorální hyperkalcémie je vyvolána systémovou sekrecí PTHrP (parathyroid hormone related protein), produkovaného maligním tumorem. PTHrP způsobuje zvýšenou kostní

resorpci a zvyšuje retenci kalcia ledvinami. Humorální hyperkalcémii může v zásadě vyvolat každý tumor, ale typicky jej způsobují skvamocelulární karcinomy hlavy, krku, ezofagu, plic a uteru, dále karcinomy ledvin, ovarii, endometria a mammy a konečně HTLV-asociovaně lymfomy. Typy hyperkalcémií označené výše jako (c) a (d) jsou vzácné, mohou jej vyvolat například některé lymfomy.

Pravou hyperkalcémií vyvolávají: zvýšená osteoklastická kostní resorpce, zvýšená tubulární reabsorpce a zvýšená absorpce kalcia ve střevě. U většiny nemocných bývá přítomna hypofosfatémie. K diagnóze je nezbytné samozřejmě stanovit hladinu kalcia. Může být výhodnější stanovit hladiny ionizovaného kalcia, neboť hladina celkového kalcia může být ovlivněna hladinami albuminu.

Při elevaci hodnot kalcia je nutno uvážit i působení vlivů zvyšujících hladinu kalcia bez přímého vlivu neoplazie. Jde například o primární hyperparatyreózu, thiazidová diuretika apod. V případech hyperkalcémie by měla být stanovena hladina parathormonu.

Za mírnou hyperkalcémií se považuje kalcé-

mie 2,6–2,9 mmol/l, střední hyperkalcémie 3,0–3,4 mmol/l a těžká hyperkalcémie nad 3,5 mmol/l.

Terapie: Základem úspěšné antihyperkalcemické léčby je energická rehydratace fyziologickým roztokem. Dále je nezbytné navýšení kalcieury s použitím kličkových diuretik. Další součástí léčby je inhibice kostní resorpce intravenózními bifosfonáty (např. pamidronát 60–90 mg během 2 hodin nebo zolendronát 4 mg během 15 minut). Po této léčbě začíná hladina kalcia klesat asi za 12 hodin. Normalizace hodnot kalcia trvá zhruba 1–3 týdny. Jako alternativu lze uvážit hemodialýzu. Jde o případy, kdy není efektivní uvedená léčba anebo kdy jí není možno dostatečně energicky aplikovat (např. renální či kardiální insuficience s rizikem hyperhydratace).

Literatura:

Stewart, A. F.: Hypercalcemia Associated with Cancer. N. Engl. J. Med., 2005, 352, s. 373-379.

O. Louthan

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Syntázy oxidu dusnatého, typické hemoflavoproteiny a jejich komplikovaná enzymologie

Jáchymová M., ¹Masters B. S., ²Horký K., ³Zima T., ⁴Martásek P.
Laboratoř molekulární kardiologie Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky I. LF UK a VFN, Praha
¹Department of Biochemistry UTHSC at San Antonio, Texas, USA
²II. interní klinika I. LF UK a VFN, Praha
³Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky I. LF UK a VFN, Praha
⁴Klinika dětského a dorostového lékařství I. LF UK a VFN, Praha

SOUHRN

Oxid dusnatý je dvouatomová, plynná molekula s jedním nepárovým valenčním elektronem. Fyzikální vlastnosti, jako je rozpustnost, difuzibilita a biologický poločas, spolurozhodují o chemické reaktivitě oxidu dusnatého. Oxid dusnatý je nestabilní volný radikál, signální molekula v cévách, imunitním systému i v centrální nervové soustavě. Reaktivita oxidu dusnatého za fyziologických a patologických podmínek je závislá na jeho koncentraci a na místě vzniku. Oxid dusnatý hraje důležitou roli v různých patologických stavech, jako je septický šok, kardiovaskulární onemocnění, artritida, diabetes mellitus, roztroušená skleróza, astma a hypertenze. Syntázy oxidu dusnatého jsou hemoflavoproteiny odpovědné za syntézu oxidu dusnatého z L-argininu prostřednictvím dvou následných monoxygenázových reakcí. N-terminální, hemova doména syntáz oxidu dusnatého je funkčně podobná cytochromu P450, ale nebyla potvrzena strukturální shoda mezi cytochromem P450 a N-terminálními doménami syntáz oxidu dusnatého. Prostetické skupiny flavinadenin dinukleotid a flavinmononukleotid C-terminální, reduktázové domény syntáz oxidu dusnatého vykazují velkou podobnost sekvencí aminokyselin s NADPH cytochrom P450 reduktázou. Prostřednictvím reduktázové domény probíhá přenos elektronů z NADPH pro katalytické reakce syntázy oxidu dusnatého. Přítomnost kalmodulinové vazebné domény, která spojuje hemovou a reduktázovou doménu, je závazná pro tvorbu oxidu dusnatého u všech izoform syntáz oxidu dusnatého. Syntázy oxidu dusnatého jsou také nepřímo regulovány různými signálními dráhami, které jsou zprostředkovány kinázami v důsledku přítomnosti fosforylačních míst v reduktázové doméně. Studium mechanismů působení syntáz oxidu dusnatého se stalo jedním z nejsledovanějších z hlediska základních biochemických mechanismů, fyziologických procesů a aplikací v medicíně, na mnoho otázek však zatím neznáme odpověď.

Klíčová slova: oxid dusnatý, syntázy oxidu dusnatého, přenos elektronů, protein-proteinové interakce.

SUMMARY

Jáchymová M., Masters B. S., Horký K. et al.: Nitric Oxide Synthase, Typical Flavohemoprotein and Their Complicated Enzymology

Nitric oxide is a diatomic gaseous molecule with unpaired electron in the molecule. Physical properties such as solubility, diffusibility and half-life decide the chemical reactivity of nitric oxide. Nitric oxide is the unstable free radical in vessels, immune system and central nervous system. The reactivity of nitric oxide under physiological and pathological conditions depends upon its concentration and site of production. Nitric oxide is thought to play a role in many pathological situations: septic shock, cardiovascular diseases, arthritis, diabetes, multiple sclerosis, asthma, and hypertension. Nitric oxide synthase is a self-sufficient flavohemoprotein capable of producing nitric oxide from L-arginine by two successive monoxygenation steps. Although the N-terminal heme domain functionally resembles cytochromes P450, no structural similarities exist between cytochrome P450 and nitric oxide synthases heme domains. The C-terminal domain of nitric oxide synthases containing flavin adenine dinucleotide and flavin mononucleotide as cofactors exhibits a high degree of sequence similarity with NADPH-cytochrome P450 reductase. The reductase domains serve as an intermediary for the transfer of electrons from NADPH for the catalytic reaction. The connecting domain between the oxygenase and the reductase domains of nitric oxide synthase isoforms binds calmodulin in the presence of calcium. The binding of calmodulin to all nitric oxide synthase isoforms is obligatory for the production of nitric oxide. At the same time, the presence of one or more phosphorylation sites in nitric oxide synthase puts them among the kinase-mediated signaling pathways. This also means that nitric oxide synthases are regulated indirectly by the events that regulate kinases. This field of research of nitric oxide synthase regulation has become one of the most actively pursued and much has been learned from basic biochemical mechanisms to physiological processes and to medical applications, but many more questions still remain to be answered.

Key words: nitric oxide, nitric oxide synthases, electron transfer, protein-protein interaction.

Ja.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 526–531.

OXID DUSNATÝ

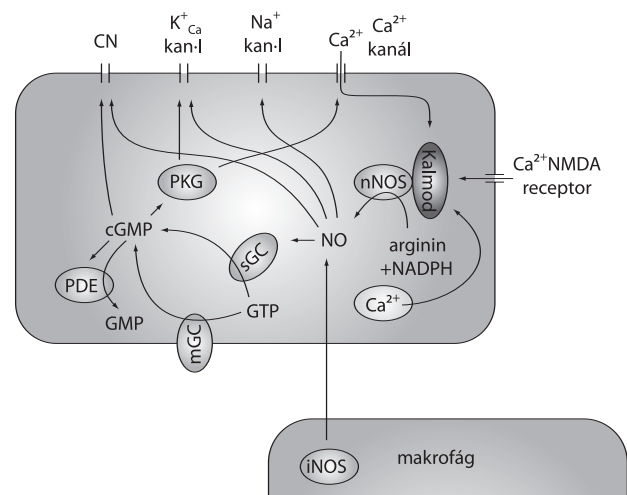
T. Brunton (1867) po prvé použil, bez znalosti aktivní látky, nitrosloučeniny, jako je amylnitrit a později nitroglycerin u pacientů s anginou pectoris (1). V roce 1916 Mitchell et al. zjistili, že u savců je vylučováno více nitrátů, než je jejich příjem (2). Vazodilatační efekt oxidu dusnatého při aktivaci dráhy solubilní guanylát cyklázy po prvé popsali Murad se spolupracovníky v roce 1977 (3). Od Bruntonových experimentů uplynulo 113 let do doby, kdy Furchgott a Zawadzki zjistili (1982), že endoteliální buňky hrají důležitou úlohu v acetylcholinem navozené relaxaci hladkých svalových buněk cév. Zprostředkovatel této reakce endoteliální relaxační faktor (EDRF) byl později rozpoznán jako oxid dusnatý (4). Nobelova cena za medicínu byla udělena v roce 1998 třem vědcům, R. F. Furchgottovi, L. J. Ignarrovi a F. Muradovi. Jejich objevy přispěly k pochopení úlohy oxidu dusnatého jako signální molekuly v kardiovaskulárním systému. Je ironií osudu, že když A. Nobel navštívil svého lékaře pro úporné bolesti na hrudi, nabídl mu na jejich zmírnění lék nitroglycerin – látku, kterou použil k výrobě dynamitu. Léč však z obavy o své zdraví odmítl použít. V té době nikdo neznal, ba ani netušil pozitivní účinky nitroglycerinu na základě uvolňování oxidu dusnatého.

Oxid dusnatý (NO) je lipofilní, dvouatomová plynná molekula s jedním nepárovým valenčním elektronem a krátkým biologickým poločasem (3–5 sekund). Komplexnost biologického působení oxidu dusnatého v organismu má za následek množství potenciálních interakcí s jinými molekulami, jako jsou reaktivní kyslíkaté sloučeniny, kovové ionty a proteiny. NO může reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku oxidu dusičitého (NO₂). NO₂ také obsahuje nepárový elektron, ale vyznačuje se vyšší reaktivitou a toxicitou než NO (5, 6). Produktem reakce mezi NO a superoxidem (O₂⁻) je peroxynitrit (OONO⁻), který je silnějším oxidačním agens než NO a superoxid. Tyto sloučeniny patří do skupiny derivátů kyslíku. Jsou důležité ve vaskulární biologii vzhledem k jejich redox potenciálu. Porušení rovnováhy oxidačně-redukčních stavů končí oxidačním stresem. Oxidační stres se ztotožňuje s oxidačním poškozením a zánětem u kardiovaskulárních onemocnění včetně hyperlipidémie, diabetu mellitus a hypertenze (7).

Oxid dusnatý je nestabilní volný radikál, působí jako signální molekula v cévách, imunitním systému i v centrální nervové soustavě. Je volně difuzibilní, rozpustný ve vodě i v lipidech.

Reaktivita oxidu dusnatého za fyziologických a patofyziologických podmínek je závislá na jeho koncentraci a na místě produkce NO. Oxid dusnatý ochotně reaguje se železem za tvorby komplexu v hemové skupině. Tyto skupiny jsou součástí mnoha metaloproteinů – např. solubilní guanylátcyklázy, katalázy a cytochromu P450 (8–10). Efekt interakce NO a solubilní guanylátcyklázy (sGC) byl dobře charakterizován (11–14). NO se rychle váže na hemové železo sGC, přičemž dochází k aktivaci guanylátcyklázy. Aktivovaná sGC konvertuje guanosintrifosfát na cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), který je považován za hlavní signální dráhu NO. Oxid dusnatý je také známý jako induktor kaskády dalších signálních drah (15, 16). Jejich cílem je aktivace proteinkináz, fosfodiesteráz a iontových kanálů. Výsledkem jsou různé modifikace buněčných funkcí, jako je svalová relaxace, potlačení agregace destiček a synaptická plasticita. cGMP, produkovaný solubilní guanylátcyklázou v buňkách hladkého svalu, po aktivaci oxidem dusnatým ze sousedních endoteliálních buněk, aktivuje proteinkinázu G (3, 4, 17). Vazorelaxace aktivovanou proteinkinázou G je zprostředkována fosforylací mnoha proteinů různými kinázami. Výsledkem je defosforylace lehkých myozinových řetězců a relaxace (16). Oxid dusnatý a metabolismus cGMP je znázorněn na obrázku 1.

Kromě hlavní signální dráhy zprostředkované cGMP vedoucí k vazorelaxaci, byla objasněna alternativní cesta nezávislá na cGMP, ale závislá na NO (17, 18). Vazorelaxace na NO závislá a na



Obr. 1. Oxid dusnatý a metabolismus cGMP

CN – kanál pro cyklické nukleotidy, K_{Ca}⁺ – draslíkový kanál, aktivovaný Ca²⁺ ionty, Kalmol – kalmodulin, iNOS – inducibilní NO syntáza, mGC – guanylátcykláza vázaná na buněčnou membránu, sGC – solubilní guanylátcykláza, nNOS – neuronální NO syntáza, PDE – cyklická nukleotidová fosfodiesteráza, PKG – protein kináza G, NMDA – N-methyl-D-aspartátový receptor (obrázek modifikován dle (67))

cGMP nezávislá je přičítána aktivaci draslíkových iontových kanálů (K_{Ca}) prostřednictvím NO. Otevřením K_{Ca} dochází ke snížení intracelulárního vápníku (Ca²⁺) a k vazorelaxaci. Oxid dusnatý inhibuje enzym cytochrom P450A, který je zodpovědný za produkci 20-hydroxyarachidonové kyseliny v buňkách hladkého svalstva cév (19). K účinkům NO aditivně působí prostacyklin, tlumí agregaci destiček, jeho vazodilatační účinky jsou výrazně nižší ve srovnání s NO (20, 21).

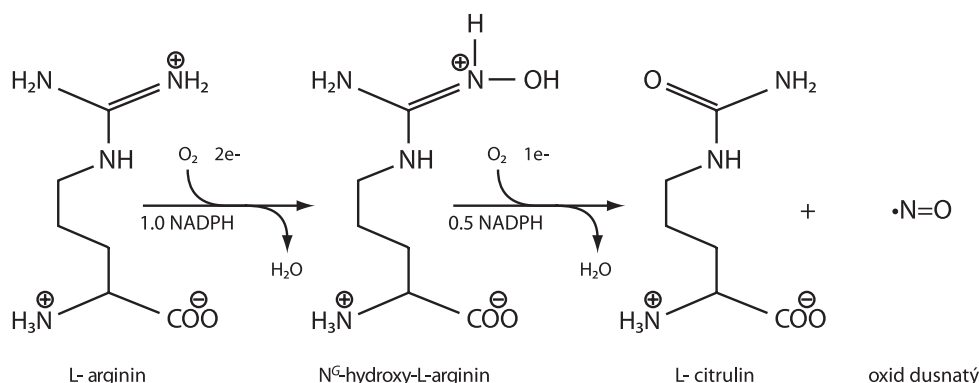
V organismu má NO nezastupitelnou úlohu. Jeho trvalá bazální sekrece je nutná k udržení průchodnosti cév (22). Difúzí do lumina oxid dusnatý inhibuje adhezi trombocytů na endotel a jejich aktivaci a agregaci (23, 24). Dále NO působí protizánětlivě, brání hromadění leukocytů v subendoteliálním prostoru. Současně NO významně snižuje permeabilitu endotelu pro řadu aterogenních makromolekul, zejména pro LDL a fibrinogen. NO také reguluje proliferaci hladkých svalových buněk (25).

Význam NO v regulaci apoptózy a nekrózy není plně objasněn. Je zcela evidentní, že oxid dusnatý má cytotoxické a mutagenní vlastnosti. Jeho efekt na regulaci apoptózy je závislý na hladině NO a na typu buněk v místě jeho působení. U některých typů buněk NO podněcuje proces apoptózy, u jiných včetně hepatocytů inhibuje vznik apoptózy vyvolané medikamenty nebo úbytkem růstového faktoru (26, 27). Pro přežívání buněk je třeba určité hladiny NO. Inhibitory syntéz oxidu dusnatého zvyšují incidenci apoptózy (28, 29).

Vysoká koncentrace NO má za následek zvýšenou formaci peroxynitritu a poškození DNA. Obnova DNA vyžaduje energii k aktivaci enzymu (DNA repair enzyme – PARP). Tento proces může v buňkách iniciovat vznik apoptózy. Na druhé straně, S-nitrosylací enzymů kaspáz dochází k jejich inaktivaci a k inhibici programové smrti buněk (30–32).

Oxid dusnatý reguluje široké rozmezí biologických funkcí prostřednictvím postranslačních modifikací proteinů. Proteinové modifikace se uskutečňují na základě vazby NO se železem hemové skupiny, dále pak S-nitrosylací redukovaných cysteinových zbytků a C-nitrací tyrozinových a tryptofanových reziduí (33–35).

Produkce kyslíkových radikálů, zejména superoxidových aniontů makrofágy a zánětlivými buňkami vede k degradaci oxidu dusnatého za vzniku peroxynitritů, které mají další negativní účinky na cévní funkce. Kyslíkové radikály jsou produkovány různými enzymatickými



Obr. 2. Reakce katalyzovaná NOS
Mechanismus reakce je podobný jako u cytochrom P450 oxidoreduktázového systému.

a neenzymatickými cestami, např. působením cyklooxygenázy, xantinoxidázy, NAD(P)H-dependentními oxidázami nebo NO syntázami při nedostatku tetrahydrobiopterinu. Význam oxidačního stresu v patogenezi endoteliální dysfunkce u hypertenze potvrzuje například pozorování, že podávání kyseliny askorbové jako lapače (scavengeru) kyslíkových radikálů zlepšuje u hypertoniků vazodilatační odpověď tepen na podání acetylcholinu (36, 37).

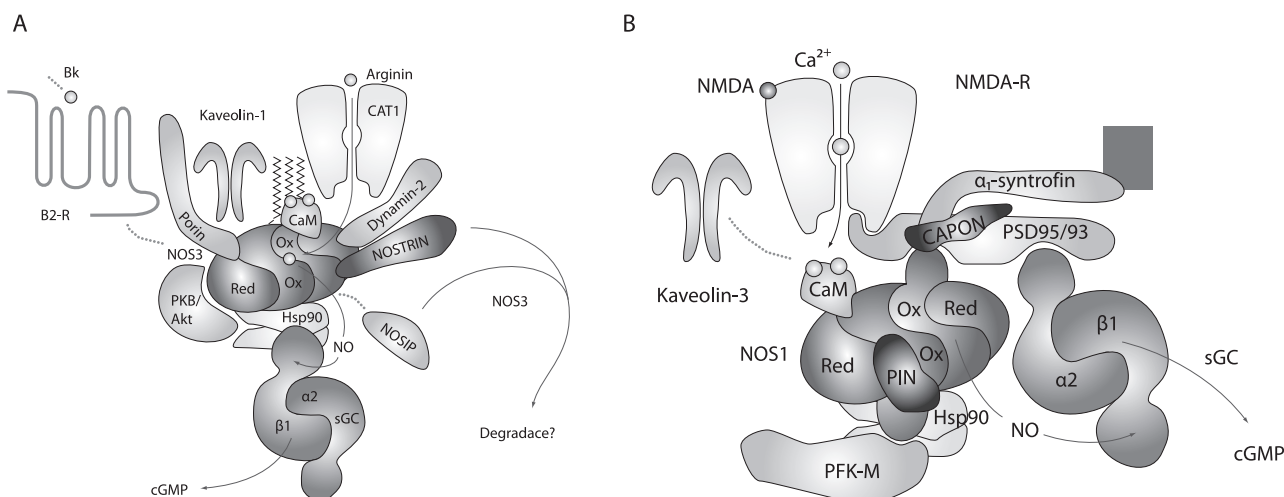
Kromě snížené dostupnosti oxidu dusnatého se na zvýšení cévního tonu podílí zvýšená aktivita vazokonstrikčních faktorů, zejména endotelinu-1. Bylo zjištěno, že vazokonstrikční aktivita endotelinu-1 se zvyšuje s poklesem dostupnosti NO (38). Narušená rovnováha mezi těmito dvěma systémy je tak odpovědná za zvýšení vazokonstrikční a proliferační aktivity endotelinu-1 (39, 40).

SYNTÁZY OXIDU DUSNATÉHO

Syntázy oxidu dusnatého (NOS) spojují v jednom proteinu funkce hemoproteinů a flavoproteinů. Výsledkem jejich složitě kontrovaného a velmi komplikovaného působení je vznik oxidu dusnatého. NO je produktem dvou monooxygenázových reakcí. V přítomnosti O_2 a NADPH dochází ke konverzi L-argininu na L-citrulin. Meziproduktem enzymatické reakce je N-hydroxy-L-arginin (41–43) (obr. 2).

U savců byly identifikovány tři základní izoformy NOS (44, 45). **Neuronální NO syntáza (nNOS, typ I)**, **inducibilní** neboli makrofágová (**iNOS, typ II**) a **endoteliální (eNOS, typ III)**. Nedávné studie odhalily existenci nové NO syntázy v mitochondriích (**mitochondriální, mtNOS**) (46). Z nich nNOS, eNOS a mtNOS jsou exprimovány konstitutivně a jsou Ca^{2+} -kalmodulin dependentní. Aktivita iNOS není regulována koncentrací kalciových iontů a kalmodulin je vázán ireverzibilně. Mezi jednotlivými izoformami je významná podobnost sekvencí. Všechny izoformy jsou aktivní v produkci NO pouze jako **homodimery**, přičemž každý monomer se skládá ze dvou rozdílných, katalyticky aktivních domén. Oxygenázová-hemová, N-terminálová doména (HD) zahrnuje vazebná místa pro protoporphyrin IX (hem), strukturální a redoxní kofaktor tetrahydrobiopterin (BH4) a L-arginin (substrát). HD je spojena kalmodulinovou oblastí s C-terminálovou reduktázovou doménou (RD, někdy je v literatuře uváděno pod názvem flavoproteinová). RD doména obsahuje vazebná místa pro prostetické skupiny flavinadenindinukleotid (FAD) a flavinmononukleotid (FMN) a ko-substrát nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) (46–50). Domény mohou být odděleny limitovanou proteolýzou (46, 51).

NADPH je donorem redukčních ekvivalentů pro katalytickou konverzi L-argininu na L-citrulin. Přenos elektronů se uskutečňuje z NADPH přes FAD a FMN po vazbě Ca^{2+} -kalmodulin k hemu oxygenázové domény, kde probíhá reakce s tvorbou NO. Jednotlivé



Obr. 3. Protein-proteinové interakce eNOS (A, NOS3) a nNOS (B, NOS1) v dimerním uspořádání
Ox – hemová doména, Red – reduktázová doména, Bk – bradykinin, B2-R – bradykininový receptor typ 1, CAM – kalmodulin, CAT1 – aminokyselinový transportér kationtů, PKB – proteinkináza B, sGC – solubilní guanylátycycláza, NOSIP – eNOS interacting protein, NOSTRIN – nitric oxide synthase interacting protein, Hsp90 – heat shock protein, PIN – proteinový inhibitor NOS, CAPON – C-terminal PDZ ligant protein, PSD 95/93 – postsynaptické denzitní proteiny (bližší (58)).

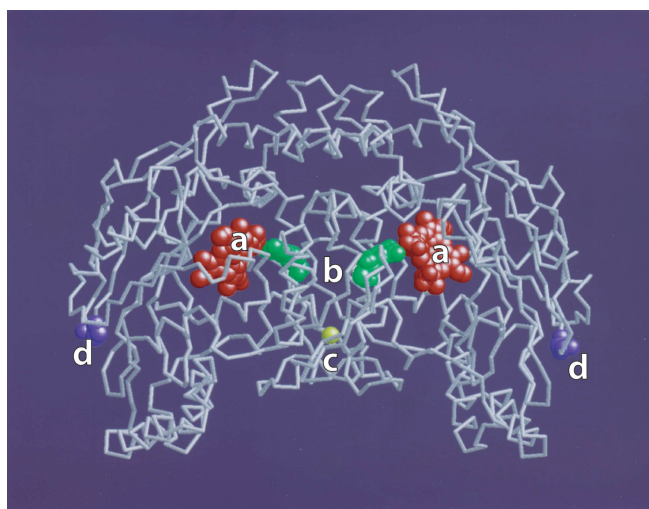
izofomy NOS se liší v rychlosti přenosu elektronů. Přenos elektronů je kontrolován několika strukturálními motivy v reduktázové části domény NOS (52).

V doméně FMN nNOS a eNOS se nachází 45 aminokyselinová sekvence, která se nevyskytuje v iNOS a v cytochrom P450 reduktáze. Tento segment je označen jako autoregulační inzert, slouží ke kontrole toku elektronů v Ca^{2+} -kalmodulinové vazbě (45).

Nitrobuněčná lokalizace jednotlivých izoforem NOS je určující pro dostupnost mimobuněčných podnětů a účinnost produkce NO (50, 53). Mechanismus přísné kontroly enzymatické reakce zahrnuje mnohočetné proteinové interakce (obr. 3), lokální dostupnost kofaktorů a substrátu a posttranslační modifikace. Jednotlivé izofomy jsou v zásadě organově specifické (45, 54).

Odlišnosti v aktivitě a regulaci jednotlivých izoforem NOS se odrážejí ve funkci proteinů. Tlumená aktivita je shodná s úlohou konstitutivních forem ve funkcích, jako je regulace krevního tlaku a nervová signalizace. V poslední době se zájem soustřeďuje na úlohu jednotlivých NOS izoforem v zánětlivé odpovědi organismu (artritida, septický šok, hypertenze) (55).

NOS je důležitým proteinem, na který je zaměřena pozornost z hlediska farmakologického ovlivnění. Znalost detailní struktury proteinu je důležitá pro návrh látek s možným terapeutickým dopadem na produkci NO. Obrovské nasazení mnoha vědeckých týmů zatím vedlo k popisu struktury hemové části všech tří izoforem a popisu FAD/NADPH fragmentu RD nNOS (54–56). Navzdory skutečnosti, že všechny NOS izofomy se v souhrnné sekvenci shodují z 50–60 %, s ohledem na porovnání syntézy NO, redukce cytochromu c, přenosu elektronů a formaci hemo-nitrosylového komplexu se jedna od druhé liší. Struktura hemových domén NOS vykazuje zdánlivě minoritní rozdíly, kromě jejich počátečních N-terminálních sekvencí (56, 57). U všech izoforem NOS byl zjištěn centrálně vázaný atom zinku (obr. 4) (55, 58).



Obr. 4. Kvaternární struktura hemové domény eNOS
a) pozice hemu, b) kofaktor tetrahydrobiopterin, c) strukturní atom zinku, d) polymorfismus G298A (68).

NADPH CYTOCHROM P450 REDUKTÁZA A SYNTÁZY OXIDU DUSNATÉHO

V savčích systémech byla jako první z rodiny diflavinových reduktáz izolována cytochrom P450 oxidoreduktáza (CYPOR) (59). Pak následovaly syntázy oxidu dusnatého (60), reduktáza methionin-syntázy (61) a nová lidská reduktáza 1 (NR1) (62). Tyto enzymy obsahují obě prostetické skupiny, FAD i FMN. CYPOR je nejlépe charakterizovaná reduktáza, jedná se o 78 kDa flavoprotein vázaný na buněčnou membránu. CYPOR pravděpodobně vznikla

fúzí dvou genů kódujících proteiny, které se vztahují k ferredoxin-NADP⁺ reduktáze a flavodoxinu, přinášející oba flaviny (FAD a FMN) (63). CYPOR katalyzuje přenos elektronů z NADPH na mikrozomální cytochrom P450, cytochrom b₅, hemoxygenázu a elongázu mastných kyselin (64). Přenos elektronů se uskutečňuje také na alternativní redox akceptory, jako jsou ferikyanid draselný, dichlorfenolindofenol a další látky – např. farmaka (65).

CYPOR a C-terminál (641 aminokyselinových zbytků) nNOS jsou z 38 % identické a z 58 % homologické (60). Tyto vlastnosti řadí reduktázové domény NOS do třídy flavoprotein-dehydrogenáz, které obsahují obě FMN a FAD strukturní domény v jednom polypeptidovém řetězci.

Ve srovnání s CYPOR mají všechny NOS izofomy navíc 21–42 aminokyselinových zbytků v C-terminálních částech proteinů. Tuto koncovou část CYPOR neobsahuje (52) (obr. 5).

CYPOR (rat):	RYSLDWVS	
iNOS (murine):	RYHEDIFG	AVFSYGAKKGSAALEPKATRL (21)
nNOS (rat):	RYHEDIFG	VTLRTYEVNRLRSESAFIEESKDDAEVFFSS (33)
eNOS(bovine):	RYHEDIFG	LTLRTQEVTSRIRTOQSFLQERHLRGAVPWAFFDPPGDPDTPGP (42)

Obr. 5. Sekvence koncových aminokyselin CYPOR a C-terminálních aminokyselinových reziduí tří izoforem NOS

Intraproteinový přenos elektronů v syntázách oxidu dusnatého byl charakterizován pomocí navržených chimerických konstruktů proteinů, jejichž základ tvořil CYPOR s připojenými C-terminálními částmi jednotlivých izoforem NOS. Bylo prokázáno, že C-terminální domény hrají důležitou diferenciální a funkční roli v každé z izoforem NOS (66).

ZÁVĚR

Aktivita syntáz oxidu dusnatého je regulována dokonalou souhrou vnitřních a vnějších regulačních faktorů. Celkový podíl produkce oxidu dusnatého za katalýzy jednotlivých izoforem NOS je výsledkem sladění komplexu kombinací intraproteinových faktorů s faktory vnějšími. Vnitřní faktory NOS zahrnují prostředí hemu, dimerní stav, kalmodulinovou vazbu, autoinhibiční doménu a C terminálové oblasti. Mezi působnost vnějších faktorů patří posttranslační modifikace, fosforylace a specifické protein-proteinové interakce. Hlubší pochopení vnitřních elementů získáváme ze strukturálních studií reduktázových domén syntáz oxidu dusnatého a z rozlišení specifických kontaktů mezi kalmodulinovou a autoinhibiční doménou, C terminálovou oblastí a vlastním proteinem. Využití moderních metod molekulární biologie a krystalografie dopomůže k ohalení nových dosud neznámých mechanismů katalýzy zprostředkované syntázami oxidu dusnatého.

Zkratky

BH ₄	– tetrahydrobiopterin
cGMP	– cyklický guanozinmonofosfát
CYPOR	– cytochrom P450 oxidoreduktáza
DCIP	– 2,6 dichlorfenolindofenol
EDRF	– endotelální relaxační faktor
EDRF/NO	– endotelální relaxační faktor/oxid dusnatý
eNOS	– endotelová syntáza oxidu dusnatého
FAD	– flavinadeninindinukleotid
FMN	– flavinmononukleotid
HD	– N-terminálová hemová doména
iNOS	– inducibilní syntáza oxidu dusnatého
K _{Ca}	– draslíkový iontový kanál
NADPH	– nikotinamadeninindinukleotidfosfát
nNOS	– neuronální syntáza oxidu dusnatého
NO	– oxid dusnatý

NO ₂	– oxid dusičitý
NOS	– syntáza oxidu dusnatého
O ₂	– molekulární kyslík
O ₂ ⁻	– superoxid
OONO ⁻	– peroxynitrit
PARP	– polymeráza poly(ADP-ribózy)
RD	– C-terminálová reduktázová doména
sGC	– solubilní guanylátcykláza

LITERATURA

- Brunton, T. L.:** Use of nitrite of amyl in angina pectoris. *Lancet*, 1867, I, s. 628-629.
- Mitchell, H. H., Shonle, H. A., Grindley, H. S.:** The origin of the nitrates in the urine. *J. Biol. Chem.*, 1916, 24, s. 461-490.
- Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S., Murad, F.:** Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, s. 3203-3207.
- Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V.:** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980, 288, s. 373-376.
- Ford, P. C., Wink, D. A., Stanbury, D. M.:** Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett.*, 1993, 326, s. 1-3.
- Fukuto, J. M., Cho, J. Y., Switzer, C. H.:** The Chemical Properties of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. In: Ignarro, L. J. (ed.) *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. London, Academic Press, 2000, s. 23-40.
- Touyz, R. M., Schiffrin, E. L.:** Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem. Cell. Biol.*, 2004, 122, s. 339-352.
- Wink, D. A., Osawa, Y., Darbyshire, J. F. et al.:** Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, 300, s. 115-123.
- Cooper, C. E.:** Nitric oxide and iron proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1411, s. 290-309.
- Zima, T.:** Oxid dusnatý (NO) – fyziologické a patofyziologické účinky v organismu. Praha, Remedia, 1997, 7, s. 298-307.
- Koesling, D., Friebe, A.:** Structure-Function Relationships in NO-Sensitive Guanylyl Cyclase. In: Ignarro, L.J. (ed.) *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. London, Academic Press, 2000, s. 369-379.
- Reynolds, M. F., Burstyn, J. N.:** Mechanism of Activation of Soluble Guanylyl Cyclase by NO. In: Ignarro, L. J. (ed.) *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. London, Academic Press, 2000, s. 381-400.
- Stone, J. R., Marletta, M. A.:** Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, 1994, 33, s. 5636-5640.
- Yu, A. E., Hu, H., Spiro, T. G. et al.:** Resonance Raman spectroscopy of soluble guanylyl cyclase reveals displacement of distal and proximal heme ligands by NO. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, s. 4117 až 4118.
- Gruetter, C. A., Barry, B. K., McNamara, D. B. et al.:** Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 1979, 5, s. 211-224.
- Chung, H. T., Pae, H. O., Choi, B. M. et al.:** Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 282, s. 1075-1079.
- Lincoln, T. M., Komalavilas, P.:** Cyclic GMP-mediated signaling mechanisms in smooth muscle. In: Ignarro, L.J. (ed.) *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. San Diego, Academic Press, 2000, s. 401-425.
- Weisbrod, R., Griswold, M., Yaghoubi, M. et al.:** Evidence that additional mechanisms to cyclic GMP mediate the decrease in intracellular calcium and relaxation of rabbit aortic smooth muscle to nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, 1998, 125, s. 1695-1707.
- Alonso-Galicia, M., Sun, C. W., Falck, J. R. et al.:** Contribution of 20-HETE to the vasodilator actions of nitric oxide in renal arteries. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 1998, 275, s. F370-F378.
- Sun, C. W., Alonso-Galicia, M., Taheri, M. R. et al.:** Nitric oxide-20-hydroxyeicosatetraenoic acid interaction in the regulation of K⁺ channel activity and vascular tone in renal arterioles. *Circ. Res.*, 1998, 83, s. 1069-1079.
- Carter, T. D., Pearson, J. D.:** Regulation of prostacyclin synthesis in endothelial cells. *N. Physiol. Sci.*, 1992, 7, s. 64-69.
- Palmer, R. M. J., Ferige, A. G., Moncada, S.:** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, 327, s. 524-526.
- Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D. N.:** Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, s. 4651-4655.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. J., Moncada, S.:** Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991, 12, s. 87-88.
- Scott-Burden, T., Vanhoutte, P. M.:** The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation*, 1993, 87, s. V51-V55.
- von Knet, B. B.:** Apoptosome and activation of caspasehen A. Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, 351, s. 261-272.
- Kim, P. K., Zamora, R., Petrosko, P. et al.:** The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int. Immunopharmacol.*, 2001, 1, s. 1421-1441.
- Youn, T. J., Kim, H. S., Kang, H. J. et al.:** Inhibition of nitric oxide synthesis increases apoptotic cardiomyocyte death and myocardial angiotensin-converting enzyme gene expression in ischemia/reperfusion-injured myocardium of rats. *Heart Vessels*, 2001, 16, s. 12-19.
- Ciani, F., Guidi, S., Bartesaghi, R. et al.:** Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. *J. Neurochem.*, 2002, 82, s. 1282-1289.
- Ashkenazi, A., Dixit, V. M.:** Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998, 281, s. 1305-1308.
- Mannick, J. B., Miao, X. Q., Stamler, J. S.:** Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, s. 24125-24128.
- Zech, B., Kohl, R., von Knethen, A. et al.:** Nitric oxide donors inhibit formation of the Apaf-1/ caspase -9 apoptosome and activation of caspases. *Biochem. J.*, 2003, 371, s. 1055-1064.
- Ischiropoulos, H.:** Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *BBRC*, 2003, 305, s. 776-783.
- Mannick, J. B., Schonhoff, M.:** Nitrosylation: the next phosphorylation? *ABB*, 2002, 408, s. 1-6.
- Zhang, H., Bhargava, K., Keszler, A. et al.:** Transmembrane nitration of hydrophobic tyrosyl peptides. *J. Biol. Chem.*, 2003, 277, s. 8969-8978.
- Solzbach, U., Hornig, B., Jeserich, M. et al.:** Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation*, 1997, 96, s. 1513-1519.
- Jackson, T. S., Xu, A., Vita, J. A. et al.:** Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at high physiologic concentrations. *Circ. Res.*, 1998, 83, s. 916-922.
- Taddei, S., Viridis, A., Ghiadoni, L. et al.:** Vasoconstriction to endogenous endothelin-1 is increased in the peripheral circulation of patients with essential hypertension. *Circulation*, 1999, 100, s. 1680-1683.
- Schiffrin, E.:** Role of Endothelin-1 in Hypertension and Vascular disease. *Am. J. Hypertens.*, 2001, 14, s. 83S-89S.
- Touyz, R. M., Schiffrin, E. L.:** Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.*, 2000, 52, s. 639-672.
- Griffith, O.W., Stuehr, J.D.:** Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Ann. Rev. Physiol.*, 1995, 57, s. 707-736.
- Cooper, C. E.:** Biochemistry of nitric oxide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1411, s. 215-216.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowless, R. G.:** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 2001, 337, s. 593-615.
- Raman, C. S., Martásek, P., Masters, B. S. S.:** Structural themes determining function in nitric oxide synthases. In: Kadish, K. M., Smith, K. M., Guillard, R. (eds) *The Porphyrin Handbook 2000*. New York, Academic Press, 2000, s. 293-339.

45. **Roman, L. J., Martásek, P., Masters, B. S. S.:** Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. *Chem. Rev.*, 2002, 102, s. 1179-1190.
46. **Silvagno, F., Xia, H., Brecht, D. S.:** Neuronal nitric oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, s. 11204-11208.
47. **Brecht, D. S., Snyder, S. H.:** Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin - requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, s. 682-685.
48. **Masters, B. S. S., McMillan, K., Sheta, E. et al.:** Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: Structure studies of a cysteine thiolateliganded heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO as a cellular signaling. *FASEB J.*, 1996, 10, s. 552-558.
49. **Kone, B. C., Kunciewicz, T., Zhang, W. et al.:** Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2003, 285, s. F178-F190.
50. **Nedvetsky, P., Sessa, W. C., Schmidt, H. H. W.:** There's NO binding like NOS binding: protein-protein interactions in NO/cGMP signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, s. 16510-16512.
51. **Vermilion, J.L., Ballou, D.P., Massey, V. et al.:** Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, s. 266-277.
52. **Roman, L. J., Martásek, P., Miller, R. T. et al.:** The C termini of constitutive nitric-oxide synthases control electron flow through the flavin and heme domains and affect modulation by calmodulin. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, s. 29225-29232.
53. **Brecht, D. S.:** Nitric oxide signaling specificity – the heart of the problem. *J. Cell. Sci.*, 2003, 116, s. 9-15.
54. **Crane, B. R., Arvai, A. S., Gachhui, R. et al.:** The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science*, 1997, 278, s. 425-431.
55. **Raman, C. S., Li, H., Martásek, P. et al.:** Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell*, 1998, 95, s. 939-950.
55. **Knudsen, G. M., Nishida, C. R., Mooney, S. D. et al.:** Nitric-oxide synthase (NOS) reductase domain models suggest a new control element in endothelial NOS that attenuates calmodulin-dependent activity. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, s. 31814-31824.
56. **Fischmann, T. O., Hruza, A., Niu, X. D. et al.:** Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveal striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.*, 1999, 6, s. 233-242.
57. **Zhang, M., Vogel, H. J.:** The calmodulin-binding domain of caldesmon binds to calmodulin in an alpha-helical conformation. *Biochemistry*, 1994, 33, s. 1163-1171.
58. **Miller, R. T., Martásek, P., Omura, T.:** Rapid kinetic studies of electron transfer in the three isoforms of nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 265, s. 184-188.
59. **Yasukochi, Y., Masters, B.:** Some properties of a detergent-solubilised NADPH-cytochrome c (cytochrome P-450) reductase purified biospecific affinity chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, s. 5337-5344.
60. **Brecht, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E. et al.:** Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 1991, 351, s. 714-718.
61. **Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R. et al.:** Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, s. 3059-3064.
62. **Shen, A. L., Porter, T. D., Wilson, T. E. et al.:** Structural analysis of the FMN binding domain of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, s. 7584-7589.
63. **Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R. et al.:** Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, s. 8411-8416.
64. **Enoch, H. G., Strittmatter, P.:** Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, s. 8976-8981.
65. **Masters, B. S. S.:** *Enzymatic Basis of Detoxification* In: Jakoby, W. (ed.) Orlando, FL, Academic Press, 1980, s. 183-200.
66. **Jáchymová, M., Martásek, P., Panda, S. et al.:** Recruitment of governing elements for electron transfer in the nitric oxide synthase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, s. 15833-15838.
67. **Ahern, G. P., Klyachko, V. A., Jackson, M. B.:** cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.*, 2002, 25, s. 510-517.
68. **Jáchymová, M., Horký, K., Bultas, J. et al.:** Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 284, s. 426-430.

Děkuji B. Th. R. Veselému za technickou pomoc při přípravě obrazové dokumentace.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 000064165.

Increased expression and potential anti-inflammatory role of TRAIL in atopic dermatitis

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) je významný pro adaptivní imunitní reakci indukci apoptózy dendritických buněk, ale kontroluje i přirozenou imunitu apoptózou neutrofilů – má tedy protizánětlivou povahu a je

ubikvitární v organismu při mnoha zánětlivých procesech, např. u psoriázy.

U AD TRAIL je exprimován v hlavně v CD4+ a CD8+ T buňkách jak v kůži, tak v krvi. Je to spojeno se vzestupem exprese IL-1Ra (receptorový antagonist IL-1) v keratinocytech. Tím je způsobeno, že T buňky mohou být v atopii jak prozánětlivé, tak i protizánětlivé.

IL-1Ra je hlavním preventivním opatřením před poškozením tkání zánětem a integrální

součástí také atopického zánětu, kterým je limitováno poškození tkání. TRAIL pravděpodobně reguluje poměr, resp. homeostázu IL-1/IL-1Ra.

Literatura:

Vassina, E. et al.: *J. invest. Dermatol.*, 2005, 125, s. 746-752.

P. Barták

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Molekulární cytogenetika v diagnostice nádorových onemocnění

Michalová K., Zemanová Z.

Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav klinické biochemie a diagnostiky I. LF UK a VFN, Praha

SOUHRN

Maligní buněčnou transformaci můžeme definovat jako sérii progresivních genetických událostí, které se objevují v jednom buněčném klonu v limitovaném počtu specifických genů. Těmito geny mohou být onkogeny anebo nádorové supresorové geny (antionkogeny, recesivní onkogeny). Každá změna, ať už je spojena s iniciací, nebo postupem nádorového procesu, může být spojena s přestavbou chromozómů, a pokud je tato přestavba rozlišitelná na úrovni světelného mikroskopu, jsme schopni ji klasickými cytogenetickými metodami detekovat. Paralelou této představy je, že molekulární charakteristika chromozómových přestaveb povede k identifikaci genů, jejichž úloha je při vzniku a postupu maligního procesu klíčová. Skutečně v místech častých a opakujících se zlomů byly lokalizovány geny, které mají význam při vzniku nádorů, a těchto míst bylo lokalizováno již více než 1800. Největší pokrok v nádorové cytogenetice přineslo zavedení molekulárních metod, které posunulo citlivost na úroveň asi 100 kb. Uvádíme stručný popis nejčastěji používaných metod molekulární cytogenetiky a přehled specifických translokací a delecí chromozómů a jejich prognostickou hodnotu, pokud je známa.

Klíčová slova: chromozómové přestavby, maligní nádory, leukémie, molekulární cytogenetika.

SUMMARY

Michalová K., Zemanová Z.: Molecular Cytogenetics in Diagnostics of Malignant Diseases

Malignant cell transformation can be defined as series of progressive genetic events which are happening in one cell clone in limited number of specific genes. These genes could be oncogenes and/or tumor suppressor genes (antioncogenes, recessive oncogenes). Each change regardless if it is associated with initiation or progression of cancer can be related to a chromosomal rearrangement. If the aberration is above the limit of the light microscope sensitivity, it should be detected by classical cytogenetic techniques. Therefore it was hypothesized that the molecular characteristics of chromosomal rearrangements will lead to identification of genes with pivotal role in cancerogenesis. And indeed, genes important for origin of tumors were identified in recurrent chromosomal breakpoints. Until now, more than 1800 breakpoints were identified. Oncocytogenetics has remarkably developed after the introduction of molecular methods with higher sensitivity (100kb). We present a short review of molecular cytogenetic methods with a survey of specific recurrent translocations and deletions of chromosomes in several malignancies and their prognostic value is given.

Key words: chromosomal rearrangements, malignant tumors, leukemia, molecular cytogenetics. *Mi.*

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 532–537.

Nádorová buňka se liší od normální tím, že se trvale a nekoordinovaně dělí, protože se vymkla signálům, které řídí její funkci. Maligní buněčnou transformaci můžeme definovat jako sérii progresivních genetických událostí, které se objevují v jednom buněčném klonu v limitovaném počtu specifických genů. Těmito geny mohou být onkogeny a nebo nádorové supresorové geny (anti-onkogeny, recesivní onkogeny). Každá změna, ať už je spojena s iniciací, nebo postupem nádorového procesu může být zprostředkována přestavbou chromozómů, a pokud je tato přestavba rozlišitelná na úrovni světelného mikroskopu, jsme schopni ji cytogeneticky detekovat. Paralelou této představy je, že molekulární charakteristika chromozómových přestaveb povede k identifikaci genů, jejichž úloha je při vzniku a postupu maligního procesu klíčová. Skutečně, v průběhu posledního desetiletí bylo takto zmapováno mnoho genů, které při vzniku zhoubných nádorů mají důležitou roli. Jsou to většinou buněčné onkogeny (protoonkogeny), které za normálních okolností nezpůsobují buněčnou maligní transforma-

ci. Ve zdravé buňce kódují bílkoviny regulující normální růst buňky a teprve jejich mutace či atypická aktivace vedou ke ztrátě kontroly růstu a k přeměně normální buňky na buňku nádorovou (1).

NÁDOROVÁ CYTOGENETIKA

Nádorová cytogenetika se zabývá studiem získaných chromozómových změn v buňkách benigních a maligních tumorů. Vzhledem k tomu, že až do roku 1970 bylo používáno jen klasické, homogenní barvení chromozómů, byly až do roku 1972 u nádorů popisovány jen početní odchylky nebo velké přestavby chromozómů. Nejvýznamnější objev 60. let minulého století byl nález tzv. Filadelfského chromozómu (Ph chromozóm) Nowellem a Hungerfordem (1962) u nemocných s chronickou myeloidní leukémií (CML), který je stabilní marker a jeho objev stimuloval rozsáhlý cytogenetický výzkum nádorových buněk. Podpořil rovněž předsta-

Tab. 1. Vybrané specifické změny chromozómů a jejich prognostická hodnota

Chromozómová změna	geny	klinická charakteristika	prognóza
t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL	CML, ALL	u ALL špatná
t(8;21)(q22;q22)	AML1/ETO	AML M2	dobrá
t(15;17)(q22;q12)	PML/RARA	AML M3	dobrá
inv(16)(p13q22)	CBFB/MYH11	AML M4	dobrá
t(8;16)(p11;p13)	MOZ/CBP	AML M5	
t(1;7)(q10;p10)	?	MDS	
del(5)(q31)	?	MDS	dobrá
+8	?	AML M2, M4, M5, MDS	střední
t(6;9)(p23;q34)	DEK/CAN	MDS, AML M2, M4	špatná
t/del(11)(q23)	MLL	AML, MDS, ALL	špatná
t/del(12)(p12)	?	AML, ALL, MDS	
del(20)(q12)	?	PV, AML	
t(1;19)(q23;p13)	PBX1;E2A	ALL L1	špatná
t(4;11)(q21;q23)	AF4;MLL	ALL L1, L2	špatná
t(12;21)(p12;q22)	TEL/AML1	B-ALL	dobrá
del(6)(q)	?	ALL L1,L2, CLL	
t(8;14)(q24;q11)	MYC;TCRA/TCRD	B- nebo T-ALL	špatná
t(14;18)(q32;q21)	IGH/BCL	ALL L2, L3, B-CLL	
t(12;16)(q13;p11)	FUS/CHOP	liposarkom	
t(X;18)(p11;q11)	SYT/SSX	synoviální sarkom	
t(2;13)(q35;q14)	PAX3/FKHR	rhabdomyosarkom (alveolární)	špatná
t(12;15)(p12;q25)	ETV6/NTRK3	fibrosarkom	
inv(10)(q11q21)	RET/PTC	papilární karcinom štítné žlázy	
t(X;1)(p11;q21)	PRCC/TFE3	karcinom ledvin	

Tab. 2. Některé DNA sondy komerčně dostupné pro diagnostiku maligních onemocnění

Typ nádoru	typ sondy	lokalizace
karcinom prsu	lokus specifická Her-2 Neu	17q11.2-q12
karcinomy	lokus specifická c-myc	8q24.12-q24.13
karcinom prostaty	lokus specifická androgen receptorový gen	Xq12
karcinom močového měchýře	mnohobarevná sada centromerická 3,7, 9, 17, lokus specifická 9	Cen 3, 7, 9, 17, 9p21 9q34 a 22q11
akutní myeloidní leukémie M2	lokus specifická BCR/ABL	
akutní lymfocytární leukémie	lokus specifická AML1/ETO	8q22 a 22q22
myelodysplastický syndrom	lokus specifická TEL/AML1	12p12 a 21q12
akutní leukémie	lokus specifická sonda pro delecii 5q zlomová sonda MLL genu	5q31 11q23
myelodysplastický syndrom a leukémie	centromerická sonda chromozóm 7 a/nebo 8	cen 7 a cen 8
chronická lymfatická leukémie	panel sond	11q22.3, 17p13, 13q14, 13q34, cen12
mnohočetný myelom, lymfomy	lokus specifická, dvoubarevná zlomová sonda IGHV	14q32 oblast

vu té doby, že každý typ nádoru bude mít svůj typický marker chromozóm (2). Cytogenetické nálezy však tuto hypotézu nepotvrdily, právě naopak. Ph chromozóm zůstal déle než 15 let jediným příkladem specifické změny u nádorů. Teprve Rowleyová (1973) G- pruhovací technikou barvení zjistila, že Ph chromozóm vzniká recipírou translokací mezi chromozómy 9 a 22 (3) a pruhovacími technikami barvení chromozómů byly v dalších letech nalezeny další specifické cytogenetické odchylky, které se staly důležitým

diagnostickým kritériem při vyšetřování určitých typů leukémií, lymfomů a solidních nádorů (1). Hematoonkologická onemocnění byla mnohem častěji vyšetřovaná, a to vzhledem ke snadnějšímu odběru i zpracování buněk kostní dřeně a/nebo periferní krve pro cytogenetické analýzy. Od roku 1970, kdy se začaly chromozómy barvit pruhovacími technikami, bylo u nádorů popsáno více než 1800 zlomových míst na chromozómech. Jde o chromozómové změny, které se opakují a nejsou náhodné. Dá se proto předpoklá-

dat, že jsou zahrnuty v procesu iniciace nádorového bujení i v progresi onemocnění. Počet zjištěných a molekulárními metodami studovaných chromozómových odchylek u malignit se každoročně zvyšuje a jsou známy jejich klinické a biologické charakteristiky. Proto vznikl Atlas genetiky a cytogenetiky v onkologii a hematologii (<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer>) jako volně přístupná databáze na internetu, která přináší cytogenetické a klinické nálezy u maligních onemocnění a která je používána genetiky a lékaři ve všech lékařských odvětvích zainteresovaných v onkologii.

Další volně přístupné databáze jsou Katalog chromozómových aberací prof. Mitelmana, na adrese <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman/recurrent/aberrations> a katalog <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCAP>. Ve všech jsou uváděny chromozómové aberace nádorových buněk. Nejčastější specifické změny a jejich prognostickou hodnotu u různých typů a subtypů leukémií a lymfomů uvádíme v tabulkách 1 a 2. Ve výše uvedeném Mitelmanově katalogu je do roku 2005 popsáno téměř 50 000 v odborném písemnictví publikovaných cytogenetických nálezů u maligních buněk, více než dvě třetiny z nich jsou získané klonální změny chromozómů u onkohematologických pacientů.

KLASICKÁ A MOLEKULÁRNÍ CYTOGENETIKA

Kromě pruhovacích barvicích metod přispělo k dalšímu rychlému rozvoji nádorové cytogenetiky zavedení nových systémů kultivace a synchronizace buněčného dělení nádorových buněk *in vitro*. Výrazně se zlepšila kvalita chromozómových preparátů, byla zavedena jednotná mezinárodní nomenklatura (4) a zvýšila se citlivost metod. Byly tak nalezeny další dříve neidentifikované přestavby, jako jsou translokace malých částí chromozómů, inverze, duplikace, delece a inserce, z nichž mnohé se ukázaly být zcela specifickým markerem určitého typu nádoru. Velká většina z nich byla prokázána až metodami molekulární DNA analýzy. V molekulární cytogenetice je to hybridizace *in situ* fluorochromy značených sond DNA, tzv. fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Analýza nádorových buněk a získaných změn chromozómů nejrůznějšími modifikacemi základní metody FISH přináší stále nové informace o biologickém významu chromozómových změn v maligním procesu a rychlý rozvoj a modifikace základních technik pak zvyšují citlivost a zaměření jednotlivých vyšetření, což umožňuje zpřesnění diagnostiky. Jen velmi stručně uvádíme dále principy a základní popis těchto metod.

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Metody hybridizace *in situ* jsou postaveny na schopnosti vazby jednořetězcové DNA s komplementárními úseky cílové DNA, která je fixovaná na mikroskopickém preparátu (5). V současnosti jsou většinou používány neradioaktivně značené sondy a průkaz navázání sondy se provádí nepřímou nebo přímou imunofluorescencí ve fluorescenčním mikroskopu. Molekulárními metodami studované fragmenty DNA jsou přibližně 200–300 kb velké. Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace je úspěšně a především cíleně využívána v klinické cytogenetice a onkocytogenetice při studiu karyotypu buněk v metafázi nebo interfázi. Metodami FISH lze:

- určovat početní a přesně identifikovat strukturní vrozené nebo získané chromozómové odchylky a marker chromozómy;
- mapovat geny a DNA sekvence, sledovat jejich deleci nebo amplifikaci;
- lokalizovat geny na chromozómech;
- ve srovnávacích studiích mapování genomu porovnávat rozsah a lokalizaci DNA sekvencí u člověka a různých druhů rostlin a živočichů.

- Speciální využití v nádorové cytogenetice přinesla tzv. interfázická FISH – I-FISH, což je metoda, která umožňuje sledovat početní i strukturní změny chromozómů v nedělících se jádrech nádorových buněk. Touto metodou je pak možné určit:
 - zastoupení patologického klonu ve sledovaném vzorku nádorové tkáně;
 - amplifikace, translokace nebo dalece jednotlivých genů;
 - detekci minimální reziduální choroby nebo časného relapsu u leukémií a zhoubných nádorů;
 - monitorování výsledků chemoterapie a/nebo transplantace kostní dřeně u nemocných s leukémiemi;
 - detekci typu buněk, které jsou zahrnuty v neoplastickém procesu.
- Identifikace fluorescenčního signálu je možná přímo z fluorescenčního mikroskopu, citlivější je však analýza z mikroskopu vybaveného velmi výkonnou CCD (charge coupled device) kamerou, napojenou na počítač se speciálním programem pro FISH. Citlivost metody se zvyšuje o několik řádů, rovněž je možné použít současně více fluorochromů pro značení několika sond k simultánnímu vyhodnocení. Počítačová analýza obrazu umožňuje kvantitativní zpracování získaných dat, měření vzdáleností jednotlivých signálů a vytváření jednoho obrazu z více záznamů.

Sondy DNA

Sondy, které používáme, jsou nejrůznějšího typu a můžeme je navzájem kombinovat. Jedná se o sondy, které hybridizují se specifickými chromozómovými strukturami, což jsou obvykle centromerické oblasti obsahující alfa a beta satelitní sekvence DNA. Satelitní DNA přítomná v centromerické oblasti je pro většinu chromozómů specifická, je vysoce repetitivní a tandemově uspořádání zasahuje oblast až 4000 kb velkou. Kromě centromerických sond existují také sondy na subtelomerické a telomerické oblasti lidských chromozómů. Všechny výše uvedené typy sond je možné použít i k vyšetření nedělících se buněk (I-FISH).

Dále jsou velmi využívány sondy, které hybridizují s jedinečnými sekvencemi DNA. Jsou to obvykle genomické klony, které se liší velikostí v závislosti na klonovacím vektoru, kterým může být plasmid (500 bp – 5 kb), kosmid (20–50 kb), bakteriofág lambda (8–15 kb) nebo umělé kvasinkové chromozómy (YAC klony 50–1000 kb), umělé bakteriální klony (BAC), P1 klony a další vektory. Rovněž tento typ sond je možné použít při sledování nedělících se buněk (I-FISH).

V indikovaných případech využíváme speciální sondy, které hybridizují s mnohočetnými chromozómovými sekvencemi. Tyto sondy jsou obvykle připraveny ze specifických knihoven DNA, lze jimi označit celý chromozóm (tzv. chromosome painting – malování chromozómů), nebo jsou získány mikrodisekcí určité části chromozómu, cíleně odebranou pod mikroskopem pomocí mikromanipulátoru z fixovaných preparátů a získaná DNA je pak dále amplifikována metodou DOP-PCR (polymerázová řetězová reakce s degenerovanými oligonukleotidy). Malovací sondy nelze využít při sledování nedělících se buněk, protože signál jednotlivých chromozómů je v interfázi dispersní a je v závislosti na doméně, kterou jednotlivé despiralizované chromozómy zaujímají v jádře.

Srovnávací genomová hybridizace (CGH) a matrix CGH

Komparativní genomová hybridizace (CGH – z angl. comparative genomic hybridization) je molekulární cytogenetická metoda, která umožňuje detekovat a mapovat relativní počet kopií jednotlivých sekvencí mezi různými genomy (6). Normální a studovaná DNA jsou odlišně označeny některými z haptenu a jsou simultánně kohybridizovány na normální metafázické chromozómy. Oblasti zmnožení nebo ztráty DNA sekvencí, jako jsou delece, duplikace nebo amplifikace, jsou zvýrazněny rozdílnou barvou homologů. To je způsobeno změnou poměru intenzity signálu obou fluorochromů měřených podél cílových, normálních chromozómů. Poměr intenzit

signálů je zpracován nejméně u 10 mitóz pomocí počítačového programu, který určí místa, v nichž pak nalezneme příslušnou změnu ve smyslu delece nebo amplifikace. CGH nelze využít u recipročních translokací, inverzí a inzercí, při kterých se nemění poměr počtu kopií sekvencí DNA. Na stejném principu jako CGH je založena metoda mikročipů a tzv. matrix CGH. Ta se liší od CGH tím, že jako podklad pro hybridizaci slouží nikoliv celé mitózy, ale jednotlivé oligonukleotidy představující části DNA oblastí (např. subtelomerických) nebo vybraných genů, které jsou roboticky natištěny na podložním skle (tzv. čip). Na takto připravené preparáty je pak kohybridizovaná rozdílně značená kontrolní a sledovaná DNA. Výsledná barva daného políčka ukazuje přítomnost nebo nepřítomnost určitého genu nebo části chromozómu.

Mnohobarevné karyotypování lidských chromozómů (mFISH a mBAND)

Od roku 1996 je možné rozlišit barevně každý jednotlivý pár autozómů a pohlavní chromozómy. Jde o další variantu FISH metody, při které jsou pěti fluorochromy kombinatoriálním způsobem označeny jednotlivé páry autozómů i pohlavní chromozómy, výsledný obraz je analyzován pomocí počítače, který na základě proměření intenzity fluorescenčních signálů přiřadí k příslušným chromozómům, tzv. pseudobarvy (tj. klasifikační barvy). Metoda mFISH je velmi vhodná při určování původu, tzv. marker chromozómů, a to jak v klinické, tak i nádorové cytogenetice. Na podobném principu je postavena i metoda mnohobarevného pruhování s vysokou rozlišovací schopností – mBAND. Metody mnohobarevné analýzy jednotlivých chromozómů využíváme v nádorové cytogenetice, stejně jako i v klinické cytogenetice při studiu komplexních změn karyotypu a při určování původu marker chromozómů. Pomocí této metody lze přesně lokalizovat místo zlomu na chro-

mozómech, zjistit rozsah delecí nebo duplikací apod. V současné době je možné zakoupit sondu pro mBAND pro všechny autozómy a pro X chromozóm.

INDIKACE K VYŠETŘENÍ MOLEKULÁRNĚ – CYTOGENETICKÝMI METODAMI

Metody FISH používáme vždy cíleně, na základě výsledků klasického cytogenetického vyšetření a po domluvě s ošetřujícím lékařem. Přímé vyšetření metodou FISH bez výsledků klasické cytogenetiky aplikujeme na nedělících se buňkách, například při nezdaru kultivace jakéhokoliv typu buněk pro cytogenetické vyšetření nebo při monitorování léčby u onkohematologických nemocných včetně sledování úspěšnosti transplantace kostní dřeně. Dále používáme I-FISH při sledování amplifikace některých genů, jako je například amplifikace N-myc onkogenu při diagnóze neuroblastomu, amplifikace c-myc onkogenu u některých nádorů, amplifikace Her-2neu onkogenu u nádoru prsu, při diagnostice nádorů močového měchýře, mozkových nádorů a v mnoha dalších případech. CGH využíváme v onkologii při sledování amplifikací a delecí. Předpokládáme, že se bude stále více cíleně používat čipové technologie včetně matrix CGH.

Delece chromozómů

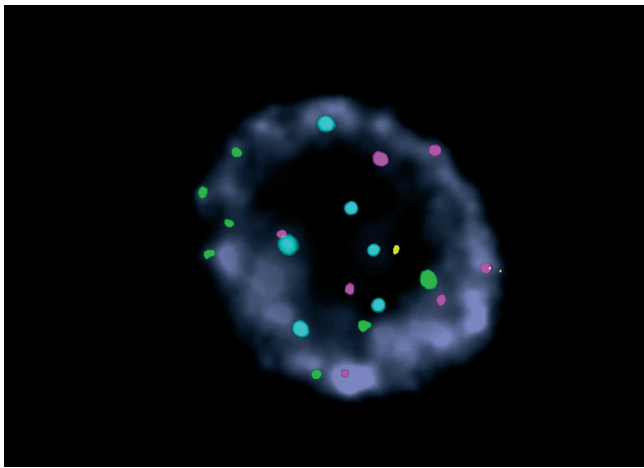
Delece různého rozsahu byly v nádorových buňkách zjišťovány klasickými pruhovacími technikami, teprve molekulárně cytogenetické metody přispěly k identifikaci i kryptických změn. Jako příklad rozvoje našich znalostí a získání dalších diagnostických a prognostických ukazatelů můžeme uvést mozkové nádory. Uvádíme jen některé z nich.

Tab. 3. Specifické chromozómové aberace u různých subtypů difúzních gliomů

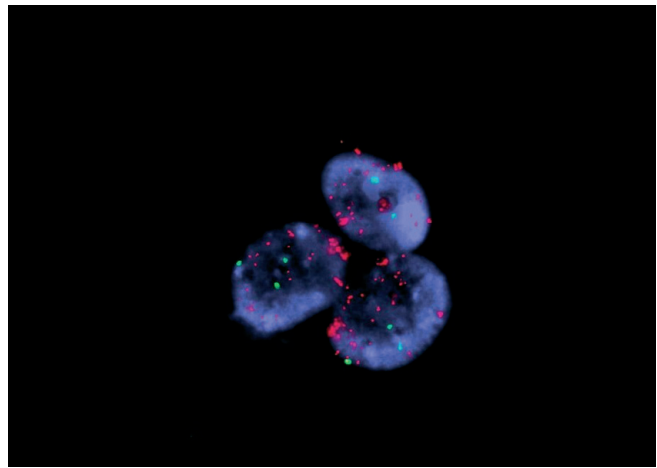
	Typ difúzního gliomu	WHO grade	chromozómové aberace
astrocytomy	nízkostupňový astrocytom	II	trizómie 7, aneuploidie
	anaplastický astrocytom	III	delece genu p53, delece genu p16, delece genu RB1, aneuploidie
	glioblastoma multiforme - primární	IV	amplifikace genu EGFR, delece genu p16, delece genu RB1, delece genu p53 (vzácně), monozómie 10, aneuploidie
	glioblastoma multiforme - sekundární	IV	delece genu p53, delece genu p16, delece genu RB1, monozómie 10, aneuploidie
oligodendrogliomy	nízkostupňový oligodendrogliom	II	delece oblasti 19q13.3, aneuploidie
	anaplastický oligodendrogliom	III	delece 19q13.3 / delece 1p36, aneuploidie (nálezy kombinované delece je ukazatelem dobré odpovědi na chemoterapii)

Tab. 4. Přehled chromozómových změn dosud nalezených u karcinomu močového měchýře

Saran et al., 1996	delece 3p a 17p
Al-Sukhum et al., 2003 (12)	delece 4p, 17p a izochromozóm 5p
Khaled et al., 2004 (13)	ztráta chromozómu Y
Kim et al., 2005 (14)	delece 11p, 8p, polyzómie 8q a 1q
Okamura et al., 2004 (15)	aneuploidie 9 a 17
Panani et al., 2004 (16, 17)	monozómie 9, polyzómie 11, strukturální aberace 3p12, 6q23, 11p15, 14q32 a 19q13, i(8q), i(17q) a i(6p)
Steidl et al., 2002 (11)	aneuploidie 1, 8, 9, 11, 17, 1p36, 8p23, 9p21, 11q13, 17p13



Obr. 1. Interfázní buňka močového měchýře s prokázanou polyzómií chromozómů 3 (růžový signál), 7 (modrý signál) a 17 (zelený signál) K fluorescenční *in situ* hybridizaci byl použit komerčně dostupný kit DNA sond od firmy Abbott-Vysis (UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kit).



Obr. 2. Amplifikace genu EGFR (červený signál) a trizómie chromozómu č. 7 (zelený signál) v interfázních buňkách nemocného s primárním glioblastomem
K hybridizaci byla použita sonda LSI EGFR SO/CEP 7 SG od firmy Abbott-Vysis.

U difuzních gliomů je často popisována delece genu p53 lokalizovaného na krátkých ramenech chromozómu 17 v oblasti 17p13.1. Gen p53 patří do skupiny tumor-supresorových genů a je zároveň nejčastěji mutovaným genem u všech typů nádorových onemocnění (7). Kóduje informaci pro protein o molekulové hmotnosti 53 kDa, který hraje významnou roli v regulaci buněčného cyklu, buněčné odpovědi na poškození DNA a regulace apoptózy. p53 je schopen rozpoznat poškozenou DNA a zablokovat společně s PCNA replikaci DNA či buňku zastavit v G1 fázi buněčného cyklu přes indukci p21 (inhibitor cyklin-dependentních kináz). Ztráta genové informace (delece) nebo mutace genu p53 byly detekovány u asi 30–40 % astrocytomů všech tří stupňů, což svědčí o tom, že vyřazení funkce tohoto genu je časná a kritická událost při vzniku astrocytomů (8, 9).

Přechod z nízkostupňového astrocytomu do anaplastického je často doprovázen delecí na krátkých ramenech chromozómu 9 v oblasti 9p21. V této oblasti je lokalizován další nádorový supresorový gen p16 (CDKN), který má důležitou funkci v regulaci buněčného cyklu a řídí přechod z G1 fáze do S fáze (9). p16 je protein, který podobně jako p21 blokuje aktivitu cyklin-dependentních kináz (Cdk4/6) a zabraňuje jejich vazbě na cyklin D. Delece p16 byla popsána u přibližně dvou třetin všech gliomů vyšších stupňů (anaplastický astrocytom, primární a sekundární glioblastom).

Asi u jedné třetiny nemocných s vysokostupňovým astrocytomem byla popsána delece RB1 genu. Tento nádorový supresorový gen je lokalizován v oblasti 13q14 a kóduje protein o molekulové hmotnosti 107 kDa. Při fosforylaci RB proteinu dochází k uvolnění transkripčního faktoru E2F, se kterým RB protein vytváří komplex a ten pak aktivuje geny nutné pro buněčnou proliferaci. Delece RB1 byla poprvé popsána u nemocných s familiárním i sporadickým retinoblastomem, můžeme se s ní však setkat u řady dalších typů solidních nádorů (např. osteosarkom) i hematologických malignit (např. chronická lymfatická leukémie (CLL), mnohočetný myelom (MM)). V současné době je pomocí I-FISH vyšetřována přítomnost Rb1 genu při těchto obou diagnózách a tato informace patří k základním prognostickým faktorům.

U difuzních gliomů jsou často popisovány i delece v oblastech 1p a 19q, nejčastěji dochází k alelickým ztrátám v oblasti 1p36. Nenáhodné ztráty genetického materiálu z chromozómu 1 (zejména telomerické části 1p) byly detekovány u širokého spektra nádorových onemocnění od různých typů solidních nádorů až po leukémie a myeloproliferativní onemocnění. Znamená to, že v této oblasti jsou lokalizovány geny, které jsou důležité při vzniku maligního nádoru. V oblasti 1p se proto předpokládá přítomnost jednoho

nebo více kandidátních tumor-supresorových genů, které se však dosud nepodařilo přesně určit (10). V tabulce 3 uvádíme nejčastější delece u jednotlivých typů mozkových nádorů.

Dalším velmi často molekulárně geneticky studovaným nádorem je nádor močového měchýře. Také zde byly prokázány časté delece krátkých nebo dlouhých ramen mnoha různých chromozómů (tab. 4). Ztráta 9q byla prokázána u málo diferencovaných stejně jako u vysoce diferencovaných nádorů, což ukazuje na to, že tato změna by mohla být primárním znakem geneze karcinomu močového měchýře. Naopak ztráta heterozygoty, tj. ztráta jedné alely, 17p (LOH – loss of heterozygosity) byla prokázána v 60 % invazivních tumorů a nikoliv u nádorů povrchových, což naznačuje roli této aberace v progresi onemocnění. Ve své studii se Steidl et al. (11) zaměřili na detekci chromozómových aberací s využitím centromerických a lokus-specifických sond a prokázal pomocí I-FISH početní změny alespoň jednoho chromozómu ve 100 % analyzovaných vzorků karcinomu močového měchýře.

Amplifikace chromozómů

K velmi častým nálezům v nádorových buňkách patří rovněž amplifikace jednotlivých genů či celých chromozómů a/nebo jejich částí. Jedním z možných mechanismů, které vedou k progresi nádoru, je zvýšená genová dávka (dosage effect). U nádorového onemocnění je nález nadpočetného chromozómu nebo jeho části obvykle svědectvím o postupu nádorového procesu. Jako příklad můžeme uvést klonální vývoj u nemocných s chronickou myeloidní leukémií (CML), kdy při přechodu z chronické do blastické fáze dochází k poměrně uniformnímu klonálnímu vývoji. Může se objevit trizómie 8, izochromozóm 17q nebo další Ph chromozóm, který nevzniká novou translokací, ale mitotickou nondisjunkcí. Rovněž u MDS a akutních leukémií vznikají při postupu onemocnění nové početní nebo strukturní změny ve smyslu zmnožení chromozómů. Tyto změny jsou vždy spojeny se špatnou prognózou pro nemocného. Polyzómie celých chromozómů jsou často popisovány u i různých typů solidních nádorů. Například u karcinomu močového měchýře dochází ke zmnožení chromozómů 3, 7 a 17 (obr. 1). U různých typů hematologických malignit a hlavně solidních nádorů velmi často dochází i k amplifikaci jednotlivých genů. Například u akutních leukémií se nejčastěji můžeme setkat s amplifikací genu MLL (mixed lineage gen). U různých typů solidních nádorů pak patří k nejčastějším nálezům například amplifikace onkogenu n-myc. Dalším příkladem může být častý nález amplifikace onkogenu n-myc u nemocných s neuroblastomy či amplifikace genu EGFR u mozkových gliomů vyšších stupňů (obr. 2).

Chromozómové translokace

Chromozómové translokace v nádorových buňkách způsobují aktivaci existujících genů nebo tvoří nové fúzní proteiny. Obvykle se jedná o mezibuněčnou expresi buď hybridních molekul s novými vlastnostmi, nebo nepatřícně exprimovanými normálními proteiny. V současné době známe více než 200 různých fúzních genů, některé z nich jsou silně promiskuitní a rekombinují s mnoha různými partnery – např. MLL gen u akutních leukémií – translokace byly zjištěny mezi 40 partnerskými místy na chromozómech, některá zlomová místa jsou častější. Jen několik příkladů translokací, které mají za důsledek vznik fúzního genu, je uvedeno v tabulce 1. V této tabulce uvádíme také translokace, které zasahují T-buněčné receptory, případně i IgH řetězce.

Účinnost většiny z nově uváděných technologií, které slibují vysoce specifickou a účinnou léčbu zaměřenou na intracelulární cíle, může být vlivem těchto translokací snížena případně i zcela anulována. Například není vůbec jisté, že translokacemi pozměněná exprese onkogenů je nezbytná i pro pozdní stadia nádorů, jejich viabilitu a růst. Chromozómová nestabilita nádorových buněk a následná akumulace mutací může způsobit, že se stane původní defekt onkogenů přebytečný a bude škodit a narušovat terapeutický efekt, který na něj bude naměřený. Ačkoliv současná data ukazují, že jsou chromozómové translokace podstatné, nemusí tomu tak být ve všech případech.

ZÁVĚR

Podstatná variabilita delečních i translokačních míst přináší řadu problémů, jak v diverzitě přestaveb u jedné skupiny nemocí, tak i v přesné lokalizaci zlomového místa na daném chromozómu. Stále hledáme rychlou a spolehlivou metodu pro identifikaci odpovídajících translokací a/nebo delecí u každého nádoru. Stejně tak se hledá způsob vytváření specifických léků, aby bylo každému pacientovi podáváno správné a přesné terapeutické agens. Zavedení nových sofistikovaných technologií pro identifikaci specifických lézí a zajištění výroby reagentů proti abnormálním produktům, které jsou specifické pro daný typ nádoru, by nás mohly posunout do období individuální, molekulárně cílené terapie proti nádorovým molekulám každého jednotlivého pacienta.

Zkratky

ALL	– akutní lymfatická leukémie
AML	– akutní myeloidní leukémie
BAC	– bakteriální umělé klony
CCD kamera	– charged couple device camera
Cdk4/6	– cyklin-dependentní kináza
CDKN	– cyklin dependentní kynáza
CGH	– komparativní genomová hybridizace (comparative genomic hybridization)
CLL	– chronická lymfatická leukémie
CML	– chronická myeloidní leukémie
DAPI- 4,6	– diamidino 2-phenylindol
DOP-PCR	– polymerázová řetězová reakce s degenerovanými oligonukleotidy
FISH	– fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FITC	– fluorescein isothiokyanát
I-FISH	– interfázická FISH
IgH	– těžký imunoglobulinový řetězec
ISCN	– mezinárodní standardizace lidské cytogenetiky (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature)
Kb	– kilobáze DNA
kD	– kilodaltony

LOH	– ztráta heterozygoty (loss of heterozygosity)
Mb	– megabáze DNA
MLL	– myeloidní lymfoidní leukémie (mixed lineage gen)
mBAND	– mnohobarevné pruhování s vysokou citlivostí
MDS	– myelodysplastický syndrom
mFISH	– mnohobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
MM	– mnohočetný myelom
YAC	– yeast artificial clone- artifiční kvasničné klony
PCR	– polymerázová řetězová reakce
Ph	– Filadelfský chromozóm t(9;22)(q34;q11)
PRINS	– PCR <i>in situ</i> hybridizace

LITERATURA

1. Heim, S., Mitelman, F.: Cancer Cytogenetics. Second Edition. New York, Wiley-Liss, 1995.
2. Novell, P. C., Hungerford, D. A.: A minute chromozóme in human granulocytic leukemia. Science, 1960, 132, s. 1497-1500.
3. Rowley, J. D.: A new consistent chromozómal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature, 1973, 243, s. 290-293.
4. ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Mitelman, F. editor. Basel, S. Karger, 1995.
5. Passarge, E.: Color Atlas of Genetics. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2001.
6. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Citro, G. et al.: Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer, 1995, 12, s. 213-219.
7. Varmus, H., Weinberg, R. A.: Genes and Biology of cancer. New York, Scientific American Library, 1993.
8. Okada, Y., Hurwitz, E. E., Esposito, J. M. et al.: Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. Cancer Res., 2003, 63, s. 413-416.
9. Tachibana, I., Smith, J. S., Sato, K. et al.: Investigation of germline PTEN, p53, p16INK4A/p14ARF, and CDK4 alterations in familial glioma. Am. J. Med. Genet., 2000, 92, s. 136-141.
10. Smith, J. S., Perry, A., Borell, T. J. et al.: Alterations of chromozóme arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas and mixed oligoastrocytomas. J. Clin. Oncol., 2000, 18, s. 635-645.
11. Steidl, C., Simon, R., Bürger, H. et al.: Patterns of chromozómal aberrations in urinary bladder tumours and adjacent urothelium. J. Pathol., 2002, 198, s. 115-120.
12. Al-Sukhun, S., Hussain, M.: Molecular biology of transitional cell carcinoma. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2003, 47, s. 181-193.
13. Khaled, H. M., Aly, M. S., Mokhtar, N.: Chromosomal aberrations in Cis and Ta bilharzial bladder cancer: a theory of pathogenesis. Urol. Oncol., 2004, 22, s. 443-447.
14. Kim, W. J., Quan, C.: Genetic and epigenetic aspects of bladder cancer. Journal of Cellular Biochemistry, 2005, 95, s. 24-33.
15. Okamura, T., Umemoto, Y., Yasui, T. et al.: Noninvasive detection of alterations in chromosome numbers in urinary bladder cancer cells, using fluorescence *in situ* hybridization. Int. J. Clin. Oncol., 2004, 9, s. 373-377.
16. Panani, A. D., Babanaraki, A., Malianga, E., Roussos, Ch.: Numerical aberrations of chromosomes 9 and 11 detected by FISH in Greek bladder cancer patients. Anticancer Res., 2004, 24, s. 3857-3861.
17. Panani, A. D., Ferti, A. D., Raptis, S. A., Roussos, C.: Novel recurrent structural chromosomal aberrations in primary bladder cancer. Anticancer Res., 2004, 24, s. 2967-2974.

Práce byla podpořena grantem VZ 64165.

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Diagnostické a prognostické biomarkery časně revmatoidní artritidy

Šenolt L.

Revmatologický ústav I. LF UK, Praha

SOUHRN

Revmatoidní artritida (RA) je chronické systémové zánětlivé onemocnění, které vede k nevratnému destruktivnímu poškození kloubů. Kritéria americké revmatologické společnosti pro diagnózu RA nejsou příliš senzitivní pro velmi časný začátek onemocnění. Postrádají zejména prognostický význam pro riziko rychlé progresy kloubního poškození a hodnocení efektu léčby. V současné době je proto intenzivně zkoumána řada biologických markerů, které by měly tyto nedostatky nahradit. V tomto přehledovém článku je s ohledem na patofyziologickou podstatu RA diskutován význam parametrů imunitního systému, zánětlivé aktivity, destrukce kloubu a některé genetické faktory. Závěrem je shrnuto využití některých markerů v klinické praxi.

Klíčová slova: revmatoidní artritida, biomarkery, zánět kloubu, destrukce kloubu.

SUMMARY

Šenolt L.: An Update on Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Early Rheumatoid Arthritis

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, systemic, inflammatory disease that leads to inevitable joint destruction. The revised American College of Rheumatology (ACR) criteria for the diagnosis of RA are not sensitive enough for classification of the very early onset of the disease. They lack the predictive value for identifying patients at high risk of rapid joint damage and for assessing the efficacy of treatment. To improve the situation, several new biomarkers are currently studied to help to achieve this goal. Respecting the pathophysiology of RA, several markers reflecting immune response, inflammation, joint destruction, and genetic factors are discussed in this review. Finally, the potential use of several markers in the clinical practice is depicted.

Key words: rheumatoid arthritis, joint biomarkers, inflammation, joint destruction.

Še.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, pp. 538–542.

U pacientů s časnou symetrickou polyartritidou je často obtížné rychle diferencovat mezi diagnózou revmatoidní artritidy (RA) nebo jiného zánětlivého revmatického onemocnění. RA představuje chronické autoimunitní zánětlivé onemocnění, které vede k destrukci kloubů, ireverzibilním deformitám a funkčnímu omezení. Diagnóza choroby se v současné době opírá o přepracovaná kritéria Americké revmatologické společnosti (ACR) z roku 1987 (tab. 1) (1). Senzitivita těchto kritérií v časném stadiu choroby je však nízká. Revmatoidní faktor nemusí být pozitivní až u 20 % pacientů a rentgenové známky kostní eroze nebo destrukce chrupavky nemusí být během prvních týdnů či měsíců patrné. ACR kritéria též neúplně odpovídají na dvě základní otázky – určení prognózy choroby a odpovědi na léčbu. Ireverzibilní změny kloubního aparátu často vznikají v průběhu prvních let onemocnění (2). Proto v současné době existuje konsensus včasné a agresivní léčby RA, která často přispívá ke klinickému a funkčnímu zlepšení a vede ke zpomalení, někdy též zástavě rentgenové progresy choroby (3). Současná doporučení evropské ligy proti revmatismu (EULAR) pro léčbu časně RA jsou shrnuta v práci řady zkušených expertů z oboru revmatologie (4). Výsledkem jsou doporučení, která se týkají včasného rozpoznání artritidy, diagnózy, prognózy, klasifikace a léčby časně RA včetně pravidelného monitorování průběhu choroby. S ohledem na zvážení ceny, prospěchu

a nežádoucích účinků je v současné době doporučováno začít léčbu preparáty ze skupiny tzv. chorobu modifikujících antirevmatických léků (např. metotrexát, sulfasalazin, hydroxychlorochin, leflunomid) a v případech nedostatečné odpovědi nebo intolerance přidat biologickou léčbu (blokátory TNF – infliximab, etanercept, adalimumab) (5). Hlavním cílem u pacientů s nediferencovanou artritidou, časnou i etablovanou RA je nyní navození remise. Výsledkem by tak měla být redukce strukturálního poškození kloubu a zabránění následné disability. Koncepce významu včasné a intenzivní léčby pacientů s RA ve smyslu dosažení klinické remise a zpomalení rentgenové progresy choroby se opírá o výsledky několika nedávných studií (6, 7). Bylo například prokázáno, že u RA pacientů s délkou choroby kratší než 3 roky měla TNF blokující léčba, a to zejména v kombinaci s metotrexátem, větší účinnost při dosažení remise a snížení rentgenové progresy choroby v porovnání s monoterapií metotrexátem.

V klinické praxi existuje několik potenciálních ukazatelů hodnocení odpovědi na léčbu a rentgenovou progresi RA:

- klinické a funkční známky aktivity choroby (dotazníky DAS28, HAQ apod.),
- laboratorní ukazatele zánětu (FW, CRP),
- rentgenový nálezn (kostní eroze),
- genetické markery (HLA-DRB1).

Tab. 1. Přepřacovaná kritéria ACR pro diagnózu revmatoidní artritidy (1)

ranní ztuhlost (>1 hodinu)*
 artritida 3 nebo více kloubních oblastí
 (pozorovaná lékařem)*
 artritida ručních kloubů (PIP, MCP, RC)*
 symetrická artritida*
 revmatoidní uzly
 pozitivita revmatoidního faktoru
 rentgenové změny (eroze nebo periartikulární poróza)

*přítomna nejméně 6 týdnů

Pro diagnózu RA je zapotřebí splnit minimálně 4 z uvedených kritérií.

ACR – Americká revmatologická společnost, MCP – metakarpofalangeální, PIP – proximální interfalangeální, RC – radiokarpální

Nicméně tyto ukazatele mají také svá omezení a nízkou senzitivitu. Kostní eroze a destrukce chrupavky mohou probíhat nezávisle na zánětlivém postižení kloubního aparátu a mohou progredovat i navzdory nízké zánětlivé aktivitě a klinickému zlepšení (8). Významný prognostický faktor při hodnocení dalšího vývoje choroby představuje jak přítomnost kostních erozí na počátku onemocnění, tak různé modifikace Sharpova skóre (TTS – total Sharp score, van der Heijde apod.), které hodnotí množství kostních destrukcí a zúžení kloubní štěrby (9). Kromě prostého rentgenového snímku lze hodnotit postižení drobných kloubů rukou či nohou také pomocí ultrasonografie nebo magnetické rezonance (MR). Zejména pak posledně jmenovaná zobrazovací modalita umožňuje časný záchyt destrukcí kloubu (10). V současné době se MR používá zejména v průřezových, observačních a kontrolovaných klinických studiích. Její výhodou je kromě časného stanovení kloubních destrukcí také hodnocení synovity a edému kosti (11).

V této práci se diskutují otázky významu nových biologických ukazatelů hodnocení klinické aktivity a progresu RA (tab. 2), zejména pak s ohledem na některé autoprotilátky, zánětlivé parametry, ukazatele kloubního metabolismu a dědičné faktory.

AUTOPROTILÁTKY ASOCIOVANÉ S REVMATOIDNÍ ARTRITIDOU

RA patří mezi autoimunitní onemocnění, které vzniká na podkladě zvýšené aktivity imunitního systému. Dominantní postavení při vzniku autoimunitní choroby má narušení tolerance, vznik autoreaktivních lymfocytů a aktivace dalších imunokompetentních buněk s tvorbou autoprotilátek (12).

Revmatoidní faktor je protilátka zaměřená proti Fc části molekuly IgG a byl původně objeven v roce 1940 (13). Nejčastěji používaným izotypem revmatoidního faktoru je IgM, který má senzitivitu přibližně 90 %. Ostatní izotypy mají senzitivitu nižší. K detekci revmatoidního faktoru se nejčastěji používá latex fixační test nebo metoda ELISA. Nicméně pozitivita revmatoidního faktoru může být přítomna i u dalších systémových revmatických onemocnění, některých bakteriálních infekcí nebo nádorových onemocnění a navíc stoupá s věkem i u zdravé populace (2–10 %) (14). Existuje však vztah mezi vysokou koncentrací revmatoidního faktoru a systémovými příznaky, vaskulitidou, těžkým průběhem a další prognózou choroby. Sledování revmatoidního faktoru v rámci monitorování průběhu choroby nebo odpovědi na léčbu je však sporné.

Ostatní protilátky (ANA, RA33, ANCA apod.) se mohou také vyskytovat v průběhu RA, jejich specifita pro toto onemocnění je

Tab. 2. Biologické markery hodnotící aktivitu a progresi revmatoidní artritidy by měly odrážet patologický stav onemocnění, který je založen na aktivaci imunitního a zánětlivého procesu, na destrukci kloubu a dědičné podstatě choroby

autoprotilátky	RF, anti-CCP, APF, AKA, RA33
zánětlivé parametry	CRP, S100 proteiny, NO, AGE, rezistin
ukazatele kloubního metabolismu	CTX-I, CTX-II, COMP, HA, Glc-Gal-PYD
dědičné faktory	HLA-DR4, HLA-DRB1, HLA-DM, PTPN22

anti-CCP – protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu, AGE – pozdní produkty pokročilé glykace, AKA – protilátky proti keratinu, APF – protilátky proti perinukleárnímu faktoru, COMP – oligomerní protein chrupavkové matrix, CRP – C-reaktivní protein, CTX – C-terminální příčně vazebný telopeptid kolagenu, Glc-Gal-PYD – glukosyl-galaktosyl pyridinolin, HA – kyselina hyaluronová, HLA – lidský transplantační antigen, NO – oxid dusnatý, PTPN – gen pro tyrosin fosfatázu, RA – revmatoidní artritida, RF – revmatoidní faktor

však nízká. V poslední době se stává velmi oblíbeným vyšetřením detekce protilátek proti cyklickému citrulinovanému peptidu (CCP). Hlavní antigenní determinantou těchto protilátek je citrulin. Jedná se o zvláštní aminokyselinu, která vzniká potranslační enzymatickou modifikací argininového zbytku polypeptidového řetězce. Historie anti-CCP protilátek má souvislost s objevem protilátek proti perinukleárnímu faktoru (APF) a keratinu (AKA) (15, 16). Ukázalo, že oba druhy protilátek reagují s filagrinem – citrulinovaným proteinem, který je asociován s keratinovými filamenty. Citrulinované proteiny i protilátky proti těmto proteinům se nachází v RA synoviální tkáni a přítomnost anti-CCP protilátek v séru je vysoce specifická (>95 %) pro diagnózu RA (17). Detekce anti-CCP protilátek má navíc prediktivní význam strukturálního postižení u jedinců s časným začátkem choroby (18) a u jedinců nediferencovanou artritidou trávající méně než 3 měsíce dokáží s vysokou citlivostí odlišit pacienty, kteří vyvinou perzistující RA (19). Specifita tohoto prediktivního nálezu se zvyšuje při kombinaci anti-CCP s IgM izotypem revmatoidního faktoru. Naše poznatky navíc poukazují na asociaci zvýšených anti-CCP protilátek v séru s ukazateli destrukce chrupavky a metabolického obratu kosti. Efekt léčby na sérové hladiny anti-CCP je diskutabilní. V dosud jediné prospektivní práci byl při terapii adalimumabem pozorován pokles titru revmatoidního faktoru i anti-CCP protilátek (20), naopak při terapii infliximabem nebyly shledány v hladinách anti-CCP protilátek žádné změny (21).

ZÁNĚTLIVÉ PARAMETRY

RA synoviální tkáň je infiltrována zánětlivými buňkami, podléhá hyperplazii, a představuje klíčovou tkáň patologického průběhu onemocnění. Důležitá je zejména nerovnováha mezi tvorbou pro- a protizánětlivých cytokinů, která vede k nadměrné tvorbě proteolytických enzymů, jež navozují destrukci kloubní tkáně. Kromě lokálně zánětlivých změn je v popředí navíc systémová zánětlivá odpověď.

Systémovým ukazatelem probíhajícího zánětu je C-reaktivní protein (CRP), jehož tvorba játry je stimulována prozánětlivými cytokiny (IL-6, IL-1, TNF). Již dříve bylo prokázáno, že CRP reflektuje aktivitu choroby lépe než sedimentace erytrocytů, může mít vztah k rentgenové progresi a často klesá u pacientů s dobrou klinickou odpovědí na chorobu modifikující léčbu (22). Ačkoli prozánětlivé cytokiny (IL-1, IL-6 a TNF) a matrixové metaloproteinázy (MMP) mají klíčové postavení v patogenezi RA, jejich sérové hla-

diny nejsou specifické a nemají tudíž významnější uplatnění při hodnocení aktivity RA. Bylo však pozorováno, že sérové koncentrace MMP-3 mohou odrážet zánětlivou aktivitu choroby a na druhé straně MMP-1 vznik kostních erozí (23).

Dlouho zůstával podceňovaný význam zánětlivých parametrů tzv. rodiny S100 proteinů. Fagocytární buňky kloubní výstelky a synoviální tekutiny tvoří významné množství dímeru S100A8/S100A9 (kalprotektinu). Zvýšené sérové koncentrace kalprotektinu významně korelovaly s klinickou i laboratorní aktivitou choroby a bylo zjištěno, že mohou předznamenávat relaps onemocnění již týdnů před elevací standardních zánětlivých ukazatelů a vlastní manifestací RA (24). Totéž platí pro další S100 protein S100A12 (kalgranulin C), což bylo potvrzeno u pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou (25). Další neméně významný protein S100 rodiny představuje protein S100A4 (kalvaskulin), který je ve velkém množství přítomen v séru a synoviální tekutině u pacientů s RA (Grigorian a Šenolt, připraveno k publikaci). Je tvořen buňkami agresivní synoviální tkáně, *in vitro* podporuje tvorbu MMP synoviálními fibroblasty, a může tak přispívat k destrukci kloubu u RA (26). Uplatnění S100 proteinů v časném stadiu onemocnění a jejich prognostický význam není dosud plně objasněn.

Buňky hyperplastické synoviální tkáně produkují řadu reaktivních kyslíkových radikálů, vzniká oxidační stres a dochází k posílení zánětlivé odpovědi. Důležitým představitelem kyslíkových radikálů je oxid dusnatý (NO), jehož zvýšené koncentrace u pacientů s RA korelovaly s aktivitou choroby, reaktanty akutní fáze a zánětlivými cytokiny (27). Oxidační stres přispívá významně k tvorbě pozdních produktů pokročilé glykace (AGE – advanced glycated end products). Nejznámější z nich je pentosidin, jež u pacientů s osteoartrózou vykazoval korelaci s ukazatelem destrukce kloubní chrupavky COMP v synoviální tekutině (28). Naopak u pacientů s RA měly vyšší hodnoty pentosidinu v séru spíše vztah k zánětlivé aktivitě choroby (29).

Rezistin, původně charakterizovaný jako protein tukové tkáně se vztahem k obezitě a inzulinové rezistenci, má navíc významné regulační schopnosti podporující zánětlivou aktivitu (30). Nám se podařilo prokázat nadměrnou akumulaci rezistinu v RA synoviální tkáni, jeho zvýšenou tvorbu zánětlivými buňkami a zvýšené uvolňování rezistinu do synoviální tekutiny. Zvýšené hladiny rezistinu v séru navíc reflektovaly systémový zánět a klinickou aktivitu RA.

UKAZATELE KLOUBNÍHO METABOLIZMU

Postižení kloubního aparátu během RA může být provázeno zvýšenou hladinou parametrů degradace a novotvorby jednotlivých komponent extracelulární matrix synoviální výstelky, chrupavky a kosti. Mezi markery lokálně probíhající synovitidy patří kyselina hyaluronová, N-propeptid kolagenu typu III a glykoprotein-39 (YKL-40). Tyto molekuly mohou odrážet aktivitu onemocnění a některé z nich mohou mít i prediktivní charakter progresu kloubního postižení (31, 32). Více specifický pro kloubní výstelku je glykosylovaný pyridinolin, tzv. glukosyl-galaktosyl pyridinolin (Glc-Gal-PYD). Nedávno byla prokázána významná asociace jeho zvýšených hladin s progresí kloubních erozí během jednoho roku sledování pacientů s časnou RA (33).

Metabolický obrat „revmatického kloubu“ je provázen elevací parametrů destrukce chrupavky a kosti. Zvýšené hladiny příčně vazebných telopeptidů kolagenu CTX-II a CTX-I v moči měly prediktivní význam rentgenové progresu u pacientů s časnou RA (34). Lepší prediktivní význam měly zejména u jedinců bez prokazatelných známek rentgenového postižení na počátku studie. Úspěšná léčba RA byla provázena poklesem obou parametrů, přičemž kombinovaná terapie měla lepší efekt na pokles zejména močového CTX-II (34). V posledních letech je extenzivně zkoumán význam

nekolagenního oligomerního proteinu chrupavkové matrix (COMP). Již dříve byla popsána asociace zvýšených hladin COMP u pacientů s časnou RA s progresí choroby (35). Nicméně v nedávne prospektivní 5leté studii nebyl pozorován vztah COMP k zánětlivé aktivitě, ani rentgenové progresi choroby (36).

DĚDIČNÉ FAKTORY

Příčina vzniku RA není dosud plně objasněna. Předpokládá se, že vznik RA může být navozen dosud neznámým činitelem u geneticky predisponovaných jedinců. Je pozorována významná asociace RA s molekulami HLA-systému, a to zejména s HLA-DR4 antigénem. V poslední době byla prokázána důležitá role genů HLA-DM, přičemž kombinace alel HLA-DM s HLA-DRB1 může pomoci odhalit pacienty se špatnou prognózou choroby. Pozornost je věnována pouze některým vlohám (alelám) pro HLA-DR4 gen, které kódují totožný úsek aminokyselin v oblasti tzv. žlábků β glykoproteinového řetězce. Tento úsek se nazývá sdílený epitop. Již dříve bylo pozorováno, že pacienti se sdílenými epitopy HLA-DRB1 odpovídali lépe na agresivnější kombinovanou léčbu (37). V současnosti bylo potvrzeno, že množství těchto sdílených epitopů má vztah k závažnosti choroby a mohlo by pomoci při výběru pacientů pro biologickou léčbu (38). Stanovení sdílených epitopů, ani polymorfismu genů pro některé cytokiny u pacientů s RA však neumožňuje předpovědět klinickou odpověď na TNF blokující léčbu. Vedle polymorfismu cytokinů, jejich receptorů a transkripčních faktorů, je v poslední době zkoumán gen pro tyrosin fosfatázu PTPN22 – lymfocytární protein s regulační aktivitou. Bylo prokázáno, že polymorfismus PTPN22 významně zvyšuje riziko vzniku revmatoidní artritidy s pozitivitou revmatoidního faktoru, a to nezávisle na antigenech HLA-systému (39).

ZÁVĚR

Výzkum biologických markerů RA nabývá v posledních několika letech nebyvalého rozmachu. Důvodů je proto několik. První z nich je fakt, že ACR kritéria pro diagnózu časného stadia RA nejsou příliš senzitivní. Dále by bylo vhodné nalézt specifický ukazatel, který by usnadnil rozhodnutí o včasné intenzivní léčbě, jež by mohla významně zpomalit, eventuálně zastavit vznik ireverzibilních kloubních změn již na počátku onemocnění. Hodnocení biomarkerů RA by mělo dále pomoci při určení prognózy choroby, vytížení vhodných jedinců pro účinnější biologickou léčbu a monitorování efektu této léčby. Tento aspekt je důležitý zejména s ohledem na velké finanční náklady biologické terapie.

Přes veškerou snahu mnoha výzkumných pracovišť zůstává hlavním laboratorním diagnostickým ukazatelem RA stále revmatoidní faktor. Rada laboratoří již disponuje kity na detekci protilátek anti-CCP, které se v brzké době pravděpodobně začlení mezi nová kritéria pro diagnózu RA. Několik biomarkerů představuje nadějně prognostické ukazatele rentgenové progresu choroby. Mezi ně patří například CRP (22), anti-CCP protilátky (18, 19), některé parametry metabolismu synoviální tkáně (31–33), chrupavky a kosti (34, 35) a molekuly HLA-systému (37, 38). Navíc, některé z výše zmíněných biomarkerů by mohly sloužit k monitorování efektu léčby. Některé nové biomarkery (např. pentosidin, NO, S100 proteiny, rezistin) mohou odrážet zánětlivou a následně i klinickou aktivitu RA (24, 25, 27). Podle dostupných prací z poslední doby se zdá, že nové ukazatele závažnosti RA mohou představovat spíše kombinace více markerů z různých skupin. Tak například kombinace některých imunologických a zánětlivých parametrů, markerů destrukce kloubní chrupavky či dědičných faktorů v časně fázi choroby může přispět k určení prognózy jednotlivých pacientů s RA (40). Nicméně

ně dosud neexistuje vhodný ukazatel předpovídající klinickou odpověď na antiревmatickou léčbu, což by jistě velmi usnadnilo výběr z poměrně široké škály preparátů pro léčbu RA.

Diagnóza časné artritidy se opírá o klinický nález kloubního otoku, jež nebyl indukován traumatem, postihuje minimálně 2 klouby, zejména pak metakarpofalangeální a metatarzofalangeální, a je doprovázen alespoň 30minutovou ranní ztuhlostí (4). Dále je třeba vyloučit jiné choroby než RA a až potom sledovat tzv. prognostické ukazatele perzistující a erozivní formy RA. Podle nových doporučení se jedná o počet oteklých a bolestivých kloubů, laboratorní známky zánětu (CRP, FW), hladiny revmatoidního faktoru a zejména anti-CCP protilátek včetně evidence erozivních změn na počátku onemocnění (4). Výše zmíněné ukazatele mají prediktivní význam ve smyslu rentgenové progrese choroby a lze je jednoduše použít v klinické praxi. Výzkum v oblasti biomarkerů by měl do budoucna přispět k odhalení nových diagnostických a prognostických parametrů RA, k hodnocení terapeutického efektu a zejména k vytipování jedinců vhodných pro biologickou léčbu.

Zkratky

ACR	– Americká revmatologická společnost
AGE	– pozdní produkty pokročilé glykace (advanced glycated end products)
AKA	– protilátky proti keratinu
anti-CCP	– protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu
APF	– protilátky proti perinukleárnímu faktoru
CCP	– cyklický citrulinovaný peptid
COMP	– oligomerní protein chrupavkové matrix
CRP	– C-reaktivní protein
CTX	– C-terminální příčně vazebný telopeptid kolagenu
DAS28	– skóre aktivity choroby (disease activity score)
EULAR	– Evropská liga proti revmatismu
FW	– sedimentace erytrocytů (fahræus westergren)
Glc-Gal-PYD	– glukosyl-galaktosyl pyridinolin
HA	– kyselina hyaluronová
HAQ	– dotazník zhodnocení zdravotního stavu (Health Assessment Questionnaire)
HLA	– lidský transplantační antigen
IgG	– imunoglobulin G
IgM	– imunoglobulin M
MMP	– matrixová metaloproteináza
MR	– magnetická rezonance
NO	– oxid dusnatý
PTPN	– gen pro tyrosin fosfatázu
RA	– revmatoidní artritida
RF	– revmatoidní faktor
TNF	– faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
TTS	– total Sharp score

LITERATURA

1. **Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A. et al.:** The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1988, 31, s. 315-324.
2. **Pincus, T., Fuchs, H. A., Callahan, L. F. et al.:** Early radiographic joint space narrowing and erosion and later malalignment in rheumatoid arthritis: a longitudinal analysis. *J. Rheumatol.*, 1998, 25, s. 636-640.
3. **Emery, P.:** Evidence supporting the benefit of early intervention in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 2002, 66 (Suppl.), s. 3-8.
4. **Combe, B., Landewe, R., Lukas, C. et al.:** Eular recommendations for the management of early arthritis: Report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCSIT). *Ann. Rheum. Dis.*, 2006 (v tisku).
5. **Haq, U. J., Bathon, J. M.:** The role of biologicals in early rheumatoid arthritis. *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2005, 19, s. 179-189.
6. **Breedveld, F. C., Weisman, M. H., Kavanaugh, A. F. et al.:** The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum.*, 2006, 54, s. 26-37.
7. **Quinn, M. A., Conaghan, P. G., O'Connor, P. J. et al.:** Very early treatment with infliximab in addition to methotrexate in early, poor-prognosis rheumatoid arthritis reduces magnetic resonance imaging evidence of synovitis and damage, with sustained benefit after infliximab withdrawal: results from a twelve-month randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.*, 2005, 52, s. 27-35.
8. **Mulherin, D., Fitzgerald, O., Bresnihan, B.:** Clinical improvement and radiological deterioration in rheumatoid arthritis: evidence that the pathogenesis of synovial inflammation and articular erosion may differ. *Br. J. Rheumatol.*, 1996, 35, s. 1263-1268.
9. **van der Heijde, D. M., van Riel, P. L., van Leeuwen, M. A. et al.:** Prognostic factors for radiographic damage and physical disability in early rheumatoid arthritis. A prospective follow-up study of 147 patients. *Br. J. Rheumatol.*, 1992, 31, s. 519-525.
10. **Scheel, A. K., Hermann, K. G., Ohrndorf, S. et al.:** Prospective 7 year follow-up imaging study comparing radiography, ultrasonography, and magnetic resonance imaging in rheumatoid arthritis finger joints. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, 65, s. 595-600.
11. **Conaghan, P. G., McQueen, F. M., Peterfy, C. G. et al.:** OMERACT 7 Special Interest Group. The evidence for magnetic resonance imaging as an outcome measure in proof-of-concept rheumatoid arthritis studies. *J. Rheumatol.*, 2005, 32, S. 2465-2469.
12. **Firestein, G. S.:** The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytokine networks in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 2004, 114, s. 471-474.
13. **Waalder, E.:** On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep corpuscles. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 1940, 1, s. 172-188.
14. **Sheldon, J.:** Laboratory testing in autoimmune rheumatic diseases. *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2004, 18, s. 249-269.
15. **Nienhuis, R. L., Mandema, E.:** A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis; the antiperinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis.*, 1964, 23, s. 302-305.
16. **Young, B. J., Mallya, R. K., Leslie, R. D. et al.:** Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br. Med. J.*, 1979, 2, s. 97-99.
17. **Vincent, C., Nogueira, L., Clavel, C. et al.:** Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity*, 2005, 38, s. 17-24.
18. **Vencovský, J., Macháček, S., Šedová, L. et al.:** Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2003, 62, s. 427-430.
19. **Raza, K., Breese, M., Nightingale, P. et al.:** Predictive value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with very early inflammatory arthritis. *J. Rheumatol.*, 2005, 32, s. 231-238.
20. **Atzeni, F., Sarzi-Puttini, P., Dell'Acqua, D. et al.:** Adalimumab clinical efficacy is associated with rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody titer reduction: a one-year prospective study. *Arthritis Res. Ther.*, 2005, 8, s. R3.
21. **De Rycke, L., Verhelst, X., Kruithof, E. et al.:** Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, 64, s. 299-302.
22. **Blackburn, W. D. Jr.:** Validity of acute phase proteins as markers of disease activity. *J. Rheumatol.*, 1994, 42 (Suppl.), s. 9-13.
23. **Cunnane, G., Fitzgerald, O., Beeton, C. et al.:** Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2001, 44, s. 2263-2274.
24. **Schulze zur Wiesch, A., Foell, D., Frosch, M. et al.:** Myeloid related proteins MRP8/MRP14 may predict disease flares in juvenile idiopathic arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2004, 22, s. 368-373.
25. **Foell, D., Wittkowski, H., Hammerschmidt, I. et al.:** Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis Rheum.*, 2004, 50, s. 1286-1295.
26. **Šenolt, L., Grigorian, M., Lukanidin, E. et al.:** S100A4 (Mts1): Is there any relation to the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Autoimmun. Rev.*, 2006, 5, s. 129-131.

27. **Ueki, Y., Miyake, S., Tominaga, Y., Eguchi, K.:** Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 1996, 23, s. 230-236.
28. **Šenolt, L., Braun, M., Olejárová, M. et al.:** Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in serum and synovial fluid from patients with knee osteoarthritis and its relation with cartilage oligomeric matrix protein. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, 64, s. 886-890.
29. **Chen, J. R., Takahashi, M., Suzuki, M. et al.:** Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 1999, 38, s. 1275-1278.
30. **Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L. et al.:** Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J. Immunol.*, 2005, 174, s. 5789-5795.
31. **Majeed, M., McQueen, F., Yeoman, S., McLean, L.:** Relationship between serum hyaluronic acid level and disease activity in early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2004, 63, s. 1166-1168.
32. **Sharif, M., George, E., Dieppe, P. A.:** Synovial fluid and serum concentrations of aminoterminal propeptide of type III procollagen in healthy volunteers and patients with joint disease. *Ann. Rheum. Dis.*, 1996, 55, s. 47-51.
33. **Garnero, P., Gineyts, E., Christgau, S. et al.:** Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl-pyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2002, 46, s. 21-30.
34. **Garnero, P., Landewe, R., Boers, M. et al.:** Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA study. *Arthritis Rheum.*, 2002, 46, s. 2847-2856.
35. **Forslind, K., Eberhardt, K., Jonsson, A., Saxne, T.:** Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.*, 1992, 31, s. 593-598.
36. **Roux-Lombard, P., Eberhardt, K., Saxne, T. et al.:** Cytokines, metalloproteinases, their inhibitors and cartilage oligomeric matrix protein: relationship to radiological progression and inflammation in early rheumatoid arthritis. A prospective 5-year study. *Rheumatology (Oxford)*, 2001, 40, s. 544-551.
37. **O'Dell, J. R., Nepom, B. S., Haire, C. et al.:** HLA-DRB1 typing in rheumatoid arthritis: predicting response to specific treatments. *Ann. Rheum. Dis.*, 1998, 57, s. 209-213.
38. **Marotte, H., Pallot-Prades, B., Grange, L. et al.:** The shared epitope is a marker of severity associated with selection for, but not with response to infliximab in a large rheumatoid arthritis population. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, 65, s. 342-347.
39. **Lee, A. T., Li, W., Liew, A. et al.:** The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. *Genes. Immun.*, 2005, 6, s. 129-133.
40. **Lindqvist, E., Eberhardt, K., Bendtzen, K. et al.:** Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, 64, s. 196-201.

KOMENTÁŘ

K článku Šenolt L. „Diagnostické a prognostické biomarkery časně revmatoidní artritidy“

Paradigma klinické medicíny o vztahu časně diagnózy k úspěšnosti léčby a k prognóze přirozeně platí i pro revmatoidní artritidu (RA). Tato nejčastější zánětlivá revmatická choroba doživotně ztrpčuje život nemocných a prokazatelně zhoršuje jejich životní prognózu. Perzistující aktivita je totiž spjata nejenom s urychlenou destrukcí kloubních struktur, ale také se zvýšeným rizikem extraartikulárních manifestací (EAM). Vedle dlouho známého rizika řady EAM a dalších komplikací, jako je např. AA amyloidóza ledvin, nadledvin a dalších orgánů, jde především o akcelerovanou aterosklerózu. I s přihlédnutím k interferenci s aterogenními vlivy farmakoterapie (glukokortikoidy, cytostatika aj.) bylo doloženo, že RA je spojena se zvýšeným rizikem ICHS, měštnavé srdeční nedostatečnosti a náhlé smrti (1).

Požadavek včasné diagnózy RA lze v nastíněném kontextu považovat za naléhavý imperativ. Stanovení diagnózy časně (resp. velmi časně) RA je ovšem nesnadné a naráží na dílčí problémy:

1. Není všeobecná shoda v časových limitech pro pojmy časně a velmi časně RA; řádově však platí, že jde obvykle o týdny a měsíce. V práci o velmi časně terapii RA Infliximabem a Methotrexátem byla hodnocena časná RA jako onemocnění s trváním do jednoho roku (průměrně 6 měsíců) (2). V široce založené studii o prognostickém významu autoprotilátek u časně RA (N=104), která vzešla z pracoviště autora komentovaného přehledu, to byla RA s trváním do dvou let (3).

2. Diagnóza RA se opírá o splnění celosvětově používaných kritérií ACR/1987. Část nemocných ovšem naplňuje tyto požadavky až postupně a v poměrně dlouhém časovém rozmezí. To znamená oddálení startu účinné léčby s potenciálem předcházet/retardovat/blokovat nezvratné strukturální poškození postižených kloubů.

3. Na rozdíl od některých jiných difuzních nemocí pojiva (např. idiopatické polymyozitidy/dermatomyozitidy) nemají kritéria pro diagnózu RA jinou možnost odpovědi, než ano – ne. Neobsahují totiž kategorie spolehlivosti na úrovni hodnocení pravděpodobná nebo možná RA.

Východiskem z této situace je přistoupit k hodnocení zánětlivého kloubního syndromu, suspektního z RA jako k časně formě nediferencovaného difuzního onemocnění pojiva (UCTD – Undifferentiated Diffuse Connective Tissue Disease), kde způsob terapie určuje závažnost postižení terčového orgánu (-nů), tj. v daném kontextu charakter kloubního zánětu.

prof. MUDr. Zbyněk Hrnčíř, DrSc.
2. interní klinika LF UK a FN
500 05 Hradec Králové, Sokolská 581
e-mail: hrncir@fnhk.cz

Nepříliš odlišný přístup k řešení této naléhavé problematiky zvolila expertní skupina ESCISIT (EULAR Standing Committee for International Studies Including Therapeutics; EULAR – European League Against Rheumatism), která vypracovala doporučení, týkající se rozpoznání artritidy (nediferencované artritidy), diagnózy, prognózy, klasifikace a léčby časné RA. Dodávám, že pracovní diagnóza nediferencované kloubní zánětu má ekvivalenty i v jiných oborech interní medicíny. Jako příklad lze uvést termín „indeterminovaná kolitida“, používaný v časné fázi idiopatických střevních zánětů tam, kde aktuálně nelze stanovit, zda půjde o ulcerózní kolitidu nebo Crohnovu chorobu. Autor správně zdůrazňuje, že hlavním cílem u pacientů s nediferencovanou artritidou, časnou i etablovanou RA je navodit (a udržet!) remisi dříve, než dojde k nezvratným strukturálním změnám postižených kloubů, popř. i jiných tkání. Z prognosticky závažných útrobních projevů RA lze zmínit časné postižení plicního intersticia. Vedle precizního klinického šetření máme v této situaci k dispozici zobrazovací metody (včetně MRI) a rozšiřující se škálu laboratorních ukazatelů, kam lze zařadit i znaky genetické predispozice. Komentované review podává instruktivně stratifikovaný přehled těchto biomarkerů. Ve skupině autoprotilátek spjatých s RA zdůrazňuje přínos kombinace anti-CCP protilátek s IgM izotypem revmatoidního faktoru. Význam anti-CCP protilátek je dán jejich více jak 95% specificitou pro RA. K autorově pozorování signifikantní asociace anti-CCP protilátek k parametrům destrukce chrupavky a kostní remodelace chci poznamenat to, že citrulinované proteiny nejsou specifické pro revmatoidní synovitidu, a těžiště specificity anti-CCP protilátek pro RA je spíše v charakteru imunitní odpovědi na CCP podnět (4). Efekt léčby na sérové hodnoty anti-CCP protilátek bude ještě dlouho předmětem zkoumání. Nedávná studie o Etanerceptu například zaznamenala pokles sérových hodnot anti-CCP protilátek a revmatoidního faktoru ve vztahu k redukci klinické aktivity RA (5). Za cenné doplnění článku považuji informaci o tom, že u časné RA a dokonce v předklinickém období nemoci byly zjištěny u nemalé části zkoumaných osob protilátky stresového proteinu BiP (6).

Společným problémem v hodnocení přínosu narůstajícího počtu ukazatelů zánětlivé aktivity a kloubního metabolismu je jejich nozologická specifická. Záleží ovšem na přístupu: Jiný je význam signifikantních diferencí pro patofyziologická zkoumání a jiná je využitelnost pro klinické rozhodování u konkrétního nemocného. Příkladem pro první z uvedených situací je klasický biomarker zánětu a poškození, jakým je CRP. Stačilo zavedení supersenzitivní metody průkazu a signifikantně zvýšené hodnoty CRP přispěly k hodnocení patofyziologie osteoartrózy a dalších chorob. Je otázkou, zda je reálné očekávat takový vývoj i v přínosu pro klinická rozhodování. Zatím se zdá, že jednoznačnou odpověď lze předpokládat především tam, kde je jednoznačná příčina: např. průkaz živých mikrobů v synoviální tekutině u akutní bakteriální (septické) artritidy nebo průkaz urátových krystalů u dnaveho tofu. U nozologicky méně specifických biomarkerů se domnívám, že dosud nebyly plně využity možnosti stratifikace jejich přínosu sofistikovanou aplikací biostatistických metod (např. kroková diskriminační analýza aj.).

Závěrem konstatuji, že pročetění exaktně formulovaného a didakticky efektivního review o biomarkerech časné RA je informačním obohacením a intelektuálním prožitkem pro každého, kdo mu věnoval pozornost.

LITERATURA

1. **Maradit-Kremers, H. et al.:** Arthritis Rheum., 2005, 52, s. 722-732.
2. **Quinn, M. A. et al.:** Arthritis Rheum., 2005, 52, s. 27-35.
3. **Vencovský, J. et al.:** Ann. Rheum. Dis., 2003, 62, s. 427-430.
4. **Vossenaar, E. R. et al.:** Arthritis Rheum., 2004, 50, s. 3485-3494.
5. **Chen, Ha et al.:** Ann. Rheum. Dis., 2006, 65, s. 35-39.
6. **Bodman-Smith, M. D. et al.:** Rheumatology, 2004, 43, s. 1283-1287.

Významný příspěvek k vědomostem o slunečním „nebezpečí“

V prvním příspěvku Arenbergerová velmi výstižně popisuje kožní malignity, které jsou vůbec nejčastějším rakovinným bujením v lidském organismu a zmiňuje i poněkud opomíjené neuroendokrinní nádory z Merkelových buněk (1). Článek obsahuje sice jen letmou, ale výstiž-

nou zmínku také o imunosupresi a genetice, které bývají sice v současné literatuře podrobně pojednané, ale nespécializovanému čtenáři ne docela srozumitelné.

Také Ettlérova stať o lokální fotoprotekci (2) je mimořádně záslužná, protože poskytuje nedermatologovi právě ty informace, které jsou velice užitečné při komunikaci s pacienty na téma současného nebezpečí slunečního záření. Jsou zmíněny ochranné faktory i metoda kvantifikace pigmentové odpovědi s náležitým vysvět-

lením a praktickými radami k jejich racionálnímu využití.

Literatura:

1. **Arenbergerová, M.:** Kožní nádory indukované UV zářením. Ref. Výběr, 2006, 48, s. 11-15.
2. **Ettler, K.:** Lokální fotoprotekce. Ref. Výběr, 2006, 48, s. 16-18.

P. Barták

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Hipokampus, morfologie mozku a schizofrenie

Kašpárek T., Příkryl R., ¹Schwarz D., Kučerová H., Češková E.*Psychiatrická klinika LF MU a FN, Brno*
¹Centrum biostatistiky a analýz LF MU, Brno

SOUHRN

Schizofrenie je klinicky heterogenní onemocnění, u kterého doposud není jasná patogeneze a patofyziologické mechanismy, jež by umožnily jasnější klasifikaci, odrážející individuální vulnerabilitu a umožňující cílenější terapeutické přístupy. Množí se nálezy – zejména z oboru zobrazovacích metod, které naznačují klíčovou roli hipokampu v rozvoji tohoto onemocnění. Nejvýznamnější nálezy přinášející metody studia morfologie mozku, doposud nejčastěji tzv. volumetrie. Klinické souvislosti hipokampální dysfunkce však nejsou doposud objasněny, existuje množství inkonzistentních nálezů. V současnosti jsou dostupné nové metody zpracování obrazu mozku a jeho statistického vyhodnocení (výpočetní neuroanatomie), které by mohly pomoci upřesnit koncept schizofrenie a ujasnit souvislosti morfologických změn mozku u schizofrenie s klinickým obrazem.

Klíčová slova: schizofrenie, endofenotyp, morfologie, volumetrie, výpočetní neuroanatomie.

SUMMARY

Kašpárek T., Příkryl R., Schwarz D. et al.: Hippocampus, Structure of the Brain and Schizophrenia

Schizophrenia is a clinically heterogeneous state without clearly defined pathogenesis. This limits the classification approaches with consequent lack of ability for individual treatment strategies. It becomes evident that hippocampus is a key structure in the neuropathology of schizophrenia and a concept of hippocampal reduction as an endophenotype of schizophrenia was established. The biggest support came from MRI volumetric studies. Despite that, due to some inconsistent findings, clinical consequences of hippocampal shrinkage are not yet clear. Contemporary methods of brain imaging (computation morphometry, voxel-based morphometry) could help us to outline the concept of schizophrenia and to clarify the clinical consequences of brain structure changes.

Key words: schizophrenia, endophenotype, morphology, volumetry, computational neuroanatomy.

Ka.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, pp. 544–547.

Schizofrenie patří mezi nejzávažnější psychické poruchy. Celoživotní riziko rozvoje nemoci je asi 1%, zároveň velmi často přechází do chronicity a nezhřídka vede k invaliditě, ztrátě sociální kompetence. Jde o klinicky značně heterogenní onemocnění, charakterizované individuálně různě vyjádřenými symptomy z okruhu obsahových i formálních poruch myšlení (např. bludy, poruchy abstrakce), poruch vnímání (halucinace různého druhu), psychomotoriky (katatonní symptomatologie), volního jednání, afektivity, kognitivních funkcí aj. Současná diagnostika a subtypizace nemoci je dle používaných klasifikačních systémů (10. revize Mezinárodní klasifikace nemocí, americký Diagnostický a statistický manuál IV) založená výhradně na klinickém obrazu. MKN 10 zná dle převládající symptomatologie schizofrenii paranoidní, hebefrenní, katatonní, simplexní a dále schizofrenii nediferencovanou, kdy není zjevná převaha symptomů z určitého okruhu. Přitom u jednotlivých klinicky definovaných subtypů není jasná jejich validita z patofyziologického a etiologického hlediska.

Klinická zkušenost ukazuje, že jednotliví pacienti mají rozdílnou prognózu, kdy horší průběh očekáváme u jedinců s vleklým nástupem nemoci, s převahou negativních příznaků, s rodinnou anamnézou schizofrenního onemocnění. Chybí nám však jasná vodítka, pomocí kterých bychom dokázali spolehlivě vytipovat podskupiny pacientů, zohlednit jejich specifika a pátrat po možnostech individualizace terapeutických přístupů.

Od počátku vymežování schizofrenie jako diagnostické jednotky bylo toto onemocnění považováno za onemocnění mozku. Tehdejšími přístupy ke studiu morfologie mozku však nebylo možné nalézt specifickou abnormitu, která by byla podkladem nemoci. Objevil se tedy koncept tzv. „funkční psychózy“, kdy projevy nemoci měly být důsledkem nesprávné funkce nebo nedostatečné spolupráce strukturálně intaktních systémů v mozku. S rozvojem zobrazovacích metod bylo postupně poukazováno i na odlišnosti struktury. Jedním z nejčastějších nálezů změn morfologie kortikálních struktur mozku je redukce objemu hipokampu.

HIPOKAMPUS V PATOGENEZI SCHIZOFRENIE

Hipokampus je kortikální struktura mediálního temporálního laloku, tradičně řazená mezi limbické oblasti a spojovaná s tvorbou a vybavením paměťové stopy. Zároveň je popsána jeho role v několika dalších dějích, jako jsou detekce nových informací, integrace informací do systému již získaných zkušeností, určení kontextu jednotlivých informací, což vše může být projevem tvorby a vybavení paměťové stopy na různých úrovních. *In vivo* intracelulární měření naznačují, že informace o kontextu, které zprostředkovává hipokampus, ovlivňují aktivitu prefrontálního kortexu (PFK, oblast zapojená v tvorbě, iniciaci a monitoraci volního jednání) cestou

olivnění neuronů *nc. accumbens*. Ty jsou schopny tvorby akčních potenciálů – a tím převedení vzruchů z prefrontálních oblastí – jen tehdy, pokud jsou aktivovány hipokampálními glutamatergními vstupy. Jen ty vzruchy, které jsou posíleny vlivem hipokampu, pak pokračují přes thalamus zpět do prefrontálního kortexu (1). Toto by mohl být neuronální substrát zprostředkování vlivu minulé zkušenosti či kontextu aktuálních informací na vytvářené strategie adaptace.

Všechny zmíněné struktury vykazují u schizofrenie odchylky – je přítomná kognitivní dysfunkce vázaná na PFK (2), poruchy perфуze při zátěži PFK (3), známky neuronální poruchy v PFK a hipokampu (4), abnormní funkce bazálních ganglií (5), existují data naznačující přítomnost abnormit thalamu, zejména jeho mediodorzálního jádra (6). Jde o množství zdánlivě nesouvisejících změn, které se několik teorií snaží uspořádat do smysluplných řetězců. V jedné z nich hraje klíčovou roli hipokampus.

Lipská s Weinbergerem vytvořili animální model schizofrenie, který je založený na neonatální lézi hipokampu. U zvířat s touto poruchou dochází v dospělosti k rozvoji behaviorálních změn, které jsou považovány za analogii schizofrenních příznaků (7). Je u nich přítomná dysfunkce PFK (8), redukce N-acetyl aspartátu (NAA) v této oblasti (9), zvýšená bazální mezolimbická dopaminergní (DA) aktivita (10), po infuzi amfetaminu do PFK dochází k abnormně zvýšené stimulované mezolimbické DA aktivitě (11). Existují data u pacientů se schizofrenií, která tomuto modelu odpovídají. Zjistilo se, že menší hipokampus predikuje nižší aktivitu PFK (12), menší přední část hipokampu je spojena s horším výkonem v kognitivních testech zatěžujících PFK (13, 14), je přítomná abnormální koherence (EEG studie) mezi PFK a hipokampem (15, 16), což může odrážet poruchy spolupráce mezi těmito oblastmi, snížená hladina NAA v PFK je spojená s abnormální mezolimbickou DA aktivitou (4, 17). Model patofyziologie schizofrenie pak vypadá tak, že neonatální léze hipokampu způsobí v průběhu vývoje konektivity mozku narušení prefrontální architektury a funkce s dysregulací DA systému v mezolimbické oblasti s projevy psychózy. Jako by dysfunkční hipokampus zkrusloval funkci prefrontálního kortexu.

VELIKOST HIPOKAMPU A JEJÍ DŮSLEDKY

Hipokampus by tedy měl být klíčovou oblastí v patogenezi schizofrenie. Existují důkazy pro to, že je u schizofrenie tato oblast narušena? Jedny z nejkonzistentnějších důkazů o abnormitách hipokampu u schizofrenie máme díky studiím, které měřily velikost hipokampu z obrazů získaných pomocí magnetické rezonance (MR), tzv. volumetrickým studiím. Dle volumetrie je redukce velikosti hipokampu jedním z endofenotypů onemocnění, tj., má odrážet patofyziologické mechanismy, nemá být závislá na průběhu či fázi onemocnění (tzv. trait marker), je přítomná od počátku onemocnění, vyskytuje se i u zdravých příbuzných pacientů se schizofrenií a je pod vlivem dědičnosti. Redukce velikosti hipokampu je nejvýraznější nález morfologických změn kortikálních oblastí – effect size 0,6 (18).

Přes tato fakta je stále nejasný důsledek zmenšení hipokampu pro klinickou manifestaci nemoci, jaká je souvislost velikosti hipokampu s kognitivními funkcemi, symptomatologií, odpovědí na léčbu. Effect size 0,6 znamená, že je značný překryv ve velikosti hipokampu mezi populací nemocných a zdravými jedinci. Je tedy otázka, zda výraznější redukce hipokampu odpovídá výraznějšímu postižení kognitivních funkcí, výraznějšímu vyjádření (některých) symptomů či horší odpovědi na léčbu, prognóze. Zda dokážeme na základě velikosti hipokampu odlišit skupiny pacientů s odlišným klinickým obrazem.

Tomuto tématu se věnovalo doposud relativně málo studií

a jejich výsledky nejsou jednoznačné. Objevují se data, která naznačují souvislost s produktivními psychotickými symptomy (19–21). Jsou však publikovány i negativní výsledky (22–24). Obtíž se nalezením vztahů hipokampu se symptomatologií schizofrenie je možné vysvětlit tím, že strukturální změny představují trvalejší rysy nemoci než ty, které se zachytí průřezovými studiemi, jako je právě klinický stav nemocných. Data, která by ukazovala na souvislost velikosti hipokampu s průběhovými variantami schizofrenie, odrážející rozdílnou prognózu nemoci, chybí. Průběh onemocnění je spojen spíše s komorovým systémem, i když i zde je množství protichůdných nálezů (25–28).

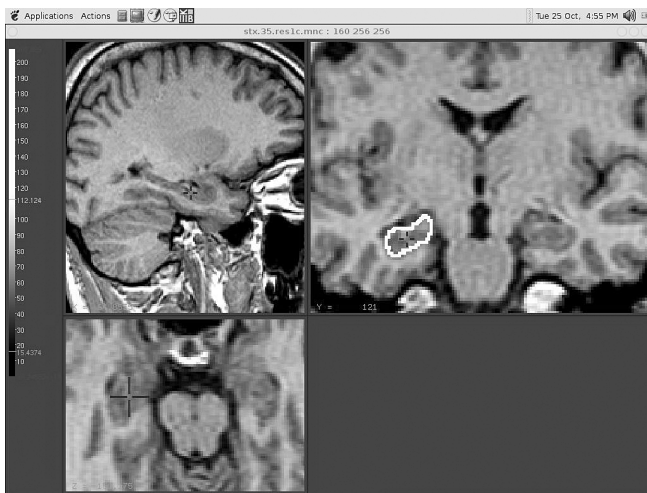
Více údajů je k dispozici pro zhodnocení souvislosti velikosti hipokampu s kognitivními funkcemi, potažmo s funkcemi paměťovými. Přestože je lze teoreticky předpokládat i zde nacházíme inkonzistentní výsledky. Množství studií nenalezlo předpokládané korelace mezi velikostí hipokampu a testy paměťových funkcí (13, 14, 29). Nami provedené studie také vyzněly negativně: U skupin pacientů s první epizodou schizofrenie jsme neprokázali korelace mezi velikostí hipokampu a subjektivním hodnocením úrovně paměťových funkcí (30), s Bentonovým testem, zatěžujícím krátkodobou paměť (31), ani s indexy Wechsleryovy škály paměti, která testuje paměťové funkce detailně, ve kterých výkon pacientů nedosahoval normy. Velikost hipokampu se přitom nelišila od zdravých jedinců (32). Pozitivní nálezy jsou hlášeny zejména v posledních letech – korelace s verbální pamětí (33), prostorovou pamětí (23). Vztah mezi velikostí hipokampu a oddálenou verbální pamětí byl nalezen i u zdravých příbuzných pacientů se schizofrenií (34). Studie Sanfilipa (35) pak ukázala, že vztahy mohou být složitější: Výkonnost verbální paměti byla spojena s velikostí hipokampu pouze u pacientů se schizofrenií, u zdravých dobrovolníků takový vztah nebyl. Přitom v konkrétní studii nebyl rozdíl ve velikosti hipokampu mezi skupinami nemocných a zdravých jedinců.

Zatím není jasné, jak se na inkonzistenci těchto korelačních studií projevuje vliv heterogenity souborů ve smyslu klinické manifestace, délky nemoci, podávané medikace, věkové skladby, poměrného zastoupení pohlaví či statistické síly studií. Kromě výše zmíněných problémů se může projevovat vliv metody hodnocení velikosti hipokampu, tj. volumetrie. Její velkou nevýhodou je nutnost vytyčení oblastí zájmu z MR obrazu (obr. 1). To je značně zatíženo subjektivitou hodnotitele, problémem variability kortikálních oblastí, což je u schizofrenie ještě zvýrazněno, nutností definovat arbitrární hranice, což vše vede k rozdílným mezi centry a problémům při interpretaci odlišných výsledků. Kromě toho je volumetrie časově velmi náročná metoda. Z praktických důvodů se tedy můžeme zaměřit pouze na omezené množství oblastí. Tato omezení by měly řešit nové metody studia morfologie mozku, metody tzv. výpočetní neuroanatomie (computational neuroanatomy), zejména voxel-based morfometrie (VBM).

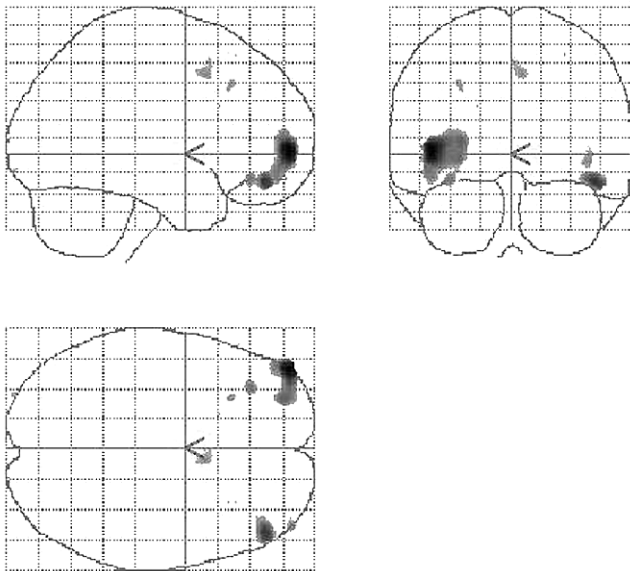
MORFOLOGIE MOZKU U SCHIZOFRENIE V OBRAZE VOXEL-BASED MORFOMETRIE

Výpočetní neuroanatomie zahrnuje přístupy, které kvantitativně hodnotí morfologii mozku jako celku (obr. 2). Nejsou tedy omezeny nutností definovat oblastí zájmu. Jsou založeny na transformaci MR obrazů pomocí metod digitálního zpracování obrazu a následně statistické analýze. Tímto způsobem získáme lokální charakteristiky mozku na úrovni jednotlivých voxelů. Podle toho, jaké charakteristiky hodnotíme, lze tyto metody rozdělit – tzv. deformation-based morfometrie hodnotí informace o tvaru a objemu v každém voxelu, voxel-based morfometrie (VBM) informace o koncentraci či objemu některé tkáně mozku (šedá, bílá hmota a likvor) v daném místě.

VBM studie zatím přinesly informace o regionálních změnách



Obr. 1. Vytčení oblasti zájmu ve volumetrii
Postup při vytčování oblasti zájmu – hipokampu. Při ohraničování nepravidelných struktur je nutné zpracovávat obrazy s vysokým rozlišením (nejvhodnější jsou navazující koronární řezy kolem 1 mm) a použít program, který umožňuje neustálou kontrolu polohy kurzoru ve všech třech základních rovinách. Jen tak je možné zajistit reliabilní určení hranic oblastí.



Obr. 2. Výsledky voxel-based morfometrické studie
Výsledky voxel-based morfometrické studie – oblasti, ve kterých je u pacientů s první epizodou schizofrenie menší objem šedé hmoty ve srovnání se zdravými kontrolami (Kašpárek, nepublikovaná data).

šedé hmoty u schizofrenních pacientů. Nedávno bylo publikováno systematické shrnutí 15 VBM studií u schizofrenie (36). Výsledky jednotlivých studií se v poměrně velké části nálezů nepřekrývají, větší shoda byla nalezena pro redukci šedé hmoty levostranného hipokampu (9 z 15 studií) a levostranného g. temporalis superior (8 z 15 studií). Právě 50 % studií pak referovalo o redukci šedé hmoty v oblasti levostranného g. frontalis inferior a medialis, pravostranného g. temporalis superior a levostranného g. parahippocampalis. Studie zahrnovaly jak pacienty dlouhodobě nemocné, tak s první epizodou schizofrenie. Právě heterogenita souborů může odpovídat za nedostatečný překryv nálezů – faktory, které mohou mít vliv, zahrnují progresi změn morfologie v souvislosti s délkou trvání onemocnění, délkou podávání antipsychotik i délkou neléčené psychózy, klinické (zastoupení subtypů nemoci) a demografické

(věk, pohlaví, preference ruky) charakteristiky souboru, citlivosti metodiky odhalit změny malých struktur, statickou silou studií. Z těchto důvodů je důležité studovat pacienty na začátku onemocnění, s první epizodou schizofrenie.

S pacienty s první epizodou schizofrenie bylo doposud provedeno 5 studií (37–40). Jde o menší studie s maximálně 30 pacienty. Soubory pacientů s první epizodou jsou však poměrně vzácné, a proto je třeba vyvážit nižší sílu studií jejich replikací. Tyto studie častěji nacházejí redukci šedé hmoty v prefrontálních oblastech – g. cinguli (5/5 studií), g. frontalis inferior (4/5 studií), v temporálních strukturách méně často – g. temporalis superior (3/5 studií) a hipokampus (3/5 studií). Tři studie našly navíc redukci v cerebellu. Oblastí, které jsou u schizofrenie narušeny, je tedy více. Význam těchto změn pro kliniku je však stále nutně objasnit.

ZÁVĚR

Dle uvedených studií lze říci, že dysfunkce fronto-temporálních oblastí je charakteristickým rysem schizofrenie. Stále však nejsou dořešeny otázky etiologie, mechanismu a návaznosti změn (primární, sekundární změny, progresse nálezů apod.), či jejich vztah k heterogenní klinické manifestaci onemocnění. K zodpovězení těchto otázek je zde nadále prostor pro nové metodické přístupy zahrnující morfologické, funkční a klinické rozměry nemoci. Tyto přístupy by nám měly pomoci v upřesnění konceptu schizofrenie a při vysvětlení klinického významu morfologických změn. Zároveň od nich očekáváme informace upřesňující vliv léčby na centrální nervovou soustavu (CNS) s následným hledáním nových terapeutických strategií a individualizací léčebného plánu.

Zkratky

CNS	– centrální nervová soustava
DA	– dopamin
EEG	– elektroencefalografie
MKN 10	– Mezinárodní klasifikace nemocí, 10. revize
MR	– magnetická rezonance
NAA	– N-acetyl aspartát
PFK	– prefrontální kůra
VBM	– voxel-based morfometrie

LITERATURA

- O'Donnell, P., Grace, A. A.: Dysfunction in multiple interrelated systems as the neurobiological bases of schizophrenic symptom clusters. *Sch. Bull.*, 1998, 24, s. 267-283.
- Weinberger, D. R., Egan, M. F., Bertolino, A. et al.: Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 2001, 50, s. 825-844.
- Yurgelun-Todd, D. A., Wateraux, C. M., Cohen, B. M. et al.: Functional magnetic resonance imaging of schizophrenic patients and comparison subjects during word production. *Am. J. Psychiatry*, 1996, 153, s. 200-205.
- Bertolino, A., Knable, M. B., Saunders, R. C. et al.: The relationship between dorsolateral prefrontal N-acetylaspartate measures and striatal dopamine activity in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 1999, 45, s. 660-667.
- Liddle, P. F., Friston, K. J., Frith, C. D. et al.: Patterns of cerebral blood flow in schizophrenia. *Br. J. Psychiatry*, 1992, 160, s. 179-186.
- Kemether, E. M., Buchsbaum, M. S., Byne, W., Hazlett, E. A.: Magnetic resonance imaging of mediodorsal, pulvinar, and centromedian nuclei of the thalamus in patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 2003, 60, s. 983.
- Lipska, B. K., Jaskiw, G. E., Weinberger, D. R.: Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 1993, 9, s. 67-75.

8. **Bachevalier, J., Alvarado, M. C., Malkova, L.:** Memory and socioemotional behavior in monkeys after hippocampal damage incurred in infancy or in adulthood. *Biol. Psychiatry*, 1999, 46, s. 329-339.
9. **Bertolino, A., Saunders, R. C., Mattay, V. S. et al.:** Altered development of prefrontal neurons in rhesus monkeys with neonatal mesial temporo-limbic lesions: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Cereb. Cortex*, 1997, 7, s. 740-748.
10. **Heinz, A., Saunders, R. C., Kolachana, B. S. et al.:** Striatal dopamine receptors and transporters in monkeys with neonatal temporal limbic damage. *Synapse*, 1999, 31, s. 71-79.
11. **Saunders, R. C., Kolachana, B. S., Bachevalier, J., Weinberger, D. R.:** Neonatal lesions of the medial temporal lobe disrupt prefrontal cortical regulation of striatal dopamine. *Nature*, 1998, 393, s. 169-171.
12. **Weinberger, D. R., Berman, K. F., Suddath, R., Torrey, E. F.:** Evidence of dysfunction of a prefrontal-limbic network in schizophrenia: a magnetic resonance imaging and regional cerebral blood flow study of discordant monozygotic twins. *Am. J. Psychiatry*, 1992, 149, s. 890-897.
13. **Bilder, R. M., Bogerts, B., Ashtari, M. et al.:** Anterior hippocampal volume reductions predict frontal lobe dysfunction in first episode schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 1995, 17, s. 47-58.
14. **Szeszko, P. R., Strous, R. D., Goldman, R. S. et al.:** Neuropsychological correlates of hippocampal volumes in patients experiencing a first episode of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 2002, 159, s. 217-226.
15. **Ford, J. M., Mathalon, D. H., Whitfield, S. et al.:** Reduced communication between frontal and temporal lobes during talking in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 2002, 51, s. 485-492.
16. **Winterer, G., Coppola, R., Egan, M. F. et al.:** Functional and effective frontotemporal connectivity and genetic risk for schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 2003, 54, s. 1181-1192.
17. **Bertolino, A., Breier, A., Callicott, J. H. et al.:** The relationship between dorsolateral prefrontal neuronal N-acetylaspartate and evoked release of striatal dopamine in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 2000, 22, s. 125-132.
18. **Davidson, L. L., Heinrichs, R. W.:** Quantification of frontal and temporal lobe brain-imaging findings in schizophrenia: a meta-analysis. *Psych. Res. Neuroimaging*, 2003, 122, s. 69-87.
19. **Bogerts, B., Lieberman, J. A., Ashtari, M. et al.:** Hippocampus-amygdala volumes and psychopathology in chronic schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 1993, 33, s. 236-246.
20. **Flaum, M., O'Leary, D. S., Swayze, V. W. et al.:** Symptom dimensions and brain morphology in schizophrenia and related psychotic disorders. *J. Psychiatr. Res.*, 1995, 29, s. 261-276.
21. **Giedd, J. N., Jefferies, N. O., Blumenthal, J. et al.:** Childhood-onset schizophrenia: progressive brain changes during adolescence. *Biol. Psychiatry*, 1999, 46, s. 892-896.
22. **Becker, T., Elmer, K., Schneider, F. et al.:** Confirmation of reduced temporal limbic structure volume on magnetic resonance imaging in male patients with schizophrenia. *Psychiatry Res. Neuroimaging*, 1996, 67, s. 135-143.
23. **Gur, R. E., Turetsky, B. I., Cowell, P. E. et al.:** Temporolimbic volume reductions in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 2000, 57, s. 769-775.
24. **Molina, V., Reig, S., Pascau, J. et al.:** Anatomical and functional cerebral variables associated with basal symptoms but not risperidone response in minimally treated schizophrenia. *Psychiatry Res. Neuroimaging*, 2003, 124, s. 163-175.
25. **Davis, K. L., Buchsbaum, M. S., Shihabuddin, L. et al.:** Ventricular enlargement in poor-outcome schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 1998, 43, s. 783-793.
26. **Staal, W. G., Hulshoff Pol, H. E., Schnack, H. G. et al.:** Structural brain abnormalities in chronic schizophrenia at the extremes of the outcome spectrum. *Am. J. Psychiatry*, 2001, 158, s. 1140-1142.
27. **van Haren, N. E. M., Cahn, W., Hulshoff Pol, H. E. et al.:** Brain volumes as predictor of outcome in recent-onset schizophrenia: a multi-center MRI study. *Schizophr. Res.*, 2003, 64, s. 41-52.
28. **deLisi, L. E., Sakuma, M., Maurizio, A. M. et al.:** Cerebral ventricular change over the first 10 years after the onset of schizophrenia. *Psychiatry Res. Neuroimaging*, 2004, 130, s. 57-70.
29. **Colombo, C., Abbruzzese, M., Livian, S. et al.:** Memory functions and temporal-limbic morphology in schizophrenia. *Psychiatry Res.*, 1993, 50, s. 45-56.
30. **Kašpárek, T., Příkryl, R., Češková, E. et al.:** Změny objemu hipokampu u prvních epizod schizofrenie. *Psychiatrie*, 2003, 7, s. 25-26.
31. **Kašpárek, T., Češková, E., Příkryl, R. et al.:** Souvislosti velikosti hipokampu u prvních epizod schizofrenie: MRI volumetrická studie. *Čes. a slov. Psych.*, 2005, 101, s. 199-206.
32. **Kašpárek, T., Kučerová, H., Příkryl, R. et al.:** Vztah mezi poruchou paměti a strukturální patologií hipokampu u první epizody schizofrenie: MRI studie – vlastní data. *Psychiatrie*, 2005 (Suppl. 2), s. 50-51.
33. **O'Driscoll, G. A., Florencio, P. S., Gagnon, D. et al.:** Amygdala-hippocampal volume and verbal memory in first-degree relatives of schizophrenic patients. *Psychiatry Res.*, 2001, 107, s. 75-85.
34. **Sanfilippo, M., Lafargue, T., Rusinek, H. et al.:** Cognitive performance in schizophrenia: relationship to regional brain volumes and psychiatric symptoms. *Psychiatry Res., Neuroimaging*, 2002, 116, s. 1-23.
35. **Honea, R., Crow, T. J., Passingham, D., Mackay, C. E.:** Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am. J. Psychiatry*, 2005, 162, s. 2233 až 2245.
36. **Job, D. E., Whalley, H. C., McConnell, C. et al.:** Structural gray matter differences between first-episode schizophrenics and normal controls using voxel-based morphometry. *NeuroImage*, 2002, 17, s. 880-889.
37. **Kubicki, M., Shenton, M. E., Salisbury, D. F. et al.:** Voxel-based morphometric analysis of gray matter in first episode schizophrenia. *NeuroImage*, 2002, 17, s. 1711-1719.
38. **Salgado-Pineda, P., Baeza, I., Pérez-Gómez, M. et al.:** Sustained attention impairment correlates to gray matter decreases in first episode neuroleptic-naive schizophrenic patients. *NeuroImage*, 2003, 19, s. 365-375.
39. **Jayakumar, P. N., Venkatasubramanian, G., Gangadhar, B. N. et al.:** Optimized voxel-based morphometry of gray matter volume in first-episode, antipsychotic-naive schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2005, 29, s. 587-591.
40. **Farrow, T. F. D., Whitford, T. J., Williams, L. M. et al.:** Diagnosis-related regional gray matter loss over two years in first episode schizophrenia and bipolar disorder. *Biol. Psychiatry*, 2005, 58, s. 713-723.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem Ministerstva školství a tělovýchovy ČR č. MSM0021622404.

KOMENTÁŘ

K článku autorů Kašpárek T., Příkryl R., Schwarz D., Kučerová H., Češková E. „Hipokampus, morfologie mozku a schizofrenie“

Autoři předkládají čtenáři polemiku k problémům jednoho ze zdánlivě úzkých neurovědních úhlů pohledu na etiologii schizofrenií. Připomínají několik desítek z mnoha set studií (včetně dvou vlastních), které se v posledních dvou desetiletích zabývají podrobným měřením mozkových struktur u pacientů se schizofrenií. Na rozdíl od patologicko-anatomických studií počátku 20. století tentokrát měřením *in vivo*, soudobými zobrazovacími metodami mozku. Duševní poruchy, které jsou současnými psychiatrickými klasifikacemi MKN-10 a DSM-IV nazývány schizofrenie, jsou vymezeny převážně fenomenologicky (symptomy, syndromy), částečně průběhem, nikoli etiologií a patogenezi. V psychiatrii odedávna ožehavý problém – etiologie a patogeneze jsou známou „achilovou patou“ psychiatrické diagnostiky. Při hlubší a poctivé úvaze o vývoji soudobých lékařských věd dospějeme ale nutně k závěru, že na stejný problém narážejí i ostatní lékařské obory včetně takových, u nichž jsme donedávna o etiologii a patogenezi jednotlivých poruch (resp. nemocí) téměř nepochybovali. Za všechny jmenujme kupříkladu duodenální nebo žaludeční vřed, infarkt myokardu, bakteriální infekce. Můžeme dnes s jistotou tvrdit, že jejich etiopatogeneze je nám jasná z takových úhlů pohledu, jako jsou imunologický, genetický nebo dokonce evoluční?

Počáteční entuziasmus, způsobený objevem zobrazovacích metod mozku *in vivo* v 80. letech 20. století a slibujících zásadní průlom v pohledu na etiologii schizofrenií, pominul začátkem třetího tisíciletí. Ukázalo se, že i vysoce sofistikovaná měření mozkových struktur u statisticky signifikantních vzorků pacientů narážejí na heterogenitu diagnózy schizofrenie již při zařazování probandů do studií a na celou plejádu metodologických problémů při závěrečných hodnoceních. A tak po řadě let usilovné práce mnoha špičkových vědeckých pracovišť na celém světě přichází období metaanalýz a zamyšlení nad tím, nakolik nás stovky těchto vysoce náročných studií skutečně přiblížily ke kýženému řešení otázky etiopatogeneze schizofrenií. Přísně kritické myšlení naráží znovu na starobylou ontologickou otázku vztahu mysli a těla. Poměrně úzce vymezená vědecká otázka vztahu struktur mozku (částečně i jejich funkcí) a klinického obrazu duševní poruchy znovu vyústila (po kolikáté již v historii nejenom psychiatrie) v zásadní epistemologický problém metodologie vědy. Autoři článku prošli obdobím tvůrčí vědecké práce (viz citace vlastních prací) a neváhají podrobit výsledky střizlivé kritické analýze. Zatím jsme se dozvěděli tolik, že hipokampus je pozoruhodná mozková struktura, která souvisí nepochybně s pamětí, a to především deklarativní, patrně méně s procedurální. Jeho velikost se zmenšuje při degenerativních onemocněních (např. Alzheimerova nemoc, chronická ischemie mozku) a ne zcela konzistentně u řady psychotických poruch (schizofrenií, afektivních poruch). Jeho struktura i funkce jsou natolik složité, že si vyžádaly vznik svěbytného neurovědního podoboru, který se zabývá výhradně hipokampem a ústí do stejnojmenného vědeckého periodika. Jako bychom se ocitli na úpatí jedné z mnoha dosud neslezených osmitisícovek pomyslných mozkových velehor. Zjišťujeme, že naše výzbroj je navzdory mohutnému technickému pokroku zatím chabá, ale že naše chuť dobýt vrchol se nezmenšuje.

Na jednom z nedávných mezinárodních psychiatrických kongresů položila otázku širokému plénu posluchačů, vesměs kliniků, Nancy Andreasenová, jedna z klíčových osobností amerického neurovědního výzkumu v oblasti zobrazování mozku u pacientů se schizofrenií. Na závěr svojí přednášky se posluchačů zeptala, zda si z výsledků dlouhých let výzkumu zobrazovacími metodami mozku neodnášejí pocity beznaděje. Co jim výzkum vlastně přinesl? Následovala chvíle rozpačitého mlčení, dokud se nezvedl jeden z jejích bývalých zahraničních spolupracovníků a odpověděl dvěma slovy: „Just a hope“. „Právě že naději“. Sklidil potlesk.

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Novinky v medikamentózní léčbě inkontinence moči u žen

Martan A.

Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN, Praha

SOUHRN

Práce se zabývá problematikou medikamentózní léčby inkontinence moči u žen. Jsou zde krátce zmíněny dva základní typy inkontinence moči, tzn. stresová inkontinence a urgentní typ inkontinence moči či jen urgentní symptomatika. Podrobněji je zde rozebrán podíl uretry v udržení kontinence moči u žen. Důkladně je pojednáno o nových možnostech medikamentózní léčby SUI s detailním rozбором účinků nového preparátu duloxetinu (YENTREVE). V druhé části práce je přehled nejčastěji používaných léků v léčbě urgentní inkontinence moči či jen urgentní symptomatiky s upozorněním na nové léky či nové lékové formy již dříve používaných preparátů. Podrobněji je zde rozebráno působení tolterodinu (DETRUSITOL), oxybutyninu (UROXAL) a solifenacinu (VESICARE).

Klíčová slova: inkontinence moči u žen, medikamentózní léčba.

SUMMARY

Martan A.: News in the Pharmacological Treatment of Female Urinary Incontinence

The article addresses the issue of pharmacological treatment of female urinary incontinence. It summarizes the two types of incontinence, i.e. stress urinary incontinence (SUI) and urgency incontinence, or even just urgency symptoms (overactive bladder – OAB). It focuses on the role of urethra in maintaining continence for women. The article covers new possibilities of pharmacological treatment of SUI with detailed analysis of the effects of a new drug - duloxetine (YENTREVE). In the second part, the article outlines the drugs most frequently used in the treatment of urgency incontinence or just urgency symptoms, mentioning new preparations and new forms of preparations already in use. It analyzes the effects of tolterodine (DETRUSITOL), oxybutinine (UROXAL) and solifenacine (VESICARE).

Key words: female urinary incontinence, pharmacological treatment.

Ma.

Čas. Lék čes., 2006, 145, pp. 549–553.

Inkontinence moči u žen není chorobou ve vlastním slova smyslu, nýbrž příznakem, který má různé příčiny. Dle poslední definice ICS (International Continence Society) je symptom inkontinence moči definován jako stížnost na jakýkoliv vůli neovladatelný únik moči (1). Odhaduje se, že 30–50 % žen udává občasné úniky moči a přibližně u 30 % z nich se jedná o urgentní typ inkontinence.

Stresová inkontinence moči (SUI – stress urinary incontinence) je stav mimovolného úniku moči spojeného s fyzickými aktivitami, jako je běhání, skákání, zvedání předmětů, kýčání a nebo kašláni. U pacientek tento stav způsobuje sociální izolaci, ztrátu sebedůvěry a významné finanční zatížení. Velká část žen se domnívá, že jde o součást procesu stárnutí a spoléhá pouze na to, že tento stav zvládne pomocí absorpčních vložek nebo změnou životosprávy. Léčba je indikována, když inkontinence moči zasáhne do kvality života pacientky a nemůže být zvládnuta časťjším močením nebo snížením fyzické aktivity. Současné možnosti léčby – cvičení svalů pánevního dna s možným použitím různých pomůcek, elektrická stimulace, změna návyků, chirurgická léčba a při selhání užívání vložek – jsou základními možnostmi řešení problémů s SUI. Rozšíření dosavadní medikamentózní léčby pomůže zvýšit úspěšnost léčby u těchto žen. Cílem farmakoterapie SUI je zvýšit intrauretrální uzavírací síly zvýše-

ním tonu hladkých svalů uretry nebo ovlivněním tonu příčně pruhovaných svalů uretry.

URETRA A JEJÍ PODÍL V UDRŽENÍ KONTINENCE MOČI U ŽEN

Na inervaci uretry se podílí jak sympatikus, parasympatikus, tak i somatické nervy. Příčně pruhovaná svalová vlákna uretry spolu se svaly dna pánevního zajišťují kontinenci na úrovni střední uretry ve stresových podmínkách, tzn. při zvýšeném intraabdominálním a intravezikálním tlaku. Hlavní role příčně pruhovaného svalu spočívá tedy v okamžité kontrakci při zvýšení nitroblíšího tlaku. Může být tedy aktivován volně a nebo reflexním mechanismem vyvolaným distenzí močového měchýře. Tento sfinkter je inervován převážně cestou n. pudendalis, který je součástí dvou reflexních oblouků: Jeden je segmentální a zajišťuje trvalý tok motorických impulzů ke svalům, druhý je centrální z motorické oblasti kůry. Motoneurony pudendálních nervů jsou uloženy v párovém Onufově jádře a řídí činnost příčně pruhovaného zevního sfinkteru uretry. Onufovo jádro vykazuje vysokou hustotu výskytu receptorů pro serotonin (5-HT) a noradrenalin (NA). Blokáda zpětného vychytávání 5-HT a NA zvyšuje aktivaci α_1 -adrenergních a 5-HT₂ recepto-

rů a vede ke zvýšení aktivity pudendálních nervů, což vede ke zvýšenému tonu a k silnějšímu stahu příčně pruhovaného sfinkteru uretry (2).

LÉČBA STRESOVÉ INKONTINENCE MOČI

Při léčbě stresového typu inkontinence moči doporučujeme začít nejprve konzervativní metodou léčby. Pokud je tento typ inkontinence moči provázen výrazným sestupem stěn poševních a dělohy či nadměrnou pohyblivostí uretrovezikálního spojení, pak nemůžeme předpokládat dobrý léčebný efekt konzervativní metody a přistupujeme rovnou k operační léčbě. Cílem farmakoterapie SUI je zvýšit intrauretrální uzavírací síly zvýšením tonu hladkých svalů uretry nebo ovlivněním tonusu příčně pruhovaných svalů uretry.

Tricyklická antidepresiva (TCA)

Jsou indikována při depresivních poruchách, ale jejich příznivé účinky byly popsány i u pacientů s močovou inkontinencí. Avšak jediným široce užívaným lékem této skupiny, který je indikován také při enuréze dětí starších pěti let, je imipramin. Imipramin je obvykle předepisován v dávce 50–150 mg za den.

Tricyklická antidepresiva (např. IMIPRAMIN) snižují kontraktilitu močového měchýře a zvyšují výtokový odpor v uretře. Mechanismus tohoto působení není dosud zcela jasný. Jedna z teorií vysvětluje mechanismus působení tricyklických antidepresiv na uretru inhibicí zpětného vstřebávání noradrenalinu a serotoninu v zakončení adrenergních nervů v uretře. To může být příčinou zvýšeného kontrakčního efektu noradrenalinu na hladkou svalovinu uretry. Důvodem, proč nejsou tricyklická antidepresiva široce užívána k léčbě SUI, jsou časté nežádoucí účinky tohoto léku. Jde nejčastěji o třes, posturální hypotenzi, arytmií, únavu a další.

Estrogeny

Effekt působení estrogenů při léčbě SUI je sporný. Řada studií prokazuje subjektivní zlepšení příznaků, ale to může být způsobeno tím, že estrogeny zlepšují celkovou pohodu pacientky. Rozbor objektivního hodnocení efektu estrogenů neprokazuje signifikantní změny. Nicméně estrogeny působí na cévy a vazivovou tkáň stěny močové roury, dále pak zvyšují senzitivitu α -adrenergních receptorů a zvyšují množství epiteliálních buněk v uretře, což může být příčinou částečného ústupu obtíží SUI (3). U postmenopauzálních žen, které trpí opakovanými močovými infekcemi, mají estrogeny preventivní účinek.

NOVÉ MOŽNOSTI MEDIKAMENTÓZNÍ LÉČBY SUI

α_1 -adrenergní agonisté, kterých bylo použito s proměnlivým efektem k léčbě GSI, měly často vedlejší účinky, např. tachykardii a hypertenzi.

Absence spolehlivého farmaceutického přípravku a pokračující světový výzkum na poli medikamentózní léčby SUI přinesl nové terapeutické možnosti. Studie prokázaly, že serotoninergní agonisté celkově potlačují parasymptické aktivity a zvyšují sympatickou a somatickou aktivitu v dolním močovém traktu, podporují plnění močového měchýře. Serotoninergní antagonisté mají opačný efekt (4, 5). Noradrenergní agonisté a antagonisté mají též efekt na sympatickou a somatickou aktivitu v dolním močovém traktu (6, 7). Vliv neurotransmiterů na dolní močový trakt vedl další vývoj léčby GSI k lékům, které inhibují zpětné vstřebávání serotoninu a noradrenalinu ve spinální míše.

Serotonin

Ve studii, která byla prováděna na kočkách, Danuser et al. (4) prokázali, že užívání 5-HT₂ agonisty receptorů 2,5-dimethoxy-4-iodophenylisopropylaminu (DOI) vyvolává jasné zvýšení amplitudy sfinkterového reflexu. Užívání 5-HT₂ antagonisty (LY 53857) může tento efekt zvrátit. To nasvědčuje tomu, že stimulace 5-HT₂ receptorů podporuje sfinkterový reflex a může zlepšit kontinenci (8).

Noradrenergní neurotransmitery

Selektivní α_1 -adrenergní antagonisty je dlouhodobě užíván ke zmenšení obstrukce uretry u mužů s benigní hyperplazií prostaty. Tyto zkušenosti a studie na zvířatech prokázaly, že α_1 -adrenergní antagonisté (jako např. prazosin) mohou snížit amplitudu sfinkterového reflexu, a proto byl vývoj zaměřen na preparát, který by působil jako selektivní adrenergní agonista k podpoře močové kontinence.

INHIBITOR ZPĚTNÉHO VYCHYTÁVÁNÍ SEROTONINU A NORADRENALINU

V současnosti je zaváděn do léčby SUI nový preparát – duloxetin (YENTREVE), který se na rozdíl od periferně působících farmak uplatňuje centrálně jako inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu. Účinnost duloxetinu v léčbě GSI je vysvětlována jeho inhibicí zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu presynaptickými neurony v centrálním nervovém systému (sакrální mícha), čímž dochází ke zvýšení hladin serotoninu a noradrenalinu v synaptické šterbině. Ve studiích na zvířatech vede inhibice zpětného vychytávání 5-HT a NA v centrálním nervovém systému ke zvýšené stimulaci příčně pruhovaného svalstva sfinkteru uretry pudendálními nervy, která se manifestuje osminásobným vzestupem elektromyografické (EMG) svalové aktivity a projevuje se pouze během plnicí fáze mikčního cyklu. Dále pak duloxetin zvyšuje kapacitu močového měchýře. Působení duloxetinu na močový měchýř může být zrušeno neselektivním 5-HT antagonistou (methiothepin) (8). Duloxetin vede u žen ke zvýšení trvalého tonu svěrače a k jeho silnějším kontrakcím v průběhu zadržování moči, což vysvětluje jeho léčebný efekt u žen trpících GSI. Ze studie Thora vyplývá, že NA ani 5-HT nemají přímý efekt na motorické neurony a že napomáhají efektu neurotransmiteru glutamátu, který může přímo aktivovat motorické neurony a uplatňuje se při plnicí fázi močového měchýře. Naopak při naplněném močovém měchýři a vyprazdňování byly motorické neurony inhibovány, což bylo v důsledku nepřítomnosti neurotransmiteru glutamátu, který je pro jejich aktivaci bezpodmínečně nutný. Proto duloxetin, inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu nezpůsobuje retenci moči a poruchy při vyprazdňování močového měchýře. Při chybění glutamátu NA ani 5-HT neovlivní motorické neurony. Nežádoucí účinky a bezpečnost duloxetinu byla hodnocena při podávání 40 mg 2x denně pacientkám se SUI v placebem kontrolované studii. Pokles frekvence výskytu epizod inkontinence byl pozorován již v průběhu prvního měření po 4 týdnech terapie. Po 12měsíční terapii duloxetinem byl efekt léčby hodnocen z pohledu pacientek dotazníkem PGI-I (Patient Global Impression of Improvement – pacientův celkový dojem zlepšení). Ve srovnání se situací před léčbou přibližně 80 % pacientek považovalo svůj stav za zlepšený. Klinický přínos dulotexinu byl pozitivní i u pacientek, u nich předcházely chirurgické zákroky. Duloxetin je po perorálním podávání dobře vstřebáván s dosažením C_{max} za 6 hodin po podání a je široce distribuován do tkání a metabolizován oxidačními a konjugacími enzymy. Po metabolizování jsou jeho metabolity vylučovány především močí. Cirkulující metabolity duloxetinu jsou na podkladě *in vitro* studií považovány za farmakologicky inaktivní.

Biologický poločas eliminace duloxetinu se po perorálním podání pohybuje od 8 do 17 hodin (průměrně 12 hodin). Nežádoucí účinky a bezpečnost duloxetinu byla hodnocena při podávání 40 mg 2x denně pacientkám s SUI v placebem kontrolované studii. Nežádoucími účinky byly nejčastěji nauzea, sucho v ústech, únava, nespavost a zácpa. Analýza údajů ukazuje, že nežádoucí účinky byly nejčastěji uváděny v prvním týdnu léčby. Většinou byly tyto nežádoucí účinky pouze mírné až středně závažné. Nauzea se vyskytla u 23 % pacientek užívajících duloxetin, sucho v ústech u 12 %, ostatní nežádoucí účinky byly méně časté.

LÉČBA URGENTNÍ INKONTINENCE

Léčba tohoto typu inkontinence či jen urgentní symptomatiky (OAB – overactive bladder), které jsou provázeny polakisurií, nykturií a urgentním nucením na močení je převážně konzervativní. Nová medikamentózní léčba má vyšší úspěšnost a nižší procento nežádoucích účinků. Proto řada žen po zvážení, jaké nepříjemnosti jim v každodenním životě přináší únik moči či jen urgentní symptomatika, volí raději řešení tohoto problému a svému lékaři se svými obtížemi svěřit.

PŘEHLED NEJČASTĚJI POUŽÍVANÝCH LÉKŮ V LÉČBĚ URGENCE ČI URGENTNÍ INKONTINENCE MOČI

Anticholinergika se čtyřmocným dusíkem v molekule

Tyto látky se z trávicího ústrojí absorbují nedokonale, membránami pronikají omezeně. Vedle účinků parasymptolytických mají i mírný blokující účinek na N-receptory ve vegetativních gangliích, což útlumem gangliového přenosu zvyšuje spazmolytický účinek zejména v oblasti trávicího ústrojí a močového měchýře.

Trospium (SPASMED, URAPLEX)

Je kvarterní amoniová sloučenina, u které dominuje spasmolytický efekt. Výhodou je, že trospium neproniká do likvoru a nemá účinky na CNS. Jeho biologický poločas se pohybuje mezi 5 až 15 hod., přičemž maximální sérové hladiny je dosaženo za 4–6 hod. Doporučené dávkování je 15–20 mg 2x denně. Má menší množství nežádoucích účinků při srovnání s oxybutyninem.

Nevýhodou a léčebnou limitací většiny látek je nedostatečné selektivní zaměření na močový měchýř, což způsobuje často nepříjemné nežádoucí účinky (sucho v ústech, zácpa, mlhavé vidění atd.). Ty pak mohou nejen znepríjemnit pacientkám léčbu, ale též u některých případů vést k přerušení léčby. Z těchto důvodů se výzkum zaměřil na preparáty se selektivním působením hlavně na receptory M_2 a M_3 . Receptor M_3 hraje hlavní roli při kontrakci močového měchýře a M_2 receptor může hrát roli při kontrakci močového měchýře při některých patologických stavech. Receptorová selektivita je velmi důležitá pro maximální léčebný efekt s minimem nežádoucích účinků léku.

Do této skupiny řadíme Tolterodin (DETRUSITOL, DETROL). Tolterodin vykazuje u žen s urgencí či urgentním typem inkontinence moči cílené, výrazné a dlouhotrvající působení na močový měchýř a jen malé ovlivnění slinných žláz, či jiné nežádoucí účinky léku (9–11). Ovlivnění M_3 receptoru je hlavní při léčbě urgentního typu inkontinence moči, i když ovlivnění M_2 receptoru v močovém měchýři se uplatňuje hlavně u denervovaného hypertrofického močového měchýře. Tolterodin má 8x menší afinitu k muskarinovým receptorům v průšňí žláze než oxybutinin. Kompletně se absorbuje z trávicího ústrojí, poločas setrvání v oběhu je 2–3 hodiny. Je metabolizován v játrech na aktivní metabolit (DDO1), který má obdobné vlastnosti jako tolterodin. Tolterodin v lékové formě

s rychlým uvolňováním (IR – immediate-release) se podává nejčastěji v dávce 2 mg 2x denně. Účinek léčby můžeme zaznamenat za 4 týdny a maximální efekt pak za 5–8 týdnů (12). Řada dvojitě slepých a placebem kontrolovaných studií u žen jak s motorickým (DI), tak sensorickým typem urgentní inkontinence moči prokázala redukcí epizod inkontinence a snížení frekvence mikce (13, 14). Při srovnávacích studiích s oxybutyninem byl hlavně zaznamenán statisticky významně nižší výskyt pocitu suchosti v ústech. Někteří autoři doporučují podávání tolterodinu při špatné snášenlivosti oxybutyninu u dětí (15). Ještě lepší efekt a rychlejší nástup účinku se dosáhl při léčbě tolterodinem s řízeným uvolňováním (ER – extended-release), kdy je účinná látka uvolňována postupně. Výskyt nežádoucího příznaku – suchosti v ústech je u této formy léku nižší.

Tolterodin ER má o 18 % vyšší účinnost než tolterodin IR a patří mezi antimuskarinika s nejlepší tolerabilitou (16).

Darifenacin

Je vysoce selektivní antagonistu M_3 receptoru, který má k tomuto receptoru 5x vyšší afinitu, než k receptoru M_1 . Nejčastějším vedlejším účinkem tohoto preparátu je sucho v ústech a obtíže s obštipací.

Nově je k léčbě urgency a urgentní inkontinence moči doporučeno Solifenacin (VESICARE), který se dobře vstřebává po perorálním užití a je kompetitivním antagonistou cholinergních receptorů M_3 s vyšší selektivitou k močovému měchýři než ke slinným žlázám. Je účinný při léčbě všech symptomů OAB s nižší incidencí sucha v ústech. Studie STAR, která zahrnovala 1355 pacientek a byla prováděna v 17 zemích, prokazuje po léčbě solifenacinem u 74 % pacientek minimálně 50% snížení počtu epizod inkontinence, přičemž téměř 59 % pacientek z celé skupiny bylo plně kontinentních (17). Výjimečně se mohou z nežádoucích účinků vyskytnout dvojitě vidění a obtíže s obštipací. Doporučené dávkování je 5–10 mg 1x denně. Z dalších studií vyplývá, že není nutno upravovat dávku přípravku vzhledem k věku pacientky a že léčba solifenacinem nezpůsobuje retenci moči.

Léky se smíšeným účinkem (spazmolytickým a parasymptolytickým)

K léčbě je užíván oxybutynin (DITROPAN, CYSTRIN, UROXAL) nejčastěji v dávce 5 mg 2x denně. V počátku léčby musíme zhodnotit snášenlivost léku pacientkou, případně výskyt nežádoucích účinků, a tomu pak přizpůsobit dávku. Oxybutynin působí lokálně anesteticky, má přímý myorelaxační účinek a působí jako parasymptolytikum. Vedlejší účinky jsou převážně: suchost v ústech, obtíže s obštipací, poruchy vidění a únava. Podávání IR formy (immediate-release) s okamžitým uvolňováním účinné látky je prvou volbou při léčbě urgentní inkontinence moči u žen. Bohužel tento preparát nepůsobí cíleně na genitourinární trakt, a proto způsobuje systémové reakce, které tvoří nežádoucí účinky. Nežádoucí účinky jsou menší, pokud celková léčebná denní dávka nepřesáhne 5 mg (tzn. 2x2,5 mg). Nová výhodná léková forma ER oxybutyninu (DITROPAN XL) zaručuje 24hodinovou účinnost v jedné denní dávce (1x 5, 10, 15 mg p.o.). Ve srovnání se starší formou oxybutyninu je biologická dostupnost XL formy vyšší a tato forma výrazněji redukuje epizody úniku moči a poněkud snižuje nežádoucí účinky léku. Obdobné výsledky s léčbou urgentní inkontinence moči jsou referovány i při léčbě transdermální formou (TD) oxybutyninu (OXYTROL). Kontrolní studie prokazují, že TD forma oxybutyninu má stejný léčebný účinek jako oxybutynin IR a má menší výskyt nežádoucích účinků léku. Účinnost oxybutyninu je dobře dokumentována, ačkoli často je jeho klinické užití limitováno vedlejšími účinky. Jiné způsoby a formy užívání léku – TD a XL vedou ke snížení jejich výskytu.

Propiverin (MICTONORM, MICTONETTEN)

Je další látka, která působí jako parasymptolytikum a blokátor kalciového kanálu. Doporučené dávkování je 15 mg 2x denně p.o.

Podávání tohoto léku je velmi populární v Německu, Rakousku a Japonsku. Z výsledků dvojité slepých, placebem kontrolovaných studií vyplývá, že tento preparát signifikantně zvyšuje kapacitu močového měchýře. Má však též řadu nežádoucích účinků, které vyplývají z jeho anticholinergního působení. Sucho v ústech se ve studii vyskytovalo u 37 % vyšetřovaných žen, oproti 8 % u skupiny žen užívajících placebo.

Tricyklická antidepresiva

Imipramin (MELIPRAMIN), tricyklické antidepresivum, se podává ve zvyšujících se dávkách. Nejčastěji začínáme dávkou 25 mg na noc a dávkování se zvyšuje do dosažení efektu či výskytu nežádoucích účinků. Nejčastěji se podává 25 mg 2–3x denně. Mohou se též objevit nežádoucí účinky léku, jako jsou například únava, slabost, ortostatická hypotenze, arytmie a další, které vyplývají hlavně z anticholinergního působení. Působí anticholinergně a α -adrenergně, což způsobuje relaxaci močového měchýře a stah uretrálního sfinkteru. Toto kombinované působení se uplatňuje hlavně při léčbě smíšeného typu inkontinence moči.

Další typy léků se užívají zcela minimálně, a proto o nich nebude podrobněji pojednáno (např. blokátory kalciových kanálů, inhibitory syntézy prostaglandinů, antiparkinsonika, β_2 – sympatomimetika). Nově se klinicky zkouší léky ovlivňující draslíkový kanál. Otevření draslíkových kanálů v membráně hladkých svalových buněk močového měchýře způsobuje pohyb K^+ z buňky ven, což vede k hyperpolarizaci, a tím k inhibici dráždivosti hladkého svalů.

Estrogeny – výskyt detruzorové instability u žen se zvyšuje s věkem, a je proto častý u postmenopauzálních žen. Estrogenní receptory byly prokázány hlavně v oblasti uretry a v trigonu močového měchýře. Estrogeny mimo zlepšení trofiky zvyšují i senzitivitu α -receptorů v uretře, což vysvětluje, proč léčba estrogeny může být úspěšná i u stresového typu inkontinence, i když řada studií neprokazuje změny urodynamických parametrů. Na úspěchu léčby senzorkého typu urgentní inkontinence se podílí mimo jiné i snížení prahu dráždivosti receptorů ve stěně močového měchýře. Estrogeny mohou zmírnit příznaky polakisurie, nykturie, urgencye a dysurie a podle některých autorů též snižují rozvoj infekce močových cest po menopauze. Proto je u žen po menopauze vhodné zvážit také lokální či celkovou hormonální léčbu, po které mohou příznaky urgencye ustoupit.

ZÁVĚR

Základním požadavkem pro správnou volbu medikamentózní léčby inkontinence moči u žen je správné určení typu inkontinence, tzn. rozlišení stresové a urgentní. Pokud je diagnostika špatná, pak je i medikamentózní léčba bez efektu a může stav pacientky ještě zhoršit. Při nasazení medikamentózní léčby jak u stresového, tak i urgentního typu inkontinence moči je nutné začít s menší dávkou a tu eventuálně postupně zvyšovat k dosažení léčebného efektu za pozorného sledování nežádoucích účinků léčby. Pokud se tyto objeví, je nutno zhodnotit, o jaký druh a stupeň problémů jde a zda je nutno léčbu ihned přerušit, či je možno po snížení dávky preparátu v léčbě pokračovat. Pokud je léčba bez efektu, či se objeví výrazné nežádoucí účinky léku, které pacientce komplikují běžný život, pak je nutné změnit přípravek a opět vyhodnotit jeho léčebný efekt a nežádoucí účinky. Pro pacientky musí být medikamentózní léčba přínosem a musí zaznamenat významné změny při hodnocení svých problémů. Za účinnou je považována léčba u stresového typu inkontinence moči tehdy, když pacientka zaznamená po 3měsíční léčbě za stálého užívání přípravku v posledním týdnu před kontrolou pokles frekvence epizod mimovolního úniku moči pod 50 %.

U urgentního typu inkontinence moči se nedostatečným působením rozumí pokles frekvence počtu epizod inkontinence moči – eventuálně počtu urgencí o méně než 50 % a počtu mikcí o méně než 20 %. Po 3 měsících je stav pacientek a účinnost léčby vyhodnocena a v léčbě je pokračováno pouze při prokázání efektu.

Důležité je i hodnocení efektu léčby ve vztahu k její finanční náročnosti, jak z prostředků veřejného zdravotního pojištění, tak i ve vztahu k výši doplatku pro pacientky. Proto je doporučeno začít s léky, které mají dobrý léčebný efekt, ale finanční náročnost léčby je malá. Pokud se objeví v průběhu léčby, že efekt přípravku je nedostatečný, či že léčba způsobuje nežádoucí účinky, které pacientku buď výrazně zatěžují, či zdravotně ohrožují, pak je nutno přejít na léky další skupiny, které jsou již finančně náročnější.

Zkratky

DOI	– dimethoxyiodophenylisopropylamin
EMG	– elektromyografie
ER	– extended-release
ICS	– International Continence Society
IR	– immediate-release
NA	– noradrenalin
OAB	– overactive bladder
5-HT	– serotonin
PGI-I	– Patient Global Impression of Improvement
SUI	– stresová inkontinence moči (stress urinary incontinence)
TCA	– tricyklická antidepresiva
TD	– transdermální
XL	– extended release

LITERATURA

1. **Abrams, P., Cardovo, L., Fall, M. et al.:** The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol. Urodyn.*, 2002, 21, s. 167-178.
2. **Thor, K. B.:** Serotonin and norepinephrine involvement in efferent pathways to the urethral rhabdosphincter: implications for treating stress urinary incontinence. *Urology*, 2003, 62 (Suppl. 4A), s. 3-9.
3. **Wein, A. J.:** Oral and intravaginal estrogens alone and in combination with alpha adrenergic stimulation in genuine stress incontinence. *J. Urol.*, 1991, 146, s. 1670-1671.
4. **Danuser, H., Thor, K. B.:** Spinal 5-HT₂ receptor-mediated facilitation of pudendal nerve reflex in the anaesthetized cat. *Br. J. Pharmacol.*, 1996, 118, s. 150-154.
5. **Thor, K. B., Hisamitsu, T., de Groat, W. C.:** Unmasking of a neonatal somatovesical reflux in adult cats by the serotonin autoreceptor agonist 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 1990, 54, s. 35-42.
6. **Gajewski, J., Downie, J. W., Awad, S. A.:** Experimental evidence for a central nervous system site of action in the effect of alpha-adrenergic blockers on the external urinary sphincter. *J. Urol.*, 1984, 132, s. 403-409.
7. **Pederson, E., Topping, J., Klemar, B.:** Effect of the alpha-adrenergic blocking agent thymoxamine on the neurogenic bladder and urethra. *Acta Neurol. Scand.*, 1980, 61, s. 107-114.
8. **Thor, K. B., Katofiasc, M. A.:** Effects of duloxetine, a combined serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor, on central neural control of lower urinary tract function in the chloralose anesthetized female cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995, 274, s. 1014-1024.
9. **Nilvebrant, L., Hallen, B., Larson, G. et al.:** Tolterodine – a new bladder selective muscarinic receptor antagonist: preclinical pharmacological and clinical data. *Life Sci.*, 1997, 60, s. 1129-1136.
10. **Nilvebrant, L., Sundquist, S., Gillberg, P. G.:** Interaction of tolterodine with cholinergic muscarinic receptors in human detrusor. *Neurourol. Urodyn.*, 1996, 15, s. 310-311.
11. **Nilvebrant, L., Anderson, K., Gillberg, P. G. et al.:** Tolterodine – a new bladder selective muscarinic receptor antagonist: preclinical pharmacological and clinical data. *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, 327, s. 195-207.

12. **Jonas, U., Hofner, K., Madesbacher, H., Holmdahl, T. H.:** Efficacy and safety of two doses of tolterodine versus placebo in patients with detrusor overactivity and symptoms of frequency, urge incontinence, and urgency: urodynamic evaluation. *World. J. Urol.*, 1997, 15, s. 144-151.
13. **Abrams, P., Freeman, R., Anderstrom, C., Mattiasson, A.:** Tolterodine, a new antimuscarinic agent: as effective but better tolerated than oxybutinin in patients with an overactive bladder. *Br. J. Urol.*, 1998, 81, s. 801-810.
14. **Millard, R., Tuttle, J., Moore, K. et al.:** Clinical efficacy and safety of tolterodine compared to placebo in detrusor overactivity. *J. Urol.*, 1999, 161, s. 1551-1555.
15. **Bolduc, S., Upadhyay, J., Payton, J. et al.:** The use of tolterodine in children after oxybutynin failure. *BJU International*, 2003, 91, s. 398-401.
16. **Chapple, Ch., Khullar, V., Gabriel, Z., et al.:** The Effects of Antimuscarinic Treatments in Overactive Bladder: A Systematic review and Meta-Analysis. *European Urology*, 2005, 48, s. 5-26.
17. **Haab, F., Cardozo, L., Chapple, C. et al.:** Long-term Open-Label Solifenacin Treatment Associated with Persistence with therapy in Patients with Overactive Bladder Syndrome. *Eur. Urol.*, 2005, 47, s. 376-384.

Wegenerova granulomatóza a relaps choroby

Wegenerova granulomatóza (WG) je typ primární systémové vaskulitidy. Postižení ledvin je histologicky identické s mikroskopickou polyangiitidou. WG ovšem postihuje řadu dalších orgánů jako dýchací cesty, kůže, klouby, oči. Na rozdíl od mikroskopické polyangiitidy jsou léze u WG většinou granulomatózní. Vaskulitida a granulomy se mohou vyskytovat v téže lézi, ale často odděleně. Iniciální granulomatózní forma může přetrvávat po desetiletí, přičemž někdy napodobuje revmatoidní artritidu, nežli se manifestuje jako systémová forma WG. Systémová WG je závažné onemocnění provázené vysokou mortalitou. Před nástupem imunoterapie délka přežití byla asi 2 roky. Klinické zkušenosti s cyklofosfamidem prokázaly významnou efektivitu, i když krátkodobou. Procento remise činí asi 90 %. Remise neznamená ovšem vyléčení, neboť udržet remisi je obtížné. Metotrexat může prodloužit kontrolu onemocnění, ale po brzkém

vysazení léku následuje rychlý relaps. Blokáda TNF alfa je účinná hlavně u granulomatózních forem, ale může upravit i dysfunkci endotelu navozenou právě TNF alfa.

Bohužel Stone et al. ve stejném čísle časopisu prokázal, že dlouhodobá blokáda TNF alfa (např. etanercept) není schopna prodloužit trvání remise v porovnání se standardní léčbou kortikoidy a cyklofosfamidem. Relaps je tedy primárním klinickým problémem. Může se objevit již po 18 měsících léčby a během 5 let sledování je relapsem postiženo asi 50 % nemocných. Procento relapsu u WG je vyšší nežli u systémové vaskulitidy. Nelze vyloučit, že určitou příčinou relapsů u WG je perzistence granulomů. Bude tedy důležité rozpoznat patogenezi granulomatózní komponenty u WG.

Výzkum se zaměřuje například na antineutrofilní cytoplazmatické protilátky (ANCA). V poslední době se dostávají do pozornosti i T lymfocyty. Vzhledem k tomu, že jsou často postižené dýchací cesty, uvažuje se o někte-

řích vdechovaných anorganických látkách, jako je oxid křemičitý nebo hydrokarbony, jako o vyvolávajících faktorech. Roli může hrát i intekurentní infekce. Infekce může spustit novou aktivitu u dříve stabilní, ale chronické, prachem indukované léze. Ukazuje se, že v granulomech a u vaskulitidy se objevují odlišné subtypy T lymfocytů. Výzvou je i identifikace procesů, které způsobují perzistenci granulomů a které vyvolávají přechod lokalizované formy onemocnění v systémové onemocnění. Rozpoznání těchto procesů by mohlo vést k identifikaci nových cílů pro léčbu, která by byla tak efektivní v udržení dlouhodobé remise tak, jak jsou dnešní léky efektivní v dosažení v indukci remise.

Literatura:

Bacon, P. A.: The Spectrum of Wegener's Granulomatosis and Disease Relapse. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352, s. 330-332.

O. Louthan

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Gynekologie dětí a dospívajících v České republice

Hořejší J.

Klinika gynekologie dětí a dospívajících 2. LF UK a FNM, Praha

SOUHRN

Dětská gynekologie je jedním z podoborů gynekologie a porodnictví, kompletizující péči o ženu. Její zakladatel Rudolf Peter jí určil za základní náplň prevenci poruch ženské plodnosti. Významné momenty odlišností představuje chybění estrogenů a absence pohlavního života. Nejčastější onemocnění a poruchy jsou: výtok (vulvovaginitis), krvácení v neestrogenizovaném období, nástup a poruchy menstruačního cyklu, synechie vulvy, vrožené vývojové vady, poruchy pohlavního dospívání a nádory. Dětská gynekologie je samostatnou odborností v rámci vztahů s pojišťovny, je samostatným atestačním oborem a má i svou mezinárodní odbornou zkoušku IFEPAG. Dětská gynekologové jsou organizováni v Sekci gynekologie dětí a dospívajících ČGPC ČLS JEP mezinárodně ve federaci FIGIJ, tyto organizace pořádají české i mezinárodní vědecké konference.

Klíčová slova: gynekologie dětí a dospívajících, vrožené vývojové vady, poruchy puberty, nádory rodidel, atestace z dětské gynekologie, IFEPAG.

SUMMARY

Hořejší J.: Paediatric and Adolescence Gynaecology in Czech Republic

Pediatric gynecology is a subdivision of gynecology and obstetrics and completes its care of women. The founder of the subject, Rudolf Peter, considered its essential role in the prevention of woman infertility. Important difference represents the lack of estrogens and the absence of sexual life. The most frequent diseases of this age are vaginal discharge (vulvovaginitis), bleeding during non-estrogenized period, onset and disturbances of menstrual cycle, labial adhesions, congenital malformations, disorders of pubertal development and tumors. Pediatric gynecology is an independent specialization in the respect to Insurance companies, it is an independent professional specialization (attestation) and it has its own international exam IFEPAG. Pediatric gynecologists are organized in the Czech Society of Pediatric and Adolescent Gynecology ČLS JEP and internationally in FIGIJ federation. Both organizations organizes Czech and international scientific congresses.

Key words: pediatric and adolescent gynecology, congenital malformations, pubertal disorders, genital tumors, specialization in pediatric gynecology, IFEPAG.

Po.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 554–556.

Dětská gynekologie je součástí oboru gynekologie a porodnictví, která kompletizuje gynekologickou péči na celý ženský věk. Svým charakterem je to disciplína především preventivní s cílem prevence poruch ženské plodnosti. Vždyť jenom rodidla správně anatomicky vyvinutá a s neporušenou funkcí jsou předpokladem toho, aby žena mohla otěhotnět, donosit a porodit zdravé dítě. To měl na mysli profesor Rudolf Peter (1900–1966), když 12. září 1940 otevřel první samostatnou ambulanci pro dětskou gynekologii v České dětské nemocnici na Karlově. První nejen v Čechách, ale první na světě! To je uznáváno na celém světě a ve všech monografiích i na mezinárodních kongresech dětské gynekologie je to vždy připomínáno. Peter a jeho spolupracovník Karel Veselý napsali první (opět první na světě) monografii dětské gynekologie. Vyšla německy v roce 1966. Díky této knížce i díky postgraduální výuce dětské gynekologie pro lékaře z celé Evropy se vžil pojem „Prager Schule der Kindergynäkologie“.

Dětskou gynekologii by rozhodně neměl praktikovat kterýkoli gynekolog, aniž by se pro to vzdělal a vycvičil, protože není jen mechanickou aplikací gynekologie na dětský věk. Naopak ale by se s ní měl každý gynekolog v základních rysech seznámit, aby v situaci, kdy bude postaven před gynekologický problém, nedělal hrubé chyby, jak se s tím bohužel občas setkáváme. Také dětské lékaři musí

být a zpravidla jsou rámcově obeznámeni s problematikou dětské gynekologie, protože i pro tuto oblast představují linii prvního kontaktu.

ZÁNĚTY RODIDEL

Největší podíl náplně dětské gynekologie jsou záněty rodidel a poruchy menstruačního cyklu. Hlavní odlišnosti mezi dětskou a dospělou gynekologickou pacientkou jsou dvě:

1. V dětském věku chybí estrogenizace organismu, což se projevuje nejen na anatomii a funkci rodidel, ale ovlivňuje to i patologické procesy a do jisté míry i způsob léčby (typicky např. u vulvovaginitid).

2. Patologie zánětů je jiná u dětí a virginálních pacientek proti ženám a dívkám, které již pohlavní život zahájily.

V důsledku chybění estrogenů jsou dětská rodidla vnímavější pro bakteriální nákazu, proto jsou vulvovaginitidy v dětském věku běžné, kdežto výtoky, které se nejčastěji vyskytují u žen dospělých (mykózy, trichomoníáza), jsou u dětí vzácnosti. Častý původce výtoků u dospělých žen, tj. chlamydie, jsou u dětí tak vzácné, že jejich výskyt je někdy považován za důkaz předčasného pohlavního života či pohlavního zneužívání.

Také cesty přenosu infekce do rodidel jsou odlišné: U dětí jsou to především hygienické prohřešky, často hrají roli i střevní paraziti – roupi, nezřídka si děvčátka zavádějí do rodidel i cizí tělesa. U dívek, které již zahájily vita sexualis, jde pak převážně o přenos pohlavním stykem. To vše musí mít gynekolog na paměti při diagnostice dětských výtoků. Častou chybou je celkové podávání antibiotik k léčbě vulvovaginitidy, i když u dospělé ženy by to nikdo jako primární léčbu neužil. I u dětí musí být léčba především vždy vaginální. Ta se ovšem také liší. Dospělá žena si zavádí medikamentózní čípky či globule do pochvy sama, u dětí by to měl provádět zacvičený personál (lékař či sestra). Méně vhodné je, aby medikamentózní léčbu prováděla matka dítěte. Každé léčbě by mělo ovšem předcházet vyšetření erudovaným dětským gynekologem: Viděli jsme mnohokrát dítě, léčené 3 i více sériemi celkově podávaných antibiotik, aniž by bylo diagnostikováno a odstraněno cizí těleso z pochvy!

Zánět vnitřních rodidel čili adnexitis je u dospělé ženy dramatickým onemocněním. U dospívajících dívek vzniká nejčastěji v souvislosti se zánětem apendixu. Probíhá obvykle mírněji a hlavně, nikdo na ni nemyslí, takže se dívky dostávají do odborné péče často až při chronickém zánětu, který se léčí těžko a který může zanechat pozánětlivé změny vedoucí k primární sterilitě. Proto nesmíme bagatelizovat bolesti v podbřišku, mírně zvýšenou sedimentaci a subfebrilie jako možné známky probíhající adnexitis. Mělo by být pravidlem, aby u každé dospívající dívky s bolestmi v podbřišku a u každé dívky po apendektomii bylo provedeno také gynekologické vyšetření. V době asistované reprodukce není sice hrozba neplodnosti tak osudově fatální jako dříve, přesto však by prevence zánětu vnitřních rodidel neměla být opomíjena.

KRVÁCENÍ Z RODIDEL

Krvácení z rodidel může být fyziologické (v důsledku estrogenizace) a patologické. Patologické krvácení z rodidel může být způsobeno zánětem, traumatem, cizím tělesem v pochvě, ale může být také příznakem předčasného dospívání či dokonce známkou maligního nádoru dětské pochvy. Proto je každé zakrvácení z rodidel v neestrogenizovaném období jednoznačnou indikací gynekologického vyšetření s vaginoskopií, tj. endoskopickým vyšetřením, které lze provést přirozeným otvorem v neporušením hymenu.

MENSTRUAČNÍ CYKLUS A JEHO PORUCHY

Fyziologické krvácení či menstruace nastupuje v průměrném stáří 12 a půl roku. První cykly bývají pravidlem anovulační, jde tedy vlastně o pseudomenstruaci a ta může být a bývá ve svých intervalech nepravidelná, obvykle nevyžadující léčbu. Co však nesmíme připustit je, aby dívka krvácela z rodidel příliš silně, příliš dlouho a příliš často. Pak hovoříme o dysfunkčním děložním krvácení čili juvenilní metroragii. Zde je již potřeba zavést šetrnou léčbu hormonální; jen zřídka a vlastně jen z vitální indikace musíme provést i kyretáž. I když nepravidelnosti v prvních dvou letech po menarché jsou běžné a téměř fyziologické, měla by si dívka od počátku vést menstruační kalendář, jehož rozbořením lze přispět k diagnóze typu poruch, což napomáhá správné léčbě. Pokud trpí dívka nepravidelnostmi typu oligomenorey nebo silnějším krvácením (při anovulaci je to běžné!), je často nutná substituce chybějícího hormonu žlutého tělíska cyklickým podáváním preparátu progesteronu. Podobného úspěchu lze dosáhnout i podáním některého preparátu kombinovaného hormonální antikoncepce: Pro lékaře a mnohdy i pro pacientku je to pohodlné, ale není to správný postup, neboť pacientce, která je obvykle hyperestrinní, antikoncepci ještě hladinu estrogenů zvyšujeme. Léčebný efekt kombino-

vané hormonální antikoncepce je ovšem příznivým „vedlejším“ efektem tam, kde si dívka antikoncepci žádá. Termín „primární amenorea“ znamená, že dívka do stáří 15 let nezačala spontánně menstruat. Může to mít řadu příčin a může se to negativně projevit na mineralizaci kostry. Proto by příčiny primární amenorey měly být vyšetřením určeny a dle toho léčeny. Pro první klasifikaci primární amenorey doporučujeme orientovat se podle stavu rozvoje sekundárních pohlavních znaků: Pokud nemenstruuje dívka s dobře a žensky vyvinutými druhotnými pohlavními znaky, pak uvažujeme o vrozené vývojové vadě rodidel (derivátů Müllerových vývodů). Při retardaci rozvoje sekundárních znaků zahájíme endokrinní vyšetření. Prvním krokem je stanovení gonadotropinů: Poruchy hypogonadotropní svědčí pro poruchu centrální, tedy v systému hypothalamus-hypofýza, kdežto hypergonadotropní stav je typický pro poruchy gonád a na místě je stanovení karyotypu a vyšetření ovarii laparoskopií často s biotickým vyšetřením. Při rozvoji druhotných znaků se známkami virilizace pátráme po zdroji hyperandrogenismu (ovariálním či nadledvinovým), který může být rovněž příčinou primární amenorey.

V adolescenci se může na poruchách cyklu podílet kromě zmíněného hyperandrogenního stavu (např. při syndromu polycystických ovarii – PCO) také mentální anorexie (s oligomenoreou až těžkou sekundární amenoreou). V poslední době je studována i možnost autoimunního poškození ovarii protilátkami proti jaderným strukturám (zona pellucida a ooplazma – obvykle u primárních poruch) nebo proti steroidprodukcujícím strukturám (granulózovým, thekálním a luteinním buňkám). Tyto změny, nejsou-li včas diagnostikovány a léčebně podchyceny, mohou vést až k předčasnému ovariálnímu vyhasnutí (POF).

VROZENÉ VÝVOJOVÉ VADY

V dětském věku a v dospívání se také prezentují některé vrozené vývojové vady, které musí být, i když obvykle ne okamžitě po jejich zjištění, operačně řešeny. Nejčastější z nich jsou poruchy průchodnosti rodidel čili gynatrémie. Rozlišujeme 3 základní typy: hymennální atrézie s tvorbou haematocolpos, partiální aplazii pochvy s haematocolpos partialis a úplnou aplazii pochvy s izolovanou hematometrou. Každá z těchto malformací se operačně léčí jinak – pro správnou volbu druhu výkonu je nutná správná diferenciální diagnóza poruchy, kterou lze stanovit až po menarché pomocí vznikající retence. Proto se tyto vady řeší zásadně až při vzniklé retenci a pouštět se do jejich operační korekce dříve – na začátku puberty – by bylo hrubou chybou, která by mohla vést ke zcela nesprávné operační léčbě k neprospěchu pacientky.

Při aplazii dělohy a pochvy (sy. Rokitanský – Küster) je nutné vytvořit chybějící pochvu buď dilatační metodou, nebo neoplastickou pochvy. Tato léčba se provádí zásadně až v psychosexuální dospělosti, když pacientka sama touží po pohlavním životě a je reálný předpoklad, že ho bude brzy po korekci mít. Bez této „fyziologické dilatace“ nemá žádný způsob korekce trvalý efekt.

SYNECHIA VULVAE

Častým stavem, se kterým se setkáváme u holčiček v batolecím věku, je synechia vulvae infantum (nesprávně srůst malých stydkých pysků). Vzniká na podkladě neestrogenizovaného terénu při nedostatečné či nesprávné toaletě rodidel, tedy stav obvykle zavíní maminka sama. Jsou-li rodidla denně při mytí „rozhrnuta“ a vyčištěna od smegmatu či výtoku, neslepí se a nesrostou. V opačném případě se může poměrně rychle vytvořit i pevný kožovitý srůst, který je pak nutno přerušit termokauterizací nebo laserem v celkové anestezii.

NÁDORY RODIDEL

Nádory rodidel u dětí a dospívajících jsou výrazně odlišné od nádorů rodidel dospělých žen. Jejich diagnostika (zejména histologická, ale i zobrazovacími metodami a laboratorní) je velmi komplikovaná a vyžaduje centralizaci do zařízení, kde je i oddělení dětské onkologie.

ZÁVĚR

Ze stručného výčtu hlavní náplně oboru dětské gynekologie doufám vplynulo, že mezi fyziologií, patologií i léčbou onemocnění pohlavních orgánů dětí, dospívajících dívek a dospělých žen jsou výrazné rozdíly. To opodstatňuje nutnost erudice v tomto pod-oboru gynekologie a porodnictví. Dalším důležitým požadavkem je i to, aby lékař, který pečuje o gynekologické zdraví dětí a dospívajících dívek, byl schopen k těmto pacientkám vhodně přistupovat, uměl s nimi komunikovat, měl porozumění pro specifika jejich věku (zejména s adolescentními pacientkami je to často velmi obtížné!) a dovedl si získat jejich důvěru. To ovšem není automaticky dáno každému gynekologovi. Proto v naší republice v roce 1983 vznikla nástavbová atestace z dětské gynekologie. Vzdělávání i atestační zkoušky z dětské gynekologie zajišťuje Subkatedra dětské gynekologie Institutu postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví. Do června 2005 nástavbovou atestací z dětské gynekologie získalo 59 lékařů. Podle zákona 95/2004 Sb. je nyní dětská gynekologie samostatnou základní atestací. Nevím, jak to vzniklo, ale všichni cítíme, že je to nesmysl: Dětskou gynekologií se musí zabývat zkušený gynekolog. Proto také nový vzdělávací program byl stanoven tak, aby součástí specializační přípravy bylo absolvování vzdělávacího programu v gynekologii a porodnictví s nutným dalším tréninkem v gynekologii dětí a dospívajících. Tuto novou atestaci složilo letos prvních 8 lékařů, ale je o ní zájem; do specializačního vzdělávání v dětské gynekologii je zapsáno dalších 43 lékařů.

Lékaři, kteří se o dětskou gynekologii zajímají a praktikují ji, se sdružují v Sekci gynekologie dětí a dospívajících České gynekologické a porodnické společnosti – ta má v současnosti 228 členů. Sekce pořádá pravidelně odborné konference, v roce 2005 se konala již XXXVI. konference.

Od roku 1998 existuje mezinárodní vzdělávací program IFEPAG (International Fellowship of Pediatric and Adolescent Gynecology), který organizuje vzdělávání v dětské gynekologii, pro něž je naše pracoviště akreditováno. Součástí programu jsou i mezinárodní kvalifikační zkoušky IFEPAG, které složilo již 7 českých lékařů, tři z nich byli v jednotlivých letech vyhodnoceni jako nejlepší! Je tedy zřejmé, že česká dětská gynekologie je stále na výši a dobře naplňuje Peterův odkaz a rozvíjí termín „Prager Schule der Kinderynäkologie“. Jako výraz toho nám v roce 2000 (tedy v jubilejním roce dětské gynekologie!) bylo svěřeno uspořádání VIII. evropského kongresu gynekologie dětí a dospívajících v Praze. Zúčastnilo se ho 525 lékařů z domova i ze zahraničí. Přesto, že šlo o kongres „jen“ evropský, zúčastnili se ho lékaři ze 38 států 4 kontinentů!

Zkratky

IFEPAG	– International Fellowship of Pediatric and Adolescent Gynecology
PCO	– polycystická ovaria
POF	– předčasné ovariální vyhasnutí

LITERATURA

1. **Hořejší, J.:** Dětská gynekologie. Praha, Avicenum, 1990, 284 s.
2. **Hořejší, J. (ed.):** Vybrané kapitoly z gynekologie dětí a dospívajících. Moderní gynekologie a porodnictví 10/4. Praha, Levret, 2001, s. 392-475.
3. **Hořejší, J.:** Gynekologické problémy u děvčátek a dospívajících dívek. Grada, Praha 2003, 129.
4. **Hořejší, J.:** Gynekologie dětí a dospívajících. Postgraduální medicína, 2004, 6, s. 630-635.
5. **Hořejší, J.:** Spolupráce dětské gynekologie a pediatrie v prevenci. Lékařské Listy, 2005.
6. **Hrodek, O., Vavřínek, J. (eds.):** Pediatrie v praxi. Galén, Praha, 2002, 767 s.
7. **Mlčochová, H., Hořejší, J., Martínek, J. et al.:** Treatment of autoimmune ovarian damage in adolescent girls. Neuroendocrinological Letters, 2005, 26, s. 131-135.
8. **Peter, R., Veselý, K.:** Kinderynäkologie. Leipzig, Georg Thieme, 1966, 216 s.
9. **Smetanová, D., Mlčochová, H., Hořejší, J.:** Léčba dysfunkčního krvácení a prevence jeho recidiv u dospívajících dívek. Gynekolog, 2004, 13, s. 262-263.

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

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Autozomálně recesivní etnické choroby českých Romů

Seeman P., ¹Šišková D.*Klinika dětské neurologie, DNA laboratoř 2. LF UK a FNM, Praha*¹*Klinika dětské neurologie FTN a IPVZ, Praha*

SOUHRN

Romové tvoří geneticky izolovanou etnickou skupinu stejného původu s odhadovaným celosvětovým počtem 10–14 milionů osob, vzešlou z omezeného počtu tzv. zakladatelů. Většina (asi 8 milionů) příslušníků romského etnika žije v Evropě, zejména na Balkáně a jihovýchodě Evropy. U Romů se vyskytují specifické dědičné choroby, způsobené stejnou recesivní genetickou poruchou. V posledních letech byl molekulárně geneticky objasněn a potvrzen podklad některých chorob v romské populaci. Vzhledem k významnému podílu romského etnika v naší populaci je možné se s romskými pacienty postiženými těmito chorobami setkat i v České republice. Diagnostika těchto chorob však dělá nezdědka problémy a tyto choroby proto bývají poddiagnostikovány či nesprávně diagnostikovány. Uvádíme příklady autozomálně recesivních chorob potvrditelných i na DNA úrovni, vyskytujících se u Romů v České republice: syndrom kongenitální katarakty, faciální dysmorfismus a demyelinizační neuropatie, nesyndromové prelingvální hluchota s poruchou GJB2 genu a kongenitální myastenický syndrom.

Klíčová slova: syndrom kongenitální katarakty, faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie; kongenitální myastenický syndrom, nesyndromová prelingvální hluchota v důsledku poruchy GJB2 genu, founder, Romové, gypsy.

SUMMARY

Seeman P., Šišková D.: Autosomal Recessive Ethnic Diseases of Czech Roma

Roma (Gypsy ethnic) form a genetically isolated ethnical group of the identical origin with the world population of 10 to 14 millions derived from a limited number of so-called founders. Majority (about 8 millions) of Roma ethnic live in Europe, namely at Balkan and in the southwest of Europe. Roma have specific hereditary diseases, namely those caused by recessive genetic mutations. The molecular-genetic mechanism has been recently elucidated and confirmed in several diseases of the Roma population. Owing to the significant proportion of Roma in the population, patients with those diseases are possible to meet also in the Czech Republic. However, the diagnostics of those diseases is frequently difficult and they are often under diagnosed or misdiagnosed. The article gives examples of autosomal recessive diseases, which can be confirmed at the DNA level which occur in Roma population of the Czech Republic: syndrome of congenital cataract, facial dysmorphism and demyelinating neuropathy, non-syndromic prelingual deafness with GJB2 gene impairment and the congenital myastenic syndrome.

Key words: syndrome of congenital cataract, facial dysmorphism and demyelinating neuropathy, congenital myastenic syndrome, non-syndromic pre-lingual deafness due to GJB2 gene impairment, founder, Roma, Gypsy. Po.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 557–560.

Romové jsou etnickou skupinou o odhadovaném počtu 10–14 milionů osob. Romové představují geograficky rozptýlenou, nicméně geneticky izolovanou populaci vzešlou z omezeného počtu jedinců, tzv. zakladatelů. Většina Romů žije v Evropě, a to zejména v zemích Balkánu a v jihovýchodní Evropě. Na rozdíl od jiných populací, kde existuje systematická dokumentace a rozsáhlé genealogické záznamy, je romské etnikum charakteristické chyběním spolehlivých písemných záznamů a kočovným způsobem život. Jeho původ se obecně předpokládá v Indii. Antropologie, lingvistika i historické záznamy z většinových populací předpokládají, že Romové opustili Indii někdy mezi 5. a 10. stoletím našeho letopočtu. V 11. a 12. století se dostali do byzantské oblasti, odkud se dále šířili do Evropy z jihovýchodu (1–3). Část Romů, která se usadila trvale na Balkáně – jižně od Dunaje, je označována jako balkánští Romové a část, která pokračovala v migraci severně od Dunaje, je označována jako vlašští (olašští) Romové (t.č. Rumunsko). Další část pokračovala v migraci a osídlování dále po Evropě a dostala se tak i na Slovensko a na naše území. Většina původních romských obyvatel Čech

byla vyhlazena během 2. světové války a současní Romové jsou většinou potomci migrantů ze Slovenska a Bulharska (4).

V různých skupinách Romů, žijících na různých místech Evropy, charakterizovaných sociálními a lingvistickými odlišnostmi byly v posledních letech popsány specifické – unikátní monogenní recesivní choroby, způsobené v každé ze skupin stejnou mutací stejného genu na podkladě tzv. efektu zakladatele (founder efekt) hereditární motoricko-senzitivní neuropatie typ Lom v Bulharsku (HMSN-L) (MIM 601455) (5), kongenitální myastenický syndrom (CMS) (MIM 608931) (6), syndrom kongenitální katarakty faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie (CCFDN) (MIM 604168) (7), LGMD2C (8) kongenitální glaukom na Slovensku (9).

Některé tyto choroby jsou silně regionálně vázané a jejich výskyt jinde je velmi vzácný. Řada dědičných chorob u Romů je však zapříčiněna poruchou, která je způsobena starou mutací, vyskytující se i v Indii, a proto s těmito chorobami mohou být konfrontováni lékaři ve všech zemích, kde žijí Romové, tedy významnou měrou i v České republice.



Obr. 1. Příklady typické obličejové dysmorfie u pacientů s molekulárně geneticky potvrzeným syndromem CCFDN

Obličej je nenápadný v útlém dětství a dysmorfie je typická až v dorostovém věku. Typická je mírná ptóza víček, prominující rty, malá brada a mírně prominující přední zuby.



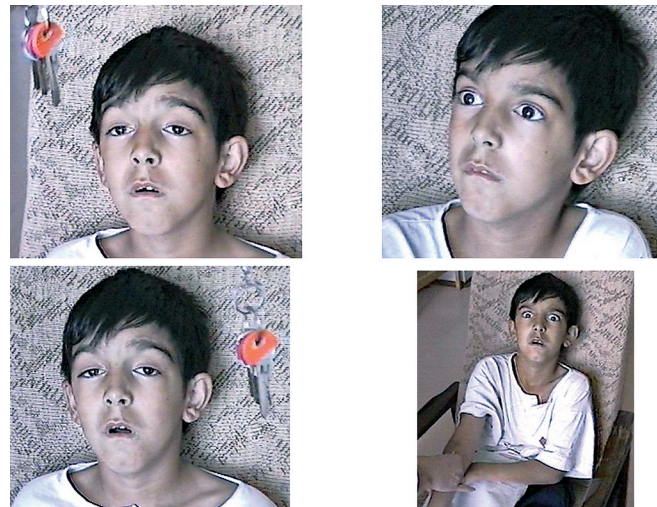
Obr. 2. Těžká skolióza, těžké deformity nohou i rukou v důsledku periferní neuropatie u 17letého, těžce postiženého pacienta s CCFDN

Některé klinické jednotky s typickým výskytem buď výhradně, nebo i častěji u Romů byly popsány teprve v posledních letech (např. CCFDN). Objevy molekulárních příčin řady těchto chorob a příčinných mutací, které jsou u Romů většinou identické, u postižených v homozygotním stavu ukazují na společný, zakladatelský původ jejich vzniku.

Některé jednotky jsou pravděpodobně poměrně časté v romské populaci, ale podle našich dosavadních zkušeností jsou mezi českými lékaři málo známé, což nezřídka vedlo a vede k nesprávným či nejasným diagnózám u řady postižených s příznaky některých dědičných poruch typických pro romské etnikum. To vedlo k napsání tohoto přehledného článku, který popisuje klinické příznaky, cílenou diagnostiku pomocnými vyšetřeními a molekulární příčinu několika autozomálně recesivních chorob, se kterými jsme se opakovaně setkali na našich pracovištích. Domníváme se, že s těmito poruchami se lze nezřídka setkat u českých pacientů romského etnika. Tyto dědičné poruchy podle našich vědomostí nebyly v české literatuře v posledních letech a možná vůbec popsány. Na Slovensku se věnoval problematice Romů a o epidemiologii u Romů publikoval prof. I. Bernasovský (10).



Obr. 3. Progressivní periferní demyelinizační neuropatie u pacientů s CCFDN vede k sekundárním změnám na svalech s distálním oslabením a atrofiemi na končetinách



Obr. 4. Typická ptóza (obrázky vlevo) u pacienta s molekulárně geneticky prokázaným kongenitálním myastenickým syndromem (homozygot pro mutaci 1267delG v CHRNE genu) a ustoupení až vymizení ptózy a slabosti po podání blokátoru acetylcholinesterázy (obrázky vpravo)

SYNDROM KONGENITÁLNÍ KATARAKTY, FACIÁLNÍHO DYSMORFISMU A DEMYELINIZAČNÍ NEUROPATIE (CCFDN) (OMIM 604168)

Syndrom kongenitální katarakty, faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie (CCFDN) je nová klinická jednotka

popsaná teprve v roce 1999 Tourněvem u 50 vlašských Romů z 19 velkých rodin v Bulharsku (MIM 604168) (11). Následně byli diagnostikováni a popsáni pacienti i v dalších evropských zemích včetně České republiky (12). Stejně jako u dalších zde popisovaných chorob jde o autozomálně recesivně dědičné onemocnění, které je u CCFDN způsobeno mutací v CTDP1 vedoucí k parciální deficienci karboxy terminální domény fosfatázy 1 (7). Tento enzym hraje důležitou roli v procesu transkripce. CCFDN proto po objevu této molekulární příčiny patří do malé skupiny tzv. transkripčních syndromů. Někteří pacienti s CCFDN byly vzhledem k podobné kombinaci klinických příznaků před objevem kauzální mutace v CTDP1 genu opakovaně popisováni jako postižení Marinesco-Sjögrenovým syndromem (MSS). Nálezem mutace IVS 6 + 389 C na T v CTDP1 genu u pacientů romského etnika s tehdejší klinickou diagnózou MSS a naopak vyloučením této mutace i jiných poruch CTDP1 genu u 19 pacientů s MSS neromského původu byla následně vyloučena i hypotéza o možném alelickém původu obou chorob.

Klinický obraz u CCFDN

Hlavní příznaky jsou již zmíněny v názvu choroby. V klinickém obrazu jsou některé příznaky zcela konstantní, přítomné u všech postižených a některé variabilní, přítomné jen u části pacientů. Kongenitální katarakta, periferní demyelinizační neuropatie na dolních končetinách po 4. roce věku, skeletální abnormity včetně faciálního dysmorfismu (obr. 1) a opoždění psychomotorického vývoje jsou od počátku konstantními příznaky. Variabilně bývá vyjádřena skolióza, kterou trpí pacienti s CCFDN zejména od dospovitého věku (obr. 2), a rabdomyolýza po virovém infektu, která byla u těchto pacientů opakovaně popsána a kterou jsme pozorovali i u dvou našich pacientů, u jednoho z nich dokonce již opakovaně. Psychomotorický vývoj je u pacientů s CCFDN vždy opožděn a samostatná chůze je u nich možná obvykle až od 3–4 let. Chůze je pak vždy nejistá, o široké bázi, cerebelární, ale ovlivněna i slabostí dolních končetin a polyneuropatií (obr. 3). Kondukční studie při EMG vyšetření ukazuje u pacientů výrazně sníženou rychlost vedení vzruchu periferními nervy dolních končetin na hodnoty kolem 20 m/s po 4. roce věku, které pak již zůstávají stabilní. Na nervech horních končetin jsou tyto hodnoty dosaženy později, až kolem 8. roku věku (13). U některých pacientů s CCFDN se objevila akutní, přechodná rabdomyolýza po virovém infektu, při které pacienti udávají zprvu velké bolesti svalů či končetin, pak slabost, vedoucí až k nemožnosti chůze a je obvykle přechodně pozorována i tmavá moč následkem makroskopické myoglobinurie. Hodnoty CK, transamináz i myoglobinu v séru dosahují na počátku ataky extrémních hodnot (CK i přes 500 μ kat/l, ALT i AST přes 10 až 15 μ kat/l, myoglobin přes 4000 μ kat/l) a normalizují se během asi 3 týdnů (14). Terapeuticky v této atace obvykle dostačuje forsírovaná diuréza bez nutnosti dialýzy, která by však měla být pro pacienta vždy připravena. Degenerativní charakter onemocnění vede v dospělosti nebo i ještě před jejím dosažením k invalidizaci a životní očekávání je nejspíše zkráceno, vlastní osobní zkušenost s pacientem s CCFDN, starším než 18 let však dosud nemáme.

KONGENITÁLNÍ MYASTENICKÝ SYNDROM (CMS) (MIM 608931)

Jde o heterogenní skupinu chorob postihujících nervosvalový přenos na všech jeho úrovních, většinou způsobenou inaktivujícími, autozomálně recesivními mutacemi zejména těchto čtyř genů: ChAT (cholin acetyltransferáza) – presynaptický defekt, COLQ (kolagenová doména podjednotky acetylcholinesterázy) – synaptický defekt, AChR (podjednotky acetylcholin receptoru) nebo RAPSN (rapsyn) genu – postsynaptické defekty.

U Romů je CMS nejčastěji způsoben poruchou epsilon podjed-

notky AChR genu (CHRNE genu), a to u převážné většiny z nich mutací 1267delG v homozygotním stavu, v exonu 12 tohoto genu (6). Tato mutace vznikla před asi 800–900 lety zřejmě v Indii, kde je v populaci relativně častá (15). Frekvence této tzv. zakladatelské mutace v populaci Romů v různých částech Evropy se pohybuje od 0 do 8 % s průměrem 3,74 % (15).

Klinický obraz u romských pacientů s CMS způsobeném homozygotní mutací 1267delG je poměrně uniformní a typicky zahrnuje od velmi útlého věku: bilaterální ptózu, nápadnou unavitelnost zejména okohybných svalů, ale i obličejových, polykacích a končetinových svalů (obr. 4). Průběh je většinou stabilní a poměrně benigní a typicky se stav a slabost pacientů zlepšují po podání blokátorů acetylcholinesterázy (6) (obr. 4). Při EMG vyšetření je u většiny pacientů zachytilý dekrement při repetitivní stimulaci.

NESYNDROMOVÁ PRELINGVÁLNÍ HLUCHOTA V DŮSLEDKU PORUCHY GJB2 GENU (DFNB1) (OMIM 220290)

Ztráta sluchu a hluchota je nejčastější smyslovou vadou s incidencí u malých dětí asi 1:1000 v různých zemích. Asi 60 % případů vrozené nebo prelingvální nesyndromové ztráty sluchu je podmíněno poruchou některého z mnoha genů. Zdaleka nejčastější geneticky podmíněnou příčinou vrozené hluchoty je porucha genu GJB2. Tak jak tomu je i u jiných recesivních chorob, i v GJB2 genu se vyskytují v různých populacích různé prevalentní mutace. Pro evropskou, resp. bílou populaci je typická a prevalentní mutace 35delG, která tvoří například v České republice více než 80 % všech patogenních mutací v tomto genu (16). Hluchota má však pravděpodobně vyšší frekvenci v populaci Romů než v české neromské populaci. Systematický průzkum a údaje nicméně bohužel dosud chybí. Jak zjistili Minárik et al. na Slovensku (17) a jak bylo pozorováno a popsáno i naší skupinou v Čechách (16) a následně i například ve Španělsku (18), je většina neslyšících Romů homozygoty pro mutaci W24X, která je prevalentní právě v Indii a Pákistánu, tedy oblastí, odkud je původ Romů předpokládán.

Stupeň ztráty sluchu u homozygotů pro mutaci W24X je velmi těžký (obvykle 95–120 dB ztráta), tento genotyp je spojen s nejtěžšími ztrátami sluchu, odpovídajícími praktické hluchotě u všech dosud známých postižených.

DISKUZE

Romové tvoří v současné době důležitou část naší populace. Jde o etnickou skupinu vzniklou z omezeného počtu zakladatelů před asi 32–40 generacemi (15), ve které se podobně jako v jiných izolovaných skupinách vyskytují unikátní autozomálně recesivní choroby. Některé choroby jsou na podkladě starých mutací, které se vyskytují již v původním domově Romů v Indii, jako je tomu u CMS s mutací 1267delG nebo nesyndromové hluchoty s mutací W24X. Jiné choroby však vznikly následkem později vzniklých mutací až během migrace do Evropy, jako je tomu u CCFDN, chorobě, která je vázána jen na romské etnikum.

Genetická homogenita této etnické skupiny je dobrým předpokladem pro zjednodušení a urychlení molekulárně genetického testování, a tím zjednodušení celého diagnostického procesu. Zjednodušením je však pouze pro s touto problematikou a chorobami seznámeného lékaře, s chorobami, které se jinak buď jen velmi vzácně (CMS), nebo vůbec (CCFDN) nevyskytují v naší většinové populaci. Existují však i choroby, běžné v naší většinové populaci, které se vyskytují také u Romů, ale většinou na podkladě specifické mutace, jako je tomu například u fenylketonurie (PKU) či neuronální ceroidlipofuscinózy (NCL).

Klinická i molekulární diagnostika těchto nemocí při zohlednění etnického původu v diagnostické úvaze by pak pro informovaného lékaře již neměla být problémem, ale spíše zjednodušením.

U CCFDN, kde je kongenitální katarakta přítomna u všech pacientů již při narození a pacienti jsou také velmi časně operováni, je ideální předpoklad, že v případě domluvy a mezioborové spolupráce mezi pediatrií-neonatology, oftalmologií a dětskými neurologií a genetikou by bylo možné zajistit celorepublikový a úplný záchyt tohoto závažného neurodegenerativního onemocnění a postiženým rodinám zajistit včas účinnou genetickou prevenci formou prenatální diagnostiky a postiženým pacientům odpovídající symptomatickou léčbu. Včasná a správně cílená diagnostika těchto etnických specifických chorob by nesporně dále vedla k výrazným úsporám za zbytečně provedenou, složitou a nezávadnou i invazivní vyšetření, která tito pacienti podle naší dosavadní zkušenosti často zbytečně podstupují v důsledku dosud nedostatečné informovanosti a zkušenosti lékařů s chorobami tohoto etnika. Speciální genetická ambulance pro pacienty a rodiny romského původu by mohla v budoucnu usnadnit a zracionalizovat diagnostiku genetických poruch této etnické skupiny. Vzhledem k tomu, že každý asi 8.–10. Rom je nosič aspoň jedné z pěti recesivních mutací pro CMS, CCFDN, HMSN-L, LGMD2C (pletencová svalová dystrofie typ 2C) nebo GALK1 (deficit galaktokinázy) (15), je jasné, že tato skutečnost představuje velké zdravotní ohrožení pro příslušníky této etnické skupiny a že například preventivní program pro testování těchto nejčastějších recesivních mutací pro příslušníky tohoto etnika by mohl být pro tuto skupinu velmi prospěšný, tak jak se tomu stalo na Slovensku v případě mutace pro kongenitální glaukom. Vývoj DNA čipu pro testování nejčastějších mutací u velkého počtu osob by mohl v blízké budoucnosti tento program umožnit a cenově výrazně zvýhodnit.

Zkratky

CCFDN	– syndrom kongenitální katarakty faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie
CMS	– kongenitální myastenický syndrom
GALK1	– deficit galaktokinázy
HMSN-L	– hereditární motoricko-senzitivní neuropatie typ Lom
LGMD2C	– pletencová svalová dystrofie typ 2C
MSS	– Marinesco-Sjögrenův syndrom
NCL	– neuronální ceroidlipofuscinóza
PKU	– fenylketonurie

LITERATURA

1. **Frazer, A.:** The Gypsies. Oxford, Blackwell Publishers, 1992.
2. **Marushiakova, E., Popov, V.:** Gypsies in Bulgaria. In: Studien zur Tsiganologie und Folkloristik. Frankfurt am Main, Peter Lang, 1997, s. 15-122.
3. **Gresham, D., Morar, B., Underhill, P. A. et al.:** Origins and divergence of the Roma (gypsies). *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, 69, s. 1314-1331.
4. **Marushiakova, E.:** Ústav etnologie Bulharské Akademie Věd Sofia – osobní komunikace.
5. **Kalaydjieva, L., Gresham, D., Gooding, R. et al.:** N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Am. J. Hum. Genet.*, 2000, 67, s. 47-58.
6. **Abicht, A., Stucka, R., Karcagi, V. et al.:** A common mutation (epsilon 1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. *Neurology*, 1999, 53, s. 1564-1569.
7. **Varon, R., Gooding, R., Steglich, Ch. et al.:** Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat. Genet.*, 2003, 35, s. 185-189.
8. **Piccolo, F.:** A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum. Mol. Genet.*, 1996, 5, s. 2019-2020.
9. **Plasilova, M., Stilov, I., Sarfarazi, M. et al.:** Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. *J. Med. Genet.*, 1999, 36, s. 290-294.
10. **Bernasovsky, I., Halko, N., Biros, I. et al.:** Some genetic markers in Valachian (Olachian) Gypsies in Slovakia. *Gene. Geogr.*, 1994, 8, s. 99-107.
11. **Tournev, I., Kalaydjieva, L., Youl, B. et al.:** Congenital Cataracts Facial Dysmorphism Neuropathy Syndrome, a novel complex genetic disease in Balkan Gypsies: Clinical and Electrophysiological Observations. *Ann. Neurol.*, 1999, 45, s. 742-750.
12. **Šišková, D., Hadač, J.:** Congenital cataract facial dysmorphism demyelinating neuropathy (CCFDN) syndrome – two cases in Czech Republic. *Eur. J. Ped. Neurol.*, 2001, 5, s. A59.
13. **Kalaydjieva, L., Lochmüller, H., Tournev, I. et al.:** 125th ENMC International workshop: Neuromuscular disorders in Roma (Gypsy) population, 23-25 april 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.*, 2005, 15, s. 65-71.
14. **Merlini, L., Gooding, R., Lochmüller, H. et al.:** Genetic identity of Marinesco-Sjögren/myoglobinuria and CCFDN syndromes. *Neurology*, 2002, 58, s. 231-236.
15. **Morar, B., Gresham, D., Angelicheva, D. et al.:** Mutation history of the Roma/Gypsies. *Am. J. Hum. Genet.*, 2004, 75, s. 596-609.
16. **Seeman, P., Malíková, M., Rašková, D. et al.:** Spectrum and frequencies of mutations in the GJB2 (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness. *Clin. Genet.* 2004, 66, s. 152-157.
17. **Minarik, G., Ferak, V., Feráková, E. et al.:** High frequency of GJB2 mutation W24X among Slovak Romany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). *Gen. Physiol. Biophys.*, 2003, 22, s. 549-556.
18. **Alvarez, A., del Castillo, I., Villamar, M. et al.:** High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (Gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am. J. Med. Genet.*, 2005, 137A, s. 255-258.

Práce byla podpořena IGA NR 7916.

KOMENTÁŘ

K článku autorů Seeman P. a Šišková D. „Autozomálně recesivní etnické choroby u českých Romů“

Identifikace vysoce rizikových skupin obyvatelstva pro vybraná dědičně podmíněná onemocnění se závažným klinickým průběhem a nepříznivou prognózou, včasná diagnostika jednotlivých onemocnění u konkrétních pacientů a především genetické poradenství v postižených rodinách s možností nabídnout prenatální diagnostiku ženám ve fertilním věku s vysokým rizikem pro postižení plodu patří medicínsky, eticky i ekonomicky mezi nejefektivnější preventivní lékařské postupy.

Rozvoj nových molekulárně biologických metod včetně „čipových technologií“ a metod používajících „genové mapování“ významně přispívá k pochopení molekulární a biochemické podstaty celé řady onemocnění s dosud neznámou etiologií (1, 2).

Již delší dobu je známo, že výskyt některých dědičně podmíněných onemocnění se může v různých populacích významně lišit. Jako příklad lze uvést klasickou fenylketonurii s výskytem cca 1:4500 v Severním Irsku, 1:10 000 v České republice, 1:50 000 u Afroameričanů a 1:77 000 v Číně nebo výskyt Gaucherovy nemoci – 1:60 000 v západní Evropě, asi 1:100 000 v České republice a 1:500 – 2000 u Ashkenazi Židů v USA a Izraeli.

V lékařské praxi je důležité vědět o regionálních rozdílech ve výskytu některých onemocnění. Článek P. Seemana a S. Šiškové, který se zabývá problematikou tří autozomálně recesivních onemocnění u Romů, dokumentuje, že Romové představují nejen ve světě, ale i v České republice komplexní populaci s významnou vnitřní stratifikací se zvýšeným rizikem výskytu některých geneticky podmíněných onemocnění, která se mohou u jiných skupin obyvatelstva vyskytovat méně často (3).

V Evropě žije zhruba 10 milionů Romů, kteří představují etnickou skupinu se společným původem. „Specifický životní styl“ i významný „sociální a ekonomický tlak“ vedl k postupné fragmentaci romské komunity v Evropě a vytváření „geneticky a geograficky“ odlišných subizolátů (4, 5). Pro nedostatek písemných historických dokumentů o životě Romů však většinou neexistují, na rozdíl od jiných skupin obyvatel v Evropě, spolehlivé demografické údaje. Ani vyšší výskyt některých onemocnění u Romů všeobecně nebo u Romů žijících jen v „menším regionu“ ve srovnání s výskytem stejného onemocnění u jiných skupin obyvatelstva nebyl dosud objasněn. Pomocí matematických modelů, které využívají výsledky cíleně zaměřených molekulárních analýz a genetického mapování, se ukazuje, že původní celoevropská populace Romů byla založena před cca 32–40 generacemi, zatímco různý výskyt některých onemocnění u současných Romů může souviset se „zakladatelskými mutacemi“ (founder effect), které vznikly v jejich rodinách před cca 16–25 generacemi (4).

Studium specifických zvláštností zdravotní problematiky u Romů nabývá na významnosti. Zdravotní systém žádného regionu nemůže „marginalizovat“ specifitu některých aspektů zdravotní problematiky ani u menších skupin obyvatelstva, protože by mohla nastat situace, v níž nedostatek informací o příčinách některých onemocnění povede nejen k nedostatečné klinické zkušenosti s onemocněním, ale i k následnému vzestupu finančních nákladů na zdravotní a sociální péči. Pouze dostatečné povědomí o existenci dědičně podmíněných onemocnění přispěje k lepší diagnostice nemocných se specifickými dědičně podmíněnými chorobami a ke zlepšení podmínek pro sekundární genetickou prevenci.

LITERATURA

1. Hodanova, K., Majewski, J., Kublova, M. et al.: Mapping of a new candidate locus for uromodulin-associated kidney disease to chromosome 1q41. *Kidney Int.*, 2005, 68, s. 1472-1482.
2. Newman, T. L., Rieder, M. J., Morrison, V. A.: High-throughput genotyping of intermediate-size structural variation. , 2006 (Epub ahead of print).
3. Kalaydjieva, L., Hallmayer, J., Chandler, D. et al.: Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nature Genetics*, 1996, 14, s. 214-217.
4. Morar, B., Gresham, D., Angelicheva, D. et al.: Mutation history of the roma/gypsies. , 2004, 75, s. 596-609.
5. Kalaydjieva, L., Morar, B., Chaix, R., Tang, H.: A newly discovered founder population: the Roma/Gypsies. 2005, 27, s. 1084-1094.

PŮVODNÍ PRÁCE

Polymorfismy genů pro adiponectin a rezistin u pacientek s mentální anorexií a obezitou – pilotní studie

Dolinková M., Křížová J., Lacinová Z., Doležalová R., Housová J., Krajíčková J., Bošanská L., ¹Papežová H., Haluzík M.

III. interní klinika I. LF UK a VFN, Praha
¹Psychiatrická klinika I. LF UK a VFN, Praha

ABSTRAKT

Východisko. Adiponectin a rezistin jsou hormony, které by mohly být pojítkem mezi obezitou a inzulínovou rezistencí. Geny pro tyto hormony jsou považovány za nové kandidátní geny inzulínové rezistence a diabetes mellitus 2. typu. Cílem naší studie bylo stanovit četnost jednonukleotidových polymorfismů 45T>G a 276T>G adiponectinového genu a 62G>A a -180C>G rezistinového genu u pacientek s obezitou, mentální anorexií a u štíhlých žen a porovnat vliv jednotlivých genotypů na koncentrace sledovaných hormonů.

Metody a výsledky. Byly stanoveny hladiny adiponectinu, rezistinu, TNF alfa a inzulínu a byla provedena DNA analýza u 17 mentálních anorektiček, 51 obézních a 17 štíhlých žen. Polymorfismy byly detekovány polymerázovou řetězovou reakcí s následnou restriční analýzou PCR produktu. Koncentrace adiponectinu byly nejnižší u obézních a nejvyšší u mentálních anorektiček. Hladiny rezistinu byly nejnižší u mentálních anorektiček a nejvyšší u obézních. Při rozdělení probandů uvnitř skupin podle genotypů jednotlivých polymorfismů nebyly zjištěny rozdíly ve sledovaných parametrech. Pouze u kontrolní skupiny byl BMI významně vyšší u G/G genotypu než u nosičů alely T v pozici 276 adiponectinového genu (23,48±0,85 vs. 19,7±0,95, p<0,05). U mentálních anorektiček byla vyšší frekvence alely G u polymorfismu RETN -180 ve srovnání s kontrolami (p<0,04).

Závěry. Polymorfismy 45T>G a 276T>G ADP genu a 62G>A a -180C>G RETN genu neměly vliv na sérové koncentrace ADP a RETN. U štíhlých žen byl BMI ovlivněn přítomností alely T v pozici 276 ADP genu. Mentální anorektičky měly vyšší frekvenci alely G u polymorfismu RETN -180 oproti zdravým ženám.

Klíčová slova: adiponectin, rezistin, polymorfismus, obezita, mentální anorexie.

ABSTRACT

Dolinková M., Křížová J., Lacinová Z. et al.: Polymorphisms of Adiponectin and Resistin Genes in Patients with Obesity and Anorexia Nervosa

Background. Adiponectin and resistin are hormones that may represent a link between obesity and insulin resistance. Genes for these hormones are new candidate genes of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. The aim of our study was to determine the frequency of single nucleotide polymorphisms 45T>G and 276T>G of adiponectin gene and 62G>A and -180C>G of resistin gene in patients with obesity, anorexia nervosa and in lean women and to study the influence of particular genotypes on serum concentrations of these hormones.

Methods and Results. Serum adiponectin, resistin, TNF-alfa and insulin levels were measured in 51 patients with obesity, 17 with anorexia nervosa and 17 lean women. DNA analysis was carried out by means of polymerase chain reaction (PCR) with restriction analysis of PCR product (RFLP). Adiponectin levels were lowest in obese women and highest in anorexia nervosa patients. Resistin concentrations were lowest in anorexia nervosa and highest in obese patients. Genotype analysis within respective groups showed no differences in assessed parameters when comparing different adiponectin and resistin polymorphisms. The only difference detected was significantly higher BMI in G/G genotype relative to T allele carriers in 276 position of ADP gene in control group (23.48±0.85 vs. 19.7±0.95, p<0.05). In anorexia nervosa patients, frequency of G allele in RETN -180 polymorphism was significantly higher relative to control group (p<0.05).

Conclusions. Polymorphisms 45T>G a 276T>G of ADP gene and 62G>A and -180C>G RETN gene did not influence serum ADP and RETN concentrations. BMI was influenced by T allele presence in 276 position of ADP gene in control group only. Anorexia nervosa patients had higher frequency of G allele of RETN -180 polymorphism compared to healthy women.

Key words: adiponectin, resistin, polymorphism, obesity, anorexia nervosa.

Do.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 562–566.

Adiponectin (ADP) a rezistin (RETN) jsou nově objevené hormony produkované tukovou tkání. Předpokládá se, že by mohly být pojítkem mezi obezitou a inzulínovou rezistencí.

Adiponectin je tvořen výhradně v tukové tkáni. Jeho hladiny jsou sníženy u pacientů s obezitou a diabetes mellitus (DM) 2. typu (1,

2). Podávání rekombinantního ADP snižuje glykémii u normálních i diabetických potkanů bez zvýšení inzulínémie a výrazně zvyšuje schopnost inzulínu blokovat glukoneogenezi v játrech (3). Myši s knockoutem genu pro adiponectin se vyznačují inzulínovou rezistencí a akcelerovanou aterosklerózou (4).

Rezistinu je proteinový hormon, jehož hladiny jsou vyšší u genetických experimentálních modelů obezity a u hladovců s obezitou indukovanou dietou. Podávání rezistinu myším zhoršuje glukózovou toleranci a působení inzulínu; podání neutralizující protilátky proti tomuto hormonu naopak zvyšuje inzulínovou senzitivitu (5). Během hladovnění se exprese rezistinové mRNA snižuje (6). Podávání RETN stimuluje produkci glukózy v játrech při izozulínemickém stavu a to glukoneogenezi a glykogenolýzou (7). Údaje o změnách hladin rezistinu a jejich souvislosti s obezitou a inzulínovou rezistencí u lidí jsou rozpornější než data experimentální. Podle některých prací jsou u obézních jedinců vyšší sérové hladiny RETN a vyšší exprese rezistinové mRNA v tukové tkáni (8). Jsou ale i práce, které souvislost mezi RETN a inzulínovou rezistencí zpochybňují, v některých publikacích například nebyly popsány odlišné hladiny tohoto hormonu u obézních a štíhlých jedinců (9). Geny pro RETN a ADP jsou považovány za nové kandidátní geny inzulínové rezistence a diabetes mellitus 2. typu.

U obézních byly studovány polymorfismy pro oba tyto geny. Byla publikována řada prací o jednonukleotidových polymorfismech (SNP) adiponectinového genu 276G>T. Opakovaně bylo zjištěno, že se výskyt G alely v této pozici pojí s nižšími a výskyt T alely s vyššími hladinami ADP (10, 11). Dále bylo zjištěno, že G/G genotyp SNP 276 je asociován s porušenou glukózovou tolerancí (12). Stejní autoři také prokázali souvislost mezi přítomností alely G v pozici 45 a porušenou glukózovou tolerancí, v jiné práci asociace mezi tímto polymorfismem a inzulínovou rezistencí zjištěna nebyla (13). Menzaghi et al. zjistil, že genotyp 45G a 276T genu pro adiponectin těsně koreluje s řadou složek indikátorů inzulínové rezistence (tělesná hmotnost, obvod pasu, HOMA index, poměr celkového a HDL cholesterolu) (14). U jedinců s nadváhou byla prokázána nižší frekvence alely G než alely T v pozici 94 ADP genu (15).

Výsledky analýzy rezistinového genu u obézních byly publikovány v několika pracích. Bouchard zjistil, že muži (nikoliv ženy) homozygotní pro alelu G v pozici -420 mají méně viscerálního tuku a nižší hladiny C peptidu než nosiči alely C (16). Byla prokázána asociace SNP -420 C>G, 156 C>T, 298 G>A s vyšší hmotností nositelů (17, 18). Byla také prokázána souvislost mezi polymorfismy promotorové oblasti (-420C>G a -537A>C) a plazmatickými koncentracemi rezistinu (19).

Byly rovněž publikovány 2 práce o polymorfismu genu pro rezistinu 62G>A. U diabetiků 2. typu v čínské populaci byla prokázána nižší frekvence alely A než u nediabetiků. Diabetici s GG genotypem měli navíc vyšší prevalenci arteriální hypertenze. Tento polymorfismus autoři považují za nezávislý rizikový faktor DM 2. typu a arteriální hypertenze (20). Obdobnou studii prezentovali autoři z Německa (21), kteří nepotvrdili rozdíl ve výskytu alely A u diabetiků a nediabetiků. Jednonukleotidovým polymorfismem -180C>G v promotorové oblasti rezistinového genu se zabývá pouze jediná práce. GG homozygoté měli signifikantně vyšší hladiny rezistinové mRNA v abdominálním podkožním tuku, které pozitivně a nezávisle korelovaly s inzulínovou rezistencí a množstvím tuku v játrech (22).

Zatím nebyla publikována práce, která by sledovala zmíněné polymorfismy u pacientek s mentální anorexií.

Cílem naší studie bylo sledovat polymorfismy +45T>G a +276T>G adiponectinového genu a +62G>A a -180C>G rezistinového genu v české populaci u obézních a mentálních anorektiček v porovnání se štíhlými ženami a porovnat vliv jednotlivých genotypů na sérové koncentrace sledovaných hormonů. Změny v sérových koncentracích uvedených hormonů indukované výše uvedenými polymorfismy by totiž mohly vysvětlit řadu metabolických odchylek nalézáných u pacientek s obezitou respektive mentální anorexií.

SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODY

Bylo vyšetřeno 51 obézních žen, 17 mentálních anorektiček a 17 zdravých neobézních žen. Všem subjektům byla po celonočním hladovění odebrána krev, byly zváženy a změřeny, byl vypočítán body mass index (BMI). Všechny ženy podepsaly informovaný souhlas.

V krvi byly stanoveny hladiny adiponectinu, rezistinu a TNF alfa pomocí ELISA kitů (Linco Research, USA; BioVendor, ČR; R&D Systems, USA) a inzulínu pomocí RIA kitu (Immunotech, ČR).

Tab. 1. Detaily stanovení polymorfismu Adiponectin +45 T>G

forward primer*	5'-GAA GTA GAC TCT GCT GAG ATG G-3'	
reverse primer*	5'-TAT CAG TGT AGG AGG TCT GTG ATG-3'	
podmínky PCR	95 °C/5 min 1x 95 °C/60 s 35x 58 °C/45 s 35x 72 °C/45 s 35x 72 °C/5 min 1x	
velikost PCR produktu	372 bp	
restrikční enzym	Sma I °	
podmínky RFLP	30 °C/24 h	
produkt RFLP	při výskytu G alely	219 bp a 153 bp
	při výskytu T alely	372 bp

* převzato z práce Xita et al. (27)

° výrobce Fermentas Life Sciences, Lithuania

Tab. 2. Detaily stanovení polymorfismu Adiponectin +276 G>T

forward primer*	5'-GGC CTC TTT CAT CAC AGA CC-3'	
reverse primer*	5'-AGA TGC AGC AAA GCC AAA GT-3'	
podmínky PCR	95 °C/5 min 1x 95 °C/60 s 35x 58 °C/45 s 35x 72 °C/45 s 35x 72 °C/5 min 1x	
velikost PCR produktu	196 bp	
restrikční enzym	Mva 1269I °	
podmínky RFLP	37 °C/24 h	
produkt RFLP	při výskytu G alely	148 a 48 bp
	při výskytu T alely	196 bp

* převzato z práce Xita et al. (27)

° výrobce Fermentas Life Sciences, Lithuania

Tab. 3. Detaily stanovení polymorfismu rezistinu +62G>A

forward primer*	5'-GCC GAG ACC ACA TGT CAC T-3'	
reverse primer*	5'-CCT CCG GGC CTA CTA AAG AA-3'	
podmínky PCR	96 °C/2 min 1x 94 °C/30 s 35x 54,3 °C/30 s 35x 72 °C/30 s 35x 72 °C/5 min 1x	
velikost PCR produktu	233 bp	
restrikční enzym	BseR I °	
podmínky RFLP	37 °C/24 h	
produkt RFLP	při výskytu A alely	151 bp a 82 bp
	při výskytu T alely	233 bp

* převzato z práce Tan et al. (20)

° výrobce New England Biolabs, USA

Tab. 4. Detaily stanovení polymorfismu rezistinu -180 C>G

forward primer*	5'-TTT TGT CAT GTT TGC ATC AGC-3'	
reverse primer*	5'-AGA TGC AGC AAA GCC AAA GT-3'	
podmínky PCR	96 °C/2 min 1x	
	94 °C/30 s 35x	
	58,2 °C/30 s 35x	
	72 °C/30 s 35x	
	72 °C/5 min 1x	
velikost PCR produktu	330 bp	
restrikční enzym	Bpil °	
podmínky RFLP	37 °C/24 h	
produkt RFLP	při výskytu C alely	202 bp a 128 bp
	při výskytu G alely	330 bp

* převzato z práce Smith et al. (22)

° výrobce Fermentas Life Sciences, Lithuania

Celková DNA byla izolována z 500 µl nesrážlivé krve izolačním kitem MagNA Pure Nucleid Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Německo) na automatickém izolátoru MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Německo). Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla ověřována spektrofotometricky (BioPhotometr Eppendorf AG, Německo). Průměrná koncentrace DNA byla 141,5 µg/ml, poměr $R_{260/280nm}$ se pohyboval v rozmezí 1,6–1,79. Integrita DNA byla ověřena elektroforeticky na 0,8% agarózovém gelu s 1% ethidium bromidem.

DNA byla použita pro stanovení 2 polymorfizmů genu pro adiponectin (45 T>G a 276 G>T) a 2 polymorfizmů genu pro rezistinu (62 G>A, -180 C>G).

Všechny výše uvedené polymorfizmy byly detekovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) na přístroji MyCycler™ Thermo Cycler (Bio-Rad, USA) s následnou restrikční analýzou PCR produktu (RFLP).

Reakční směs PCR pro všechny polymorfizmy obsahovala 2x PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR), forward primer a reverse primer, PCR H₂O (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR) a 150 ng DNA. Sekvence jednotlivých primerů a podmínky PCR a RFLP jsou uvedeny v tabulkách 1–4.

Produkty PCR a restrikční analýzy byly detekovány na 2% agarózovém gelu s 1% ethidium bromidem. Sekvence všech PCR produktů byla ověřena enzymatickou sekvenací na přístroji ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA).

Statistická analýza byla provedena pomocí programu SigmaStat (Jandel Scientific, USA). Ze získaných dat byly vypočítány průměry a standardní chyby. Významnost rozdílů mezi skupinami byla stanovena nepárovým t-testem nebo Mann-Whitney Rank Sum testem. Rozdíly ve výskytu jednotlivých polymorfizmů byly hodnoceny frekvenční analýzou, Fischerovými exaktními testy a chí-kvadrát testem.

VÝSLEDKY

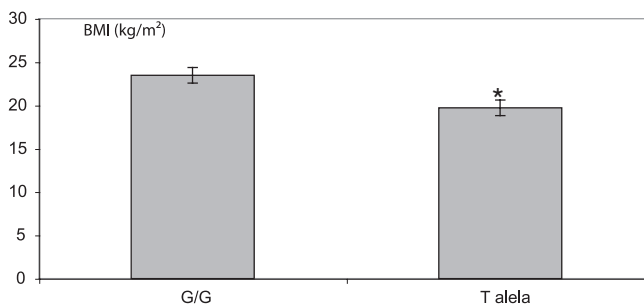
Koncentrace ADP byly statisticky významně nižší u obézních žen v porovnání s kontrolní skupinou a mentálními anorektičkami, oproti zdravým ženám měly mentální anorektičky tyto hladiny výrazně vyšší. Koncentrace RETN byly nejnižší u mentálních anorektiček a nejvyšší u obézních. Hladiny inzulínu byly statisticky významně vyšší u obézních oproti kontrolní skupině i mentálním anorektičkám. Koncentrace TNF α se mezi jednotlivými skupinami nelišily (tab. 5).

Při rozdělení probandů uvnitř skupin podle genotypů jednotlivých polymorfizmů nebyly zjištěny rozdíly v BMI a hladinách ADP, RETN, inzulínu a TNF α . Pouze u kontrolní skupiny se lišil BMI u G/G genotypu a nosičů alely T v pozici 276 adiponectinového genu ($p=0,017$) (graf 1).

Při analýze polymorfizmů bylo zjištěno, že alela G v lokusu 62 a alela C v lokusu -180 genu pro rezistinu a alela T v lokusu 45 a alela G v lokusu 276 genu pro adiponectin byly zastoupeny výrazně častěji než alely A, G, G a T v odpovídajících lokusech (RETN 62:

Tab. 5. Body mass index (BMI), hladiny adiponectinu (ADP), rezistinu (RETN), inzulínu a tumor necrosis factoru-alfa (TNF α) u pacientek s mentální anorexií, obezitou a kontrolní skupiny zdravých štíhlých žen

	mentální anorektičky	obézní ženy	kontrolní skupina
N	17	51	17
BMI (kg/m ²)	15,4±0,45****	45±1,60** ^{OO}	22,2±0,79 ^{++OO}
ADP (µg/ml)	57,8±6,33***	18,7±1,75* ^{OO}	33,0±6,79 ^{°O}
RETN (ng/ml)	3,7±0,29***	6,8±0,35* ^{OO}	5,42±0,53 ^{°O}
inzulín (mIU/ml)	16,4±1,68*	33,5±3,48* ^O	17,1±3,10*
TNF α (ng/ml)	2,0±0,87	2,67±1,06	0,85±0,13

Výsledky jsou uvedeny jako průměry \bar{x} SEM.*statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p<0,05$)**statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p<0,001$)*statisticky významný rozdíl oproti obézním ženám ($p<0,05$)**statisticky významný rozdíl oproti obézním ženám ($p<0,001$)^Ostatisticky významný rozdíl oproti mentálním anorektičkám ($p<0,05$)^{OO}statisticky významný rozdíl oproti mentálním anorektičkám ($p<0,001$)**Graf 1.** Porovnání BMI u kontrolní skupiny zdravých žen v závislosti na genotypu polymorfismu genu pro adiponectin v pozici 276 (G/G genotyp vs. nosiči alely T), $p=0,017$ (*)

$p<0,0001$, RETN -180: $p<0,0002$, ADIPO 45: $p<0,0001$, ADIPO 276: $p<0,0001$).

Na hranici významnosti byla korelace mezi nosičstvím alely G u polymorfismu RETN -180 a diagnózou anorexie ve srovnání s kontrolami ($p=0,06$, Fisherův exaktní test; $p<0,04$ chí-kvadrát test).

Mezi jednotlivými polymorfizmy nebyl zjištěn statisticky významný vztah, vazba blížící se významnosti byla pouze mezi polymorfizmy RETN 62 a RETN -180 ($p<0,07$, chí-kvadrát test; $p<0,06$, frekvenční analýza).

DISKUZE

Cílem naší studie bylo stanovit četnost polymorfizmů 45T>G a 276T>G adiponectinového a 62G>A a -180C>G rezistinu genu v české populaci u pacientek s obezitou a mentální anorexií v porovnání se štíhlými ženami a posoudit vliv jednotlivých genotypů na sérové koncentrace sledovaných hormonů. Bylo zjištěno, že hladiny adiponectinu jsou nejvyšší u mentálních anorektiček a nejnižší u obézních žen, hladiny rezistinu jsou u nemocných s mentální anorexií nejnižší, u obézních naopak nejvyšší. Tato zjištění jsou v souladu s dříve publikovanými pracemi i našimi dřívějšími výsledky (1, 5, 23–25).

V naší práci nebyl nalezen vliv přítomnosti jednotlivých alel na sledované parametry, kromě vztahu mezi G/G genotypem ADP genu v pozici 276 a vyšším BMI u neobézních žen. Toto pozorová-

ni je v částečném rozporu s prací Fredrikssona, který zjistil, že obézní nosiči alely T mají vyšší obsah tuku v organizmu než obézní s genotypem G/G (11). Asociace jiných polymorfismů s BMI byla zjištěna v kanadské populaci – nosiči alely G v pozici -420 a alely C v pozici -537 RETN genu měli vyšší BMI; tyto výsledky ale nebyly potvrzeny při studiu genotypu Skandinávské populace (26).

Vliv polymorfismů na hladiny ADP nebo RETN nebyl v naší práci zjištěn na rozdíl od některých dříve publikovaných výsledků. Například Hara et al. Popsal u osob s BMI nad 26,7 kg/m² s G alelou v pozici 276 nižší hladiny ADP (10). Nosiči alely T v pozici 276 měli vyšší expresi adiponektinové mRNA ve viscerálním tuku, která korelovala s hladinami ADP (11). V jiné práci byl G/G genotyp SNP 276 ADP genu asociován se sníženými hladinami ADP (12). Byla prokázána souvislost mezi polymorfismy promotorové oblasti RETN genu (-420C>G a -537A>C) a plazmatickými koncentracemi rezistinu (19).

Zcela novým zjištěním naší práce je vyšší frekvence alely G v lokusu -180 RETN genu u mentálních anorektiček ve srovnání se zdravými ženami. Práce o polymorfismech genů pro adiponektin a rezistin zatím nebyly u nemocných s touto diagnózou publikovány.

Naše výsledky jsou nepochybně ovlivněny malým počtem subjektů v jednotlivých skupinách a je nutné je považovat za pilotní. Zejména u skupiny pacientek s mentální anorexií jde však o zcela originální dosud nepublikované údaje. Předpokládáme, že po rozšíření množství pacientů v jednotlivých skupinách mohou naše výsledky dále přispět k objasnění úlohy endokrinní funkce tukové tkáně v etiopatogenezi metabolických komplikací obezity a mentální anorexie.

ZÁVĚR

Polymorfismy 45T>G a 276T>G ADP genu a 62G>A a -80C>G RETN genu neměly vliv na sérové koncentrace ADP a RETN.

U štíhlých žen byl BMI ovlivněn genotypem v pozici 276 ADP genu.

Mentální anorektičky měly vyšší frekvenci alely G u polymorfismu RETN -180 oproti zdravým ženám.

Zkratky

ADP	– adiponektin
BMI	– body mass index
DM	– diabetes mellitus
DNA	– deoxyribonukleová kyselina
HDL	– lipoprotein vysoké hustoty
HOMA index	– homeostasis model assessment
PCR	– polymerázová řetězová reakce
RETN	– rezistin
RFLP	– restrikční analýza PCR produktu
RNA	– ribonukleová kyselina
SNP	– jednonukleotidový polymorfismus
TNF α	– tumor necrosis faktor α

LITERATURA

- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N. et al.: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponektin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 257, s. 79-83.
- Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y. et al.: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponektin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, 20, s. 1595-1599.
- Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X. et al.: The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.*, 2001, 7, s. 947-953.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T. et al.: Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, s. 25863-25866.
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S. et al.: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001, 409, s. 307-312.
- Kim, K. H., Lee, K., Moon, Y. S., Sul, H. S.: A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, s. 11252-11256.
- Rajala, M. W., Obici, S., Scherer, P. E., Rossetti, L.: Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J. Clin. Invest.*, 2003, 111, s. 225-230.
- Degawa-Yamauchi, M., Bovenkerk, J. E., Juliar, B. E. et al.: Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, 88, s. 5452-5455.
- Lee, J. H., Chan, J. L., Yiannakouris, N. et al.: Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, 88, s. 4848-4856.
- Hara, K., Boutin, P., Mori, Y. et al.: Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes*, 2002, 51, s. 536-540.
- Fredriksson, J., Carlsson, E., Orho-Melander, M. et al.: A polymorphism in the adiponectin gene influences adiponectin expression levels in visceral fat in obese subjects. *Int. J. Obes. (Lond.)*, 2006, 30, s. 226-232.
- Gonzalez-Sanchez, J. L., Zabena, C. A., Martinez-Larrad, M. T. et al.: An SNP in the adiponectin gene is associated with decreased serum adiponectin levels and risk for impaired glucose tolerance. *Obes. Res.*, 2005, 13, s. 807-812.
- Filippi, E., Sentinelli, F., Trischitta, V. et al.: Association of the human adiponectin gene and insulin resistance. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2004, 12, s. 199-205.
- Menzaghi, C., Ercolino, T., Di Paola, R. et al.: A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, 2002, 51, s. 2306-2312.
- Yang, W. S., Tsou, P. L., Lee, W. J. et al.: Allele-specific differential expression of a common adiponectin gene polymorphism related to obesity. *J. Mol. Med.*, 2003, 81, s. 428-434.
- Bouchard, L., Weisnagel, S. J., Engert, J. C. et al.: Human resistin gene polymorphism is associated with visceral obesity and fasting and oral glucose stimulated C-peptide in the Quebec Family Study. *J. Endocrinol. Invest.*, 2004, 27, s. 1003-1009.
- Conneely, K. N., Silander, K., Scott, L. J. et al.: Variation in the resistin gene is associated with obesity and insulin-related phenotypes in Finnish subjects. *Diabetologia*, 2004, 47, s. 1782-1788.
- Mattevi, V. S., Zembrzski, V. M., Hutz, M. H.: A resistin gene polymorphism is associated with body mass index in women. *Hum. Genet.*, 2004, 115, s. 208-212.
- Cho, Y. M., Youn, B. S., Chung, S. S. et al.: Common genetic polymorphisms in the promoter of resistin gene are major determinants of plasma resistin concentrations in humans. *Diabetologia*, 2004, 47, s. 559-565.
- Tan, M. S., Chang, S. Y., Chang, D. M. et al.: Association of resistin gene 3'-untranslated region +62G->A polymorphism with type 2 diabetes and hypertension in a Chinese population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, 88, s. 1258-1263.
- Gouni-Berthold, I., Giannakidou, E., Faust, M. et al.: Resistin gene 3'-untranslated region +62G->A polymorphism is associated with hypertension but not diabetes mellitus type 2 in a German population. *J. Intern. Med.*, 2005, 258, s. 518-526.
- Smith, S. R., Bai, F., Charbonneau, C. et al.: A promoter genotype and oxidative stress potentially link resistin to human insulin resistance. *Diabetes*, 2003, 52, s. 1611-1618.
- Delporte, M. L., Brichard, S. M., Hermans, M. P. et al.: Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 2003, 58, s. 22-29.

24. **Brichard, S. M., Delporte, M. L., Lambert, M.:** Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin. *Horm. Metab. Res.*, 2003, 35, s. 337-342.
25. **Housova, J., Anderlova, K., Krizova, J. et al.:** Serum adiponectin and resistin concentrations in patients with restrictive and binge/purge form of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005, 90, s. 1366-1370.
26. **Engert, J. C., Vohl, M. C., Williams, S. M. et al.:** 5' flanking variants of resistin are associated with obesity. *Diabetes*, 2002, 51, s. 1629-1634.
27. **Xita, N., Georgiou, I., Tsatsoulis, A. et al.:** A polymorphism in the resistin gene promoter is associated with body mass index in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.*, 2004, 82, s. 1466-1467.

Podpořeno grantem Grantové agentury České republiky 301/04/P167.

ZPRÁVY

PROFESOR MUDr. CTIRAD JOHN, DrSc. RYTÍŘEM LÉKAŘSKÉHO STAVU

Pane prezidente České lékařské komory, pane prezidente České lékařské společnosti J. E. Purkyňe, pane předsedo Čestné rady lékařské komory, dámy a pánové.

Ceny nebývají stejně cenné a vyznamenání stejně významná. Pasování rytířem stavu, který mám rád a v němž mi bylo dáno zestárnout, je pro me výzvou k potulce vlastním životním příběhem.

Jako mladý asistent Ústavu pro lékařskou mikrobiologii a imunologii lékařské fakulty jsem sedával při přednáškách pana profesora Patočky v nejvyšší řadě rozlehlé posluchárny Purkyňova ústavu. Bývalo plno, studenti se tísnili i v ochozu obklopujícím promítačovou kabinu. V průběhu přednášky o bakteriální taxonomii otevřel opožděný návštěvník zlehýnka dveře a tlumeně se zeptal: „Kdo přednáší?“ Z klubka soustředěných posluchačů se ozvalo: „Rytíř Patočka“. To bylo na fakultě mé prvé setkání s rytířem. Profesor Patočka rytířem vskutku byl. Celý ústav před každou přednáškou s respektem chránil jeho vigilii, chvíle soustředění, v nichž leštil rytířskou zbroj nepřekonatelného rétora. S porozuměním až synovským jsme sledovali jeho každodenní putování na pražský hrad a do katedrály. Pouti do Kutné Hory pro nás bývaly při různých kongresech celoustavním svátkem.

Na fakultě jsem potkal několik dalších rytířů. Kdykoliv mne pan docent Reiniš uvedl na VI. interní kliniku naší fakulty a já měl čest předstít panu profesorovi Prusíkovi naše domněnky o infekčním impulzu v rozvoji prvých stadií migrující flebitidy, měl jsem vždy pocit, že stojím před rytířem vystupujícím z dávných časů. Vždyť byl obklopen skvělou družinou oddaných zbrojnošů a truvérů, asistentů kliniky. Jedna tvář se mi však vybavuje zvlášť jasně: tvář profesora Kamila Hennera. Vzpomínky jsou velmi živé. Pan profesor při našich lékařských stážích trpělivě obcházel všechny praktikující skupiny a téměř s rozpaky korigoval naše neurologické neumětelství. Jeho dialog s demonstrujícím docentem Jiroutem jsme vnímali jako setkání dvou rytířů stejného bratrstva. Jednou jsem měl čest být s ním členem poroty, která hodnotila závěrečné kolo recitační medicke soutěže. Pan profesor trpělivě naslouchal a potom s rozvážností a jemností pro něho tak typickou prohlásil: „Víte, bude nejlépe, když udělíme hlavní cenu ex aequo, rovným dílem.“ Vyšel jsem tehdy z ministerstva stavebnictví, kde se v zasedací síni soutěž konala, podíval se na špičky kostela v Emauzích a cítil se přijat do rytířské družiny pana profesora.

V únoru 1920 přednášel studentům Emanuel Rádl „o Masarykově ideálu moderního hrdiny“. Připomněl jim slova Jana Lucemburského, s nimiž umíral v bitvě u Kresčaku: Toho bohda nebude, aby český král z boje utíkal. A Rádl naznačil (bylo to těsně po skončení první světové války), že „jako by na nás dosud ležely stopy onoho rytířského závazku“.

Revoluční požadavky volnost, rovnost, bratrství Rádl považoval za základní mravní příkaz hrdinů všech dob. Nebyly však vždy chápány tak široce jako v moderní době. Středověcí hrdinové uznávali volnost pro své přátele, byli rovni jen podobně urozeným, jako byli oni sami“. Žádali, aby svět spolehl „na jejich srdce, věrnost, čestnost,



přímost, pravdivost, statečnost, vůli pomáhat slabým a utlačovaným“. Rádl ukázal na rozdíly mezi novým demokratickým ideálem a ideálem rytířů středověkých turnajů. Ti osvobozovali boží hrob z rukou nevěřících. Moderní hrdinové bojují za osvobození z vlády těch, kteří rovnost a bratrství pokořují. Moderním rytířem byl Rádlovi Masaryk. Středověký rytíř se kořil ženě, královně svého srdce. Dnešní hrdina učinil ženu občankou sobě ve všem rovnou. „Máte odvahu jít za službou rytířskou?“ – zeptal se tehdy Rádl na závěr studentů. Není lehké domyslet podstatu Masarykova ideálu hrdiny. „Neboť je jediné možné ctnění hrdinů: být hrdinou sám.“

Jako vagant v devátém deceniu vlastního životního příběhu beru stále častěji do ruky Kulhavého poutníka Josefa Čapka. Poutník je někdo, kdo je na cestě, kdo někam směřuje. Čapek ví, že jeho myšlení je „směsíci skepse, vnitřního pathosu, odporu

i dobrodružné důvěry.“ Kulhá, je nachýlen, jde pomaleji než jeho rostenci. Víc vidí, ostřeji rozlišuje. Všimá si uvážlivěji různých setkání. Naléhavěji potřebuje spolehlivá návěští, ukazatele směru, milníky. To aby někam došel a nesešel se cesty. Když se připomene bolavá páteř či noha, usedne, aby nabral nové síly, „pozoruje velké úkazy, jako jsou nebesa a dálky. Ale vidí i úkazy drobné, jako let ptáka či motýla!“

Poutník, kterému jste dnes prokázali poctu tak významnou, se stále sama sebe ptá, zda od něho, badatele a laboratorního pracovníka dostával kliník, ošetřující lékař, a tedy i pacient věrohodná a jednoznačná data poskytovaná laboratorní technologií. Zda laboratoř jím vedená vždy přesvědčovala, že práci v laboratoři lze považovat za integrální součást celé medicíny. A víc. Zda ji lze právem pokládat za součást lékařské etiky. Etika totiž netkví jen ve skutcích a slovech směřujících k humanitním cílům, ale i ve spolehlivém a přesném laboratorním konání.

Kulhavý poutník Josefa Čapka „krystalizátora tmy“ – mluveno s F. X. Šaldou – uviděl a poznal na světě příliš mnoho a příliš málo. „Mnoho v tom, co se neobsažne ani nejdůvtipnějším duchem. A málo v tom, co by až do dna ukrojilo lidskou tékavost, neklid, baživot a touhu“.

Vážení, dovolu, abych poděkoval v pokořtém, kteří rozhodovali o mém pasování rytířem lékařského stavu. Lékařské komoře a jejím čestným radám. Ale také vám všem, kteří jste v tuto chvíli při mně stáli. Díky vám, rodino a moji nejbližší, kteří mne stále udržujete na cestě. Jsem dojat, vidím-li zde vynikající představitele naší medicíny z Čech, ale i z mně tolik milé Moravy, přátele z luhů imunologických, mikrobiologických, ale i badatelských, uměleckých a literárních.

Dovolte, abych svůj projev uzavřel několika truvérskými verši. Napsal je skutečný rytíř, vévoda lucemburský a brabantský, zvaný princ Václav Český, syn krále Jana, bratr římského císaře a českého krále Karla IV.

Pochválit chtěl bych zraky své,
zraky, jež stále vzrušují
mé srdce plné touhy

Byť mi i změnu nabídne
samotný Bůh, já nechci ji
po celý život dlouhý

Pochválit chtěl bych zraky své

Projev přednesený dne 19. května 2006 u příležitosti slavnostního pasování prof. MUDr. Ctirada Johna, DrSc. na rytíře českého lékařského stavu.

PŮVODNÍ PRÁCE

Výskyt kvasinek a vláknitých hub u hematologických pacientů v letech 2002 – VIII. 2005

Jedličková A., Hajíčková M., Olišarová P.

ÚKBLD I. LF UK, Praha

Klinická mikrobiologie a ATB centrum VFN, Praha

Laboratoř mykologie VFN, Praha

ABSTRAKT

Východisko. V posledních letech stoupá počet onemocnění způsobených kvasinkami a plísněmi. Primární onemocnění způsobují dermatofyta a *Cryptococcus neoformans*. Ostatní kvasinky a plísně jsou původci sekundárních infekcí u pacientů s predispozičními faktory. Mezi mykotická onemocnění diagnostikovaná v naší laboratoři patří kandidóza, kryptokokóza, aspergilóza a mukormykóza.

Metody a výsledky. U hematologických pacientů vyšetřovaných v naší mykologické laboratoři nejčastěji identifikujeme tyto kvasinky: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* a *Saccharomyces cerevisiae*.

Závěry. Současně se zvýšeným počtem vyšetřených materiálů zaznamenáváme v poslední době zvýšený počet kmenů s rezistencí na azolová antimykotika.

Klíčová slova: primární patogen, sekundární patogen, exoinfekce, endoinfekce, kandidóza, kryptokokóza, aspergilóza, mukormykóza, antimykotika.

ABSTRACT

Jedličková A., Hajíčková M., Olišarová P.: Occurrence of the Yeast and Filamentous Fungi in Haematological Patients during 2002 to August 2005

Background. The number of diseases caused by yeast and fungi has been increasing recently. The primary disease is caused by dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. Other types of yeast and fungi can cause secondary infections of patients with predisposition factors. Among the mycotic diseases diagnosed in our laboratory can be included candidosis, cryptococcosis, aspergillosis and mucormycosis.

Methods and Results. In haematological patients *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae* are the most frequently diagnosed.

Conclusions. Together with the increased number of examined samples, the rising number of strains resistant to azole antimycotics can be observed.

Key words: primary pathogen, secondary pathogen, exoinfection, endoinfection, candidosis, cryptococcosis, aspergillosis, mucormycosis, antimycotics. Po.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 567–570.

V posledních letech stoupá výskyt onemocnění způsobených kvasinkami a plísněmi. Je popsáno asi 200 000 druhů hub, z toho je asi 280 patogenů. Způsobují ve velké většině sekundární oportunní infekce. Mezi primární patogeny řadíme u nás dermatofyta a *Cryptococcus neoformans*. Dermatofyta způsobující onemocnění kůže, vlasů a nehtů. Tyto keratofilní houby jsou v populaci velmi rozšířené.

Vznik a rozvoj onemocnění kvasinkami a plísněmi předpokládá určitou predispozici u hostitele (1). Jsou to:

- dlouhodobá léčba ATB,
- léčba kortikoidy,
- transplantace orgánů (zejména kostní dřeň),
- chemoterapie,
- radioterapie,
- katetry,
- léčba imunosupresiv,
- diabetes mellitus,
- HIV infekce,

- autoimunitní onemocnění,
- hematologická onemocnění,
- popáleniny a otevřené rány.

Sekundární mykózy komplikují léčebné postupy a ohrožují pacienta na životě. Udává se, že 1/4–1/3 závažných onemocnění je komplikována mykotickou infekcí. Patogeny oportunních mykóz se vyskytují u většiny lidí jako saprofytická komenzální flóra, ale klinicky onemocní jen oslabení jedinci. Mezi oportunní infekce patří zejména nozokomiální infekce.

Podle způsobu nákazy dělíme mykotické infekce na:

- **exoinfekce** – získané ze zevního prostředí. Zdrojem jsou kvasinkovité mikroorganismy a plísně, které se vyskytují ve vzduchu místností, na kůži a sliznicích člověka nebo na předmětech. K nákaze dojde inhalací nebo infekcí ran a popálenin. Patří sem i infekce zavlečené do organismu zdravotnickým zásahem.
- **endoinfekce** – vznikají aktivací latentní infekce nebo přemnožením komenzální saprofytické flóry u oslabeného jedince. Tyto organ-

my se dostávají do krevního oběhu většinou přes střevní stěnu a mohou napadnout kterýkoliv orgán a může dojít k diseminaci.

Při vzniku oportunní infekce má zásadní význam selhání obranné hostitele. Obranné mechanismy jsou: 1. vnější – kůže, sliznice, sekrety na sliznicích, fyziologická flóra, 2. vnitřní – klíčové postavení v obraně proti plísním mají neutrofilní granulocyty, které mají zničit plísně, které překonaly vnější bariéru a pronikly do tkání hostitele.

U kandid, které patří mezi dimorfní houby, je významné, v jaké se vyskytují formě. Zde se forma kvasinková považuje většinou za saprofytickou a forma vláknitá za patogenní. Neutrofilny ničí snáze formu kvasinkovitou, ale jsou schopny se přichytit i na hyfy a zničit je. Jestliže tedy nedojde k úpravě neutropenie, je prognóza i při intenzivní léčbě antimykotiky nepříznivá (1, 2).

V laboratoři jsou diagnostikovány tyto mykotické infekce: kandidóza, kryptokokóza, aspergilóza a mukormykóza.

KANDIDÓZA

Jedná se téměř vždy o endogenní infekci. Kandidy kolonizují gastrointestinální trakt (GIT) i u zdravých jedinců, ale za určitých podmínek pronikají střevní stěnou a mohou napadnout kterýkoliv orgán. Je popsáno asi 200 druhů kandid, ale jen asi 36 jsou častějšími lidskými patogeny. V našem materiálu je nejčastější (asi v 50 %) *Candida albicans*, pak následují *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii* (3).

Podle klinické manifestace můžeme kandidózy rozdělit na:

- lokální infekce se slizničními a kožními projevy; slizniční formy jsou nejčastějším projevem kandidové infekce. Jsou závažné, protože se mohou stát zdrojem kandidémie a diseminované kandidózy. Mezi lokální projevy patří i kandidová vulvovaginitida, která je velmi častá.
- orgánová a diseminovaná kandidóza; nejčastější je orgánové postižení plic, jater, sleziny, ledvin a močových cest, oka, centrální nervové soustavy (CNS). Je charakterizována invazí vláknitých elementů do tkání.

KRYPTOKOKÓZA

Nejčastější je infekce druhem *Cryptococcus neoformans*, vzácněji *Cryptococcus albidus*. Zdrojem v přírodě je holubí trus, ve kterém blastosporu mohou přežít dlouhou dobu. K nákaze dochází inhalací, proto je nejčastější plicní onemocnění, které může zůstat lokalizováno nebo se může šířit na jiné orgány. Buňky kryptokoků jsou obaleny polysacharidovým pouzdrém, které je chrání před fagocytózou, takže onemocnění postihuje hlavně nemocné s defektem T lymfocytů. S tím souvisí v dnešní době zvyšující se výskyt hlavně u pacientů s AIDS. V našem materiálu jsme se setkali s nálezem *C. neoformans* jen výjimečně.

ASPERGILÓZA

Zdroj infekce je vždy exogenní. Jedná se o saprofytické plísně, které se nacházejí všude v prostředí obývaném člověkem. Se

sporami těchto plísní se setkáme ve vzduchu, v půdě, na potravinách, na rostlinách atd. Spory mají rozměr zhruba kolem 3–5 μm. K nákaze dojde snadno inhalací do dýchacích cest a paranazálních dutin. Přenos přímým kontaktem – například lékařskými nástroji – je vzácný. Nejčastější je plicní forma aspergilózy. Mimoplicní lokalizace je vzácná. Z našeho materiálu jsme izolovali: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* a *A. nidulans* (4).

MUKORMYKÓZA

Je akutní a často fatální oportunní mykóza. Původci jsou houby z řádu *Mucorales*. Jejich hyfy vnikají do stěn a lumen krevních cév, kde vytvářejí shluky smíšené s fibrinem. To vyvolá vznik trombózy a infarktaci okolní tkáně. Onemocnění u člověka vyvolávají rody *Absidia*, *Mycocladius*, *Mucor*, *Rhizomucor* a *Rhizopus* (4). Zástupci tohoto řádu jsou značně rozšířeni v přírodě, hlavně v půdě a na tlejících rostlinách. K infekci dochází inhalací spor, které se mohou uchytit na nosní sliznici a pak dále klíčí. Jindy se dostávají vdechnutím do dolních partií respiračního traktu. Méně často dochází k infekci vniknutím spor do poraněné kůže například při úrazech a popáleninách. Nejčastěji se setkáme s těmito infekcemi u nemocných s hematologickými chorobami a po transplantaci orgánů. V naší laboratoři jsme se setkali se všemi výše uvedenými druhy, ale velmi vzácně.

SOUBOR MATERIÁLU A POUŽITÉ METODY

Naše mykologická laboratoř pracuje od roku 1998 a zpracovává materiál ze všech klinik VFN (tab. 1, 2, 3). Zabývá se hlavně diagnostikou systémových mykóz. Každý rok stoupá počet vyšetřených materiálů a rovněž se rozšiřuje i spektrum zachycených patogenů. Mezi mykologicky monitorované pacienty patří hlavně hematologičtí pacienti.

Odběr materiálu probíhá stejným způsobem jako pro bakteriologické vyšetření, to znamená do sterilních nádobek nebo na sterilní tampony.

Nejprve je materiál vyšetřen **mikroskopicky**. Prohlížíme nativní preparáty nebo preparáty barvené Gramem nebo laktofenolem. Při tomto vyšetření si všímáme charakteru i četnosti všech mykotických elementů. Pak následuje **kultivační vyšetření**. Kultivujeme na Sabouraudově agaru, Sabouraudově agaru a thiaminem a chloramfenikolem a na Czapek-Dox agaru, který je vhodnou půdou pro vláknité plísně. Kultivujeme při teplotách 25 a 37 °C. Při pozitivní kultivaci nejprve izolujeme jednotlivé kolonie, protože jen čistá kultura se dá použít pro následnou identifikaci. Při identifikaci kvasinek hodnotíme znaky:

- makroskopické – vzhled, barvu a strukturu kolonie;
- mikroskopické – velikost a tvar buněk, způsob větvení mycelia, tvorba trvalých buněk;
- biochemické vlastnosti – fermentaci a asimilaci cukrů.

Při identifikaci vláknitých hub sledujeme makroskopický i mikroskopický vzhled kultury. Zde je důležitým znakem složení a rozměry reprodukčních orgánů, případně tvorba pigmentu, který difunduje do kultivační půdy.

U získané čisté kultury **stanovujeme citlivost na anitmykotika**. Buď difuzní diskovou metodou, kde sledujeme velikost zóny inhibice růstu kolem disků. Přesnější je stanovení minimální inhibiční koncentrace E-tes-tem, které umožní kvantitativní posouzení citlivosti i stanovení optimálních léčebných dávek.

Tab. 1. Počet vyšetření v mykologické laboratoři v letech 1998–VIII. 2005

Rok	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	VIII.2005
počet vyšetření	2508	4958	6119	6335	13402	14393	15048	10683

Tab. 2. Přehled vyšetření v mykologické laboratoři v letech 1998–VIII. 2005 – kvasinky

Rok	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	VIII.2005
počet vyšetření	2508	4958	6119	6335	13402	14393	15048	10683
% pozitivních	42,90	51,50	51,30	52,40	34,00	40,70	33,50	38,5
<i>C. albicans</i>	57,60	61,80	60,80	55,10	55,20	50,50	55,00	51,20
<i>C. glabrata</i>	16,40	12,10	9,90	13,10	13,30	16,00	19,20	13,80
<i>C. krusei</i>	9,30	7,10	7,60	10,20	12,90	12,80	13,90	10,50
<i>C. tropicalis</i>	4,70	7,10	9,00	10,80	6,20	7,50	8,30	4,80
<i>C. kefir</i>	0,90	2,10	1,70	1,30	0,90	2,10	3,60	3,40
<i>C. parapsilosis</i>	3,50	2,20	1,70	1,40	1,60	1,40	2,00	1,30
<i>C. guilliermondii</i>	0,40	0,30	0,30	0,40	0,50	0,40	0,60	1,30
<i>C. lusitanae</i>	0,80	0,70	1,40	1,30	2,00	1,20	1,80	1,70
<i>C. inconspicua</i>		0,08	0,06	0,03	0,02	0,06	0,02	0,10
<i>C. zeylanoides</i>			0,03	0,09	0,04	0,05	0,02	
<i>C. pelliculosa</i>			0,03				0,04	0,05
<i>C. famata</i>				0,06	0,02	0,10		
<i>C. lipolytica</i>				0,03		0,20	0,02	0,05
<i>C. rugosa</i>			0,09	0,06	0,10	0,10		0,02
<i>Geotrichum candidum</i>	0,09	0,04	0,09	0,27	0,20	0,20	0,40	0,70
<i>Geotrichum capitatum</i>		0,08	0,20			0,63	0,04	0,20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,90	1,50	0,90	1,50	3,50	3,20	5,60	5,50
<i>Rhodotorula sp.</i>	0,60	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,30	0,50
<i>Trichosporon sp.</i>	2,10	3,20	3,10	0,30	0,20		0,02	
<i>Trichosporon asahii</i>				1,10	0,50	1,22	1,50	1,70
<i>Trichosporon inkin</i>							0,02	
<i>Candida sp.</i>		0,10	1,00	0,60	0,50	0,70	0,50	1,60
<i>Cryptococcus albidus</i>				0,06	0,02		0,02	0,02
<i>Cryptococcus neoformans</i>				0,06				
<i>Cryptococcus sp.</i>					0,02			
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>								0,02

Tab. 3. Přehled vyšetření v mykologické laboratoři v letech 1998–VIII. 2005 – plísňe

Rok	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	VIII.2005
počet vyšetření	2508	4958	6119	6335	13402	14393	15048	10683
% pozitivních	42,90	51,50	51,30	52,40	34,00	40,70	33,50	38,5
<i>Acremonium sp.</i>								0,05
<i>Aspergillus candidus</i>				0,03			0,02	
<i>Aspergillus fumigatus</i>		0,35	0,70	0,63	0,80	0,50	0,70	0,30
<i>Aspergillus flavus</i>		0,08		0,36	0,20	0,08	0,20	0,02
<i>Aspergillus niger</i>		0,30	0,60	0,36	0,10	0,10	0,40	0,10
<i>Chrysosporium sp.</i>			0,03		0,08			
<i>Fusarium sp.</i>				0,03	0,02	0,01		
<i>Fusarium solani</i>								0,20
<i>Aureobasidium sp.</i>				0,03			0,02	
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>			0,03					
<i>Paecilomyces varioti</i>						0,01		
<i>Mucor circinelloides</i>						0,01		
<i>Aspergillus terreus</i>						0,05		
<i>Rhizomucor pusillus</i>					0,2	0,22		
<i>Mycocladus corymbifer</i>							0,08	0,02

VÝSLEDKY

V mykologické laboratoři jsme u hematologických pacientů ze dvou pracovišť VFN Praha nejčastěji diagnostikovali kvasinku *Candida albicans* (tab. 4, 5). Dalším závažným patogenem je *Candida glabrata*, a to pro svou velmi vysokou rezistenci k itraconazolu (E-test) a často i flukonazolu a ketokonazolu. Další

místa patří *Candida krusei* s primární rezistencí k flukonazolu, *Candida tropicalis* a *Saccharomyces cerevisiae*. I u této poslední kandidy se objevuje rezistence na itraconazol a flukonazol. U několika pacientů jsme identifikovali zástupce rodu *Aspergillus* (nejčastěji *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*). Tyto kmeny jsou citlivé k amfotericinu, vorikonazolu a některé i k itraconazolu (tab. 5).

Tab. 4. Nálezy kvasinek a plísni ze dvou hematologických pracovišť v Praze v letech 2002–VIII. 2005

Rok	zkratka	2002	2003	2004	VIII. 2005
Název mikroorganismu					
<i>Candida albicans</i>	CAL	1793	1873	1681	1096
<i>Candida glabrata</i>	CGL	476	843	726	420
<i>Candida guilliermondii</i>	CGU	6	18	20	43
<i>Candida inconspicua</i>	CIN	1	4	1	5
<i>Candida kefyr</i>	CKE	36	117	142	117
<i>Candida krusei</i>	CKR	545	682	615	361
<i>Candida lusitanae</i>	CLU	67	35	42	26
<i>Candida lipolytica</i>	CLI		1		2
<i>Candida parapsilosis</i>	CPA	29	23	58	18
<i>Candida pelliculosa</i>	CPE				1
<i>Candida rugosa</i>	CRU	4	4		1
<i>Candida species</i>	CAN	19	22	17	52
<i>Candida tropicalis</i>	CTR	144	249	173	63
<i>Candida zeylandoides</i>	CZE	2			
<i>Cryptococcus albidus</i>	CRA			1	2
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	CRU				1
<i>Geotrichum candidum</i>	GCN	8	25	18	27
<i>Geotrichum capitatum</i>	GCA		25	2	7
<i>Rhodotorula species</i>	RHO	10	13	14	18
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SCE	156	174	278	205
<i>Trichosporon asahii</i>	TRI	25	80	72	57
<i>Aspergillus flavus</i>	AFL	3	1	1	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AFU	21	17	7	4
<i>Aspergillus niger</i>	ANI	1		3	1
<i>Aureobasidium species</i>	AUR			1	
<i>Fusarium solani</i>	FUS				7
<i>Mucor circinelloides</i>	MCI		1		
<i>Mycocladius corymbifer</i>	MCO			3	
<i>Rhizomucor pusillus</i>	RPU	7	14		

Tab. 5. Pořadí výskytu kvasinek ze dvou hematologických pracovišť v Praze

1. pracoviště	2. pracoviště
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>

ZÁVĚR

Z našich výsledků vyšetření materiálů od hematologických pacientů vyplývá, jak velmi důležitá je u závažných mykotických infekcí identifikace kmene a vyšetření jeho citlivosti k jednotlivým antimykotikům.

Zkratky

CNS – centrální nervové soustavy
GIT – gastrointestinální trakt

LITERATURA

1. **Haber, J. et al.:** Systémové mykózy a jejich léčba. Praha, Galén, 1995.
2. **Tomšíková, A.:** Mykotická onemocnění u rizikových pacientů. Praha, UK vydavatelství Karolinum, 1992.
3. **Kurtzman, C. P., Fell, J. W.:** The yeast, a taxonomic study. Amsterdam, Elsevier, 1998.
4. **de Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M. J.:** Atlas of clinical fungi, Centaalbureau voor Schimmelcultures. Universitat Rovira i Virgili, 2000.

PŮVODNÍ PRÁCE

Vliv různých aplikačních forem estrogenní substituční terapie na hladiny C-reaktivního proteinu

Fait T., ¹Vrablík M., ²Koštířová M., ²Trnková B.

Gynekologicko-porodnická klinika I. LF UK a VFN, Praha

¹III. interní klinika I. LF UK a VFN, Praha

²Ústav klinické biochemie I. LF UK a VFN, Praha

ABSTRAKT

Východisko. Jedním z nezávislých rizikových faktorů kardiovaskulárních nemocí je C-reaktivní protein. Cílem studie bylo zjistit jeho změny při různých aplikačních formách estrogenní substituční terapie.

Metody a výsledky. V prospektivní randomizované 12týdenní intervenční studii byl v cross-over designu podáván estradiol perorálně v dávce 2 mg denně nebo transdermálně v dávce 50 µg denně. Zařazeno bylo 41 zdravých postmenopauzálních žen do 12 týdnů od chirurgické kastrace s průměrným věkem 49±6 let. Průměrná bazální hodnota hsCRP byla 3,3 mg/l. Po perorální léčbě došlo k signifikantnímu ($p=0,05$) nárůstu hladiny na 4,8 mg/l. Transdermální léčba nevyvolala významné změny ($p=0,87$). Rozdíl mezi vlivem perorální a transdermální estrogenní substituční terapie na hladinu hsCRP je statisticky významný s $p=0,002$.

Závěry. Transdermální estrogenní terapie je z pohledu hsCRP šetrnější k cévní stěně. Rozdíl proti perorální léčbě je patrný i při časném zahájení hormonální substituce.

Klíčová slova: hormonální substituční terapie, hsCRP, kardiovaskulární nemoci.

ABSTRACT

Fait T., Vrablík M., Koštířová M.: Changes of hsCRP Levels Induced by Different Application Ways of Estrogene Replacement Therapy

Background. C-reactive protein is one of the independent risk factors of cardiovascular diseases. The aim of study was to find changes of hsCRP levels during transdermal and oral application of estrogen replacement therapy.

Methods and Results. Two application ways were used for 12 weeks: oral estradiol 2 mg/day and transdermal estradiol 50 µg /day (7-day patches). 41 healthy women with average age 49±6 years were randomised into prospective cross-over designed study. The average level of hsCRP before therapy was 3,3 mg/l. Elevation on 4,8 mg/l after the oral therapy was significant ($p=0,05$). Transdermal estrogene therapy did not induce any significant ($p=0,87$) changes. Differences between oral and transdermal therapy were significant ($p=0,002$).

Conclusions. The transdermal application of the estrogene replacement therapy is more safety for a vessel wall from the view of hsCRP levels. Differences between transdermal and oral application way are apparent even in case of the early start of hormone replacement therapy.

Key words: hormone replacement therapy, high sensitive C-reactive protein, cardiovascular diseases.

Fa.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 571–574.

Vliv hormonální substituční terapie (HRT) na riziko ischemické choroby srdeční (ICHS) a kardiovaskulárních nemocí byl široce diskutován. Observační studie přinesly mnoho dat o ochranném vlivu HRT, nicméně prospektivní randomizované studie tato pozorování nepotvrdily. Z indikací HRT tak zmizela sekundární prevence ICHS. Primárně prevence je dále zkoumána. Velký význam má nejen složení, dávka a aplikační cesta HRT, ale také časování zahájení léčby (1, 2).

Vliv HRT na lipidový profil pacientek je i ve studiích, kde došlo ke zvýšení kardiovaskulárního rizika, pozitivní (3). Proto je zkoumáno ovlivnění dalších nezávislých rizikových faktorů aterosklerózy.

Jeden z obecně uznávaných patofyziologických mechanismů aterosklerózy je zánět cévní stěny. Riziko komplikací aterosklerózy je úměrné hladinám prozánětlivých cytokinů zejména interleukinů IL-1 a IL-6 a reaktantů akutní fáze, jako je C-reaktivní protein (CRP) (4, 5). CRP je produkován zejména v hepatocytech pod vlivem IL-6,

TNF α a IL-1 β . Patří do skupiny pozitivních proteinů akutní fáze (APP) a biochemicky do skupiny pentraxinů. Dle elektroforetické pohyblivosti se jedná o γ -globulin o molekulární váze 110 kDa s fyziologickými hladinami do 10 mg/l a poločasem eliminace menším než 0,05 dne (6). CRP je vysoce citlivým markerem zánětu a poškození tkání. Při užití vysoce citlivých (hs – high sensitive) souprav bylo zjištěno, že lehké zvýšení CRP běžnými soupravami nedetekovatelné je citlivým nezávislým markerem pro riziko ICHS a aterosklerózy obecně. Je silným markerem pro individuální riziko ruptury aterosklerózy plátu, a tedy i pro riziko infarktu myokardu, nemoci periferních cév u jedinců bez příznaků, ale i s anamnézou infarktu myokardu, nestabilní anginy pectoris či akutní ICHS (7). Studie ukazují, že hsCRP je dokonce markerem endoteliální dysfunkce u pacientů bez aterosklerózy (8).

Zatímco někteří autoři nedoporučovali rutinní určování hsCRP pro stanovení kardiovaskulárního rizika, vzhledem k tomu, že není

stanovena jasná hranice patologie a přesná prediktivní hodnota (9), stanovila ve stejném roce American Heart Association za normální hranici hodnotu ≤ 3 mg/l (10).

P. M. Ridker (11) srovnával další rizikové faktory ICHS. V souboru 28 263 žen se hsCRP ukázalo jako silný prediktor s relativním rizikem (RR) 4,4 s 95% konfidenčním intervalem 2,2–8,9 při srovnání žen z nejnižšího a z nejvyššího kvartilu hodnot. Pro srovnání RR pro amyloid A bylo 3, s-ICAM-1 (solubile intracellular adhesion molecule type I) 2,6, IL-6 2,2, homocystein 2, celkový cholesterol 2,4, LDL cholesterol 2,4, poměr celkového cholesterolu k HDL cholesterolu 3,4 a HDL cholesterol 0,3. V multivariální analýze se jako nezávislé faktory jevíly hsCRP a poměr celkový cholesterol/HDL cholesterol.

V naší studii jsme sledovali změny hladin hsCRP v závislosti na aplikační formě čistě estrogenní substituční terapie (ET) ve skupině žen s časným startem substituční terapie.

SOUBOR ŽEN A POUŽITÉ METODY

Prospektivní studie probíhala od září 2003 do března 2005. Zařazeno bylo 45 žen s příznaky akutního klimakterického syndromu, 41 žen studii ukončilo a jejich data byla analyzována. Ženy byly 6 až 12 týdnů po operačním odstranění ovaríí a dělohy. Před operací neměly obtíže svědčící pro estrogenní deficit. Průměrný věk souboru byl 49 ± 6 let (32–57 let). Byly dodrženy známé kontraindikace HRT (12). V cross-over designu byly randomizovány pro perorální nebo transdermální ET podávanou vždy 12 týdnů s výměnou aplikační formy po týdenní wash-out periodě. Podávány byly 2 mg 17beta-estradiolu (E2) denně (Estrofem tbl, Novo Nordisk) nebo jejich ekvivalent v transdermální terapeutickém systému uvolňujícím 50 μ g E2 denně s týdenní aplikací (Climara emp, Schering).

Vyšetření byla prováděna na počátku studie, po 12 a 25 týdnech, tedy v posledním týdnu léčební intervence. Odběry žilní krve byly prováděny po minimálně 10hodinové lačnění mezi 8 a 9 hodinou ránní pomocí Vacutainer systému do zkumavek obsahujících EDTA. Vzorky byly skladovány na ledu a centrifugovány do 1 hodiny po odběru. Plazma byla zmrazena na -80 °C.

Ke stanovení hsCRP byla použita Souprava pro ultrasenzitivní stanovení C-reaktivního proteinu, SevaPharma a.s., kalibrovaná v rozsahu 0,5–10 mg/l. Principem stanovení je imunoturbidimetrie při vlnové délce 620 nm. Aglutinace CRP ve vzorku a protilátky pro CRP navázané na latexové částice je detekována jako změna absorbance. Velikost změny absorbance je úměrná množství CRP. Všechna stanovení byla prováděna v doubletech.

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno párovým t-testem.

Studie byla schválena Etickou komisí VFN Praha.

VÝSLEDKY

Průměrná bazální hodnota hsCRP byla 3,3 mg/l. Po perorální ET došlo k signifikantnímu ($p=0,05$) nárůstu hladiny na 4,8 mg/l. Po transdermální léčbě hladina hsCRP mírně poklesla na 2,8 mg/l, tato změna však není statisticky významná ($p=0,87$). Rozdíl mezi vlivem perorální a transdermální ET na hladinu hsCRP je statisticky významný s $p=0,002$ (tab. 1).

DISKUZE

Je popsáno několik základních rozdílů mezi perorální a transdermální aplikační formou hormonální terapie. Při transdermální terapii je dosaženo vyrovnanějších plazmatických hladin estrogenů a je dosaženo vynechání metabolické zátěže jater ve smyslu „first-pass efektu“. To platí i pro perkutánní a subkutánní aplikační formy. Transdermální terapie je proto považována za obecně metabolicky šetrnější při současném nulovém rozdílu ve vlivu na akutní klimakterický syndrom, urogenitální atrofii a prevenci osteoporózy (13).

Vzhledem k minimálnímu odstupů od začátku iatrogeně nastole-

ného estrogenního deficitu, můžeme léčbu v naší skupině považovat za časně zahájenou. To by mělo být spojeno s převahou přínosů léčby nad riziky (14).

Podávání HRT je spojeno s elevací hsCRP (15). Zvýšení CRP bylo zjištěno i v opakovaně citovaných studiích HERS (16) a PEPI (17). V 383členné podskupině studie PEPI bylo pro všechny intervence (0,625 mg CEE, 0,625 mg CEE + 10 mg MPA sekvenčně, 0,625 mg CEE + 2,5 mg MPA kontinuálně, 0,625 mg CEE + 200 mg progesteron sekvenčně) zjištěno významné ($p=0,001$) zvýšení hsCRP oproti placebo po 12 i 36 měsících bez rozdílu mezi intervenčními větvemi studie.

Studie opakovaně ukazují na rozdíly mezi jednotlivými druhy HRT ve smyslu složení (ET vs. EPT) a aplikační cesty (perorální vs. transdermální) ve vlivu na riziko aterosklerózy (18).

Některé studie nenacházejí významné změny hsCRP po perorální EPT. K. K. Koh (19) v prospektivní dvojité slepé studii 30 postmenopauzálních žen s cross-over designem sledoval vliv kombinace 0,625 mg CEE a 100 mg mikronizovaného progesteronu nebo 2,5 mg MPA na faktory koagulace. Zjistil pouze nesignifikantní ($p=0,107$) tendenci k zvýšení hladin CRP pro oba druhy EPT.

Výsledky se shodují s většinou dalších studií na toto téma. Populační studie 975 žen ve věku 40–59 let potvrdila zvýšení hsCRP po perorální HRT na rozdíl od léčby transdermální (20). Ke stejnému závěru dospěla i B. Zegura (21). Skupina 43 žen dostávala po 28 týdnů perorální nebo transdermální estradiol. Perorální ERT zvýšila hsCRP z 2,15 na 3,41 mg/l ($p=0,04$), zatímco po transdermální léčbě došlo pouze k nesignifikantním změnám ($p=0,13$).

Tab. 1. Změny hladin hsCRP

	Bazální hodnoty	po perorální ET	po TTS ET
průměr	3,3	4,8	2,8
směrodatná odchylka	3,0	4,8	2,0
medián	2,7	3,7	2,0
minimum	0,5	0,6	0,5
maximum	13,2	19,6	7,1

H. Bukowska (22) ve skupině 61 zdravých časně postmenopauzálních žen (průměrný věk 52,3 roku) zjistila po perorální terapii (estriol 2 mg + estradiolvalerát 1 mg + levonorgestrel 0,25 mg) po 3 měsících tendenci k významně vyšší ($p=0,0356$) elevaci hladin hsCRP ve srovnání s kombinací transdermálního estradiolu 50 μ g/den s progesteronem. V perorální skupině došlo k vzestupu hsCRP ve významně ($p=0,015$) vyšším procentu žen než v transdermální (61 % vs. 39 %).

Ve dvojité slepé studii (23) bylo 152 zdravých postmenopauzálních žen randomizováno mezi placebo, perorální E2 1 mg, transdermální E2 50 μ g/den, E2 1 mg sekvenčně doplněný 25 μ g gestodenu. HsCRP signifikantně vzrostlo po perorální čistě estrogenní léčbě oproti placebo ($p=0,004$), transdermální ($p=0,003$) i kombinované perorální léčbě ($p=0,009$). Bazální hodnoty CRP byly signifikantně závislé na body mass indexu (BMI) a výšce diastolického tlaku krve.

Srovnání standardní dávky 0,625 mg konjugovaných estrogenů (CEE) s nízkou dávkou 0,3 mg vždy v kombinaci se 100 mg progesteronu (24) v randomizované dvojité slepé studii 57 žen v dvouměsíčním cross-over designu ukázala, že zatímco při konvenční dávce došlo k signifikantnímu ($p<0,001$) vzestupu hsCRP, při nízké dávce byly změny nevýznamné ($p=0,874$).

Populační studie 256 zdravých postmenopauzálních žen prokázala, že uživatelky perorálních CEE (2,7 mg/l, $p=0,0009$) a tibolonu

(2,6 mg/l, $p=0,0001$) mají vyšší hladiny hsCRP než uživatelky transdermální léčby (1,3 mg/l) a ženy bez léčby (1,2 mg/l) (25).

Ojedinelé je sdělení o významném ($p=0,006$) poklesu hsCRP po percutánní estrogení léčbě (26).

Jednoznačně negativní hodnocení elevace hsCRP relativizuje „Mohučská teorie“. Dle ní je na počátku aterogeneze elevace CRP protizánětlivá, hsCRP je nutné k aktivaci komplementu a následnému odstranění LDL cholesterolu. Později CRP destabilizuje ateromové pláty podporou tvorby tkáňových metaloproteináz, enzymu NO-syntázy a proteinu p22^{phox} (27).

Další možností interpretace indukce nárůstu hsCRP perorální hormonoterapií je, že se nejedná o start zánětlivého procesu, ale pouze o projev indukce jaterního metabolismu. V souboru 346 postmenopauzálních žen (průměrný věk 66 let) ve vysokém riziku kardiovaskulární příhody (28) došlo již po 3 měsících k významnému vzestupu hsCRP o 76 %. Po 36 měsících byl zpětně hodnocen výskyt kardiovaskulárních příhod. Pacientky s komplikacemi měly významně ($p<0,05$) vyšší hladiny hsCRP ($1,94\pm 0,61$ vs. $1,43\pm 0,21$). Zvýšení hladiny hsCRP po EPT bylo významně ($p<0,05$) vyšší u pacientek s komplikacemi (81 ± 12 % vs. 76 ± 21 %). HsCRP bylo predikcí komplikací pouze při současné elevaci IL-6, která zde měla vyšší prediktivní hodnotu pro kardiovaskulární příhody. Zvýšení hsCRP při podávání HRT tak může být pouze jeho metabolickým důsledkem a nikoli markerem zánětu. Tuto teorii podporuje rovněž prospektivní studie případů a kontrol provedená v rámci WHI (Women's Health Initiative), kde bazální hodnoty zánětlivých markerů měly na rozdíl od elevace CRP indukované HRT prediktivní význam pro kardiovaskulární komplikace (29).

AL Eilertsen (30) analyzovala data ze dvou placebem kontrolovaných studií – studie EVTET (Estrogen in Venous Thromboembolism Trial) zahrnující 140 postmenopauzálních žen s anamnézou tromboembolické nemoci užívající 2mg E2 + 1 mg NETA a EWA (Estrogen Women Atherosclerosis) se 118 postmenopauzálními ženami s angiograficky ověřenou ischemickou chrobou srdeční užívající transdermální estradiol 50 μ g/den oponovaný 5 MPA po 14 dní 1x za 3 měsíce. Po třech měsících perorální HRT se hsCRP významně ($p=0,001$) zvýšilo o průměrně 79 % a elevace přetrvávala i po 12 měsících. Elevace CRP byla vyšší ve skupině žen, u kterých později došlo k rekurenci TEN (328 % vs. 54 %). Při transdermální léčbě nedošlo k významným změnám hladin. Ani při jednom typu léčby nedošlo k elevaci dalších zánětlivých markerů například IL-6.

Perorální HRT zvyšuje hladiny hsCRP rovněž ve srovnání s neutrálním vlivem raloxifenu (31) a tibolonu (32).

ZÁVĚR

Protichůdné výsledky intervenčních a observačních studií vlivu HRT na ICHS vyzývají k hledání příčin tohoto rozporu. Jednou cestou je pečlivá reanalýza charakteristik sledovaných souborů, ze které vyplývá význam časování zahájení HRT, jejího složení i aplikační cesty. Druhá cesta se snaží v multifaktoriálních mechanismech aterogeneze ozřejmit vliv HRT. Jedním z obecně uznávaných nezávislých faktorů aterogeneze je hsCRP. Jeho zvýšení je považováno za marker endoteliální dysfunkce nebo nestability ateromového plátu.

V referované prospektivní studii jsme prokázali statisticky významný rozdíl ve změnách hladin hsCRP při transdermální a perorální aplikaci ET. Při perorální aplikaci dochází k významnému nárůstu hladiny hsCRP. Podávání transdermální formy ET má neutrální vliv na hladiny hsCRP.

Naše nálezy jsou v souladu s dostupnými literárními údaji. Z pohledu hladin hsCRP se transdermální estrogení substituční terapie ukazují jako bezpečnější pro cévní stěnu.

Zkratky

BMI	– body mass index
CEE	– konjugované ekvinní estrogény
CRP	– C-reaktivní protein
E2	– 17 beta estradiol
AT	– estrogení substituční terapie
EPT	– estrogen-gestagení substituční terapie
HDL	– lipoprotein o vysoké hustotě
HRT	– hormonální substituční terapie
hs	– high sensitive
hsCRP	– C-reaktivní protein určený vysoce citlivou diagnostickou metodou
ICHS	– ischemická choroba srdeční
IL	– interleukin
LDL	– lipoprotein nízké hustoty
MPA	– medroxyprogesteronacetát
NETA	– norethisteronacetát
RR	– relativní riziko
s-ICAM-1	– soluble intracellular adhesion molecule type I
TEN	– tromboembolická nemoc
TTS	– transdermální terapeutický systém

LITERATURA

1. **Fait, T., Málková, J., Živný, J.:** Vliv hormonální substituční terapie na kardiovaskulární systém. *Čes. Gynek.*, 2002, 67, s. 285-293.
2. **Fait, T., Vokrouhlická, J., Vrablík, M. et al.:** Současné postavení hormonální substituční terapie. *Čas. Lék. čes.*, 2004, 143, s. 447-452.
3. **Fait, T., Vrablík, M.:** Změny lipidového spektra při užívání hormonální substituční terapie. *Čas. Lék. čes.*, 2004, 143, s. 101-105.
4. **Libby, P., Ridker, P. M., Maseri, A.:** Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002, 105, s. 1135-1143.
5. **Yeh, E. T. H., Anderson, V., Pasceri, V. et al.:** C-reactive protein linking inflammation to cardiovascular complications. *Circulation*, 2001, 103, s. 974-975.
6. **Maruna, P.:** Proteiny akutní fáze. Maxdorf, Praha, 2004, s. 282.
7. **Ridker, P. M.:** HSCRP Potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*, 2001, 103, s. 1813-1818.
8. **Pasceri, V., Willerson, J. T., Yeh, E. T.:** Direct proinflammatory effect of CRP on human endothelial cells. *Circulation*, 2000, 102, s. 2165-2168.
9. **Sellmayer, A., Limmert, T., Hoffmann, U.:** High sensitivity C-reactive protein in cardiovascular risk assessment. CRP mania or usefull screening? *Int. Angiol.*, 2003, 22, s. 15-23.
10. **Perason, T. A., Mensah, G. A., Alexander, R. W. et al.:** AHA/CDC scientific statement. Markers of inflammation and cardiovascular disease. *Circulation*, 2003, 107, s. 499-511.
11. **Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Buring, J. E. et al.:** C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *NEJM*, 2000, 342, s. 836-843.
12. **Čepický, P., Burdová, M., Cibula, D. et al.:** Doporučení k hormonální terapii a substituci perimenopauzy a postmenopauzy. *Čes. Gynek.*, 2003, 68, s. 125-127.
13. **Jeníček, J.:** Hormonální substituční terapie a klimakterium. Praha, Grada., 2001, 101 s.
14. **Salpeter, S. R., Walsh, J. M. E., Greyber, E. et al.:** Mortality associated with HRT in younger and older women. *J. Gen. Intern. Med.*, 2004, 19, s. 791-804.
15. **Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Rifai, N. et al.:** HRT and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation*, 1999, 100, s. 712-722.
16. **Hulley, S., Grady, D., Bush, T. et al.:** Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA*, 1998, 280, s. 605-613.
17. **Cushman, M., Legault, C., Barret-Connor, E. et al.:** Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins the postmenopausal estrogen/progestin intervention (PEPI) study. *Circulation*, 1999, 100, s. 717-722.

18. **Modena, M. G., Sisoni, P., Mueck, A. O. et al.:** New evidence regarding HRT is urgently required. Transdermal postmenopausal hormone therapy differs from oral hormone therapy in risk and benefits. *Maturitas*, 2005, 52, s. 1-10.
19. **Koh, K. K., Ahn, J. Y., Kim, D. S. et al.:** Effect of HRT on tissue factor activity, C-reactive protein, and the TFPI. *Am. J. Cardiology*, 2003, 91, s. 371-373.
20. **Lowe, G. D., Upton, M. N., Rumley, A. et al.:** Different effects of oral and transdermal HRT on factor IX, APC resistance, t-PA, PAI and C-reactive protein – a cross-sectional population survey. *Tromb. Haemost.*, 2000, 86, s. 550-556.
21. **Zegura, B., Keber, I., Sebestjen, M. et al.:** Different effects of oral and transdermal estradiol replacement on inflammatory markers. *Climacteric*, 2000, 5 (Suppl. 1), s. 99.
22. **Bukowska, H., Stanosz, S., Zochowska, E. et al.:** Does the type of HRT affect lipoprotein (a), homocystein, and C-reactive protein levels in postmenopausal women? *Metabolism*, 2005, 54, s. 72-78.
23. **Post, M. S., van der Mooren, M. J., Stehouwer, C. D. A. et al.:** Effects of transdermal and oral oestrogen replacement therapy on C-reactive protein levels in postmenopausal women: a randomised, placebo-controlled trial. *Thromb. Haemost.*, 2002, 88, s. 605-610.
24. **Koh, K. K., Shin, M. S., Sakuma, I. et al.:** Effects of conventional or lower doses of HRT in postmenopausal women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, 24, s. 1516-1521.
25. **Prelevic, G. M., Kwong, P., Byrne, D. J. et al.:** A cross-sectional study of the effects of HRT on the cardiovascular disease risk profile in healthy postmenopausal women. *Fertil. Steril.*, 2002, 77, s. 945-951.
26. **Kvasnička, J., Donát, J., Šormová, I.:** Serum C-reactive protein, SE-selectin, SICAM-1 and alpha-2-makroglobulin concentrations in women with percutaneous 17-beta-estradiol substitution. *Climacteric*, 2000, 5 (Suppl. 1), s. 151.
27. **Vitale, C., Gebara, O., Mercurio, G. et al.:** Value of C-reactive protein levels and IL-6 in predicting events levels in women at increased cardiovascular risk. *Maturitas*, 2005, 50, s. 239-246.
28. **Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rossouw, J. E. et al.:** Inflammatory biomarkers, HRT, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the WHI observational study. *JAMA*, 2002, 288, s. 980-987.
29. **Kuneš, P.:** CRP v patogenezi aterosklerózy: přednosti a úskalí „Mohučské hypotézy“. *Čas. Lék. čes.*, 2005, 144, s. 25.
30. **Eilertsen, A. L., Hoibraaten, E., Os, I. et al.:** The effect of oral and transdermal HRT on CRP levels and other inflammatory markers in women with high risk of thrombosis. *Maturitas*, 2005, 52, s. 111-118.
31. **Walsh, B. W., Paul, S., Wild, R. A. et al.:** The effects of HRT and raloxifene on C-reactive protein and homocysteine in healthy postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 85, s. 214-218.
32. **Koh, K. K., Ahn, J. Y., Jin, D. K. et al.:** Significant differential effects of HT or tibolone on markers of cardiovascular disease in postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-control, crossover study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003, 23, s. 1889-1889.

Podpořeno grantem IGA MZ ČR NB/7588-3.

KOMENTÁŘ

K článku autorů Fait T., Vrablík M., Koštířová M. „Vliv různých aplikačních forem estrogenní substituční terapie na hladiny C-reaktivního proteinu“

C-reaktivní protein patří mezi reaktanty akutní fáze, ale také ho řadíme k nezávislým rizikovým faktorům aterosklerózy. Jeho zvýšení je dávan do souvislosti s rizikem akutního infarktu myokardu. V listopadovém čísle (11/2005) *Clinical Chemistry* byly publikovány dvě práce k této problematice. Ze studie analyzující práce z let 1966–2005 vyplývá, že vyšetření CRP při urgentním příjmu pacienta nemá význam pro diagnostiku akutního koronárního syndromu. Plocha pod křivkou celkové ROC křivky dosahovala hodnot 0,61. CRP patří mezi nejčastěji studované proteiny u akutního koronárního syndromu a jeho prevalence byla 16% s rozmezím od 3–40%. CRP se uplatňuje jako nástroj stratifikace rizika u pacientů s rizikovými faktory aterosklerózy a u populace nemocných se syndromem anginy pectoris.

In vivo biologie CRP naznačuje jeho nízkou specifitu u postižení koronárních cév. Jaterní transkripce a translace CRP stoupá jako odpověď na „zánět“ vyvolaný řadou příčin zahrnující infekci, depresi, nádorový proces, nemoci pojiva, žilní trombózu a řadu dalších podnětů. Je si třeba uvědomit, že jeho koncentrace závisí na rychlosti jeho syntézy jaterními buňkami.

Zvstup CRP je dávan do souvislosti s vystupňovanou zánětlivou odpovědí u nekrózy buněk myokardu. Zvýšení CRP při provedení percutánní koronární intervence je nezávislý predikční faktor úmrtí nebo infarktu myokardu. Odpověď CRP na výkon, který stimuluje zánětlivou reakci, byl eliminován.

Uvedená práce sleduje vztah odlišné aplikace hormonální substituční terapie (HRT) na jeden rizikový faktor aterosklerózy, a to CRP. Autoři popisují snížení CRP při transdermální aplikaci oproti perorální. Řada studií popisuje rozdíly mezi jednotlivými druhy HRT v závislosti na složení přípravku, což se může projevit různou stimulací signálních drah hepatocytu. K uvedeným studiím v diskuzi lze konstatovat, že řada z nich studovala relativně malý počet pacientek a většinou hodnotily pouze CRP a nikoliv další významné rizikové faktory aterosklerózy, jako jsou LDL-cholesterol, homocystein a řada dalších. Problémem pro srovnání studií je rozdílná doba sledování pacientek, aplikační cesta i složení HRT. Lze souhlasit s autory, že perorální HRT snadněji indukuje jaterní metabolismus ve srovnání s transdermální aplikací. Nepochybný závěr studie pro praktickou medicínu je následující: Jestliže CRP stoupá při perorální aplikaci HRT a CRP je nezávislý rizikový faktor aterosklerózy, volme raději, než další studie objasní příčiny této změny a důsledky, „bezpečnější“ transdermální aplikaci HRT.

prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.
Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN
128 08 Praha 2, U Nemocnice 2
fax: +420 224 962 848, e-mail: zimatom@cesnet.cz

PŮVODNÍ PRÁCE

Prenatální diagnostika v prvním trimestru gravidity v klinické praxi

Calda P., Víšková H., ¹Bezdičková D., ¹Zima T.

Gynekologicko-porodnická klinika I. LF UK a VFN, Praha

¹Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky I. LF UK a VFN, Praha

ABSTRAKT

Východisko. Skrininkový test na vrozené vývojové vady plodu dosud nabízený mezi 16.–20. týdnem těhotenstvím má při exaktním provedení senzitivitu 60–65 %, při falešné pozitivitě 5 %. Nově nabízený kombinovaný test v gestačním stádiu 11+0 až 13+6 týdně těhotenství umožňuje stanovit riziko Downova, Patauova a Edwardsova syndromu na základě věku těhotné a analýzy mateřského séra (hladin free beta hCG a PAPP-A) a hodnoty šíře šířového projasnění plodu stanovené ultrazvukem. Senzitivita kombinovaného testu pro záchyt Downova syndromu je 90 %, při falešné pozitivitě 5 %. Cílem je zavést novou metodiku a ověřit její proveditelnost v praxi. Zjistit senzitivitu a specifitu kombinovaného testu v našich podmínkách.

Metody a výsledky. Zhodnotili jsme výsledky kombinovaného testu u 2573 pacientek. Falešná pozitivita byla u 2,2 %. Z 6 plodů s trizomií 21 jsme identifikovali kombinovaným testem 5 (83 %). U 1 trizomického plodu s negativním kombinovaným testem byla při standardním ultrazvukovém vyšetření ve 21. týdnu těhotenství diagnostikována srdeční vada a indikována karyotypizace. Dále jsme identifikovali 4 plody s Edwardsovým a 1 plod s Turnerovým syndromem.

Závěry. Výhodou kombinovaného testu oproti biochemickému skríninku v II. trimestru je informace o výsledcích již v I. trimestru gravidity, vyšší senzitivita testu při nízké falešné pozitivitě, jasné výstupy, snadný audit a kontrola výsledků jednotlivých typů skríninku (ultrazvukového i biochemického). Podmínkou provádění skríninku vrozených vad v I. trimestru je dodržování přísné metodiky skríninku, jak ze strany sonografistů, tak i biochemických laboratorů a akceptování přísných podmínek auditu.

Klíčová slova: I. trimestr, prenatální diagnostika, biochemický skrínink.

ABSTRACT

Calda P., Víšková H., Bezdičková D., Zima T.: Prenatal Diagnostics During the First Trimester in the Clinical Praxis
Background. Biochemical screening test for Down's syndrome now offered in the 16th to 20th week of pregnancy reaches 60–65 % sensitivity with 5 % false positives. Newly introduced combined test done between 11+0 to 13+6 weeks of pregnancy, maternal serum biochemistry (free beta hCG and PAPP-A) and foetal nuchal translucency measurement, offer very early identification of Down's syndrome in foeti. The purpose of our study was the introduction of the new method and confirmation of the expected sensitivity and false positivity in our conditions.

Methods and Results. The combined test identified 5 of 6 (83 %) of Down's syndrome foeti from the studied group of 2573 pregnancies. The false positive rate was 2.2 %. Women aged 35 years or more represented 15% of our cohort. One Down's syndrome foetus with normal combined test was identified in the 21 week of pregnancy due to its heart failure which was diagnosed with ultrasound. Moreover, 4 foeti with Edwards- and one with Turner syndrome were identified.

Conclusions. In comparison with the second trimester biochemical screening, the first trimester combined test offers the information at the end of first trimester, it has higher sensitivity and low false positivity. The combined test gives clear outcomes, easy audit and control over ultrasound and biochemical results. Introduction of the first trimester screening requires strict adherence to the method both by the sonographer and the biochemical laboratory, and the acceptance of rigorous audit rules.

Key words: first trimester screening, prenatal diagnosis, biochemical screening.

Ca.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 575–577.

Skríninkový test na vrozené vývojové vady plodu nabízený od osmdesátých let 20. století všem těhotným v České republice je biochemický skrínink v II. trimestru, double test. Tento test stanovuje riziko Downova syndromu i dalších vrozených vývojových vad (VVV) u plodu na podkladě věku a váhy těhotné, délky těhotenství a stanovení dvou biochemických markerů – hCG a AFP v séru těhotné – odtud double test. V 90. letech minulého století se rozšířilo stanovení volného estriolu (uE3) a testu se

říkalo triple test. Velké procento laboratoří v současné době vypustilo stanovení nekonjugovaného estriolu pro jeho nestabilitu a vysokou falešnou pozitivitu výsledků a provádí opět double test. Senzitivita tohoto testu pro identifikaci plodu s Downovým syndromem je v ideálních podmínkách 60–65 % (procento postižených plodů, které jsou testem označeny za pozitivní) při falešné pozitivitě 5 % (procento zdravých plodů, které jsou testem označeny za pozitivní).

Nově nabízený skríninkový test VVV plodu pomocí tzv. kombinovaného testu v I. trimestru těhotenství umožňuje stanovit riziko Downova, Edwardsova a Patauova syndromu na základě věku těhotné ženy a analýzy mateřského séra (stanovení hladin free beta -hCG a PAPP-A v 10.–12. týdnu těhotenství) a hodnoty širše šíjového projasnění plodu v 12.–14. týdnu těhotenství (resp. v gestačním stáří 11^{+3} až 13^{+6}) stanovené ultrazvukem. V současné době jsou publikovány výsledky kombinovaného testu z multicentrických studií, které hodnotí data statistických souborů pacientek. Senzitivita kombinovaného testu pro záchyt Downova syndromu je 90%, při falešné pozitivitě 5% (1). Cílem práce bylo: 1. zavedení nové metodiky a ověření její proveditelnosti v praxi; 2. zjištění senzitivity a specifity kombinovaného testu v našich podmínkách.

POUŽITÉ METODY

Kombinovaný test nabízíme na Gynekologicko-porodnické klinice 1. LF UK a VFN v Praze od roku 2003. Vyšetřující jsou pro toto vyšetření certifikováni, jednotlivci i celé centrum podléhají pravidelnému auditu výsledků. (Centum fetální medicíny 1. LF UK a VFN je školicím centrem Fetal Medicine Foundation, London). Ošetřující gynekolog odešle pacientku v 10. až 12. týdnu těhotenství (resp. 9^{+0} až 11^{+6}) na náběr krve ke stanovení hladin free beta -hCG a PAPP-A do odběrového centra polikliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (biochemická laboratoř VFN je držitelem certifikace FMF k vyšetřování free beta -hCG a PAPP-A, garantující kvalitu a průběžným auditem skríninkového procesu). Výsledky analýzy biochemických markerů jsou zaneseny do počítačové databáze (Gynekologicko-porodnická databáze © Astraia Software, SRN), která je na síti přístupná laboratořím, Centru fetální medicíny i oddělení lékařské genetiky. Následně, se znalostí hodnot biochemických analytů, provádíme ultrazvukové stanovení šířky šíjového projasnění plodu (nuchální translucence) na přístroji GE Logiq 9. Hodnotu v mm zaneseme do databáze. Výsledek kombinovaného testu (tj. stanovení rizika Downova, Edwardsova a Patauova syndromu na podkladě věku těhotné, hladin free beta -hCG a PAPP-A a širše šíjového projasnění) pacientce sdělíme hned po ukončení vyšetření ultrazvukem. Vedle změřeni šíjového projasnění je provedeno i komplexní ultrazvukové vyšetření plodu – stanovení četnosti těhotenství, v případě vícečetného těhotenství stanovení chorionicity, ověření, resp. korekce datace těhotenství podle CRL, kontrola morfologie plodu. Ultrazvukem lze na konci I. trimestru vyloučit většinu závažných morfologických vad plodu (zaměřujeme se na tvar lebky, šířku mozkových komor, obličej plodu, tvar hrudníku a trupu plodu, základní srdeční anatomii, velikost močového měchýře, kontrolu struktury horních i dolních končetin, uzavěr neurální trubice a přední stěny břišní). Je-li výsledek kombinovaného testu negativní (tj., riziko je nižší než 1:300), považujeme skríninkový proces za uzavřený a další skrínink již těhotné nedoporučujeme (tj., biochemický skrínink ve II. trimestru již neprovádíme). Těhotné doporučujeme ultrazvukové vyšetření ve 20.–22. týdnu těhotenství se zaměřením na biometrii a morfologii plodu, zhodnocení množství vody plodové a polohu placenty.

VÝSLEDKY

Kompletní kombinovaný test jsme zhodnotili softwarem Astraia u 2573 pacientek. V souboru bylo 386 (15 %) žen starších 35 let. Výsledek těhotenství známe u 1733, u dalších 840 těhotných těhotenství dosud pokračuje. Celkem byl kombinovaný test pozitivní u 2,2 % těhotných. Ve zhodnoceném souboru 1733 těhotných se vyskytlo 6 plodů s Downovým syndromem. Z těchto 6 těhotných žen mělo pozitivní kombinovaný test 5 těhotných (83 %). „V našich rukou“ má tedy kombinovaný test 83% záchyt při 2,2% falešné pozitivitě. U trizomického plodu těhotné s negativním kombinovaným testem byla u nás při standardním ultrazvukovém vyšetření v 21. týdnu těhotenství diagnostikována srdeční vada a indikována karyotypizace. I tento plod byl tedy prenatalně diagnostikován. Dále jsme kombinovaným testem zachytili 4 plody s Edwardsovým syndromem a jeden plod se syndromem Turnerovým.

DISKUZE

Historie skríninku vrozených vad sahá do začátku osmdesátých let 20. století. Od té doby jsme začali těhotným ženám nabízet biochemický skrínink ve II. trimestru (mezi 16.–18. týdnem těhotenství). Test poskytuje dvě nezávislé informace: míru rizika Downova syndromu (kombinace věku, AFP, hCG, resp. uE3) a riziko rozštěpné neurální trubice a stěny břišní plodu (samotná hodnota AFP).

Test rozděluje populaci těhotných na dvě skupiny: s nízkým a zvýšeným rizikem. Těhotným se zvýšeným rizikem chromozomální aberace je nabídnuto diagnostické (nikoliv skríninkové) vyšetření. Tímto vyšetřením je amniocentéza, odběr plodové vody, ze které se stanovuje karyotyp plodu. V dobách, kdy ultrazvuk neměl ještě dostatečnou rozlišovací schopnost, přinášela důležitou informaci i hladina AFP v plodové vodě jako marker rozštěpových vad. Dnes se pro zvýšenou hladinu AFP již amniocentéza neindikuje a rozštěpová vada se vyloučí ultrazvukem. Ve své době byl biochemický skrínink ve II. trimestru velmi progresivní, ale několik zásadních nedostatků se nepodařilo odstranit nikdy:

1. poměrně vysoká falešná pozitivita (často se pohybující kolem 10 %, zvláště v laboratořích, které lpí na uE3) – při pozitivitě testu je indikována amniocentéza se stanovením karyotypu plodu;

2. nutnost provádět amniocentézu v pokročilém stadiu těhotenství s výsledkem v době, kdy těhotná již vnímá pohyby plodu – kolem 20. týdne těhotenství.

Senzitivita testu ve II. trimestru pro identifikaci plodu s Downovým syndromem je v ideálních podmínkách, resp. při *správném* provedení testu asi 60–65 % (procento postižených plodů, které jsou testem označeny za pozitivní) při falešné pozitivitě 5 % (procento zdravých plodů, které jsou testem označeny za pozitivní). *Správným* provedením testu se rozumí hlavně: 1) správná datace těhotenství; 2) správná manipulace s nabitým vzorkem krve těhotné a validní stanovení hladiny těchto markerů v biochemické laboratoři. Správné stanovení gestačního stáří v den odběru je důležité proto, že hladina všech těchto markerů (a od nich odvozené riziko chromozomální aberace) je závislá na gestačním stáří. Všechny požadavky jsou vyjádřeny v Doporučení pro provádění biochemického skríninku ve II. trimestru, který mají laboratoře i lékaři k dispozici od roku 2002.

Jaká je senzitivita a falešná pozitivita double testu v celé České republice, není známo. Výši senzitivity a falešné pozitivity můžeme pouze odhadovat z dostupných údajů o počtu provedených diagnostických invazivních vyšetření (amniocentézy, kordocentézy a odběru choriových klků) a počtu diagnostikovaných chromozomálních aberací. Podle dat z registru ÚZIS bylo v roce 2004 v České republice provedeno invazivní diagnostické vyšetření (amniocentéza, kordocentéza a odběr choriových klků) u více jak 16 % těhotných žen a těmito vyšetřeními bylo prenatalně diagnostikováno asi 68 % plodů s Downovým syndromem (Gregor, nepublikovaná data). Z těchto údajů vychází předpoklad, že pozitivita double testu je vyšší než 5 % vzhledem k tomu, že pozitivní double test tvoří 64 % indikací stanovení karyotypu plodu, tedy k invazivnímu vyšetření (2) (ostatními indikacemi jsou: věk těhotné, nález strukturální vady plodu na ultrazvuku, genetická vada v rodině nebo předchozí graviditě atd.). V neposlední řadě je biochemický skrínink metodou laboratorní a teprve na jejím základě jsou těhotné cíleně vyšetřovány ultrazvukem a prováděna invazivní diagnostika, oboje však až se znalostí biochemických výsledků v období, kdy má těhotná za sebou téměř polovinu gravidity, vnímá pohyby a plod se blíží do období viability.

Byla navržena řada kombinací biochemických testů v I. a II. trimestru. (3, 4, 7). Vedle námi prováděného kombinovaného testu jsou to zejména test integrovaný a sekvenční. **Integrovaný test** pracuje s informacemi (ultrazvuk, biochemie) zjištěnými v I. a II. trimestru, které se těhotné sdělí až po kompletním provedení všech

testů a integraci ve II. trimestru. Ultrazvukové vyšetření v I. trimestru probíhá tak, že těhotná často i s partnerem vidí průběh celého vyšetření. Při zjištění značně zvýšené hodnotě šíjového projasnění (od níž se odvíjí vysoké riziko chromozomální aberace plodu) můžeme u integrovaného testu sdělit těhotné výsledek až za několik týdnů, resp. až se znalostí výsledků biochemického testu ve II. trimestru. Při integrovaném testování nemůžeme nabídnout biopsii choria (invazivní test I. trimestru), ale jen amniocentézu (provádí se po 16. týdnu těhotenství).

Sekvenční test pracuje s výsledky odděleně, tj., těhotné s negativním testem v I. trimestru testuje znovu mezi 16.–18. týdnem (double test) a stanovujeme další míru rizika. Těhotným s pozitivním testem je hned v prvním trimestru nabídnuta karyotypizace (biopsie choria). Důvodem pro neprovádění skríninku ve II. trimestru při negativním testu v prvním trimestru (tedy důvodem k neprovádění sekvenčního testu) je hlavně to, že nárůst falešné pozitivivity (a tím nárůst počtu invazivních diagnostických výkonů) při provádění dvou testů po sobě není vyvážen odpovídajícím zvýšením senzitivity záchytu. Falešná pozitivita sekvenčního testu je 10 % (tedy dvojnásobná proti kombinovanému testu v I. trimestru), senzitivita asi 96 % (tedy o pouhých 6 % vyšší než senzitivita testu kombinovaného). Další již delší dobu známou modifikací biochemického skríninku ve II. trimestru, který se u nás nepoužívá, je zvyšování počtu analytů, takže se hovoří o quadruple – testu. Zvyšování počtu analytů zvyšuje nároky na kontrolu kvalitu jednotlivých stanovení, stoupá cena a zůstávají výhrady týkající se pozdní znalosti výsledků skríninku.

Z uvedených důvodů postupujeme tak, že je-li výsledek kombinovaného testu v I. trimestru negativní (tj., riziko je nižší než 1:300), považujeme skríninkový proces za uzavřený a další skrínink již těhotné nedoporučujeme (tj. biochemický skrínink ve II. trimestru již neprovádíme).

V přechodném období se prováděl biochemický skrínink v I. i ve II. trimestru, tzn., těhotné s negativním kombinovaným testem v I. trimestru podstoupily biochemické vyšetření i ve II. trimestru. V letech 2003–2005 došlo k významnému poklesu procenta pozitivivity biochemického skríninku ve II. trimestru (ze 4,7 % na 2,4 %). To bylo zřejmě způsobeno záchytem abnormálních těhotenství kombinovaným testem v I. trimestru.

Ve stadiu ověřování jsou další ultrazvukové markery Downova syndromu v I. trimestru, jako je přítomnost nosní kosti, patologický průtok ductus venosus a regurgitace mitrální chlopně plodu. Novým konceptem je stanovení individuálního rizika ve dvou krocích (tzv. individual risk-orientated two-stage first-trimester screening) (5). Tento koncept spočívá v provedení klasického kombinovaného testu a rozřazení těhotných do 3 skupin podle výše rizika (více jak 1:100; 1:100 až 1:1000; méně než 1:1000). Je-li riziko více než 1:100, považujeme test za jasně pozitivní a těhotné nabízíme invazivní vyšetření karyotypu plodu (odběr choriových klků nebo amniocentézu). Je-li riziko 1:100 až 1:1000, provedeme ještě druhý krok ultrazvukového skríninku, tj., zhodnotíme jeden z dalších ultrazvukových markerů Downova syndromu (přítomnost nosní kosti, průtok ductus venosus a regurgitace mitrální chlopně plodu). Je-li riziko z kombinovaného testu méně než 1:1000, pak tento test považujeme za jasně negativní a další krok ke stanovení rizika ve dvou krocích již neprovádíme. Tento koncept dosahuje stejného procenta záchytu jako kombinovaný test (tedy 90 %) při nižší falešné pozitivitě 2–3 % (4).

V našem souboru je 15 % matek starších 35 let, což je asi dvakrát více než v populaci České republiky (7,8 v letech 2003–2004)

(6). To je jedním z faktorů, který částečně vysvětluje přibližně dvakrát vyšší výskyt Downova syndromu v našem souboru než v běžné populaci.

ZÁVĚR

Na základě výsledků můžeme potvrdit, že výhodou kombinovaného testu oproti biochemickému skríninku ve II. trimestru je:

1. informace o výsledcích skríninku již v I. trimestru gravidity,
2. vyšší senzitivita záchytu Downova syndromu při stejné nebo nižší falešné pozitivitě a
3. jasné výstupy, snadný audit a kontrola výsledků jednotlivých typů skríninku (ultrazvukového i biochemického).

Je žádoucí, aby byl zatím stále ještě převažující biochemický skrínink ve II. trimestru postupně nahrazován prvotrimestrálním kombinovaným testem. Ale jen tam, kde budou podmínky pro dodržování přísné metodiky skríninku, jak ze strany sonografistů, tak i biochemických laboratoří. Všichni, kdo se budou chtít touto problematikou zabývat, musí ve svém vlastním zájmu a v zájmu svých pacientek, přijmout přísné podmínky auditu.

Přesto není možné zcela opustit vyšetřování ve II. trimestru už jen proto, že vždy bude skupina žen, která se dostaví k lékaři až ve II. trimestru a biochemický skrínink pro ně zůstane jedinou alternativou.

Zkratky

AFP	– alfafetoprotein
CRL	– crown-rump-length (temenokostřční vzdálenost)
hCG	– human chorionic gonadotropin
PAPP-A	– pregnancy associated plasma protein-A
VVV	– vrozená vývojová vada
uE3	– estriol

LITERATURA

1. **Bindra, R., Heath, V., Liao, A. et al.:** One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11-14 weeks: a prospective study of 15 030 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 2002, 20, s. 219-225.
2. **Calda, P., Víšková, H.:** Vliv invazivních metod prenatalní diagnostiky na výsledky těhotenství. *Závěrečná zpráva grantu GA UK 16/2001 (2004).*
3. **Calda, P., Víšková, H.:** Příliš mnoho možností jak screenovat populaci na výskyt Downova syndromu – aneb jak invazivní diagnostika ovlivňuje výsledky prenatalní péče. *Moderní Gynekologie*, 2004, 13, s. 118-120.
4. **Calda, P.:** Prenatální screening vrozených vývojových vad plodu. *Zdravotnické listy*, 2005, <http://www.zdn.cz/detail.htm?id=48198>.
5. **Nicolaides, K. H., Spencer, K., Avgidou, K. et al.:** Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 2005, 25, s. 221-226.
6. *Rodička a novorozenec 2004. Zdravotnická statistika, ÚZIS ČR, 2004.*
7. **Malone, F. D., Canick, J. A., Ball, R. H. et al.:** First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 353, s. 2001-2011.

Podpořeno grantem IGA NR-8350.

PŮVODNÍ PRÁCE

Autoimunitní poškození ovarií u dospívajících dívek

Kosová H., Hořejší J., ¹Martínek J., ²Veselá M.*Klinika gynekologie dětí a dospívajících 2. LF UK a FNM, Praha*¹*Ústav histologie a embryologie 1. LF UK a VFN, Praha*²*Pediatrická klinika 2. LF UK a FNM, Praha*

ABSTRAKT

Východisko. Cílem studie bylo zmapovat výskyt antiovariálních protilátek (AOA) u dospívajících dívek s poruchou menstruačního cyklu v porovnání s dívkami s pravidelným cyklem. Sledován byl také vztah mezi pozitivitou AOA protilátek a morfologickými změnami v bioptických vzorcích ovaria pacientek.

Metody a výsledky. Do studie bylo zařazeno 39 dívek s primární amenoreou (N=18) a oligo/sekundární amenoreou (N=21). U všech pacientek bylo provedeno vyšetření séra k detekci antiovariálních protilátek (AOA) a hladin FSH a LH. Toto vyšetření bylo provedeno na počátku studie a další po šesti měsících léčby, po které byla většina pacientek léčena hormonální substituční terapií. V indikovaných případech byla provedena laparoskopická biopsie ovaria. U všech vyšetřených pacientek s těžkou poruchou menstruačního cyklu byla nalezena pozitivita protilátek proti různým strukturám ovaria. Byla zjištěna signifikantně vyšší hladina FSH; hladina LH nebyla signifikantně vyšší. Deplece a alterace folikulárního aparátu patřila mezi hlavní nálezy v kůře ovaria u našich pacientek. Při kontrolních vyšetřeních po šestiměsíční hormonální substituci byl výskyt AOA signifikantně snížen, u části pacientek autoprotilátky dokonce zcela vymizely.

Závěry. Mapování výskytu antiovariálních protilátek u pacientek s poruchami menstruačního cyklu koreluje s nálezem vystupňované atrezie. Dříve či později se objevují poruchy menstruačního cyklu, které mohou vyústit k předčasnému ovariálnímu selhání, což je provázeno vymizením folikulárního aparátu a fibrotizací kůry ovaria.

Klíčová slova: autoimunitní poškození ovaria, předčasné ovariální selhání, antiovariální protilátky, dospívající dívky, hormonální substituční terapie.

ABSTRACT

Kosová H., Hořejší J., Martínek J., Veselá M.: Autoimmune Ovarian Failure in Adolescent Girls

Background. The aim of the study was to map the incidence of antiovarian antibodies (AOA) in adolescent girls with ovarian cycle irregularities in comparison with girls with the regular cycle. The relation between the AOA positivity and structural changes in the bioptic samples of ovaria was examined.

Material and Results. The studied cohort included 39 girls with primary amenorrhea (N=18) and oligo/secondary amenorrhea (N=21). All patients were tested for the presence of antiovarian antibodies (AOA) in the serum and levels of FSH and LH. The examination was done at the beginning of the study and after six months of therapy, in most of the cases by the hormone substitution treatment. In indicated cases the laparoscopic ovarian biopsy was done. A patients with serious failure of ovarian cycle the positivity of antibodies against various components of ovaria was found. Significantly higher levels of FSH was also found, LH levels were not higher. In our patients the depletion and alteration of the follicular apparatus in the cortex of ovaria belonged to the common findings. The control examination after the six month of hormonal substitution brought about lower levels of AOA, in some patients AOA fully disappeared.

Conclusions. Incidence mapping of antiovarian antibodies in patients with ovarian cycle irregularities correlate with findings of elevated atresia. Ovarian cycle irregularities can later or earlier turn into the extinction of the follicular apparatus and fibrotization of the ovarian cortex.

Key words: autoimmune ovarian failure, premature ovarian failure, antiovarian antibodies, adolescent girls, hormonal substitution therapy. *Po.*

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 578–581.

Za normálních podmínek je obvyklý věk menopauzy kolem 50. roku. Předčasné ovariální selhání (POF) je onemocněním definované jako nefyziologické ukončení menstruačního cyklu po pubertě a před 40. rokem. Frekvence tohoto onemocnění je asi 1 %. Hormonální hladiny vykazují hypergonadotropní hypoestrismus (FSH větší než 40 IU/l). Nástup onemocnění může být pozvolný. Nejčastěji po menarché a pravidelných cyklech následují poruchy cyklu typu oligomenorey až po sekundární amenoreu, v reprodukčním období se onemocnění může projevit jako sterilita či infertilita.

Jednou z příčin vzniku předčasného ovariálního selhání je autoimunitní poškození ovaria, které může nastoupit kdykoliv od puberty po reprodukční období.

Autoimunitní poškození postihující ovariální hormonální produkci řadí toto onemocnění mezi autoimunitní endokrinopatie způsobené přímou destrukcí cílové tkáně, jako je tyroiditida, inzulin dependentní diabetes mellitus a Addisonova choroba. V první fázi onemocnění předchází lokální změny tkáně, způsobené cizími antigeny (např. viry, bakterie), případně změna vlastních antigenů,

vyvolaná účinkem toxinů nebo léků. Možnou příčinou je také extrémně zvýšená metabolická aktivita tkáně, možná je i kumulace jednotlivých příčin. Na expresi choroby se také účastní zevní faktory: stres, dieta, infekce a další.

U jedinců predisponovaných k rozvoji autoimunního onemocnění (dáno hlavně haplotypem HLA systému jedince, především přítomností některých alel HLA II. třídy) je často pozorována asociace primárního onemocnění s jinými autoimunními projevy. Je možno prokázat přítomnost dalších autoprotilátek, a to jak orgánově specifických (proti nadledvině, štítné žlázy, Langerhansovým ostrůvkům), tak i orgánově nespecifických (proti fosfolipidům, buněčným jádrům, hladkému svalu apod.). Častá je asociace více endokrinních chorob. Jsou rozeznávány dva hlavní typy: polyglandulární syndrom I. a II. POF nacházíme u autoimunního polyglandulárního onemocnění I. ve 12–17 %, u syndromu II zjišťujeme gonadální vyhasnutí ve 3,5–3,6 % případů. Je známo, že v případě POF jsou nejčastějšími doprovodnými chorobami nemoci štítné žlázy (Hashimotova struma 15–37 %, Graves-Basedovova choroba 7–18 %). Na druhé straně u pacientů s manifestním autoimunitním postižením štítné žlázy se následně přidružují poruchy ovariální funkce, a to až ve 30 %. Addisonova choroba a POF mají společný cílový antigen, kterým jsou steroidy produkující buňky. U části pacientek s autoimunitním poškozením ovaria je přítomna manifestovaná autoimunitní choroba nadledvin a jsou přítomny protilátky proti steroidy produkujícím buňkám.

V případě pozitivního nálezu protilátek proti steroidy produkujícím buňkám je v raném stadiu choroby na experimentálním modelu ovaria zachytitelná autoimunitní ooforitida. Makroskopicky lze na ováriích prokázat asi v 50 % cysty, které jsou pravděpodobně podmíněny účinkem zvýšených hladin gonadotropinů. Mikroskopicky byla prokázána infiltrace mononukleárními elementy v oblasti folikulů. Tato infiltrace byla pozorována především u větších folikulů. Infiltrující buňky patří k T lymfocytům, méně k B lymfocytům.

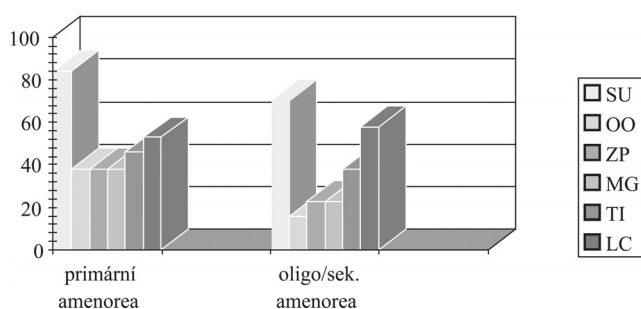
Cílem studie bylo zmapování výskytu orgánově specifických autoprotilátek proti složkám ovaria u dívek sledovaných pro poruchy menstruačního cyklu ve srovnání s výskytem antiovariálních protilátek v populaci zdravých dívek. Byly sledovány protilátky proti zárodečným buňkám a steroidy produkujícím buňkám. V indikovaných případech byla u dívek s pozitivitou antiovariálních protilátek provedena biopsie ovariální tkáně, vzorky byly imunohistochemicky zpracovány a vyšetřeny pomocí elektronového a světelného mikroskopu. Většina sledovaných dívek byla léčená pomocí hormonální substituční léčby. V šestiměsíčním odstupu po nasazení léčby bylo provedeno kontrolní vyšetření hladiny antiovariálních protilátek.

SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODY

Studie byla součástí řešení grantového úkolu NH 5664-3, probíhajícího na gynekologicko-porodnické klinice 2. LF UK a FN Motol od roku 1999–2001.

Hlavní vyšetřovaný soubor představovaly pacientky soustředěné v dispenzární péči ambulance gynekologie dětí a dospívajících. V této skupině bylo 39 pacientek ve věku $21,87 \pm 4,27$. Z tohoto souboru bylo 18 pacientek sledováno pro primární amenoreu, 21 ostatních bylo sledováno pro poruchy menstruačního cyklu typu oligomenorey až sekundární amenorey. Podmínkou zařazení pacientky do sledovaného souboru bylo opakované vyšetření, a to nejméně v šestiměsíčním odstupu. U všech vyšetřovaných pacientek bylo sledováno: hladina gonadotropinů (FSH, LH) a výskyt antiovariálních protilátek (proti ooplazmě, zona pellucida, membrana granulosa, theca folliculi interna, luteinním buňkám) (graf 1).

Ve 21 indikovaných případech byla u pacientek s pozitivním nálezem protilátek provedena laparoskopie s bioptickým odběrem. Získaný vzorek ovaria byl po imunohistochemickém zpracování vyšetřen morfologicky ve světelném a elektronovém mikroskopu. Průměrný věk pacientek byl



Graf 1. Prevalence AOA protilátek u PA a OSA pacientek
SU – summary, OO – ooplazma, ZP – zona pellucida,
MG – membrana granulosa,
TI – theca interna, LC – luteinní buňky,

$18,4 \pm 2,3$ let, sedm z nich trpělo primární amenoreou, čtrnáct oligomenoreou nebo sekundární amenoreou. U většiny z nich byl stanoven karyotyp.

Pacientky byly zařazeny do terapeutického schématu s použitím substituční hormonální léčby.

Laboratorní metody

Antiovariální protilátky byly sledovány metodou nepřímé imunofluorescence jak v séru, tak ve folikulární tekutině. Použity byly monoklonální protilátky proti orgánově specifickým protilátkám značených fluoroscianatem. Jako cílový orgán byla použita ovaria pohlavně zralých krys. Sledovány byly protilátky proti – ooplazma, zona pellucida, membrana granulosa, theca folliculi interna, luteinním buňkám. Všechny vzorky byly dále zpracovány a hodnoceny v elektronovém mikroskopu.

FSH, LH byly analyzovány pomocí RIA metody.

Informovaný souhlas pacientek byl získán od pacientek i jejich rodičů.

Získané údaje byly statisticky zpracovány běžnými postupy. Výsledky byly zpracovány graficky pomocí Mcnamarova testu.

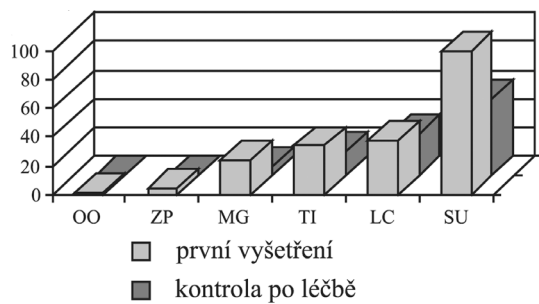
VÝSLEDKY

Prevalence protilátek proti buňkám germ-line a steroidy produkujícím buňkám ve sledované skupině pacientek na začátku studie shrnuje graf 1. Ze sérových protilátek jsme nejčastěji zjistili protilátky proti luteinním buňkám, nižší prevalenci měly protilátky proti buňkám theca folliculi interna a jen ve 35 % byly zjištěny protilátky proti buňkám membrana granulosa. Tento nález koresponduje s morfologickým obrazem atrézie folikulů v bioptických vzorcích již v ranných stádiích diferenciaci (obr. 1).

Většina pacientek byla následně léčená podle terapeutického schématu s použitím náhradní hormonální léčby, zpravidla Estrofem 1–2 mg (estradiolum hemihydratum) ob den, do vyvolání proliferativního efektu, poté Provera (medroxyprogesteron acetát) 10 mg ob den. Téměř kompletní úspěšnost zvoleného terapeutického postupu v navození cyklických změn se odrazila i v profilu výskytu antiovariálních protilátek, neboť v 65 % případů bylo zjištěno snížení incidence antiovariálních protilátek a v 15 % jejich úplné vymizení od původního stavu. Výsledky jsou shrnuty v grafu 2.

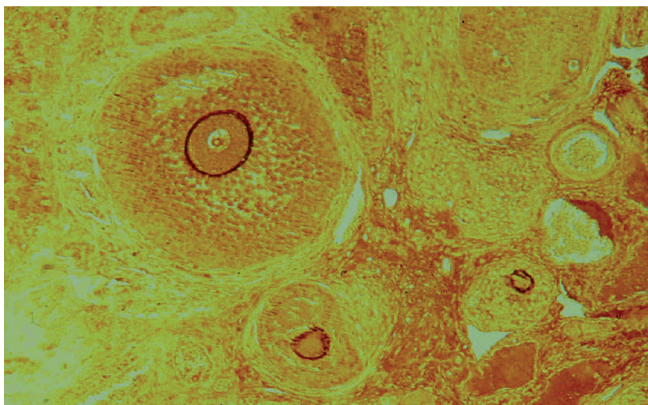
Výsledky výskytu antiovariálních protilátek u pacientek s těžkými poruchami menstruačního cyklu byly porovnány s výskytem antiovariálních protilátek ve skupině zdravých dívek. Bylo vyšetřeno 15 zdravých dívek s pravidelným menstruačním cyklem. V tomto souboru jsme zachytili jen jeden nález positivity antiovariálních protilátek proti LB, což reprezentuje 4,8 % výskyt antiovariálních protilátek v běžné populaci zdravých, gynekologicky neléčených žen v České republice. Pozitivita protilátek proti luteinním buňkám je často spojena s pozitivitou protilátek proti buňkám kůry nadledvin.

Ve 21 indikovaných případech byla provedena laparoskopie s bioptickým odběrem. Bylo provedeno morfologické vyšetření bioptického vzorku ovaria pomocí světelné a elektronové mikro-



Graf 2. Prevalence autovariálních protilátek při prvním odběru a při kontrolním odběru po léčbě

OO – ooplazma, ZP – zona pellucida, MG – membrana granulosa, TI – theca interna, LC – luteinální buňky, SU – summary



Obr. 1. Elektronmikroskopický obrázek: detail folikulární buňky v pokročilém stadiu programované buněčné smrti. Přítomnost apoptózy je charakterizována kondenzací ooplazmy, typickými invaginacemi nukleární membrány a ztlustěním Slavjanského-bazální membrány.

skopie a zároveň byla sledovaná vazba specifických protilátek na definované struktury ovaria (pomocí monoklonálních protilátek). Sedm pacientek ze souboru trpělo primární amenoreou, čtrnáct oligomenoreou až sekundární amenoreou.

Získané výsledky potvrdily, že průběh autoimunitního onemocnění ovaria lze zachytit jen výjimečně (pouze ve dvou případech, 14,3 %) v podobě mononukleární infiltrace kůry ovaria i se zastoupením lymfocytární složky. Naproti tomu vysokou frekvencí nálezů představují stimulované procesy atrezie folikulů v různých stadiích vývoje. V doposud zachycených folikulech byla pozorována opožděná tvorba zona pellucida – v intercelulárních prostorech mezi cytoplazmatickou membránou oocyta a folikulárními buňkami, což odpovídá tomu, že v sérech vyšetřovaných dívek nebyly nalezeny protilátky proti této komponentě.

ZÁVĚR

Jednou z příčin vzniku předčasného ovaria selhání je autoimunitní poškození ovaria. Nástup onemocnění je velmi pozvolný, kdy po menarché a zprvu pravidelných menstruačních cyklech následují poruchy cyklu, nejčastěji typu oligomenorey až sekundární amenorey. Toto onemocnění je velice závažné a může nastoupit kdykoliv od puberty po celé reprodukční období a může být příčinou sterility postižené ženy.

V naší studii jsme provedli výzkum výskytu autovariálních protilátek u pacientek sledovaných pro poruchy menstruačního cyklu a v indikovaných případech, kdy byla provedena biopsie

ovarií, jsme sledovali změny tkáně ovaria u těchto pacientek. Pro srovnání jsme použili kontrolní skupinu zdravých pacientek ke zmapování výskytu protilátek u zdravé populace žen v České republice. Za významnou považujeme skutečnost, že se ve zdravé populaci mohou vyskytovat případy výskytu autovariálních protilátek.

Na základě výsledků sledování sérových autovariálních protilátek, hladin hypofyzárních, ovariačních hormonů a biopsických nálezů lze konstatovat, že vlastní průběh autoimunitního onemocnění ovaria lze zachytit jen ve výjimečných případech v podobě přítomné mononukleární infiltrace v kůře ovaria i se zastoupením lymfocytární složky. Naproti tomu prakticky ve všech případech je zřejmá stimulace atretických procesů, a to až po úplný deficit folikulárního aparátu. Tyto procesy, provázené až úplným vymizením germ-line komponent v kůře ovaria, jsou asociovány s fibrotizací stromatu kůry ovaria, v němž převládá složka mezibuněčné hmoty. Překonáním fagocytární ovariační bariéry si vysvětlujeme možnost vzniku endogenních antigenních determinant pro protilátkovou odpověď, a tím výskyt sérových autovariálních protilátek.

Většina pacientek soustředěných v dispenzární péči byla na základě vyšetření hladin gonadotropních (FSH, LH) a ovariačních hormonů (E2 a progesteronu) léčená hormonální léčbou. Na základě našich výsledků se domníváme, že hormonální substituce vede k utlumení vlastních cyklických procesů v ovariu. Důsledkem je následně snížení až vymizení antigenních popudů k tvorbě autoprotiátek, a tím i jejich pokles či úplné vymizení. Ve studii se úspěšnost zvoleného terapeutického postupu odrazila i v profilu výskytu autovariálních protilátek.

SHRNUTÍ

Výsledky studie a mapování výskytu sérových autovariálních protilátek nás vedou k přesvědčení, že výskyt autoprotiátek proti ovariu koresponduje dříve či později s prezentujícími se klinickými příznaky. Onemocnění může propuknout v období od puberty po celé reprodukční období. Nasazení adekvátní léčby (v naší studii se osvědčilo použití HRT) může snížit autoimunitní poškození ovaria, což vede k zachování jeho hormonálních funkcí a především k zachování zdravé ovariační tkáně, nezbytné pro budoucí fertilitu pacientky. Naše studie potvrdila význam včasné diagnostiky a léčby autoimunitního onemocnění ovaria, jež vede k zachování fertilitu postižené ženy.

Zkratky

AOA	– autovariální protilátky
FSH	– folikuly stimulační hormon
LH	– luteinizační hormon
OSA	– oligomenorea/sekundární amenorea
PA	– primární amenorea
POF	– předčasné ovariační selhání

LITERATURA

1. **Coulam, C. B., Tung, K. S. K.:** Autoimmune basis of premature ovarian failure. *Immunol. Alerg. Clin. North Amer.*, 1994, 14, s. 739-752.
2. **Conway, G. S., Kalfsas, G., Patel, A. et al.:** Characterisation of idiopathic premature ovarian failure. *Fertil. Steril.*, 1996, 65, s. 337-341.
3. **De Moraes-Ruehsen, M., Jones, G. S.:** Premature ovarian failure. *Fertil. Steril.*, 1967, 18, s. 440-461.
4. **Forges, T., Monnier-Barbarino, P., Faure, G. C., Bene, M. C.:** Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology. *Hum. Reprod. Update*, 2004, 10, s. 163-175.

5. **Hoeck, A., Shoemark, J., Drexhage, H. A.:** Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocrin. Rev.*, 1997, 18, s. 107-134.
6. **Mainini, G., Festa, B., Messalli, E. M. et al.:** Premature ovarian failure: clinical evaluation of 32 cases. *Mirena Ginecol.*, 2003, 55, s. 525-529.
7. **Peterson, C.M.:** Thyroid disease and fertility. *Immun. Allerg. Clin. North Amer.*, 1994, 14, s. 725-737.
8. **ThiHuong, D., Gmpel, A., Wechsel, B., Pietr, J. C.:** Spontaneous pregnancy in a woman with lupus and thyroiditis despite intermittent premature ovarian failure: *Am. Rheum. Dic.*, 2004, 63, s. 108-109.
9. **Trence, D., Morley, J. E., Handwerker, B. S.:** Polyglandular autoimmune syndromes. *Am. J. Med.*, 1984, 77, s. 107-116.
10. **Weetman, A. P.:** Autoimmunity to steroid-producing cells and familial polyendocrine autoimmunity. *Baill. Clin. Endocrin. Metab.*, 1996, 9, s. 157-174.

Práce byla přednesena 19. září 2005 při večeru Spolku lékařů českých.

Studie byla podporována grantem IGA č. NH/7663-3 a Výzkumným záměrem MŠMT č. 111100002-6.

Serotoninový syndrom

Serotoninový syndrom je potenciálně život ohrožující nežádoucí léková reakce. Serotoninový syndrom (SS) je předvídatelný důsledek aplikace vyšších dávek serotonergních agonistů receptorů centrálního nervového systému a periferních serotonergních receptorů. Klinická manifestace může být různě intenzivní – od lehkých forem až po letální projevy. Pacienti s mírnými projevy jsou afebrilní, mají tachykardií, třes, pocení nebo mydriázu. U středně závažných případů pozorujeme tachykardií, hypertenzi a hypertermii. Dále pozorujeme mydriázu, střední hypermotilitu a průjem, pocení, hyperreflexii či klonus více vyjádřený na dolních končetinách. Je patrná mírná agitovanost, hypervigilance, urychlená řeč. Naproti tomu u závažných forem pacienti mívají těžkou hypertenzi, tachykardií a mohou rychle upadnout do šokového stavu. Jsou agitovaní, delirantní. Pozorujeme svalovou rigiditu a hypertonií zejména na dolních končetinách. Tento hypertonus vede

k hypertermii tělesného jádra na $>41,1$ °C. Z laboratorních změn je u těžkých forem patrná metabolická acidóza, projevy rhabdomyolýzy, zvýšené hladiny kreatinikínázy a aminotransferáz, projevy renální insuficience a diseminované intravaskulární koagulace.

Neexistují však specifické testy schopné potvrdit diagnózu SS.

Léčba spočívá v odstranění léku vyvolávající SS, zahájení podpůrné péče. Je nutná kontrola agitovanosti, podávání 5-HT_{2A} antagonistů, úprava nestability autonomního nervstva a korekce hypertermie. Řada případů se zlepšuje během 24 hodin po vysazení serotonergního léku, ale v případě použití léků s dlouhým poločasem tyto projevy samozřejmě mohou přetrvávat déle. U lehkých případů též přidáváme benzodiazepiny. U středně těžkých případů nutno energicky korigovat všechny projevy kardiopulmonální a termoregulační abnormality, zde přidáváme 5-HT_{2A} antagonisty. Benzodiazepiny jsou indikovány při agitovanosti u všech stupňů závažnosti SS. Při závažné

hypotenzi se podávají katecholaminy. Kontrolu hypertermie lze v lehčích případech zajistit benzodiazepiny. V těžších případech je nutno hypertermii potlačit aplikací nedepolarizujících myorelaxancií, např. vecuronium s následnou intubací a umělou plicní ventilací. Je třeba se vyvarovat aplikace sukcinylnololu vzhledem k riziku arytmií při průvodní hyperkalémii vyvolané rhabdomyolýzou. Propranolol, 5-HT_{2A} antagonistu s dlouhým trváním účinku nelze doporučit vzhledem k riziku prohloubení hypotenze. Cílená terapie zahrnuje aplikaci 5-HT_{2A} antagonistů. Aplikuje se cyproheptadin v dávce 12–32 mg během 24 hodin, přičemž tato dávka váže 85–95 % serotoninových receptorů. Lze zkusit i aplikaci 50–100 mg chlorpromazinu.

Literatura:

Boyer, E. W., Shannon, M.: The Serotonin Syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352, s. 17.

O. Louthan

SPECIÁLNÍ SDĚLENÍ

Nabídka diagnostických služeb v oblasti molekulární genetiky v České republice Je to málo, moc, nebo akorát?

Brdička R., Dobrovolná M.
Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

SOUHRN

Je podán přehled diagnóz a laboratoří nabízejících molekulárně genetické testování a porovnání, kolik laboratoří nabízí určitá vyšetření. Diagnózy jsou rozděleny do tří skupin: 1. diagnózy nabízené velkým počtem laboratoří, tj. více než 8; 2. diagnózy nabízené alespoň dvěma laboratořemi a 3. diagnózy nabízené jen jednou laboratoří. Mezi nejčastěji nabízené diagnózy patří vyšetření trombofilních faktorů F2 a F5 a metylenetetrahydrofolátreduktázy, cystické fibrózy, stanovení rodičovství, určení pohlaví, molekulární vyšetření hemochromatózy – HFE, stanovení přítomnosti fúzního genu BCR/ABL u myeloproliferací, a vyšetření Y-chromozomálních lokusů DAZ a AZF.

Klíčová slova: molekulárně genetická diagnostika v ČR, nejčastěji nabízená vyšetření.

SUMMARY

Brdička R., Dobrovolná M.: Availability of Molecular Genetic Diagnostic Services in the Czech Republic. Is It too Much, too Less or Enough?

Review of diagnostic services offered by molecular genetic laboratories classified according the number of laboratories dealing with individual diagnoses is presented. Three different categories were distinguished: frequently, medium and rarely offered diagnostic service. Services that concerned trombophilic factors F2 a F5 and methylenetetrahydrofolatreductase, cystic fibrosis, paternity testing, gender determination, molecular testing for hemochromatose - HFE, detection of BCR/ABL fused gene, and Y-chromosomal loci DAZ and AYF examination were most frequently offered.

Key words: molecular genetic testing services in Czech Republic, most frequently and rarely offered services. *Br.*

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 582–584.

VÝSLEDKY

V uplynulých letech v České republice stále dochází k rozšiřování nabídky molekulárně genetické diagnostiky jak po stránce kvantitativní – (více laboratoří), tak kvalitativní (pro větší počet nemocí – situací).

Je to do jisté míry vyvoláno prohlubováním našich znalostí, ale jistě také ekonomikou.

O tom, že diagnostických možností stále přibývá, a to i po stránce technologické, není nejmenší pochyb.

Stejně rostou i náklady na tuto součást zdravotnických služeb a bylo by účelné je oddělit jako samostatnou položku, neboť na rozdíl od úhradové politiky pojišťoven, založené na nechvalně známém „bodníku“ úředně označovaném jako „Seznam výkonů“, jde o objektivní a reálná čísla. Můžeme porovnávat jak nárůst počtu diagnóz, kde se uplatňuje molekulární diagnostika, tak zvyšování počtu laboratoří, které se jí věnují. Tento trend je celosvětový. Lze jej doložit grafem uveřejněným na webových stránkách celosvětové databáze spravované organizací GENETESTS (1) (graf 1).

Jak roste mezi zadavateli povědomost o těchto možnostech a zdokonaluje se zdravotní péče, dochází pochopitelně i k nárůstu počtu vyšetření v jednotlivých laboratořích. Můžeme to dokumentovat vlastními údaji z akreditované Národní referenční laboratoře pro DNA diagnostiku například na počtech vyšetření genotypů HLA (graf 2).

Ostatní údaje viz ročenka 2005 (2).

Z jakých hledisek je možné posuzovat změny, ke kterým v nabídce dochází?

Předkládaná čísla jsou sice obecně platná, ale nikoliv v absolutních hodnotách, neboť jde o zachycení dynamického procesu. Nabízená vyšetření můžeme zhruba rozdělit na ta, která jsou nabízena velkým počtem laboratoří – v našem souboru jsou to vyšetření trombofilních faktorů F2, F5 a metylenetetrahydrofolátreduktázy, cystické fibrózy, určení rodičovství, stanovení pohlaví, vyšetření molekulárního podkladu hemochromatózy – HFE, detekce fúzního genu BCR/ABL, a ohledání Y-chromozomálních lokusů DAZ a AZF.

První tři patří do oblasti hematologické molekulární diagnostiky, poslední dva do vyšetřování fertility; určování rodičovství a stanovení pohlaví bychom mohli zařadit mezi identifikaci osob a určování příbuzenských vztahů – tedy obecně řešené otázky, hledání dědičných příčin hemochromatózy a identifikace fúzního genu BCR/ABL u myeloproliferací jsou zřejmě spojeny s obtížemi při stanovení klinické diagnózy.

Další skupinu tvoří vyšetření, která jsou poskytována více než jednou laboratoří, a existuje možnost výběru a zastupitelnosti podobně jako v předchozí skupině – tam patří: muskulární dystro-

fie, myotonické dystrofie, vyšetření polymorfismu APOE, diagnostika hemofilii (A, B), neurofibromatózy, fragilního X, Huntingtonovy chorei, fúzních genů BCL/IgH, PML/RARa, MLL/AF4, AML1/ETO, familiární polypózy tlustého střeva, karcinomu tlustého střeva (Lynchův syndrom), fenylketonurie, Wilsonovy choroby, syndromů diGeorge, Angelman, Gilbertův, Nijmegen a Prader-Willi, nesyndromové hluchoty, deficitu alfa-1-antitrypsinu, stanovení genotypu Rh krevní skupiny, identifikace defektů fumarátdehydrogenázy, poruch inhibitoru aktivátoru plasminogenu, stanovení genotypu APOB-100, vyšetření molekulárních příčin spinální muskulární atrofie, adrenální hyperplazie, deficitu pyruvátdehydrogenázy a genotypizace angiotenzin konvertujícího enzymu.

Poslední a nejpočetnější skupinu tvoří diagnózy nabízené jen jednou laboratoří. Jejich seznam by přesahoval míru tohoto článku, proto pouze odkazujeme na databázi CZDDNAL, kde jsou potřebné informace k dispozici:

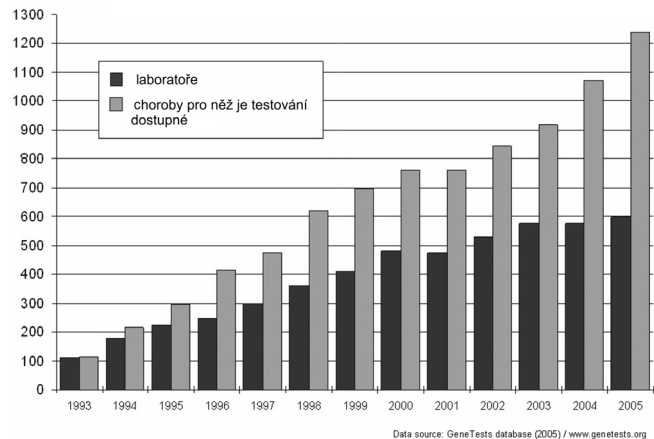
http://www.uhkt.cz/lab_a_vysetreni/nr_lab_dna_diag/dna_lab_db

Zatím jsme nezmínili situaci, kdy vyšetření dostupná v zahraničí, nejsou nabízena žádnou laboratoří v České republice.

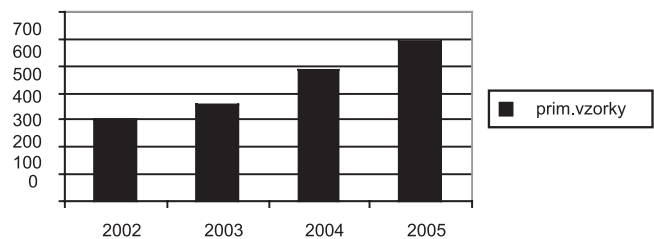
V tom případě jsme odkázáni požádat o vyšetření v zahraničí, což dnes již nepředstavuje, alespoň by nemělo, nepřekonatelnou překážku. V rámci „starých“ zemí unie je přeshraniční vyšetřování poměrně běžné, neboť zde platí, že kvalita souvisí se zkušeností a onemocnění, která jsou vzácná tak, že se jich najde v celosvětovém měřítku jen několik desítek za rok nebo i méně, je výhodně soustředěn jen do několika málo, případně jen do jedné laboratoře s celosvětovou působností. Naopak u nově přistoupivších do evropském regionu je přeshraničních vyšetření málo. A pokud ano, pak se to většinou děje v rámci výzkumné spolupráce. V současnosti naše laboratoře vstupují do mezinárodních databází – odkazy na ně najdeme na stejné adrese, a to jak na zanikající EDDNAL – European Directory of DNA Laboratories (<http://www.eddnal.com/>), tak na novou evropskou ORPHANET (<http://www.orphanet.org/>), případně světovou GENETESTS (<http://www.genetests.org/>), a proto můžeme očekávat, že i naše laboratoře budou poskytovat přeshraniční služby, budou-li ovšem jejich výsledky považovány za dostatečně kvalitní.

DISKUZE

Vrátíme se k podtitulu, kde vedle medicínského pohledu musí být brán zřetel na ekonomiku práce laboratoří, které jsou dosud většinou odměňovány za svou práci na základě smluv s pojišťovnami a jen výjimečně přímo svými zákazníky. Z medicínského hlediska je jistě výhodné, aby dostupnost těchto vyšetření byla co nejlepší, právě tak jako vzájemná zastupitelnost. Těmto dvěma hlediskům by však v každém případě měl být nadřazen nárok na kvalitu. Ověření kvality se děje jednak formální cestou, například získáním akreditací, kdy třetí osoba – tou je míněna spíše právnická osoba, k takovým úkonům oprávněná, ověřuje činnost laboratoře z mnoha hledisek, která souvisí s kvalitou podávaných výsledků, jednak mezilaboratorním porovnáváním (EQA/PT), do kterého postupně proniká i možnost zveřejnění laboratoří s opakovaně špatnými výsledky. Je pochopitelné, že kvalita má úzký vztah ke zkušenosti a jistě připustíme průměr s chirurgickým pracovištěm, které ročně odoperuje několik málo zánětů slepého střeva ročně, a pracovištěm, kde počet těchto výkonů přesahuje stovky. Čím náročnější výkon, tím větší závislost na zkušenosti. Proto není vyloučené, že do posuzování schopnosti laboratoře odvádět kvalitní práci bude kromě již existujících nepodkročitelných mezí obsazení laboratoře personálem, dojde i ke stanovení minimálního počtu daných vyšetření. To sice v žádném případě nemusí znamenat, že by malé laboratoře s malým počtem vyšetření musely nezbytně pracovat méně kvalitně, ale všeobecně trpí sníženou důvěryhodností. Připomeneme-li si



Graf 1. Nárůst počtu laboratoří a diagnostických služeb podle světové databáze GeneTests (převzato se svolením)



Graf 2. Nárůst výkonů v akreditované národní referenční laboratoři pro DNA diagnostiku v letech 2002 až 2005 – genotypizace HLA systému

nezbytnost neustálého vnitřního i vnějšího ověřování kvality, provádění validací a používání všech nezbytných kontrol, zjistíme, že náklady na vyšetření v těchto laboratořích budou rozhodně větší než náklady laboratoří s velkou produktivitou. Aplikujeme-li tyto názory na naši situaci, která je částečně zmíněna již v předchozí práci (3), zjistíme, že: 1. Čím jednodušší způsob detekce a čím více potencionálních zákazníků, tím více laboratoří danou službu nabízí. 2. Množství vyšetřených vzorků se liší, stejně jako jejich „hloubka“ – (rozuměj schopnost dovést diagnózu až do konce – např. určením odpovědné alely daného genu). 3. Způsoby prováděných analýz se rovněž liší – pokud je laboratoř odkázána na průmyslově vyráběné kity – je omezena jen na to, co příslušný kit dovede, a často v případě cílů detekce chybí některý pro naši populaci důležitý. V tomto případě hraje svou roli i vybavení laboratoře.

Pokud existují doporučení jak správně postupovat – GLP, neměly by se laboratoře od těchto směrnic odchylovat.

ZÁVĚRY

Z uvedeného vyplývá, že hospodárnost (cost-effectiveness) laboratorního vyšetřování může být v rámci komplexu nabízených molekulárně genetických vyšetření různá a z obecného pohledu mají, i s ohledem na zajištění kvality, potencionální výhodu větší laboratoře s velkým počtem vyšetření.

Z toho je ovšem třeba vyjmout vyšetření speciální týkající se vzácných chorob, kde se také jedná spíše o vyšetřování v rámci výzkumu. Pak to platí spíše na úrovni celoevropské nebo celosvětové a záleží na tom, na kolik stojíme o zachování nabídky takových vyšetření na našem území, samozřejmě za cenu, že hledisko hospo-

dárnosti náležitě potlačíme. V těchto případech by měla na prvním místě rozhodovat kvalita nabízených vyšetření.

Zkratky

APOE	– apolipoprotein E
AZF	– azoospermie (gen pro)
BCR/ABL	– fúzní gen (u leukémií)
CZDDNAL	– Czech Directory of DNA Laboratories
DAZ	– azoospermie (gen pro)
GLP	– správná laboratorní praxe (good laboratory practice, také BLP)
HFE	– hemochromatóza

LITERATURA

1. GeneTests: Medical Genetics Information Resource [online databáze]. Seattle, University of Washington, c1993–2006 [cit. date of access] (dostupné na <http://www.genetests.org>)
2. Ústav hematologie a krevní transfuze: výroční zpráva 2005 (sestavila Jana Sajdová). Praha, ÚHK, 2006. 111 s.
3. **Brdička, R. et al.:** Frekvenční pohled na vyšetření odchylek genomu. Čas. Lék. čes., 2006, 145, s. 98-103.

Práce byla sestavena v souvislosti s národním programem kvality zdravotní péče č. 69/05 – OZP/4.

OSOBNÍ ZPRÁVY

PAVOL IVÁNYI, NÁŠ VĚDEC SVĚTOVÉHO VÝZNAMU

V červenci tomu bude rok, co v Amsterdamu zemřel MUDr. Pavol Iványi, DrSc., lékař, proslavený imunogenetik, zabývající se zejména transplantační imunologií, a pokračovatel vynikající tradice v zahraničí renomovaných československých imunologů. O jeho úmrtí jsme se dozvěděli opožděně, a tak se stalo, že jeho odchod byl v naší odborné veřejnosti zaznamenán jen v několika málo zprávách. Protože MUDr. Pavol Iványi byl nezapomenutelnou osobností a celosvětově známým odborníkem, je na místě připomenout si jeho práci a zásluhy.

Pavol Iványi byl skromný člověk, vzorně se starající o svou rodinu, vynikající vědec známý v širokém zahraničí, který ani po své okolnostmi vynucené emigraci z Prahy nezapomněl na svá bývalá pracoviště a své přátele doma. Jeho úmrtí zaznamenaly světové odborné žurnály jeho oboru. Pavol Iványi do Prahy ze svého posledního působiště v Amsterdamu stále vícekrát do roka dojížděl, aby našim vědcům při jejich práci pomáhal, a to i jako iniciátor grantových projektů Evropské unie. Ponechal si občanství České republiky a svá bývalá působiště v Praze vždy považoval za hlavní úsek svého života

Pavol Iványi se narodil 26. května 1930 v Košicích a první léta svého života strávil v Michalovicích na východním Slovensku, kde jeho otec pracoval jako právník. Jeho maminka pocházela z Transylvánie, kde se hovořilo maďarsky, a tak se malý Pavol naučil jak slovensky, tak maďarsky. Protože slovenská vláda na začátku druhé světové války z vlastní iniciativy začala deportovat osoby židovského původu do Osvětimi, pokusila se rodina Iványiů v roce 1941 zachránit svou kritickou situaci – oba rodiče byli Židé – konverzí do řeckokatolické církve a plánovala útek do Maďarska ke svým příbuzným. Plán útoku přes hranice však selhal, a to zřejmě zachránilo rodině život, neboť většina jejich židovských příbuzných v Maďarsku byla v roce 1944 deportována do koncentračních táborů, kde zahynula.

Po osvobození Československa Pavol velmi úspěšně absolvoval vyhlášené (dříve premonstrátské) gymnázium v Košicích a bohatě využíval tamního kulturního života. Již během svých středoškolských let se pevně rozhodl pro studium medicíny, i když v té době měl větší vztah ke kultuře a umění než k přírodním vědám. Láska k umění ho však doprovázela celý život, později chodil v Praze na aukce a sbíral díla českých umělců. Jeho přání studovat lékařství také podpořili jeho rodiče, a protože měli k české kultuře a vědě pozitivní vztah, rozhodli, že Pavol půjde studovat medicínu na Karlovu Univerzitu v Praze. Tak se stalo, že Pavol brzy hovořil nejenom slovensky a maďarsky, ale osvoji si výborně i češtinu, která potom zůstala už po celý jeho život jeho hlavním jazykem. Během svých vysokoškolských studií se vysloveně zapálil pro biologické vědy (třebaže pocházel z jiného prostředí, neboť jeho otec byl právníkem) a již od druhého roku studia medicíny pracoval v laboratořích, nejprve jako demonstrátor v Ústavu biologie, později v oblasti imunopatologie a hematologie. Imunohematologické práce na králičích přivedly nakonec Pavla k imunogenetice a nasměrovaly jeho budoucí zájem o histokompatibilitu. Během medicínských studií, kdy v padesátých letech 20. století nastala komunistickým



režimem tvrdě prosazovaná a v tehdejší naší vědě a zejména genetice zhoubná éra tzv. lysenkovského učení (zastupovaná tehdy Milanem Haškem), se Pavol k tomuto hnutí stavěl výrazně kriticky.

Po promoci v roce 1956, v době nuceného přídělování lékařů na různá pracoviště (kdy hrál rozhodující roli „třídní“, komunistickou stranou posuzovaný původ a postavení absolventa) musel MUDr. Iványi nastoupit do nemocnice v Nitře, protože jeho dědeček byl „třídní nepřítel“ – vesnický statkář na východě Slovenska, a dr. Iványi nemohl tedy pokračovat ve svých slibně započatých vědeckých pracích v Praze. V Nitře strávil potom 5 let a získal specializaci ve vnitřním lékařství.

V roce 1961 docílil pražský imunolog Milan Hašek, který měl politicky velice silnou pozici, uvolnění mladého a již osvědčeného imunogenetika dr. Iványiho pro práci na svém oddělení v Československé akademii věd (ČSAV) v Praze. Tam Pavol pokračoval ve svých studiích histokompatibility na králičích a později na myších.

Se svou ženou Dagmar pak strávil Pavol v roce 1965 šest měsíců na pracovišti prof. J. Dausseta v Paříži, což bylo rozhodující období jeho kariéry imunogenetika. Protože měl dr. Iványi velkou zkušenost s aloantiséry u králíků a podrobně znal histokompatibilní systém H-2 u myši (tehdy se antigeny toho systému nazývaly transplantační antigeny), mohl společně s Dagmar účinně „udělat pořádek“ v lidských aloantisérech posbíraných v průběhu let prof. Daussetem. Analýza sérologických dat a také výsledky smíšených lymfocytárních kultur indikovaly, že také u člověka existuje jeden hlavní systém tkáňových aloantigenů. Byl nazván Hu-1. Poprvé byly jejich společné výsledky publikovány se jmény Dausset J., Iványi P. Iványi D. v roce 1965 (Histocompatibility Testing, Munksgaard, Copenhagen), další výsledky byly publikovány v řadě mezinárodních časopisů (Vox sang., 1966; Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1970; Nature, 1971, 1972 a v dalších). Tyto práce nepochybně přispěly k tomu, že prof. Daussetovi byla v roce 1980 udělena Nobelova cena. Byl to zrod rozpoznávání

hlavního lidského histokompatibilního komplexu, který tehdy autoři označili termínem „systém Hu-1“ Po roce bylo jeho označení změněno mezinárodní nomenklaturní komisí na „systém HLA“. Je analogický nejvíce studovanému systému H-2 u myši a obecně v imunologii nazývaný „MHC - Major Histocompatibility Complex“. Jeho význam je pro imunitní pochody zcela zásadní a u člověka je v praxi velice důležitý při posuzování vhodnosti spojení dárc-příjemce v transplantologii.

V roce 1963 získal dr. Iványi hodnost CSc. a od té doby pracoval ve funkci vedoucího imunogenetického oddělení ČSAV. Věnoval se mnoha imunogenetickým problémům, zejména předkládaní peptidů receptorům T lymfocytů molekulami HLA a MHC-restringovaným protilátkám již v době, kdy ještě znalosti molekulárních modelů imunitního rozpoznávání byly neúplné. Publikoval ve světových časopisech řadu prioritních prací v problematice histokompatibilních antigenů u lidí a myši a jeho práce jsou dodnes citovány v mezinárodních periodikách. Spolupracoval úzce s řadou světových imunologů, např. s prof. van Roodem z Holandska. V roce 1969 pracoval na genetickém oddělení Columbia University v New Yorku, roku 1973 mu byl udělena hodnost DrSc. V ČSAV svou práci skončil v roce 1976, protože pro nepříznivé politické prostředí, ohrožující jeho rodinu, považoval za nutné emigrovat. Odešel na pozvání prof. Eijsvogela s rodinou do Amsterdamu, kde byl až do roku 1995 šéfem oddělení experimentální imunogenetiky v Central Laboratory Blood Transfusion Service.

Vánoce 1989 slavili již manželé Iványiovi v Praze, i když zůstávali trvale bydlit v Amsterdamu. Od roku 1995 se pak uskutečňuje intenzivní spolupráce dr. Iványiho s pražskými pracovišti, hlavně s oddělením imunogenetiky v Imunologickém pracovišti IKEM v Praze, kam ho pozval přednost pracoviště prof. Hána a kde dr. Iványi odvedl na poli typizace a výzkumu histokompatibilních antigenů a příslušných informačních technologií vynikající práci. Získal pro toto pracoviště řadu grantů především z Evropské unie a výrazně pomohl zřízení prvního registru dárců kostní dřeně v postkomunistických zemích, které iniciovala dr. Ivašková s prof. Hánou. Dr. Iványi obnovil i spolupráci s Akademií věd ČR. Jeho práce v průběhu let byla ohodnocena řadou ocenění (např. ČSAV, Maďarská imunologická společnost, plaketa Collège de France, Česká imunologická společnost, Slovenská imunologická společnost), jmenování, členství v redakčním radách apod. Je autorem více než 300 citovaných prací, řady přehledných článků a editorem dvou monografií, vše většinou publikováno ve špičkových časopisech v zahraničí. Byl školitelem jedenácti CSc., respektive Ph.D. studentů, organizátorem řady sympozií a pracovních zasedání. Byl zvolen členem Učené společnosti České republiky.

Pavol Iványi byl nejenom velkým vědcem, byl i milujícím bratrem, manželem, otcem a dědečkem, člověkem pevně etickým pravdu a úsilí v životě, polyglot – hovořil sedmi jazyky, vlastencem, milovníkem umění a života.

V jeho úmrtím oznámení bylo: „Žije dále v našich srdcích a ve svých příspěvcích pro vědu.“ Patří mezi velikány naší vědy, medicíny a imunologie. Bude nám chybět.

*prof. MUDr. Ivo Hána, CSc.
předseda Rady vědeckých společností ČR
110 00 Praha 1, Národní 3/1009*

SPECIÁLNÍ SDĚLENÍ

Co nového v prevenci škod působených alkoholem, tabákem a jinými látkami u dětí a dospívajících

Nešpor K.

Psychiatrická léčebna Bohnice, Praha

SOUHRN

Novější výzkumy potvrdily užitečnost interaktivních programů zaměřených na získávání relevantních dovedností potřebných pro život, jako jsou relaxační dovednosti nebo dovednosti rozhodování. Potvrzuje se rovněž význam rodičů při prevenci. Důležité je také snižování dostupnosti alkoholu, tabáku, drog a hazardních her pro děti a dospívající.

Klíčová slova: prevence ve školním prostředí, alkohol, drogy, tabák.

SUMMARY

Nešpor K.: School-based Prevention of Alcohol, Tobacco and Drug Problems: What is New?

Research consistently confirms the efficacy of interactive programmes based on acquiring relevant social and other life skills such as decision making or relaxation skills. The participation of parent is helpful. In the same time it is also important to decrease availability of alcohol, tobacco, drugs and gambling for children and adolescents.

Key words: school based prevention, alcohol, drugs, tobacco.

Ne.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, pp. 585–586.

Toblerová v polovině 90. let minulého století na základě meta-analýzy uvedla, že za účinné (tj. schopné ovlivnit chování) lze považovat pouze interaktivní programy, které využívají nácvik dovedností potřebných k životu (1). S odstupem deseti let je užitečné se zamyslet nad tím, co je v této oblasti nového.

INTERAKTIVNOST

Sussman et al. (2) uvádějí, že program „Project Towards No Drug Abuse“ byl efektivní pouze ve „vysoce interaktivní“ verzi, ne však v jiné méně interaktivní verzi. Důležitý tedy není pouze obsah, ale také způsob podání.

DOVEDNOSTI POTŘEBNÉ PRO ŽIVOT

Programy založené na nácviku dovedností potřebných pro život (dovednosti odmítání, řešení problémů, relaxační dovednosti atd.) nacházejí v literatuře nadále podporu. Ukázalo se dokonce, že patrně nejznámější z nich „Life skills training program“ je účinný také v modifikaci pro děti na nižším stupni základních škol (3). Nácvik dovedností potřebných pro život se těší podpoře Světové zdravotnické organizace. Ta ho doporučuje i v jiných oblastech podpory zdraví, například v prevenci AIDS a dalších infekčních onemocnění nebo při prevenci násilného chování (4). Nácvik dovedností potřebných pro život je použitelný i u dětí a dospívajících se zvýšeným rizikem (5).

RODIČE

Dalším trendem je zapojovat rodiče do prevence u celé dětské populace a zejména u ohrožených (např. 6). V této souvislosti lze zmínit program „Strengthening Families Program“. Ten je zaměřen na 6 až 10leté děti rodičů, kteří užívají drogy. Program zahrnuje 14 sezení. V každém sezení se během první hodiny pracuje s dětmi a rodiči odděleně a během druhé hodiny se s nimi pracuje společně a nacvičují se dovednosti potřebné pro rodinný život. To je následováno společným jídlem a zábavnými aktivitami. Cílem tréninku rodičů je nácvik rodičovských dovedností a snižování jejich abúzu návykových látek. Cílem práce s dětmi je nácvik sociálních dovedností, snižování jejich negativního chování a nácvik chování, které je sociálně akceptovatelné. Cílem práce s celou rodinou je zlepšovat rodinné prostředí a nacvičovat nově získané vzorce chování. Výsledky zahrnovaly snižování počtu rodinných konfliktů, zlepšenou komunikaci v rodině, lepší organizaci rodinného života, snížení poruch chování u dětí a jejich agresivitu a nižší užívání drog.

PEER PRVEK

Účast předem připravených zdravě žijících vrstevníků se podle literatury jeví jako prospěšná. Není však bezpodmínečně nutná, jak se předpokládalo v první polovině 90. let minulého století.

PREVENCE VE SPOLEČNOSTI

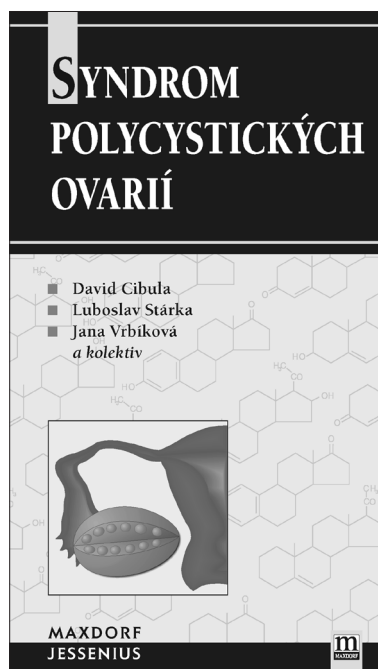
Programy založené ve společnosti využívají zpravidla řadu modalit. Organizace těchto programů i hodnocení jejich efektivity je nejobtížnější. Montoya et al. (7) uvádějí, že se efektivní prevence vyznačuje účastí rodičů, nácvikem dovedností potřebných pro život a dovedností odmítání, normativním vzděláváním, prosazováním a naplňováním zákonných norem, účastí (zdravě žijících) vrstevníků, vhodnou účastí médií a schopností udržet účastníky v programu dostatečně dlouho.

LITERATURA

1. **Tobler, N. S.:** Interactive program are successful: a new meta-analysis findings. 3rd Annual Meeting of the Society for Prevention Research. Scottsdale (Arizona), 1995, abstrakta; 18 s.
2. **Sussman, S., Rohrbach, L. A., Patel, R., Holiday, K.:** A look at an interactive classroom-based drug abuse prevention program: Interactive contents and suggestions for research. *Journal of Drug Education*, 2003, 33, s. 355-368.

3. **Botvin, G. J., Griffin, K. W., Paul, E., Macaulay, A. P.:** Preventing tobacco and alcohol use among elementary school students through. *Journal of Child & Adolescent Substance Abuse*, 2003, 12, s. 1-17.
4. **Skills for Health.** Skills-based health education including life skills: An important component of a Child-Friendly/Health-Promoting School. The WHO information series on school health, document 9, 2003 (viz www.unicef.org/lifeskills/SkillsForHealth230503.pdf)
5. **Roe, S., Becker, J.:** Drug prevention with vulnerable young people: A review (review). *Drugs: Education, Prevention and Policy*, 2005, 12, s. 85-99.
6. **Wu, Y., Stanton, B. F., Galbraith, J. et al.:** Sustaining and broadening intervention impact: A longitudinal randomized trial of 3 adolescent risk reduction approaches. *Pediatrics*, 2003, 111, s. 32-38.
7. **Montoya, I. D., Atkinson, J., McFaden, W. C.:** Best characteristics of adolescent gateway drug prevention programs. *Journal of Addictions Nursing*, 2003, 14, s. 75-83.

Tato práce vznikla v rámci Evropského akčního plánu o alkoholu a je možné ji šířit bez omezení.



SYNDROM POLYCYSTICKÝCH OVARIÍ

David Cibula, Luboslav Stárka, Jana Vrbíková

Syndrom polycystických ovarií (PCOS) je s největší pravděpodobností nejčastějším onemocněním žen ve fertilním věku a inspiruje již téměř 60 let gynekology a endokrinology k intenzivnímu bádání. Výzkumem, diagnostikou a léčbou PCOS se zabývala nejen řada pracovišť v zahraničí, ale i u nás.

Monografie vznikla na základě spolupráce pracovníků z Gynekologicko porodnické kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a Výzkumného ústavu endokrinologického. Dr. Cibula je mladý, nadějný, systematický lékař s velkou invencí, který navázal na klinickou práci prof. Kobilkové. Brzy po promoci dokázal skloubit klinickou a výzkumnou práci a v oblasti hyperandrogenních stavů je jedním z předních odborníků u nás. Profesor Stárka je naším nejvýznamnějším odborníkem ve výzkumu poruch metabolismu steroidů a svým příspěvkem do této knihy pokračoval ve své práci z roku 1967. Dr. Vrbíková přináší do problematiky důležitý pohled vědeckého pracovníka zaměřeného na inzulinovou rezistenci a poruchy metabolismu. Spoluprací tří editorů vznikla v posledních létech řada prioritních publikací s mezinárodním ohlasem. Výsledky těchto studií společně s doporučeními předních zahraničních odborníků v oblasti PCOS byly podkladem pro napsání této knihy.

Téma monografie je aktuální a přináší nové informace ze základního a klinického výzkumu, které mají praktický dopad pro klinickou praxi. Publikace je přehledná a ve srozumitelné formě lze zde vyhledat praktická doporučení včetně návodů na léčbu a sledování výsledků této léčby.

Vydal Maxdorf v roce 2004, edice Jessenius, ISBN 80-7345-005-4, formát A5, brož., cena 185 Kč

Objednávku můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts.@cls.cz

DĚJINY LÉKAŘSTVÍ

Dobřany na konci devatenáctého století

Klik J.

SOUHRN

Zemský ústav pro choromyslné v Dobřanech byl koncem 19. století vzorem pro ostatní ústavy. Pohyb pacientů i stav personálu byly oproti současné době omezené. Léčba odpovídala tehdejší medicínské úrovni, spočívala hlavně v pečovatelské službě a léčbě prací. Mezilidské vztahy mezi lékaři nebyly však po určitou dobu ideální.

Klíčová slova: Zemský ústav pro choromyslné Dobřany.

SUMMARY

Klik J.: Dobřany at the end of Nineteenth Century

At the end of 19th century, the Municipal Institute for patients with mental diseases in Dobřany represented a standard for other Institutes. The fluctuation of patients and staff was in comparison to nowadays limited. The therapy corresponded to medical level of that time, consisted mainly of nurturant services and working therapy. For a certain period of time, interpersonal relations among the medical staff were not ideal.

Key words: The Municipal Institute for patients with mental diseases in Dobřany.

Kl.

Čas. Lék. čes., 2006, 145, p. 587–588.

Zemský ústav pro choromyslné v Dobřanech, jak zněl oficiální název, byl na konci 19. století považován za vzor nejmodernějších ústavů ve střední Evropě.

Bylo to ještě relativně mladé zařízení, na jehož pavilonech postavených před méně než dvaceti roky, obrazně řečeno, ještě neoschla omítka.

Ústav byl rozdělen na část mužskou a ženskou a jeho členění za administrativní budovou (zničenou za války v roce 1943) bylo naplánováno účelně a dle moderních zásad. V prvním sledu to byl trakt přijímacích oddělení, pak pás oddělení tělesně nemocných a chronických a nakonec pavilony pro neklidné nemocné. Mezi nimi na obvodu těchto základních oddělení byly menší budovy, „villy“ a „kolonie“ pro klidné a pracující pacienty.

Odbornou úroveň zajišťovala často osobnost ředitele ústavu – první byl dr. Arnold Pick, známý ze světové literatury a u nás neprávem opomíjený. Později se stal profesorem pražské německé kliniky.

Na rozhraní století byl nejvíce vzpomínán ředitel dr. Jan Hraše (1), čtvrtý ředitel ústavu, vynikající organizátor, jenž pozvedl ústav na vysokou úroveň (2).

Stav pacientů vystoupil na 1400 (3). Lékařů byla oproti současné situaci jen hrstka, kolem osmi. Asi stejně tolik bylo úředníků. Počet opatrovníků a opatrovnic dosahoval počtu 200. Jejich práce se v některých ústavech řídila tak zvaným „čeledním řádem“ (4). Byla hlavně kustodiální a pečovatelská, spočívající v hlídání pacientů a udržování důsledného pořádku (4). Snad proto došlo během roku jen k nepatrnému počtu útěků – 3 až 4.

Léčba byla omezená, spočívala jen v podávání tehdy dostupných sedativ a omezujících fyzikálních prostředků.

Za rok bylo přijato do ústavu již kolem 600 pacientů, což je několikanásobně méně než v současné době. Diagnostická kritéria byla jednoduchá. Duševní poruchy se dělily na vrozené a získané, získané pak na jednoduché a sdužené. Tam patřila progresivní paralýza, epi-

lepsie, neurastenie a další. K intoxikační poruše patřil alkoholismus. Za rok v ústavu zemřelo něco přes 300 nemocných a nejméně dvě třetiny z nich byly pitvány. V příčinách úmrtí byla nejčastěji uváděna pneumonie, tuberkulóza, atrofie mozku, vnitřní krvácení a další.

Ošetřování nemocných bylo podle kvality rozděleno do tří tříd. V první třídě, kde bylo jen málo pacientů, činila ošetrovací taxa 2 zlaté a 50 krejcarů. Ve třetí, nejnižší to bylo 80 krejcarů. Umístování pacientů do Dobřan i jiných ústavů se řídilo rajonizací. Dobřanský ústav zabezpečoval z území Čech něco přes dva miliony obyvatel, tj. 32 %. Někteří nemocní byli též překládáni z Dolního a Horního Rakouska. Celá řada tak zvaných klidných nemocných musela být dána do péče obcí a přežívala zde.

Zajímavou kapitolou byly vztahy mezi ředitelem, primáři a sekundáři. S podobnými problémy se setkáváme ve zdravotnictví i v současnosti. I dnes se projevují podobné situace a vytvářejí se „pro“ a „protitábory“. Totéž se odehrávalo i tenkrát (3). Řediteli Hrašemu se vytýkalo, že je osobou kontraverzní, že je sice pracovitý a energický organizátor, ale že jeho zásluhou museli někteří „neposlušní“ lékaři z ústavu odejít, neboť byli ve stálém boji proti řediteli a jiným lékařům. Důvodem ke sváru bylo například to, že Zemský parlament v rámci úsporných opatření snížil svojí komisí rozpočet na léky činící 3000 zlatých ročně na polovinu, stejně jako příspěvek na literaturu. Sekundáři se zatvrdili, když se jim přestaly platit jimi prováděné pitvy a zmenšila se jejich práva podávat nemocným mimořádné příděly (5).

V Zemském parlamentu se proti Hrašeho kritikům „despotického“ řízení postavil poslanec dr. Eduard Grégr, jeden ze zakladatelů strany Mladočechů, stejně jako jeho bratr a politik dr. Julius Grégr. Také některý tisk si bral na paškál ústav v Dobřanech, když tamní poměry pranýřoval. Například se měl tehdy objevit v Národních listech kritický článek určitého druhu, který ředitele silně rozeznil a usilovně hledal viníka. Ani v té době to nebylo tedy „nic nového pod sluncem“.

Další citlivou otázkou pro Dobřany byla i ta skutečnost, že byly umístěny v pásmu mezi Čechami a Sudety. Národností napětí kulminovalo i zde. V Zemském parlamentu se musel obhajovat dr. Grégr z osočování německých poslanců, že je v Dobřanech zaměstnáno málo občanů německé národnosti. Napětí se vystupňovalo v roce 1938, kdy byly Dobřany i s ústavem zabrány do Sudet a staly se německým zařízením.

Jiné archivní dopisy svědčí naopak o tom., že lékaři v dobránském ústavu žili jinak v příjemné rustikální pohodě. Psalo se o nich, že si pořádají příjemné, společné, opulentní hostiny a jezdí ústavním kočárem trávit volné dny na Křížový vrch u Stoda, který je dominantou krajiny. Zabývají se svými koníčky, především prací ve svých kvetoucích zahrádkách.

Závěrem lze říci, že postavení a úroveň ústavu byly na konci předminulého století ve své době na výši. Oproti dnešku byl pohyb pacientů omezený, byla dávana do popředí důsledná péče o nemocné a zabránění útekům v zájmu ochrany společnosti.

Léčba byla ponejvíce fyzikální a léčba prací. V mezilidských vztazích byla situace obdobná, s jakou se setkáváme i v pozdějších obdobích.

LITERATURA

1. **Baudiš, P.:** Kniha MUDr. Jana Hraše „O potřebě prohloubení naší péče o duševně nemocné z r. 1916“. Čs. Psychiat., 1997, 2, s. 109-113.
2. **Šedivec, V.:** Osobnost ředitele MUDr. Jana Hraše. Sborník: 75 let Psychiatrické léčebny v Dobřanech. s. 44-49.
3. **Klík, J.:** Zemský ústav v Dobřanech v r. 1987. Čs. Psychiat., 1974, 2, s.129-130.
4. **Mečír, J.:** Domácí řád Královského Českého Zemského ústavu pro chomyslné platný v posledních letech 19. století. Čs. Psychiat., 1997, 4, s. 289-290.
5. **Dobíšek, K.:** Dopisy z Dobřan. Osobní archiv.

Prosím, věnujte pozornost tomuto sdělení!

Po dohodě redakce ČASOPISU LÉKAŘŮ ČESKÝCH s nakladatelským a tiskovým střediskem ČLS JEP počínaje číslem 1/2005 zpoplatňujeme publikaci článku s dedikací grantového či jinak finančně podporovaného výzkumu a vývoje z veřejných zdrojů. Cena jedné černobílé tiskové strany v časopisu je 1800 Kč včetně DPH, přičemž potřebnou částku lze čerpat z prostředků na tento výzkum.

Důvodem k zavedení poplatku je mj. skutečnost, že ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH v posledních dvou letech zveřejňuje téměř 53 % prací z oblasti výzkumu podporovaných z veřejných zdrojů.

Přes finanční podporu, které se prezidiálním časopisu dostává cestou vedení ČLS JEP, je ekonomická situace časopisu obtížná a limitující. Uvedené opatření považujeme za legitimní a doufáme, že se setká s pochopením autorů prací.

S oznámením o doručení rukopisu Vám redakce zašle formulář objednávky k publikaci vaší práce. Po navrácení vyplněné objednávky Nakladatelskému a tiskovému středisku ČLS JEP bude Vaše práce neprodleně předána k recenzi. Částka bude zálohově fakturována ve fázi korektury a daňový doklad Vám bude zaslán po zveřejnění článku.

Věnujte, prosím, zvýšenou pozornost aktualizovaným pokynům pro autory. Bližší informace Vám poskytne Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel./fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz

*doc. MUDr. Petr Bartůněk, CSc.
vedoucí redaktor*

ZPRÁVY

Zamyšlení nad Postgraduálními lékařskými dny v Plzni Plzeň, 16. a 17. února 2006

Postgraduální lékařské dny v Plzni pořádala Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni, a Česká lékařská společnost J. E. Purkyně – Spolek lékařů v Plzni ve spolupráci s Fakultní nemocnicí v Plzni a Českou asociací sester.

Společným tématem všech vystoupení byla problematika „Onemocnění cév a jejich léčení v současnosti“. Téma vsutku široké, zajímavé a hlavně aktuální, spojující řadu odborníků interních i chirurgických oborů. Systémové zaměření na cévy představovalo samozřejmě množství sdělení. Celé jedno půldne zaujímaly přednášky cévních chirurgů, kteří už jenom s ohledem na to, že se celá desetiletí věnují v plzeňské FN s úspěchem transplantaci ledvin, že provádějí náročné rekonstrukční operace tepen dolních končetin a výkony na karotidách, mají v cévní problematice ve FN v Plzni jedno z hlavních slov.

Osobně jsem mohla vyslechnout sdělení, která se zabývala technologickými postupy zprůchodňujícími náhle obturovaný cévní systém v oblasti tepen srdce a mozku.

Zajímavá byla v tomto ohledu sdělení kardiochirurgů a neurochirurgů, ale i radiodiagnostiků, neboť přístupy všech těchto odborníků, ať už konzervativní, semiinvasivní nebo invazivní, vedou při včasném zákroku k obnovení perfuze, a tím i k záchraně tolik důležitého orgánu, jakým je srdce nebo mozek. V těchto případech jde často nejen o záchranu života člověka samotného, ale především života se zachováním všech jeho dosavadních kvalit včetně důležitých složek sociální. Je tím tedy naplňován ten cíl, který by měl být sledován v každém medicínském oboru: odvrátit smrt a dále pak prodloužit plnohodnotný život.

Tyto snahy jsou u jednotlivých oborů sice sledovány, ale pravděpodobně někdy chybí konsenzus, podle kterého by se zvolil nejracionalnější, nejefektivnější a i neekonomičtější postup. Takový pocit jsem měla při vyslechnutí přednášek některých výše zmíněných odborníků, kteří se terapeuticky zabývají cévním systémem mozku. Vždyť obnova perfuze mozku při náhlém uzávěru lumina cévy jakékoliv etiologie nemusí vždy znamenat, že je vyhráno. Je třeba dále sledovat, zda různě provleklá porucha perfuze a z toho rezultující hypoxie v cílovém orgánu nepřinesla nějaká další nebezpečí a komplikace, zda není na místě ještě jiná léčba, například léčba kyslíkem, nejlépe v přetlaku. Ta dokáže korigovat následky přechodné hypocirkulační hypoxie lokálního významu a dále pak i hypoxický otok mozku s jeho nebezpečím i v podobě vzniku generalizované mozkové hypoxie sekundárního typu.

Zmíněnou hyperbaroxii prezentoval naproti tomu zkušený radiodiagnostik, který má při své specializaci málokdy příležitost indikovat nemocného pro tento typ léčby. Jeho hluboká erudice a zájem o užívání této metody však vede k tomu, že na ni v pravou chvíli pomýšlí. Ten u mladší nemocné karotidu semiinvasivním způsobem zprůchodnil a přes užití protekčního filtru se dostavila během výkonu porucha hybnosti, manifestující ischemický iktus. Bez dlouhého přemýšlení o etiologii této jasné poruchy perfuze byla zmíněná nemocná opakovaně exponována v léčebné barokomoře s užitím 100% kyslíku a následně došlo k restituci ad integrum. Je totiž přirozené, že při těchto výkonech může dojít přes veškerou opatrnost ke vzniku vzduchové embolie. Stejně tak může dojít ke známým spazmům intracerebrálního cévního řečiště. Není pak na místě hyperbaroxii užít v každém případě a co nejdříve? Někdo jistě namítne, že kyslík v nadbytku vyvolává sám vazokonstrikci. Je však také známo, že zvýšený obsah kyslíku během hyperbaroxie plně kompenzuje eventuálně rezultující sníženou perfuzi a její následky. Argument zvaný „fatální vazokonstrikce“ tedy neobstojí, a to ani podle našich klinických zkušeností.

V následné diskuzi došlo k výměně různých názorů a k vyjasňování i některých užitých termínů. Mladý kardiochirurg například uvedl, že provedený koronární bypass je „paliativní“ zákrok. Když však zvážíme, že jde o obnovení dodávky kyslíku k samotnému myokardu, pak jde nepochybně

o zákrok „patogenetický“! Více mě však zamrzelo hodnocení efektivity tohoto akutního chirurgického zákroku z různých aspektů:

- firmy (asi se zdravotnickými prostředky) prý už nemají o tuto problematiku zájem;
- v odborných sděleních již není o čem psát;
- zákrok je velmi náročný na manuální zručnost kardiochirurga;
- takže prospěch má vlastně jen pacient.

A já stále žiji v domnění, že pro pacienta toto vše podnikáme, zdokonalujeme a na nic jiného skoro nebereme zřetel ani ve svém podvědomí, natož při veřejném vystoupení na odborném fóru! A když, tak alespoň v obráceném pořadí hodnocených hledisek!

Nemohu souhlasit s názorem zkušeného neurologa, že prý konkurence mezi obory při řešení dané problematiky je přínosná, neboť prý se ruší zavedené stereotypy. Dle mého soudu správná „cesta tudy nevede“. Tím, že naším společným cílem je uzdravení anebo alespoň zlepšení nemocného, nebudeme mezi sebou soutěžit, „kdo dřív a kdo lépe“! Medicína 20. a 21. století je přece založena na týmové práci, která probíhá dle přijatého konsenzu. Ten však není dogmatem, jak se obával mladý neurochirurg. Vždyť on sám měl dokonale dokumentovaná sdělení, kde byly uvedeny prověřené racionální postupy a zhodnocena jejich efektivnost. To však jistě neznamená, že v krátkém či delším časovém odstupu nebude prezentována korekce, na které opět došlo ke shodě zainteresovaných odborníků.

Překvapily mě argumenty jiného zkušeného neurologa, který pochyboval o tom, že by byl akceptován eventuální návrh na vytvoření konsenzu z plzeňské FN. To mě nutí přemýšlet o tom, jakým stylem pracuje příslušná odborná společnost či společnosti ČLS JEP? A když by se z jakýchkoliv objektivních důvodů neuplatnil návrh z Plzně, tak se snad vytvoří potřebný návrh a posléze konsenzus jiný. Vždyť těmito kroky nesledujeme vlastní nebo místní prestiž a nejde nám ani o „lukrativní“ výkony, ale jde nám přece o prospěch nemocného! Vžijme se také někdy do jeho situace, tzv. do jeho kůže!

Ze zajímavého půldne jsem si odnesla znovu přesvědčení, že v medicíně pokračuje hluboká specializace vědomostí, manuální i přístrojová v mnoha dílčích a úzkých oborech a že jsou nadále a v rychlém sledu zdokonalovány technologické postupy. Že je však potřeba budovat centra, která se budou specializovat na řešení chorobného postižení orgánu či systému s participací všech specializovaných odborníků, jejichž odbornost má k chorobě ať už hlavní, nebo vedlejší vztah. Tito odborníci by pak pod vedením zkušeného specialisty, resp. týmového lékaře, měli pracovat na určitém konsenzu, na standardizaci diagnózy i terapie. Tím bude docíleno efektivity léčebné i ekonomické.

Pokud nebudou tyto postupy respektovány, pak jakékoliv „léčení“ zdravotnictvím včetně jeho financování je hromadění omylů a doplatí na to jak pacient, tak i veřejné finanční prostředky. Zatím. Brzy půjde i o to, aby nemocný nemusel na neracionální přístupy připlácet z vlastní kapsy. V aktuálním denním tisku (Plzeňský deník, 2. března 2006, s. 6) je uvedeno, že slovenská lékařská komora vyzvala lékaře, aby začali od nemocných vybírat peníze od 1. března t.r. v hotovosti. Dominový efekt opět pokročil. Věřme, že řízení slovenského zdravotnictví se nám vzorem nestane, i když nám pan náměstek ministra zdravotnictví Slovenské republiky ing. Pažitný dost často přednáší na seminářích, organizovaných krajským zastupitelstvem.

*doc. MUDr. Milada Emmerová, CSc.
náměstkyně ředitelky FN Plzeň pro vzdělávání a styk s Lékařskou fakultou v Plzni*

*I. interní klinika FN
305 99 Plzeň – Bory, dr. Edvarda Beneše 13
e-mail: emmerova@volny.cz*

ZPRÁVY

Israel Revisited aneb II. mise českého zdravotnictví do Izraele

20.–26. února 2006

Koncem února tohoto roku proběhla již podruhé Mise českého zdravotnictví do Izraele. Navázala na úspěšnou první misi z května 2004 a opět ji uspořádala Smišená česko-izraelská obchodní komora v organizačním zajištění společnosti ALEA Tours and Trade Praha. Oproti minulé misi, o níž jsme referovali v časopisu Praktický lékař (2004, 84, s. 365–424), měla tato téměř dvojnásobný počet účastníků a poněkud odlišný program, specializovaný převážně na krizové řízení situací s hromadným výskytem raněných a na využití moderních informačních a komunikačních technologií ve zdravotnictví. Misi vedl doc. MUDr. Leo Klein, CSc., přednosta Kliniky popáleninové medicíny 3. LF UK a FNKV a předseda odborné Společnosti vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů ČLS JEP. Účastníky

a řešení MCS, které pořádá i výjezdové výukové akce pro zahraniční subjekty (přednemocniční složky, nemocniční lékaře, sestry a administrativní pracovníky).

Filozofie haifských odborníků je jednoduchá: Nové tisíciletí začalo připomínkou, že k teroristickému útoku nebo hromadnému neštěstí (třeba k chemické havárii) může dojít kdekoli. At již jde o jedno nebo druhé, otázka není zda, ale kdy a kde. Je třeba definovat, co z hlediska zdravotnického systému je MCS a patřičné složky systému na ni připravit. Organizace je klíč k úspěchu. Fungovat mohou jedině jasná a stručná pravidla řádně implementovaná při jasně vymezené kompetenci jednotlivých složek, koordinace a jasné, stručné, okamžitě dostupné písemné pokyny (standing



Obr. 1. Prohlídka sanitních vozů Magen David Adom (vpravo vedoucí Mise doc. L. Klein)



Obr. 2. Moderní nemocnici Soroka v Beershevě ještě čeká značné rozšíření

mise byli zejména pracovníci státní správy a regionální samosprávy z oblasti zdravotnictví, zástupci zdravotnických záchranných služeb, inženýři a odborníci a kliničtí lékaři.

Je nezvyklé začínat zpravu od konce programu, avšak v případě letošní exkurze je to správně. To nejpodstatnější pro krizové řízení totiž bylo řečeno tím nejjednodušším způsobem právě na posledním navštíveném pracovišti, kterým byla nemocnice Rambam (Rambam Health Care Campus) v Haifě. Delegaci zde přijali ředitel nemocnice profesor Rafael Beyar, ředitel centra urgentní medicíny a traumacentra dr. Moshe Michaelson a paní Gila Hyamsová, koordinátorka pro situace při hromadných neštěstích a ředitelka ošetrovatelského centra (sekce chirurgie).

Rambam je jednou z pěti hlavních nemocnic v Izraeli a největší v severní Izraeli. Je státní, má 4000 zaměstnanců a 1000 lůžek. Poskytuje primární péči třicetitisícové Haifě a specializovanou péči více než jednomu a čtvrt milionu obyvatel v oblasti mezi Haderou a severní hranicí země. Slouží jako fakultní nemocnice lékařské fakultě technické univerzity (Technion), spolupracuje s předními americkými a evropskými nemocnicemi a je největším lékařským centrem, které poskytuje služby mírovým silám OSN na Středním Východě a 6. flotile USA sídlící v haifském přístavu.

Právě blízkost severní hranici se Sýrií a Libanem a související přísun raněných ze severní fronty, stejně jako dlouholetá zkušenost s hromadnými neštěstími (MCS – mass casualty situations) napomohly vzniku mezinárodně uznávaného traumacentra s novou koncepcí a inovativním řízením. Toto centrum má statut školicího pracoviště traumatologie, urgentní medicíny

orders) pro všechny myslitelné varianty MCS. Osvojené algoritmy je třeba cvičit tak dlouho a tak pravidelně, až se stanou podvědomými. Důležitá je zpětná vazba (debriefing). Jednoduchý systém (typologické rozdělení MCS, rozdělení MCS na jednotlivé fáze, plán, postup podle písemných pokynů, nácvik) přitom vychází z velmi podrobné analýzy (např. statistické vyhodnocení poklesu kvality péče v závislosti na růstu počtu MCS pacientů v jedné nemocnici, optimalizace rozdělení zdravotnického personálu, distribuce materiálu a krve, optimalizace třídění a přesměrování pacientů v závislosti na jejich množství a povaze poranění atd.).

V mnohém navázala tato prezentace na předcházející návštěvu delegace v sídle izraelské záchranné služby Magen David Adom (MDA) v Tel Avivu. Jde o nevládní neziskovou organizaci se sto stanicemi na celém území Izraele (mimo teritoria pod palestinskou územní samosprávou). Disponuje 650 základními sanitkami (BLS – basic life support) a 110 speciálními vozy (ALS – advanced life support) a 21 vozy určenými výhradně pro hromadná neštěstí (multicasualty response vehicles). MDA má 1500 zaměstnanců a 7500 dobrovolníků v jedenácti regionech (nyní je v terénu 7000 pagerů pro rychlý kontakt). Od vypuknutí intifady v roce 2000 do konce loňského října vyjela MDA k 7550 obětem teroristických útoků, jejichž výsledkem bylo 976 mrtvých (a více než 600 těžce zraněných, zhruba 900 středně těžce a 5000 lehce zraněných). Včetně běžných záležitostí absolvuje MDA průměrně 1200 výjezdů denně.

Také zde bylo jasně definováno zadání: Zvládnout MCS, která přesahuje okamžitou místní kapacitu tak, aby pacient přežil. Postupuje se podle co nej-

jednodušších pokynů (guidelines, revidují se každých šest měsíců). Každý rok se koná opakovací kurz. Trénuje se koordinovaně (např. velitelem pro incident je vždy zástupce policie, silná opora je v nemocničním systému, MDA úzce spolupracuje s palestinským Červeným půlměsícem). Plán reflektuje realitu, takže například počítá i s přihlížející veřejností. Tu není třeba vždy vyhnat z místa neštěstí. I laik může dostat materiál k stavění krvácení a zapojit se do pomoci.

Součástí MDA je i Ústřední izraelská krevní banka (Blood Services Center). Odpovídá za odběry, zpracování, testování a distribuci krevních jednotek a komponent v celé zemi a zásobuje i armádu. Devadesát procent krve obstarávají mobilní jednotky, jen deset procent se odebere ve stanicích. Dárcovství krve je možné od 17 let věku a je bezplatné, dárce však obdrží kredit pro budoucnost (Future Credit). To znamená, že bude-li v budoucnu sám potřebovat krev, nemocnice se již na něj nebude obracet, aby se pokusil mezi přáteli či příbuznými získat dárce pro počet jednotek, které vypočítal, což je postup, který se jinak v Izraeli uplatňuje. Součástí prezentace krevní banky byly výstupy z programu Progesa firmy MAK, který kontinuálně mapuje, kde je v dané chvíli jaká zásoba jaké krve či krevních komponent. Strategickým dokumentem k okamžitému použití (ve skutečnosti jde o malou tabulku do kapsy) je souhrnná denní informace, Daily Inventory Report, pro celý Izrael.

Prezentace zaměřené na krizové řízení lze těžko oddělit od prezentací informačních a komunikačních technologií (ICT), protože první by bez toho druhého prostě nefungovalo.

Relativně více na ICT byl zaměřen program delegace v univerzitní nemocnici Soroka (Soroka University Medical Center) v Beershevě. Českou delegaci zde přijali generální ředitel nemocnice dr. Eytan Hyam, ředitel klinických informačních systémů dr. Julian Zelingher, zástupce generálního ředitele nemocnice dr. Gilbert Sebbag a přednosta kliniky plastické chirurgie a popáleninového centra profesor Lior Rosenberg.

Soroka je po telavivské nemocnici Tel Hashomer v Izraeli druhá největší. Patří největší izraelské zdravotní pojišťovně Clalit*, má 1000 lůžek a zabezpečuje půl milionu lidí v jižní části země, od Aškelonu po Eilat. Válka sem občas přivede i zraněné civilisty z Gazy. Izraelský zdravotní systém charakterizoval dr. Zelingher jako „socializovanou“ zdravotní péči podobnou britskému modelu**.

Od roku 1995 používá Clalit, a následně i Soroka, program Clicks® (viz www.roshtov.com). Je to klinicky založený systém napojený na místní management, který je zase napojen na hlavní kanceláře Clalitu. Lékaři a ostatní zdravotničtí pracovníci mají přístup k aplikacím podle své specializace nebo k segmentům systému na základě hesel. Klíčové lékařské informace se vysílají do centrálního počítače Clalitu ze všech pracovišť, čímž vzniká databáze klíčových lékařských informací. Tyto informace jsou zase dostupné opačným směrem z kterékoli pracovní stanice Clicks® a umožňují okamžitý pohled na celou pacientovu anamnézu. Zabudován je modul preskripce léků (v Soroce funguje celoplošně od roku 2001), který dokonce upozorňuje na lékové interakce a navrhuje alternativy. Takový program funguje i jako optimalizační nástroj, tj. pomáhá hlídat náklady v celé organizaci.

V letech 1997–1998 zahájila Soroka projekt datového skladu (DW – Data Warehouse) se společností Ness Technologies, Inc. Jde o na míru šitá rozhraní (interfaces), která od roku 2003 umožňují managementu integrovaný pohled na veškerá data instituce a ještě mohou srovnávat mezi nemocnicemi.

Běží i další integrační projekty (CDR and Web Based Clinical System Project, dbMotion), které řeší jak dostupnost a skladování, tak i bezpečnost dat.

Řešení dbMotion (rovněž původní produkt společnosti Ness) je webová technologie, která zprostředkovává poskytovatelům lékařské péče bezpečný přístup k vybraným částem zdravotní dokumentace pacienta vedené nezávisle v různých zařízeních v různých informačních systémech bez ohledu na jejich fyzické umístění a formát dat. To je možné díky „virtuální zdravotní kartě“, která obsahuje relevantní informace o pacientovi, aniž by byly jakýmkoli způsobem ovlivněny originální záznamy v jednotlivých systémech. Data lze sdílet uvnitř organizace i mezi organizacemi i bez standardizace jazyka a protokolů, tedy bez přímé interoperability systémů (nově bude dbMotion sloužit jako technologická platforma pro nový zdravotnický informační systém v Holandsku, viz <http://www.ness.com/CZ/dbMotion.htm>).

Soroka má 30 zaměstnanců v IT oddělení a využívá i externích služeb. Vybavení nemocnice čítá 3000 stolních počítačů a 1000 laptopů a vyžaduje každoroční investice. „Máte problémy s obnovou hardwaru? Tak raději nedělejte informační systém, nebude to fungovat.“ zněl optimistický závěr dr. Zelinghera.

Zajímavá byla také negativní zkušenost Soroky s elektronickými zdravotními kartami a upřednostnění centralizované databáze dat, a negativní zkušenost v oblasti telemedicíny (pilotní projekt diabetické kontroly selhal, lidé chtějí živý kontakt s lékařem). Telemedicina se v Izraeli ovšem dobře uplatňuje v oblasti radiologie.

Bylo mnoho dalších zajímavých přednášek, a byl také veletrh MEDAX s doprovodným kongresem, kde informační technologie byly na pořadu dne jak v sekci diagnostiky, tak i terapie. Je zřejmé, že jde o „hot topic“, ať již z hlediska kvality péče nebo regulace nákladů na zdravotnictví, které jsou vždy a všude větší než objem peněz právě dostupný na jejich pokrytí.

Izraelci nejspíš nadávají na své zdravotnictví stejně jako mnozí z nás. Koluje dlouhá a docela legrační anekdota o tom, jak Bůh dělal pro Adama a Evu to nejlepší a Satan mu to pořád kazil. Nakonec Bůh stvořil léky, aby napravily následky špatné životosprávy našeho nejstaršího páru. Satan se však jen usmál – a stvořil zdravotní pojišťovnu. Člověk by si řekl, že všude je to stejné. Ale asi není. To kouzelné slovo je systém. „Zdejší problémy zejména pramení z toho, že tady každý nejlíp ví, co si přeje Bůh,“ pravila naše izraelská průvodkyně v jednom místě historického výkladu. To v jisté variaci také známe. Co se však týče izraelského zdravotnictví, patrně někteří zúčastnění ustoupili ze svého neochvějného přesvědčení a umožnili tak existenci slušně hierarchizovaného systému, ve kterém je vidět na práci, pacienty i peníze. Vcelku pěkná výjimka z pravidla, že?

PhDr. Michaela Malinová
e-mail: malinova@levyn.cz

* Izrael má povinné základní zdravotní pojištění, a to u libovolné ze čtyř zdravotních pojišťoven: Clalit (58 % pojištěnců), Maccabi (22 %), Meuhedet (10 %) a Leumit (10 %). Platby jsou kapitační, závislé na věku pojištěnce. Pojišťovny vlastní některé nemocnice a s dalšími zařízeními uzavírají smlouvy, takže se okolo nich vytváří určitý systém, který se nazývá HMO (Health Maintenance Organization). Služby hrazené pojišťovnami tvoří tzv. košík. Košík se každý rok aktualizuje. Běžné a vhodné je připojištění pro služby, které v košíku nejsou (např. dentální péče, optometrie).

** Ve zdravotnictví se angažuje jak vláda, tak odbory (Clalit je původně odborová pojišťovna). Většina lékařů v Izraeli jsou zaměstnanci, nemocnice jsou buď státní, vlastněné HMO nebo veřejné (nestátní vlastnická struktura, příkladem je jeruzalémská Hadassah). Většinu lékáren vlastní HMO, menší část je soukromá. Většinou soukromá jsou rehabilitační a geriatrická zařízení.

NEJVÝZNAMNĚJŠÍ OSOBNOSTI PRAŽSKÉ LÉKAŘSKÉ FAKULTY

HERMANN HUBERT KNAUS

(1892–1970)

Po rozdělení pražské univerzity na českou a německou v roce 1882 a její lékařské fakulty o rok později se nástupkyněmi původní univerzity staly obě instituce. V roce 1920 byl tento nárok německé univerzitě zákonem odepřen, přesto se i nadále považovala za dědičku Karlova učení i ona, i když zakladatelovo jméno bylo vyhrazeno pouze české univerzitě. Stejně tak profesori německé lékařské fakulty v Praze navazovali na své předchůdce a patří tak neodmyslitelně do dějin pražské univerzitní medicíny. Podobně jako v letech 1883–1918, byli za první republiky mezi pražskými německými profesory nejenom rodáci z Čech a Moravy, ale i Rakušané a občané Německa. V nejproblematičtějším, respektive nejtragičtějším období dějin pražských univerzit v letech 1939–1945 počet „říšských“ Němců vzrostl (po odstranění židovských kolegů) i na německé lékařské fakultě a velká část z nich se bez problémů konformovala s nacistickým režimem. Mezi profesory německé lékařské fakulty v Praze v rušných 30. letech minulého století a v letech války nad jiné vynikl gynekolog Hermann Hubert Knaus, a to nejenom jako světoznámý vědec, ale v době „vymknuté z kloubů“ jako jeden z mála, který si po celou dobu nacistického režimu uchoval čistý štít.

H. H. Knaus se narodil 19. října 1892 v rakouském, přesněji řečeno korutanském St. Veit an der Glan v rodině kupce. Medicínu vystudoval (s přestávkou válečných let 1914–1918) na lékařské fakultě ve Štýrském Hradci (Graz), kde byl 2. března 1920 promován doktorem medicíny. Po promoci pracoval nejprve jako pomocný asistent v patologicko-anatomického ústavu lékařské fakulty ve Štýrském Hradci (1920), poté jako operační elév chirurgické kliniky tamtéž (1921), aby nakonec zakotvil na klinice gynekologicko-porodnické

prof. Emila Knauer. Začínal na ní jako operační elév (1922), od ledna 1923 byl neehonorovaným asistentem. V letech 1924–1925 strávil s podporou Rockefellerova stipendia rok na studijních pobytech v Londýně, Cambridgi, Berlíně a Paříži. Po návratu do Štýrského Hradce se stal od ledna 1926 opět asistentem gynekologicko-porodnické kliniky. Z gynekologie a porodnictví se habilitoval 15. července (20. srpna) 1927. Po další studijní cestě do Berlína a Paříže v roce 1930 se stal 30. října 1930 mimořádným profesorem hradecké univerzity. V říjnu 1934 byl povolán na místo přednosty porodnické a gynekologické kliniky německé lékařské fakulty v Praze, kde byl zanedlouho (1. července 1935) jmenován řádným profesorem. V Praze vykonával v letech 1939–1940 rovněž funkci děkana lékařské fakulty. Kromě univerzitních povinností zastával po roce 1939 také pozici vrchního vojenského lékaře a v letech 1942–1943 byl ředitelem německé školy pro porodní asistentky v Praze. Během pražského pobytu odmítl několik jiných nabídek na profesuru (Štýrský Hradec, Istanbul, Innsbruck). Po válce odešel zpět na lékařskou fakultu do Štýrského Hradce, ale již roku 1948 přesídlil jako hostující profesor do Londýna. V roce 1949 se vrátil do Rakouska, kde působil na gynekologicko-porodnickém oddělení ve Vídni-Lainzu, od roku 1951 jako jeho vedoucí lékař. V roce 1960 odešel na odpočinek.

Knaus přišel do Prahy již jako uznávaný vědec, pět let po uveřejnění svého nejznámějšího objevu. V roce 1929 stanovil na základě svých fyziologických experimentů cyklus plodných a neplodných dní u ženy, v jehož rámci je možné vypočítat jak optimální dobu pro početí, tak naopak určit neplodné dny. Výsledky svého výzkumu publikoval v roce 1933 v časopise *Zentralblatt für Gynäkologie* pod titulem *Die periodische Frucht- und Unfruchtbarkeit des Weibes*. O rok později vyšla práce ve Vídni v rozšířené podobě jako monografie v německé, anglické a španělské verzi. Další pozměněné

vydání bylo v jazykových mutacích publikováno po válce. Ke svým závěrům došel nezávisle na výzkumech japonského gynekologa Kjúsaka Ogina (1882–1975), s nímž ve své monografii částečně polemizoval. Metoda výpočtu plodných a neplodných dní, uznávaná mimochodem jako „přirozená“ (ale nepřilíží spolehlivá) metoda zabránění početí i katolickou církví, je nazvána po obou svých objevitelích Knaus-Ogina. Ve své vědecké a publikační činnosti pokračoval i v Praze, a to – na rozdíl od řady svých pražských kolegů – s neztenčenou intenzitou i za války.

Na pomyslné škále od aktivních exponentů nacismu přes přinejmenším přizpůsobivé stál Knaus mezi profesory lékařské fakulty na opačném konci (nepočítáme-li židovské oběti režimu) než například jeho kolega, nechvalně známý rasový hygienik Karl Thums. Své přátelské styky s Čechy a loajalitu k Československé republice prokázal ostatně již v době mnichovské krize, k českým kolegům se choval korektně i během okupace. Neshody a problémy měl naopak s nacisticky aktivními nadřízenými i kolegy na univerzitě; důvodem byla jak jeho malá ochota přizpůsobit se ve své práci rasově hygienickým principům německé medicíny a biologie, tak například jeho vystoupení na obranu pronásledovaných učitelů včetně židovských, nebo protesty proti politicky protežovaným, ale málo kvalifikovaným kolegům. Také Knaus byl ovšem v roce 1938 členem sudetoněmecké strany a od roku 1939 NSDAP, i poté byl ale hodnocen jako „nezajímající se o politiku“. Přesto patří jednoznačně k nejsympatičtějším osobnostem německé univerzity v jejím „hnědém“ období.

H. H. Knaus zemřel po delší nemoci 22. srpna 1970 ve Štýrském Hradci.

doc. PhDr. Petr Svobodný
Ústav dějin UK – Archiv UK
116 36 Praha 1, Ovocný trh 3
e-mail: petr.svobodny@ruk.cuni.cz



Věřím, že nic nepomine bez následků
a že každý náš krok, i ten nejmenší, jest
významný pro život přítomný i budoucí...

A. P. ČECHOV