

# ALERGIE

ČASOPIS PRO KONTINUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ V ALERGOLOGII  
A KLINICKÉ IMUNOLOGII

PRAHA



29. 10. – 1. 11. 2008

**XXV. SJEZD ČESKÝCH  
A SLOVENSKÝCH ALERGOLOGŮ  
A KLINICKÝCH IMUNOLOGŮ**

**XII. KONGRES ČESKÝCH  
A SLOVENSKÝCH IMUNOLOGŮ**

S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

TÉMA SJEZDU

**OD EXPERIMENTU KE KLINICKÉ PRAXI**

ABSTRAKTA

ABSTRACTS

CLARION CONGRESS HOTEL

WWW.CSAKI2008.CZ

ROČNÍK 10, SUPPLEMENTUM 2, 2008  
[www.tigis.cz/alergie/Index.htm](http://www.tigis.cz/alergie/Index.htm)

EXCERPOVÁNO V BIBLIOGRAPHIA MEDICA ČECHOSLOVACA

ISSN 1212-3536

**Tigis**  
společnost s r.o.



S 4/3

**VÝZNAM NEINVAZIVNÍCH PARAMETRŮ PRO MONITOROVÁNÍ LÉČBY TĚŽKÉHO ASTMATU**

P. Panzner

*Ústav imunologie a alergologie LF UK a FN Plzeň*

Průduškové astma je heterogenní onemocnění charakterizované chronickým zánětem dolních dýchacích cest, bronchiální hyperreaktivitou a remodelací. Základním znakem je zánět, jehož charakter a intenzita jsou pro diagnostiku těžkého astmatu zcela zásadní. Pomineme-li možnost histologického vyšetření průduškové sliznice, které v praxi připadá v úvahu pouze z diferenciálně diagnostických důvodů, bylo pro diagnostiku zánětu v průběhu minulých let vyvinuto několik semi-invazivních i neinvazivních metod.

Nejčastěji používanou metodou detekující charakter a intenzitu zánětu průduškové sliznice přímým způsobem, tj. identifikací a kvantifikací přítomnosti buněk zánětu, je vyšetření indukovaného sputa. Přestože je tato technika poměrně náročná metodologicky, je v některých centrech využívána i v běžné klinické praxi. Další metodou detekující zánět nepřímou, tj. měřením produktu zánětem stimulovaných buněk, je plně neinvazivní sledování koncentrace vydechaného oxidu dusnatého (FeNO). Tato technika se během několika málo minulých let široce rozšířila do klinické praxe a je dnes již téměř nepostradatelnou součástí diagnostiky těžkého astmatu.

Výsledky výše zmíněných diagnostických metod je vždy nutno zasadit do klinického rámce a posuzovat je v kontextu funkčního vyšetření plic (zejména FEV1) a subjektivně vnímaných potíží pacienta, k jejichž měření jsou k dispozici standardizované dotazníky (např. TKA).

Přehledová přednáška týkající se výše uvedených diagnostických přístupů v kontextu diagnostiky a monitorování léčby těžkého astmatu je doplněna stručnými výsledky vlastního sledování, které bylo prováděno ve spolupráci s Klinikou TRN FN Plzeň a jehož detailní výsledky jsou prezentovány na posteru: Malkusová a kol.: Invazivní a neinvazivní monitorace zánětlivých změn u pacientů s těžkým astmatem před a po léčbě systémovou kortikoterapií.

*Práce byla podpořena grantem VZ MSM 002 1620812.*

S 4/4

**ČASNÁ DIAGNOSTIKA ASTMATU U MALÝCH DĚTÍ**

P. Pohunek

*Dětská pneumologie, Pediatrická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha*

Respirační potíže s obstrukční složkou jsou častým problémem pediatrické praxe. Až 50 % dětí ve věku do 5 let zažije nějakou epizodu dechových obtíží s projevy kašle, pískotů a více či méně vyjádřené dušnosti. I když tyto potíže nejsou u všech dětí projevy průduškového astmatu, často se již o první příznaky této nemoci jednat může. Je známo, že až 2/3 případů astmatu začínají v časném věku do tří let. V tomto věkovém období začíná i většina příznaků astmatu těžkého. Významu pro dlouhodobou prognózu dětí s obstrukčními projevy proto nabývá především co nejvčasnější detekce příznaků, řádná diferenciální diagnostika a včas nasazená správně indikovaná terapie.

Vzhledem k tomu, že možnosti objektivního vyšetření funkce plic a bronchiální reaktivity u malých dětí jsou dosud jen omezené, zůstává nejdůležitější metodou diagnostiky řádná klinická a anamnestická analýza každého případu a zhodnocení přítomnosti rizikových faktorů pomocí validizovaných klinických nástrojů. Důležitá je především kvalitní strukturovaná anamnéza rodinná a osobní se zaměřením na přítomnost atopického rizika a alergické senzibilizace.

V diferenciální diagnóze je třeba mít vždy na paměti skutečnost, že právě v časném dětském věku se podobně jako astma mohou projevovat i jiné, vzácnější nemoci. Vyloučit je tak třeba vždy především cystickou fibrózu, poruchy mukociliární clearance, vlivy prodělané perinatální respirační patologie nebo anatomické příčiny poruchy průchodnosti dýchacích cest.

Léčba časně bronchiální obstrukce u dětí musí být vždy založena na co nejkvalitněji provedené diagnóze, abychom na jedné straně nezatěžovali děti neodpovídající farmakoterapií s potenciálem nežádoucích účinků, na straně druhé ale neodkládali léčebný zásah tam, kde je ho třeba a kde má potenciál ke zlepšení jak současného klinického stavu dítěte, tak dlouhodobé prognózy nemoci.

**05 Autoimunita a tolerance**

S 5/1

**PODÍL AUTOIMUNITNÍCH MECHANISMŮ NA VZNIKU A ROZVOJI ONEMOCNĚNÍ PLICNÍHO INTERSTICIA**

M. Petřek

*Ústav imunologie LF UP a FN Olomouc*

Intersticiální plicní nemoci (IPN) představují heterogenní skupinu více než 150 nosologických jednotek, jejichž většinovým jmenovatelem je zánětlivé poškození plicního parenchymu, popř. kombinace zánětu a fibrózních změn. K nejnámější IPN patří sarkoidóza a idiopatická plicní fibróza.

Sarkoidóza, systémové onemocnění s autoimunitními rysy, se nejčastěji manifestuje v plicích jako CD4+ T-lymfocytární alveolitida s následnou tvorbou granulomů, 15 % případů nemoci přechází ve fibrózu. V přednášce bude podán přehled současných poznatků o imunopatogeneze sarkoidózy včetně výsledků snah o identifikaci peptidů, které HLA-DR molekuly prezentují T-lymfocytům, tj. potenciálním specifickým antigenům sarkoidózy. Bude pojednáno také o podílu imunogenetických faktorů na vzniku a rozvoji onemocnění.

Pozornost bude také věnována fibrotickému poškození plic u sarkoidózy, idiopatických intersticiálních pneumonií i sekundárnímu poškození plic u autoimunitních nemocí, zejména systémové sklerózy. Závěrem budou naznačeny perspektivy dalšího výzkumu v oblasti imunologie a imunogenetiky IPN s důrazem na jejich využití v diagnostice a terapii.

*Pozn.: Část prezentovaných výsledků byla získána s podporou grantu IGA MZ ČR NR 9037.*

S 5/2

**DENDRITICKÉ BUŇKY A INDUKCE TOLERANCE**

J. Bartůňková, K. Sochorová, D. Rožková, R. Špišek

*Ústav imunologie UK 2. LF a FN Motol*

Dendritické buňky (DC) jsou v organismu nejdůležitější buňky prezentující antigen. Na charakteru interakce s antigenem a zejména na mikroprostředí, ve kterém se tato iniciální interakce odehrává, záleží výsledek imunitní reakce – buď indukce efektorových



zahrnujeme i CRP. Zde dochází k rychlému nárůstu hladin PTX3, které předcházejí vzrůstu hladin CRP. Za prozáněťový ukazatel je považován i plazmatický protein lipopolysaccharide binding protein (LBP). Jeho sérová hladina je zvýšena v průběhu operace. Na základě provedených analýz uzavíráme, že LBP se nechová jako bílkovina akutní fáze u nemocných operovaných na srdci. Protičůdné tendence vedoucí k prozáněťové i protizáněťové aktivitě můžeme určit i stanovením vybraných membránových znaků na leukocytech. Prokázali jsme, že molekula CD163, která slouží jako receptor pro hemoglobin, je ve zvýšené míře vyjádřena na monocytových buňkách brzy v průběhu operace.

Výše uvedené výsledky ukazují, že nemocní podstupující kardiologické operaci jsou vhodným klinickým modelem, který umožní sledovat indukční i efektorové aktivity záněťové odpovědi jak ve složce přirozené imunity, tak ve větvi imunity specifické.

*S podporou MŠMT ČR MSM0021620812 a IGA MZ ČR NR/9090-4.*

#### S 21/4

### VLIV ANALOGU VITAMINU D PARIKALCITOLU NA MORFOLOGICKÉ A FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY DENDRITICKÝCH BUNĚK

K. Sochorová<sup>1</sup>, V. Budínský<sup>1</sup>, D. Rožková<sup>1</sup>, Z. Tobiášová<sup>1</sup>, R. Špišek<sup>1</sup>, S. Sulková<sup>2</sup>, J. Bartůňková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav imunologie UK, 2. LF a FN Motol, Praha

<sup>2</sup>Klinika gerontologická a metabolická, LF UK a FN Hradec Králové

**Úvod:** Kalcitriol, aktivní forma vitamínu D, je znám svými imunomodulačními účinky, avšak jeho použití v imunologii brání jeho výrazný hyperkalcemický efekt. Parikalcitol je analogem kalcitriolu, jehož hyperkalcemický efekt je výrazně omezen, avšak jeho imunomodulační vlastnosti nebyly dosud sledovány.

**Cíl:** V této studii jsme porovnávali vliv kalcitriolu a parikalcitolu na zastoupení dendritických buněk (DC) v periferní krvi a na morfoloické a funkční charakteristiky DC kultivovaných z monocytů.

**Materiál a metody:** Z monocytů zdravých dárců byly v přítomnosti GM-CSF a IL-4 připraveny nezralé DC. Nezralé DC byly následně maturovány lipopolysaccharidem (LPS). Buňky byly vystaveny působení kalcitriolu a parikalcitolu v průběhu diferenciaci, maturace, nebo v průběhu obou dějů. Následně jsme sledovali fenotypové (expresi kostimulačních molekul, molekuly CD83, CD14, MHC II. třídy a PD-L) a funkční (endocytární aktivitu, produkci cytokinů, schopnost stimulovat antigen specifické lymfocyty a schopnost indukovat regulační T-lymfocyty) charakteristiky DC.

**Výsledky:** Po ošetření léčivými si sledované buňky i po aktivaci LPS uchovávaly fenotyp nezralých DC, a to zejména v případě, že byla léčiva použita při jejich diferenciaci. V porovnání s kontrolou byla výrazně snížena exprese CD80, CD86, CD83 a HLA-DR. Naopak byla vždy výrazně zvýšena exprese CD14, znaku typického pro prekurzory DC. Expresce PD-L1 a PD-L2, molekul zodpovědných za regulaci T-buněčné odpovědi, byla srovnatelná u kontrolních i léčivými ošetřených DC. DC ošetřené léčivými si uchovaly vysokou endocytární aktivitu, ve srovnání s kontrolami produkovaly méně IL-12, klíčového cytokinu pro polarizaci Th1 imunitní odpovědi. DC ošetřené kalcitriolem nebo parikalcitolem měly signifikantně sníženou schopnost indukce antigen specifických T-lymfocytů.

Schopnost indukovat vznik FoxP3 pozitivních T-regulačních lymfocytů byla srovnatelná s kontrolními DC. V rámci *in vivo* studie jsme sledovali vliv podávání parikalcitolu na zastoupení populací DC v periferní krvi. Po čtrnáctidenním podávání léčiva jsme neznamenali rozdíl v zastoupení jednotlivých populací.

**Závěr:** Z našich výsledků vyplývá, že parikalcitol neovlivňuje zastoupení DC v periferní krvi, ale má vliv na jejich funkční charakteristiky ve smyslu snížené schopnosti indukovat antigen specifické T-lymfocyty. Lze předpokládat, že by DC ošetřené analogy vitamínu D s omezeným hyperkalcemickým efektem mohly být využity pro ovlivnění imunoregulačních dějů v organismu.

*Podpora: VZ MSM 002 162 0812, GAUK 7588/2007.*

#### S 21/5

### RE-SEKVENAČNÍ ANALÝZA PROMOTOROVÝCH OBLASTNÍCH GENŮ PRO CHEMOKINY CCL19 A CCL21 U PACIENTŮ S INFARKTEM MYOKARDU

A. Stáhelová<sup>1</sup>, F. Mrázek<sup>1</sup>, J. Petřková<sup>1,2</sup>, Z. Kubišová<sup>1</sup>, M. Petřek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř imunogenomiky a imunoproteomiky, Ústav imunologie, LF UP Olomouc

<sup>2</sup>I. interní klinika, LF UP a FN Olomouc

**Úvod:** Komplikace aterosklerózy (např. infarkt myokardu) patří do skupiny komplexních onemocnění s genetickou složkou a jsou nejčastější příčinou úmrtí v rozvinutých zemích. V aterosklerotických plátech jsou exprimovány chemotaktické cytokiny (např. CCL2, CCL19 a CCL21), které podmiňují místní akumulaci makrofágů a podporují zánět. Varianty regulačních oblastí genů pro chemokiny CCL19 a CCL21 mohou proto souviset s vnímavostí k rozvoji aterosklerózy.

**Cíl:** Cílem práce bylo využít re-sekvenční systém k analýze variability promotorových oblastí genů pro chemokiny CCL19 a CCL21 u pacientů s infarktem myokardu (IM).

**Metodika:** Promotorová oblast genů pro chemokiny CCL19 a CCL21 byla analyzována u 60 českých nepříbuzných pacientů s IM. Re-sekvenace byla provedena pomocí techniky značených terminátorů; sekvenční fragmenty byly identifikovány pomocí kapilární elektroforézy (genetický analyzátor ABI310). Vyhodnocení variability promotorů genů CCL19 a CCL21 bylo provedeno pomocí programu SeqScape.

**Výsledky:** V promotoru genu pro chemokin CCL19 byly detekovány jednonukleotidové (SNP) polymorfismy rs2233872 T/C (četnost alely T: 73,3 %) a rs2233873 A/G (alela A: 95 %). Lokus rs2233874 G/C byl v našem souboru pacientů monomorfní. U genu CCL21 jsme identifikovali varianty rs11574914 C/T (alela C: 61,7 %), rs11574915 T/G (alela T: 61,7 %) a rs2812378 T/C (alela T: 81,6 %). U našich pacientů s IM nebyly ve vyšetřovaných promotorových oblastech CCL19 a CCL21 identifikovány žádné neznámé sekvenční varianty.

**Závěr:** V pilotním souboru pacientů s IM jsme pomocí re-sekvenace určili variabilitu promotorových oblastí kandidátních genů pro chemokiny CCL19 a CCL21 a stanovili četnost jednotlivých SNP variant. Získaná data budou dále využita k provedení asociační studie souvislosti genových variant chemokinů CCL19 a CCL21 s vnímavostí k IM.

*Práce podpořena z projektů MŠMT ČR (ME-856 a MSM6198959205).*



## 23 Transplantační imunologie

S 23/1

### IMUNITNÍ ODPOVĚĎ PROTI ŠTĚPU A MOŽNOSTI JEJÍHO OVLIVNĚNÍ

I. Stříž

*Pracoviště klinické a transplantační imunologie, IKEM, Praha*

I při stávajících moderních imunosupresivních režimech musíme stále počítat s imunitní reakcí zaměřenou k odvrhnutí transplantovaného štěpu. Jedná se zpravidla o buněčnou či protilátkovou odpověď proti histokompatibilním HLA antigenům indukující následné rejekční mechanismy. V počáteční fázi odpovědi organismu proti allotransplantátu zřejmě převažují mechanismy přirozené imunity, když během několika minut po reperfuzi transplantovaného orgánu dochází k uvolnění prozánětlivých cytokinů, zejména TNF alfa a IL-1 beta. Následně jsou tvořeny také chemokiny atrahující nejdříve leukocyty bez specifity pro antigen, posléze i alloantigen specifické T-lymfocyty. T-lymfocyty příjemce rozeznávají HLA antigeny prostřednictvím dvou hlavních mechanismů. U tzv. nepřímé dráhy (indirect pathway), která se zásadně neliší od klasické prezentace jakéhokoliv pohlceného cizorodého antigenu, jsou HLA antigeny dárce pohlceny antigen prezentující buňkou příjemce migrující do štěpu. Na druhé straně tzv. přímá dráha (direct pathway) je unikátním mechanismem, kde T-lymfocyty prostřednictvím svého receptoru (TCR) rozeznávají intaktní HLA molekuly exprimované na dendritických buňkách dárce. Kromě TCR/MHC signalizace jsou nezbytné ještě kostimulační signály, zejména mezi molekulami ze skupiny B7 a CD28. Vazba mezi molekulami B7-1 (CD80) a B7-2 (CD86) k CD28 může být účinně inhibována expresí antigenu CTLA-4 (CD152).

Při akutní i chronické rejekci se mohou uplatnit jak protilátkové mechanismy, tak i cytotoxická aktivita provádějící buněčnou odpověď proti štěpu. Primárním cílem rejekčních mechanismů je endotel transplantovaného štěpu, v případě protilátkové odpovědi poškozený za účasti komplementu, při buněčné rejekci se v efektorové fázi uplatní zejména allospecifické CD8+ T-lymfocyty. Při buněčné rejekci dochází k infiltraci ledvinového parenchymu jak CD4, tak i CD8+ buňkami, ale neméně významnou úlohu zde hrají také makrofágy představující až 60 % infiltrujících buněk. Při chronické rejekci jsou to právě makrofágy, které svou produkcí cytokinů s fibrogenní aktivitou, např. TGF beta, indukují strukturální změny v parenchymu.

Není sporu o tom, že imunitní odpověď proti transplantovanému orgánu nelze omezit pouze na problematiku míry shody v HLA antigenech (stále zásadní u transplantací ledvin), jedná se o neobvykle složitou kaskádu buněčných interakcí. Bližší poznání patogenetických mechanismů transplantačních reakcí nám umožňuje možnosti relativně cíleného zásahu, ať již se jedná o imunosupresivní účinek anti-CD25 protilátky (daclizumab), inhibici tvorby allospecifických protilátek pomocí anti-CD20 (rituximab), zásah do kostimulace pomocí rekombinantního antigenu CTLA-4 (belatacept) nebo drastickou depleci lymfocytů pomocí anti-CD52 protilátky (alemtuzumab). Současné poznatky směřují k využití biologické léčby (monoklonální protilátky, rekombinantní proteiny) nejen k oddálení rejekčních mechanismů, ale i pokusům o navození transplantační tolerance.

S 23/2

### SOUČASNÉ METODY HLA TYPIZACE A JEJICH AUTOMATIZACE

A. Slavčev

*Oddělení imunogenetiky, IKEM, Praha*

Shoda v HLA (Human Leukocyte Antigens) systému mezi dárce a příjemcem má pozitivní vliv pro dlouhodobé přežití (dobrou funkci) transplantovaných orgánů (ledviny, srdce, pankreas). U transplantací kmenových buněk je shoda v HLA mezi dárce a příjemcem na úrovni alel („high resolution“) důležitá pro snížení rizika reakce štěpu proti hostiteli (GvHD). HLA antigeny jsou kódovány geny, které jsou lokalizovány v úseku MHC (Major Histocompatibility Complex) na krátkém raménku šestého chromozomu. Pro potřeby orgánových transplantací se určují varianty antigenů HLA-A, -B (I. třídy) a -DR (II. třídy), zatímco pro transplantace kmenových buněk se typizují navíc antigeny HLA-Cw, -DQ a výjimečně i -DP. Sérologická typizace, i když postupně ztrácí na významu, je zatím dostačující pro určení HLA antigenů I. třídy pro transplantační program orgánů. Protože HLA antigeny jsou komplexní a mají více než jednu antigenní determinantu na svém povrchu, někdy mohou společně antigenní determinanty mezi různými HLA antigeny typizaci zkomplikovat, je to tzv. zkřížená reaktivita mezi HLA antigeny (A2 a A28, B7 a B27 atd.). Pro sérologickou techniku je rovněž limitující, že jsou zapotřebí živé buňky s výraznou povrchovou expresí HLA antigenů (lymfocyty). Po objevu PCR (polymerázová řetězová reakce) v 80. letech minulého století se dnes molekulárně-biologické metody rutinně používají pro typizaci HLA antigenů I. a II. třídy. V HLA laboratoři se aplikují PCR metodiky za použití sekvenčně specifických primerů (PCR-SSP) a sekvenčně specifických oligonukleotidů (PCR-SSO). Pro transplantaci kmenových buněk a definici nových alel se také používá sekvenování HLA genů. Každá molekulárně-biologická metodika má své výhody a nevýhody, a proto i své specifické využití. Některé metodiky se mohou plně nebo částečně automatizovat (např. PCR-SSO za použití DNA čipů), zatímco jiné (např. PCR-SSP, sekvenování) se automatizují obtížně.

I přes obrovský pokrok v imunosupresivní terapii, přesná typizace HLA antigenů je stále důležitá a shoda v HLA systému může ovlivnit výsledek jak akutní, tak chronické rejekce po transplantaci. Velký pokrok, který byl dosažen v posledních letech v diagnostice HLA a jiných genových polymorfismů klade velké nároky nejen na laboratorní pracovníky, ale také i na spolupracující klinické lékaře.

S 23/3

### ÚLOHA HLA A non-HLA GENŮ V IMUNOPATOLOGII ZÁNĚTLIVÝCH NEMOCÍ A KOMPLIKACÍ TRANSPLANTAČNÍ LÉČBY

M. Petřek, F. Mrázek, J. Petřková, Z. Ambrůzová, J. Gallo

*Laboratoř imunogenetiky při Ústavu imunologie LF UP a FN Olomouc*

Přehledná přednáška pojednává o úloze polymorfních genů imunitního systému při vzniku a rozvoji vybraných imunopatologických stavů. Kromě „tradičních“ polymorfismů v genech Hlavního histokompatibilního komplexu (HLA) bude věnována pozornost variabilitě v genech pro cytokiny a jejich receptory, polymorfismu Toll-like receptorů, event. dalších genů přirozené i získané imunitní odpovědi.



Na príkladech z oblasti nemocí respiračného a kardiovaskulárneho systému budú také stručne ilustrované prístupy ke štúdiu súvislostí medzi geny a komplexnými nemocami včetně diskuse limitácií a možností jejich prekonaní. Prednáška bude doplnená vlastnými výsledky mj. o úlože variability imunitných genů při modifikaci průběhu GvHD po alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk, příp. o podílu cytokinových polymorfismů na rozvoji osteolytických komplikací totální náhrady kyčelního kloubu.

*Pozn. Výsledky, které budou v přednášce prezentovány, byly získány s podporou grantů IGA MZ ČR 9099 a 9490, GA ČR 310/06/827 a MŠMT ME-856.*

S 23/4

#### INDIKÁCIE TRANSPLANTÁCIÍ KRVOTVORNÝCH BUNIEK

M. Hrubíško

*Katedra hematológie a transfúziológie FZŠŠ Slovenskej zdravotníckej univerzity, FNŠP Bratislava – Petržalka*

Transplantácie kmeňových krvotvorných buniek (KB) sa stali jednou z najčastejších transplantácií, počtom niekde prevyšujú i transplantácie obličiek. Inšpiráciou pre transplantácie KB (TKB) boli tragické príbehy ľudí vystavených rádioaktívnemu žiareniu po zvrhnutí atómových bômb i po haváriách jadrových reaktorov. Letálne ožiarení jedinci zomierali na útlm kostnej drene, objavila sa tu logická snaha o náhradu zničenej kostnej drene (KD) zdravou. Pre neznalosť HLA systému boli zaznamenané len prechodné prihojenia KB, jedinci zomierali buďto na odvrhnutie štepu alebo multiorgánové zlyhanie, o ktorom dnes vieme, že je spôsobené reakciou štepu proti hostiteľovi (GvHD). Ojedinelé úspechy pri transplantácii medzi jednovajcovými dvojčatami (syngénne transplantácie) však dokázali správnosť myšlienky. Po objave HLA systému sa v 60. rokoch začali robiť TKB v čoraz väčšej miere, prevažne pre eradikáciu infaustných ochorení krvotvorby (akútne leukémie). Postupne sa objavovali i niektoré indikácie nemalígne, či už získané (aplastická anémia), alebo vrodené poruchy krvotvorby, imunity a metabolizmu s infaustnou prognózou (Fanconiho anémia, Blackfanova-Diamondova anémia, adrenoleukodystrofia, poruchy adhézie leukocytov, tesaurizmózy...).

Keďže spočiatku bola alogénna TKB rizikovým zákrokom, s mortalitou > 50 %, bol prístup k transplantáciám menej rizikových, i keď taktiež nevyliciteľných ochorení veľmi zdržanlivý. Výnimkou bola chronická myelocytová leukémia (CML), kde sa ukázalo, že alogénna TKB urobená na začiatku v tom období ešte infaustného ochorenia má najlepšie výsledky. Ešte v 90. rokoch 20. storočia bola CML najčastejšou indikáciou na alogénnu TKB, nové lieky odsunuli túto indikáciu u dospelých do pozadia.

Úspechy súrodeneckých transplantácií viedli k hľadaniu alternatívnych darcov KB. Len asi 25 % chorých má HLA-identického súrodenu. Jednou z možností je transplantácia KB od HLA-zhodného nepríbuzného dobrovoľného darcu. Za týmto účelom vzniklo na celom svete množstvo národných registrov darcov kostnej drene dnes už s 12 miliónmi darcov. Ďalšou možnosťou je autológna transplantácia krvotvorných buniek (ATKB). Týmto sa transplantácie KB odlišujú od orgánových transplantácií. Keďže ATKB je

podstatne menej rizikovým zákrokom, rozšírila indikácie TKB aj na menej akútne choroby. Ide o celú skupinu lymfoproliferatívnych ochorení vrátane mnohopočetného myelómu, kde napr. autológne transplantácie sú v súčasnosti jednou z najčastejších indikácií. I tu je však možné očakávať zmenu s nástupom moderných liekov, podobne ako tomu bolo pri ATKB pre nádory prsníka. Pre nižšie riziko našla ATKB uplatnenie i v liečbe mnohých autoimunitných ochorení.

Z imunologického hľadiska sú zaujímavé nepríbuzenské transplantácie, kde býva stupeň nezahody napriek HLA-zhode vyšší, resp. sa tu niekedy robia i transplantácie s 1–2 nezahodami v HLA-lokusochoch. Toto sa týka najmä pupečníkových transplantácií (UCB), kde sú 1–2 nezahody bez problémov tolerované. Pre menší počet KB v UCB sa čoraz častejšie vykonávajú dvojité i trojité transplantácie UCB, kde sa imunologická situácia natoľko komplikuje, že pozorujeme nielen reakciu GvHD ale i GvG (graft versus graft).

S 23/5

#### STRATEGIE K NAVOZENÍ IMUNOLOGICKEJ TOLERANCE PO TRANSPLANTACII LEDVINY – JAK DALEKO JSME OD KLINICKEJ APLIKACE?

O. Viklický

*Klinika nefrologie TC IKEM, Praha*

Dlouhodobé výsledky transplantací ledvin jsou stále ovlivněny akutní a chronickou rejekcí na jedné straně a vedlejšími účinky imunosupresivní léčby na straně druhé, a proto se přežití štěpů významně nezvýšilo, i když se krátkodobé výsledky transplantací zlepšily. V současnosti jsme proto svědky zvýšeného úsilí výzkumníků a kliniků pokročit v protokolech navození transplantáční tolerance. Po prvních úspěších v 50.–60. letech výzkum transplantáční tolerance pokročil až v posledních 10 letech, kdy se objevily nové pokroky především v buněčné terapii. Protože je výzkum tolerance významný především pro plátce zdravotní péče, vznikly dvě velké výzkumné skupiny, jak v USA (ITN) a v Evropské unii (RISET). Jedním z možných testovaných postupů jak navodit transplantáční toleranci v klinice byla indukce s monoklonální protilátkou anti-CD52 (MabCampath) bez další přídavné imunosuprese. Výsledky pilotních studií ale ukázaly, že štěpy jsou odhojovány bez ohledu na absenci T- a B-lymfocytů v periferní krvi. Použití monoklonální protilátky anti-CD4 v indukci tolerance v experimentálních modelech nebylo nikdy v klinice přesvědčivě ověřeno. V klinické praxi je známo, že existuje skupina nemocných, kteří z různých důvodů neužívají imunosupresivní medikaci, a přesto mají dobrou a stabilní funkci transplantované ledviny. Tito nemocní vykazují větší přítomnost regulačních Treg lymfocytů a další markerů transplantáční tolerance známé z experimentů. Proto v současnosti probíhají pilotní studie testující metody buněčné terapie po transplantaci jater. Jediným hmatatelným posunem ve výzkumu transplantáční tolerance po transplantaci ledviny je tak identifikace nových markerů, jejichž přítomnost umožní bezpečné snížení imunosuprese s cílem eliminovat její vedlejší účinky. Dalším posunem je minimalizace dlouhodobé imunosuprese po indukci s monoklonálními nebo polyklonálními protilátkami. Zavedení metod umožňující vysazení imunosupresivních léků po transplantaci ledviny je tak zatím stále jen snem.



zejména tam kde kultivace mikroorganismů je časově náročná, příliš složitá či v současné době nemožná. Takovým příkladem je bakterie *Borrelia burgdorferi* sensu lato, původce Lymešské boreliózy.

Jedná se o skupinu několika genomspesies přičemž v České republice se v patogenezi tohoto onemocnění nejčastěji uplatňují *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* a v menší míře rovněž *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

Z řady důvodů (lokalizace infekce v kůži, časná eliminace z krevního oběhu působením antibiotik nebo specifických protilátek a komplementového systému) je senzitivita přímého průkazu v plné krvi nízká. Naopak při proniknutí borelií do CNS je jejich přímá detekce často jedinou možností průkazu neuroboreliózy. Proto bylo spektrum vyšetření v oblasti likvorové diagnostiky rozšířeno o diagnostiku neuroboreliózy metodou PCR.

V období prosinec 2007–červen 2008 bylo na našem pracovišti vyšetřeno 290 vzorků biologického materiálu zaměřených zejména na průkaz neuroboreliózy (161 likvorů). Dosud jsme ale nezaznamenali žádný pozitivní nález, což může být v souvislosti s udávanou nízkou senzitivitou přímého průkazu daného agens. Správnost stanovení je ověřena zařazením pozitivních kontrolních vzorků do každé testované série a interní kontroly (kontroly inhibice) ke každému vzorku. O validitě obou technik může svědčit i maximální úspěšnost v systému externí kontroly kvality Instand e.V., kterého se pravidelně účastníme.

#### S 26/6

##### LASEROVÁ SCANOVACÍ CYTOMETRIE V PRAXI

Z. Cimburek, B. Pecharová, Z. Zákostelská, O. Hovorka  
*Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha*

Laserová scanovací cytometrie je technika která spojuje přednosti průtokové cytometrie, kdy v relativně krátkém čase získáme informace z velkého množství událostí u několika parametrů, a mikroskopie, která nám poskytuje informace o vnitřní struktuře buňky a není limitována požadavkem na kvalitu buněčné suspenze.

Naše pracoviště je vybaveno laserovým scanovacím cytometrem Compucyte iCys vybaveným 3 excitačními lasery 405,488 a 633nm. Současně je přístroj schopen měřit 4 parametry.

Pomocí Spherotech Rainbow kalibračních kuliček jsme porovnávali citlivost přístroje s průtokovým cytometrem Becton Dickinson LSRII a buněčným sorterem Becton Dickinson FACS Vantage SE. V současné době je přístroj využíván zejména k experimentům na vysoce adherentních buněčných liniích, u kterých je sledována indukce apoptózy pomocí Annexinu V.

Další skupinu měření tvoří experimenty, ve kterých zjišťujeme počet buňek na definované ploše. Tato data nám poskytují informace o migraci a proliferaci buněk.

Poslední skupinu tvoří experimenty, při kterých je sledována exprese antigenu na adherentní buněčné linii.

Laserová scanovací cytometrie je nastupující technika, která umožňuje kvantitativní a funkční buněčnou analýzu na úrovni jedné buňky *in situ*. Tato metoda nám umožní studovat buněčné signalizace a mezibuněčné interakce na živých buňkách *in situ*. Naměřená data jsou srovnatelná s průtokovým cytometrem, oproti kterému má výhodu vizualizace buněk. Laserová scanovací cytometrie poskytuje řadu předností, díky kterým může najít uplatnění v našich laboratořích.

#### S 26/7

##### PŘÍBUZENSKÉ A NEPŘÍBUZENSKÉ TRANSPLANTACE LEDVIN

H. Stehlíková, L. Brožová, H. Sajdllová, A. Slavčev  
*Odd. imunogenetiky, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha*

Na oddělení imunogenetiky v pražském IKEMu provádíme laboratorní vyšetření, která jsou součástí výběru vhodného dárce ledviny pro příjemce zařazené na čekací listině. V některých indikovaných případech se přistupuje k příbuzenským transplantacím pro nedostatek orgánů od kadaverózních dárců. Mezi ty patří i takzvané emotivní transplantace mezi manželi. Mnohem více je ale transplantací od neživých dárců.

Při příbuzenských transplantacích se provádí HLA typizace příjemce a dárce, aktuální křížová zkouška ACM (aktuální crossmatch) a křížová zkouška s pomocí průtokové cytometrie FACS CM (fluorescence-activated cell sorting crossmatch). Příprava těchto transplantací trvá několik týdnů. U nepříbuzenských kadaverózních transplantací je příjemce a dárce vyšetřen na HLA antigeny a provede se křížová zkouška ACM. Tato vyšetření se provádějí v nepřetržitém provozu. Oproti příbuzenským transplantacím se FACS CM z časových důvodů nedělá. HLA typizaci vyšetřujeme pomocí sérologických i molekulárně genetických metod (analýza DNA). Pro křížové zkoušky se používají klasické sérologické metody.

Transplantace ledviny je nejčastější orgánová transplantace. V 1. pololetí roku 2008 bylo v ČR alokováno 136 ledvin od kadaverózních dárců a 17 od žijících dárců. Z toho v IKEMu 81 ledvin, to je 60 % z celkového počtu kadaverózních transplantací a 13 ledvin, to je 76,5 % od žijících dárců.

#### S 26/8

##### VYŠETŘENÍ HLA PROTILÁTEK METODOU ELISA – KVALITATIVNÍ POSUN STANOVENÍ HLA IMUNIZACE PACIENTA PŘED TRANSPLANTACÍ LEDVINY

M. Dosoudilová, B. Uhýrková, M. Skotalová, Z. Ambrůzová, M. Petřek

*HLA laboratoř Ústavu imunologie LF UP a FN Olomouc*

**Úvod:** Vyšetření HLA protilátek u pacientů – čekatelů na transplantaci ledviny je nedílnou součástí vyšetřovacího algoritmu před zařazením na čekací listinu. Stanovení HLA protilátek a jejich přesná identifikace je nezbytným předpokladem pro výběr vhodného dárce ledviny a stanovení rizika rejekce transplantovaného štěpu. V současné době je v rámci českého transplantčního programu pro vyšetření HLA protilátek standardně používán mikrolymfocytotoxický test (CDC), technika ELISA je pro vyšetření HLA protilátek používána jako doplňující metoda pouze na některých pracovištích. Každá z těchto metod však přispívá k výsledku vyšetření jinou specifickou informací.

**Cíl:** Porovnat výsledky vyšetření HLA protilátek metodou CDC a ELISA a zhodnotit možnosti použití obou metod v rámci transplantčního programu.

**Metody:** HLA protilátky byly vyšetřeny v souboru 199 pacientů pravidelného dialyzačního programu paralelně mikrolymfocytotoxickým testem s použitím panelu dárcovských lymfocytů se známým HLA fenotypem a metodou ELISA (AbScreen HLA Class I a Class II, Biotest).

**Výsledky:** Z celkového počtu 199 pacientů byly HLA protilátky prokázány u 31 pacientů (15,6 %). CDC test byl pozitivní u 21 nemocných (10,5 %), pozitivní výsledek ELISA testu pro stanovení protilátek proti HLA antigenům I. třídy byl zaznamenán u 22 pacientů (11 %), protilátky proti HLA antigenům II. třídy byly prokázány u 19 pacientů (9,5 %). Metodou ELISA byly HLA protilátky nově prokázány u 13 pacientů (6 %) s negativním výsledkem CDC testu. Na základě kombinací výsledků obou testů byli pacienti s pozitivním výsledkem rozděleni celkem do 6 skupin s rozdílnou interpretací typu protilátek (protilátky vázící/nevazící komplement, I./II. třída HLA protilátek, IgG/IgM protilátky, popř. non-HLA protilátky).

**Závěr:** Použití senzitivnější metody ELISA umožňuje detekci HLA protilátek, které nejsou odhaleny vyšetřením mikrolymfocy-



totoxickým testem, avšak mohou ovlivnit přežívání štěpu po transplantaci ledviny. Proto kombinace CDC a ELISA testu pro vyšetření HLA protilátek v rámci pravidelného screeningu by mohla zpřesnit interpretaci HLA imunizace pacienta před transplantací ledviny, stanovit míru rizika rejekce transplantovaného štěpu, a tím umožnit ošetřujícímu lékaři individuální přístup pro její prevenci.

S 26/9

### STANOVENÍ T-REGULAČNÍCH LYMFOCYTŮ NA ODDĚLENÍ KLINICKÉ IMUNOLOGIE

J. Grecová, A. Skalická

Ústav imunologie, UK 2. lékařská fakulta, Fakultní nemocnice v Motole

Hlavní funkcí T-regulačních lymfocytů je udržování homeostázy v imunitním systému. Jejich tlumivé působení potlačuje zánětlivé reakce a zabraňuje poškození tkání. Jsou definovány funkčně svou schopností potlačovat aktivaci a proliferaci CD4+ a CD8+ efektorových lymfocytů. Z celé řady T-regulačních lymfocytů se jako velmi důležité jeví tzv. přirozené T-regulační /Treg/ lymfocyty. Tyto buňky jsou označovány jako Foxp3+CD4 natural Treg. Tvorí přibližně 5–10 % z celkového CD4+ lymfocytů.

Stanovení Treg se provádí z mononukleárních periferních krevních buněk izolací pomocí hustotního gradientu. Měření se provádí na průtokovém cytometru. Výsledkem analýzy je populace CD3+CD4+CD25+FoxP3+.

S 26/10

### RUTINNÍ A SPECIALIZOVANÁ LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ ALERGICKÝCH PACIENTŮ NA NAŠEM PRACOVÍŠTI

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

celkových IgE protilátek alergii nevylučují. Proto je v indikovaných případech nutné stanovení specifického IgE proti jednotlivým alergenům. V naší laboratoři používáme chemiluminiscenční metodu (Immulite), kde jsou jako antigeny použity extrakty alergenů.

K další specifikaci IgE protilátek máme k dispozici fluoroenzymoimunoanalýzu (CAP systém), využívající rekombinantní alergeny, které jsou vysoce specifické, čisté a standardní. Význam pro diagnostiku spočívá v tom, že jsme schopni detekovat stupeň senzibilizace k jednotlivým alergenům a odlišit zkříženou reaktivitu od polyreaktivitu.

K posouzení funkce basofilů provádíme funkční test aktivace basofilů (BAT). Po stimulaci basofilů alergenem dochází ke změně exprese aktivačních znaků na povrchu basofilů. K jejich značení používáme monoklonální protilátky anti-CD63 a anti-CD203c, vyhodnocujeme na průtokovém cytometru.

V případě imunomodulační léčby můžeme stanovit hladinu specifického IgG (podtříd IgG1 a IgG4). IgG má inhibiční účinky a zabraňuje navázání IgE protilátek na alergen. Srovnání hodnot před a po léčbě ukazuje na úspěšnost léčby.

Laboratorní alergologické testy tedy mohou napomáhat diagnostice alergického onemocnění, stanovení tíže onemocnění, monitorování průběhu a účinnosti léčby.

Musí být proto spolehlivé, vhodné pro rutinní práci, cenově dostupné, bezpečné a komfortní pro pacienta.

S 26/11

### LABORATORNÍ A KLINICKÉ VYŠETŘENÍ DÍTĚTE S RECIDIVUJÍCÍMI INFEKCEMI A NESPECIFICKÝMI BOLESTMI BŘICHA

K. Zemanová, E. Štercová, V. Thon, Z. Pikulová, D. Bartoňková

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

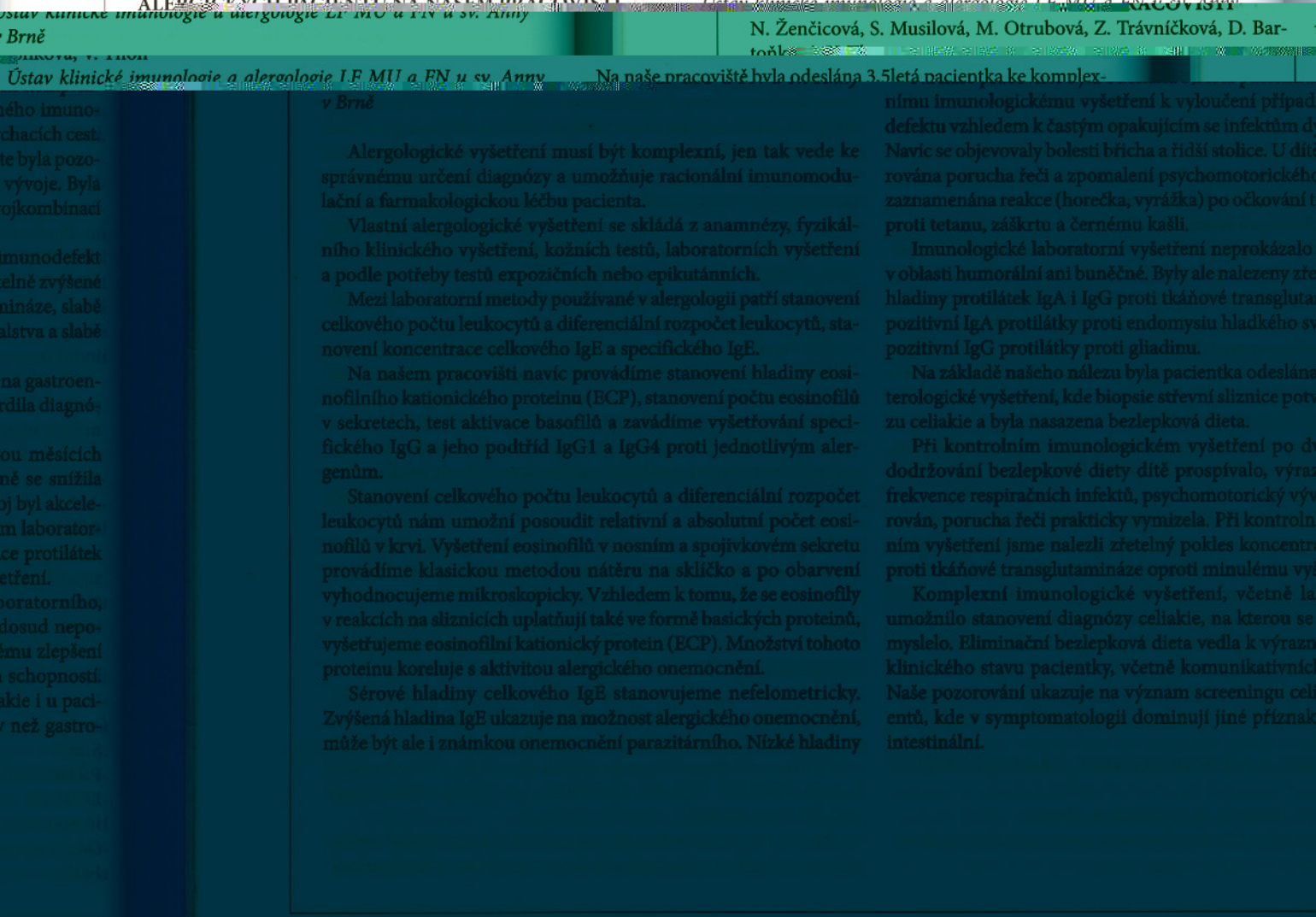
Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně





P 4/8

**PROTIZÁNĚTLIVÝ ÚČINEK INHALAČNÍCH KORTIKOSTEROIDŮ NA EXPRESI PGP NA POVRCHU LYMFOCYTŮ U DĚTSKÝCH ASTMATIKŮ VS. ANTILEUKOTRIENY**

 F. Kopriva<sup>1</sup>, P. Džubák<sup>2</sup>, J. Potěšil<sup>1</sup>, M. Hajdúch<sup>2</sup>, R. Kratochvilová<sup>2</sup>, A. Plocová<sup>1</sup>, J. Závodská<sup>1</sup>, L. Radová<sup>2</sup>
<sup>1</sup>Dětská klinika FN a LF UP, Olomouc

<sup>2</sup>Lab. Experimentální medicíny při Dětské klinice FN a LF UP, Olomouc

**Background:** Inhaled corticosteroids (ICS) are used in asthma therapy for their anti-inflammatory effects. P-glycoprotein (PGP) is a transmembrane efflux pump for corticosteroids. Leukotrienes (LT) have been shown to be involved in many process that play a role in bronchial asthma pathophysiology. MRP1 transporter (multidrug resistance protein) is involved in the transport of leukotrienes.

**Objective:** We studied the anti-inflammatory effects of ICS,

změnami. MMP (mátrixové metaloproteinázové) enzymy, které štěpí složky extracelulární matrice, jejich biologická aktivita je inhibována TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)-1. Předpokládá se, že zvýšená exprese MMP2 a 9 u pacientů s CHOPN přispívá k patologickým změnám

expresi proteolytických enzymů MMP-1 v buňkách z bronchoalveolárního epitelu u pacientů s CHOPN a srovnat ji s expresí u zdravých jedinců.

Pro sledované geny byla stanovena exprese v stádiu 0-I: n = 14 a stádium II-III: n = 16 metodou kvantitativní RT-PCR s LNA sondami s využitím PSMB2 jako referenčního genu. Signifikance rozdílů v expresi studovaných genů byla hodnocena U-testem (Mann-Whitney).

U zdravých jedinců byla v bronchoalveolární laváži (BAL) zvýšena exprese TIMP-1 a TIMP-1 mRNA pro MMP2, 9 a TIMP-1 v pokročilém stádiu CHOPN (II-III) v porovnání s kontrolní skupinou ( $p < 0,05$ ). Expresi sledovaných genů se nelišila mezi pacienty s CHOPN a s astmatem ( $p > 0,05$ ).

Studie poukazují na zvýšení exprese proteolytických enzymů v pokročilém stádiu CHOPN a jsou v souladu s teorií, že se matrice metaloproteinázy uplatňují

006, GAČR 310/06/827.

P 4/9

**EXPRESI mRNA PRO MMP 2, 9 A TIMP-1 V BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽI U PACIENTŮ S CHRONICKOU OBSTRUKČNÍ PLICNÍ NEMOCÍ – PILOTNÍ STUDIE**

 Z. Navrátilová<sup>1</sup>, R. Fillerová<sup>1</sup>, J. Zatloukal<sup>2</sup>, R. Langerová<sup>1</sup>, E. Kriegerová<sup>1</sup>, V. Kolek<sup>2</sup>, M. Petřek<sup>1</sup>
<sup>1</sup>Laboratoř Imunogenomiky a proteomiky, Ústav imunologie, Lékařská fakulta UP Olomouc

<sup>2</sup>Klinika plicních nemocí a tuberkulózy, Fakultní nemocnice Olomouc

**Úvod:** Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) je charakterizovaná omezeným průtokem vzduchu v průduškách (bronchiální obstrukcí), která není plně reverzibilní. Průběh nemoci má progresivní charakter se zhoršováním plicních funkcí a s akutními exacerbacemi, které jsou spojeny s vysokou úmrtností. V patogenezi CHOPN je klíčový chronický zánět doprovázený abnormální infiltrací neutrofilů a dalších buněk s následnou přestavbou plicní

ho parenchymu a fibrotickými změnami. MMP (mátrixové metaloproteinázové) enzymy, které štěpí složky extracelulární matrice, jejich biologická aktivita je inhibována TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)-1. Předpokládá se, že zvýšená exprese MMP2 a 9 u pacientů s CHOPN přispívá k patologickým změnám

expresi proteolytických enzymů MMP-1 v buňkách z bronchoalveolárního epitelu u pacientů s CHOPN a srovnat ji s expresí u zdravých jedinců. Pro sledované geny byla stanovena exprese v stádiu 0-I: n = 14 a stádium II-III: n = 16 metodou kvantitativní RT-PCR s LNA sondami s využitím PSMB2 jako referenčního genu. Signifikance rozdílů v expresi studovaných genů byla hodnocena U-testem (Mann-Whitney).

U zdravými jedinci byla v bronchoalveolární laváži (BAL) zvýšena exprese TIMP-1 a TIMP-1 mRNA pro MMP2, 9 a TIMP-1 v pokročilém stádiu CHOPN (II-III) v porovnání s kontrolní skupinou ( $p < 0,05$ ). Expresi sledovaných genů se nelišila mezi pacienty s CHOPN a s astmatem ( $p > 0,05$ ).

Studie poukazují na zvýšení exprese proteolytických enzymů v pokročilém stádiu CHOPN a jsou v souladu s teorií, že se matrice metaloproteinázy uplatňují

which decreased inflammatory response resulted in decreased level of expression PGP on the lymphocytes in asthmatic patients and anti inflammatory effects of montelukast.

**Patients and Methods:** Asthmatic children were divided into three groups: 1. treated by inhaled budesonide 200–400 ug per day (n = 45) more than one year; 2. treated by montelukast 4 or 5 mg at an age-based dose (n = 29); 3. treated by inhaled corticosteroids and montelukast (n = 25).

The expression of PGP on the lymphocytes were also determined in a group of 52 healthy children. Expression of PGP on fixed and permeabilized cells was analyzed by flow cytometry indirect immunofluorescence staining technique modified according to Boer et al, 1997.

**Results:** Based on the weighted of PGP expression on peripheral blood lymphocytes we proved significant difference ( $p < 10^{-3}$ ) for group of asthma patients (n = 99), ( $485 \pm 3$ ) and healthy controls (n = 52) ( $425 \pm 2$ ) and lower level of PGP-median in group treated by ICS PGP expression ( $550 \pm 9$ ) to group treated by montelukast weighted median of Pgp expression ( $642 \pm 6$ ) ( $p < 10^{-6}$ ).

**Conclusion:** Antiinflammatory activity ICS, decreasing the production of proinflammatory mediators, decreases MDR-1 gene (multidrug resistance) activity and expression of PGP.

*Acknowledgment: Supported by Grant IGA NR8954-3/2006 and MSM 6198959216.*

ho parenchymu a fibrotickými změnami. MMP (mátrixové metaloproteinázové) enzymy, které štěpí složky extracelulární matrice, jejich biologická aktivita je inhibována TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)-1. Předpokládá se, že zvýšená exprese MMP2 a 9 u pacientů s CHOPN přispívá k patologickým změnám

expresi proteolytických enzymů MMP-1 v buňkách z bronchoalveolárního epitelu u pacientů s CHOPN a srovnat ji s expresí u zdravých jedinců.

Pro sledované geny byla stanovena exprese v stádiu 0-I: n = 14 a stádium II-III: n = 16 metodou kvantitativní RT-PCR s LNA sondami s využitím PSMB2 jako referenčního genu. Signifikance rozdílů v expresi studovaných genů byla hodnocena U-testem (Mann-Whitney).

U zdravými jedinci byla v bronchoalveolární laváži (BAL) zvýšena exprese TIMP-1 a TIMP-1 mRNA pro MMP2, 9 a TIMP-1 v pokročilém stádiu CHOPN (II-III) v porovnání s kontrolní skupinou ( $p < 0,05$ ). Expresi sledovaných genů se nelišila mezi pacienty s CHOPN a s astmatem ( $p > 0,05$ ).

Studie poukazují na zvýšení exprese proteolytických enzymů v pokročilém stádiu CHOPN a jsou v souladu s teorií, že se matrice metaloproteinázy uplatňují

Grantová podpora: NR9037-4/2



P 11/11

**ANALÝZA TVORBY CYTOKINŮ U PACIENTŮ S NEŽÁDOU-  
CÍ REAKCÍ NA KOVY**Š. Podzimek, J. Bártová, J. Procházková, Z. Venclíková  
Výzkumný ústav stomatologický I. LF UK a VFN, Univerzita Kar-  
lova, Praha

Cytokiny působí jako mediátory imunitní odpovědi. Důkladné poznání funkcí jednotlivých cytokinů a jejich vzájemných funkčních interakcí má velký praktický význam pro fyziologické i patofyziologické reakce organismu. Cílem naší studie bylo stanovit tvorbu cytokinů u deseti pacientů s prokázanou nežádoucí reakcí na kové dentální materiály pomocí metody MELISA® a u 7 kontrolních osob. Ke stanovení cytokinů byla použita metoda Protein Microarray, která je první dostupnou technologií pro simultánní detekci až 200 cytokinů a jiných proteinů na formátu nitrocelulózových membrán. Multiplexová analýza tvorby cytokinů byla provedena kitem Human Inflammatory RayBio array.

Zjistili jsme, že cytokiny se významnou měrou podílejí na *in vitro* reakcích mononukleárních buněk po stimulaci sloučeninami rtuti a niklu. Tvorba cytokinů byla odlišná u pacientů a u zdravých kontrol. Po stimulaci rtutí i niklem byla zjištěna u pacientů v porovnání s kontrolami zvýšená exprese IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-11, IL-12p40, IL-12p70, STNFR2, MIP-1 delta a MIP-1beta. Metoda Ray Bio Human cytokine array umožňuje sledovat tvorbu velkého počtu cytokinů, a tak i upřesňovat *in vitro* imunitní aktivaci, kterou sledujeme pomocí proliferace.

Studie byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. NR 9124-3.

P 11/12

**INTERLEUKIN (IL)-17 V BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽI  
PACIENTŮ S PLICNÍ SARKOIDÓZOU – PILOTNÍ STUDIE**M. Petřek<sup>1</sup>, A. Králová<sup>1</sup>, A. Arakelyan<sup>1</sup>, E. Kriegová<sup>1</sup>, Z. Kubišová<sup>1</sup>,  
V. Kolek<sup>2</sup><sup>1</sup>Laboratoř imunogenomiky a proteomiky Ústavu imunologie LF  
UP<sup>2</sup>Klinika respirační medicíny a tbc LF UP a FN Olomouc

**Úvod:** Plicní sarkoidóza je zánětlivé postižení plicních sklípků a vmezežené tkáně. V patogenezi onemocnění hrají důležitou úlohu CD4+ T-lymfocyty a cytokiny, zejména Th1 typu a také mediátory s prozánětlivými funkcemi (chemokiny, TNFalfa). IL-17 je prozánětlivý cytokin primárně vytvářený T-lymfocyty, tzv. Th17 buňkami. IL-17 mj. posiluje efektorové mechanismy přirozené imunity, např. migraci neutrofilů a aktivaci IL-1beta a TNFalfa.

**Cíl:** Zjistit, zda IL-17 protein je přítomen v plicích pacientů s plicní sarkoidózou a v kladném případě sledovat, zda se hladina IL-17 liší u rentgenologických stádií, charakterizujících klinický průběh onemocnění.

**Metoda:** Hladina imunoreaktivního IL-17 proteinu byla stanovena v neředěných vzorcích bronchoalveolární lavážní tekutiny (BAL) pomocí enzymové imunoanalýzy (R and D Systems). Detekční limit IL-17 ELISA činil 0,3 pg/ml. Byla vyšetřena BAL od 58 pacientů se sarkoidózou (rtg stádium I, n = 15; st. II, n = 27; st. III, n = 16), od 26 pacientů s Löfgrenovým syndromem, LS (benigní, spontánně ustupující onemocnění) a také od 22 kontrolních jedinců bez známek plicního zánětu.

**Výsledek:** IL-17 byl detekován v 6 vzorcích (27 %) BAL od kontrolních jedinců (medián 5,4 pg/ml). V BAL pacientů se sarkoidózou byl IL-17 přítomen v 23 (40 %) případech (medián 71,6 pg/ml); BAL nemocných s LS obsahovala IL-17 v 9 (35 %) případech. Subanalýza dle klinického průběhu onemocnění odhalila, že nejméně IL-17 se

vyskytuje u pacientů s I. stádiem onemocnění a u nemocných s LS (medián 12,6, resp. 12, 2 pg/ml). Naproti tomu nejvíce IL-17 se vyskytovalo u pacientů s progredujícím onemocněním, tj. se stádiem II (71,6 pg/ml) a zejména pak se stádiem III (342,9 pg/ml).

**Závěr:** Data z pilotní studie naznačují, že IL-17 protein je přítomen v plicích pacientů se sarkoidózou. Naznačenou souvislost mezi množstvím IL-17 v BAL a klinickým průběhem onemocnění je potřeba dále sledovat na větším souboru pacientů s využitím citlivých metodik, případně pomocí analýzy IL-17 mRNA.

Grantová podpora: IGA MZ ČR 9037, GA ČR 310/06/827.

P 11/13

**REGULAČNÍ CYTOKINY IL-10 a TGF-BETA 1 V MATEŘSKÉM  
MLÉKU**M. Durilová<sup>1</sup>, K. Flajšmanová<sup>1</sup>, K. Štechová<sup>1</sup>, M. Čepelková<sup>2</sup>,  
J. Nevorál<sup>1</sup><sup>1</sup>Pediatriká klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha<sup>2</sup>Gynekologicko-porodnická klinika 2. LF UK, Praha

**Úvod:** Mateřské mléko obsahuje široké spektrum imunologických faktorů, které aktivně i pasivně ovlivňují vyvíjející se imunitní systém kojeného dítěte. Jeho význam v ochraně před vznikem alergických onemocnění u kojených dětí je v posledních letech velice diskutován a zůstává kontroverzní, významnou roli pravděpodobně mají individuální rozdíly ve složení mateřského mléka.

**Cíl studie:** Cílem naší studie bylo porovnání hladin regulačních cytokinů IL-10 a TGF-beta1 v mateřském mléce alergických a nealergických matek

**Metody:** Bylo vyšetřeno mateřské mléko od alergických a nealergických matek, a to kolostrum (do 4 dní po porodu) a ve věku 1 a 3 měsíce po porodu. Matky s pozitivní alergickou anamnézou byly léčeny pro atopický ekzém, polinózu nebo astma. Koncentrace cytokinů byly stanoveny metodou ELISA pomocí komerčních kitů. Výsledky byly analyzovány statistickým programem SPSS, použitím Mann-Whitney U testu. Hladina pravděpodobnosti < 0,05 byla považována za statisticky významnou.

**Výsledky:** Koncentrace IL-10 byly významně vyšší ( $p < 0,001$ ) v kolostru alergických matek ( $n = 48$ , 0–101 pg/ml, median 8 pg/ml), v porovnání s nealergickou skupinou ( $n = 27$ , 0–18 pg/ml, median 0 pg/ml). Během laktálního období byl v alergické skupině zaznamenán významný pokles v koncentraci IL-10 ( $p = 0,0003$ ,  $p = 0,0003$ , kolostrum vs. 1. a 3. měsíc).

TGF-beta1 byl zatím testován jen ve vzorcích zralého mateřského mléka, a to v 1. a 3. měsíci po porodu. Významně vyšší koncentrace byly nalezeny v mléku nealergických matek ( $n = 10$ , 418–762 pg/ml, median 592 pg/ml v 1. měsíci;  $n = 10$ , 454–803 pg/ml, median 698 pg/ml ve 3. měsíci), v porovnání s koncentracemi u alergických matek ( $n = 10$ , 106–394 pg/ml, median 283 pg/ml v 1. měsíci;  $n = 10$ , 209–620 pg/ml, median 417 pg/ml ve 3. měsíci) a to v 1. ( $p < 0,001$ ) i ve 3. měsíci ( $p = 0,002$ ).

**Závěr:** Alergické matky měly významně vyšší hladiny IL-10 v kolostru, ale významně nižší hladiny TGF-beta1 ve zralém mateřském mléce. Nízké hladiny TGF-beta1 v mateřském mléku alergických matek byly již prokázány v jiných studiích a jsou považovány za rizikový faktor pro vývoj alergických onemocnění. Vysoká koncentrace IL-10 v kolostru alergických matek by mohla poukazovat na kompenzační aktivitu a snahu o regulaci imunitního systému matky, který je primárně nakloněn směrem k Th2 odpovědím. Děti zařazené do této studie jsou dále sledovány pro vznik alergických onemocnění.

Studie byla podpořena grantem IGA MZ NR/8310-5.



P 23/2

VLIV TERAPIE CYKLOSPORINEM A NA FUNKCI LYMFOCYTŮ PERIFERNÍ KRVE U PACIENTŮ PO TRANSPLANTACI LEDVINY MONITOROVANOU TESTEM TRANSFORMACE LYMFOCYTŮ A TESTEM QUANTIFERON<sup>®</sup>I. Lochman<sup>1</sup>, A. Lochmanová<sup>1</sup>, P. Maršálková<sup>2</sup>, J. Dědochová<sup>3</sup>, V. V. Novák<sup>1</sup>, A. Kloudová<sup>1</sup>, M. Grundmann<sup>2</sup>, H. Brozmanová<sup>2</sup>, I. Komzáková<sup>2</sup>, J. Raška<sup>4</sup>, H. Tomášková<sup>5</sup><sup>1</sup>Odbor imunologie a alergologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě<sup>2</sup>Ústav klinické farmakologie Fakultní nemocnice Ostrava<sup>3</sup>Interní klinika Fakultní nemocnice Ostrava<sup>4</sup>Oddělení virologie CMPI Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě<sup>5</sup>Odbor informačních technologií Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě

U 14 pacientů s transplantovanou ledvinou byla sledována funkce lymfocytů periferní krve pomocí testu transformace lymfocytů (TTL) a testu QuantiFERON<sup>®</sup> (QFN, Cellestis). Pacienti vstoupili do studie v období 21. 6. 2006–12. 5. 2008. První vyšetření bylo provedeno těsně před transplantací (Tx) v den Tx a dále byla vyšetření prováděna v dohodnutých intervalech po Tx. Imunosupresivní terapie je realizována trojkombinací cyklosporin A (CsA), kortikoidy a mykofenolát a je v posttransplantačním období individualizována podle klinického stavu pacienta. Ke stimulaci lymfocytů byl v TTL použit PHA, v testu QFN navíc směs mykobakteriálních antigenů a CMV antigen. U pacientů byla měřena také koncentrace CsA a jeho metabolitů AM1, AM4 a AM9 v celé krvi a uvnitř lymfocytů pomocí UPLC/MS metody. Dosud získané výsledky studie ukazují, že:

- U pacientů dochází v prvních dnech po transplantaci k silnému útlumu schopnosti lymfocytů periferní krve odpovídat na mitogenní nebo antigenní podnět, který je důsledkem celkově vyšší úrovně imunosuprese. Tento efekt je zřejmý především v prvních hodinách po podání imunosupresiv. V naší studii však nebylo možno oddělit vliv a působení jednotlivých současně aplikovaných imunosupresiv.
- Odpovídatost pacientů v TTL a QFN na PHA spolu sice celkově statisticky významně korelují, ale tato korelace není příliš těsná a musí být posuzována individuálně.
- Závislost byla nalezena i mezi koncentracemi CsA a jeho metabolitů v plné krvi a v lymfocytech a odpovědí lymfocytů na mitogenní a antigenní podnět v testech TTL a QFN. V praxi však opět musí být hodnocena individuálně
- Ukazuje se, že neschopnost odpovídat na stimulaci CMV antigenem v testu QFN je rizikovým faktorem pro postižení transplantovaného jedince CMV infekcí v posttransplantačním období.

Vybrané statistické výsledky (hodnocení bylo provedeno Spearmanovým testem)

Tabulka k P 23/2

Srovnávané parametry	n	skk	p
TTL/QFN po stimulaci PHA	174	0,7265	0,0000
TTL po stimulaci PHA/ CsA v plné krvi	156	-0,5759	0,0000
TTL po stimulaci PHA/CsA v lymfocytech	83	-0,4354	0,0000
QFN po stimulaci PHA/CsA v plné krvi	160	-0,7183	0,0000
QFN po stimulaci PHA/CsA v lymfocytech	84	-0,7021	0,0000

n – počet srovnávaných hodnot v odběrech těsně před podáním další dávky imunosupresiv, skk – Spearmanův koeficient korelace, p – pravděpodobnost, že srovnávané parametry jsou nezávislé

P 23/3

## JEDNONUKLEOTIDOVÉ POLYMORFISMY GENU MAdCAM-1 A JEJICH VÝZNAM PRO PŘEDPOVĚĎ KOMPLIKACÍ PO ALOGENNÍ TRANSPLANTACI KMENOVÝCH KRVEVTVORNÝCH BUNĚK

Z. Ambrůzová<sup>1</sup>, F. Mrázek<sup>1</sup>, L. Raida<sup>2</sup>, E. Faber<sup>2</sup>, A. Stáhelová<sup>1</sup>, K. Indrák<sup>2</sup>, M. Petřek<sup>1</sup><sup>1</sup>Laboratoř imunogenomiky a imunoproteomiky, Ústav imunologie LF UP Olomouc<sup>2</sup>Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

**Úvod:** MAdCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1) je adhezivní molekula exprimovaná na povrchu endoteliálních buněk, která se váže s integriny na povrchu leukocytů (např. LPAM-1) a významně se tak uplatňuje při směrování T-lymfocytů dárce do slizničních tkání příjemce při rozvoji reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) po alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk (TKB). Variabilita struktury a/nebo exprese molekuly MAdCAM-1 podmiňuje genovými polymorfismy může proto ovlivňovat výskyt a závažnost komplikací po TKB.

**Cíl:** Zhodnotit, zda vybrané jednonukleotidové polymorfismy (SNP) genu pro MAdCAM-1 jsou asociovány s rozvojem akutní či chronické GVHD a zda ovlivňují přežívání po TKB.

**Pacienti a metody:** V souboru 87 pacientů a jejich příbuzných (n = 70) resp. nepříbuzných (n = 17) HLA-identických dárců kmenových krvetvorných buněk byly metodou PCR-SSP vyšetřeny tři vybrané běžné polymorfismy genu MAdCAM-1 (rs758502 C/T, rs2302217 A/G, rs3745925 G/T).

**Výsledky:** Rozložení genotypů všech vyšetřovaných polymorfismů bylo ve shodě s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. Statistická analýza odhalila častější výskyt chronické GVHD u MAdCAM-1 AA (rs2302217) homozygotních pacientů ve srovnání s příjemci s ostatními genotypy [64,7 % proti 34 %; p = 0,025 (p<sub>corr</sub> = 0,075)]. Při analýze přežívání byl u pacientů s genotypem MAdCAM-1 GG (rs3745925) pozorován trend k nižší kumulativní úmrtnosti spojené s transplantací (TRM) než u jedinců s jinými genotypy (p = 0,06). Ve vyšetřovaném souboru nebyly nalezeny žádné jiné asociace mezi variantami genu MAdCAM-1 a rozvojem akutní GVHD nebo celkovým přežíváním po TKB.

**Závěr:** Výsledky této studie naznačují, že polymorfismy genu MAdCAM-1 mohou souviset s rizikem rozvoje chronické GVHD a ovlivňovat úmrtnost na komplikace TKB. Získaná pilotní data je nezbytné zhodnotit na větším souboru pacientů.

Tato práce byla podpořena Výzkumným záměrem MSM 6198959205 a grantem IGA MZ ČR NR 9099.

P 23/4

## REKONSTITUCE DENDRITICKÝCH BUNĚK PO ALOGENNÍ TRANSPLANTACI HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK

R. Horváth<sup>1</sup>, V. Budínský<sup>1</sup>, J. Kayserová<sup>1</sup>, T. Kalina<sup>2</sup>, R. Formánková<sup>2</sup>, J. Starý<sup>2</sup>, J. Bartůňková<sup>1</sup>, P. Sedláček<sup>2</sup>, R. Špišek<sup>1</sup><sup>1</sup>Ústav imunologie, UK 2. lékařská fakulta a FN Motol v Praze<sup>2</sup>Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. lékařská fakulta a FN Motol v Praze

Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (H SCT) s myeloablativním režimem představuje unikátní model pro sledování rekonstituce hematopoetických buněk. Dendritické buňky jsou nejdůležitější antigen prezentující buňky a v periferní krvi byly identifikovány dvě hlavní subpopulace. Myeloidní (mDC) a plazmacytoidní (pDC) dendritické buňky mají odlišné úlohy v indukci imunitní reakce, rozpoznávají např. různé patogeny a produkují rozdílná spektra cytokinů. Po rozpoznání patogenu se DC aktivují, exprimují vysoké množství kostimulačních molekul



**Úvod:** Dendritické buňky (DB) jsou specializované antigen-prezentující buňky uplatňující se v oblasti imunoterapie. Funkční DB se podílejí na vyvolání a udržování protinádorové antigenně-specifické odpovědi, což je zpochybňováno v vybraných onemocněních.

**Cíl:** Analýza fenotypu DB a jejich schopnosti vyvrátit u pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) či mnohočetným myelomem (MM) ve srovnání se zdravými kontrolami.

**Metodika:** Pro získání DB byly využity adherentní prekurzory periferní krve 18 kontrol, 18 osob s MGUS a 20 osob s MM. Po 7denní kultivaci s IL-4 a GM-CSF, v bezsérovém médiu nebo s přidávkou autologního séra, byly DB stimulovány huCD40Ligandem (CD40L). Flowcytometricky byla sledována exprese CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CCR6, CCR7. V supernatantu kultur byla pomocí ELISA analyzována hladina IL-12p70, v séru periferní krve hladina IL-6.

**Výsledky:** Při kultivaci v bezsérovém médiu nebyl nalezen významný rozdíl ve fenotypu DB hodnocených osob, ať už u nezralých nebo stimulovaných DB. Exprese CD83 byla po stimulaci nevysoká (kontroly 10,0 ± 6,6 %; MGUS 14,6 ± 13,3 %; MM 15,7 ± 12,1 %) a byla nalezena pouze nižší exprese CD1a ( $p = 0,014$ ) u kontrol ve srovnání s osobami s MGUS (kontroly 7,4 ± 5,2%; MGUS 23,0 ± 18,4%; MM 12,1 ± 11,9%). Při autologních podmínkách kultivace byl zjištěn negativní efekt séra osob s MGUS a MM na kvalitu DB ve srovnání s kontrolami. Bylo prokázáno snížení exprese CD83 (kontroly 36,5 %; MGUS 9,5 %; MM 13,2 %), CD80 (kontroly 3,4 %; MGUS 10,3 %; MM 12,8 %), CCR6 (kontroly 15,1 %; MGUS 2,1 %; MM 3,3 %) a CCR7 (kontroly 14 %; MGUS 1,1 %; MM 2,5 %). Produkce IL-12p70 byla ve všech případech nízká a významný rozdíl v sérové hladině IL-6 mezi skupinami nebyl nalezen (mediány – kontroly 1,7 pg/ml; MGUS 3,1 pg/ml; MM 1,9 pg/ml).

**Závěr:** Za bezsérových podmínek nebyly nalezeny rozdíly ve fenotypu DB při srovnání zdravých osob s MGUS či MM pacienty. Stimulace CD40L nevyvolala plné vyvrátění DB. Přítomnost autologního séra snížila kvalitu DB u osob s MGUS a MM, u kontrol nebylo výrazné ovlivnění nalezeno. Negativní efekt autologního séra zřejmě není způsoben pouze IL-6, ale komplexem inhibitorů.

Podpořeno MŠMT LC 06027 a IGA MZČR NR/8945-4.

#### P 27/5

### VLIV VYSOCE NENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN A JEJICH METABOLITŮ NA TVORBU REAKTIVNÍCH METABOLITŮ KYSLÍKU BUŇKAMI RAW 264.7

G. Ambrožová, A. Lojek  
Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Brno

Vysoce nenasycené mastné kyseliny (VNMK) mohou různými způsoby ovlivňovat imunitní a zánětlivé reakce. Vliv mastných kyselin na biologické děje závisí na jejich chemické struktuře. Z tohoto hlediska jsou významné zejména skupiny  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6. Dlouhé karboxylové řetězce mastných kyselin obsahují dvojné vazby a jsou tak náchylné k lipidové peroxidaci. Neenzymatickou lipidovou peroxidací mohou vznikat mnohé biologicky aktivní toxické látky, jako jsou malondialdehyd, 4-hydroxynonenal a akrolein. VNMK i produkty jejich peroxidace mohou ovlivňovat mikrobicidní funkce fagocytů včetně tvorby reaktivních kyslíkových metabolitů (RKM).

Hlavním cílem naší studie bylo popsat vliv vybraných VNMK a jejich metabolitů na tvorbu RKM stimulovanými makrofágy. Kyselina arachidonová, docosahexaenová a eicosapentaenová, akrolein, 4-hydroxynonenal a malondialdehyd byly testovány v koncentracích 0,1; 1; 10 a 100  $\mu$ M. Pro experimenty byly používány buňky myší peritoneální makrofágové linie RAW 264.7. Makrofágy byly stimulovány LPS (0,1  $\mu$ g/ml), současně byly přidány testované látky a následovala inkubace 8 hodin při 37 °C. Změny v produkci RKM

byly detekovány chemiluminiscenčně, cytotoxicita používaných látek byla stanovena ATP testem.

Z experimentů vyplývá, že žádná z testovaných VNMK významně nezvyšuje produkci RKM buňkami RAW 264.7. Naopak kyselina arachidonová a docosahexaenová tvorbu RKM inhibovaly. Nejvyšší koncentrace všech použitých VNMK snižovaly množství RKM, nevykazovaly však cytotoxické účinky. Akrolein a 4-hydroxynonenal snižovaly tvorbu RKM v závislosti na jejich koncentraci. U koncentrací 10 a 100  $\mu$ M byl tento efekt způsoben cytotoxickými účinky těchto metabolitů. Malondialdehyd snižoval tvorbu RKM pouze v nejvyšší použité koncentraci, efekt však nebyl způsoben jeho cytotoxickými účinky.

Byla měřena také koncentrace dusitanů (nepřímá metoda pro detekci tvorby oxidu dusnatého) v supernatantu, hodnoty u všech testovaných koncentrací a látek však byly na hranici detekčního limitu, zřejmě díky krátké době inkubace. V dalších měřeních tedy bude třeba dobu inkubace prodloužit.

Práce vznikla za podpory projektu MŠMT OC08058.

#### P 27/6

### HODNOTENIE DLHODOBÉHO ÚČINKU SPELEOTERAPIE DETÍ V JASOVskej JASKYNI

D. Salát<sup>1</sup>, J. Juhász<sup>2</sup>, B. Ciberajová<sup>2</sup>, I. Salátová-Kozlovská<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakulta ošetrovateľstva a sociálnej práce, Trnavskej univerzity, Klinika pneumológie a ftizeológie, Fakultná nemocnica, Trnava

<sup>2</sup>Štós-kúpele, a. s.

<sup>3</sup>Centrum imunológie a alergológie, s. r. o., Bratislava

Cieľom štúdie bolo zistiť dlhodobé účinky speleoterapie na pacientov s chronickými nešpecifickými ochoreniami dýchacích ciest (hlavne s alergickou nádchou a bronchiálnou astmou). Autori sledovali zmeny spirometrických parametrov detských pacientov, ktorí počas klimatickej liečby v a.s. Štós kúpele absolvovali aj speleoterapiu v Jasovskej jaskyni.

Speleoterapia počas klimatickej liečby v Kúpeľoch Štós má už svoju dlhoročnú históriu. Ide o „procedúru“, ktorá nie je platená z prostriedkov nemocenského poistenia. Na dosiahnutie dobrého klinického efektu sa odporúča 10–15 pobytov v jaskyni v trvaní 3 hodín.

Do klinického sledovania sme zaradili 34 detí priemerného veku 10,2 roka (14 dievčat a 20 chlapcov), ktorí sa opakovane liečili v kúpeľoch Štós (2007 a 2008) a okrem klimatoterapie absolvovali aj speleoterapiu minimálne 5× pri oboch pobytach.

Porovnávali sme užívanie antibiotík rok pred liečbou a rok po liečbe v Štóse, ako aj základné spirometrické parametre (FVC, FEV<sub>1</sub>, PEF, MEF<sub>25</sub>, MEF<sub>50</sub> a MEF<sub>75</sub>). Zistili sme:

Deti v našej skupine rok pred liečbou v Štóse užívali spolu 157× antibiotiká a rok po liečbe už len 57×.

Pri opakovanom pobyte (cca po roku) došlo k zlepšeniu parametrov FVC a FEV<sub>1</sub> (8 resp. 11 %).

Klimatická liečba v kombinácii so speleoterapiou má i dnes svoje významné miesto v komplexnej liečbe chronických nešpecifických ochorení dýchacích ciest a pľúc detí. Okrem dlhodobého zlepšeného klinického stavu má priaznivý vplyv aj na zlepšenie kvality života chorých detí.

#### P 27/7

### POLYMORFISMY GENU PRO RECEPTOROVU TYROSINKINÁZU DDR1 U PACIENTŮ S IDIOPATICKOU PLICNÍ FIBRÓZOU

Z. Kubištová<sup>1</sup>, F. Mrázek<sup>1</sup>, E. Kriegová<sup>1</sup>, B. Hutýrová<sup>2</sup>, V. Kolek<sup>2</sup>, M. Petřek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav imunologie, LF Univerzity Palackého,

<sup>2</sup>Klinika plicních nemocí a tuberkulózy, LF Univerzity Palackého



**Úvod:** Idiopatická plicní fibróza (IPF) je chronické onemocnění neznámé etiologie, které vede k závažnému poškození funkce plic. V rozvoji fibrotických změn sehrávají klíčovou roli fibroblasty a depozice kolagenu. Receptorová tyrosinkináza (DDR1, z angl. Discoidin Domain Receptor 1), jejímž ligandem je kolagen, přispívá k diferenciaci leukocytů a aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Ovlivňuje tak i přežívání fibroblastů. Dříve popsané polymorfismy genu pro DDR1 mohou mít vliv na jeho produkci a/nebo funkci, a tím se uplatňovat v predispozici k IPF.

**Cíl:** Ověřit možnou souvislost tří vybraných jednonukleotidových (SNP) polymorfismů *DDR1* genu (rs8408, rs1264323 a rs2267641) s vnímavostí k IPF.

**Metody:** Vybrané polymorfismy *DDR1* genu byly typizovány u padesáti tří pacientů s IPF a 203 zdravých kontrol. Do vyšetřovaných souborů byli zařazeni pouze nepříbuzní jedinci české národnosti. Typizace *DDR1* polymorfismů byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP). Srovnání distribuce jednotlivých variant *DDR1* genu mezi vyšetřovanými skupinami bylo provedeno pomocí Chi-kvadrátového testu s korekcí podle Woolf-Haldaneho.

**Výsledky:** Rozložení genotypů polymorfismů *DDR1* odpovídalo Hardy-Weinbergově rovnováze u kontrolních jedinců i pacientů s IPF. Ani pro jeden z vyšetřovaných *DDR1* polymorfismů nebyly zjištěny rozdíly v zastoupení alel mezi pacienty s IPF a kontrolní skupinou (frekvence vzácnějších alel: *DDR1* rs8408\*C: pacienti 0,20 / kontroly 0,24; *DDR1* rs1264323\*A: pacienti 0,38 / kontroly 0,44; *DDR1* 2267641\*C: pacienti 0,15 / kontroly 0,19). Skupiny pacientů s IPF a kontrolních jedinců se nelišily ani v zastoupení genotypů pro výše uvedené *DDR1* polymorfismy.

**Závěr:** Vybrané polymorfismy genu pro receptorovou tyrosinkinázu *DDR1* nesouvisí s vnímavostí k idiopatické plicní fibróze v české populaci. Pro definitivní vyloučení vztahu mezi variantami *DDR1* genu a predispozicí k IPF bude třeba nezávislé ověření výsledků na jiné populaci.

Podpořeno výzkumným záměrem MSM6198959205, granty IGA MZ ČR: NR903.

#### P 27/8

### THE EFFECT OF ALDOSE REDUCTASE INHIBITION BY JMC-2004 ON HYPERGLYCEMIA-INDUCED ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

I. Papežiková<sup>1</sup>, M. Pekarová<sup>1</sup>, M. Chatzopoulou<sup>2</sup>, I. Nicolaou<sup>2</sup>, V. Demopoulos<sup>2</sup>, L. Kubala<sup>1</sup>, A. Lojek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biophysics, Academy of Sciences of The Czech Republic, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

Increased glucose utilization by aldose reductase (ALR-2), a rate-limiting enzyme of polyol pathway has been implicated in the pathogenesis of diabetic vascular complications. In this process, several biochemical mechanisms are involved, including depletion of reduced cofactors required for the action of antioxidant enzymes or endothelial NO synthase. Research in recent decades has focused on ALR-2 as a potential target of pharmacologic intervention. Several aldose reductase inhibitors (ARIs) have been developed with promising results both *in vitro* and *in vivo*, however, most of them have been ruled out in the stage of clinical trials due to their adverse effects or low efficiency. Recently, the attention has been focused to discover ARIs of distinct chemical structures to overcome above-mentioned problems.

In this study, effect of a novel aldose reductase inhibitor JMC-2004 on hyperglycemia-induced endothelial dysfunction was studied. Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were treated with glucose (30 mM), JMC-2004 (0,01 mM), or glucose + JMC-2004

for 24 h. The cells were then stimulated with calcium ionophore A23187 after which NO production was measured electrochemically using porphyrine-coated carbon NO electrode. After the measurement, cell supernatants were harvested and nitrite concentrations were evaluated using Griess reaction. The peroxy and hydroxyl radical-scavenging activity of JMC-2004 was measured with luminol-enhanced chemiluminescence. Selectivity of JMC-2004 for ALR-2 was evaluated on the basis of ratio between IC<sub>50</sub> for aldehyde reductase (an enzyme closely related to ALR-2) and for ALR-2. IC<sub>50</sub> for ALR-1 was determined colorimetrically with D-glyceraldehyde as a substrate.

24h incubation of the cells with 30 mM glucose strongly diminished calcium ionophore-induced NO production. Concomitant treatment with JMC-2004 restored NO production by 40% without affecting eNOS expression. This effect was probably antioxidant-independent, since JMC-2004 did not have any antioxidant properties. JMC-2004 exerted high selectivity towards ALR-2.

In conclusion, JMC-2004 was able to abolish hyperglycemia-induced endothelial dysfunction in endothelial cells *in vitro*. Moreover, JMC-2004 has a significant selectivity factor regarding the inhibition of ALR-1, so it is expected that adverse effects and toxicity due to the inhibition of oxidoreductases apart from ALR-2 will not manifest. Thus, JMC-2004 appears to be a promising molecule with the potential to become a useful lead compound in the field of ARIs.

This study was undertaken as a part of research plan AVOZ50040507 and supported by grant No.204/07/P539 (GACR) and COST Action B35.

#### P 27/9

### IMUNOGENICITA POLYMERŮ PRO GENOVOU TERAPII I. BIOKOMPATIBILITA A IMUNOKOMPATIBILITA HYDROGELŮ

V. Pakanová<sup>1</sup>, M. Šírová<sup>1</sup>, P. Rossmann<sup>1</sup>, P. Dubrue<sup>2</sup>, S. Van Vlierbergh<sup>2</sup>, E. Schacht<sup>2</sup>, B. Říhová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Praha, Česká republika

<sup>2</sup>Ghent University, Ghent, Belgie

Tato práce je součástí projektu, který se soustřeďuje na vývoj systémů nevirálního přenosu genů *ex vivo*, s hlavním zřetelem k vývoji terapeutických postupů pro léčbu degenerativních onemocnění sítnice a léčbu kardiovaskulárních onemocnění. Jako vektory pro vlastní přenos genů jsou použity biodegradovatelné polymery na bázi poly- $\alpha$ -aminokyselin. Transfekce buněk bude nejprve provedena na polymerní membráně a tato membrána bude pak implantována do subretinálního prostoru oka nebo bude tvořit obal kardiovaskulárního protězu. Testování biokompatibility a imunokompatibility všech materiálů potřebných ke genovému přenosu je velmi důležité, neboť jakákoliv jejich případná toxicita nebo naopak imunogenicitu velmi pravděpodobně sníží účinnost přenosu genů do buněk.

Polymerní metakrylamidem modifikovaná želatina (dvojitýho typu – A a B) vytváří hydrogel, který bude sloužit k pokrytí membrány. Hydrogelový povrch implantátů ponese polyplexy (komplexy nukleové kyseliny a polymerního nosiče) a zároveň umožní, aby byly buňky účinně transfekovány. V první sérii testů bio- a imunokompatibility jsme hydrogely testovali *in vitro*. Testování proběhlo na 96 jamkových destičkách, do kterých byly hydrogely přímo nasyntetizovány. Na destičkách byly kultivovány normální buňky i buňky permanentních buněčných linií a jejich proliferace/životnost porovnávána s kontrolními kulturami v jamkách bez hydrogelu.

Buněčné linie, které jsme použili pro testování *in vitro*, byly monocyt/makrofágová linie (RAW 264.7), endoteliální (EAHY) a myeloidní leukemické buňky (U937). Jako normální buněčné populace byly použity lidské erytrocyty, lidské periferní krevní mononukleární buňky (PBMC), myši buňky peritoneálního exu-