

ZPRÁVY

ZPRÁVA O ČINNOSTI BRNĚNSKÉ POBOČKY ČESKOSLOVENSKÉ BIOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI V ROCE 2000

Členská schůze 5. ledna 2000

(Schůze konaná ve spolupráci s Hlavním výborem Čs. biologické společnosti a Biologickým ústavem Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně u příležitosti 60. narozenin prof. MUDr. Augustina Svobody, CSc.)

M. Kopecká (Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Cytoskelet u patogenních hub.**

R. Janisch (Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Využití laserové pinzety v buněčné biologii.**

R. Veselská (Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Změny cytoskeletu v průběhu indukované apoptózy.**

Členská schůze 19. ledna 2000

(Schůze konaná ve spolupráci s Českou anatomickou společností, Ústavem histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Hlavním výborem Čs. biologické společnosti v Brně u příležitosti 60. narozenin prof. MUDr. RNDr. Svatopluka Čecha, DrSc.)

D. Horký (Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Profesor Svatopluk Čech jubilující.**

D. Horký, *J. Adler*¹ (Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, ¹Tkáňová banka Fakultní nemocnice Brno-Bohunice): **Diferenciace allo- a autogenních chondrocytů a vzhled povrchu artikulární chrupavky při reparaci defektů.**

M. Sedláčková, *J. Štátná*, *J. Žáková**, *P. Ventruba** (Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, *I. gynekologicko-porodnická klinika, Fakultní porodnice Brno, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně): **Význam buněk cumulus oophorus pro fertilizaci lidských oocytů in vitro.**

I. Lauschová, *S. Čech* (Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Topochemie glykogenu v tubárním epitelu**

pohlavně nezralých myší v normě a po stimulaci exogenním estradiolem a progesteronem.

Členská schůze 9. února 2000

D. Hrubá (Ústav preventivního lékařství Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Folikulární tekutina – nové biologické médium pro hodnocení expozice xenobiotikům.**

I. Crha (I. gynekologicko-porodnická klinika, Fakultní porodnice Brno, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně): **Ovlivňuje kouření plodnost žen?**

Členská schůze 15. března 2000

J. Šmarda (Katedra genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Onkogen v-myb a možnosti jeho suprese.**

J. Šmardová (Oddělení buněčné a molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav v Brně): **Funkční analýza nádorového supresoru p53.**

Členská schůze 12. dubna 2000

(Schůze konaná ve spolupráci s Českou společností pro biochemii a molekulární biologii)

V. Mikeš (Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Molekulární mechanismy a regulace interakcí mezi rostlinou a prostředím.**

Členská schůze 3. května 2000

(Schůze konaná ve spolupráci s Hlavním výborem Čs. biologické společnosti a Biologickým ústavem Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně u příležitosti 75. narozenin prof. MUDr. Oldřicha Nečase, DrSc.)

A. Svoboda (Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Prof. Nečas a novodobá historie Biologického ústavu LF MU a Čs. biologické společnosti.**

R. Janisch (Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Nečasova koncepce výzkumu buňky na Biologickém ústavu.**

M. Gabriel (Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **“O kvasinkách a lidech” na Biologickém ústavu.**

Členská schůze 17. května 2000

(Schůze konaná ve spolupráci s Českou anatomickou společností)

F. Tichý¹, I. Míšek^{1,2}, D. Horký³, I. Kociánová¹, J. Veselý⁴ (1Ústav anatomie, histologie a embryologie Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně, 2Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Brně, 3Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, 4Klinika plastické a estetické chirurgie FN u svaté Anny, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně): **Funkční maloprůměrové cévní náhrady u prasete.**

K. Witter^{1,2}, A. Opitzová¹, I. Míšek^{1,2} (1Ústav anatomie, histologie a embryologie Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně, 2Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Brně): **Laterální sklovinná lišta – stavební jednotka zubních základů savců.**

H. Pavlíková¹, K. Witter^{1,2}, I. Míšek^{1,2} (1Ústav anatomie, histologie a embryologie Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně, 2Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Brně): **Ontogeneze vestibulum oris u hraboše mokřadního (Microtus agrestis, Rodentia).**

V. Páral (Ústav anatomie, histologie a embryologie Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně): **Zvířecí kosti ve středověké řemeslné výrobě.**

Členská schůze 20. září 2000

S. Jantová (Katedra biochemie a mikrobiologie Chemickotechnologické fakulty Slovenskej technickej univerzity v Bratislave, Slovenská republika): **Strategie vyhledávání nových látek účinných proti mikrobiálním a nádorovým buňkám.**

Členská schůze 4. října 2000

M. Vojtíšková, J. Kadlecová, T. Novotný¹, R. Gaillyová, I. Grochová, B. Semrád¹ (Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice, 1Interní kardiologická klinika, Fakultní nemocnice Brno, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně): **Informační revoluce v diagnostice srdečních arytmií a nástup molekulární medicíny na prahu třetího tisíciletí.**

B. Ravčuková, J. Kadlecová, P. Kroupová, A. Veselá, I. Valášková, M. Vojtíšková, R. Gaillyová (Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice): **Molekulární genetiky neurofibromatosy 1.**

M. Falk, E. Šilhánová¹, R. Gaillyová, M. Vojtíšková (Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice, 1Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Ostrava): **Nové trendy v diagnostice myotonické dystrofie.**

I. Valášková, R. Gaillyová, A. Holčíková¹, J. Kadlecová, B. Ravčuková, V. Bryšová, M. Vojtíšková (Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice, ¹Klinika dětských infekčních nemocí Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně): **Závažné patologie spojené s mutacemi v CFTR genu.**

R. Gaillyová, I. Grochová, I. Valášková, M. Vojtíšková (Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice): **Rodinná studie s výskytem cystické fibrózy u druhobratranců.**

Členská schůze 18. října 2000

(Schůze konaná ve spolupráci s Hlavním výborem Čs. biologické společnosti, Biofyzikálním ústavem Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a Klinikou zobrazovacích metod FN u svatě Anny v Brně u příležitosti 70. narozenin prof. MUDr. Ivo Hrazdiry, DrSc.)

V. Mornstein (Biofyzikální ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Profesor Ivo Hrazdira jubilující.**

J. Škorpíková (Biofyzikální ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Biologické účinky ultrazvuku.**

E. Kotulánová (Klinika zobrazovacích metod Fakultní nemocnice u svatě Anny v Brně, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně): **Harmonické zobrazení – výhody pro abdominální ultrasonografii.**

Z. Hlinomazová (Oftalmologická klinika Fakultní nemocnice Brno, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně): **Ultrasonografie v oftalmologii – včera a dnes.**

Workshop 30. října 2000

”Animal Environment Interaction” BRNO 2000

(Akce pořádaná ve spolupráci s Ústavem zoohygieny Fakulty veterinární hygieny a ekologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno a Österreichisches Ost- und Südosteuropa –Institut Außenstelle Brünn)

P. Novák (Ústav zoohygieny Fakulty veterinární hygieny a ekologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno): **The evaluation of the stable climate influence on farm animals.**

G. Schauburger (Institut für Medizinische Physik und Biostatistik Veterinärmedizinische Universität Wien): **Steady-state balance model to calculate the indoor climate of livestock buildings demonstrated for finishing pigs.**

L. Zeman (Ústav výživy a krmení hospodářských zvířat, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **The relation of animal feeding to the climatic condition.**

L. Novák (Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně): **New possibilities for modeling the growth of farm animals from the data about the feeding and climatic conditions used in the breeder's practice.**

Členská schůze 29. listopadu 2000

I. Ingr (Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Jakost a spotřeba potravin jako faktor lidského zdraví.**

ABSTRACTS

M. Kopecká¹, M. Gabriel¹, A. Svoboda¹, K. Takeo², M. Yamaguchi², K. Hata², M. Ohkusu², S. Yoshida² (¹Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Czech Republic, ²Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Japan): **Cytoskeleton in pathogenic fungi.**

Present knowledge of functions of cytoskeleton in cell reproduction of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* and fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus* led us to pose two questions: 1) How is the cytoskeleton organized in two human fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Aureobasidium pullulans*? 2) Is the fungal pathogenicity somehow related to its cytoskeleton?

Our methods used for detection of actin and microtubular cytoskeleton in yeasts *S. cerevisiae* and *S. japonicus* were applied to both human fungal pathogens.

The results obtained showed: (i) The topology of actin patches, cables and rings in basidiomycetous budding yeast *Cryptococcus neoformans* resembled to ascomycetous budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, while microtubules were extended along the cell axis reminding the microtubular organization of ascomycetous fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. (ii) In filamentous ascomycete *Aureobasidium pullulans* typical actin structures (patches, cables) were not seen yet, while microtubular cytoskeleton was abundant and similar to ascomycetous fission yeast, *Schizosaccharomyces japonicus*. Microtubules were also demonstrated to extend to developing conidia.

It is concluded that well developed actin and microtubular cytoskeleton enable reproduction of uniform cells of pathogenic basidiomycetous yeast *Cryptococcus neoformans* in contrast to deficient actin structures and rich microtubules in *A. pullulans* that may result in fungal polymorphism and cause resistance to fungicides. Cytoskeleton may be essential for vectorial character of secretion of hydrolytic enzymes necessary for invasive growth of pathogenic fungi in host organism.

R. Janisch (Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Využití laserové pinzety v buněčné biologii.**

Optická pinzeta využívá laserové světlo pro neinvazivní manipulaci s mikroskopickými nebo submikroskopickými částicemi a je proto velmi výhodným mikromanipulačním nástrojem pro manipulace s buněčnými strukturami. Princip tzv. optické pasti je znám již od sedmdesátých let. Pokroky v oblasti laserové technologie v druhé polovině osmdesátých let umožnily celou řadu cenných biologických experimentů. Aplikace této metody má v současnosti již i praktické a komerční využití.

Aparaturou sestavenou na Ústavu přístrojové techniky AV ČR v Brně se podařilo využít pro první neinvazivní mikromanipulace s celými volně pohyblivými buňkami i vnitrobuněčnými kulturami a v pokusech s transportem buněčných struktur uvnitř buňky. Jako buněčné modely byly použity volně pohyblivé buňky protozoí *Euglena*, *Colpidium*, *Paramecium*, volně suspendované buňky kvasinek a buňky tkáňových kultur adheované na skleněném povrchu. Byly pořízeny videozáznamy dokumentující vnitrobuněčné mikromanipulace s pohlcenými latexovými částicemi o velikosti 5–10 μm i vlastními buněčnými organelami, mitochondriemi a lysozomálními měchýřky o velikosti 3–7 μm v buňkách nálevníků *Paramecium caudatum* a plicních fibroblastech ve tkáňových kulturách. Mitochondrie a lysozomální měchýřky lze u paramecií i tkáňových buněk přesouvat po dráze až 30 μm , nikoliv však libovolným směrem. Dráha přesunu je vymezena složitou sítí cytoplazmatických mikrotubulů, aktinových mikrofilament i intermediárních filament. Tyto mikromanipulační pokusy ukazují, že v eukaryotní buňce jsou cytoskeletálními strukturami určeny dráhy po nichž se vnitrobuněčný transport může uskutečňovat.

U buněk tkáňových se podařilo zachytit částici bezprostředně pod plasmatickou membránou a při snaze odstranit ji z buňky lze vytáhnout výběžek plasmatické membrány dlouhý několik μm . Po vypnutí laseru se výběžek velmi rychle kontrahuje zpět a povrch buňky má původní vzezření. Tyto manipulace, které lze demonstrovat na tomtéž místě opakovaně svědčí o velké plasticitě a pružnosti plasmatické membrány.

D. Horký, *J. Adler*¹ (Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, ¹Tkáňová banka Fakultní nemocnice Brno-Bohunice): **Diferenciace allo- a autogenních chondrocytů a vzhled povrchu artikulární chrupavky při reparaci defektů.**

Cílem experimentu na zvířatech bylo zhodnocení léčebného efektu autogenních a allogenních chondrocytů při ošetření defektů kloubní chrupavky s možností využití získaných poznatků v klinické humánní praxi.

Do uměle vytvořených defektů artikulární chrupavky o průměru 5 mm, sahajících k subchondrální kosti, byly u 5ti prasat na kondylech femuru a tibie

implantovány allo- a autochondrocyty v tissucolu (tkáňové “lepidlo”) po předchozí kultivaci in vitro. Zvířata po operaci provedené v celkové anestezii se normálně pohybovala. Po 90, resp. 70 dnech byly odebrány jednak vzorky implantátů, jednak vzorky artikulární chrupavky kondylů pro světelnou, transmisní a rastrovací elektronovou mikroskopii.

Bylo zjištěno, že po této době ve všech případech došlo k resorpci tissucolu. Jak allo-, tak autochondrocyty se intenzivně dělily, proliferace byla vyjádřena rovněž produkcí fibrilární a interfibrilární hmoty. Novotvořená tkáň měla ve všech případech strukturu vazivové chrupavky se zřetelnou tvorbou teritorií s chondrocyty v lakunách a vytvořenou peri- a intercelulární matrix. Povrch implantátu byl ve srovnání s okolní chrupavkou nerovný, pod úrovní okolí a v některých případech byl od okolní chrupavky ohraničen zářezem, patrným i makroskopicky. V bezprostřední blízkosti implantátu došlo pravděpodobně vlivem mechanického podráždění k intenzivnímu dělení chondrocytů okolní artikulární chrupavky a tvorbě nápadně velkých isogenetických skupin, patrných i v blízkosti povrchu. V námi sledovaném období nebyly zjištěny rozdíly ve struktuře implantátů allo- nebo autograftů.

Z našich pozorování vyplývá, že je třeba prodloužit postimplantační interval k definitivnímu posouzení kvality nově vytvořené chrupavkové tkáně a k posouzení stupně přeměny vazivové chrupavky ve chrupavku artikulární (pokud vůbec k takové dokonalé přeměně dojde).

M. Sedláčková, J. Štastná, J. Žáková, P. Ventruba** (Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, *I. gynekologicko-porodnická klinika, Fakultní porodnice Brno, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně): **Význam buněk cumulus oophorus pro fertilizaci lidských oocytů in vitro.**

Na podkladě srovnání výsledků klinické metody fertilizace oocyty in vitro v přítomnosti masy cumulus oophorus a po jejím odstranění mnozí autoři dospěli k závěru, že kumulus příznivě ovlivňuje nejen fertilizaci oocyty, ale i další vývoj embrya. Vzhledem k tomu, že exaktní údaje o rolích kumulu v průběhu fertilizace in vitro jsou velmi neúplné, bylo cílem studie srovnat submikroskopickou stavbu kumulů zralých a zdravých preovulačních oocytů, se stavbou kumulů oocytů, které byly úspěšně oplozeny, rýhovaly se a po transferu embryí bylo dosaženo gravidity.

Celkem bylo studováno 12 vzorků masy kumulů mechanicky oddělených od zralých preovulačních oocytů a 50 vzorků inseminovaných kumulů po 20 h kultivace v insemináčném médiu. Obě skupiny vzorků byly zpracovány standardní technikou pro účely transmisní elektronové mikroskopie.

Kumuly preovulačních oocytů obsahovaly více či méně uniformní populaci světlých buněk, v jejichž cytoplazmě byly dominantními organelami granulární

endoplazmatické retikulum a struktury Golgiho aparátu. Tato organelová výbava svědčí, v souladu s většinou literárních údajů, o aktivní účasti buněk preovulačních kumulů na produkci extracelulární matrix. Zastoupení lipidových kapek společně s tubuly a váčky hladkého endoplazmatického retikula je projevem počínající luteinizace buněk kumulů.

V kumulech úspěšně oplozených oocytů došlo k rozlišení původní jednotné populace světlých buněk kumulů na dvě morfologicky distinktní skupiny – tmavé a světlé buňky.

Tmavé buňky v buněčné populaci kumulů dominovaly. Byly charakterizovány větší denzitou jádra i cytoplazmy, nárůstem počtu lipidových kapek a struktur hladkého endoplazmatického retikula. V mitochondriích se objevily v proměnlivém počtu tubulózní krysty. Tmavé buňky pravidelně obsahovaly, často ve vyšším počtu, fagocytované spermie, ojediněle i krevní elementy a zbytky po rozpadlých buňkách kumulu.

Světlé buňky se svým vzhledem podobaly světlým buňkám preovulačních kumulů, lišily se od nich však podstatně v tom, že pravidelně vykazovaly známky degenerace. Typické bylo zúžení až obliterace perinukleárního prostoru a cisteren granulárního endoplazmatického retikula, úbytek až vymizení na ně vázaných ribosomů. Pravidlem byly i redukce počtu ostatních buněčných organel a jejich degenerativní změny. Určitá část světlých buněk vykazovala různě pokročilé morfologické známky nahodilé buněčné smrti.

Z uvedených výsledků vyplývá, že funkce buněk kumulu termínem fertilizace oocytu nekončí. Původně světlé buňky prodělávají v průběhu kultivace v inseminačním médiu diferenciaci ve svůj finální fenotyp, tmavé buňky, které jak vyplývá z jejich organelové výbavy jednak produkují steroidní hormony, jednak pečují o zdravé kultivační mikroprostředí svými fagocytárními aktivitami. Světlé buňky, charakterizované atrofickými a degenerativními změnami, snad představují část původní populace buněk kumulu, která nebyla stimulována ke steroidogenní přestavbě. Příčinou jejich předčasného zániku by mohlo být chybění receptorů pro gonadotropní hormony.

Práce byla řešena s finanční podporou IGA MZ ČR reg. č. 5164–3.

I. Lauschová, S. Čech (Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Topochemie glykogenu v tubárním epitelu pohlavně nezralých myší v normě a po stimulaci exogenním estradiolem a progesteronem.**

Cílem práce bylo zjistit rozložení glykogenu v buňkách tubárního epitelu pohlavně nezralých myší a ověřit, zda a jak se mění po aplikaci exogenních ovariálních steroidních hormonů.

Byly použity vejcovody samic pohlavně nezralých myší [C 57 BL/10 x CBA (P1)] o stáří 0 (novorozené) až 49 dnů; odběry vejcovodů byly provedeny

v týdenních intervalech, tj. v 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 a 49 dní. Exogenní estradiol a progesteron byly aplikovány i. p. 14, 21 a 28 denním zvířatům, zahrnujícím tři experimentální podskupiny s pracovním označením 1 - "estrogenizovaná" zvířata, 2 - "progesteronizovaná" zvířata a 3 - kontrolní zvířata. Vejcovody byly fixovány a zality podle protokolu užívaného v transmisní elektronové mikroskopii a ultrastrukturní vizualizace glykogenu byla provedena pomocí PA-TSC-SP metody v kombinaci s kontrolními testy (*J.-P. Thiéry, J. Microscopie 6, 1967, 987*). Nekontrastované řezy byly prohlíženy a fotografovány elektronovým mikroskopem Tesla BS 500 při urychlovacím napětí 60 kV.

Ve vejcovodech 0, 7 a 14 denních samic byl obsah glykogenu v tubární výstelce nejvyšší. Většina epitelových buněk, bez ohledu na typ, obsahovala hojná difúzně rozptýlená β -granula, a velmi vzácně i α -granula. U některých mikroklových a diferencujících se sekrečních buněk byla evidována poblíž jejich jader různě rozsáhlá depozita polysacharidu, složená z volně asociovaných β -částic. Společné oběma uvedeným buněčným liniím bylo to, že glykogenové partikule byly pravidelně evidovány mezi hladkými membránami koncentrických tělísek, označovaných také jako glykogenová tělíška. U populace řasinkových buněk byly příležitostně zastíženy v bazálních tělíškách řasinek jednotlivé β -částice, event. jejich shluky. V případě 21, 28 a 35 denních samic vykazoval polysacharid velmi podobnou lokalizaci jako u předešlých skupin, avšak četnost glykogenových částic byla zřetelně zredukována. Standardně nízký pool glykogenu obsahovala tubární výstelka 42 a 49 denních samic, ve které téměř polovina epitelových buněk zůstala po barvení PA-TSC-SP metodou negativní. Buňky s mikrokly mohly vzácně obsahovat ještě glykogenová tělíška.

Po podání exogenního estradiolu a progesteronu bylo zjištěno signifikantní snížení hustoty glykogenových částic v buňkách tubární výstelky u všech studovaných skupin (14, 21 a 28 dnů) v porovnání s kontrolními zvířaty. S uvedenými nálezy nápadně kontrastují výsledky ultrahistochemické vizualizace polysacharidu v lamina propria tubární sliznice, v níž část vazivových buněk, zejména podél krevních vlásečnic, nečekaně stříдалa glykogen ve formě rozsáhlých ložisek. Detailní verifikace nálezů a specifikace vazivových buněk jsou předmětem dalšího výzkumu.

D. Hrubá, H. Matějová (Ústav preventivního lékařství Lékařské fakulty Masarykovy Univerzity v Brně): **Folikulární tekutina: nové biologické medium pro detekci expozice chemickým látkám.**

Od roku 1978 se začaly nové léčebné procedury – fertilizace in vitro (IVF) a metodika asistované reprodukce (AR) – používat pro neplodné páry, u nichž se konvenční způsob léčby neplodnosti neseťkal s úspěchem.

Folikulární tekutina získaná při odběru oocytů byla již v řadě studií použita jako nový druh biologického materiálu, v němž je možno sledovat expozici žen

vůči různým xenobiotikům. Folikulární tekutina se tvoří postupným přílivem tekutiny, která je derivátem krevní plasmy a obsahuje dále látky syntetizované a sekretované folikulárními buňkami. Z tohoto důvodu je složení folikulární tekutiny odrazem složení krevní plasmy a sekreční aktivity buněk vaječníku.

V současné době je kouření pokládáno za nejvýznamnější externí rizikový faktor pro poruchy reprodukce člověka. Je možno konstatovat, že průnik chemických škodlivin z cigaretového kouře do vaječníku a do folikulární tekutiny byl jednoznačně prokázán: ve folikulární tekutině aktivních i pasivně exponovaných kuřaček byly nalezeny měřitelné hladiny kotininu (metabolitu nikotinu) se zřetelnou závislostí na počtu vykouřených cigaret.

U kouřících žen jsou ve folikulární tekutině vyšší hodnoty kadmia, jehož významným zdrojem je tabák. Ve srovnání se zahraničními pacientkami jsou v ČR hodnoty reziduí kadmia ve folikulární tekutině asi 7 krát nižší.

Aktivní kuřačky měly v průměru trojnásobně a pasivní kuřačky dvojnásobně vyšší hodnoty adduktů BaP-DNA v buňkách membrana granulosa, aspirovaných spolu s folikulární tekutinou, než nekouřící pacientky. Jde o důkaz, že do folikulární tekutiny pronikají i PAU.

Ve folikulární tekutině je možno stanovovat i některé nutrienty: dosud byly vyšetřeny zinek, železo, kyselina askorbová.

Práce vznikla za podpory grantu IGA MZ ČR č. 4078–3 a programu PHARE

*I. Crha, D. Hrubá** (I. gynekologicko-porodnická klinika, Fakultní porodnice Brno, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně,*Ústav preventivního lékařství Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Ovlivňuje kouření plodnost žen?**

V roce 1998 Augood v meta-analýze 12 studií prokázal zvýšení relativního rizika neplodnosti u kuřaček (OR=1,6). V experimentálních i klinických studiích byl prokázán toxický vliv cigaretového kouře na oocyty i folikulární buňky, neboť do ovariálních tkání a folikulární tekutiny prokazatelně pronikají nikotin, polycyklické aromatické uhlovodíky i kadmium. Výsledkem je poškození DNA oocytů a ovariální steroidogeneze. Ke klinickým projevům patří snížení ovariální rezervy, poruchy menstruačního cyklu a neplodnost. Cigaretový kouř zpomaluje časný vývoj embrya a poškozuje blastocystu, což vede k poruše implantace a preklinickým potratům. Nikotin působí na motilitu vejcovodu a transport embrya a výsledkem je zvýšené riziko ektopické gravidity. Cigaretový kouř mění reakci endometria na ovariální steroidy, koncentrace nikotinu v nitroděložním sekretu je až 10x vyšší než v plasmě, což ztěžuje implantaci. Kouření poškozuje vývoj těhotenství, charakteristická je nízká porodní hmotnost plodu (fetální tabákový syndrom). Nepříznivý vliv cigaretového kouře byl popsán i při léčbě neplodnosti metodou in vitro fertilizace (IVF). Hughes v meta-analýze prokázal výrazné zhoršení fertilizace oocytů kuřaček (OR=0,57). Nepříznivý vliv na výsledky léčby má také kouření mužů.

Ve vlastních studiích jsme sledovali vliv kuřáckého chování residuí kadmia ve folikulární tekutině na výsledky léčby neplodnosti metodou IVF. Kouření významně zhoršovalo výsledky léčby a jeho vliv byl závislý na délce expozice a počtu vykouřených cigaret. Koncentrace kadmia ve folikulární tekutině byly nízké a nesouvisely s kuřáckým chováním a dosažením těhotenství. Partneri žen těhotných po IVF byli významně méně často kuřáci než partneri žen, které po léčbě neotěhotněly.

Kouření je významným faktorem neplodnosti žen i mužů, zhoršuje výsledky léčby neplodnosti a významně se podílí na těhotenských patologiích. Cigaretový kouř je nejrozšířenější reprodukční škodlivinou.

Studie byla řešena s podporou grantu IGA MZ ČR Č. 4078–3 a programu PHARE.

J. Šmarda (Katedra genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Onkogen *v-myb* a možnosti jeho suprese.**

Onkogen *v-myb* byl původně popsán jako vlastní příčina fatální monoblastické leukémie vyvolané virem ptáčích myeloblastózy (AMV) u kuřat. Podobně jako u dalších akutně transformujících retrovirů se předpokládá, že AMV vznikl rekombinací genomu replikačně kompetentního retroviru a sekvencemi buněčného původu. Při tomto procesu byl gen *c-myb* ve zkrácené podobě, zvaný *v-myb*, přenesen do sekvence retroviru a stal se jeho stálou součástí. Protein *v-Myb* je ve srovnání s proteinem *c-Myb* zkrácen na obou koncích, takže jeho molekulová hmotnost je zhruba o jednu třetinu snížena. Zkrácený protein *c-Myb* se tímto mění na onkoprotein *v-Myb*, který účinně transformuje myelomonocytické buňky. Proteiny *v-Myb* a *c-Myb* se svými N-koncovými doménami vážou na specifické nukleotidové sekvence DNA a regulují transkripci svých cílových genů, o kterých se soudí, že se účastní regulace krvetvorby. Buňky transformované AMV svým vzhledem připomínají monoblasty, které jsou naprogramovány k diferenciaci na makrofágy. Tuto diferenciací dráhu lze u monoblastů transformovaných *v-myb* obnovit působením některých induktorů typizovaných forbolovým esterem TPA, a to i přes pokračující přítomnost proteinu *v-Myb* v buňkách. Tato látka, která patří mezi tzv. nádorové promotory, vyvolává diferenciaci řady leukemických buněčných leukémií. Její vysoká toxicita však znemožňuje úvahy o případném klinickém využití při diferenciací terapiích leukémií.

Abychom blíže prozkoumali mechanismy řídící procesy diferenciaci a proliferace v leukemických buňkách a zároveň se pokusili nalézt podmínky, při kterých dochází k potlačení transformačního účinku onkogenu *v-myb*, prováděli jsme postupně cílené změny exprese určitých genů v linii ptáčích monoblastů transformovaných onkogenem *v-myb* (BM2) a zkoumali, jaké fenotypové změny těmito zásahy v buňkách vyvoláme. Jako první jsme v buňkách BM2 stimulovali

expresi genu *c-myb*, a to proto, že buňky transformované *v-myb* endogenní *c-myb* nikdy neexprimují. K tomu nás motivovala potřeba zjistit, zda je transformační účinek onkogenu *v-myb* podmíněn absencí proteinu *c-Myb* v buňkách. Naše výsledky však prokázaly, že exprese *c-myb* je kompatibilní s transformací proteinem *v-Myb*, a že *v-Myb* nevypíná expresi *c-myb*. Naopak, onkoprotein *v-Myb* může patrně transformovat pouze ty buňky, ve kterých došlo k vypnutí exprese *c-myb* v důsledku jejich přirozené diferenciaci.

Dalšími geny, jejichž expresi jsme v buňkách cíleně stimulovali, byly geny kódující receptory pro retinoidy. V buňkách BM2 jsme postupně exprimovali cDNA kódující lidský receptor (pro kyselinu retinovou (RAR α), receptor (pro retinoid X (RXR)) a receptor (pro retinoid X (RXR β)). Ve všech případech jsme prokázali, že aktivované retinoidové receptory tlumí růst buněk BM2 ve fázi G₁ buněčného cyklu a stimulují jejich diferenciaci do podoby adherentních buněk podobných makrofágům. Zatímco indukce diferenciaci buněk BM2 retinoidovými receptory je doprovázena zřetelným snížením transkripčně aktivační schopnosti onkoproteinu *v-Myb*, zpomalení proliferace nastává i za podmínek, při kterých si protein *v-Myb* svou transkripčně aktivační schopnost uchovává. Z toho usuzujeme, že proteiny regulace proliferace a diferenciaci jsou vzájemně nezávislé.

V buňkách BM2 jsme rovněž exprimovali geny *fos* a *jun*, jejichž produkty tvoří transkripční faktor AP-1. Naše výsledky ukazují, že exprese genu *fos* a genu *jun* způsobuje částečnou inhibici růstu a dočasnou diferenciaci buněk BM2. Při několikadenní indukci exprese těchto genů však dochází k dediferenciaci buněk BM2 a obnovení jejich původní rychlosti proliferace. Z toho usuzujeme, že produkty genů *fos* a *jun* jsou zapojeny do řízení diferenciaci a proliferace buněk BM2, ale pro dosažení nevratné diferenciaci do konečného stádia makrofágů, je potřebná přítomnost dalších proteinů. Při těchto experimentech jsme nadto zjistili, že protein Jun významně zvyšuje citlivost buněk BM2 na kyselinu retinovou. Toto zajímavé pozorování lze vysvětlit např. tím, že protein Jun má schopnost indukovat expresi endogenního receptoru pro kyselinu retinovou v buňkách BM2. Na potvrzení této hypotézy se v současné době pracuje.

Sponzorováno grantem č. 312/98/0679 GAČR.

J. Šmardová (Oddělení buněčné a molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav v Brně): **Funkční analýza nádorového supresoru p53.**

Změna ve struktuře genu pro nádorový supresor p53 je nejčastější genetickou změnou detekovanou v buňkách lidských nádorů. Pro určení patologických změn p53 v klinickém materiálu se používají: imunohistochemické metody, molekulární analýzy (sekvenování DNA, SSCP, apod.) a funkční metody. Funkční testy měří biologické vlastnosti proteinu p53, např. jeho schopnost vyvolávat apoptózu jako následek poškození DNA, blokovat fázi G₁ buněčného

cyklu, anebo měří transaktivační schopnost proteinu p53, která má přímou souvislost s jeho nádorově supresivní funkcí.

Jednou z metod založených na měření transaktivačních schopností proteinu p53 je funkční analýza separovaných alel v kvasinkách – FASAY (functional analysis of separated alleles in yeast) (1). V této metodě je centrální část genu p53 odvozená RT-PCR z mRNA izolované z nádorových buněk vnesena do kvasinkových buněk kmene yIG397, jejichž fenotyp je Ade. Tyto buňky obsahují reportérský gen ADE2 s předřazeným minimálním promotorem a regulační sekvencí RGC, která je specificky rozpoznávána proteinem p53. Kvasinky rostoucí na plotnách s nízkou koncentrací adeninu tvoří buď velké bílé kolonie, jestliže je reportér ADE2 aktivován funkčním proteinem p53, nebo malé červené kolonie, jestliže reportér aktivován není (kolonie jsou menší, protože jejich růst je limitován nízkou hladinou adeninu v médiu a červené zbarvení je způsobeno akumulací červeného produktu metabolismu adeninu).

Metodu FASAY jsme použili k určení stavu genu p53 u 44 nádorů prsu. Ve 24 případech (55%) jsme našli jen funkční alely genu p53, ve 20 případech (45%) jsme detekovali také mutované alely (procento červených kolonií bylo od 19.9 do 99.4). Tyto výsledky jsme porovnávali s výsledky rutinního imunohistochemického stanovení a zjistili jsme poměrně vysokou shodu ve výsledcích obou metod (94%) (2).

Metodou FASAY se nám podařilo zachytit zajímavý případ vzácné mutace v genu p53, která vede k záměně jedné aminokyseliny v oligomerizační doméně proteinu p53 (3). Takto pozměněný protein má pouze částečnou aktivitu, je akumulován v jádrech nádorových buněk a jeho struktura se liší od struktury jak standardního tak typicky mutovaného proteinu p53. Analýzou stavu genu p53 v periferní krvi metodou FASAY jsme potvrdili somatický původ této mutace.

(1) Flaman J.-M. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3963–3967.

(2) Šmardová J. et al. (1999) Neoplasma 46: 384–389.

(3) Šmardová J. et al. (2000) Tumor Biol. – In press.

Studie byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. MN/16-3.

V. Mikeš (Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Molekulární mechanismy a regulace interakcí mezi rostlinou a prostředím.**

Při interakci s patogenem se uplatňuje pasivní a aktivní ochranná bariéra rostliny. Pasivní bariéra je tvořena kutikulou, sekundárními metabolity a obrannými proteiny. Aktivní obranná bariéra je spočívá v interakci produktů obranných genů rostliny a patogenu. Produkty obranných genů patogenu (geny avirulence) jsou elicitory vyvolávající obrannou (hypersensitivní) reakci rostliny. Elicitory se vážou na specifické receptory na povrchu plasmatické membrány rostliny (geny rezistence). Tato interakce se projeví sledem rychlých reakcí vedoucích až k apoptóze, to je odumření buněk v okolí ataku, nebo dokonce

celých orgánů rostliny. Tyto reakce vedou často k získání nespecifické či specifické systémové rezistence (obdoba imunity). Sekvence těchto signálů tvoří složitou kombinatorickou síť, jejíž struktura je dnes předmětem intenzivního výzkumu. Tato síť zahrnuje G-proteiny, kalcium-dependentní proteinkinázy a mitogen-activated proteinkinázy (MAPK).

Interakce mezi rostlinou a patogenem je dokumentována na příkladu bílkovinných elicitorů houby *Phytophthora* parazitující na řadě hospodářsky významných rostlin. Tyto elicitory tvoří řadu vysoce homologních bílkovin, ovšem s různou biologickou účinností. Podařilo se prokázat, že tyto látky fungují jako přenašeče sterolů. Byla stanovena 3-D struktura některých elicitorů se steroidem. Pomocí metody bodové mutagenese bylo zkonstruováno několik mutantů s různou schopností vázat steroly a vyvolávat hypersenzitivní reakci. Ukazuje se, že aktivní formou vázající se na povrchový receptor je zřejmě komplex elicitor-sterol.

R. Janisch (Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Nečasova koncepce výzkumu buňky na Biologickém ústavu.**

Již v době, kdy profesor Nečas přišel na Biologický ústav jako student byla výzkumná témata profilována pod vedení prof. Herčíka především na oblast radiobiologie, výzkum bakteriofága a také molekulární biologie. Profesor Nečas, přednosta Biologického ústavu LFMU v Brně v letech 1961–92, od počátku své vědecko-výzkumné práce experimentoval s kvasinkami a jejich protoplasty, které sloužily jako experimentální model pro studium morfogenetických procesů buňky v rámci fyziologické a především reparativní morfogeneze buněčných struktur. Základní idea byla využít různých způsobů poškození buňky a reparace jejich struktur a funkce ke studiu zákonitostí morfogeneze. Od převzetí vedení ústavu prof. Nečasem veškerý experimentální výzkum buňky na Biologickém ústavu nese jeho charakteristické rysy a rukopis jeho myšlení. Především je to široké spektrum modelů, na které se výzkum postupně rozšiřoval. Kromě kvasinek začaly být využívány další jednobuněčné modely – protozoa, řasy a houby, později také živočišné buňky ve tkáňových kulturách.

Dalším výrazným rysem výzkumné strategie prof. Nečase byl prozíravý výběr aktuální a perspektivní tematiky, v níž docházelo k postupné specializaci. Počáteční široce pojatá koncepce regenerace buňky se zúžila na výzkum úlohy povrchů v regeneraci a morfogenezi a později vyústila ve studium funkce cytoskeletu v základních životních procesech buňky.

Prof. Nečas dokázal i v obtížných podmínkách optimálně zajistit experimentální výzkum organizačně, přiměřeným přístrojovým vybavením, zavedením týmové spolupráce vnitroustavní i v širším měřítku tehdejšího Státního plánu badatelského výzkumu. Velmi rozmanitým se stalo také spektrum metodických přístupů. Původní skromné vybavení laboratoří monokulárními mikroskopy Meopta bylo postupně doplněno mikroskopy elektronovými

transmisními i skanovacím, ultramikrotomy, aparaturou freeze-etching, fluorescenčními mikroskopy a zavedením techniky nepřímé imunofluorescence.

V 90. letech prof. Nečas iniciuje další nový perspektivní výzkumný směr v experimentální buněčné biologii - studium buněčného stresu, reakce cytoskeletu a schopnosti buňky stresu čelit za účasti stresových proteinů. Vedle již zmíněných modelů jednobuněčných organismů byla při ústavu vybudována laboratoř tkáňových kultur poskytující vynikající příležitost právě pro studium této problematiky. Ve spolupráci s řadou dalších pracovišť např. Biofyzikálním ústavem LF MU, Biofyzikálním ústavem AV ČR, Ústavem přístrojové techniky, se nyní na buněčných kulturách jako stresové faktory zkoušejí ultrazvuk, UV záření, gama záření, vliv mechanického poškození buněk mikromanipulací mechanickými mikromanipulačními nástroji, mikrurgickými zásahy pulsním laserem a optickou pinzetou a úlohy cytoskeletu v apoptóze. Ve spolupráci s Laboratoří molekulární embryologie AV ČR na MZLU a jejich konfokálního laserového mikroskopu se daří s větší přesností poznávat nové podrobnosti o stavbě složitého systému cytoskeletu normálních i poškozených buněk.

Při formování koncepce výzkumu Biologického ústavu výrazným způsobem přispěly některé velmi praktické zásady a organizační ustanovení, které prof. Nečas prosazoval např. každý den provést alespoň jeden malý experiment, pravidelné pracovní porady, vzdělávací semináře a zavedení centrálních ústavních služeb. Za mimořádnou lze považovat schopnost Prof. Nečase pomocí systémového přístupu detailní poznatky správně interpretovat v nejširších souvislostech a přiměřeně zobecňovat.

M. Gabriel (Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno): **Oldřich Nečas and the history of yeast model on Department of Biology of the MU Faculty of Medicine Brno.**

Oldřich Nečas started his experimental work with yeasts during his studies in the Medical Faculty in Brno. As a volunteer student in Department of Biology he was forced to repeat experiments with a recovery of viable yeast cells from protein crystals – very popular theme in the Lysenko's era of biology. He luckily did not confirmed such possibility, however, yeast cells attracted him so that they remained models for his research for more than a half of century. His first observations dealt with the regeneration potency of cytoplasmic droplets released from pressed yeast cells. Later on, he described a method how to prepare yeast protoplasts, cells devoid off the cell wall, on a large scale. One of the most important findings made by Nečas was that these protoplasts are capable of reversion to normal cells. This opened way for the wide application of the yeast protoplasts in studies of cell wall regeneration, ultrastructure, role of the cell wall in morphogenesis, membrane transport, immunology, membrane biophysics, somatic hybridisation, genetic engineering, etc. A group of medical students always surrounded Professor Nečas in the

laboratory and several of them became his close collaborators and followers, working on yeast morphogenesis, yeast mating, role of the cytoskeleton, stress factors, etc. Yeast protoplasts became a topic of many international conferences and symposia, two of them took place in Brno.

S. Jantová (Katedra biochémie a mikrobiológie Chemickotechnologickej fakulty Slovenskej technickej univerzity v Bratislave, Slovenská republika): **Stratégia vyhľadávania nových látok účinných proti mikróbnym a nádorovým bunkám.**

Onkologické ochorenia spolu s infekčnými chorobami predstavujú pre človeka život ohrozujúce riziko. Rozvoj liečiv používaných na liečbu týchto ochorení je sprevádzaný s neustálym rozvojom rezistencie. A práve rezistencia je jednou z hnacích síl, ktoré stále nútia vyhľadávať nové antimikróbne a protinádorovo účinné látky. V rámci stratégie vyhľadávania nových antimikróbných látok sa výskum sústreďuje na látky účinné najmä na ľudské problémové mikroorganizmy a rezistentné patogénne kmene vyvolávajúce bakteriálne a mykotické infekcie. V súčasnosti existujú dva hlavné strategické prístupy k získaniu lepších a účinných látok: zlepšenie klasických antimikróbných látok ich terčovaním na rezistentné faktory a vývoj nových účinných látok s novými mechanizmami účinku. Vyhľadávanie je zamerané na vhodne kombinácie klasických antimikróbných látok, modelovanie a syntézu nových chemických štruktúr s využitím aj kombinatorickej chémie, nové inhibítory β -laktamáz, inhibítory faktorov virulencie a bakteriálnych efluxných pump a na látky zasahujúce do genómu a génovej expresie.

Recentný výskum vyhľadávania nových protinádorových látok je charakterizovaný dvomi hlavnými strategickými prístupmi: zlepšenie farmakologických a terapeutických vlastností klasických cytostatík a vývoj nových účinných látok zasahujúcich do bunkovej proliferácie, signálnych dráh, regulačných procesov a procesov metastazovania. Vyhľadávanie je najmä zamerané na inhibítory bunkového delenia, inhibítory syntézy makromolekulových látok (nukleových kyselín a proteínov), inhibítory tymidylátsyntetázy, dihydrofolátreduktázy, proteínkináz (A, C, tyrozínkinázy), topoizomeráz (I, II) a proteínáz, inhibítory rastových a regulačných faktorov (EGF, membránových receptorov resp. regulačných peptidov, indukto apoptózy a inhibítory metastatickej kaskády).

Dnes sa bežne a rutinne používa na vyhľadávanie nových potenciálnych cytostatík primárny screening in vitro, pri ktorom sa rôznymi metódami sleduje citlivosť nádorových buniek rastúcich in vitro na cytotoxické látky. Screening umožňuje hodnotenie väčšieho množstva látok a rýchle vyraduje inaktívne zlúčeniny; umožňuje sledovanie vzťahu medzi štruktúrou a cytotoxickou aktivitou a zároveň umožňuje štúdium mechanizmu účinku. Na detekciu cytotoxicity sa používajú rôzne koncové body, napr. sa sleduje vitalita buniek, bunková

morfológia, proliferácia buniek, poškodenie membrány, bunkový metabolizmus a genóm bunky. Na sledovanie vitality a cytotoxicity sa používajú krátkodobé testy (vitálne farbenie, uvoľňovanie oxidovanej formy značeného chrómu z bunky a metabolické testy) – sú to testy na okamžitú alebo krátkodobú odpoveď bunky. Druhou skupinou testov sú dlhodobé testy. Používajú sa na sledovanie proliferácie alebo metabolickej aktivity, pričom bunky sú látkou ovplyvňované krátko alebo počas celého experimentu. V súčasnej dobe majú pri sledovaní vitality a cytotoxicity buniek veľké využitie mikrotesty v mikrotitračných platničkách (MTT test, NR test, KB test, uridínový test). Ako testovacie modely sa používajú rôzne bunkové línie izolované z nádorov zvierat a ľudí.

Vlastnosti potenciálnej protinádorovej látky môžu byť charakterizované rôznymi parametrami napr. antiproliferačnou aktivitou, štrukturálnou alebo funkčnou zmenou cytoplazmovej membrány, zmenou v obsahu bunkových makromolekúl, zmenou bunkového metabolizmu. Ďalšími parametrami charakterizujúcimi protinádorový účinok látok je sledovanie zmien bunkového cyklu, indukcia apoptózy, enzýmová aktivita (tymidylátsyntetázy, dihydrofolátreduktázy, topoizomeráz, proteínkináz, proteináz), vplyv na cytoskelet bunky a ostatné organely, na signálne dráhy, kontrolné a regulačné procesy, genovú expresiu a represiu atď.

V rámci primárneho screeningu antimikróbnej aktivity sme sledovali účinok 154 synteticky pripravených látok predstavujúcich sedem štrukturálne rôznych skupín na rôznych zbierkových kmeňoch baktérií, kvasiniek a vláknitých húb. Aktivita sa sledovala difúznymi resp. dilučnými metódami a miera účinku sa charakterizovala priemerom inhibičnej zóny resp. hodnotami IC_{50} a MIC. Osem najúčinnějších derivátov sa doporučilo ako potenciálne antimikróbne látky.

V rámci nášho primárneho screeningu protinádorovo účinných látok *in vitro* sa sledoval cytotoxický účinok 215 synteticky pripravených chemických látok deviatich štrukturálnych sérií na ľudskej nádorovej bunkovej línii HeLa, pochádzajúcich z karcinómu krčka maternice. Účinok látok sa hodnotil po ich 48 h pôsobení na asynchrónne rastúcu bunkovú populáciu na základe množstva celkových bunkových proteínov stanovených Lowryho metódou a charakterizoval sa hodnotami IC_{50} . Cytotoxicita najúčinnějších derivátov korelovala s cisplatinou. Ďalej sme pri účinných látkach sledovali ich antiproliferačnú aktivitu *in vitro* na rôznych nádorových bunkových líniiach a mechanizmus účinku. Na základe získaných výsledkov sme osem nových chemických látok doporučili ako potenciálne cytostatiká na ďalšie štúdium.

B. Ravčuková, J. Kadlecová, P. Kroupová, A. Veselá, I. Valášková, M. Vojtíšková, R. Gaillyová (Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice): **Molekulární genetiká neurofibromatosa 1.**

Neurofibromatosa typu 1 (von Recklinghausen) je autosomálně dominantní onemocnění charakterisované četnými neurofibromy, skvrnami cafe au lait, Lisch

noduly oční duhovky, predispozicí k tumorům nervového systému, s různou klinickou expresivitou. Frekvence výskytu je 1 na 3000. Gen NF1 leží v oblasti 17q11.2. DNA (350kb) kóduje mRNA o velikosti 11–13kb, tvořenou 60 exony. Exprimuje se v různých tkáních. Protein neurofibromin obsahuje středovou doménu homologní k GTPáse aktivacímu proteinu a snižuje aktivitu ras onkogenu.

Pro určení přenosu patologické alely v rodinách užíváme 5 mikrosatelitních polymorfních míst NF1 genu: RsaI štěpné místo v exonu 5, BsaBI štěpné místo v intronu 19, GXAu (AAAT)_n a IVS2TG v intronu 27b a IVS38GT v intronu 38. Provedená segregační analýza byla informativní v 80% vyšetřených rodin.

Gen NF1 vykazuje jednu z nejvyšších mutačních rychlostí s výskytem až 50% mutací de novo. Vysvětlení tohoto jevu můžeme najít ve velikosti genu, existenci homologních pseudogenů nebo chyběním mutační hot spot oblasti. Byly zavedeny vyhledávací metody mutací – DGGE, SSCP – pro exony 37, 31, 29, 28, 12, a 6 genu NF1. Nalezené mutace byly následně sekvenovány a identifikovány: v exonu 31 již dříve popsaná mutace C5839T a v exonu 37 rovněž již dříve popsaná mutace 6791 insA.

Většina všech mutací (60–70%) NF1 genu (NNFF Consortium 1999) má za následek zkrácený protein. K analýze mutací změněného transkriptu se využívá PTT (1) nebo cDNA SSCP analýza (2), kdy změna DNA transkriptu je následně upřesněna sekvenováním.

V naší laboratoři je v současné době zaváděna cDNA SSCP analýza, neboť je možno detekovat nejen zkrácený DNA transkript, ale i bodové změny na DNA (substituce, delece a inserce), které nemění velikost proteinu. Tím se zvyšuje účinnost detekce mutací nad 70% jak je tomu při použití PTT metody.

Naším prvním výsledkem je záchyt změny mobility pomocí cDNA SSCP u pacienta s dg. NF1 v oblasti exonu 28–31. Poloha i typ mutace budou následně potvrzeny na sekvenační úrovni.

(1) Park V. M. and Pivnick E. M (1998) J. Med. Genet. 35: 813–820.

(2) Ars E. et al. (2000) Human Molecular Genetics, 9/ 2: 237–247.

P. Novák, L. Novák¹, G. Schaubberger², (Department of Animal Hygiene, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, ¹Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, ²Institut für Medizinische Physik und Biostatistik Veterinärmedizinische Universität Wien): **The evaluation of the stable climate influence on farm animals.**

Housing environment systems, health and welfare concerns relate not only to the pigs but also to the producers. Environmental condition, especially air temperature has a direct effect on the animal's energy expenditure and voluntary feed intake and therefore on the production performance of farm animals. Gases, dusts, microorganisms can be produced not only from the animals, but also from

manure decomposition, feeds and building materials that are generally present in and around animals. Acceptable air quality can usually be achieved with proper ventilation and regular sanitation.

The objective of presented work was evaluation of selected microclimatic factors (air temperature, humidity and movement, carbon dioxide concentration, microbiological contamination and ventilation) during all macroclimatic conditions (scaled in steps: 1-frosty winter, 2-moderate winter, 3-spring-autumn, 4-moderate summer, 5-hot summer).

We proved the high degree of correlation between the deviation of the indoor climate outside the range of optimal values, and the lowered body mass increase during the fattening period. The decrease in body mass growth was accompanied with higher mortality rate and higher number of emergency slaughtering in the herds. Especially the period of sudden changes in the outdoor climate, heavily influenced the ventilation of stables, and provoked remarkable worsening of the health status in the housed pigs.

Tab.1.
Pig loses during various macroclimatic situations

Macroclimatic conditions	1	2	3	4	5
Average total number of fattening pigs	994	995	950	970	1000
Number of emergency slaughtering pigs	30	20	9	39	50
Number of death pigs	29	24	9	11	21
Total pig loses	59	54	18	50	71
% of total count	5,9	5,4	1,9	5,1	7,1

Tab.2.
Evaluation of microclimatic factors in stable for fattening pigs

Classification	Thermal comfort					Carbon dioxide concentration					Microbiological air contamination					Evaluation of stable ventilation				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Macroclimate	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Optimum	0	15	45	67	23	5	10	12	76	27	0	15	15	30	45	0	5	10	75	75
Tolerance	15	65	45	33	53	69	67	64	24	55	85	75	65	60	45	70	70	65	25	25
Stress	85	20	10	0	24	26	23	24	0	18	15	10	20	10	10	30	25	25	0	0

Animal environments are complex and frequently comprise several stressors simultaneously.

Therefore it is very important for evaluation of these complex relations to use appropriate mathematical model, which will include the climatic conditions, the feeding, together with the maintenance and the health care.

This work was supported by Österreichische Ost- und Südosteuropa-Institut Wien within the project "Model of the animal performance including nutrition, animal care and health status as well as the ecological implication due to the animal-environment interaction inside livestock buildings" and Research plan FVHE VFU Brno No.J16/98: 162700004.

L. Novák (Faculty of Medicine, Masaryk University Brno): **Modeling the growth of homeotherms and the perspectives of its use in the regulation of the nourishment and the optimization of the environmental conditions.**

The body mass growth in homeotherms between the births and the time of the body mass maturity exhibits an "S" shape form. The shape of the growth curve is described by the growth function of the logistic type (Robertson 1907, Ostwald 1908) or of the exponential one (Gompertz 1825) introduced in biology on suggestions of Wright (1926). The imperfection of this classical approach to describe the growth curve without respect to physiological background Ludwig (1929) considered as an example of the pure mathematical exercise. However, the classical growth functions are widely used and further developed in the biological research up to the present day (Bertalanfy 1941, Brody 1945, Richards 1959, Parks 1970, Taylor 1980, Knížetová et al. 1991, Hyánek and Hyánková 1995, Hurwitz and Talpaz 1997, Emmans 1997).

The "Self-regulating Growth Model"(SGM) is based on the physiological principle of conversion mass and energy of the feed to the mass and energy of body substance (Novák 1996). The model was approved in experiments with laboratory rats (Novák and Pípalová 1996) and broilers (Novák et al. 1997, Novák and Zeman 1997). The SGM calculates the growth curve of the organism independently on the growth of the raised individual but directly from the physical data on the nourishment and the environmental conditions, in which the modeled animal lives. The biology of the individual is characterized by the average body mass of considered species, breed and sex. This value is usually called as the asymptotic or genetic limited body mass.

The paper extends the physiological principles of the "Self-regulating Growth Model" on the biological characteristic of the genotype's expression of total proteins, lipids, glycidic, minerals and water content in the final phenotype body mass of the individual. The developed "Biological Model of the Growth" (BIOM) automatically differentiates the body mass increase as well as the body mass growth of the modeled individual into the basic components of body mass, eg.

proteins, lipides, glycidos and minerals. This fact broadens the possible use of the BIOM for the study of the body mass composition in the direct relation to the amount of proteins, lipids and glycidos in the feed served under defined conditions of the environment, the level of maintenance and medical care paid to raised animals.

Sestavil: S. Čech

