

ZPRÁVY
ZPRÁVA O ČINNOSTI BRNĚNSKÉ POBOČKY
ČESKOSLOVENSKÉ BIOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI
V ROCE 2001

Členská schůze 18. ledna 2001

(Schůze konaná ve spolupráci s Českou společností pro elektronovou mikroskopii a Biologickým ústavem Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně)

R. Reichelt (Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, SRN): **Possibilities and Prospects of Field Emission Scanning Electron Microscopy and Scanning Force Microscopy.**

Členská schůze 24. ledna 2001

(Schůze konaná ve spolupráci s Českou anatomickou společností, Anatomickým ústavem Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Hlavním výborem Čs. biologické společnosti v Brně u příležitosti 60. narozenin prof. MUDr. Libora Páče, CSc.)

M. Dokládal (Anatomický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Profesor Libor Páč šedesátníkem.**

P. Dubový, I. Klusáková, I. Svíženská, N. Ghalib, R. Jančálek (Anatomický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Rozdíly ve složení extracelulární matrix dorzálního a ventrálního kořene spinálního nervu laboratorního potkana.**

L. Horáčková, L. Vargová (Anatomický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Vojenští chirurgové za napoleonských válek.**

Členská schůze 28. února 2001

(Schůze konaná ve spolupráci s Českou anatomickou společností a Anatomickým ústavem Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně u příležitosti 65. narozenin doc. MUDr. Antonína Zechmeistera, CSc.)

L. Páč (Anatomický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Doc. MUDr. A. Zechmeister, CSc., pětšedesátníkem.**

P. Matonoha (Anatomický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Současné poznatky o aterosklerotické mineralizaci tepen a některé terapeutické trendy.**

D. Pernicová (Anatomický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Imunohistochemický průkaz aktinu v hladkých svalových buňkách vývodů mléčné žlázy.**

Členská schůze 28. března 2001

Tomáš Komprda (Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně): **Současný stav poznatků o bovinní spongiformní encefalopatii.**

Členská schůze 11. dubna 2001

Martin Vácha (Katedra srovnávací fyziologie živočichů a obecné zoologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Kompasová orientace – magnetický smysl živočichů.**

Členská schůze 25. dubna 2001

J. Nováková (Farmakologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Úloha serotoninergního systému v průběhu experimentálních látkových závislostí.**

J. Vinklerová (Farmakologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Behaviorální a imunologické účinky kanabinergik a jejich interakce s vybranými látkami.**

Členská schůze 2. května 2001

J. Vácha (Ústav patologické fyziologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Genetika multifaktoriálních nemocí.**

A. Vašků (Ústav patologické fyziologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Genetika nemocí kardiovaskulárního systému.**

M. Jurajda (Ústav patologické fyziologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Genetika invazivního růstu.**

L. Izakovičová-Hollá (Ústav patologické fyziologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Genetika atopických stavů.**

K. Kaňková (Ústav patologické fyziologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Genetika pozdních komplikací diabetu.**

Členská schůze 23. května 2001

P. Dvořák (Laboratoř molekulární embryologie Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity a Ústavu živočišné fyziologie Akademie věd ČR v Brně): **Deregulace FGF-2 a FGFR-3 u chronické myeloidní leukemie.**

M. Ešner (Laboratoř molekulární embryologie Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity a Ústavu živočišné fyziologie Akademie věd ČR v Brně): **Interakce mezi FGF-2 a FGFR-1 regulují diferenciaci viscerálního entodermu.**

A. Hampl (Laboratoř molekulární embryologie Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity a Ústavu živočišné fyziologie Akademie věd ČR v Brně): **Interakce regulátoru buněčného cyklu během vývoje žlutého tělíska.**

H. Preclíková (Laboratoř molekulární embryologie Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity a Ústavu živočišné fyziologie Akademie věd ČR v Brně): **Úloha inhibitoru cyklin-dependentních kináz p27 v diferenciaci buněk.**

Členská schůze 17. října 2001

A. Oltová (Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice): **Onkogenetická problematika na Oddělení lékařské genetiky FN Brno.**

*J. Sobotka, V. Holubová, P. Řehořková, A. Oltová, P. Kuglík*¹ (Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice, ¹Katedra genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Amplifikace TEL/AML1 fúzního genu u dětských pacientů s ALL.**

V. Holubová, J. Sobotka, A. Fišerová², P. Kuglík¹, A. Oltová, R. Hájek³ (Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice, ¹Katedra genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně, ²Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Brno – Bohunice; ³Interní hematologická klinika Fakultní nemocnice Brno – Bohunice): **Vyšetření delece 13q14 metodou FISH u pacientů s mnohočetným myelomem.**

P. Kuglík¹, M. Procházková, V. Holubová (¹Katedra genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně, Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice): **Cyto genetické změny u neuroblastomu a jejich význam pro diagnostiku a léčbu.**

B. Ravčuková, J. Kadlecová, I. Valášková, A. Kratochvílová, R. Gaillyová, J. Štěrba^a (Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice, ^a Oddělení dětské onkologie Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice): **Detekce exprese genu pro tyrosin hydroxylázu u dětských pacientů s neuroblastomem.**

J. Štěrba^a, P. Múdry^a, B. Ravčuková, P. Kuglík¹ (^aOddělení dětské onkologie Odd. Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice, Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice, ¹Katedra genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Klinický význam molekulárně genetických a molekulárně cytogenetických markerů pro léčbu dětí s neuroblastomy.**

Členská schůze 21. listopadu 2001

B. Rittich (Katedra mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Vlastnosti a využití imobilizovaných enzymů v molekulární diagnostice mikroorganismů.**

A. Španová (Katedra mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Eliminace vlivu inhibitorů při stanovení vybraných mikroorganismů v potravinách pomocí PCR.**

Členská schůze 28. listopadu 2001

(Schůze konaná ve spolupráci s Českou cyto- a histochemickou společností)

E. Matalová, I. Míšek (Laboratoř genetiky a embryologie Ústavu živočišné fyziologie Akademie věd ČR v Brně): **Koncové značení zlomu DNA v histologických řezech.**

P. Matulová, K. Witter, I. Míšek (Laboratoř genetiky a embryologie Ústavu živočišné fyziologie Akademie věd ČR v Brně): **Imunohistochemická detekce u dlouhodobě fixovaného sbírkového materiálu.**

*M. Sedláčková, J. Šiastná, J. Žáková** (Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, *I. gynekologicko-porodnická klinika Fakultní nemocnice Brno, prac. Fakultní porodnice): **Cytochemická detekce zdrojů peroxidu vodíku v kultivačním systému v průběhu fertilizace in vitro u člověka.**

P. Dubový, I. Šviženská, I. Klusáková (Oddělení neuroanatomie, Anatomický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **K problému kvantitativního vyhodnocení imunofluorescenční reakce – aplikace na struktury PNS.**

*Z. Lukáš, J. Maňák** (Imunohistochemické centrum, Patologicko-anatomický ústav Fakultní nemocnice Brno, prac. Bohunice, *Klinika anesteziologie a resuscitace, Fakultní nemocnice Olomouc): **Regenerace svalových vláken v průběhu myopatie u kriticky nemocných pacientů.**

Členská schůze 5. prosince 2001

J. Dvořák (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Využití genetických markerů ve šlechtění hospodářských zvířat.**

L. Putnová (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Význam PRLR a OPN genu ve šlechtění prasat.**

O. Kolaříková (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Gen ESR a jeho význam ve šlechtění prasat.**

P. Horák (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Molekulárně genetická charakteristika genové rezervy – Přestické černostrakaté prase.**

V. Dvořák (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Genetika zbarvení u prasat.**

A. Knoll (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Metody určování rodičovství zvířat.**

T. Urban (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Využití multimediální technologie ve výuce genetiky –“Virtuální svět genetiky”.**

Členská schůze 5. prosince 2001

(Schůze konaná ve spolupráci s Ústavem anatomie, histologie a embryologie Fakulty veterinárního lékařství Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, Ústavem živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR v Brně a Českou anatomickou společností)

P. T. Sharpe (Department of Craniofacial Development, GKT Dental Institute of King's College London, UK): **Genes, Stem Cells and Teeth:Tissue Engineering of Human Teeth.**

ABSTRACTS

AUTOREFERÁTY PŘEDNÁŠEK (pokud byly autory dodány redakci)

P. Dubový, I. Klusáková, I. Sviženská, N. Ghalib, R. Jančálek (Oddělení neuroanatomie, Anatomický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Rozdíly ve složení extracelulární matrix dorzálního a ventrálního kořene spinálního nervu laboratorního potkana.**

Schwannovy buňky představují gliové elementy, které mají zásadní význam pro vývoj, zachování normální funkce a regeneraci periferní nervové soustavy (PNS). Existuje několik typů Schwannových buněk odvozujících se od stejných prekurzorových buněk, které vycestovaly z neurální lišty. V periferním nervu to jsou myelinizující a nemyelinizující Schwannovy buňky, těla neuronů PNS jsou obalena oploštělými satelitními buňkami, nervosvalové ploténky a senzory obsahují specializované typy Schwannových buněk. Během vývoje periferního nervu se Schwannovy buňky výrazně podílejí na vytvoření endoneurální extracelulární matrix (ECM), která obklopuje jednotlivé typy nervových vláken. Dosud publikované imunohistochemické výsledky neodhalily rozdílné složení endoneurální ECM podél motorických a aferentních nervových vláken.

Autoři vypracovali postup imunofluorescenční detekce molekul endoneurální ECM, který umožnil v kombinaci s analýzou obrazu zachytit kvantitativní rozdíly v dorzálním a ventrálním kořeni spinálních nervů laboratorního potkana. Na simultánních řezech dorzálním a ventrálním kořenem lumbálních spinálních nervů dospělých laboratorních potkanů byla prokázána v dorzálním kořeni intenzivnější imunofluorescence pro tenascin, chondroitin sulfát a thrombospondin. Stejná intenzita imunofluorescence byla zjištěna v dorzálním a ventrálním kořeni po použití monoklonální primární protilátky pro identifikaci lamininu-2 a lamininu-3.

Výsledky kvantitativní imunofluorescenční detekce ukázaly, že ve složení endoneurální ECM motorických a aferentních nervových vláken dospělého laboratorního potkana existují rozdíly, které by mohly souviset s jejich rozdílnou regenerační kapacitou.

Podpořeno grantem GAČR 309/00/0407 a CEZ J07/98:141100001 MŠMT ČR.

L. Horáčková, L. Vargová (Anatomický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Vojevní chirurgové za napoleonských válek.**

Ve vojenské medicíně měla na přelomu 18.–19. století, tedy v období napoleonských válek vedoucí postavení Francie. Jednou z nejvýznamnějších postav tehdejší medicíny byl Jean Dominique Larrey (1766–1842), hlavní chirurg císařské gardy Napoleonovy armády. Zavedl tzv. létající ambulance – pohyblivé lazarety, ošetřující raněné přímo na bitevním poli. Zajištění včasné pomoci zvýšilo výrazně bojovou morálku francouzské armády. Larrey se zasloužil také o upřesnění indikací k amputacím, zdokonalil některé amputační techniky a udivoval zručností a rychlostí jejich provedení. Je známo, že např. v bitvě u Borodina v roce 1812 provedl během 24 hodin více než 200 amputací. Amputace končetin mu i s podvazy cév netrvaly déle než dvě, maximálně čtyři minuty. Rychlost operace byla v době, která neznala celkovou anestézii, naprostou nutností. Další významnou osobností napoleonské doby byl Larreyův spolupracovník, hlavní chirurg francouzské armády Pierre Francois Percy (1754–1825). Percy jako první propagoval myšlenku o uzavření smlouvy mezi bojujícími stranami, která by chránila viditelně označené válečné lazarety a považovala je za neutrální území. Ačkoliv se mu za jeho života nepodařilo ochranu zraněných prosadit, uplatnily se jeho myšlenky při vzniku Červeného kříže v roce 1864. Oba zmínění chirurgové, Larrey i Percy, se zúčastnili i slavné bitvy tří císařů u Slavkova roku 1805.

Autorky se mohly přesvědčit na vlastní oči s velkou pravděpodobností o chirurgických výkonech těchto francouzských vojenských lékařů či jejich kolegů, a to při studiu kosterních pozůstatků z hromadného hrobu ruských a francouzských vojáků z Rohlenky (katastr obce Jiříkovic). V hrobové jámě byly nalezeny kosterní pozůstatky 22 jedinců, z toho bylo 18 mužů, dvě ženy a dva nedospělí

jedinci. O tom, že šlo skutečně o hrob účastníků bitvy u Slavkova svědčí doprovodné nálezy např. ruská ikonka či knoflíky z uniforem s čísly vojenských útvarů.

K nejzajímavějším nálezům na kosterních pozůstatcích patřilo poranění prvního hrudního obratle dospělého jedince střelou o průměru 16 mm, která oddělila obratlový oblouk a uvázla v páteřním kanálu. Vzhledem k závažnosti poranění šlo bezpochyby o zranění smrtelné. Dalším nálezem typického střelného poranění byla tříštivá fraktura těla pravé stehenní kosti dospělého muže. Vzhledem k lokalizaci léze byla bezpochyby zasažena a. femoralis v místě tzv. canalis adductorius. Není pochyb o tom, že postižený krátce po úrazu vykvrácel, protože na kosti nebyly nalezeny známky hojivých procesů ani terapeutického zásahu, jímž mohla být v té době v takovém případě pouze amputace. V hrobové jámě na Rohlece byly nalezeny tři dlouhé kosti dolních končetin se zřetelnými známkami amputací. V prvním případě se jednalo o amputaci pravé stehenní kosti dospělého muže. Vzhledem k tomu, že chybí jakékoliv známky hojení, je jasné, že raněný zázrak nepřežil. V dalších dvou případech se jednalo o periferní pahýly tibíí, odhozené do jámy. Je velmi pravděpodobné, že se na provedení některé z nalezených amputací podílel sám Larrey nebo jeho kolegové, vzhledem k tomu, že po prohrané bitvě byli rakouští a ruští vojáci na ústupu a neměli čas postarat se na místě o své zraněné. Naopak francouzští lékaři měli k ošetření raněných času dostatek. Těžce ranění byli operováni a obvazováni na místě nebo byli dopravováni do ústřední nemocnice ve Šlapanicích, lehce ranění byli k definitivnímu ošetření dopraveni do Brna.

V souvislosti s bitvou u Slavkova bývají obvykle vzpomínána jména tří císařů: rakouského císaře Františka, mladého ruského cara Alexandra a vítězného francouzského císaře Napoleona, ačkoliv pro jejich mocenské zájmy umíraly na slavkovském bojišti tisíce mladých zdravých mužů. O to více je třeba vzpomenout a ocenit úlohu vojenských lékařů a jejich snahu o zmírnění tragických následků válečných útrap tisíců bezejmenných prostých vojáků a civilistů.

P. Matonoha (Anatomický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Současné poznatky o aterosklerotické mineralizaci tepen a některé terapeutické trendy.**

Dlouhodobá sledování prokázala, že pro rozvoj aterosklerozy jak u člověka, tak i v experimentu hraje nejdůležitější roli především hypercholesterolemie a zvýšená tvorba kyslíkových volných radikálů s následným ukládáním vápníku, eventuálně i jiných prvků do tepenné stěny. Cílem předloženého sledování bylo prověřit, které z biochemických faktorů se především podílejí na mineralizaci stěny tepenné v průběhu stárnutí a procesu aterosklerozy a dále zda je možno tuto mineralizaci preventivně omezit nebo některými farmakologickými preparáty (glukagon, kalcitonin, cheláty) již deponované lipidové a kalciové inkluze terapeuticky ovlivnit.

Experimentální kalcifikace a lipidóza byla vyvolána: a) u králíků jednorázovým podáním vitamínu D₂, b) u potkanů odstavením mláďat v laktačním období, c) u miniprasat ročním podáváním vysokotukové diety. Vyhodnocení bylo provedeno histochemicky, ultrahistochemicky a kvantitativní rtg mikroanalýzou.

Histochemická sledování prokázala ukládání vápníku ve třech základních fázích: v první fázi (především v tepnách elastického typu – aortě) v dispersní formě, v druhé fázi ve formě jemného či hrubého precipitátu, který prostupuje intimu i medii a ve třetí fázi – krystalizační, která nastupuje nejdříve ve věnčitých tepnách. Krystaloidy často prostupují celou stěnou tepny. Kvantitativní rtg mikroanalýza pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu prokázala v ateromatosních plátech výraznou kumulaci vápníku i fosforu, v menší míře pak kumulaci železa a křemíku. V aterosklerotickém ložisku (pacient o stáří 70 roků) byl prokázán 10 x vyšší obsah Ca oproti obsahu mimo ložisko a až 60 x vyšší obsah v porovnání s aortou dítěte (stáří 9 roků).

U glukagonu podávaného za účelem ovlivnění ateromatosních změn byl prokázán vysoký lipolytický efekt, a to jak při preventivních aplikacích, tak i u laboratorních zvířat s již vyvolanou aterosklerotickou lipidosou a kalcifikací. V případě kalcitoninu autor zjistil dekalcificační efekt plně srovnatelný s dekalcificačním účinkem chelátů (EDTA). Působení obou preparátů se při kombinaci navzájem potencovalo, a to bez vedlejších patologických účinků.

Některé klinické studie z USA uvádějí příznivé výsledky dekalcificační chelátové terapie aterosklerozy, v ČR je však chelátová terapie dosti opomíjena především z důvodu velké finanční zátěže pacientů (není hrazena pojišťovnami).

D. Pernicová (Anatomický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně): **Imunohistochemický průkaz aktinu v hladkých svalových buňkách vývodů mléčné žlázy.**

V předchozích sděleních autorka prokázala ve stěnách hlavních vývodů velkých žláz přítomnost hladkých svalových buněk (elektronová mikroskopie, barvení podle van Giesona a Malloryho). Průkaz svalových buněk na úrovni světelné mikroskopie se pokusila verifikovat pomocí imunohistochemie. Jako protilátka byla použita Monoclonal Mouse Anti-human Smooth muscle Cells od firmy DAKO, která znázorňuje aktin hladkých svalových buněk. Metoda byla aplikována na vzorcích vývodů mléčné žlázy člověka (4 jedinci), domácího prasete (2 jedinci) a mléčné žlázy laboratorního potkana (2 jedinci).

Ve vývodech mléčné žlázy ženy byla pod vícevrstevným cylindrickým epitelem souvislá vrstva vykazující pozitivní reakci na přítomnost aktinu hladkých svalových buněk. V subepitelové (vazivové) vrstvě se vyskytovaly ojedinělé hladké svalové buňky nebo jejich skupinky, které netvořily souvislou vrstvu. Mezi jednotlivými vývody se nacházely výrazné pruhy hladké svalové tkáně, která však nevykazovala přímý vztah ke stěně vývodu.

U domácího prasete jsou mlékovody vystlány vícevrstevným cylindrickým epitelem, v subepitelové vrstvě, vykazující u ženy reakci na aktin hladkých svalových buněk, pozitivita chyběla. Vazivová vrstva vývodu obsahovala četné drobné žlázky a cévy.

U laboratorního potkana byl zjištěn podobně jako u domácího prasete nižší výskyt hladkých svalových buněk, svalové pruhy ležely ve větší vzdálenosti od stěny vývodu.

Předpokládá se, že množství hladké svalové tkáně v okolí vývodu má pravděpodobně úzkou souvislost s počtem mlékovodů (mléčná žláza ženy 15 až 20 vs. žlázy prasete a potkana – 2 až 3). Imunohistochemické nálezy dobře korelují s průkazem hladkých svalových buněk provedeným pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

T. Komprda (Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno): **Current state of knowledge on bovine spongiform encephalopathy.**

Neurodegenerative disease bovine spongiform encephalopathy (BSE) originated probably due to the feeding contaminated (by scrapie and BSE agent) rendered-offal protein to cattle. The BSE agent was presumably transmitted to humans (new variant of Creutzfeld-Jakob disease, vCJD) via consumption of foods containing contaminated bovine neural tissues. The infection agent (IA) is probably proteinase-resistant prion protein (PrP) with the changed conformation (α -helix to β -sheet) and a specific glycosylation pattern (PrP^{Sc}). Glycosylation is presumably under the control both of IA and a host, which is contrary (together with the existence of at least 4 prion strains differing according to the incubation period and a lesion profile) to the „protein only“ theory. Glycoform and histopathological findings do not differ between vCJD and BSE. Polymorphism in PrP gene is related to the incubation period and presumably to the disease-resistance. IA enters lymphatic tissues in intestinal Peyer's plaques and neural tissues in enteric nervous system, and might proceed through sympathetic (n. splanchnicus) and parasympathetic (n. vagus) fibers to central nervous system. After insufficient PrP^{Sc} breaking by proteinase K in neurons, PrP^{Sc} fragments accumulate and amyloid plaques form, with the result of neuron vacuolisation, hypertrophy and hyperplasia of astrocytes and multiplication of fibrous structures. Memory failures, inability to move, unusual sensations and exitus within 6 months are usual clinical manifestations of vCJD. Incubation period is 4–5 years in BSE and about 10 years in vCJD.

To the infectious bovine tissues belong brain, spinal cord, eyes, dura mater, dorsal ganglia, skull, vertebral column, spleen, intestine, and tonsils. Infectivity of skeletal muscle and milk has not been proved. Ban on feeding of meat-and-bone meals to all animals, elimination of herds with BSE⁺ animals, BSE monitoring, and exclusion of specified risk materials from human consumption belong to current preventive measures regarding BSE. Bovine tissues in feeds/foods are possible to detect by immunological methods or PCR. Neurohistopathological methods, immunohistochemistry, Western blot or ELISA are used in BSE and vCDJ diagnostics. From the

epidemiological data follows that until now, even in countries with high BSE prevalence, risk of vCJD (87 confirmed cases within 1994–2000) is lower in comparison with spontaneous CJD (1 case/1 000 000 inhabitants annually).

J. Nováková (Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno):
The role of the serotonergic system in experimental drug dependence.

The study presents the utilization of four behavioural experimental models to assess the role of serotonin neurotransmitter brain system in withdrawal signs occurred after ending of chronic diazepam treatment, and in rat methamphetamine dependence.

Diazepam withdrawal signs were evaluated in the model of agonistic behaviour in singly housed male mice on paired interactions with the non-aggressive group-housed partners. The changes of the experimental rat methamphetamine dependence were studied in the models of „i.v. drug self-administration“ and „drug discrimination“. The influences of drugs tested on rat locomotor activity were proved in the „closed staircase“ test.

The results referred bring the evidence about a possible preventive action of serotonergics from the occurrence of withdrawal signs while pre-treated prior to diazepam repeated administration withdrawal. This effect was recorded on the pre-treatment with the non-selective 5-HTmimetic agents of the SSRI drug group fluoxetine, and the 5-HT_{1A/1B} receptor subtype agonist eltoprazine, and the 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist ketanserin. The further study results confirm the functional role of 5-HT in methamphetamine dependence. In rats with dependence raised in „i.v. methamphetamine self-administration“ the intake of the drug was inhibited after the endogenous administration of 5-HTmimetic fluoxetine and selective 5-HT_{1B} receptor agonist CGS 12066B, and partially suppressed by 5-HT_{1A/1B} agonist RU 24969. Ligands of the 5-HT_{1A}-receptor subtype had no significant influence. The results described were not jointed with inhibition of rat locomotion in the „enclosed staircase“ model. The testing of rats in the „drug discriminative“ model showed that from 5-HT receptors mainly 5-HT_{2A/2C} subtype (agonist DOI tested), and partially 5-HT_{1A} subtype (agonist 8-OH-DPAT and antagonist WAY-100635 tested) are involved in mediation of methamphetamine discriminative stimuli.

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic (Project: CEZ J07/98:141100001).

J. Vinklerová (Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno):
Behavioural and immunological effects of cannabinergic and their interactions with selected drugs.

The aim of the study was to ascertain selected behavioural and immunological effects of cannabinergics and their functional interactions with calcium channel blocker verapamil, and the psychostimulant methamphetamine.

Experimental methods chosen were: the model of agonistic behaviour in singly housed male mice on paired interactions with the non-aggressive group-housed partners, „i.v. drug self-administration“ and „closed staircase“ test in rats, and chemiluminometric measurement of phagocytic mouse leukocyte activity with simultaneous differential counting.

The study proved in endocannabinoid anandamide as well as the synthetic cannabinoid HU 210 a biphasic nature of both, their behavioural effects in the model of mouse agonistic behaviour and modulator influence on immune leukocyte function - phagocytosis. Low doses produced stimulation (increase of aggression in mice timid on the control interaction and of leukocyte phagocytosis) while high doses elicited inhibition (decrease of aggressive behaviour in aggressive and defensive-escape behaviour in timid mice, and suppression of leukocyte phagocytosis). The cannabinoid receptor antagonist AM 251 at all doses tested significantly inhibited the phagocytic immune function of leukocytes. Experiments with simultaneous administration of anandamide and verapamil confirmed the existence of functional relationship between the endocannabinoid system and the activity of calcium ion channels. Verapamil antagonised both anandamide inhibitory influence on aggression and its effects on changes of leukocyte phagocytic activity (both stimulant

and suppressive). Methamphetamine producing immunosuppressive influence on phagocytic leukocyte function antagonised the immunostimulant effect of anandamide in the case of combinative treatment. The dose-dependent increase of drug intake was registered in drug dependent rats when pre-treated before the experimental session in the model of „i.v. methamphetamine self-administration“ with cannabinoid agonists, either anandamide or methanandamide. However, the changes were non-significant. The pre-treatment with cannabinoid receptor antagonist AM 251 caused the significant decrease of rat methamphetamine intake in all doses tested. None of the same doses elicited significant inhibition of rat locomotion in the „closed staircase“ test.

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic (Project: CEZ J07/98:141100001).

M. Vácha, H. Soukopová, M. Pavelková (Department of Animal Physiology and General Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno): **Compass orientation – magnetic sense of animals.**

The sense of the Earth's magnetism has been found and described in the representatives of all the main animal phyla. The perception of the geomagnetic field parameters enables them not only to maintain the correct path's direction or to synchronize the internal clock of the organism, but also to determine the actual position within the network of geographical coordinates – without the assistance of the Sun. The geomagnetic field thus offers a whole range of useful information for navigation especially under conditions of the other senses failing – for example in the night or fog, under the surface of the ground or the sea.

Although the molecular mechanism of magnetoreception has been investigated for several decades, no conclusive evidence of its function or localization in the body has been presented to this date. What are the probable mechanisms of magnetoreception? Out of a number of hypotheses, two most plausible principles have been outlined for the present: A) Detection based on the presence of ferromagnetic particles in animal tissues. These particles – rotating like the compass needle – could cooperate with specialized mechanoreceptors. B) A second theoretical approach considers an influence of the magnetic field on the kinetics of enzymatic reactions or the photoreactions of the retina. This model might also explain the remarkable influence of illumination or even the colour of the light on the magnetic orientation faculties of animals.

The objective of present experimental work was to prove and define precisely the magnetic sense of insects, and thereby come nearer by a small step to a proof in favour of one or the other reception hypothesis. As model the common mealworm beetles (*Tenebrio molitor*) were used that are able to remember the magnetic position of the light source. Under prevailing conditions, the beetles are negatively phototactic, trying to escape from a lateral light source. After several hours of such training when, for instance, the light comes from the south, the beetles, placed in the middle of a circular arena, and then keep crawling preferably towards the north though devoid of any visual cues. This compass reaction, however, is statistically significant only in a homogeneously illuminated arena, while in the dark the direction of the beetles' paths becomes random. The magnetic behaviour of mealworm beetles thus appears to be dependent on the presence of light. Additional testing of the sensitivity of this response to the colour of the light, the field's parameters or the genetic predisposition of the tested individuals may contribute to unveiling the principles of magnetoreception.

M. Ešner (Laboratoř molekulární embryologie Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity a Ústavu živočišné fyziologie Akademie věd ČR v Brně): **Interakce mezi FGF-2 a FGFR-1 regulují diferenciaci viscerálního entodermu.**

Fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2) se podílí na regulaci významných biologických procesů, jakými jsou proliferace a diferenciacie buněk. Jeho aktivita je zprostředkována čtyřmi receptory s tyrosin kinázovou aktivitou FGFR-1-4, z nichž FGFR-1 a FGFR-2 jsou funkční již v nejčasnějších vývojových stádiích. Vzhledem k tomu, že mutace těchto receptorů jsou embryonálně letální, skýtají embryonální kmenové (Embryonic Stem – ES) buňky jedinou možnost jak sledovat funkce těchto receptorů během embryonálního vývoje.

Ve studii se autoři zabývali schopností ES buněk přenášet signály FGF-2, pokud je u nich inaktivován jeden ze čtyř FGF receptorů, konkrétně FGFR-1. Prvním bodem analýzy bylo zjištění vazebné kapacity ES buněk pro FGF-2, které prokázalo, že ztráta FGFR-1 významným způsobem snižuje schopnost buněk vázat FGF-2. Při testování proliferativní aktivity nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi normálními a FGFR-1 deficientními ES buňkami, a to ani při kultivacích s vysokými koncentracemi FGF-2. Pro analýzu diferenciaci ES buněk byl použit model tvorby tzv. embryoidních tělísek (Embryoid Bodies - EB), což jsou útvary velice podobné časným vývojovým stádiím živého embrya jak morfologicky, tak přítomností specifických genových produktů. Diferenciaci embryoidních tělísek byla posuzována podle přítomnosti následujících transkriptů: Pax-6 - neuroektoderm; Brachyury – mezoderm; GATA-4 – primitivní entoderm; AFP – viscerální entoderm. Metodou RT-PCR bylo zjištěno, že hladina mRNA pro Pax-6 se v průběhu diferenciaci nemění a je stejná u normálních i u FGFR-1 deficientních EB. Přítomnost mRNA pro Brachyury byla u FGFR-1 deficientních EB nižší, ale přídavek FGF-2 do kultačního media byl dostačující pro zvýšení transkripce Brachyury na úroveň normálních EB. Opačnou situaci jsme pozorovali v případě transkripce entodermálních genů, jejichž exprese byla přídavkem FGF-2 u mutantních EB snižována a v případě AFP zcela zastavena. Dosažené výsledky ukazují na důležitost FGFR-1 signální dráhy pro normální diferenciaci viscerálního entodermu.

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru AF MZLU v Brně č. MSM 432100001 a Fondu rozvoje vysokých škol MŠMT č. 1214/2001.

H. Preclíková¹, J. Pacherník³, V. Bryja³, P. Krejčí¹, P. Dvořák^{1,2}, A. Hampl^{1,2} (¹Laboratoř molekulární embryologie Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně, ²Laboratoř vývojové biologie Ústavu živočišné biologie a genetiky, Akademie věd České republiky, Brno, ³Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, Karlova univerzita, Praha): **Tolerance vysokých hladin p27, inhibitoru cyklin-dependenčních kináz, v buňce.**

Centrální roli v regulaci buněčného cyklu hrají cyklin-dependentní kinázy (CDK). Jejich aktivita je regulována několika mechanismy, mezi něž patří vazba k regulačním podjednotkám – cyklinům, fosforylace/defosforylace a asociace s CDK inhibitory (CKI). Cykliny regulují substrátovou specifitu CDK. Fungují jako hlavní cíle buněčných signálních drah a přenášejí mitogenní signály z okolí buňky na kontrolní aparát. CKI jsou inhibitory kinázové aktivity CDK a plní tak funkci hlavních negativních regulátorů buněčného cyklu. Jedním ze sedmi dosud identifikovaných savčích CKI je p27 – protein, jehož exprese je indukována různými antimitogenními signály, jako jsou TGF- β , rapamycin a nedostatek růstových faktorů. Zvýšená exprese p27 vede k zastavení buněčného cyklu, nejčastěji před vstupem do S fáze.

Jako molekula, která zprostředkovává buněčnou odpověď na extracelulární inhibiční signály, může p27 hrát roli onkosupresoru. Byly studovány mnohé normální tkáně i vysoce proliferující lidské nádory, u kterých byl pozorován inverzní vztah mezi množstvím p27 a rychlostí proliferace buněk. Ačkoliv většina zkoumaných agresivních nádorových tkání vykazovala nulovou expresi p27, vysoká hladina tohoto inhibitoru byla nalezena u řady nádorů prsu, tlustého střeva aj. Mutace genu pro p27 byly pozorovány jen ojediněle u některých lymfomů a leukémií. Tyto výsledky naznačují existenci mechanismu, který umožňuje dělicím se buňkám tolerovat vysoká množství p27. Spolu s vysokou expresí p27 byla zjištěna i zvýšená exprese cyklinů D třídy. Tyto proteiny byly v buňkách kolokalizovány s p27 a tvořily s ním jeden komplex (*Sanchez-Beato et al.*, 1999).

Dalším systémem, ve kterém zřejmě dochází k překonání inhibičního efektu p27, jsou diferencující buňky. V prekurzorech oligodendrocytů, indukovaných do terminální diferenciaci hormonem štítné žlázy, dochází k akumulaci p27, aniž by tento jev vedl ke zpomalení nebo zastavení buněčného cyklu. Ukázalo se, že p27 je jednou z mnoha součástí vnitřních buněčných hodin kontrolujících průběh diferenciaci (*Durand a Raff*, 2000).

Obdobně bylo pozorováno zvýšení proteinové hladiny p27 v derivátech embryonálních karcinomových buněk P19, indukovaných do diferenciaci kyselinou all-trans retinovou. Tento nárůst neměl výrazný vliv na charakteristiky buněčného cyklu. Současně došlo i k akumulaci cyklinu D3, který vyvazoval p27 do ternárních komplexů s CDK4. Tento mechanismus buňce

pravděpodobně umožňuje překonání inhibičního efektu proteinu p27. Využitím transfekcí kódujících sekvencí p27 a cyklinu D3 do buněk se zjistilo, že akumulace obou proteinů jsou navzájem závislé procesy.

B. Ravčuková, J. Kadlecová, I. Valášková, J. Štěrba^a, R. Gaillyová (Oddělení lékařské genetiky a ^a Oddělení dětské onkologie Fakultní nemocnice Brno, prac. Dětská nemocnice): **Detekce exprese genu pro tyrosin hydroxylázu u dětských pacientů s neuroblastomem.**

Neuroblastom patří mezi nejčastěji se vyskytující solidní nádory dětského věku. Představuje přibližně 8–10% nádorových onemocnění u dětí. Vyskytuje se přibližně s frekvencí výskytu 9/1 milion dětí mladších 15 let. Jde o nádorové onemocnění s velmi heterogenním klinickým průběhem (od lokalizovaných tumorů s dobrou prognózou po metastazující agresivní tumory s nepříznivou prognózou). Důležitými prognostickými faktory jsou věk pacienta, stadium choroby při diagnóze, histopatologický nálezn, nálezn na úrovni DNA, úroveň exprese TH genu, počet kopií N-myc protoonkogenu v nádorových buňkách.

Neuroblastom produkuje v 98% případů důležité neurotransmitery, regulující vnitřní funkce a motorickou koordinaci. Prvním enzymem v syntéze těchto katecholaminů je tyrosin hydroxyláza, která je markerem, typickým pro IV. stádium vývoje neuroblastomu. Exprese genu pro tyrosin hydroxylázu je regulována tkáňově specificky během neonatálního vývoje a diferenciaci.

Gen pro tyrosin hydroxylázu, lokalizovaný v oblasti 11p15.5, kóduje čtyři typy lidské mRNA, lišící se navzájem vlivem alternativního splicingu inzercí/delecí 12pb a 81pb v oblasti exonů I a 2. Strategie detekce exprese genu pro tyrosin hydroxylázu v molekulárně genetické laboratoři spočívá v následujících krocích:

- izolace RNA z krve, kostní dřeně nebo tkáně tumoru
- RT-PCR
- PCR
- potvrzení specifity detekce mRNA pro tyrosin hydroxylázu
- stanovení citlivosti detekce mRNA pro tyrosin hydroxylázu

Specifita syntézy (úseku DNA o délce 299pb) byla ověřena sekvencí na automatickém sekvencátoru ABI PRISM 310. Detekční citlivost činila přibližně 10^{-5} , což je srovnatelné s výsledky popsány v literatuře (*Miyajima et al.* 1995).

Detekce mRNA pro tyrosin hydroxylázu má význam pro stanovení diagnózy, určení prognózy, sledování vývoje onemocnění, ale také případnou detekci buněk neuroblastomu v transplantátu před autologní transplantací.

Kombinací několika molekulárních markerů neuroblastomu s dalšími detekčními metodami (imunocytologickými, histologickými ap.) lze zachytit heterogenitu neuroblastomu a zjistit i minimální onemocnění (*Cheung a kol.* 2001).

E. Matalová, I. Míšek (Laboratory of Genetics and Embryology, Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno): **Terminal nick end labelling of DNA strand breaks in tissue sections.**

Investigation of programmed cell death in the way of apoptosis is based on specific morphological, biochemical and molecular criteria of dying cells. With increasing interest in apoptosis a lot of kits and assays to prove apoptotic cell death has emerged in the last ten years. However, their exploitation in histological sections is often limited.

TUNEL assay (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling) is acknowledged as a method of choice in the rapid identification and quantification of apoptotic cells. This technique is recommended for apoptosis detection at single cell level in fresh cell samples, frozen tissue sections and as well in paraffin embedded tissues. Despite of undoubted advantages of this labelling-assisted identification, some trouble shootings mainly the risk of positive and negative findings have been often discussed.

The effectiveness of the enzymatic reaction can be reduced, e.g. by high cell density, nuclear protein environment, and impaired by cell fixation. Thus, chemical pretreatments have been devised

to improve TUNEL sensitivity and to avoid false negative findings. Influence of different pretreatment procedures – proteolytic digestion, microwave irradiation and detergent permeabilisation – was tested in this study.

In present work, TUNEL method was used to prove apoptosis and demonstrate its role during embryonic tooth development in the animal model of the field vole (*Microtus agrestis*). Formol fixed and paraffin embedded tissue sections were evaluated. Different pretreatments and modifications of the TUNEL assay (fluorescein, POD, AP) were tested and results evaluated under fluorescent and light microscopy, respectively. Localisation of apoptotic cells in embryonic tooth development using the TUNEL test will be exploited for the final model of temporo-spatial distribution of apoptotic events during odontogenesis.

Supported by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (GA AV ČR – A 70 39 901, C 50 45 105).

*M. Sedláčková, J. Štátná, J. Žáková** (Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, *I. gynekologicko-porodnická klinika Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice Brno, prac. Fakultní porodnice): **Cytochemická detekce zdrojů peroxidu vodíku v kultivačním systému v průběhu fertilizace in vitro u člověka.**

Zvýšené hladiny reaktivních forem kyslíku (především superoxidu a peroxidu vodíku) negativně ovlivňují fertilizaci in vitro a následný vývoj embryí. Tato studie se pokusila identifikovat buněčné zdroje peroxidu vodíku metodou jeho ultracytochemického průkazu.

Bylo vyšetřeno 96 vzorků čerstvých i zmrazených spermií, 60 vzorků kumulů izolovaných od čerstvě odebraných oocytů, 45 vzorků inseminovaných kumulů po 2 h kultivace a 16 oocytů, které se nepodařilo oplodnit. Vzorky byly fixovány glutaraldehydem, inkubovány v médiu obsahujícím Ce^{3+} a zpracovány pro elektronovou mikroskopii. Metoda je založena na tvorbě elektronově denzních precipitátů perhydroxidu ceritého vznikajících reakcí peroxidu vodíku s Ce^{3+} .

Spermie produkující peroxid vodíku se vyskytovaly jen ojediněle v čerstvém ejakulátu, ve vzorcích rozmražených spermií byl jejich počet vyšší s výrazným nárůstem po 2 h kultivace. Produkce peroxidu vodíku byla spojena spíše s defekty povrchové membrány než s morfologickými abnormalitami spermií. Vysoký byl zpravidla i počet spermií produkujících peroxid vodíku v inseminovaných kumulech. V kumulech produkovaly peroxid vodíku jen buňky poškozené a zanikající. Neoplozené oocyt, často fragmentované a morfologicky alterované, produkovaly peroxid vodíku na mitochondriích ještě 72 h po nezdařené inseminaci, jeho dalším zdrojem byly spermie nahodile zachycené v zona pellucida.

Z výsledků vyplývá, že produkce peroxidu vodíku je spojena se známkami poškození submikroskopické struktury, signalizující sníženou kvalitu gamet i doprovodných somatických buněk. Vzhledem k cytotoxickým účinkům peroxidu vodíku autofi doporučují zkrátit dobu inseminace na minimum a separovat oocyt, u kterých selhalo oplození, od ostatních.

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

P. Dubový, I. Svíženská, I. Klusáková (Division of Neuroanatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno): **To the problem of quantitative evaluation of an immunofluorescence detection – application for peripheral nerve structures.**

The dorsal and ventral spinal roots contain different types of axons. The endoneurial extracellular matrix (ECM), produced by Schwann cells under control of the axons, is important extrinsic factor of the nerve regeneration. Therefore, it is hypothesized different cellular and extracellular conditions in the dorsal and ventral roots based on various types of axons.

To distinct the differences, authors have optimized an indirect immunofluorescence method for localization of chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), fibronectin (FN), tenascin (TN) and thrombospondin (TSP) as well as some neurotrophins (BDNF, NGF and NT-3). For the quantitative immunohistochemistry the cryostat sections through the dorsal and ventral roots were cut and incubated simultaneously. An intensity of immunofluorescence staining was expressed as

„brightness“ and compared using the computer-assisted image analysis. We have developed an algorithm for measurement of immunofluorescence intensity using Lucia-G image analysis system. Interactive segmentation (HSI) (Lucia-G v 4.21) and new classifier block (Lucia-G v 4.61) were tested for selection of measured areas in the digitized pictures. The later method of image segmentation made identification of measured areas easier. The measurement of immunofluorescence brightness revealed that the endoneurial ECM of the dorsal roots is immunostained for investigated molecules in a higher intensity than that in the ventral roots. On the other hand, the immunofluorescence intensity for all investigated neurotrophins was very similar in Schwann cells of both roots.

Obtained results suggest quantitative differences of the endoneurial ECM content in the spinal dorsal and ventral roots. This supported previous hypothesis that the synthesis of ECM molecules by Schwann cells under control of various types of axons is displayed in various quantitative content of the endoneurium. In contrast to the endoneurial ECM content, quantitative immunofluorescence histochemistry revealed similar expression of neurotrophins in the Schwann cells of intact afferent and motor axons.

Supported by the Grants 309/00/0407 (GACR) and CEZ J07/98:141100001.

J. Dvořák, I. Vrtková (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Využívání genetických markerů ve šlechtění hospodářských zvířat.**

Recentní poznatky molekulární genetiky, genomiky strukturní i funkční jsou velmi rychle aplikovány v plemenitbě, selekci a hybridizaci u hospodářských zvířat nejen v zahraničí, ale i v ČR. Vzhledem ke krátkému generačnímu intervalu a velkému počtu potomstva po určitých rodičích (1 prasnice má za rok kolem 23 selat), jsou molekulárně genetické markery nejvíce využívány u prasat.

V roce 2001 autoři určovali pro nukleové a šlechtitelské chovy prasat (40 podniků) genotypy lokusu CRC, asociované s odolností na stresové faktory a po porážce s výskytem vady masa PSE. Pro výběr rodičovských párů ověřili další kandidátní geny asociované s produkcí masa (např. C-myc, MYF3 a 4, MC4R aj.) i v několika chovech. Jako kandidátní geny pro plodnost byly testovány asociace různých genotypů v lokusech ESR, PRLP, OPN, FSHB a některých dalších ve vztahu k počtu narozených selat, hmotnosti selat a počtu struků.

Na podkladě získaných výsledků byl formulován a od poloviny r. 2001 zahájen nový VaV projekt MZe ČR: "Tvorba superplodné linie prasat", kterého se účastní 12 nukleových chovů. Všechny prasnice (matky) a kanci (otci) zařazení do projektu mají identifikovaný genotyp ESR a FSHB.

Transfer VaV poznatků k chovatelům prasat v ČR realizuje Laboratoř aplikované molekulární (LAMGen) Ústavu genetiky MZLU, na podkladě výsledků z projektu MZe EP 9282. V roce 2001 byly zpracovány a chovatelské veřejnosti poskytnuty následující materiály z výsledků výzkumných projektů: a) J. Dvořák, I. Vrtková (2001) Malá genetika prasat II, ES MZLU v Brně, 91 s., ISBN 80-7157-521-6; b) Materiály "LAMGen informuje", vydávané neperiodicky, rozsah 4 strany, 500 výtisků (Metody používané v LAMGenu, Genetika zbarvení prasat, Ověřování parentity /rodičovství/ prasat, Prionový gen skotu a jeho polymorfismus, Perspektivy v programech produkce jatečných prasat, Genetika "dvojitého osvalení" u masného skotu, Genetika prionů, Spolupráce s ZD Dubné a.s., NCH prasat, Genetické markery plodnosti prasat, Genetické markery kvality masa, Genetický marker přírůstku u prasat, Molekulárně genetické markery u populace prasat Norské landrase v ČR, Molekulárně genetické markery pro mateřské populace prasat, Genetický marker ESR u mateřských plemen prasat a jejich kříženců).

Zpracováno s podporou MZe ČR: EP 9282 a QD 1039.

L. Putnová (Department of Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno): **The importance of PRLR and OPN genes in breeding of pigs.**

The identification of markers to be used to select superior animals for reproductive traits in pig has been one of the main subjects of research for decades. Techniques in molecular biology can now be used to identify individual alleles with desirable effects on reproductive traits and to directly select for these alleles. Information on genotypes for marker alleles can be included in marker-assisted

selection programs that can represent a more practical approach to be used by the industry. The aim of the study was investigated three DNA markers, two at the prolactin receptor (*PRLR*) locus and one at the osteopontin (*OPN*) locus as possible candidate genes for reproductive traits in pigs.

The *PRLR* gene, which is localized on porcine chromosome 16, was studied because mice homozygous for null mutations in this gene are sterile. PCR-RFLP method was used to genotyped *AluI* and *HpaII* loci of the *PRLR* gene in 244 sows of Landrace and Large White. Statistical analysis of 1020 litters showed that *AluI* locus was associated with litter size mainly in Landrace and affected the first parities while *HpaII* locus of the gene was associated with the same traits in Landrace and Large White and mainly affected numbers of weaned. The magnitude of the effect varied by population with the effects exceeding 2 pigs per litter in Landrace line and 1 pig per litter in Large White populations. Another gene identified to be associated with reproductive traits in pig and localized to chromosome 8 is *OPN* also known as Secreted Phosphoprotein-1 (*SPP1*). *OPN* plays an important role in osteoblast differentiation but the expression of this gene has been observed in other tissues and among them it has been identified in placenta and uterine epithelium. Using comparative approach the *OPN* gene was chosen as a candidate gene for a region in which the porcine version of the major gene for prolificacy *FECB* (Booroola) may be localized. Statistical analyses of 2657 litters from 584 sows of different breeds (Landrace, Large White and Norwegian Landrace) were performed. The effect of the PCR marker developed in pig at this locus ranged from 0.35 to 1.53 pg per litter increase between homozygous genotypes and varied with background genetics.

This work was supported by project of Ministry of Agriculture of the Czech Republic No. EP9282.

O. Kolaříková (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Gen ESR a jeho význam ve šlechtění prasat.**

Šlechtění prasat je dynamický proces, jež se mění v závislosti na nových potřebách a cílech, kterých chtějí producenti jatečných prasat dosáhnout. Aby chovatelé obstáli v podmínkách dnešního trhu, musí sledovat nové trendy, vyhledávat a hodnotit nové poznatky a být schopni je rychle včlenit do své výroby. Mezi takové poznatky patří i molekulárně genetické informace o QTLs (Quantitative Trait Loci), kandidátních genech (KG) nebo MAS (Marker Assisted Selection). Jedna z hlavních oblastí, která šlechtitele zajímá je reprodukce prasat. Nyní se výběr (selekce) do šlechtění provádí podle odhadu plemenné hodnoty (PH) z fenotypu zvířete. Reprodukční ukazatele prasat mají povahu kvantitativních znaků ($h^2 = 0,1-0,3$) a selekce na ně je obtížná. Proto se výzkum molekulární genetiky soustředil na identifikaci QTL a analýzu KG u prasat asociovaných s reprodukcí. Jedním z KG pro plodnost je gen estrogenového receptoru (ESR), který je lokalizován na prvním chromozomu a jsou v něm známa tři polymorfní místa, která se označují jako: ESR1 (AvaI) s alelami A a B, ESR2 (PvuII) a alelami C a D, ESR3 (MspI) s alelami E,F (*Drögenmüller et al, 1997; Short et al, 1997*). Alela D v polymorfním systému ESR2 je pozitivně asociována s velikostí vrhu prasníc komerčních plemen (např. *Rothschild et al, 1996; Short et al, 1997*). U alely ESR1-B byly také zjištěny průkazné asociace s počtem narozených selat (*Depuydt et al, 1999; Kolaříková, 1999*), ale nebyly analyzovány velké populace prasat jako v předchozím případě. V systému ESR3 nebyly nalezeny žádné významné rozdíly mezi skupinami genotypů.

Na Ústavu genetiky MZLU v Brně byly analyzovány genotypy ESR2 řádově u stovek prasat ze šlechtitelských chovů mateřských plemen prasat (bílé ušlechtilé – BU, landrase- L). Bylo zjištěno, že frekvence alely D je mezi chovy velmi variabilní (0,1–0,8) a u plemene L je obecně nižší (0,0–0,1). Byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi genotypy u obou plemen v počtu všech, živě narozených a odchovaných selat, např. ve skupině 2. – 4. vrhů u prasníc L z jednoho chovu 0,3 selete na vrh. Rozdíly mezi genotypy byly zjištěny různé v různých chovech. Musí se připustit, že ačkoli tento gen přiznivě ovlivňuje danou vlastnost, je zde ještě mnoho jiných genů, které na tuto vlastnost působí a šlechtitelé sledují především fenotyp zvířete. Řešením bude výběr vhodné selekční strategie, kombinující efekty tohoto genu a odhady plemenné hodnoty při stanovování selekčních kritérií.

Gen *ESR2* se v ČR již prakticky využívá při tvorbě superplodných linií prasat u obou zmiňovaných mateřských plemen. Chovatelé jej rovněž používají při výběru kanců do šlechtění.

Výsledky byly podpořeny grantem Ministerstva zemědělství České republiky č. EP 9282.

P. Horák, I. Vrtková, J. Dvořák (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Molekulárně-genetická charakteristika genové rezervy prasat plemene Přestické černostrakaté.**

Současné zemědělství plní mimo výroby kvalitních potravin také významné mimoprodukční funkce. Jednou z nich je ochrana genofondu málopočetných plemen hospodářských zvířat tzv. genových rezerv. Jejich význam je spatřován v uchování selektovaných alel, jejichž četnost výskytu je v komerčních populacích prasat snižována.

Jediným plemenem prasat, které bylo v České republice vyhlášeno genovou rezervou, je Přestické černostrakaté prase (Pc). Pc vzniklo v oblasti Západních Čech z místního rázu klapouchého prasete, které bylo kříženo s importovanými plemeny prasat. Hlavní předností plemene je výborná plodnost, velmi dobré mateřské vlastnosti a odolnost a jeho nedostatkem naopak nízké procento libového masa, vyšší výška hřbetního tuku a horší konverze krmiva.

Cílem práce bylo stanovení molekulárně-genetické variability ve čtyřech vybraných lokusech – *CRC* (Calcium Release Channel), *MYF4* (myogenin) a *ESR α* (estrogenový receptor α -polymorfni místa *ESR1* a *ESR2*). Uvedené lokusy jsou nebo mohou být využívány v MAS-Marker Assisted Selection.

Studovaná populace zahrnovala 96 plemenných prasnic Pc z 9 šlechtitelských chovů. DNA byla izolována z leukocytů. Pro stanovení polymorfních variant jednotlivých lokusů byla použita metoda PCR-RFLP dle metodik uvedených - *Brening et Brem* (1992)-*CRC*, *Drögenmüller et al.* (1997)-*ESR1*, *Short et al.* (1997)-*ESR2* a *Soumilion et al.* (1997)-*MYF4*.

Frekvence alely *N* v lokusu *CRC* byla 0,927 a alely *n* 0,073. V polymorfním místě *ESR1* byla zjištěna frekvence alely *A*=0,807 a alely *B*= 0,193. Vyšší frekvence alely *C* (0,854) než alely *D* (0,146) byla v polymorfním místě *ESR2*. V lokusu *MYF4* se alela *A* vyskytovala s frekvencí 0,661 a alela *B* s frekvencí 0,339.

Zjištěné frekvence alel sledovaných lokusů u plemene Pc byly podobné, jaké uvádějí autoři u plemen Bílé ušlechtilé a Landrase. To potvrzuje možnost uchování optimálních četností selektovaných alel v genofondu plemene Přestické černostrakaté a oprávněnost jeho vyhlášení genovou rezervou.

Výsledky byly získány s podporou Ministerstva zemědělství České republiky (č. EP 9282).

V. Dvořák (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Genetika zbarvení u prasat.**

Zbarvení prasat je dlouhodobě zkoumáno. Vypovídá o vyrovnanosti stáda, využívá se pro plemenářskou práci k určení plemenné příslušnosti a v některých případech slouží i k prognóze užitkového typu.

V práci byl sledován projev alel *I*, *I^p* genu *KIT* na zbarvení /výskyt barevných skvrn u bílých plemen Bílého ušlechtilého (Bu), Landrace (L)/. Dále byl sledován fenotypový projev pigmentace u různých typů křížení a možné asociace molekulárně genetických markerů se zbarvením. Bylo sledováno 420 prasnic plemene L ve dvou šlechtitelských a jednom rozmnožovacím chovu a 199 selat z vrhů těchto prasnic, kde došlo k fenotypovému projevu genotypu *I^pI^p*. Dále byly sledovány vrhy kříženců (BuxL) x H(D,DxH), ve kterých se objevila zbarvená selata. Absolutní a relativní četnosti pro alely *I* a *I^p* byly vypočteny na základě Hardy-Weinbergerova zákona.

Frekvence alely *I^p* genu *KIT* u plemen L a Bu byla nízká (0,085). U plemene L je výskyt recesivních homozygotů (*I^pI^p*) větší než u plemene Bu, což je pravděpodobně zapříčiněno importem norských a švédských variant tohoto plemene. V posledních 16-ti měsících se tato frekvence zvyšuje patrně z důvodů selekce na zmasilost, výrazného rozšíření dvou linií plemene L, jež obsahují alelu *I^p* a také díky importu plemenných zvířat ze Skandinávie. Alela *I^p* genu *KIT* má pravděpodobně pozitivní vliv na reprodukci, konstituční pevnost a zmasilost. Potvrzení těchto výroků vyžaduje další zkoumání této alely na molekulární úrovni a následné zjištění asociací

s užitkovými vlastnostmi. To že k expresi genotypu $I^P I^P$ může dojít až v průběhu života či vůbec ne, znamená to, že pozorování na fenotypové úrovni nebude nikdy dostatečně průkazné.

I přes pozitivní vliv genotypu $I^P I^P$ na užitkovost jsou tato prasata z důvodu nesplnění plemenného standardu vyřazena z chovu. Také požadavek spotřebitele na pláštově bílého finálního hybrida pravděpodobně povede časem k postupnému vyselektování této alely. Ale stálá preference zmasilosti dává alelu I^P ekonomický význam. A v případě, že se v budoucnosti potvrdí výše zmíněné hypotézy by mohl být sestaven podobný hybridizační program podobně jako pro gen *R_{YR}*.

A. Knoll (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Metody určování rodičovství u zvířat.**

Studium metod pro určování otcovství a rodičovství má velký význam v genetice člověka i zvířat. Dříve byly tyto metody založeny převážně na polymorfismu krevních skupin a bílkovin, dnes se již jedná o studium variability DNA (tzv. DNA fingerprinting). Tento přístup využívá polymorfismu různých typů struktur DNA, především VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), HLA a STR (Short Tandem Repeats, mikrosatelity). Základními požadavky jsou vysoká spolehlivost zamítnutí a (nebo) potvrzení rodičovství, relativně snadné a rychlé laboratorní testování, vysoká reprodukovatelnost a v neposlední řadě co nejnižší cena vyšetření. Těmto požadavkům, i když jsou často v protikladu, dnes nejlépe vyhovuje u dobře přístrojově vybavených laboratořích metoda založená na studiu mikrosatelitů testovaných na sekvenátoru.

Mikrosatelity jsou krátké za sebou se opakující sekvence (repetice), které se vyskytují u konkrétního mikrosatelitu v různém počtu a tvoří tak různé alely. Počet těchto alel je relativně vysoký (5–20). Vyšší počet různých polymorfních mikrosatelitů znamená vyšší přesnost vyšetření. Namnožení této mikrosatelitní DNA se děje pomocí metody PCR (polymerázová řetězová reakce) a je možno dělat i více, případně všechny mikrosatelity v jedné zkumavce (multiplex PCR). Fragменты DNA mikrosatelitů jsou poté podrobeny kapilární elektroforéze (tzv. fragmentační analýza) na genetickém analyzátoru (sekvenátoru), kde jsou jednotlivé DNA separovány na základě své velikosti. Detekce se provádí automaticky pomocí fluorescence. Proto musí být mikrosatelity označeny molekulou fluorescenční látky, která je navázána na PCR primery. Lze tak současně provádět analýzu 3 (4) skupin mikrosatelitů, každé značené jinou barvou. Protože se používají mikrosatelity, z nichž každý má odlišný rozsah své délky, lze na jednu analýzu detekovat 10–12 různých mikrosatelitů. A to je již dostatečný počet pro stanovení rodičovství. V autorově laboratoři se běžně provádějí kontroly rodičovství u prasat (9 mikrosatelitů), skotu (11) a koní (12). Metodu lze využít také pro stanovení genetické diverzity, případně příbuznosti mezi jedinci nebo plemeny.

Zpracováno s podporou grantu MZe ČR EP 9282.

T. Urban (Ústav genetiky Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně): **Využití multimediální technologie ve výuce genetiky – "Virtuální svět genetiky".**

Cílem multimediální aplikace *Virtuální svět genetiky* (VSG) je být doplňkem a podporou ve výuce základního kurzu obecné genetiky s využitím zejména schémat a animací. Byla navržena na základě využití vlastností hypertextu umožňujících interaktivitu, vlastní směřování učebního procesu s volbou tempa výuky, zpětných vazeb, textů a problémových otázek.

Aplikace VSG je určena pro studenty, kteří začínají s genetikou (studenti středních škol a prvních ročníků vysoké školy) a pro studenty vyšších ročníků či postgraduální studenty (možnost efektivního opakování a aktivizace znalostí). Předpokládá se, že program využijí i učitelé středních škol při výuce genetiky, nebo frekventanti distančního vzdělávání v rámci celoživotního vzdělávacího programu.

Obsah aplikace VSG je rozčleněn do čtyř hlavních témat, které jsou dále členěny: 1. *Úvod do genetiky*: Genetika (včetně J.G.M.); Základní pojmy; Historie genetiky; Metody genetiky; Genetika a společnost 2. *Klasická genetik*a: Buněčné dělení; Mendelistická genetika; Cytogenetika; Genové interakce; Genetika pohlaví; Vazba genů; Mimojaderná dědičnost 3. *Molekulární základy dědičnosti*: Struktura nukleových kyselin; Replikace; Transkripce; Translace; Genové mutace;

Genom; Regulace exprese 4. *Genetika populací*: Principy; Popis populací; Dynamika populací; Kvantitativní genetika; Heritabilita; Selektce.

Součástí VSG je rozsáhlý výkladový genetický slovník s anglickými překlady pojmů a na hlavní stránce (*home*) si mohou studenti ověřit testem své znalosti základů genetiky ze středních škol. Technické požadavky: aplikace vyžaduje počítač s rozlišením nejméně 800x600 v 64 tisících barvách (doporučuje se však vyšší), nainstalovaný www prohlížeč Internet Explorer 5.0 (minimálně) na libovolném operačním systému. Výukový hypertext VSG je zařazen do edičního plánu MZLU pro rok 2002 a bude vydán na nosičích CD-ROM.

"Virtuální svět genetiky" byl vytvořen s podporou Fondu rozvoje VŠ MŠMT ČR 1146/01.

Compiled and revised by S. Čech