

Vědecká příprava pro Zubní lékařství

Petra Bořilová Linhartová, Jan Křivánek, Marcela Buchtová, Zdeněk Daněk, Alena Bryšová, Břetislav Lipový, Serhij Forostyak, Jan Gajdziok, Zuzana Vranková, Michaela Cvanová, Tomáš Kratochvíl, Martin Vaculík, Filip Hromčík, Lydie Izakovičová Hollá

Cíle předmětu

- rozšířit obzory studentů na poli vědeckých pokroků v oboru stomatologie,
 - motivovat studenty a posílit jejich vědecké ambice,
 - a položit základy pro jejich postgraduální studium a vědeckou kariéru.
-
- orientace v odborné literatuře se stomatologickou tematikou.
 - možnost zapojit se do vědecko-výzkumných projektů LF MU v rámci oboru ZL
 - seznámení s principy vědecké práce a publikační činnosti

Organizace předmětu

- Studenti budou seznámeni s vědeckými pokroky v různých oblastech stomatologie zahrnující především výzkum etiopatogeneze konkrétních onemocnění a jejich terapie.
- Výuka bude probíhat blokově (1 týden) formou seminářů a exkurzí na specializovaná pracoviště.
- Předmět bude ukončen kolokviem - rozpravou na studentem zvolené odborné vědecké téma, které před kolokviem písemně zpracuje.

– Doporučená literatura

- KNECHT, Petr. O strašáku excelentního publikování a predátorských časopisech. In Universitas: Masarykova univerzita, 2014. s. 3-8, 6 s. ISSN 1211-3387.
- DAY, Robert A. a Barbara GASTEL. How to write and publish a scientific paper. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. xv, 302. ISBN 9780521671675.
- The Oxford textbook of clinical research ethics. Edited by Ezekiel J. Emanuel. New York: Oxford University Press, 2008. xx, 827. ISBN 0195168658.
- LACHIN, John M. Biostatistical methods : the assessment of relative risk. 1st ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. xvii, 529. ISBN 0471369969

Organizace předmětu

1. den

- Úvod (Bořilová Linhartová)
- Základy metodologie při vědecké práci (Bořilová Linhartová)
- Úrovně důkazů v Zubním lékařství (Hromčík)
- Metodologie klinického hodnocení (ne)jen pro zubní lékaře (Lipový)
- Dotazníky a psychometrika (Kratochvíl, Vaculík)
- Úvod do biostatistiky (Cvanová)

Organizace předmětu

2. den

- Genetické asociační studie a orální mikrobiom (Bořilová Linhartová)
 - zubní kaz (behaviorální intervence, kojení)
 - aftózní stomatitida
 - parodontopatie
 - zevní apikální kořenová resorpce po ortodontické léčbě
 - orální lichen planus, hypodoncie a oligodoncie a další
 - apikální periodontitida a odontogenní cysty
- **Exkurze na pracoviště a praktická část:** izolace DNA (Deissová, Bořilová Linhartová)

Organizace předmětu

3. den

- Lipoxiny a resolviny v léčbě parodontitidy (Hromčík)
- Využití nanovlánek k aplikaci bioaktivních látek v rámci prevence onemocnění dutiny ústní (Hromčík, Bořilová Linhartová)
- Obstrukční spánková apnoe (nejen) u dětí z pohledu zubního lékaře & ortodontisty (Vranková, Bořilová Linhartová)
- Vrozené vývojové anomálie orofaciální oblasti (rozštěpové vady) (Bryšová)

- **Exkurze na pracoviště**

Organizace předmětu

3. den

- Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy (Gajdziok)
- Mukoadhezivní filmy určené ke krytí defektů sliznice dutiny ústní (Daněk)
- Nádorové onemocnění hlavy a krku – klinické studie, terapie, mikrobiom (Daněk, Bořilová Linhartová)
- 3D Virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti (Daněk)
- **Exkurze na pracoviště**

Organizace předmětu

4. den

- Moderní metody při studiu vývoje a udržování vitality zubu (Křivánek)
 - metody genetického mapování vývojových linií *in vivo*,
 - studium a vyhodnocování transkriptomiky na úrovni jednotlivých buněk,
 - metody hledání nových kmenových buněk,
 - kontinuálně rostoucí zuby – co mají společného s lidskými zuby,
 - využití moderních trojrozměrných zobrazovacích metod (konfokální mikroskopie, uCT, FIB-SEM) při studiu vývoje a vnitřní struktury zubu.
- **Exkurze na pracoviště**

Organizace předmětu

4. den

- Odontogeneze – využití alternativních modelových organizmů (Buchtová)
 - Komparativní odontogeneze (tradiční vs. netradiční modelové organizmy, jejich výhody a nevýhody)
 - Morfogeneze a regulace vývoje náhradních generací zubů
 - Příčiny redukce vývoje náhradních generací u některých modelových organizmů se zaměřením na buněčné a molekulární procesy
- **Exkurze na pracoviště**

Organizace předmětu

5. den

- Translační výzkum v biologických vědách: výzvy a možnosti (Forostyak)
- **Exkurze na pracoviště a praktická část: qPCR** (Deissová, Bořilová Linhartová)
- **Kolokvium** (Bořilová Linhartová)

Základy metodologie při vědecké práci

doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

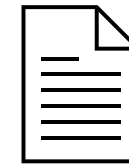
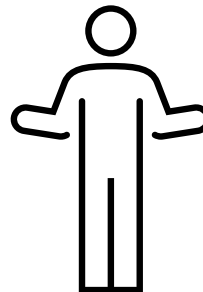
Stomatologická klinika, Ústav patologické fyziologie, Ústav lékařské genetiky,
Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie, Fakultní nemocnice Brno

Obsah přednášky

Základy metodologie při vědecké práci

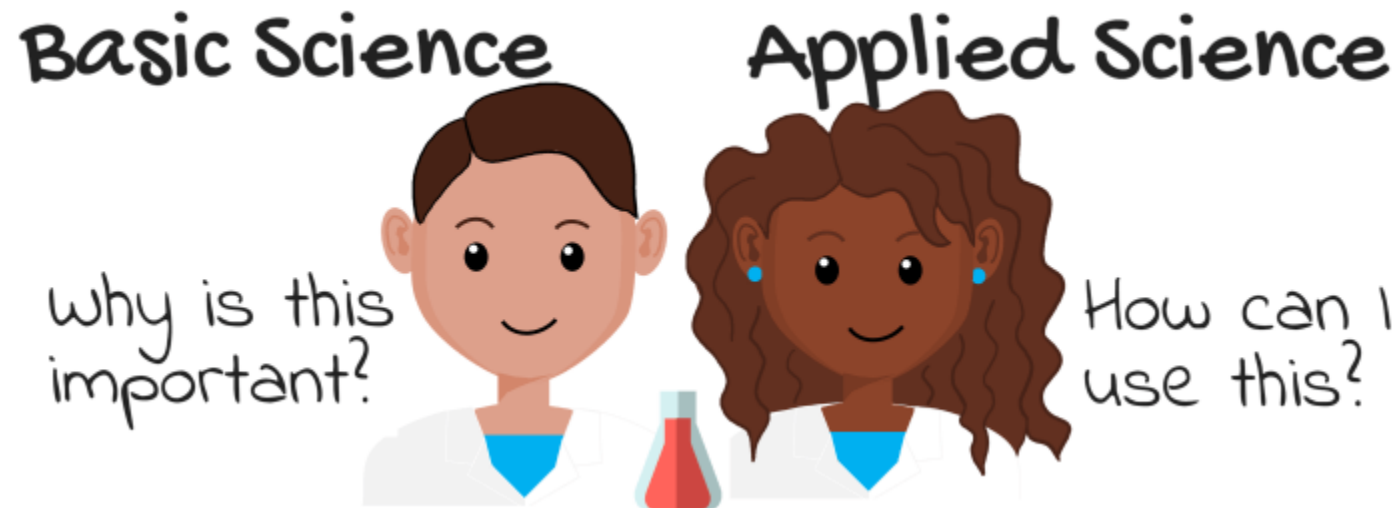
- Motivace
- Úvod
- Práce s odbornou literaturou
- Metodologie výzkumu
- Kvalita výzkumu
- Plánování
- Duševní vlastnictví
- Aplikované výsledky
- Příprava vědecké publikace



Metodologie výzkumu

Výzkum

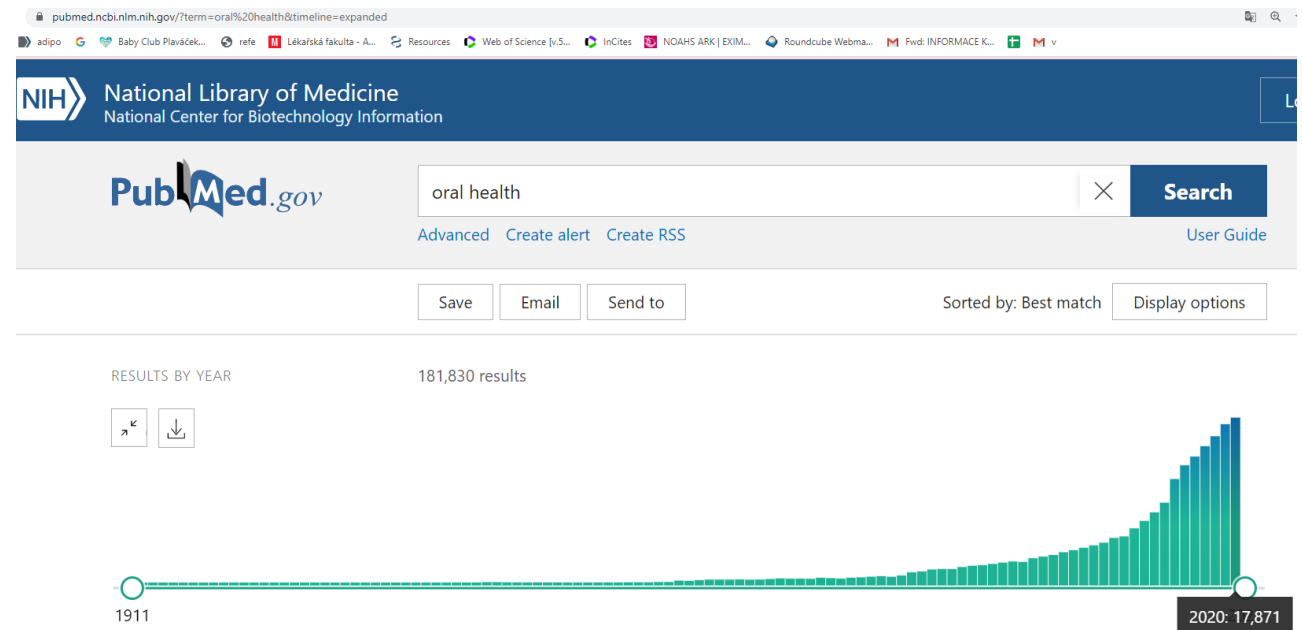
- Základní – badatelský výzkum, cílem je obohatit vědění, řeší klíčové problémy
- Aplikovaný – cílem je využití výsledků v praxi, řeší konkrétní problémy praxe



Metodologie výzkumu

Úvod

- Pro začátek: Co budeme zkoumat?
- Literární rešerše: Co už o daném problému víme? <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Metodologie: Jak budeme výzkum provádět?
 - Jaká data budeme sbírat?
 - Kdo a kde bude data sbírat?
 - Jakým způsobem budeme data sbírat?
 - Jak budeme data analyzovat?

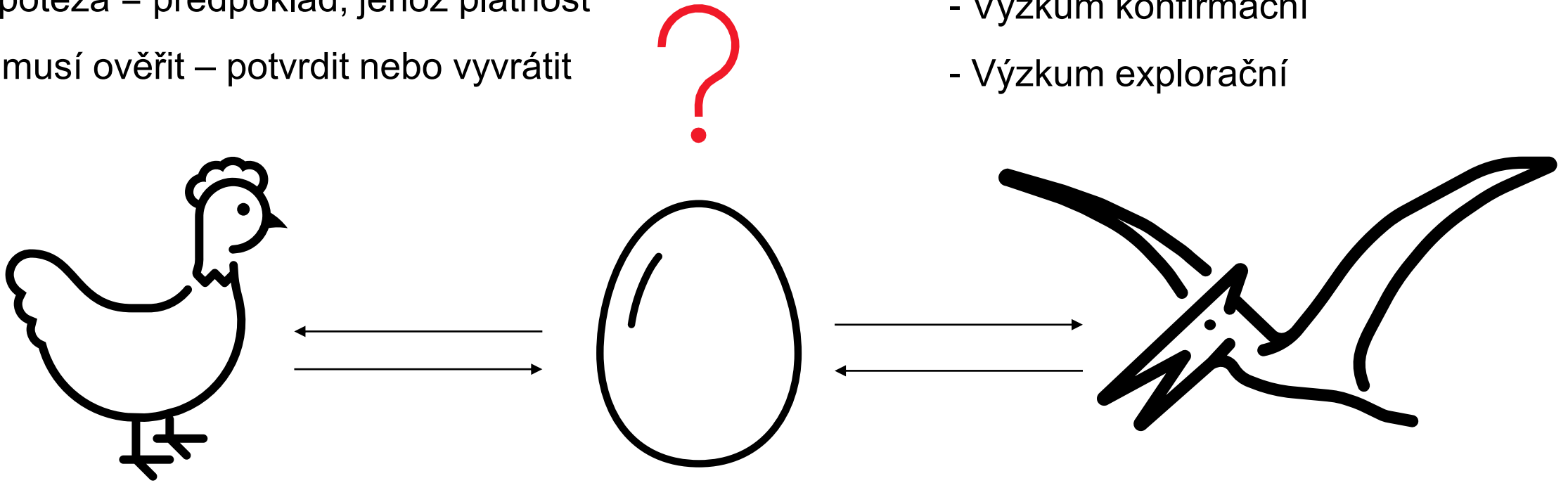


Metodologie výzkumu

Výzkumná filozofie: Hypotéza – data – alternativní hypotéza

- Hypotéza = předpoklad, jehož platnost se musí ověřit – potvrdit nebo vyvrátit

- Výzkum konfirmační
- Výzkum explorační



Metodologie výzkumu

Výzkumný přístup: Induktivní vs. Deduktivní

— Pro začátek: Co budeme zkoumat?

- Provizorní název
- Výzkumné otázky
- Výzkumné cíle

...v souladu s metodikou

— **Pilotní výzkum**

— **Empirický výzkum**

- Pozorování
- Měření
- Experiment
- Dotazník
- Rozhovor
- Analýza dokumentů

— **Teoretický výzkum**

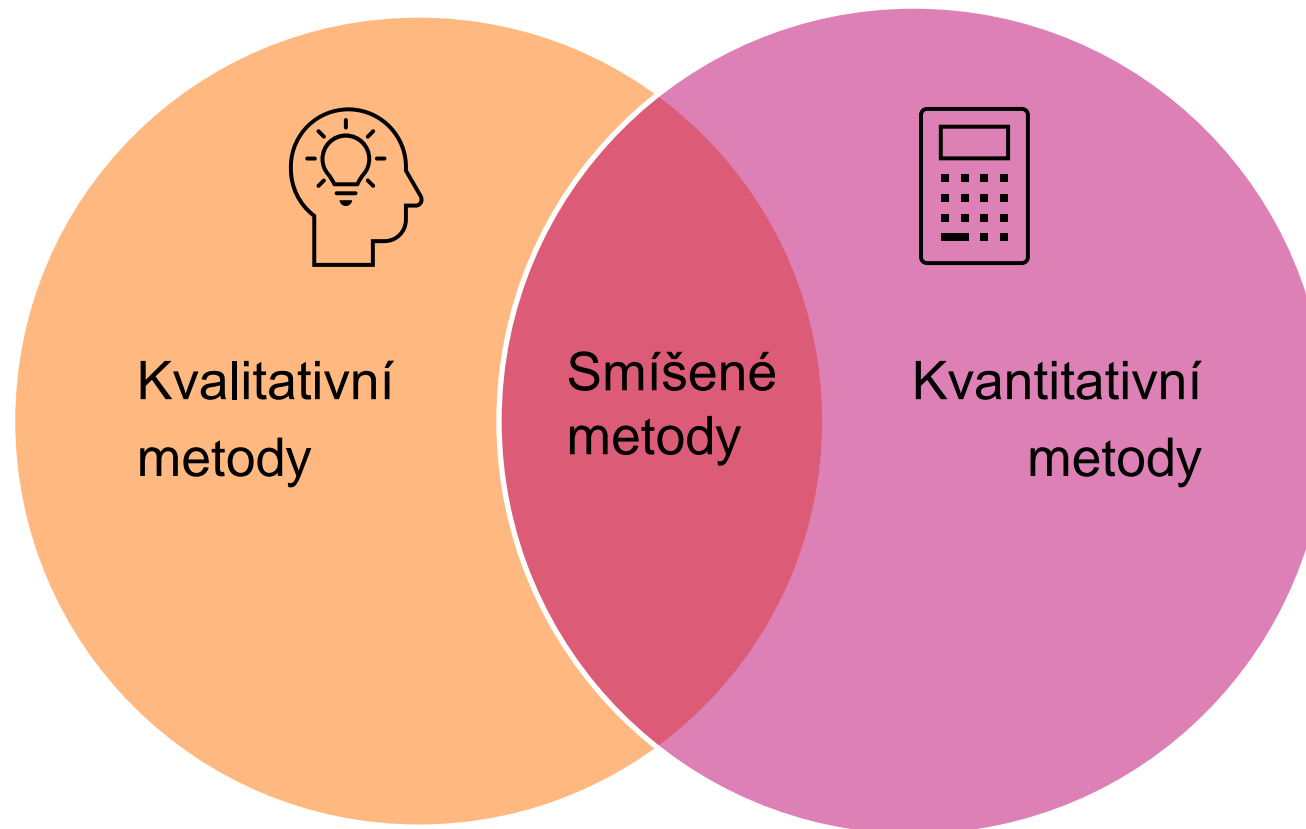
- Analýza
- Syntéza
- Dedukce
- Indukce
- Analogie – porovnání
- Generalizace ...

Metodologie výzkumu

Výzkumná strategie: Metody

Slova, nápady, koncepty

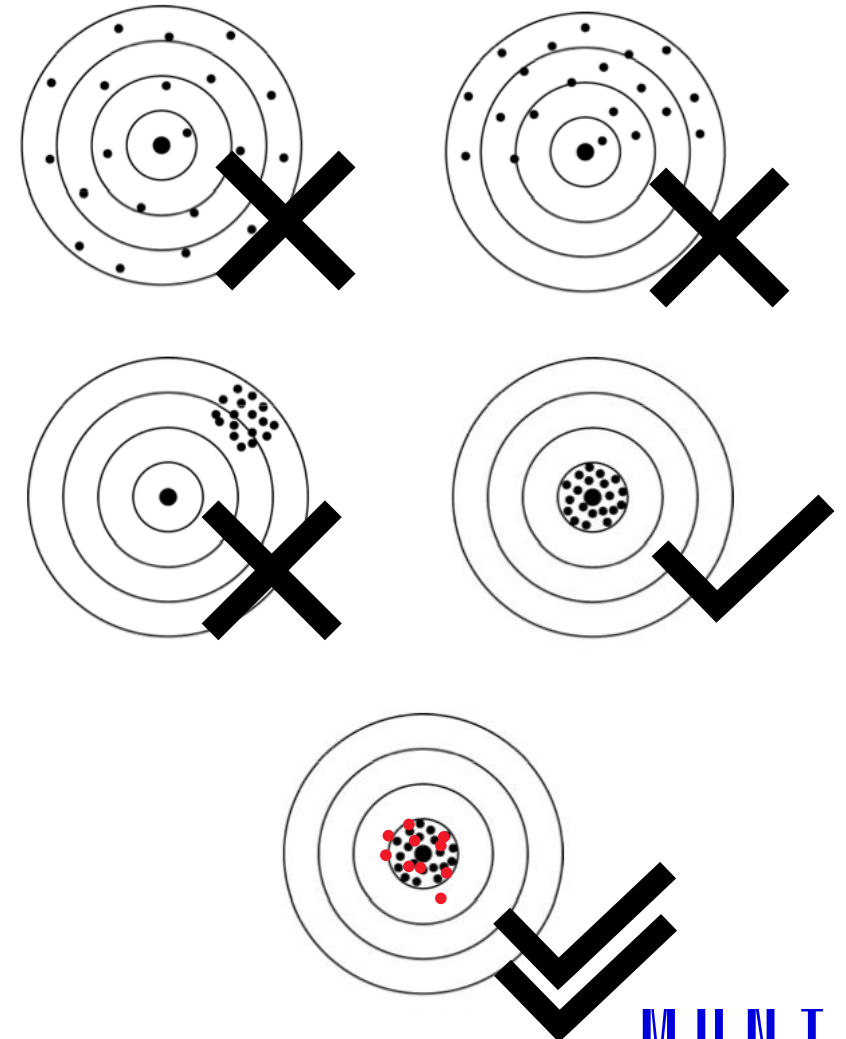
Čísla



Metodologie výzkumu

Kvalita výzkumu

- **Validita** – schopnost výzkumného nástroje zjišťovat nebo měřit právě to, co je záměrem výzkumného pracovníka
- **Reliabilita** – vyjadřuje přesnost a spolehlivost při aplikaci výzkumného nástroje
- **Triangulace** – aby se zvýšila validita výzkumu v těch případech, kdy použití pouze jedné metody nezaručuje, že výsledky jsou dostatečně objektivní a pravdivé



Metodologie výzkumu

Kvalita výzkumu: Reprezentativnost (vzorkování)

Celá populace



Vzorek populace



Metodologie výzkumu

Plánování

<https://www.projectmanager.com/gantt-chart>

GANTT CHART		2020		2021				2022				2023		
		5 - 9	10 - 12	1 - 3	4 - 6	7 - 9	10 - 12	1 - 3	4 - 6	7 - 9	10 - 12	1 - 3	4 - 9	10 - 12
CÍL I) (W)	Testování vhodných metod výroby expandující zubní nitě.													
CÍL II) (TUL)	Selekce vhodného nanomateriálu a parametrů zvláknování.													
CÍL III) (LF MU)	Selekce a testování antimikrobiálního potenciálu tělu vlastních bioaktivních látek na vybrané bakteriální kmeny asociované se zubním kazem a parodontitidou.													
CÍL IV) (TUL)	Obohacení vybraného nanomateriálu bioaktivními látkami.													
CÍL V) (LF MU)	Ověření účinnosti antimikrobiálních vlastností obohaceného nanomateriálu v simulovaných in vivo podmínkách.													
CÍL VI) (LF MU)	Klinické testování beta verze produktu v designu cross-over.													
CÍL VII) (W)	Vytvoření funkčního vzorku komerčního produktu s definovanými vlastnostmi a zkušební poloprovoz.													
CÍL VIII) (UO)	Testování efektivity odstraňování zubního plaku a šetrnosti vůči zubní sklovině													

Metodologie výzkumu

Duševní vlastnictví

- Produkt nebo forma vyjádření vytvořená vlastním intelektem, která je nová a unikátní (např. literární dílo, počítačový software, pracovní postup, chemický vzorec, oběhový cyklus, lék, geneticky modifikovaný organismus, průmyslový postup) je výsledkem duševní tvůrčí práce
- jde o vlastnictví nehmotné (nehmotný majetek, nehmotný statek)
- některé druhy duševního vlastnictví lze formálně chránit (různými způsoby dle povahy duševního vlastnictví)
- výsledky činnosti, které původce (autor) vytvořil při plnění úkolů plynoucích z jeho pracovního poměru k MU (jiného obdobného vztahu k MU), příp. v rámci studijních povinností

Metodologie výzkumu

Duševní vlastnictví

- Průmyslové vlastnictví technická řešení (např. vynálezy) a jejich ochrana (patenty, užitné vzory) průmyslové vzory, ochranné známky...
- Duševní vlastnictví chráněné zvláštními právními předpisy důvěrné informace, obchodní tajemství, know-how...
- Autorská díla a databáze vědecká díla (publikace, vědecké práce), software...



Metodologie výzkumu

Autorství

- **Autor** je někdo, kdo **podstatně intelektuálně přispěl k vzniku daného díla**.
- Autorské práva – práva autora k jeho dílu, práva související s právem autorským, a právo pořizovatele k jím pořízené databázi.
- Pořadí autorů by mělo být společným rozhodnutím všech autorů, mělo by odrážet míru přispění na textu publikace a měli by ho být schopni vysvětlit.
- První autor by měl být autor, který k vzniku a výsledkům publikace přispěl nejvíce.
- Korespondenční autor se obvykle uvádí jako první nebo poslední, dle zvyklostí v daném oboru.

Metodologie výzkumu

Aplikované výsledky

- Patent
- Užitný vzor
- Průmyslový vzor
- Prototyp
- Funkční vzorek ...

– Transfer technologií (TT)

- přenos výsledků výzkumu a vývoje do praxe
- proces převádění různých technologií (hl. technických řešení a vědeckovýzkumných poznatků a zkušeností) z univerzitního prostředí směrem do praxe a naopak
- formy TT(a znalostí):
 - poskytování práv k užívání (licence)
 - vznik spin-off společností s majetkovou účastí univerzity
 - prodej práv, kontrahovaný výzkum, kolaborativní výzkum, poskytování služeb a konzultací...



<https://www.ctt.muni.cz/>

Metodologie výzkumu

Příprava vědecké publikace

- Téma a obor?
- Typ publikačního výstupu?
- **Kde publikovat?**
- **Jak začít psát manuskript?**
 - formální
 - obsahová
 - vizuální stránka
- **Revize a jazyková korekce**
- **Recenzní řízení**

Web of Knowledge

Web of Science InCites Journal Citation Reports Essential Science Indicators EndNote Publons Kopernio Master Journal List						
Web of Science						
Citing Category Data						
	Cited Journal	# Citing Journals	All Yrs ▼	2019	2018	2017
1	ALL Journals	91	344,971	3,801	16,820	24,193
2	J ENDODONT	83	8,635	85	377	773
3	CLIN ORAL IMPLAN ...	84	8,519	20	378	636
4	J DENT RES	91	7,884	67	279	414
5	J CLIN PERIODONTOL	89	7,641	67	451	471
6	J PERIODONTOL	88	7,430	59	311	261
7	J PROSTHET DENT	83	6,972	58	352	403
8	AM J ORTHOD DENT...	85	6,900	52	154	246
9	DENT MATER	80	6,700	49	317	406
10	J ORAL MAXIL SURG	84	6,156	67	204	334
11	INT J ORAL MAX IMPL	82	5,513	33	160	333
12	OR SURG OR MED ...	91	5,197	24	119	135
13	J DENT	90	5,091	67	301	341
14	INT ENDOD J	74	3,988	78	327	339
15	INT J ORAL MAX SU...	80	3,606	59	186	283
16	CLIN ORAL INVEST	90	3,419	190	428	448

Úrovně důkazů v Zubním lékařství

MDDr. Filip Hromčík

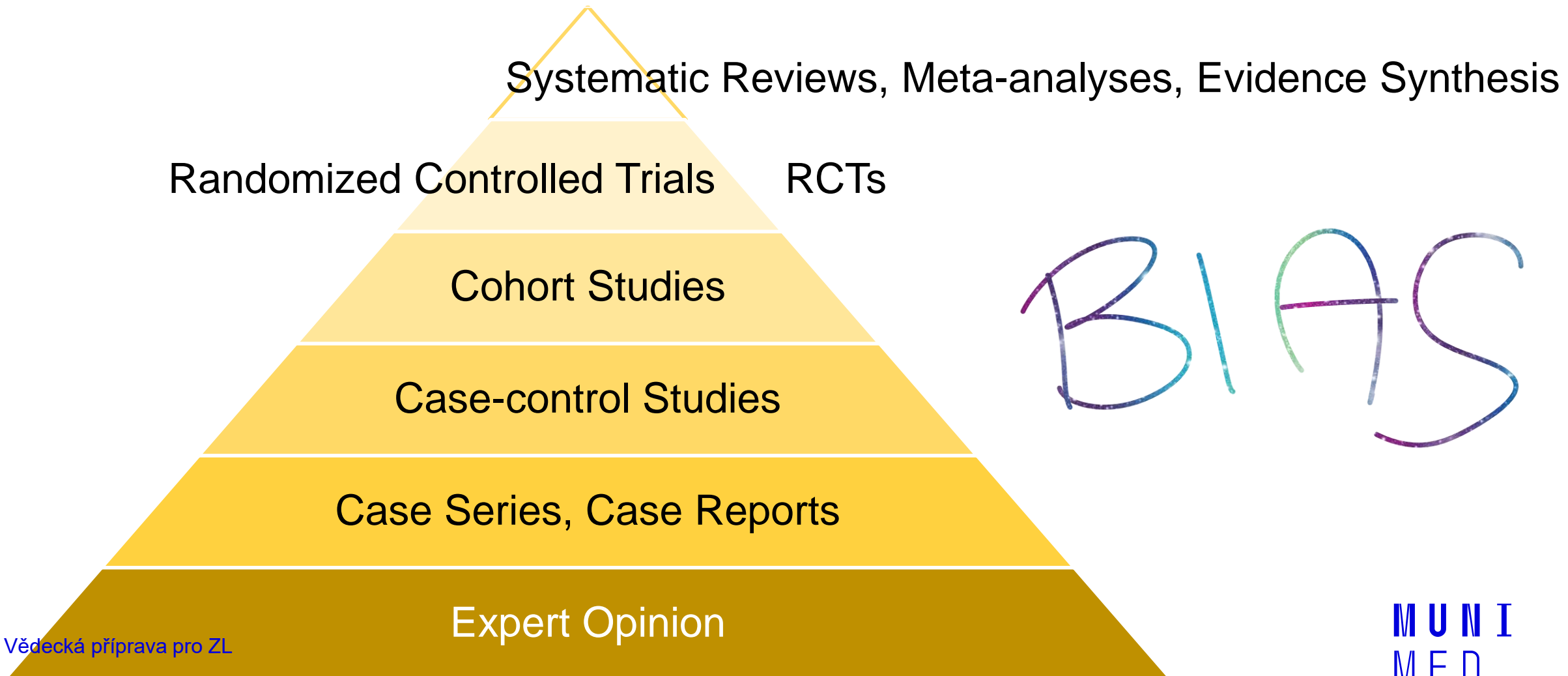
Stomatologická klinika, Fakultní nemocnice u svaté Anny
Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

Obsah přednášky

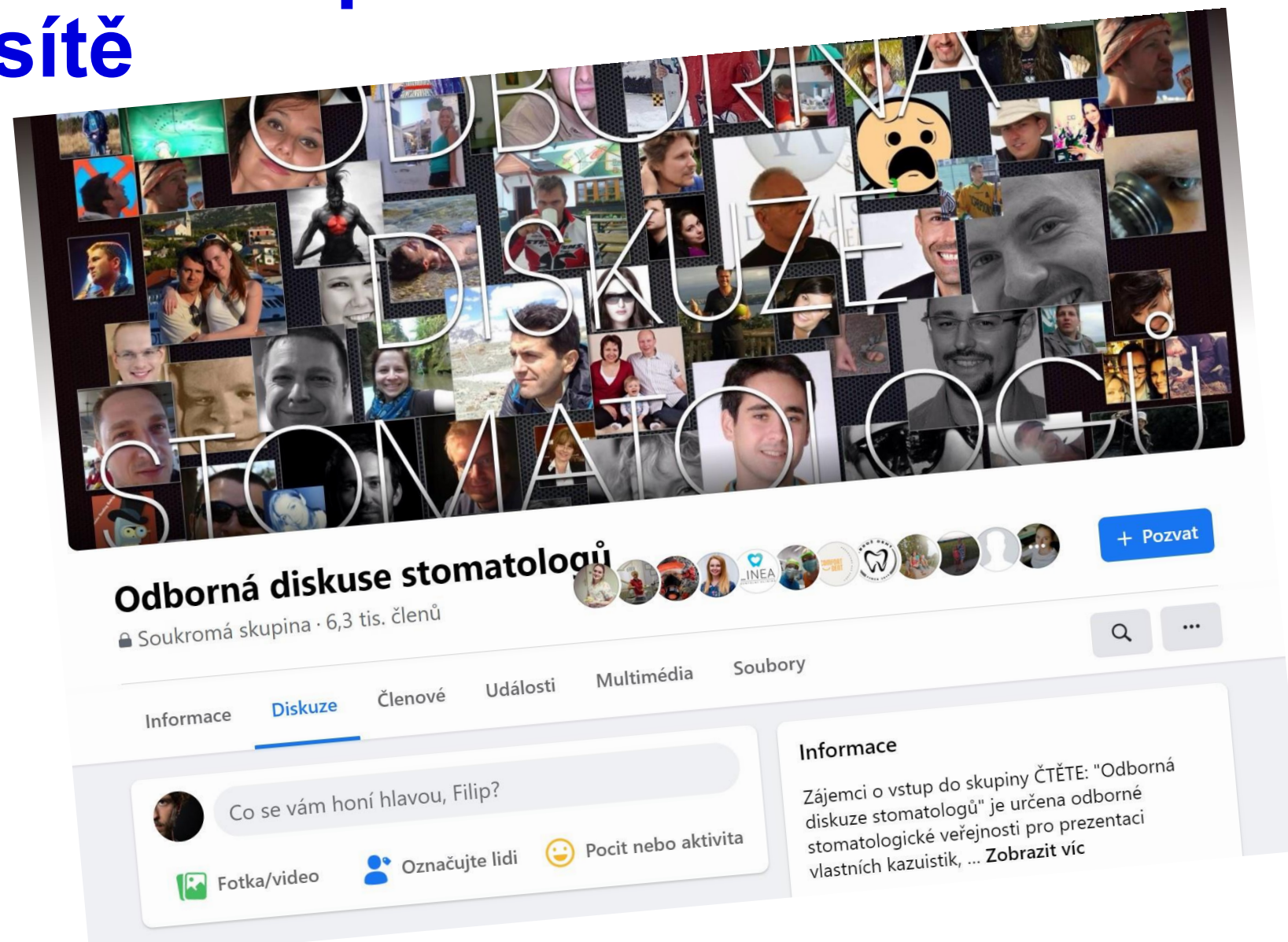
Úrovně důkazů v ZL

- Levels of evidence
- Příklady zdrojů informací
- Nácvik hodnocení zdrojů
- Orientace v článku
- Kde hledat odpovědi, kde publikovat
- Akademický výzkum vs. věda v soukromé praxi
- Vlastní vědecká otázka
- Opakování

Levels of evidence, úrovně důkazů



Zdroje informací pro zubního lékaře: sociální sítě



Zdroje:

Přednášky a kurzy

SOBOTA 5. 10. 2019		
KONGRESOVÝ SÁL	9.00 – 10.15	Panelová diskuze Resekce kořenového hrotu a její místo v současné stomatologii
	10.15 – 10.45	prestávka
	10.45 – 12.00	Využití CAD/CAM technologie pro částečně snímatelné náhrady <i>Jürgen Manfred Setz, Německo</i>
	12.00 – 13.00	oběd
	13.00 – 14.15	Zubní péče pro geriatrické pacienty <i>Frauke Müller, Švýcarsko</i>
	14.15 – 14.45	prestávka
	14.45 – 16.00	Rizika a postupy ošetření extrakční rány <i>Imre György Borzási, Maďarsko</i>
PŘEDNÁŠKOVÝ SÁL 1	9.00 – 9.30	Antibiotika v dětském zubním lékařství <i>Vlasta Merglová, Romana Koberová Ivančaková</i>
	9.30 – 10.00	Já děti nedělám. Je potřeba ošetřovat dočasné zuby? <i>Romana Koberová Ivančaková, Vlasta Merglová</i>
	10.00 – 10.30	Ortodoncie předškolního věku <i>Magdalena Kotová</i>
	10.30 – 11.00	prestávka
	11.00 – 11.30	Ošetřování úrazů dočasných zubů podle doporučení <i>Přemysl Krejčí</i>
	11.30 – 12.00	Úrazy obličejové oblasti u dětí <i>Ortognátní operace u rozštěpového pacienta v růstu</i>
	12.00 – 13.00	oběd
	13.00 – 13.45	Management retinovaných zubů u dětí aneb Kdy je autotransplantace metodou volby <i>Karin Klimo Kaňovská, Pavlína Černochová</i>
	13.45 – 14.15	Prefabrikované korunky v dětské stomatologii <i>Jana Vašáková</i>
	14.15 – 14.45	prestávka
	14.45 – 15.30	Ortognátní operace u rozštěpového pacienta v růstu <i>Jiří Borovec</i>
	15.30 – 16.15	Lesk a bída autotransplantací <i>Jiří Palek</i>

Case report

148 | ODBORNÉ SDĚLENÍ

OŠETŘENÍ DOSPÍVAJÍCÍHO PACIENTA S JEDNÍM NEZALOŽENÝM A JEDNÍM ČÍPKOVITÝM HORNÍM POSTRANNÍM ŘEZÁKEM

Kazuistika

Jan Hulvert, Martin Tomeček, Jan Streblov
3DK dentální klinika, s. r. o., Praha

O AUTORECH



MDDr. Jan Hulvert (*1992) v roce 2017 absolvoval obor stomatologie na 1. LF UK v Praze. Po absolutoriu pracoval v soukromých ordinacích v Táboře u MUDr. Ilij Buzadžieva a v Praze u MUDr. Alice Matlové. Od července roku 2018 pracuje na dentální klinice 3DK. Je členem České akademie dentální estetiky a pravidelně se účastní vzdělávacích akcí jak českých, tak zahraničních. V letech 2019 a 2020 vyhrál soutěž o nejlepší estetickou rekonstrukci roku.

Kontakt:
hulvert@3dk.cz
3DK, s. r. o.
U Zdravotního Ústavu 21
100 00 Praha 10



MUDr. Martin Tomeček (*1978) po promoci (2002) pracoval v zubních ordinacích v Praze a Dubaji (UAE). V roce 2010 spoluzaložil s MUDr. Janem Streblovem dentální kliniku 3DK. Ve své profesní dráze se zaměřuje především na implantologii, estetickou a protetickou stomatologii. V roce 2016 absolvoval kurikulum implantologie a kostní regenerace „Regenerator Program“ profesora Istvana Urbana (Urban regeneration institute & Szeged University, Budapešť, HU). S velkým zapálením se věnuje dentální fotografii, interakci světla a materiálů. Je certifikovaným členem České akademie dentální estetiky. V přednáškové činnosti je autorem mnoha přednášek a praktických kurzů na téma kostní augmentace a dentální implantologie, managementu měkkých tkání, dentální fotografie, protetiky a dalších témat. Přednášel na konferencích v České a Slovenské republice, Švýcarsku, Portugalsku, Itálii.



MUDr. Jan Streblov (*1978) po promoci (2003) pracoval v Pražském centru dentální implantologie a v roce 2010 založil spolu s dr. Tomečkem dentální kliniku 3DK. Věnuje se zejména parodontologii, implantologii a komplexním rekonstrukcím. Jako dlouholetý člen České akademie dentální estetiky a její současný prezident se podílí na rozvoji mezioborové spolupráce s ortodontisty a dalšími specialisty. Přeložil několik odborných knih, je autorem publikací a mnoha přednášek a kurzů na téma parodontologie, implantologie, plastické chirurgie parodontu, autotransplantace zubů a dalších. Přednášel na konferencích v Česku, na Slovensku, v Německu, Velké Británii a Švýcarsku.

SOUHRN: Estetické řešení anomálie počtu a tvaru zubů ve frontálním úseku u dětských a dospívajících pacientů s sebou nese několik specifík. Mezi ta nejvýznamnější patří pokračující vývoj čelistí, často vysoká linie úsměvu a požadavek na minimálně invazivní ošetření. Tato kazuistika popisuje ošetření dospívajícího pacienta s nezaloženým pravým a čípkovitým levým horním postranním řezákem a diskutuje otázky s touto terapií spojené.

Klíčová slova: adhezivní můstek, ageneze, čípkovitý zub, keramika, rolovaný lalok, RBFDP, horní postranní řezák, přímá kompozitní dostavba

treatment of an adolescent patient with a peg shaped left upper lateral incisor and agenesis of the right upper lateral incisor. Questions related to this type of treatment are being discussed.
Key words: adhesive cantilever bridge, agenesis, peg shaped tooth, ceramics, modified roll flap technique, RBFDP, upper lateral incisor, direct composite restoration

LKS. 2020; 30(9): xxxx – xxxx

Oproti tomu jednoduchý adhezivní můstek lze použít u pacientů přibližně od 10. roku života, nebrání totiž transverzálnímu růstu čelisti a nevylučuje případnou budoucí ortodontickou léčbu. Dalšími výhodami jsou menší finanční a časová náročnost a také možnost provést toto ošetření i v situaci, která není pro implantaci vhodná. Příkladem může být mezera menší než 7 mm, nevhodná angulace kořenů ohraničujících mezeru apod. (tab. 1).
Následující text podrobně popisuje postup při úpravě tvaru čípkovitého zubu a zhotovení jednoduchého adhezivního můstku včetně úpravy měkkých tkání pod mezičlenem.

Implantát	Jednoduchý adhezivní můstek
Ošetření nejlépe až po 25. roku života	Možné zhotovit již od 10. roku života

[Hulvert et al., 2020](#)

Case series

Dental Medicine, Medical Center –
University of Freiburg, Faculty of Medicine –
University of Freiburg, Freiburg, Germany

²Center for Medical Biometry and Medical
Informatics, Institute for Medical Biometry
and Statistics, Medical Center – University of
Freiburg, Faculty of Medicine – University of
Freiburg, Freiburg, Germany

Correspondence

Benedikt C. Spies, Department of Prosthetic
Dentistry, Medical Center – University of
Freiburg, Freiburg, Germany.
Email: benedikt.spies@uniklinik-freiburg.de

Funding information

Ivoclar Vivadent

Abstract

Objective: To evaluate the clinical and patient-reported outcome of all-ceramic zirconia implant supported fixed dental prostheses (FDPs) 5 years after implant installation.

Materials and methods: Thirteen patients were treated with two terminally placed one-piece zirconia implants for a three-unit FDP each. The FDPs consisted of a CAD/CAM-fabricated zirconia framework over-pressed with a fluor-apatite veneering ceramic and were adhesively cemented. Survival and success were assessed by applying modified US Public Health Service (USPHS) criteria and preparation of Kaplan–Meier (KM) plots. Alpha and Bravo ratings were accepted for success (among others including small area veneer chippings and occlusal roughness), whereas Charlie ratings allowing for intra-oral correction (e.g., polishing) were accepted for survival. Furthermore, patient-reported outcome measures (PROMs) were analyzed with the help of visual analogue scales (VAS). Wilcoxon matched-pairs signed-rank test (USPHS criteria) and linear mixed models (PROMs) were used to evaluate time effects on response variables.

Results: All patients were available 61.8 ± 1.1 months after implant installation (53.6 ± 3.1 months after final prosthesis insertion). FDP survival was 100%. Significant incidence of veneer chipping ($p = .0096$) and occlusal roughness ($p = .0019$) was observed. Charlie rated extent of both phenomena resulted in a KM success estimate of 38.5% (95% CI: 14.1%–62.8%; seven FDPs with obvious roughness, three of them with extended veneer chipping). Compared with the pre-treatment assessments (30%–81% of satisfaction), all surveys at prosthetic delivery showed significantly improved VAS scores (66%–93%; $p \leq .038$), except for speech ($p = .341$). Concerning function, esthetics and self-esteem, no decrease in satisfaction could be observed until the end of follow-up (90%–96%; $p \geq .057$), whereas perception of sense (92%) and speech (95%) increased over time ($p \leq .030$). Occurrence of technical complications did not correlate with patient satisfaction.

Conclusions: Bi-layered FDPs made from zirconia/fluor-apatite highly satisfied patients but showed significant incidence of technical complications.

KEYWORDS

CAD-CAM, case series, coronal

Cohort study

A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years

Domenico Ricucci, MD, DDS,^a John Russo, DMD,^b Michael Rutberg, DMD,^c Josef A. Burleson, PhD,^d and Larz S. W. Spångberg, DDS, PhD,^e Rome, Italy; and Farmington, Connecticut
UNIVERSITY OF CONNECTICUT

Objective. The purpose of this prospective study was: 1) to follow-up a large number of endodontic treatments performed by a single operator, periodically checked over a 5-year period; and 2) to correlate outcome to a number of clinical variables.

Study design. This prospective study included all consecutive cases during the selected time period. All cases were followed regularly for a 5-year period. At the 5-year end point of the study, 470 patients with 816 treated teeth and with 1,369 treated root canals were available for evaluation.

Results. The overall rate of success among the 816 teeth/1,369 root canals available for evaluation was 88.6%/90.3%. The success rate for 435 teeth/793 root canals undergoing vital pulp therapy was 91.5%/93.1%. Teeth/root canals with necrotic pulp but without detectable periapical bone lesion were successfully treated in 89.5%/92.3%. If the pulp necrosis was complicated by apical periodontitis, the success rate fell to 82.7% for the teeth and 84.1% for the root canals ($P = .037$). Teeth with periapical lesion <5 mm had a success rate of 86.6%, and in cases where the lesion was ≥ 5 mm the rate of success was 78.2%.

Conclusions. More severe disease conditions negatively affects outcome. An optimal working length was identified. Excess of root canal filling material decreases success. Infected pulp space should be treated with an effective intracanal dressing. The quality of the coronal restoration or the placement of intracanal post retentions does not affect treatment outcome. (Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011;112:825-842)

RCT

HUMAN RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL

Omega-3 PUFA and aspirin as adjuncts to periodontal debridement in patients with periodontitis and type 2 diabetes mellitus Randomized clinical trial

Nidia C. Castro dos Santos^{1,2,3} | Naira M. R. B. Andere¹ | Cássia F. Araujo¹ | Marco¹ | Alpdogan Kantarci² | Thomas E. Van Dyke² | Mauro P. Santamaria

¹Division of Periodontics, Unesp – São Paulo State University, Institute of Science and Technology, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

²Center for Clinical and Translational Research, The Forsyth Institute, Cambridge, Massachusetts, United States

³Dental Research Division, Guarulhos University, Guarulhos, São Paulo, Brazil

Correspondence

Mauro P. Santamaria, Principal investigator, Division of Periodontics, Institute of Science and Technology, São Paulo State University (Unesp), Av. Eng. Francisco José Longo, 777, São José dos Campos, SP 12245-000, Brazil. Email: mauro.santamaria@unesp.br

Abstract

Background: Supplementation with omega-3 polyunsaturated PUFA and low-dose aspirin (ASA) have been proposed as a host men to control chronic inflammatory diseases. The aim of this study the clinical and immunological impact of orally administered ω -3 PUFA adjuncts to periodontal debridement for the treatment of periodontitis in type 2 diabetes.

Methods: Seventy-five patients (n = 25/group) were randomly assigned to receive placebo and periodontal debridement (CG), ω -3 PUFA + ASA (3 g of fish oil/d + 100 mg ASA/d for 2 months) *after* periodontal debridement (test group [TG]1), or ω -3 PUFA + ASA (3 g of fish oil/d + 100 mg ASA/d for 2 months) *before* periodontal debridement (TG2). Periodontal parameters and GCF were collected at baseline (t0), 3 months after periodontal debridement and ω -3 PUFA + ASA and CG (t1), after ω -3 PUFA + ASA (before periodontal debridement) for TG2 (t1), and 6 months after periodontal debridement (all groups) (t2). GCF cytokine levels by multiplex ELISA.

Results: Ten patients (40%) in TG1 and nine patients (36%) in TG2 achieved the clinical endpoint for treatment (less than or equal to four sites with probing depth ≥ 5 mm), as opposed to four (16%) in CG. There was clinical attachment gain in moderate and deep pockets for TG1. IFN- γ and interleukin (IL)-8 levels decreased over time for both test groups. IL-6 levels were lower for TG1. HbA1c levels reduced for TG1.

Conclusion: Adjunctive ω -3 and ASA after periodontal debridement provides clinical and immunological benefits to the treatment of periodontitis in patients with type 2 diabetes.

KEYWORDS

aspirin, diabetes, immunomodulation, inflammation, omega-3 fatty acids, periodontitis

Abstract

Background: Supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFA) and low-dose aspirin (ASA) have been proposed as a host modulation regimen to control chronic inflammatory diseases. The aim of this study was to investigate the clinical and immunological impact of orally administered ω -3 PUFA and ASA as adjuncts to periodontal debridement for the treatment of periodontitis in patients with type 2 diabetes.

Methods: Seventy-five patients (n = 25/group) were randomly assigned to receive placebo and periodontal debridement (CG), ω -3 PUFA + ASA (3 g of fish oil/d + 100 mg ASA/d for 2 months) *after* periodontal debridement (test group [TG]1), or ω -3 PUFA + ASA (3 g of fish oil/d + 100 mg ASA/d for 2 months) *before* periodontal debridement (TG2). Periodontal parameters and GCF were collected at baseline (t0), 3 months after periodontal debridement and ω -3 PUFA + ASA or placebo for TG1 and CG (t1), after ω -3 PUFA + ASA (before periodontal debridement) for TG2 (t1), and 6 months after periodontal debridement (all groups) (t2). GCF was analyzed for cytokine levels by multiplex ELISA.

Results: Ten patients (40%) in TG1 and nine patients (36%) in TG2 achieved the clinical endpoint for treatment (less than or equal to four sites with probing depth ≥ 5 mm), as opposed to four (16%) in CG. There was clinical attachment gain in moderate and deep pockets for TG1. IFN- γ and interleukin (IL)-8 levels decreased over time for both test groups. IL-6 levels were lower for TG1. HbA1c levels reduced for TG1.

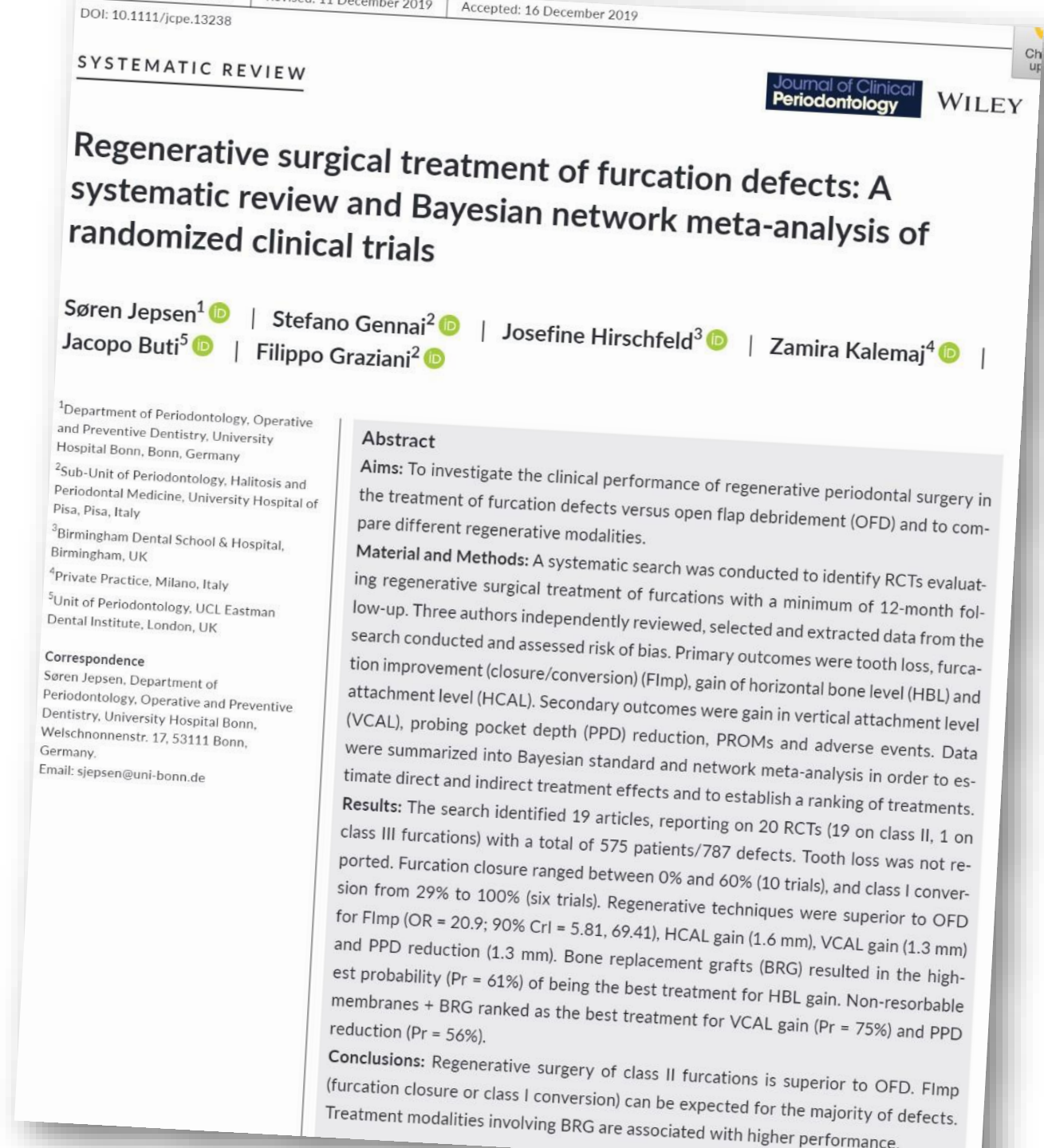
Conclusion: Adjunctive ω -3 and ASA after periodontal debridement provides clinical and immunological benefits to the treatment of periodontitis in patients with type 2 diabetes.

KEYWORDS

aspirin, diabetes, immunomodulation, inflammation, omega-3 fatty acids, periodontitis

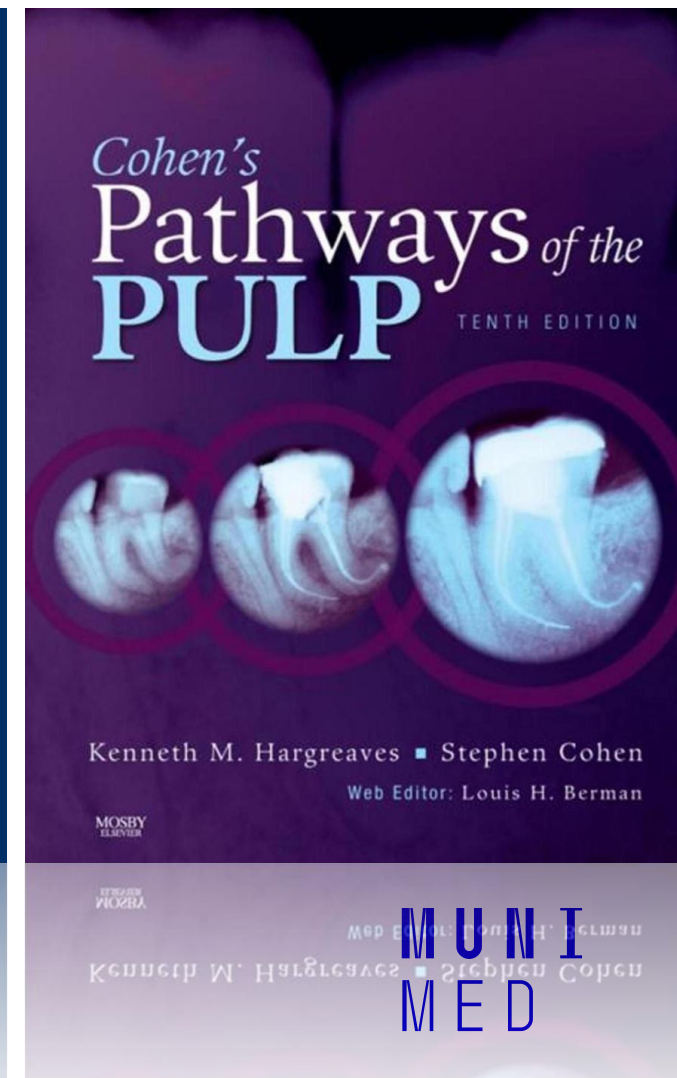
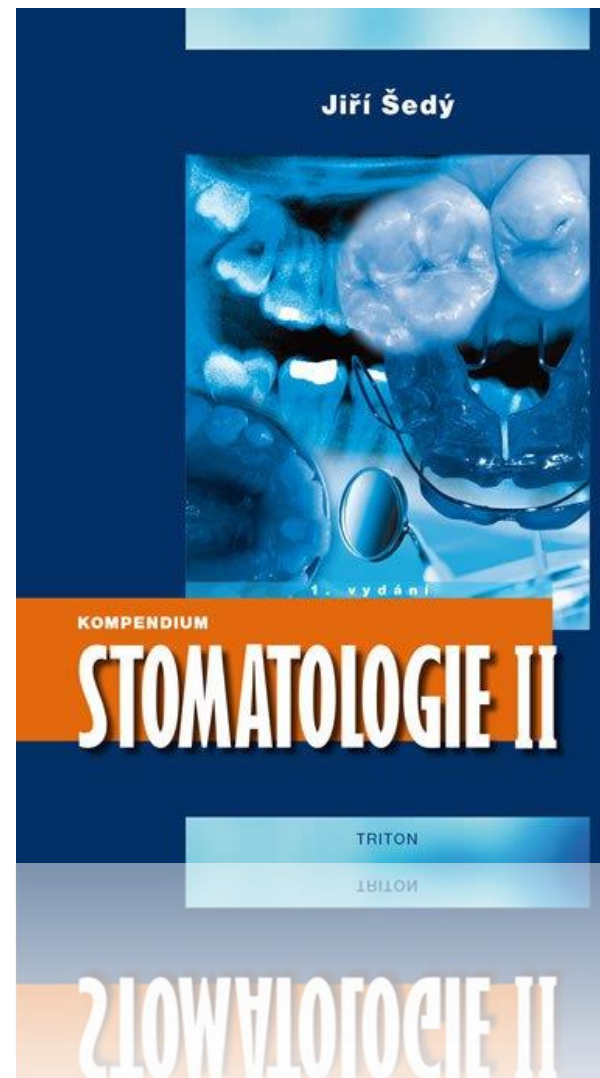
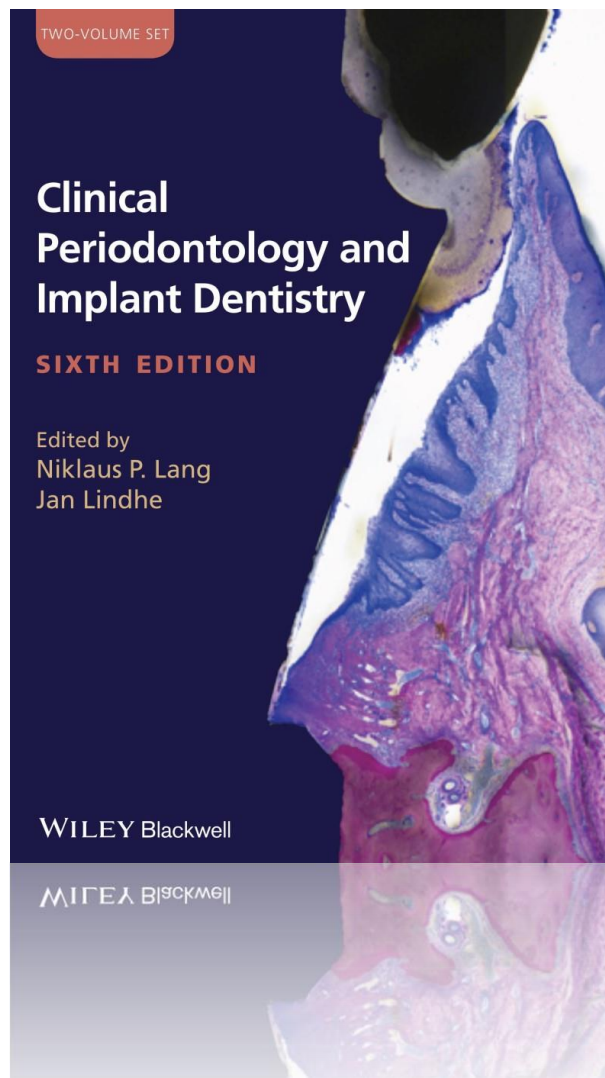
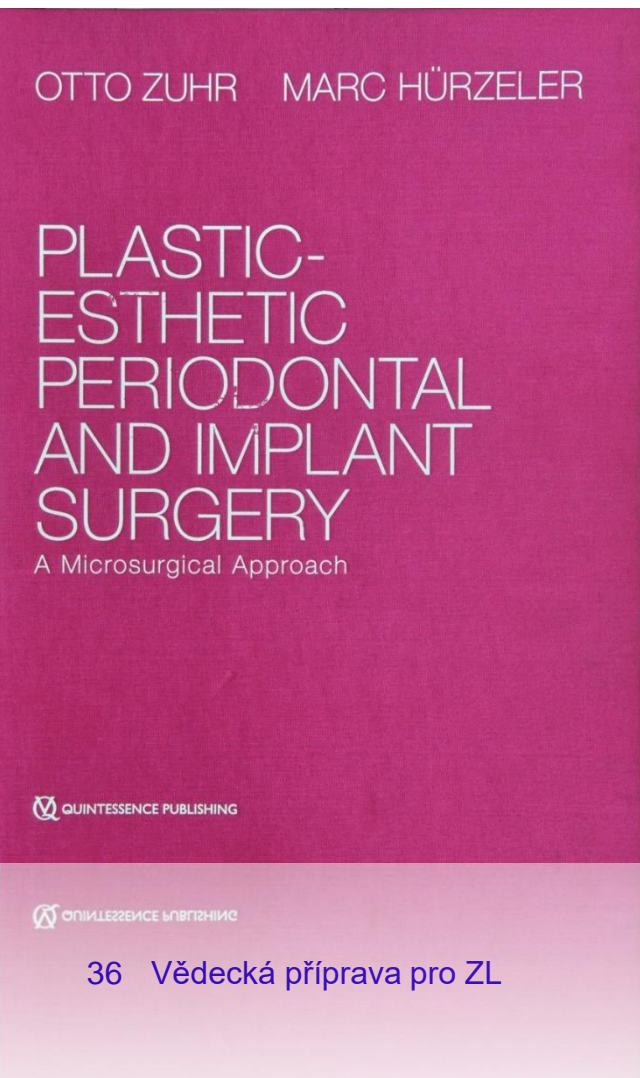
Meta-analýza, systematická review

[Jepsen et al. 2020](#)



Učebnice

Směs důkazů různé úrovně



PLASTIC- ESTHETIC PERIODONTAL AND IMPLANT SURGERY

A Microsurgical Approach

QUINTESSENCE PUBLISHING

[Zuhr et Hürzeler 2012, s. 30](#)

Individuals with the thin gingival biotype have a high risk of developing gingival recession on buccal tooth surfaces and in the papillary region after prosthetic, orthodontic, and surgical interventions. Conversely, individuals with the thick gingival biotype are less susceptible to gingival recession but have an increased risk of inflammation and pocket formation following treatment.^{76,78-80}

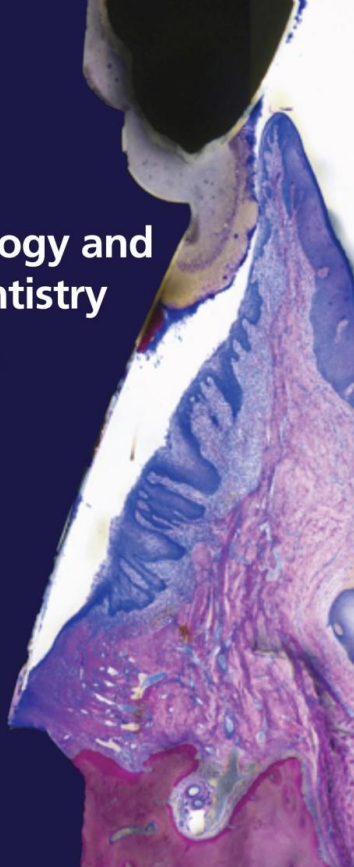
The classification of thick and thin gingival biotypes is subjective and operator dependent because the borderline between what constitutes the different biotypes can be unclear (Fig 1-31). Based on clinical experience, there seems to be a direct correlation between tooth morphology and gingival biotype. Therefore, it would seem that tooth morphology could be useful as an objective parameter of gingival biotype, as was proposed by *Olsson et al.*^{76,77} However, there is no scientific evidence confirm-

Clinical Periodontology and Implant Dentistry

SIXTH EDITION

Edited by
Niklaus P. Lang
Jan Lindhe

WILEY Blackwell



[Lang et Lindhe, 2015](#)

smoking is much greater than that due to other systemic predispositions, such as diabetes mellitus. Data derived from the NHANES III study (Tomar & Asma 2000) suggested that as many as 42% of periodontitis cases in the US can be attributed to current smoking and another 11% to former smoking. Similarly, a study from Brazil (Susin *et al.* 2004b) reported that the attributable fraction of clinical attachment loss due to cigarette smoking was 37.7% and 15.6% among heavy and moderate smokers, respectively. In longitudinal studies, smoking has been found to confer a statistically significant increased risk for periodontitis progression after adjustment for other co-variables (Beck *et al.* 1995, 1997; Machtei *et al.* 1999; Norderyd *et al.* 1999; Chen *et al.* 2001; Ogawa *et al.* 2002; Paulander *et al.* 2004b).

Figure 7-4 shows an early *meta-analysis* of data from studies reporting on the association between smoking and periodontal conditions. In essence, meta-analysis is a statistical method which combines results from different studies of similar design, in order to achieve increased *power* to detect epidemiologic associations that may be difficult to identify in smaller, individual studies (Oakes 1993; Chalmers 1993; Proskin & Volpe 1994). This analysis, initially published as part of the 1996 World Workshop in Periodontics (Papapanou 1996), incorporated data from six studies, including a total of 2361 subjects with known smoking habits and periodontal status (Bergström & Eliasson 1989; Haber & Kent 1992; Locker 1992; Haber *et al.* 1993; Stoltenberg *et al.* 1993; Grossi *et al.* 1994). It can be observed that smoking was an overall increased, statistically and clinically, significant risk for severe disease (estimated overall

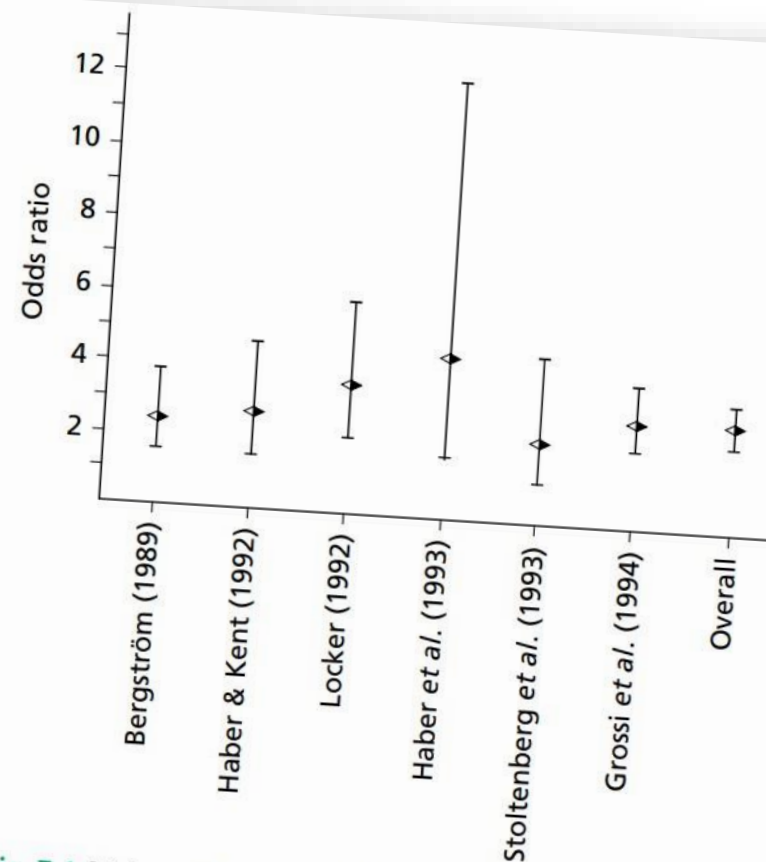


Fig. 7-4 Meta-analysis of smoking as a risk factor for periodontal disease. The studies included are: Bergström (1989), Haber & Kent (1992), Locker (1992), Haber *et al.* (1993), Stoltenberg *et al.* (1993), and Grossi *et al.* (1994). Bars indicate the 95% confidence limits for the depicted odds ratios. (Source: Papapanou 1996. Reproduced from American Academy of Periodontology.)

1994; Kaldahl *et al.* 1996; Grossi *et al.* 1997; Kinane & Radvar 1997; Tonetti *et al.* 1998; Trombelli *et al.* 2003, Stavropoulos *et al.* 2004; Paulander *et al.* 2004a; Rieder *et al.* 2004; Sculean *et al.* 2005; Wan *et al.*, 2009). Notably, these studies have confirmed the negative effect of smoking on the outcome of

Cvičení: orientace v článku – RCT

Borges, I., Faveri, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Retamal, V. B., Montenegro, S. C. L., & Feres, M. (2017). Different antibiotic protocols in the treatment of severe chronic periodontitis: A 1-year randomized trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(8), 822–832. <https://doi-org.ezproxy.muni.cz/10.1111/jcpe.12721>

1. Co bylo cílem studie – „aim“
2. Jak byla definována kontrolní skupina?
3. Kolik subjektů bylo zařazeno a jak dlouho byly sledovány?
4. Co bylo klinicky hodnoceno, primární sledovaný údaj?
5. Co ze studie vyplývá?
6. Hodnota důkazů a bias?

Základní pilíř evidence based medicine a největší rozdíl mezi literaturou a názory v přednáškách či na sociálních sítích?

**recenzní řízení
= peer-review**

Systematic Reviews, Meta-analyses, Evidence Synthesis

Randomized Controlled Trials RCTs

Cohort Studies

Case-control Studies

Case Series, Case Reports

Expert Opinion

Kde hledat odpovědi?

Hledám inspiraci a motivaci?	Přednášky, sociální sítě (velmi kriticky!)
Zajímá mě, jak tento problém řešil někdo jiný?	Case report, case series
Potřebuji něčemu porozumět?	Učebnice, narrative review, expert opinion
Je v této oblasti consensus, popř jaký?	Systematic review, meta-ana
Srovnal někdo tyto způsoby léčby?	RCT

Na jaké úrovni přispět?

Jsem uznávaný odborník a rád bych se podělil o názory a zkušenosti?

Expert opinion (přednáška, kurz), sociální sítě

Chtěl bych ověřit nový postup?

RCT

Chci zhodnotit vliv různých faktorů v delším čase?

Cohort study

Rád čtu, píšu, jsem systematický, mám hodně času a rád bych shrnul poznání v nějaké oblasti?

Systematic review, meta-analysis

Na jaké úrovni přispět?

Řešil jsem výjimečný případ a ukázkově jsem ho zdokumentoval?

Case report

Chci ukázat, že úspěch mého postupu nebyla náhoda?

Case series

Jsem student a chtěl bych nějaké téma rozebrat, zhodnotit aktuální pohled na tuto problematiku a vyvodit praktické závěry?

Narrative review, evidence synthesis

Vlastní výzkumná otázka

Cvičení

- formulovat výzkumnou otázku
- navrhnout design a možný výstup



Akademický výzkum vs. věda v soukromé praxi

- myšlenka (akademická, praktická?)
- granty, financování
- systematické hodnocení, sběr dat
- spolupráce a vybavení
- publikace
- vědec nebo klinik?

Výzkum v soukromé praxi

- správná motivace a cíl
- odhodlání a vytrvalost
- zdroj podpory, granty??
- návaznost na univerzitu, knihovnu, laboratoř
- zorientovat se v legislativě a etice
- nástroje, databáze, podpora
- význam získaných dat

[více v Hare et al., 2018](#)

Výzkum na univerzitě

- spolupráce, kurzy, podpora, záštita
- zdroje (knihovna), vybavení, financování (granty)
- sdílení, návaznost, mentoři
- doktorské studium (PhD.), akademická kariéra

Klíčové body

- Zvyšujte podíl informací získávaných z recenzovaných zdrojů s malým bias, ostatní hodnotte velmi kriticky
- Ověřujte informace, vnímejte jejich rozdílnou hodnotu
- Čerpejte z EBM a přispívejte do EBM
- Rozvíjejte svoje myšlenky, na jakékoli úrovni
- Bavte se vědou a buďte její součástí

Použité zkratky

- EBM – evidence-based medicine
- RCT – randomized controlled trial, randomized clinical trial

doc. MUDr. Břetislav Lipový, Ph.D., MBA

51 Vědecká příprava pro ZL

Představení výzkumníka a jeho týmu

doc. MUDr. Břetislav Lipový, Ph.D., MBA

– Clinical trials experiences

2007 – Indication of Veloderm® in partial thickness burns - consultant

2008-2009 – Xe-derma® in partial thickness burns (co-investigator)

2010 – Mepilex Ag® in adult and pediatric burns (co-investigator)

2013 – Principal investigator Birken clinical trial (Oleogel-S10)

2014 – Principal investigator Nexobrid™ in adult patients

2014 – Principal investigator Nexobrid™ in pediatric patients

2019 – Principal investigator The RE-ENERGIZE Study: A RandomizEd trial of ENtERal
Glutamine to minimIZE thermal injury (study terminated)

2019 – Principal investigator Reducing microbial burden in acute wounds using non-thermal
plasma.

Obsah přednášky

Metodologie klinického hodnocení (ne)jen pro zubní lékaře

- Stručná historie klinického hodnocení
- Základní principy klinického hodnocení
- Lidské subjekty v klinickém hodnocení
- Typy klinického hodnocení
- Etická komise a informovaný souhlas
- Klinické hodnocení u specifických skupin (děti)
- GCP certifikát (trénink)

„Biomedicínský pokrok je založen na výzkumu, který nutně zahrnuje i studie na lidských subjektech“

„Pacient musí být léčen jako studentův učitel, nikoliv jako tréninkový nástroj.“

Stručná historie klinického hodnocení

— (Kniha DANIEL) jedna z knih Starého zákona

Then Daniel said to the guard whom the master of the eunuchs had put in charge of Hananiah, Mishael, Azariah and himself, „*Submit to us this test for ten days. Give us only vegetables to eat and water to drink; then compare our looks with those of the young men who have lived on the food assigned by the king, and be guided in your treatment of us by what you see*“. (150BC)

Nonrandomized Concurrent Control Study
vs.
Randomized Control Trial

Stručná historie klinického hodnocení

— Randomizace

- Tento pojem byl poprvé v rámci klinického hodnocení použit R.A. Fisherem (jednalo se o zemědělce) – rozdělení svých parcel s plodinami
- Pravděpodobně první randomizace v biomedicínském výzkumu byla použita Ambersonem a McMahonem, kteří sledovali terapeutický efekt sanocrysinu v terapii plicní formy TBC

[Fisher R.A., 1926](#)

[Amberson B. et al., 1931](#)

Stručná historie klinického hodnocení

– Zaslepení

- Opět studie týkající se terapie TBC
- Hodnocení dvěma radiology a klinikem RTG snímků bez toho aniž by věděli jestli jsou pacienti v kontrolní nebo treatované skupině

Medical Research Council. Streptomycin
treatment of pulmonary tuberculosis. *Br. Med*
J. 1948;2:769-782

Tři důležité dokumenty relevantní pro etiku ve výzkumu

- Norimberský kodex (1947)
- Helsinská deklarace (1964) – revize WMA 1975, 1983, 1989, 1996, 2000, 2002, 2004, 2008
 - The Belmont Report 1979 (reguluje výzkum v USA)

Norimberský kodex

Norimberský proces (20. 11. 1945 – 1. 10. 1946)

- Celkem v deseti bodech je obsaženo následující
 - Dobrovolný souhlas pacienta
 - Výsledky nelze získat jinými metodami
 - Experiment byl úspěšně proveden na zvířatech
 - Vyvarovat se veškerého nenutného fyzického a mentálního utrpení
 - Pokud je důvodné podezření, že může vést ke smrti nebo invaliditě, nesmí být prováděn
 - Stupeň rizika nikdy nesmí převážit potenciální humánní význam
 - Provedení až po zajištění dostatečného vybavení proti i vzdálené možnosti poškození, invalidity nebo smrti
 - Vědecky kvalifikovaní lidé
 - V průběhu experimentu může lidský subjekt kdykoliv vystoupit
 - Vědec musí být připraven experiment ukončit pokud zjistí, že pokračování může vést k poškození subjektu

Helsinská deklarace 1964

- Celkem 32 paragrafů
- Definice inkompetentních lidských subjektů
 - Osoby mladší 18 let
 - Subjekty, jejichž rozhodovací schopnost je kompromitována, jakožto výsledek fyzikálních a/nebo mentálních podmínek
- **Odpovídá Helsinská deklarace současnému pojetí vědy?**
 - Odlišení terapeutického a neterapeutického výzkumu
 - Spornost v kontrolních skupinách (placebo)
 - Odpovědnost za zdraví subjektu leží pouze na něm (nikoliv na výzkumníkovi)

The Tuskegee syphilis study

„naučili jsme se více o rasismu
než o syfilis“



Participants in the Tuskegee Syphilis Study.
(Credit: National Archives)

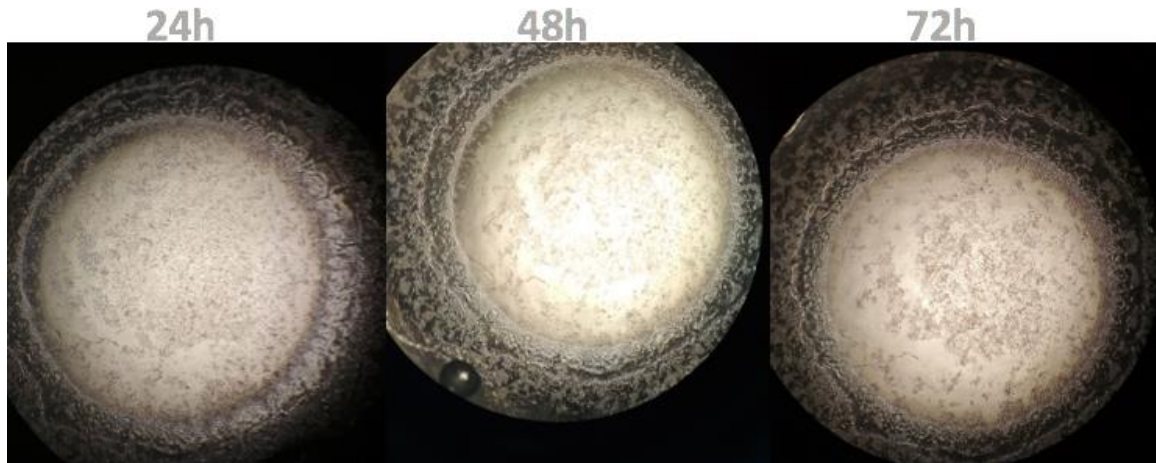


Herman Shaw speaks as President Bill Clinton looks on during ceremonies at the White House on May 16, 1997, during which Clinton apologized to the survivors and families of the victims of the Tuskegee Syphilis Study.
(Credit: PAUL J. RICHARDS/AFP/Getty Images)

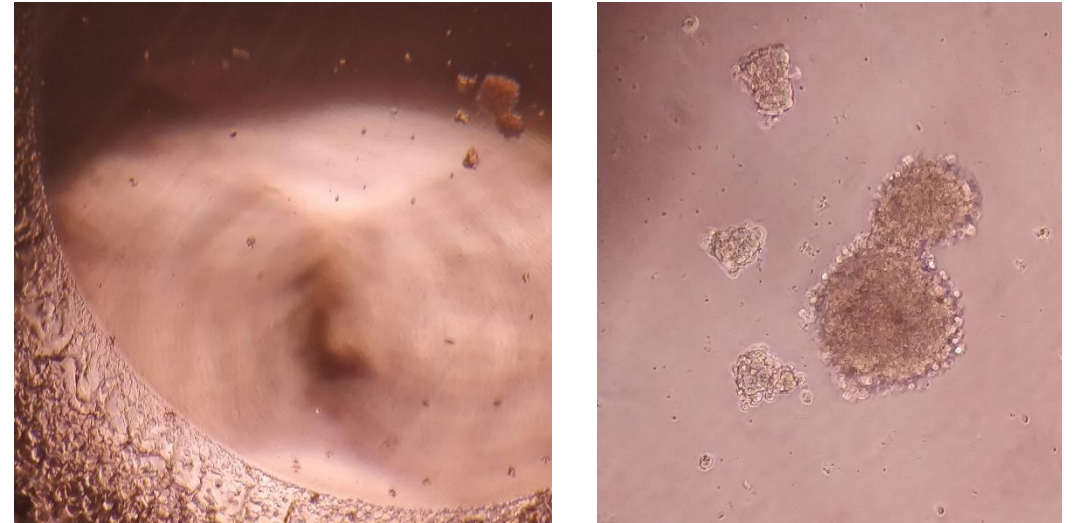
Postup před zahájením klinického hodnocení

- Preklinické testování (postup je upraven ve vyhlášce č. 86/2008 Sb. – postupy pro neklinické zkoušení bezpečnosti léčiv při provádění laboratorních zkoušek podle zásad správné laboratorní praxe)
- Cílem je ověřit bezpečnost v této fázi – toxicita, teratogenita, mutagenita, karcinogenita apod.
- *In vitro a in vivo* testování

In vitro testování



Fotografie B-lymfocytů na testovacím materiálu
během časového období



První testování in vitro na myších
fibroblastech. Buňky se shlukují a tvoří
silnější strukturu.

In vivo testování

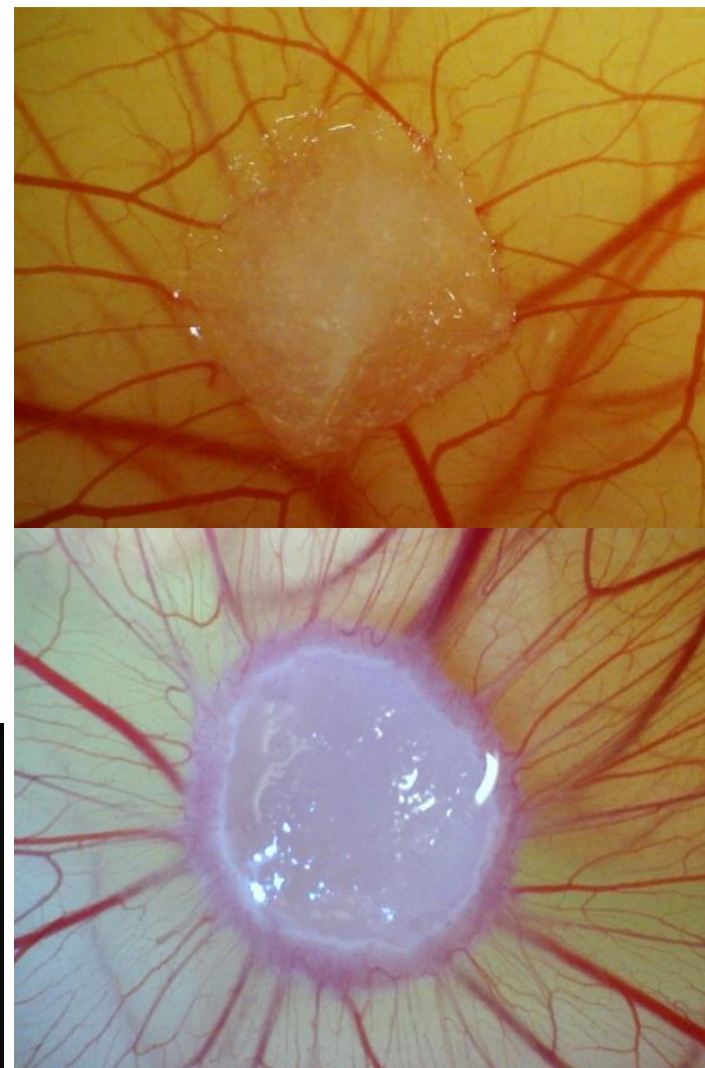
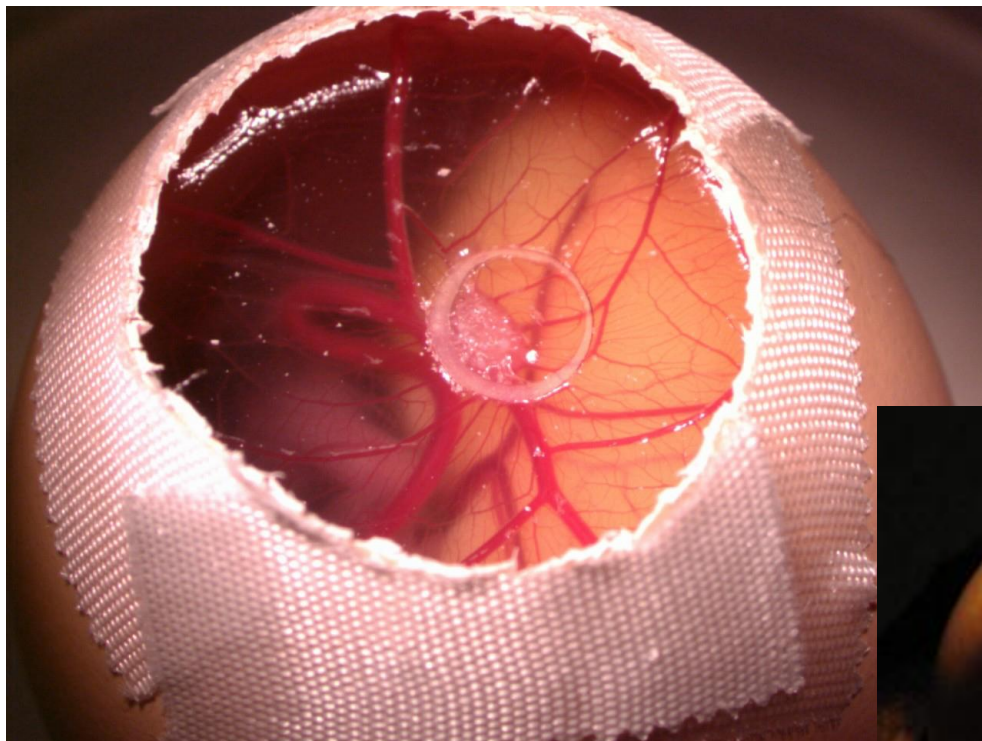


In vivo testování



Ex ovo testování

CAM model
(kuřecí chorioalantoidní membránový model)

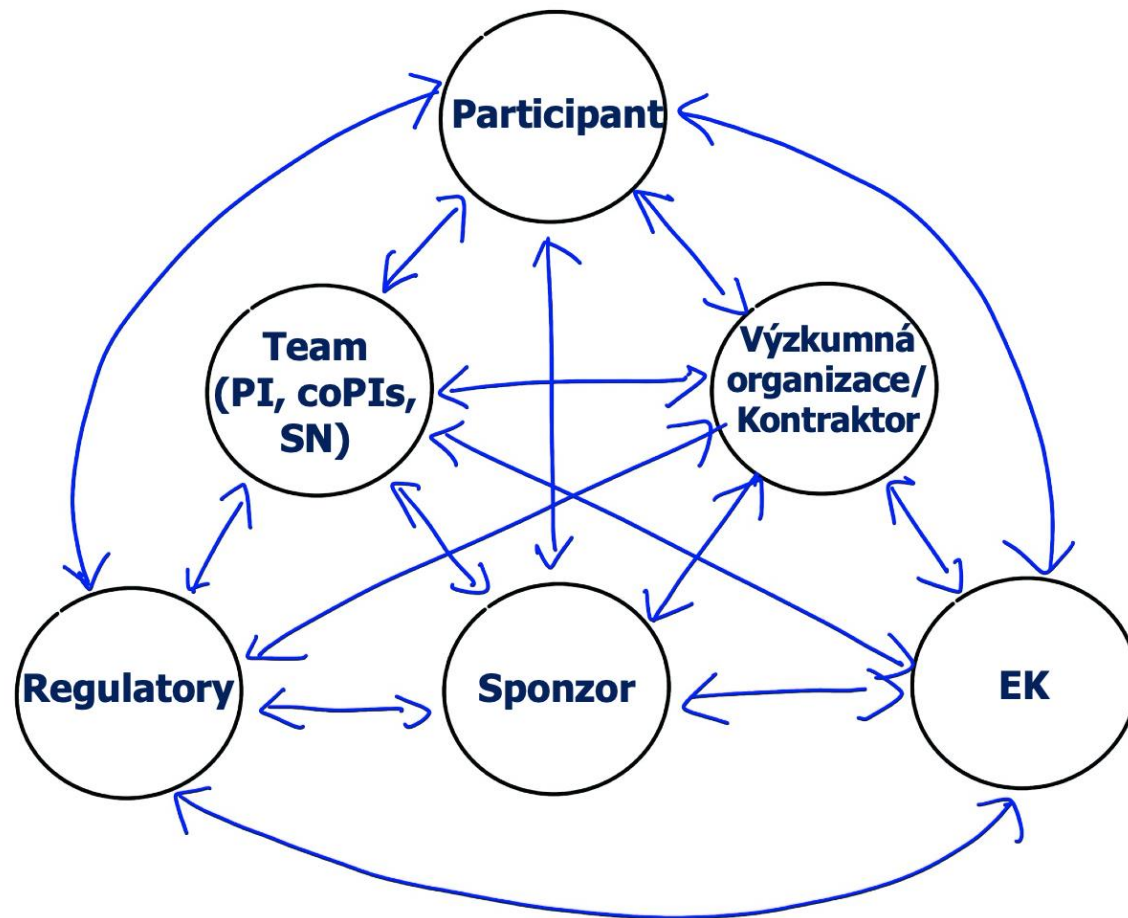


Z každých 10 000 látek z fáze preklinického testování se do fáze klinického hodnocení dostane kolem 5

Definice klinického hodnocení

- Klinické hodnocení humánních léčivých přípravků je jakékoli systematické testování prováděné na lidských subjektech za účelem zjistit či ověřit klinické, farmakologické nebo jiné účinky nebo stanovit nežádoucí účinky nebo studovat farmakokinetiku jednoho léčiva anebo ji porovnávat u několika léčiv s cílem ověřit jejich bezpečnost nebo účinnost (Zákon o léčivech č.378/2007 Sb.)
- **systematické testování léku na pacientech či na zdravých dobrovolnících, jehož hlavním úkolem je:**
 - prokázat bezpečnost a snášenlivost léku,
 - prokázat a ověřit léčivé účinky daného léku,
 - zjistit, jaké jsou jeho nežádoucí účinky,
 - určit farmakokinetické parametry a chování léku v lidském organismu.

Jednotlivé strany klinického hodnocení



Základní principy klinického hodnocení

- **Průběh klinického hodnocení je celosvětově standardizovaný.** Podléhá přísným pravidlům Správné klinické praxe, Helsinské deklarace, legislativy EU a ČR pro provádění klinických hodnocení
- Na etické a správné provedení studií dle schváleného protokolu studie dohlíží inovativní farmaceutická společnost (zadavatel, sponzor) a kontrolní úřady, tj. SÚKL a EMA (FDA), resp. ostatní regulační authority a nezávislé etické komise.

Základní principy klinického hodnocení

27.5.2014

CS

Úřední věstník Evropské unie

L 158/1

I

(Legislativní akty)

NAŘÍZENÍ

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 536/2014

ze dne 16. dubna 2014

o klinických hodnoceních humánních léčivých přípravků a o zrušení směrnice 2001/20/ES

(Text s významem pro EHP)

Klinické hodnocení

Nízkointervenční klinické
hodnocení

Neintervenční studie

Správná klinická praxe (GCP)

- Vyhláška č. 226/2008 Sb. (*Vyhláška o správné klinické praxi a bližších podmínkách klinického hodnocení léčivých přípravků*)
- GCP – soubor mezinárodně uznávaných etických a vědeckých požadavků na jakost, které musí být dodrženy při designu, provádění, dokumentování a vyhodnocování KH.
- GCP trénink

Správná klinická praxe (GCP)

Základní body

- KH mají být prováděny v souladu s právními a etickými principy (HD)
- Před zahájením KH je nutno zvážit rizika a nevýhody s očekávaným prospěchem pro pacienta a společnost. Studie může být provedena pouze v případě, že ospravedlňuje očekávaný prospěch potenciální riziko
- Nejdůležitějším hlediskem je vždy právo, bezpečnost a zdraví subjektu(ů)
- Veškeré informace o hodnoceném léčivém přípravku mají být dostatečné pro provedení KH
- KH musí být vědecky spolehlivé s podrobně popsáním protokolem
- KH musí být provedeno vždy v souladu se schváleným protokolem
- Za poskytovanou péčí v průběhu KH je vždy zodpovědný **kvalifikovaný** lékař

Správná klinická praxe (GCP)

Základní body

- Každá osoba provádějící klinické hodnocení má být kvalifikována svým vzděláním a příslušnou zkušeností
- Účast na klinickém hodnocení musí být u každého subjektu získána dobrovolně
- Všechny informace vycházející z KH musí být uchovávány tak, aby byly jednoduše a přesně reprodukovány, vykazovány a ověřovány
- Důvěrnost záznamů v souladu s právními předpisy
- Výroba, manipulace, transfer a skladování studovaného léčivého přípravku musí být v souladu s GMP kvalitou
- Mají být zavedeny postupy jištění jakosti ve vztahu ke všem aspektům KH

Přehled schválených klinických hodnocení

- Přehled klinických hodnocení je veřejně dostupný v databázi na portálu www.olecich.cz.
- Přehled zahrnuje všechna klinická hodnocení schválená od 31. 12. 2007. Informace o klinických hodnoceních z let 2004 - 2007 jsou postupně doplňovány zpětně.
- <https://www.clinicaltrials.gov>

Státní úřad pro kontrolu léčiv

Zákon o léčivech:

zahájení klinického hodnocení
bez kladného stanoviska etické komise
bez povolení / ohlášení SÚKLu
je přestupkem, za který lze uložit
pokutu až do výše 5 000 000 Kč

Intervence z pohledu klinického hodnocení

Jakýkoli způsob zásahu:

- **do použití léčiva/léčivého přípravku**
(předem striktně určený způsob podávání, dávky, úprava dávek... vše dáno protokolem)
- **do vyšetřovacích postupů**
(nové vyšetřovací postupy mimo běžnou praxi, vyšetření pouze pro účely KH... vše dáno protokolem)
- **ošetřovacích postupů**
(vizity nad rámec běžné praxe... vše dáno předem protokolem).

Za intervenci nepovažujeme vyplnění dotazníku pacientem / zdravým dobrovolníkem.

Státní úřad pro kontrolu léčiv

Léčivý přípravek	Intervence	Lidský subjekt	
ANO	ANO	ANO	jedná se o KH LP regulované SÚKL MUSÍ BÝT POSLÁNO k posouzení na SÚKL - i v případě, že jsou podávány registrované LP v souladu s běžnou praxí (fáze IV)
ANO	NE	ANO	může se jednat o studii regulovanou SÚKL MUSÍ BÝT VŽDY POSLÁNO / PŘEDLOŽENO k posouzení na SÚKL i v případě, že jsou podávány registrované LP v souladu s běžnou praxí - studie farmakoeconomiky, postmarketingové studie bezpečnosti

Etická komise

- Jedná se o orgán, který je tvořen minimálně 5 členy
- Odpovídající vzdělání, kvalifikace a zkušenosti
- Posuzuje předložené klinické hodnocení z pohledu (§ 3 odst. 1 vyhlášky o správné klinické praxi)
 - Vědeckého
 - Lékařského
 - Etického

Etická komise

- *„alespoň 1 člen EK musí být osobou bez zdravotnického vzdělání a bez odborné vědecké kvalifikace a alespoň 1 člen musí být osobou, která není v pracovním poměru, obdobném pracovněprávním vztahu nebo v závislém postavení k poskytovateli zdravotních služeb“*

§ 53 odst. 2 zákona o léčivech

Etická komise

- úkol: chránit práva, bezpečnost a zdraví všech subjektů hodnocení se zvláštní pozorností ke klinickým studiím, které mohou být prováděny na zranitelných subjektech
- multicentrické studie
 - žádosti o stanoviska v případě multicentrických klinických hodnocení se předkládají etickým komisím pro multicentrická hodnocení (celkem 11)
- místní (lokální) studie

Informovaný souhlas

Dle SÚKL...

- **Informovaným souhlasem s účastí na klinické zkoušce** se rozumí dobrovolné a prokazatelné vyjádření vůle osoby, která se má stát subjektem hodnocení, popřípadě jeho zákonného zástupce či opatrovníka, podrobit se klinické zkoušce, stvrzené podpisem subjektu hodnocení, popřípadě jeho zákonného zástupce či opatrovníka.
- Informovaný souhlas musí být udělen v písemné formě před zahájením klinické zkoušky.
- Subjekt hodnocení, musí být zkoušejícím náležitě poučen o podmínkách, za kterých bude klinická zkouška prováděna, o rizicích vyplývajících z podrobení se klinické zkoušce i z případného vystoupení z klinické zkoušky.

Informovaný souhlas

– Poučení musí být podáno písemně, srozumitelně a v jazyce, kterému subjekt

hodnocení rozumí. Je součástí informovaného souhlasu a musí obsahovat:

- informace o klinické zkoušce včetně vymezení jejího cíle,
- předpokládanou dobu trvání klinické zkoušky a předpokládanou dobu účasti subjektu hodnocení na klinické zkoušce,
- identifikaci a popis zkoušeného zdravotnického prostředku,
- seznam zdravotních výkonů, které budou na subjektu hodnocení prováděny,
- informace o možném přínosu klinické zkoušky pro subjekt hodnocení,
- informace o předvídatelných rizicích a možných obtížích spojených s podrobením se klinické zkoušce,
- informace o jiných možnostech léčby nebo diagnostiky,
- informace o zpracování získaných osobních údajů subjektu hodnocení, včetně informace o zabezpečení jejich důvěrnosti
- práva a povinnosti subjektu hodnocení.

Informovaný souhlas

- učiněn osobou způsobilou k jeho udělení, nebo zákonným zástupcem osoby nezletilé či opatrovníkem osoby s omezenou svéprávností (viz. také definici inkompetentních lidských subjektů z Helsinské deklarace, již zmíněné na předchozích slidech)
- pokud zmíněná osoba není schopna psát, je přípustný ústní souhlas učiněný za přítomnosti alespoň jednoho svědka; o udělení takového ústního souhlasu musí být pořízen písemný záznam

Good Clinical Practice (GCP) a International Conference on Harmonization (ICH) jsou základem pro psaní Informovaného souhlasu

Informovaný souhlas

- text informovaného souhlasu musí být:
 - srozumitelný (neužívat odborné výrazy, pokud se použijí je nutnost vysvětlení)
 - v jazyce, kterému subjekt hodnocení dobře rozumí
- nutno přizpůsobit skupině pacientů, které je dokument určen – tj. stručněji / jednodušeji u specifických skupin pacientů (psychiatři pac., demence, senioři, bolestivé stavy, poúrazové a pooperační stavy, infarkt, CMP,...)

Informovaný souhlas – formální pohled

- rozsah dokumentu a velikost písma (maximálně 8 stran, a to při použití standardní velikosti písma (např. Times New Roman 12, Arial 11 apod.)
- formulace, jazyk (správné užívání českého jazyka)

Úvod dokumentu:

- oslovení
- nabídka účasti ve studii
(„Dovolujeme si Vás pozvat k účasti ... / Nabízíme Vám účast ...“)

Informovaný souhlas – obsahové náležitosti

- upozornění, že klinické hodnocení je výzkumnou činností
- cíle klinického hodnocení
- léčebné postupy

Informovaný souhlas – obsahové náležitosti

- upozornění na pravděpodobnost náhodného zařazení do jednotlivých skupin lišících se léčbou tam, kde jde o randomizované klinické hodnocení, tj.
 - výčet jednotlivých léčebných větví a jejich velikost (počet pacientů / poměr)
 - definice placeba, randomizace, zaslepení (včetně zdůvodnění)
- postupy a výkony v průběhu klinického hodnocení včetně všech invazivních výkonů:
 - není nutné rozepisovat podrobně popis jednotlivých návštěv - stačí uvést do přehledné tabulky a popsat jen zásadní vyšetření

Informovaný souhlas – obsahové náležitosti

- odpovědnosti subjektu hodnocení
- návštěvy centra, užívání léku, dodržování stanoveného režimu, antikoncepce, hlášení nežádoucích reakcí / újmy na zdraví apod.
- zdůraznění těch prvků klinického hodnocení, které mají povahu výzkumu
- odlišení běžné péče a toho, co je ve studii „navíc“

Informovaný souhlas – obsahové náležitosti

- předvídatelná rizika či nepříjemnosti pro subjekt hodnocení, včetně případného rizika pro plod nebo kojené dítě:
 - nežádoucí účinky (přehledně, srozumitelně, stručně, případně do tabulky, nezmiňovat výsledky výzkumu na zvířatech, nerozepisovat podrobnosti z předchozích studií)
 - informace o antikoncepci (vždy uvést, že jedinou spolehlivou metodou je kombinace jedné vysoce spolehlivé a jedné doplňkové metody)
- očekávané přínosy - subjekt hodnocení je nutné uvědomit i v případech, že žádný klinický přínos pro něho není očekáván
- alternativní léčebné postupy, které mohou být pro léčbu subjektu hodnocení použity, jejich výhody a rizika

Informovaný souhlas – obsahové náležitosti

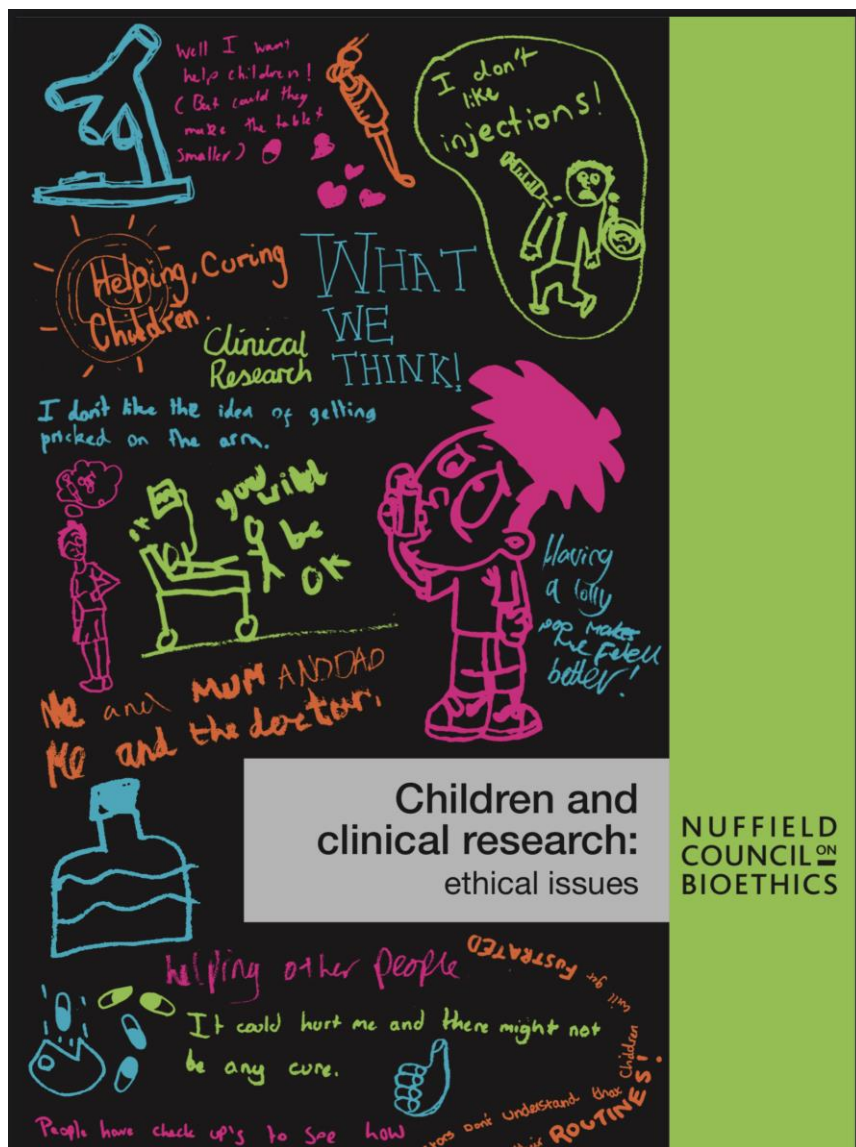
- léčba a podmínky odškodnění, které budou subjektu hodnocení poskytnuty v případě újmy na zdraví vzniklé v souvislosti s jeho účastí v klinickém hodnocení:
 - informace o pojištění studie podle platné legislativy
 - v případě újmy na zdraví v důsledku účasti v KH bude zajištěna a uhrazena odpovídající lékařská péče
 - v případě újmy se pacient obrací na zkoušejícího lékaře - nikoliv přímo na pojišťovnu
- předpokládaná výše odměny subjektu za jeho účast v klinickém hodnocení
 - odměna nesmí být poskytnuta zranitelným subjektům (např. nezletilí, osoby s omezenou svéprávností)
 - případně výslovně uvést, že nebude poskytnuta žádná odměna
- předpokládané výdaje subjektu v souvislosti s jeho účastí v klinickém hodnocení
 - kompenzace výdajů: náhrada musí být adekvátní (cestovné, stravné, ztráta času) - lze formou poukázek

Informovaný souhlas – obsahové náležitosti

- informace o tom, že účast subjektu v klinickém hodnocení je dobrovolná a že subjekt může odmítnout účast nebo může odstoupit od účasti v klinickém hodnocení kdykoliv, bez postihu či ztráty výhod, na něž má jinak nárok
 - pokud je to časově možné, doporučuje se uvést, že pacient si může informace vzít s sebou domů a účast ve studii prodiskutovat s rodinou apod.
- souhlas s tím, že monitoři, auditoři, příslušná etická komise a SÚKL budou mít umožněn přímý přístup k původní klinické dokumentaci za účelem ověření průběhu klinického hodnocení anebo údajů, aniž dojde k porušení důvěrnosti informací o subjektech
- důvěrné záznamy a jejich uchovávání

Informovaný souhlas – obsahové náležitosti

- předvídatelné okolnosti a důvody, pro které může být účast subjektu v klinickém hodnocení ukončena
 - (ukončení ze strany SH, zkoušejícího i zadavatele, odráží vylučovací kritéria definovaná v protokolu studie)
- předpokládaná doba trvání účasti subjektu v klinickém hodnocení
- přibližný počet subjektů hodnocení, které se účastní klinického hodnocení



Published by

Nuffield Council on Bioethics
28 Bedford Square
London WC1B 3JS

Telephone: 020 7681 9619
Email: bioethics@nuffieldbioethics.org
Website: <http://www.nuffieldbioethics.org>

ISBN: 978-1-904384-31-1

May 2015

To order a printed copy, please contact the Nuffield Council on Bioethics or visit the website.

£10 per report (where sold)
Developing countries: free

© Nuffield Council on Bioethics 2015

All rights reserved. Apart from fair dealing for the purpose of private study, research, criticism or review, no part of the publication may be produced, stored in a retrieval system or transmitted in any form, or by any means, without prior permission of the copyright owners.

Web references throughout this report were accessed in March 2015.

Produced by:

ESP Colour Ltd.
Elgin Drive
Swindon
Wiltshire
SN2 8XU
<http://www.espcolour.com>

Printed in the UK

No consent – no research
No consent – only therapy

Informovaný souhlas – nezletilí

nutný souhlas obou rodičů

(byl zrušen pouze v zákoně o zdravotních službách)

zákon o léčivech:

„...informovaný souhlas rodičů, případně jiného zákonného zástupce“

Informovaný souhlas – nezletilí

Pokud pacient v průběhu účasti ve studii dovrší 18 let, musí pro svou další účast ve studii znovu podepsat informovaný souhlas – ve verzi pro dospělé pacienty.

Dosažením plnoletosti přestává platit souhlas s účastí nezletilého v KH daný jeho rodiči či zástupcem.

Informovaný souhlas – nezletilí (informace)

— Věkové skupiny dle pokynu SÚKL:

- 12-14 let - max. 4 strany, jednoduché formulace
- 15-17 let - je možné již v rozsahu informací pro dospělé, obsahují informaci o antikoncepci

Nenahrazuje souhlas zákonných zástupců, který je pro účast dítěte v KH rozhodující, názor dítěte však musí být brán v úvahu.

Informovaný souhlas – doplňkový výzkum

- Pro doplňkový výzkum, kterého se neúčastní všechny subjekty hodnocení, je nutné vytvořit samostatný informovaný souhlas:
 - neopakovat informace ze základního informovaného souhlasu (pouze odkázat)
 - dobrovolnost účasti – nemá vliv na účast v hlavní studii

Informovaný souhlas – příklad



FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO
Jihlavská 20, 625 00 Brno
tel: 532 231 111

IČO: 652 697 05, DIČ: CZ65269705
Bankovní spojení: 71234621/0100
Nositel certifikátu ISO 9001:2000, 14001:2004
www.fnbrno.cz

Informace pro pacienta a informovaný souhlas

Název projektu: Použití materiálu Amnioderm® v akceleraci hojení donorských míst
Název studijního centra: Klinika popálenin a plastické chirurgie FN Brno
Jména studijních lékařů: doc. MUDr. Břetislav Lipový, Ph.D., MBA

Vážená pacientko, vážený paciente, vážení právní zástupci,
Vzhledem k tomu, že jste prodělali úraz, který vyústil v nutnost kožní náhrady, tzv. autotransplantace dermo-epidermálním štěpem, tak bychom Vás rádi požádali o účast ve studii, jejímž cílem je zhodnocení efektivity hojení aplikací materiálu získaného z lidské placenty s názvem Amnioderm®. Jedná se alogenní transplantát (transplantát od jiného dárce) získaný zpracováním placenty, resp. jejího vnitřního listu, který se následně upravuje procesem zvaným lyofilizace. V současné době se pravděpodobně jedná o nejlepší biologický kryt, který urychluje proces hojení u různých typů ran a defektů nejen v oblasti kůže, ale například také na rohovec. Cílem celého projektu je potvrzení skutečnosti, že Amnioderm® urychluje samotný proces hojení rány, v tomto případě odběrové plochy, a tedy dojde ke zlepšení lokálního procesu s jednoznačným dopadem na zdravotní stav pacienta.
Prosim, přečtěte si důkladně níže uvedené informace. Následně s Vámi zkoušející lékař provede vstupní rozhovor. Neobávejte se zeptat na všechny body, které Vám nejsou zcela jasné. Bude Vám poskytnut dostatek času na rozmyšlení, zdali máte zájem se studie zúčastnit. Do studie budete zařazen(a) pouze v případě, pokud se rozhodnete na základě dostatečného množství informací poskytnout dobrovolný písemný souhlas. Nesouhlas s účastí v této studii Vás nebude nijak hendikepovat, komplexní péče bude probíhat standardním způsobem v režimu současných doporučených postupů.

Postup provedení odběru kožního štěpu

Bude Vám odebrán kožní štěp (v celkové anestezii na operačním sále), čímž vznikne donorské místo (tzv. odběrová plocha), u kterého proběhne náhodné rozdělení na dvě identické poloviny = V (verum – tedy léčenou oblast) a K (komparátor). K účelu studie bude volena odběrová plocha v oblasti stehna s maximálním rozměrem 50 cm² (10x5cm). Na V plochu bude aplikován

Amnioderm® a celý defekt bude krytý zdravotnickým prostředkem Mepilex®. Další průběh převazů rány bude již standardizovaný, jak je na klinice zavedeno, tedy výměna krytí Mepilex® po 48-72 hodinách do úplného zhojení, které se očekává kolem 2-3 týdnů v závislosti na tloušťce kožního štěpu (primárně bude volen tenký kožní štěp o tloušťce 0,2 mm). Pravidelné převazy budou doprovázeny fotodokumentací a šetrnou aplikací antiseptik k prevenci rozvoje infekčních komplikací. Převazy budou prováděny a dokumentovány do tzv. uzávěru rány. Jako uzávěr rány se hodnotí stav, kdy je minimálně 95 % povrchu rány zhojeno.

O jaké úkony v průběhu studie půjde (nad rámec standardnímu výkonu)

- *Odběr materiálu k histologickému a imunologickému vyšetření*
Bude vám odebrán drobný vzorek kůže (biopsie 1) o velikosti 6x6 mm v celkové anestezii bezprostředně před provedením odběru kůže a následně bude realizován druhý odběr (biopsie 2) 10. den po chirurgické proceduře v celkové nebo lokální anestezii v závislosti na tom, jestli bude nutné provádět pro Vaše primární poranění podání celkové anestezie. Tyto vzorky budou použity pro vyhodnocení hojícího procesu před a po aplikaci krycího materiálu.
- Během jednotlivých převazů bude prováděna fotodokumentace rány až do samotného zhojení odběrové plochy.

Jaká rizika jsou spojená s účastí ve studii

S účastí ve studii jsou spojená rizika, která vyplývají z odběru histologického preparátu – drobné kapilární krvácení. Odběr bude vždy provádět erudovaný a zkušený lékař. Od roku 2000, kdy NCTB (Národní Centrum Tkání a Buněk a.s.) připravuje amniové membrány, nebyly hlášeny žádné nežádoucí účinky. Teoreticky může po aplikaci amniou na ránu nastat alergická reakce (membrána obsahuje stopové množství antibiotika gentamicin). Vzhledem k tomu, že jde o biologický materiál darovaný rodičkami (dárkyněmi) při porodu, existuje minimální riziko přenosu virů (žloutenky B, C, HIV). Toto riziko je však zcela zanedbatelné, všechny dárkyně jsou testovány při darování tkáně a opakovaně 6 měsíců poté, všechny výsledky musí být negativní.

Dobrovolná účast

Vaše účast ve studii je naprosto dobrovolná. Svou účast ve studii můžete kdykoliv zrušit, a to i bez udání důvodu. Neposkytnutí nebo zrušení souhlasu s účastí ve studii žádným způsobem neovlivní Vaši další léčbu.

Ochrana osobních údajů

Veškeré informace a údaje o Vás, Vašem zdravotním stavu a výsledcích vyšetření jsou důvěrné.

Informace o zpracování osobní údajů

Následující informace Vám podáváme podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2016/679 ze dne 27. dubna 2016 o ochraně fyzických osob v souvislosti se zpracováním osobních údajů a o volném pohybu těchto údajů a o zrušení směrnice 95/46/ES (obecné nařízení o ochraně osobních údajů).

Správce osobních údajů, společnost Fakultní nemocnice Brno, se sídlem Jihlavská 340/20, 625 00 Brno-Bohunice-Brno-Starý Lískovec, IČO: 65269705, zapsána v obchodním rejstříku vedeném Živnostenským úřadem města Brna, jakožto poskytovatel zdravotních služeb v souladu se zákonem č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění (dále jednotlivě nebo společně jako „Správce“).

Rozsah a účel

Vaše osobní údaje zpracováváme v rozsahu: jméno a příjmení, rodné číslo, adresa, v případě nutnosti údaj o zdravotní pojišťovně, telefon, e-mail, informace o zdravotním stavu. Tyto údaje jsou nezbytné k poskytnutí zdravotních služeb a zajištění výroby léčivého přípravku.

Vaše osobní údaje zpracováváme za účelem (i) poskytování zdravotních služeb, (ii) sdělování údajů o zdravotním stavu Vám a dalším oprávněným osobám, (iii) organizace poskytování zdravotních služeb, (iv) vedení příslušných evidencí, jak vyplývají z předpisů upravujících daně a účetnictví.

Právní základ

Právním základem pro zpracování Vašich osobních údajů je splnění naší zákonné povinnosti (zejména zákon č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, zákon

Informovaný souhlas – příklad

č. 296/2008 Sb., o lidských tkáních a buňkách, zákon č. 378/2007 Sb. o léčivech, zákon č. 563/1991 Sb., o účetnictví, zákon č. 586/1992 Sb., o daních z příjmů).

Příjemci osobních údajů

Příjemci Vašich osobních údajů mohou v souladu s ustanoveními právních předpisů v konkrétních případech kromě Vás být: poskytovatel zdravotních služeb, orgány veřejné moci a osoby oprávněné nahlížet do zdravotnické dokumentace podle § 31, § 32, § 33 a § 65 zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování. Osobní údaje mohou být pro zajištění výše popsaných účelů zpracovávány vedle správce také zpracovateli, a to na základě smluv o zpracování osobních údajů uzavřených v souladu s obecným nařízením o ochraně osobních údajů. Vaše osobní údaje nepředáváme do zahraničí.

Doba zpracování osobních údajů

Osobní údaje obsažené ve zdravotnické dokumentaci jsou zpracovávány po dobu stanovenou vyhláškou č. 98/2012 Sb., o zdravotnické dokumentaci. Osobní údaje zpracováváné pro další účely jsou zpracovávány po dobu stanovenou příslušným zákonem.

Práva subjektu údajů

Při zpracování osobních údajů máte následující práva týkající se ochrany svých osobních údajů:

- právo požadovat od nás přístup k Vaším osobním údajům;
 - právo na opravu Vašich osobních údajů, které zpracováváme;
 - právo na omezení zpracování. Omezení zpracování znamená, že musíme Vaše osobní údaje, u nichž bylo zpracování omezeno, označit a po dobu trvání omezení je nesmíme dál zpracovávat s výjimkou jejich uložení.
- Právo na omezení zpracování máte tehdy, jestliže:
- popíráte přesnost osobních údajů, a to na dobu potřebnou k tomu, abychom mohli přesnost osobních údajů ověřit;
 - zpracování je protiprávní a Vy odmítáte výmaz osobních údajů a žádáte místo toho o omezení jejich použití;
 - jestliže již Vaše osobní údaje nepotřebujeme pro účely zpracování, ale Vy je požadujete pro určení, výkon nebo obhajobu právních nároků;
 - jestliže jste vznesla námitku proti zpracování, dokud nebude ověřeno, zda naše oprávněné

důvody pro zpracování převažují nad Vašimi zájmy nebo právy a svobodami;

- právo na výmaz osobních údajů. Právo na výmaz osobních údajů se vztahuje jen na osobní údaje, které zpracováváme k jiným účelům, než je poskytování zdravotních služeb. Údaje, které o Vás vedeme za účelem poskytování zdravotních služeb (např. ve zdravotnické dokumentaci), vymazat nesmíme;
- právo na přenositelnost údajů. Můžete žádat, abychom Vám Vaše osobní údaje poskytli za účelem jejich předání jinému správci osobních údajů, nebo abychom je sami předali jinému správci osobních údajů. Toto právo však máte pouze ohledně těch údajů, které zpracováváme automatizovaně na základě Vašeho souhlasu nebo smlouvy s Vámi. Údaje, které o Vás vedeme za účelem poskytování zdravotních služeb (např. ve zdravotnické dokumentaci), však smíme poskytnout jen Vám a za zákonných podmínek též jinému poskytovateli zdravotních služeb nebo orgánu veřejné moci.

- právo podat stížnost u dozorového úřadu, a to v případě, že se domníváte, že zpracováním osobních údajů dochází k porušení právních předpisů o ochraně osobních údajů. Stížnost můžete podat u dozorového úřadu v místě svého obvyklého bydliště, místě výkonu zaměstnání nebo v místě, kde došlo k údajnému porušení. V České republice je dozorovým úřadem Úřad na ochranu osobních údajů, Pplk. Sochora 27, 170 00 Praha 7, www.uoou.cz.

Právo vznést námitku proti zpracování

V případě, že Vaše osobní údaje zpracováváme pro účely oprávněných zájmů našich nebo někoho dalšího (právní základy zpracování jsou uvedeny výše), máte kdykoliv právo vznést proti takovému zpracování námitku. Námitku můžete vznést na naši adresu uvedené výše. Pokud takovou námitku vznesete, budeme oprávněni v takovém zpracování pokračovat jen tehdy, pokud prokážeme závažné oprávněné důvody pro zpracování, které převažují nad Vašimi zájmy nebo právy a svobodami, a dále tehdy, pokud půjde o zpracování nezbytné pro určení, výkon nebo obhajobu právních nároků.

Povinné zpracování a povinnost poskytnout osobní údaje

Zpracování Vašich osobních údajů pro účely poskytování zdravotních služeb je zákonným požadavkem. Neposkytnutím Vašich osobních údajů může znamenat, že Vám nebudeme moci poskytnout zdravotní služby; povinnost poskytnout osobní údaje pacienta se týká i jeho zákonného zástupce nebo opatrovníka.

Při zařazení do studie budou osobní data pacientů uchována s plnou ochranou důvěrnosti dle

platných zákonů ČR. Údaje důležité pro studii se ukládají v anonymní podobě. Anonymní forma znamená, že se nepoužijí žádné údaje, jako je jméno nebo iniciály, rodné číslo, číslo pojištěnce apod., vedoucí k identifikaci osoby, ale používají se pouze číselné nebo písmenné kódy, popř. doplněné o rok narození. Údaje získané ve studii mohou být v anonymní podobě použity v odborných publikacích.

Na koho se obrátit v případě dalších dotazů

Pokud máte nebo budete mít dotazy ohledně studie, kontaktujte hlavního zkoušejícího lékaře.

Hlavní zkoušející: doc. MUDr. Břetislav Lipový, Ph.D., MBA

Telefon v pracovní době: +420 532 233 004

Telefon pro naléhavé situace: +420 532 233 205

Souhlas, prohlášení a podpis pacienta

Svým podpisem prohlašuji, že jsem četl/a přílohu, Informace pro pacienta, a že mi byla zdravotnickým pracovníkem poskytnuta informace, že tento souhlas uděluji dobrovolně a ze svobodné vůle, že jsem měl(a) dostatek času na rozmyšlenou a že rozumím všem informacím ohledně mé účasti ve studii.

Prohlašuji, že jsem četl/a přílohu, Informace, a že mi byla zdravotnickým pracovníkem poskytnuta informace:

- ☐ o možnosti použití informací pro potřeby lékařské vědy a výzkumu a o účelu, důležitosti a výhodách léčby tkáněmi a buňkami,
- ☐ o prováděných vyšetřeních, důvodech a dopadech jejich provádění a o mém právu obdržet výsledky vyšetření a jejich jasné vysvětlení,
- ☐ o opatřeních na mou ochranu a ochranu mých údajů a o závazku lékařského tajemství,

Poté, co jsem měl/a možnost klást doplňující otázky a zeptat se na vše, co pokládám za podstatné, a moje dotazy mi byly uspokojivě zodpovězeny, prohlašuji, že jsem informacím a vysvětlením plně porozuměla, považuji poučení mé osoby za dostatečné a na základě své svobodné vůle a poskytnutých informací SOUHLAŠÍM:

Informovaný souhlas – příklad

- ☐ se zařazením do klinického hodnocení za účelem použití experimentální léčby pomocí lyofilizované amniové membrany pro alogenní použití
- ☐ s odběrem a testováním vzorku mé krve ev. tkáně kůže (biopsie) na sledování a studování markerů/ukazatelů (např. cytokiny, genová exprese, chemokiny apod.)

V případě, že materiály definované v předchozím bodě (krev a tkáň) nebudou moci být využity pro vědecko-výzkumné účely, beru na vědomí, že budou zlikvidovány.

Všechny mnou poskytnuté informace jsou podle mého nejlepšího vědomí úplné a pravdivé.

Jméno a příjmení pacienta

Podpis pacienta

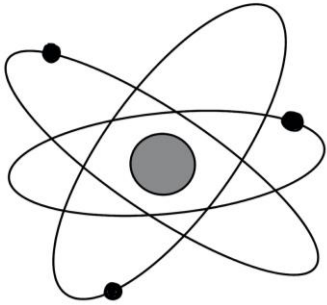
Podpis studijního lékaře

Datum

Vývoj nového léku – podmínky zahájení KH

- EUDRA CT „number“ generované Evropskou lékovou agenturou
- Povolení SÚKL (na základě dodaných dokumentů včetně dokladu o pojištění)
- Souhlas EK (místní nebo multicentrické)
- Informovaný souhlas a poučení pacienta

Jednotlivé fáze klinického hodnocení



Preklinické testování





- Poprvé podaný léčivý prostředek humánnímu probandu
- Velmi opatrné/dávkování (podaná dávka vs. cílová dávka)
- Zdraví dobrovolníci (studenti)
- Vyřazení rizikové skupiny (komorbidita, děti, těhotné apod.)
- Testování většinou jednorázové – sledovaná farmakokinetika léčiva
- Zpravidla pouze na jednom pracovišti (monocentricky)
- Malý počet probandů
- **Vyjímečně se může podat léčivo v této fázi i nemocným pacientům (u zdravých pacientů by bylo podání nevhodné)**



- Léčivý přípravek se osvědčil v 1.fázi KH (bezpečnost)
- V závislosti na charakteru léčiva je v této fázi testován na populaci několika desítek až stovek pacientů
- Většinou multicentrický (zpravidla jedna země)
- Typicky se jedná o podání nemocným SH (splňující indikace daného léčiva)
- Tato fáze může být u některých typů studií rozdělena na IIA a IIB
- **IIA – bezpečnost**
- **IIB – efektivita**



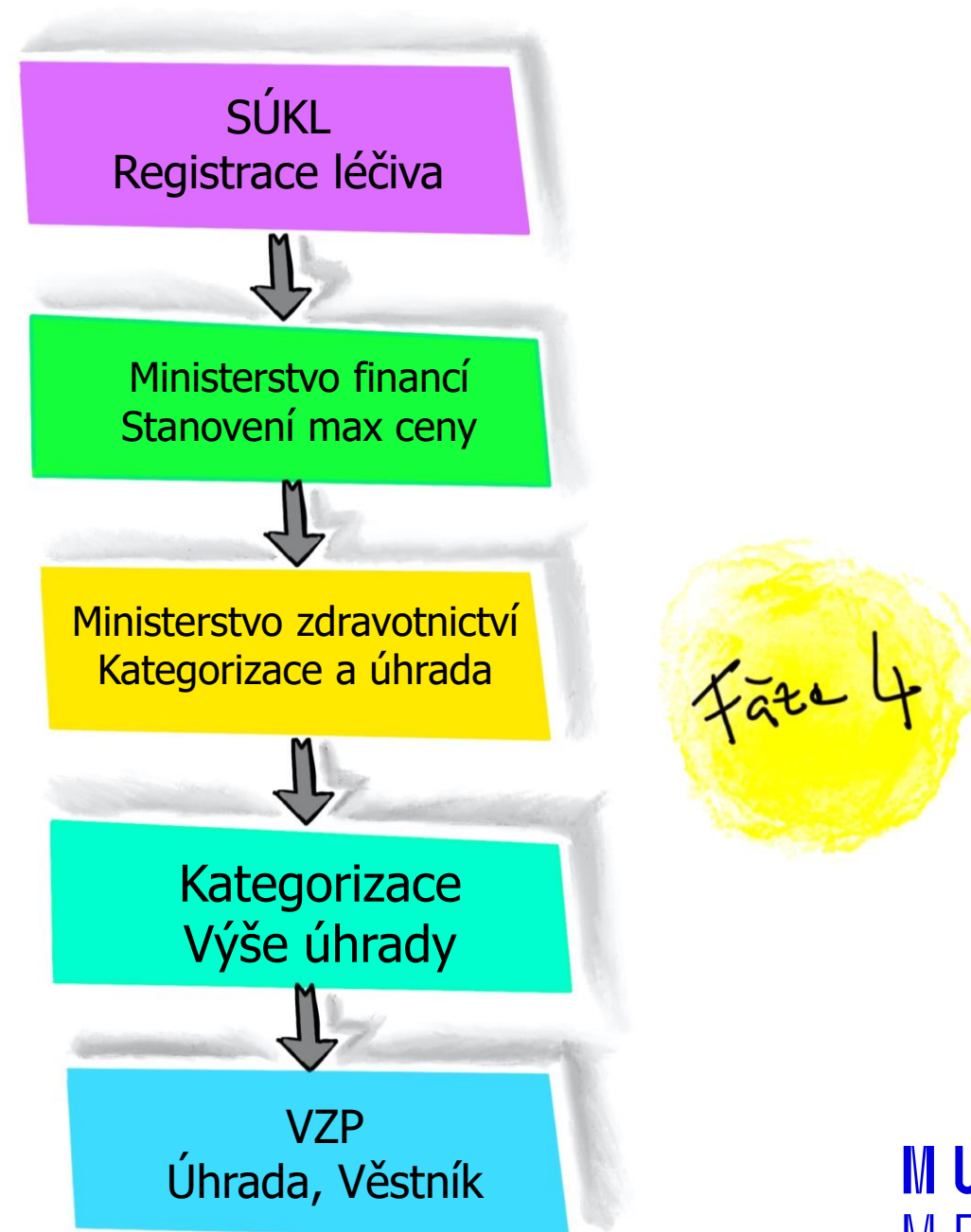
- Fáze předcházející registraci léčiva
- Řádově stovky SH
- Vždy multicentrická optimálně multinacionální (Evropa vs. USA)
- Prokázání na dostatečné populaci bezpečnost a účinnost (superioritu) v porovnání s komparátorem (placebo, SOC)

RCT (Randomized Control Trial)

Randomizace/kontrola/zaslepení

Úspěšné ukončení – možnost registrace

Proces registrace a prodeje





- Postmarketingová fáze (postregistrační fáze)
 - Povinnost shromažďovat informace o nově registrovaném léčivu po dobu minimálně 5 let
 - Léčivo se indikuje pro terapii několika tisíc pacientů – potenciální možnost výskytu vzácných nežádoucích účinků
 - Povinné hlášení těchto nežádoucích účinků SÚKL

Placebo vs. Standard-of-care (SOC)

“best available therapy”

- Obecně je placebo považováno za inertní látku nebo postup a placebo efekt (nebo odpověď) je něco, co následuje po podání placeba.
- Paradox tohoto tvrzení spočívá v tom, že pokud něco „inertního“ z definice nemůže vyvolat účinek
- To lze dále zaměnit s terminologií jako „aktivní“, „pravdivé“ a „vnímané“ placebo.
- Neexistuje jeden placebo efekt
 - Psychologické hledisko
 - Neurobiologické hledisko

Role placeba v RCTs je v současnosti velmi diskutovaná!!!

Placebo efekt – psychologické hledisko

- Existuje mnoho mechanismů, které z psychologického hlediska vyvolávají placebo efekt
 - Očekávání
 - Motivace
 - Somatické zaměření
 - Odměna
 - Redukce anxiety
 - Učení a paměť

Placebo efekt – neurobiologické hledisko

- Výzkum neurobiologie citlivosti na placebo se zaměřil na placebo analgezii
- Potenciální role opioidních a neopiodních mechanismů
- Účinky placeba mohou být zčásti nebo kompletně zvráceny při aplikaci opioidních antagonistů (analgetický efekt placeba)
- Dle některých studií je potenciální možnost role cholecystokininu (CCK) – analgetický placebo efekt je potencován při podávání antagonisty CCK

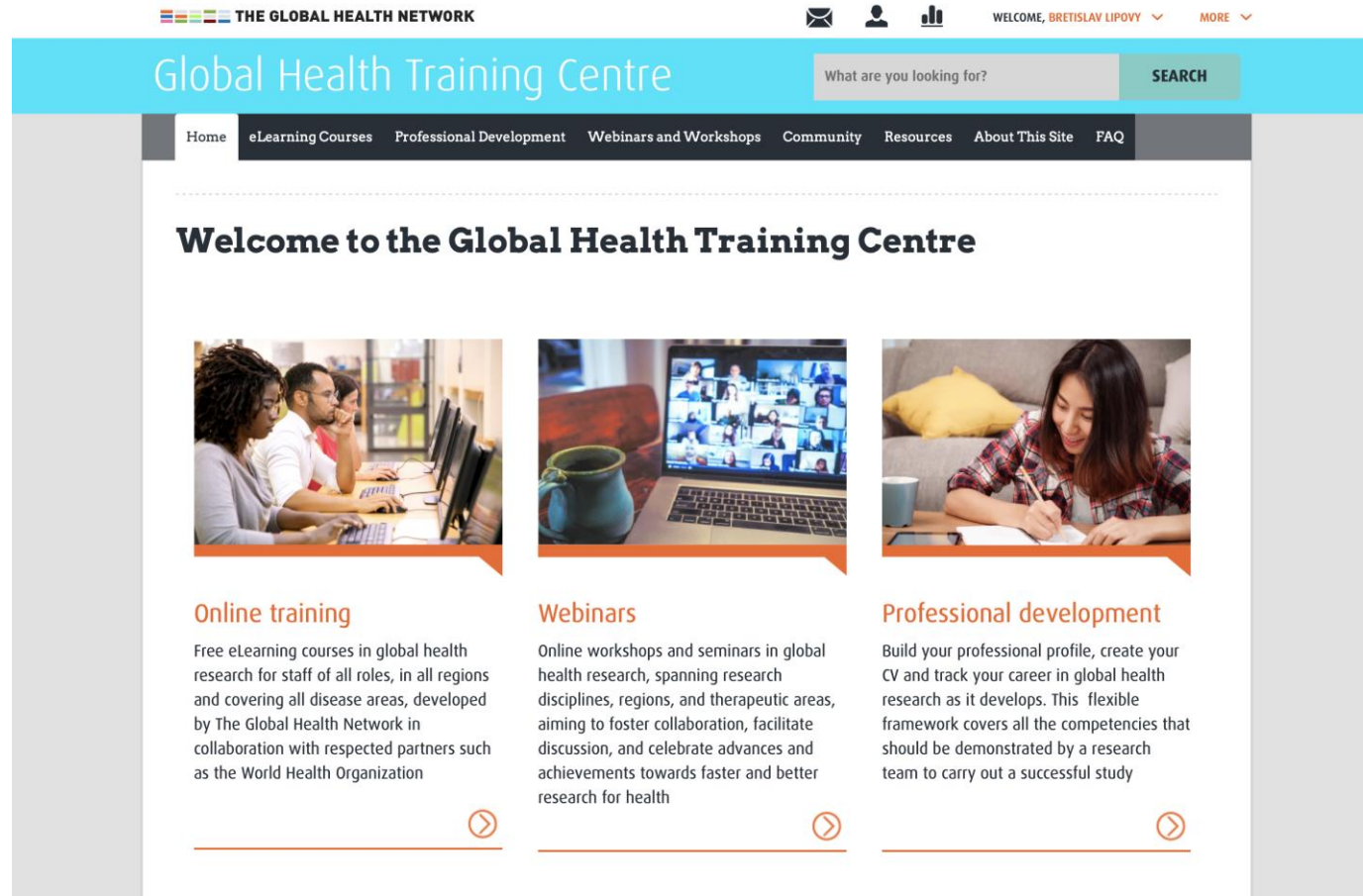
Formulář pro evidenci a schvalování VaV prací a projektů ve FN Brno

Formulář pro evidenci a schvalování VaV prací a projektů ve FN Brno	
Přesný název projektu nebo popis práce (v českém i anglickém jazyce, pokud je relevantní)	
Navrhovatel / Spolunavrhovatel za FN Brno (jméno a pracoviště)	
Navrhovatel (není-li FN Brno) (jméno, pracoviště a instituce)	
Schválení vedením pracoviště: (přednosta/primář)	Datum:
Je projekt předkládán jako grant?	ANO/NE: (název / zkratka grantové agentury, registrační číslo u ext. žádosti)
Finanční podpora (požadována nebo přidělena)	ANO: .Materiál poskytnut bezplatně/metodika hodnocení bude dále financována z institucionální podpory FN Brno (uvedte zdroj financování)

Charakter projektu dle platné legislativy (definice viz níže)	<input type="checkbox"/> klinické hodnocení humánního léčivého přípravku <input type="checkbox"/> klinická zkouška zdravotnického prostředku <input type="checkbox"/> ověřování nezavedené metody <input type="checkbox"/> projekt jiného charakteru
Typ projektu	<input type="checkbox"/> vědecká práce za účelem publikování v časopise, který <u>vyžaduje</u> schválení práce etickou komisí <input type="checkbox"/> vědecká práce za účelem publikování v časopise, který <u>nevyžaduje</u> schválení práce etickou komisí <input type="checkbox"/> vědecká práce v rámci doktorandského studia <input type="checkbox"/> projekt Institucionální podpory FN Brno <input type="checkbox"/> projekt jiného typu
Je v návrhu projektu podáván / studován léčivý přípravek ? ANO/ NE Je v návrhu projektu pro jeho účely prováděna intervence ? ANO/NE (definice intervence viz níže) Je návrh projektu prováděn na lidských subjektech ? ANO/NE	

Zpracování osobních údajů lidských subjektů	<input type="checkbox"/> v anonymní podobě (data nelze žádným způsobem přiřadit ke konkrétnímu subjektu) <input type="checkbox"/> v pseudonymní podobě (data lze přiřadit ke konkrétnímu subjektu, např. prostřednictvím kódu, kterým jsou označena) <input type="checkbox"/> s osobními údaji se nepracuje
Seznam předkládaných dokumentů (pouze v případě, že je nutné dokumenty ve vyjádření etické komise vyjmenovat)	Formulář pro evidenci a schvalování VaV prací a projektů ve FN Brno Informovaný souhlas pacienta Metodika a popis projekt

GCP trénink a certifikát




THE GLOBAL HEALTH NETWORK

Global Health Training Centre

What are you looking for? **SEARCH**


Home eLearning Courses Professional Development Webinars and Workshops Community Resources About This Site FAQ

Welcome to the Global Health Training Centre



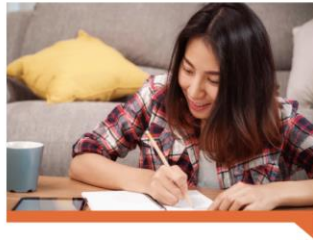
Online training

Free eLearning courses in global health research for staff of all roles, in all regions and covering all disease areas, developed by The Global Health Network in collaboration with respected partners such as the World Health Organization



Webinars

Online workshops and seminars in global health research, spanning research disciplines, regions, and therapeutic areas, aiming to foster collaboration, facilitate discussion, and celebrate advances and achievements towards faster and better research for health



Professional development

Build your professional profile, create your CV and track your career in global health research as it develops. This flexible framework covers all the competencies that should be demonstrated by a research team to carry out a successful study

<https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/elearning/>



THE GLOBAL HEALTH NETWORK
Enabling research by sharing knowledge

Hereby Certifies that
BRETISLAV LIPOVY
has completed the e-learning course
ICH GOOD CLINICAL PRACTICE E6 (R2)
with a score of
100%
on
28/08/2019

This e-learning course has been formally recognised for its quality and content by the following organisations and institutions

THE GLOBAL HEALTH NETWORK
Enabling research by sharing knowledge

This ICH E6 GCP Investigator Site Training meets the Minimum Criteria for ICH GCP Investigator Site Personnel Training identified by TransCelerate BioPharma as necessary to enable mutual recognition of GCP training among trial sponsors.

Global Health Training Centre
globalhealthtrainingcentre.org/elearning
Certificate Number 0741233a-bb3f-40e1-bee2-c86d64a6c3e5 Version number 0

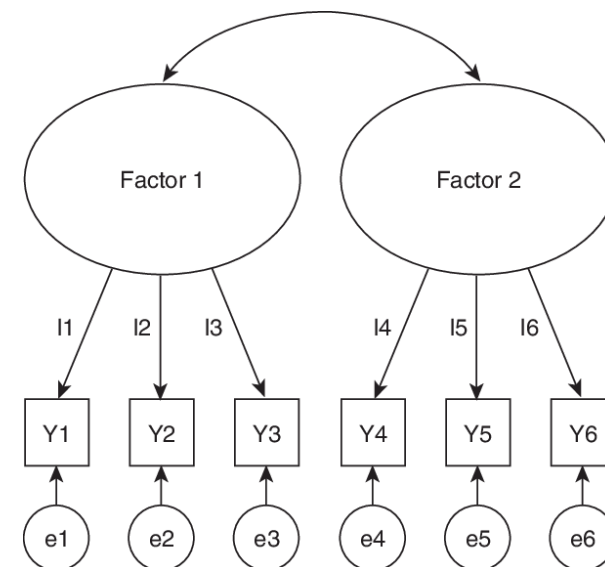
Dotazníky a psychometrika

Mgr. Tomáš Kratochvíl

doc. PhDr. Martin Vaculík, Ph.D.

Katedra psychologie

Fakulta sociálních studií, Masarykova univerzita Brno



Obsah přednášky

Dotazníková šetření a psychometrika

- Motivace. Co je dotazník a k čemu je užitečný?
- Kde a jak získat dotazník?
- Jak vytváříme dotazníky?
- Jak převádět dotazník ze zahraničí?
- Jak ověřit původní i přeložený dotazník?



Představení výzkumníka

Mgr. Tomáš Kratochvíl – pracovní psycholog a analytik na Katedře psychologie

– Tým pracovních psychologů pod vedením doc. PhDr. Martina Vaculíka, Ph.D.

– KPSY FSS MU je pracovištěm zajišťující



- vědeckovýzkumnou činnost
- řešení vědeckých projektů
- související služby, zejména **psychologického experimentálního, korelačního i kvalitativního výzkumu, vývoje a adaptací psychodiagnostických metod**, organizace studií a analýzy dat
- psychologické rady v období pandemie a vyvracení mýtů z psychologie práce

– KPSY FSS MU zajišťuje prezenční výuku a vedení závěrečných prací v rámci studijních oborů **jednooborové psychologie** a hlavního/vedlejšího oboru psychologie.



K čemu je to stomatologovi dobré?

Screening problému, který se diagnostikuje nákladně

- neurologické onemocnění (ACE-R), rakovina ústní dutiny...

Zjištění lékařsky důležité charakteristiky člověka či jeho postoje

- „Health Literacy in Dentistry“

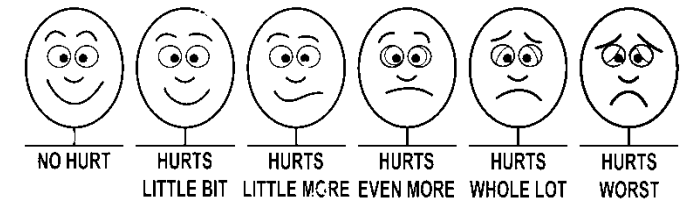
Chování, čití či postoje účastníků výzkumu

- např. chceme ověřit dodržování různých hygienických návyků

Zpětná vazba lidí na léčbu/přístup personálu/...

- spokojenost „zákazníka“ se službou

PAIN MEASUREMENT SCALE



Co je vlastně odborný dotazník?

Standardizovaný podnětový materiál

- má předem stanovený **záměr**
- otázky vychází z teoreticky podložené **definice**
- je ověřená jeho **funkčnost a srozumitelnost**

Standardizovaný způsob administrace

- instrukce jsou srozumitelné a vždy stejné
- administrátor je zacvičený

Standardizovaný způsob vyhodnocení

- existují doporučení (guidelines) v manuálu
- převodem z hrubých skóreů na Σ , M, z-skór...

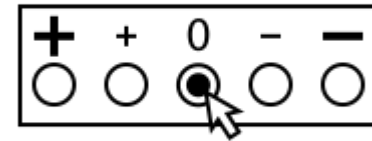


The diagram illustrates a questionnaire layout. It features a teal header bar at the top. Below the header, there are three columns of input fields. Each column contains three rows of input fields. The first row of each column is a solid gray rectangle. The subsequent two rows of each column contain a small square checkbox followed by a larger gray rectangle. In the first column, the top checkbox is checked (teal). In the second column, the bottom checkbox is checked (teal). In the third column, the middle checkbox is checked (teal).

Jaké typy odpovědí existují v dotazníku

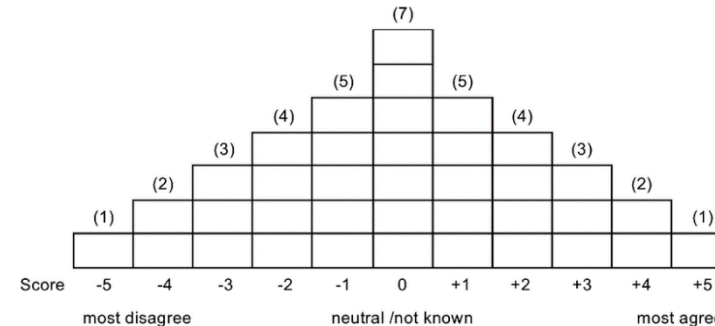
Likert

- zpravidla 5- nebo 7bodová (souhlas-nesouhlas, vždy-nikdy...)
 - měla by být **symetrická** (stejně negativních/nízkých bodů jako pozitivních/vysokých bodů)
 - prostřední hodnotu (ani souhlas, ani nesouhlas) nemusí nutně obsahovat
- v sociálních vědách jedním z nejpoužívanějších řešení



Q-třídění

- řazení výroků podle valence
- používá se také pro shodu posuzovatelů



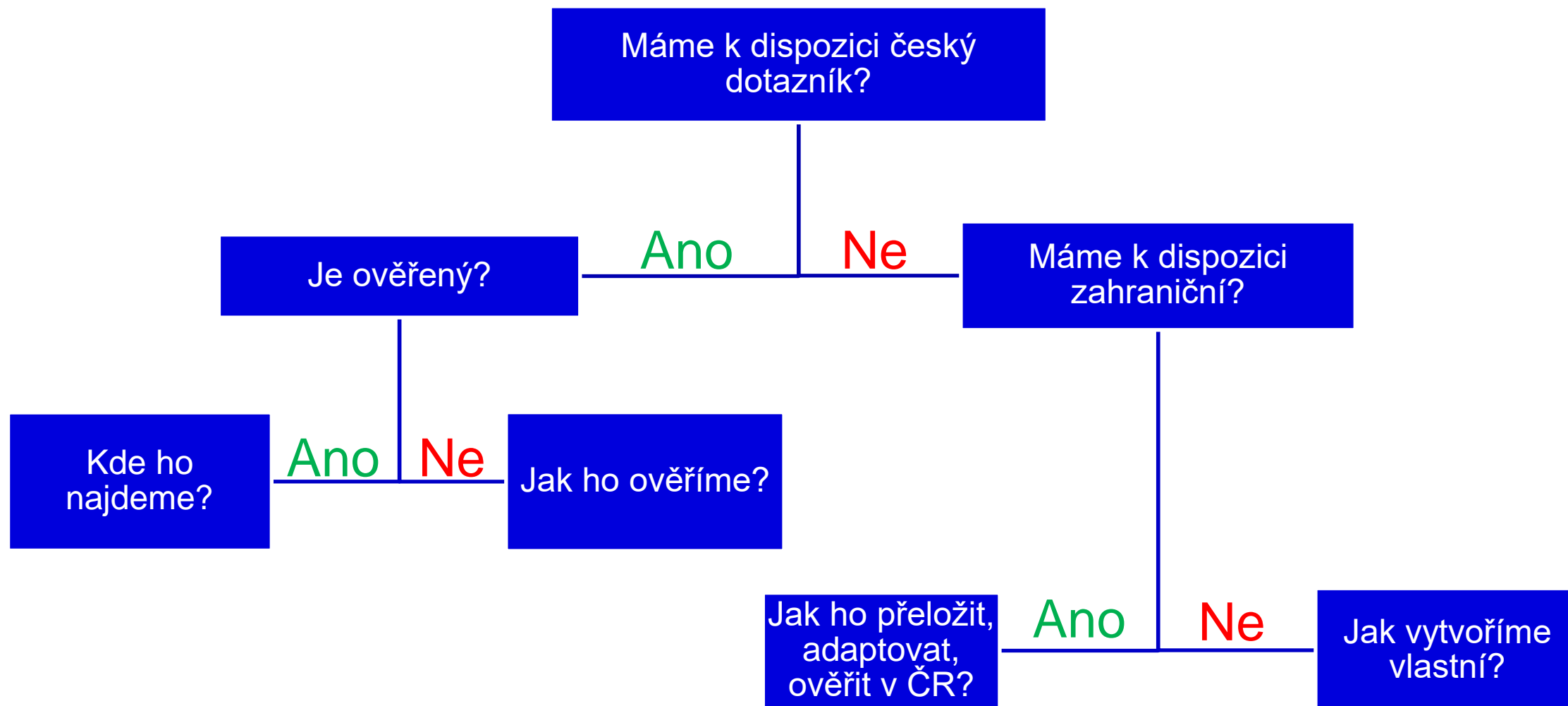
Dichotomické, demografické, slovní a další

- pro ekonomičnost, kontrolu intervenujících jevů, podrobnosti
- zvažovat je musíme podle toho, co chceme zkoumat

Výhody a nevýhody dotazníku

...aneb proč může být výhodnější než si s klientem/subjekty „popovídat“.

Rozhovor		Dotazník
nižší	možnost standardizace	vyšší
vyšší	potenciální validita	nižší
vyšší	vliv tazatele	nižší
vyšší	návratnost	nižší
vyšší	cena (\$ i čas)	nižší
nižší	anonymita	vyšší
vyšší	kontrola průchodu dotazováním	nižší



Jak získat dotazníkovou metodu?

Jde-li o psychodiagnostický test (test inteligence, pozornosti, inventář depresivity...)

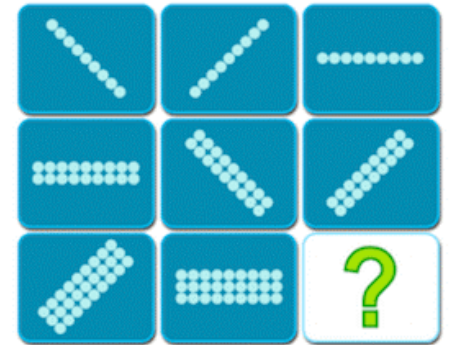
- v katalozích nakladatelů psych. testů ([Testcentrum](#), [Psychodiagnostika](#))
- v [Kabinetu diagnostických metod](#) KPSY FSS MU
- pro výzkumný účel někdy i v dřívějších studiích

Jde-li spíše o informaci o nějakém testu

- ročenky (v psychologii [Burosova](#)), knihy
- časopisy zaměřené na recenze metod (např. [Testforum.cz](#))

Jde-li přímo o dotazník (postoje, zájmy, prožívání, hodnocení...)

- předchozí výzkum
- Bc./Mgr./Ph.D. práce studentů daného oboru



Which figure logically belongs on the spot of the question mark?

I feel my manager is active:

Strongly disagree	Disagree	Neutral	Agree	Strongly agree
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

I feel my manager is cheerful:

Strongly disagree	Disagree	Neutral	Agree	Strongly agree
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Jak pracovat se získanou metodou

Návod k administraci

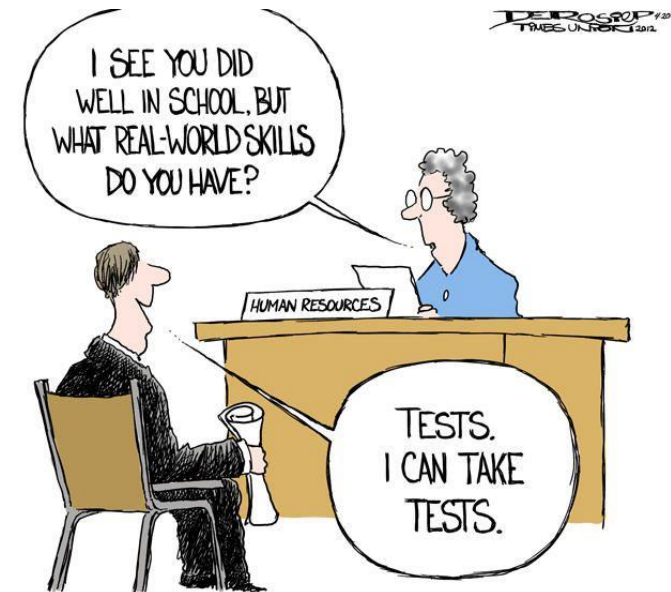
- u psychodiagnostiky bývá součástí **manuálu k metodě**
- existuje-li, stanovuje **postup použití** a **oblasti využití**
- např. co před administrací říci, zda číst nebo předat na papíře

Vyhodnocení a normy

- někdy pouze sčítáme/průměrujeme **skóry**, jindy složitě kódujeme
- metody mívají normy na **různé populace** (např. muže vs. ženy)

Interpretace

- **doporučení** mohou vycházet z manuálu či článků k metodě
- je třeba ji tvořit v kontextu dalších získaných informací



Jak vytvářet položky v dotazníku

Povinné položky

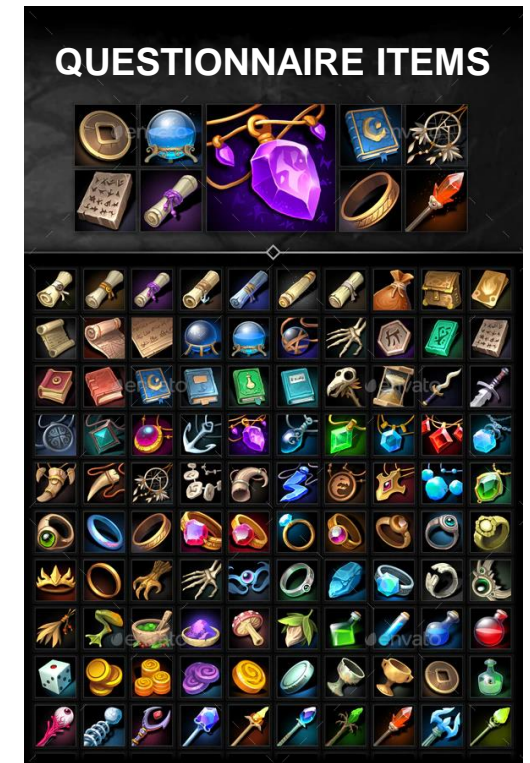
- většinou **nepoužíváme**
 - nucení k odpovědi znehodnocuje data (člověk odpoví náhodně a my se to nedozvíme)
 - podle více vynechaných položek poznáme člověka k odstranění z datové matice
 - dotazník neobsahuje možnost „nevím“ a účastník odpověď nezná = nemá jak odpovědět
- smysl mohou mít u kontrolních proměnných

Jednoduchá formulace

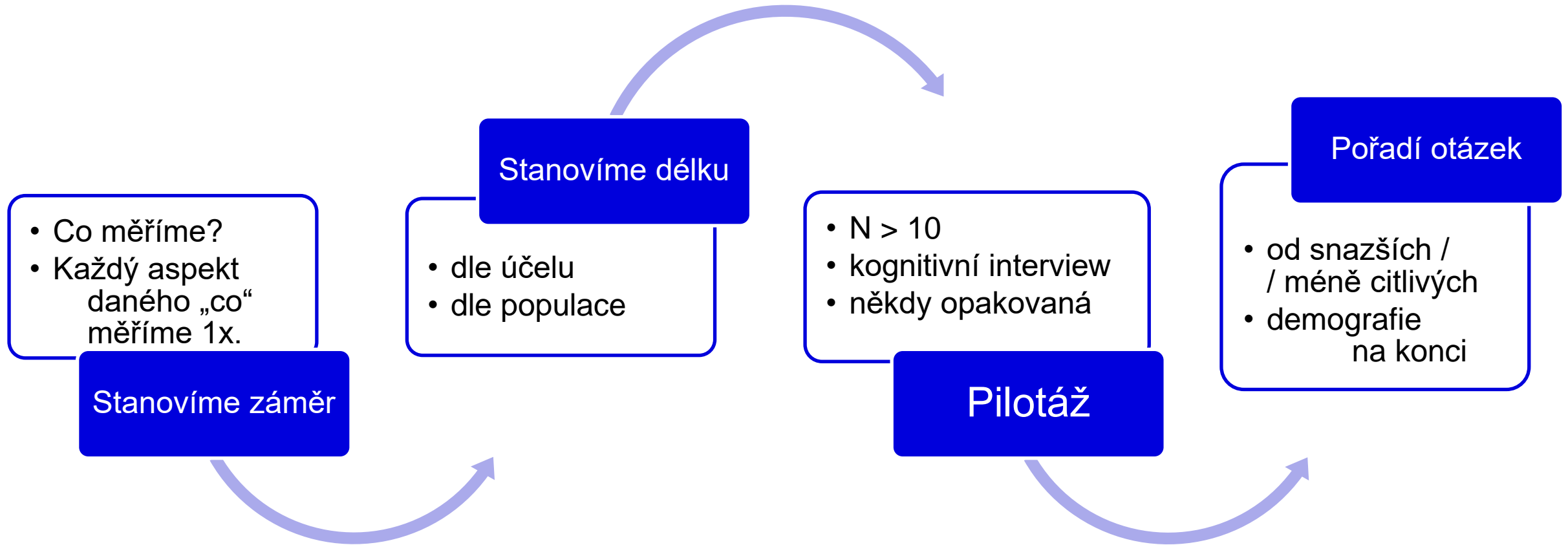
- ideálně věty jednoduché, vyhýbáme se souřadným spojkám
 - „Kdyby mi tekla krev z dásně, věděl bych, co to znamená **a jak mám zareagovat**. Když si čistím zuby, pociťuji pálení dásní **nebo mě bolí zuby**.“
 - „Kdyby mi tekla krev z dásně, věděl bych, co to znamená.“, „Když si čistím zuby, pociťuji pálení dásní.“

„Nasycení“ konstruktů

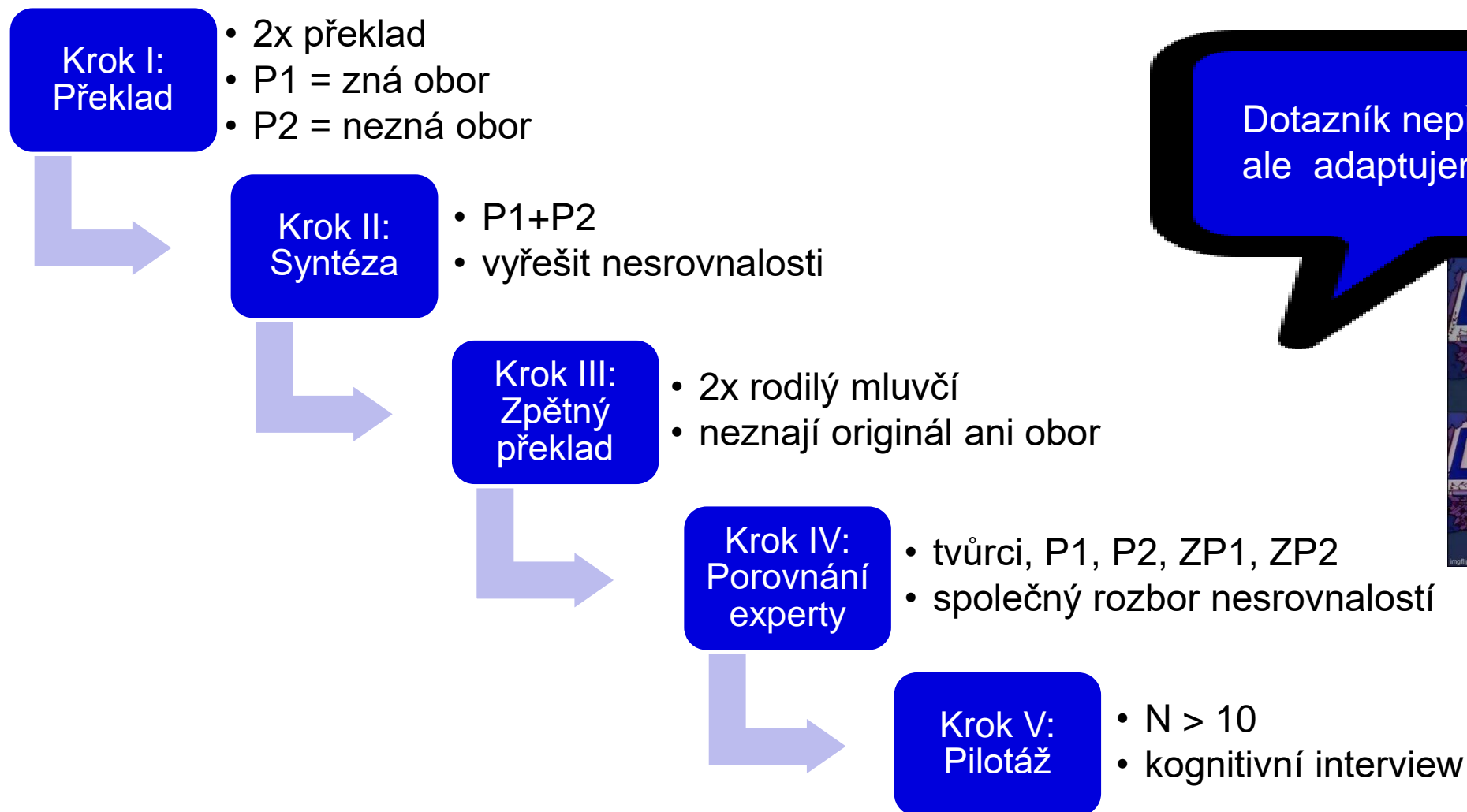
- dotazník nemůže obsahovat všechny položky
 - vybíráme klíčové položky
 - pokrýváme co nejvíc částí konstruktů



Jak „skládat“ položky v dotazníku



Jak převést cizojazyčný dotazník do ČJ?



Dotazník nepřekládáme,
ale adaptujeme!



Co ovlivňuje dotazník a co s tím?

sociální žádoucnost

- ujistit o anonymitě
- více zdrojů informací
- více způsobů měření

vliv pořadí

- provést pilotáž
- obecné → specifické položky

straight-line (1, 1, 1...)

- otočit škálu (ano ... ne) → (ne ... ano)
- obrácené položky („Jsem vyšší než většina.“ „Často stoupu na špičky.“)

tendence v odpovídání

- neutrální položky
- volbou škály

paměťové chyby

- vymezit období
- dostatek času na odpověď

Jak ověřit dotazník – validita

Konstruktová validita

- měříme, co si myslíme, že měříme? jaké to má dimenze?
- ověřuje se **faktorovou analýzou**, souvislostí s blízkým konstruktem
- **Dotazník výšky**: souvisí silněji s vahou, slabě se sebehodnocením

Obsahová validita

- na základě teorie a expertů položka „zapadá“ do dotazníku
- **Dotazník výšky**: „Jsem vyšší než většina lidí.“ **X** „Mám dlouhé nohy.“

Kriteriální validita

- souběžná či prediktivní souvislost s kritériem
- **Dotazník výšky**: úspěšnost v basketu, výška změřená metrem



Jak ověřit dotazník – reliabilita

- jak **přesně** měříme? s jakou chybou?

Vnitřní konzistence

- s jakou přesností zjišťují všechny položky totéž
- ověřuje se Cronbachovou α , McDonaldovou ω

Reliabilita v čase (test-retest)

- s jakou chybou měříme v čase T1 a v čase T2
- ověřuje se korelací opakovaných měření

Split-half reliabilita

- s jakou chybou měří podobně dvě půlky 1 testu
- měříme korelací dobře zvolených polovin



Jak a v čem to spočítat?

Co za analýzy obvykle používáme při ověřování dotazníku?

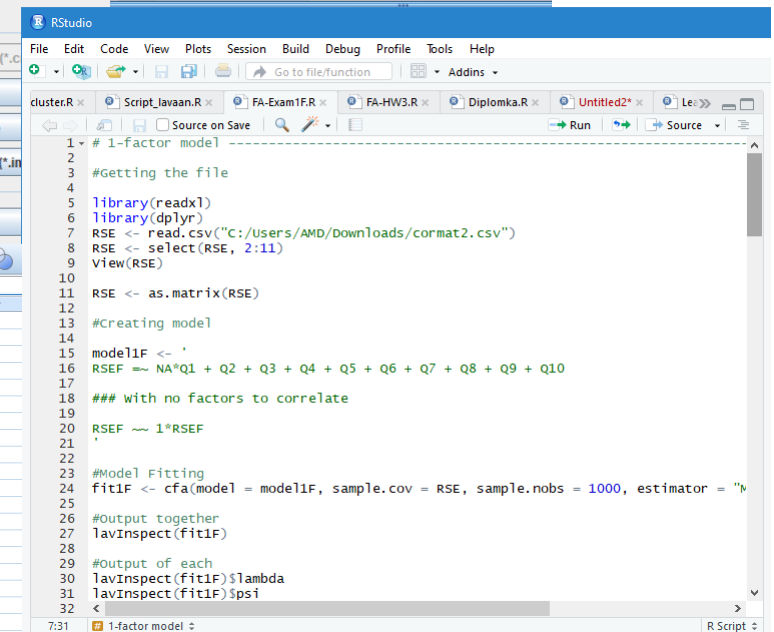
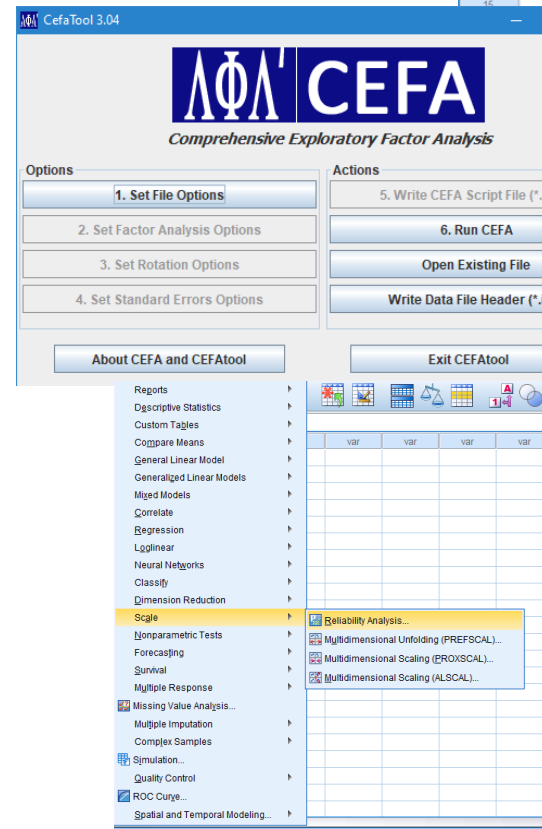
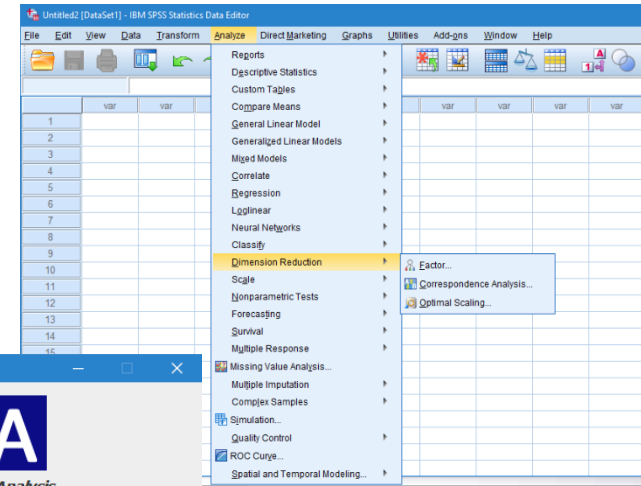
- explorační a konfirmační **faktorová analýza** (CTT)
- Raschův model (IRT)
- network modely

Co za program použít k výpočtu FA?

- základně SPSS, ale nepříliš kvalitní
- **explorační**: CEFA, Matlab
- **konfirmační**: R Studio (lavaan), AMOS

Co za program použít k výpočtu reliability?

- Cronbachova α = SPSS
- McDonaldova ω = R Studio (psych)



Jaká je logika za faktorovou analýzou?

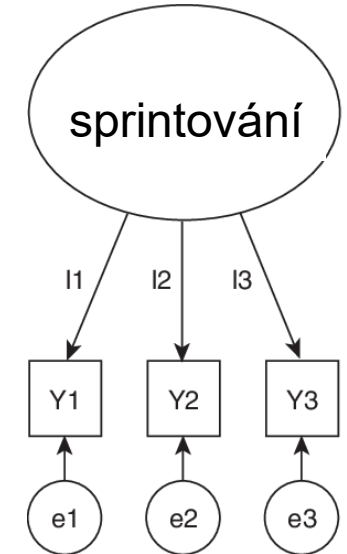
Manifestní a latentní proměnná

Y1. Jak rychle uběhne 50 m?

Y2. Jak rychle uběhne 100 m?

Y3. Jak rychle uběhne 400 m?

schopnost rychle sprintovat



Stomatologický příklad: Health Literacy in Dentistry

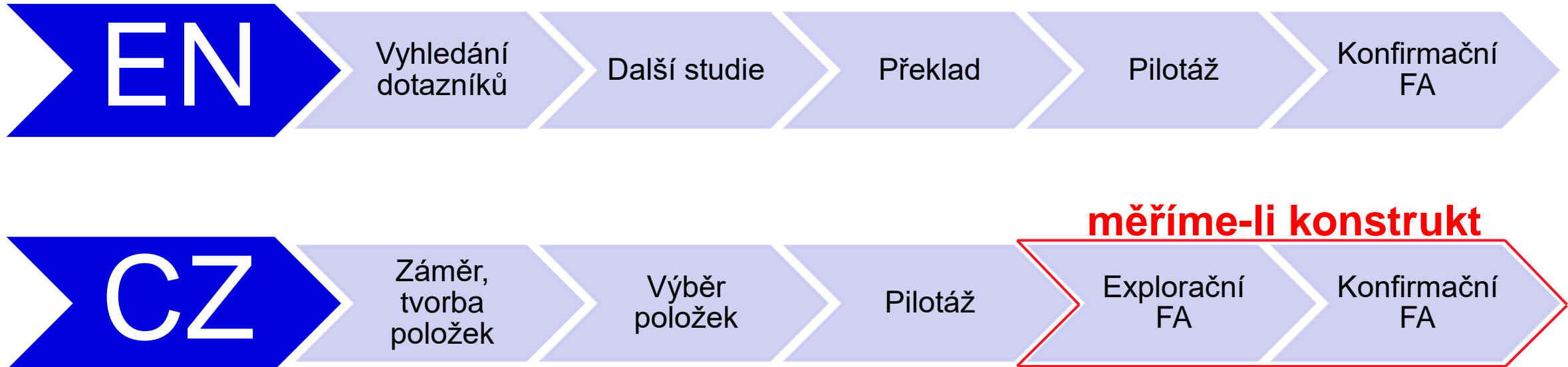
Q1. Are you able to pay to see a dentist?

Q2. Are you able to afford transport to dental clinics?

Q3. Are you able to pay to manage your dental health?

ekonomické překážky

Shrnutí celého procesu



Praktický příklad na závěr

Brněnský dotazník výšky (zkrácená verze)

- vyvinuto za účelem demonstrace psychometrie
- vyhodnocuje se na základě zmíněné CTT
- položky se sčítají

Odkaz

- <http://fssvm6.fss.muni.cz/vyska/>

Autoři

- **validizační studie:** Karel Rečka (2018)
- **zkrácená verze:** Martin Tancoš (2019)
- **webová aplikace:** Hynek Cígler (2019)



Zdroje

Studie

- Jones, K., Parker, E., Mills, H., Brennan, D., & Jamieson, L.M. (2014). Development and psychometric validation of a Health Literacy in Dentistry scale (HeLD). *Community Dental Health, 31*, 37–43. doi: 10.1922/CDH_3269Jones07
- Rečka, K. (2018). *Dotazník výšky a váhy*. Brno, Masarykova univerzita: nepublikovaná DP.

Literatura

- Goodwin, C. J. (2008). *Research in Psychology: Methods and Design* (5. ed.). NJ: Willey & Sons Inc.
- Urbánek, T., Denglerová, D., & Širůček, J. *Psychometrika: Měření v psychologii*. Praha: Portál, 2011.

135 Vědecká příprava pro ZL

[illegible]

	G2677T/A genotypes			<i>p</i> ⁵	G2677T/A alleles		<i>p</i> ⁵
	GG (<i>n</i> = 12)	GT (<i>n</i> = 17)	TT (<i>n</i> = 7)		G (<i>n</i> = 41)	T (<i>n</i> = 31)	
Desire disorders ¹							
Drug-naïve patients	0	4 (23.5%)	1 (14.3%)	<i>ns</i>	4 (9.8%)	6 (19.4%)	<i>ns</i>
Patients after the treatment	1 (8.3%)	7 (41.2%)	1 (14.3%)	<i>ns</i>	9 (22.0%)	9 (29.0%)	<i>ns</i>
Change in the desire after the treatment ²				<i>ns</i>			<i>ns</i>
Disappearance of the disorder	0 (0.0%)	1 (5.9%)	0 (0.0%)		1 (2.4%)	1 (3.2%)	
New occurrence of the disorder	1 (8.3%)	4 (23.5%)	0 (0.0%)		6 (14.6%)	4 (12.9%)	
Change in the <i>p</i> ⁴	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>		<i>ns</i>	<i>ns</i>	
Orgasm disorders ¹							
Drug-naïve patients	1 (8.3%)	2 (11.8%)	3 (42.9%)	<i>ns</i>	4 (9.8%)	8 (25.8%)	<i>ns</i>
Patients after the treatment	4 (33.3%)	4 (23.5%)	2 (28.6%)	<i>ns</i>	12 (29.3%)	8 (25.8%)	<i>ns</i>
Change in the orgasm after the treatment ²				<i>ns</i>			<i>ns</i>
Disappearance of the disorder	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)		0 (0.0%)	2 (6.5%)	
New occurrence of the disorder	3 (25.0%)	2 (11.8%)	0 (0.0%)		8 (19.5%)	2 (6.5%)	
Change in the <i>p</i> ⁴	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>		0.008	<i>ns</i>	
Lubrication disorders ¹							
Drug-naïve patients	2 (16.7%)	1 (5.9%)	4 (57.1%)	0.018	5 (12.2%)	9 (29.0%)	NS
Patients after the treatment	7 (58.3%)	3 (17.6%)	4 (57.1%)	0.045	17 (41.5%)	11 (35.5%)	NS
Change in the lubrication after the treatment ²				0.021			0.050
Disappearance of the disorder	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (28.6%)		0 (0.0%)	4 (12.9%)	
New occurrence of the disorder	5 (41.7%)	2 (11.8%)	2 (28.6%)		12 (29.3%)	6 (19.4%)	
Change in the <i>p</i> ⁴	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>		<0.001	<i>ns</i>	

⁴Changes in a disorder after paroxetine treatment were assessed using the McNemar's test for pairwise monitoring.

Statistický vtip

‘Statistik je člověk, který leží s hlavou v zapnuté troubě, s nohama v mrazáku a říká „V průměru se cítím dobře“.’

C. Bruce Grossman, cca 1958



Představení výzkumníka

RNDr. Michaela Cvanová – analytička na Institutu biostatistiky a analýz LF MU

– Tým Analýzy dat pod vedením RNDr. Jiřího Jarkovského, Ph.D.

– IBA LF MU je pracovištěm zajišťující

- **vědeckovýzkumnou činnost**
- **řešení vědeckých projektů** a
- poskytování souvisejících služeb, zejména v oblasti **analýzy biologických a klinických dat**, organizace a managementu klinických studií a projektů klinického výzkumu, vývoje softwaru a aplikace ICT.

– IBA LF MU dále zajišťuje prezenční výuku a vedení závěrečných prací a podílí se na realizaci dvou studijních programů MU: Veřejné zdravotnictví a **Matematická biologie a biomedicína**.



Obsah přednášky

Úvod do biostatistiky

- Motivace. Biostatistika a její význam
- Co jsou to data a jak vypadají?
- Jaké máme proměnné?
- Jak můžeme sledované proměnné popsat a vizualizovat?
- Hypotézy můžeme statisticky testovat



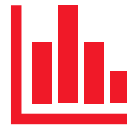
Co si z přednášky odnesete



Schopnost lépe
rozumět
publikovaným
výsledkům



Vědomosti: Co je to
průměr, medián,
interval
spolehlivosti,
směrodatná
odchylka a další, a
rozdíly mezi nimi



Schopnost číst
tabulky a grafy



Zlepšíme kritické
myšlení v oblasti
statistiky



Odvahu analyzovat
vlastní data

Motivace. Biostatistika a její význam

Co je to biostatistika?

- Biostatistika je **aplikace statistických metod** v řešení biologických a klinických problémů.
 - Snahou je **získat z pozorovaných dat užitečnou informaci**.
 - Je **orientována na konkrétní problém**, ne na teoretické aspekty.
- To však neznamená, že lze statistické metody používat bezhlavě.

The screenshot displays the IBM SPSS Statistics Processor interface. The main window shows a syntax script for a two-way ANOVA. The script includes commands for encoding, value labels, and the ANOVA procedure. The output window on the right shows a table of means and standard deviations for the variables ST22_1_TNFA1BP1, ST22_1_IL1b1BP1, ST22_1_IL101BP1, and ST22_1_IL171BP1. The table is organized into columns for the 95.0% Lower CL for Mean, 95.0% Upper CL for Mean, Mean, 95.0% Lower CL for Mean, and 95.0% Upper CL for Mean.

	ST22_1_TNFA1BP1	ST22_1_IL1b1BP1	ST22_1_IL101BP1	ST22_1_IL171BP1
Mean	829319545814439	33.902819019497350	1.219818639760204	.454
95.0% Lower CL for Mean	764894846761998	12.323441778508434	.988514020352899	.652
95.0% Upper CL for Mean	430275718622165	3.530811985162616	.366021423986406	.025
Mean	371989378476609	1.414213562373092	.415618948071394	.082
95.0% Lower CL for Mean	136471033071330	.672062199796706	.663575871169284	.139
95.0% Upper CL for Mean	1.310393403858370	16.336194011315126	.481853559195777	.344
Mean	370274388071641	5.314743256386040	5.26585087774530	.301
95.0% Lower CL for Mean	127331976244662	.842841544754700	.828362031494616	.235
95.0% Upper CL for Mean	1.433955248015830	48.167895917154205	1.233992249624070	1.099

Motivace

Příklad z praxe

The Journal of **EVIDENCE-BASED** DENTAL PRACTICE

FEATURE ARTICLE

EVIDENCE OF DIETARY CALCIUM AND VITAMIN D INADEQUACIES IN A POPULATION OF DENTAL PATIENTS



DANIEL J. PEHOWICH, PhD, MSc^a, AND ENID D. PEHOWICH, MSc^b

^aDepartment of Dentistry, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Canada

^bDepartment of Cellular Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Canada

J Evid Base Dent Pract 2016: [213-219]

1532-3382/\$36.00

© 2016 Elsevier Inc.

All rights reserved.

doi: [http://dx.doi.org/10.1016/
j.jebdp.2016.07.005](http://dx.doi.org/10.1016/j.jebdp.2016.07.005)

Table 1. Dietary calcium and vitamin D intake by sex as percent of daily recommended intake.

Variable	Male (n = 305)		Female (n = 366)	
	Mean \pm SD	Median (IQR)	Mean \pm SD	Median (IQR)
Age ^a	49.2 \pm 19.25	52.0 (25-66)	48.1 \pm 19.68	49.0 (27-65)
Body mass index (kg/m ²) ^a	25.1 \pm 4.67	24.0 (22-27)	26.0 \pm 4.38	26.0 (22-28)
Calcium: all patients ^b	76.3 \pm 33.12	72.0 (53-104)	85.8 \pm 40.94	70.0 (57-95)
Calcium: < 50 years of age ^c	83.1 \pm 35.29 ^d	78.0 (58-103)	99.5 \pm 46.07 ^d	91.0 (70-122)
Calcium: > 50 years of age ^a	70.9 \pm 30.91	64.0 (50-87)	71.8 \pm 28.87	67.0 (51-92)
Vitamin D: all patients ^a	52.2 \pm 43.38	38.0 (22-70)	65.4 \pm 61.81	43.0 (23-86)
Vitamin: D < 50 years of age ^b	68.0 \pm 50.77 ^d	57.0 (29-95)	89.7 \pm 71.91 ^d	67.5 (34-123)
Vitamin: D > 50 years of age ^a	37.9 \pm 29.31	33.0 (18-49)	40.1 \pm 34.43	31.0 (16-52)

IQR, interquartile range; n, number of patients; SD, standard deviation. Calcium adequate intakes (AIs) for women and men: age 18-50 years, 1000 mg/day; age > 50 years, 1200 mg/day. Vitamin D adequate intake (AI) for women and men: age 18-50 years, 200 IU/day; age > 50 years, 400 IU/day.

^a Difference between female and male not significant.

^b Difference between female and male, $P < .05$.

^c Difference between female and male, $P < .01$.

^d Difference between same gender age groups, $P < .01$.

Figure 2. Frequency distribution of dietary vitamin D intake for all patients for the period 2003-2013 as percentage of assumed Adequate Intake (AI; $n = 670$).

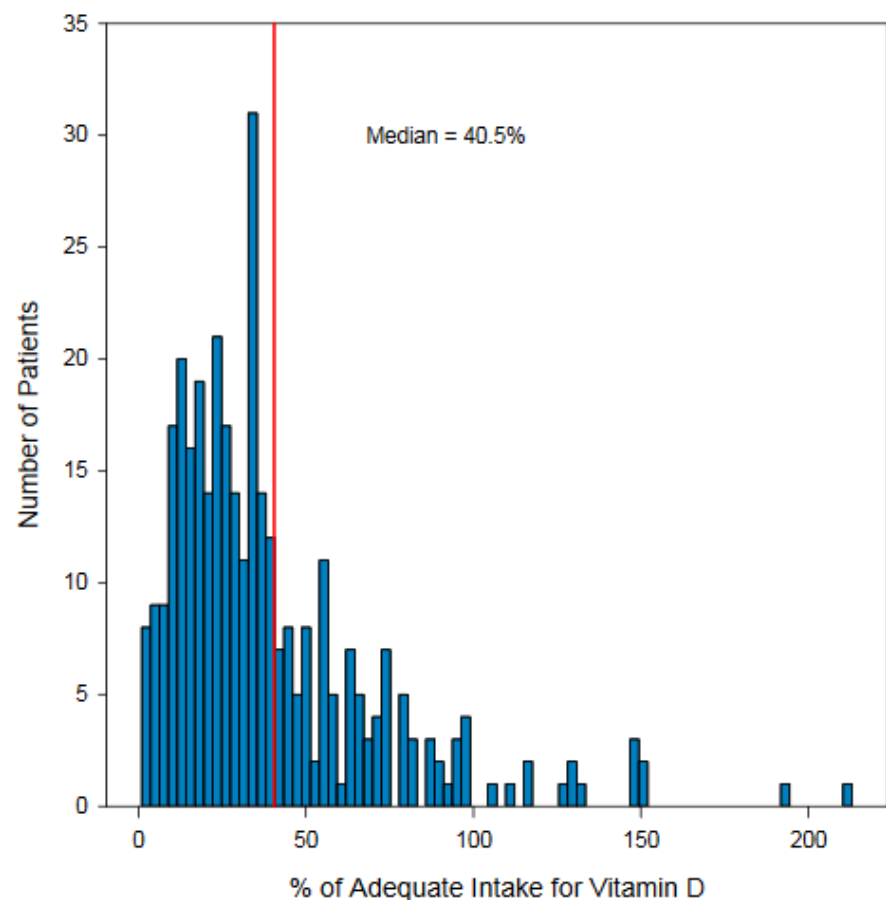
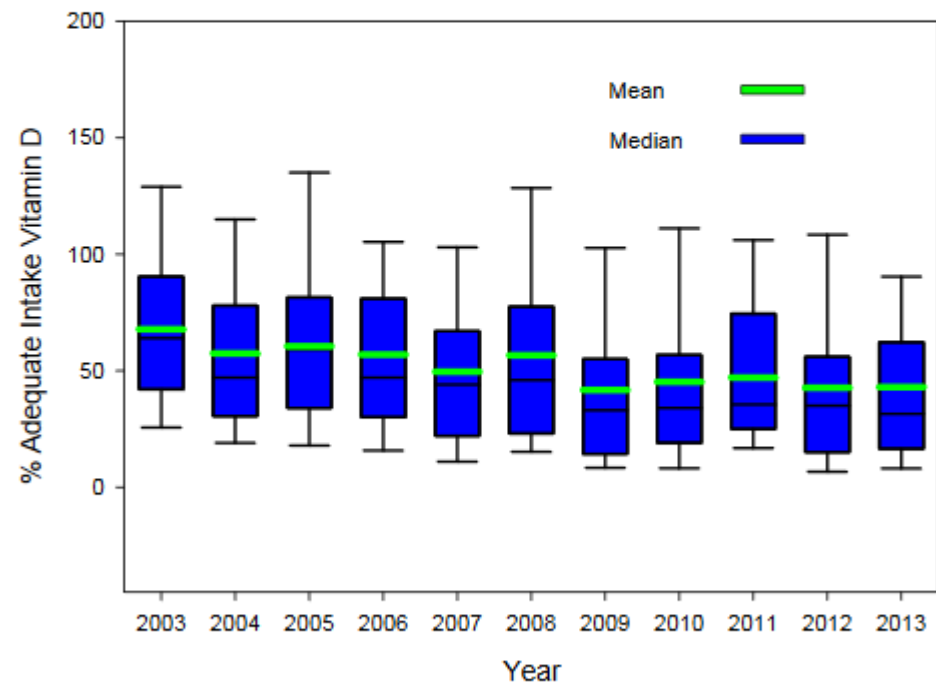
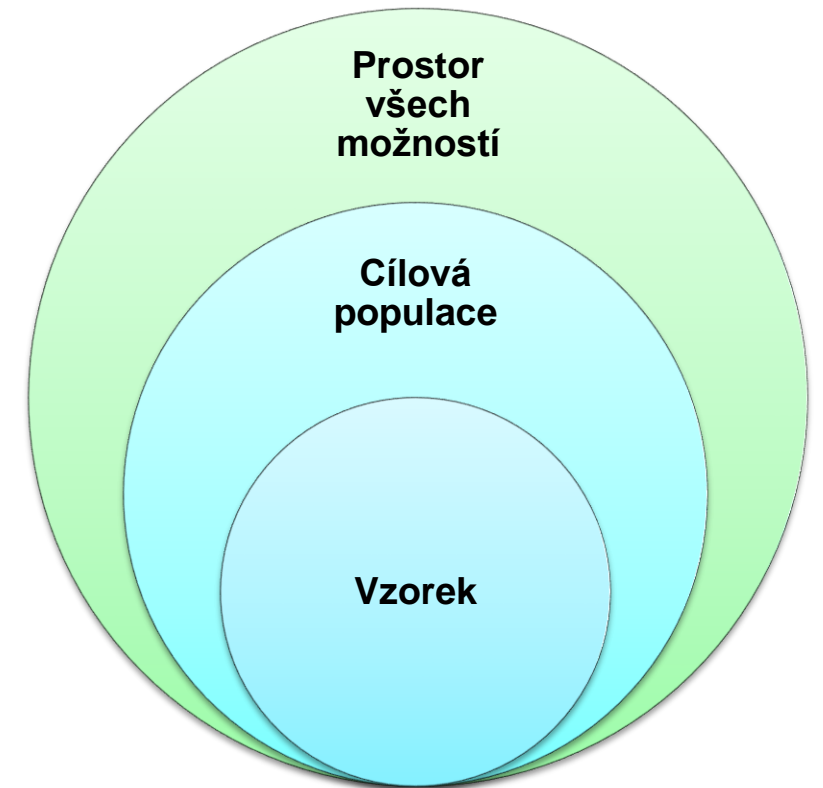


Figure 4. Box plot of means and median dietary vitamin D intake for all patients by year. Estimates of intake are percentage of existent Adequate Intake (AI) for the period 2003-2013 ($n = 670$).



Co jsou to data a jak vypadají?

- **Cílová populace** – skupina subjektů, o které chceme zjistit nějakou informaci (např. všichni pacienti s danou diagnózou v ČR).
- Cílová populace = základní soubor
- **Experimentální vzorek** – podskupina (výběr) z cílové populace, kterou „máme k dispozici“ (pozorovaný soubor).
 - Musí odpovídat svými charakteristikami cílové populaci.
 - Chceme totiž zobecnit výsledky na celou cílovou populaci.
- **Data** – číselný nebo slovní záznam informací o pozorovaném souboru lidí, zdravotnických zařízení apod.



Ukázka datového souboru

ZNAKY (parametry, proměnné)

**Základní jednotka dat
(objekty, subjekty)**

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	ID	datum odběru a vyšetření	věk v době odběrů a vyšetření	pohlaví_muž =0, žena=1	národnost česká=0, slovenská=1	váha v kg	výška v cm	BMI
2	ZL_01	06.04.2017	21	0	0	63	184	18,6
3	ZL_02	06.04.2017	21	1	1	57	167	20,43
4	ZL_03	06.04.2017	23	1	0	62	163	23,34
5	ZL_04	06.04.2017	22	1	1	64	174	21,14
6	ZL_05	06.04.2017	21	0	0	80,4	177	25,66
7	ZL_06	06.04.2017	21	0	0	90	178	28,41
8	ZL_07	06.04.2017	21	1	0	57	173	19,04
9	ZL_08	06.04.2017	22	1	0	65	169	22,75
10	ZL_09	06.04.2017	22	1	1	75	179	23,4
11	ZL_11	18.12.2017	22	1	0	59	170	20,42
12	ZL_12	18.12.2017	22	1	0	57	164	21,19
13	ZL_14	19.04.2017	21	1	0	62	174	20,48
14	ZL_15	19.04.2017	21	1	0	51	162	19,81
15	ZL_16	19.04.2017	20	1	0	54	165	19,83
16	ZL_17	08.11.2017	21	0	0	76	173	25,39
17	ZL_18	19.04.2017	21	1	1	62	173	20,71
18	ZL_21	19.04.2018	21	1	0	48	156	19,72

Zásady pro ukládání dat

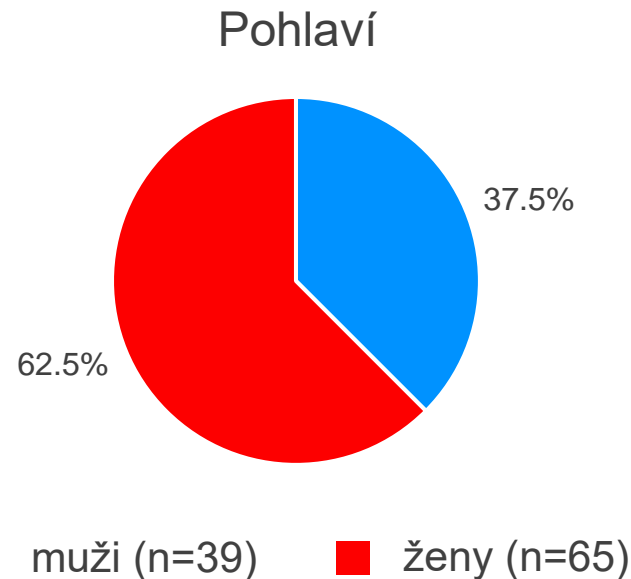
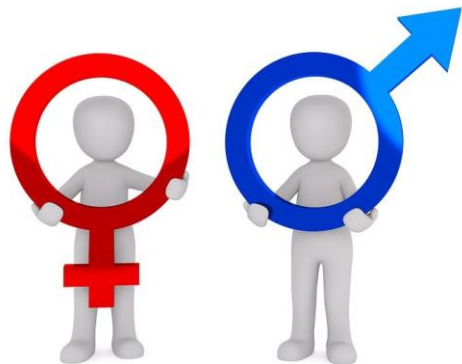
- Správné a přehledné uložení dat je základem jejich pozdější analýzy.
- Je vhodné **rozmyslet si před zahájením sběru dat, jak budou data ukládána.**
- Pro počítačové zpracování dat je nezbytné ukládat data v tabulkové podobě:
 - Každý sloupec obsahuje pouze jediný typ dat, identifikovaný hlavičkou sloupce (hlavičky sloupců musejí být unikátní).
 - Každý řádek obsahuje minimální jednotku dat (např. pacient, jedna návštěva pacienta apod.).
 - Je nepřípustné kombinovat v jednom sloupci číselné a textové hodnoty.
 - Komentáře jsou uloženy v samostatných sloupcích.
 - U textových dat je nezbytné kontrolovat překlepy v názvech kategorií.
 - Specifickým typem dat jsou datumy, u nichž je nezbytné kontrolovat, zda jsou uloženy v korektním formátu.

Jaké máme znaky?

Znaky, které nabývají **dvou hodnot**

- Pouze dvě kategorie
- Obvykle se kódují pomocí číslic 1 (přítomnost znaku/ano) a 0 (nepřítomnost znaku/ne)
- *Příklad:*

- Rovná se?



	n (%)
Pohlaví	
muži	39 (37,5 %)
ženy	65 (62,5 %)
celkem	104 (100,0 %)

Jaké máme znaky?

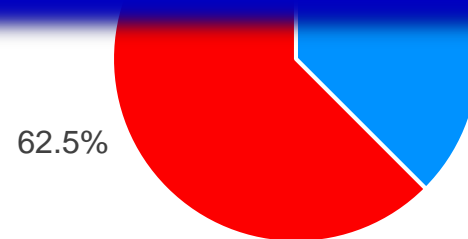
Znaky, které nabývají **dvou hodnot**

- Pouze dvě kategorie
- Obvykle se kódují pomocí číslic 1 (přítomnost znaku/ano) a 0 (nepřítomnost)

– *Příklad:*

Binární znaky (kategoriální)

– Rovná se?



■ muži (n=39) ■ ženy (n=65)

Koláčový graf

	n (%)
celkem	104 (100,0 %)
ženy	65 (62,5 %)
muži	39 (37,5 %)

Jaké máme znaky?

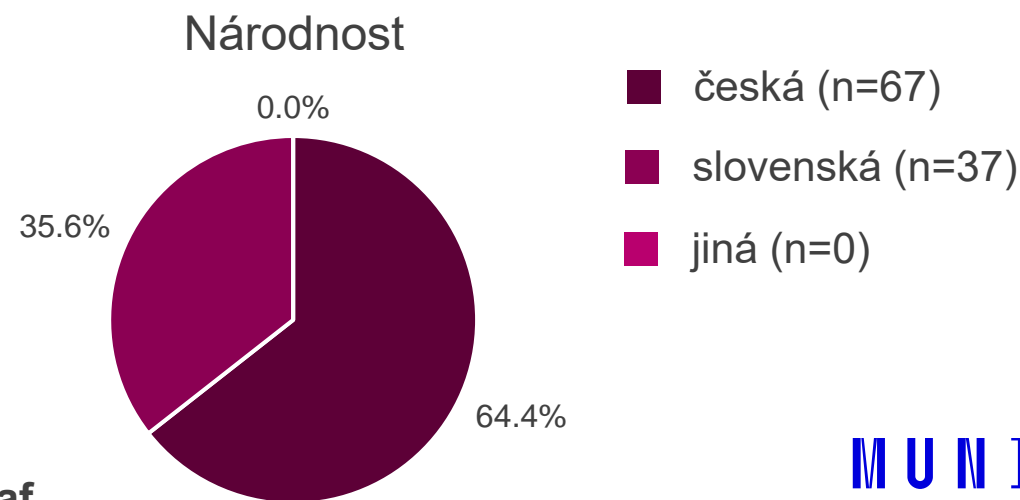
Znaky, které nabývají více hodnot, které nelze seřadit

- Více kategorií, které nelze vzájemně seřadit (neexistuje u nich přirozené pořadí jednotlivých hodnot)
- Obvykle textové hodnoty
- *Příklad:*

- Rovná se?



	n (%)
Národnost	
česká	67 (64,4 %)
slovenská	37 (35,6 %)
jiná	0 (0,0 %)
celkem	104 (100,0 %)



Jaké máme znaky?

Znaky, které nabývají **více hodnot, které nelze seřadit**

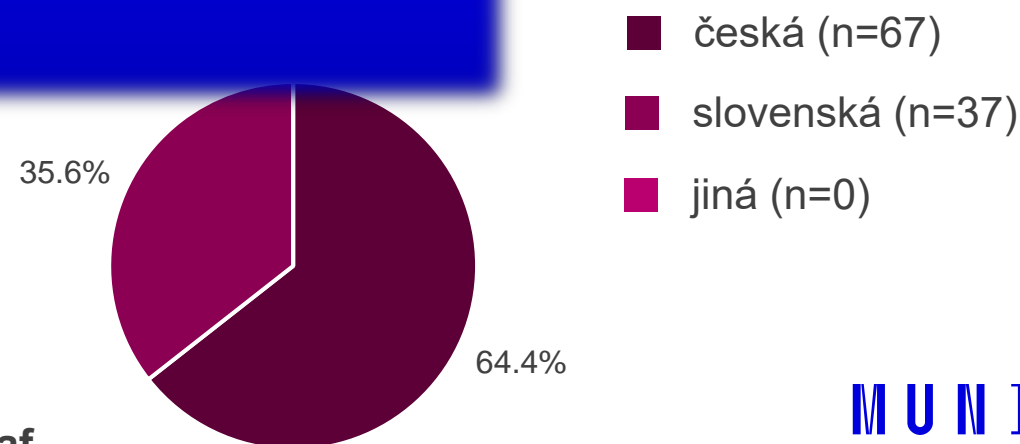
- Více kategorií, které nelze vzájemně seřadit
(neexistuje u nich přirozené pořadí jednotlivých hodnot)
- Obvykle t
- *Příklad:*

Nominální znaky (kategoriální)

- Rovná se?



	n (%)
Národnost	
česká	67 (64,4 %)
slovenská	37 (35,6 %)
jiná	0 (0,0 %)
celkem	104 (100,0 %)

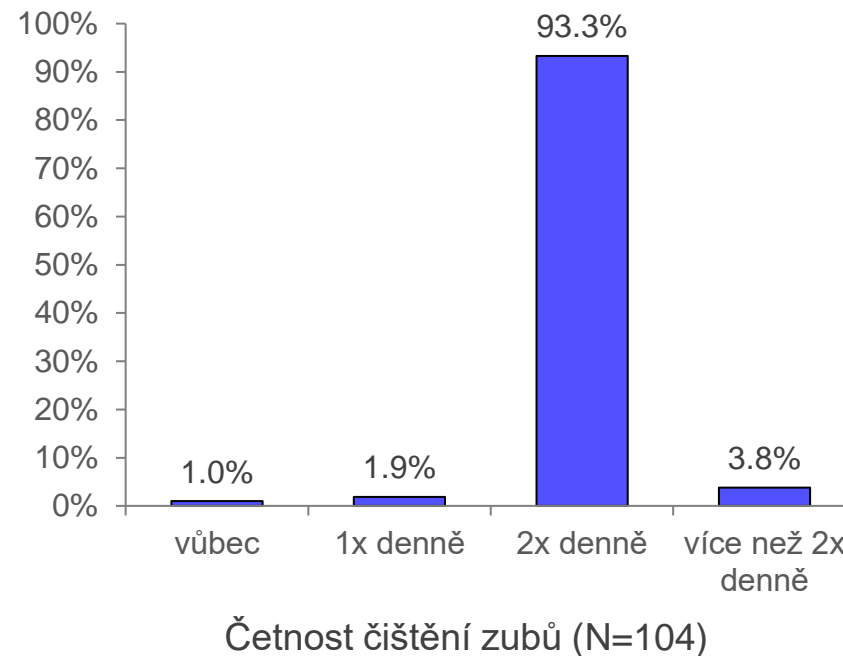


Koláčový graf

Jaké máme znaky?

Znaky, které nabývají **více hodnot, které nelze seřadit**

- Několik kategorií, které lze vzájemně seřadit
- *Příklad: četnost čištění zubů*
- Rovná se? Větší x menší?



	n (%)
Četnost čištění zubů	
vůbec	1 (1,0 %)
1x denně	2 (1,9 %)
2x denně	97 (93,3 %)
více než 2x denně	4 (3,8 %)
celkem	104 (100,0 %)

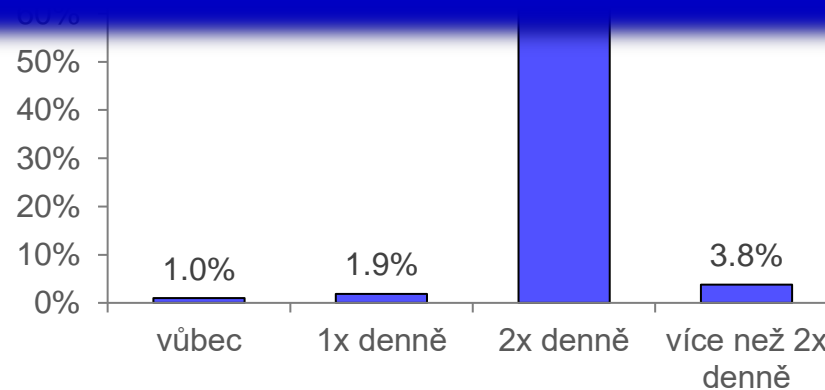
Sloupcový graf

Jaké máme znaky?

Znaky, které nabývají **více hodnot, které nelze seřadit**

- Několik kategorií, které lze vzájemně seřadit
- *Příklad: četnost čištění zubů*
- Rovná se

Ordinální znaky (kategoriální)



Sloupcový graf

Četnost čištění zubů (N=104)

Jaké máme znaky?

Znaky, které mohou nabývat **libovolných hodnot** (v určitém rozmezí)

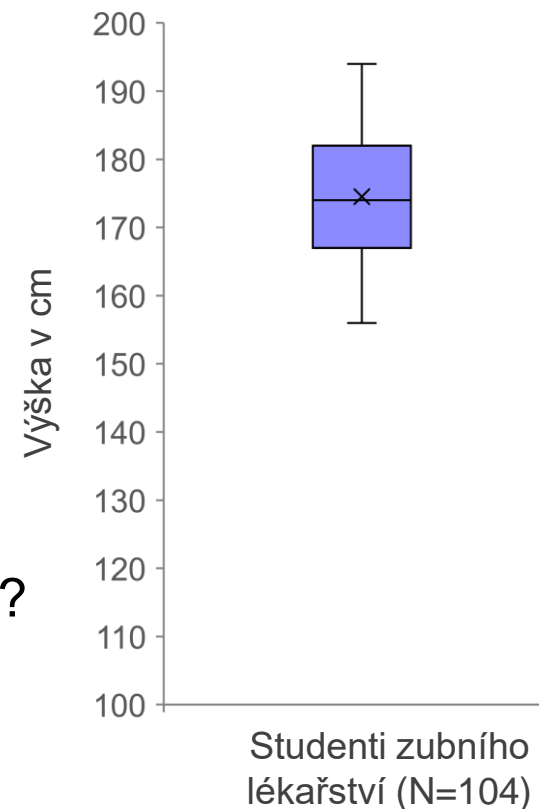
- Měření, jejichž výsledek nabývá libovolných hodnot v určitém rozmezí (intervalu)

– *Příklad:*



- Rovná se? Větší x menší? O kolik? Kolikrát?

Krabicový graf
(Box Plot)



	Výška v cm
medián	174
5%-95% percentil	162-191
průměr	174,5
SD	9,4

maximum
75% percentil
medián × průměr
25% percentil
minimum

Jaké máme znaky?

Znaky, které mohou nabývat **libovolných hodnot** (v určitém rozmezí)

- Měření, jejichž výsledek nabývá libovolných hodnot v určitém rozmezí (intervalu)

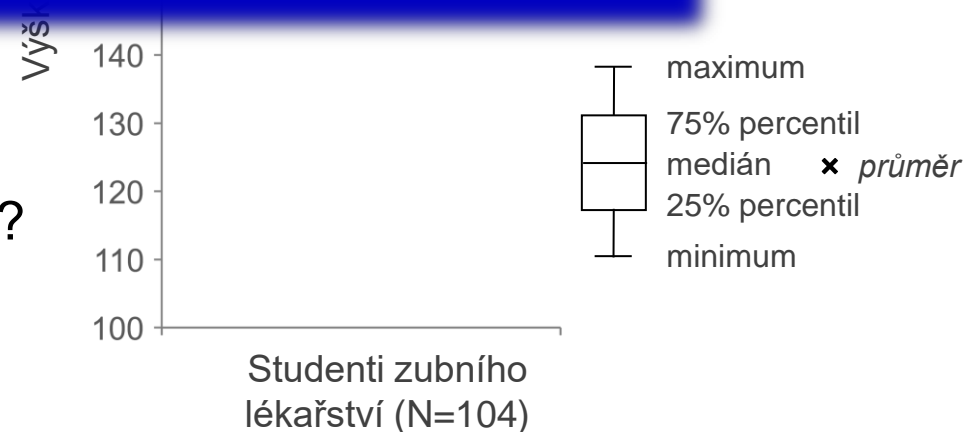
– *Příklad:*

Spojitě znaky

Krabicový graf
(Box Plot)

	Výška v cm
medián	174
25%-95% percentil	162-191
průměr	174,5
SD	9,4

- Rovná se? Větší x menší? O kolik? Kolikrát?



Jaké máme znaky?

Znaky, které mohou nabývat **pouze spočetně mnoho hodnot**

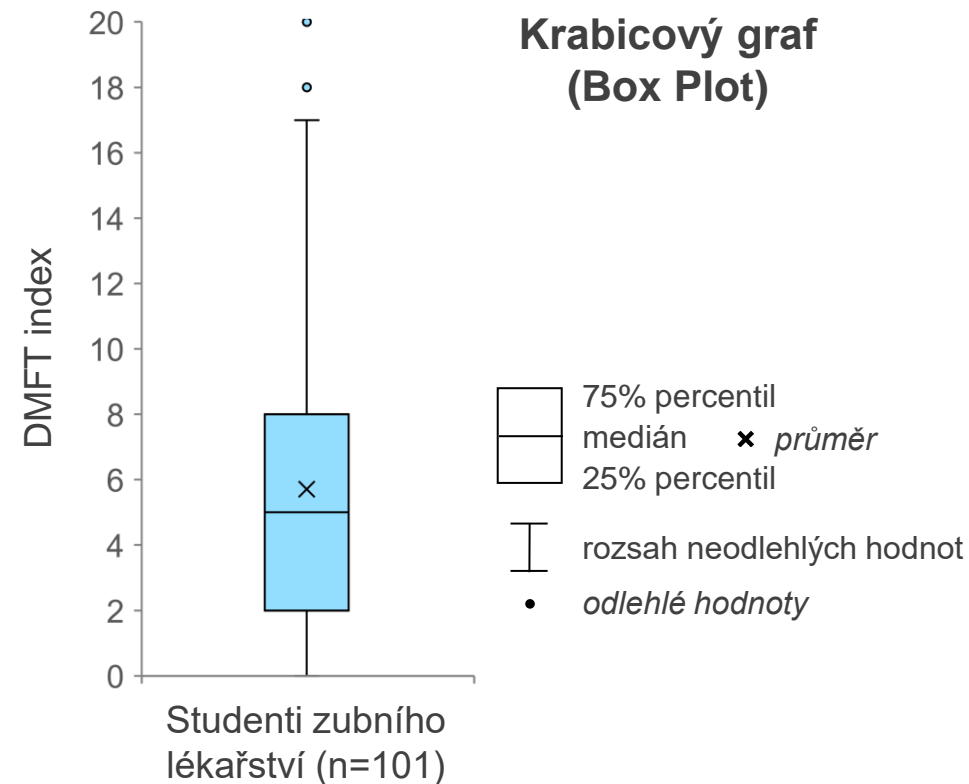
— omezené množství hodnot

— *Příklad:*



— Rovná se? Větší x menší? O kolik? Kolikrát?

KPE	četnost
0	8
1	11
2	11
3	10
4	5
5	11
6	11
7	6
8	5
9	2
10	5
11	4
12	2
13	1
14	4
15	1
16	1
17	1
18	1
19	0
20	1
chybějící	3
celkem	104



	KPE index
medián	5
5%-95% percentil	0-14
průměr	5,7
SD	4,6

Jaké máme znaky?

Znaky, které mohou nabývat **pouze spočetně mnoho hodnot**

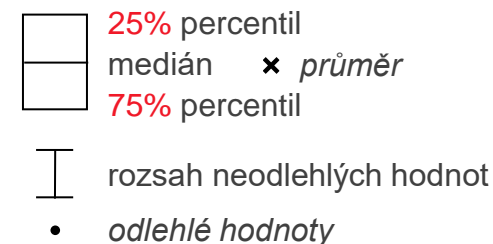
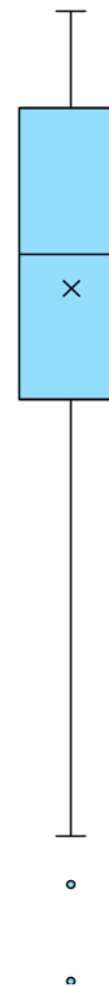
– omezené množství hodnot

– *Příklad:*

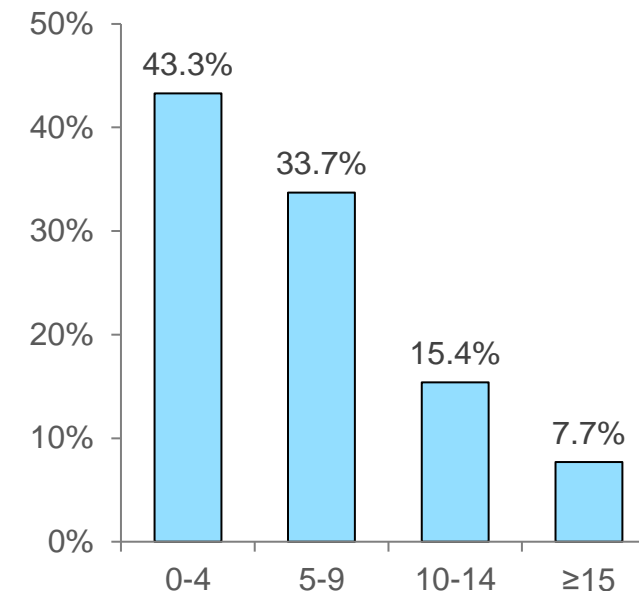


– Rovná se? Větší x menší? O kolik? Kolikrát?

KPE	četnost
0	8
1	11
2	11
3	10
4	5
5	11
6	11
7	6
8	5
9	2
10	5
11	4
12	2
13	1
14	4
15	1
16	1
17	1
18	1
19	0
20	1
chybějící	3
celkem	104



Sloupcový graf



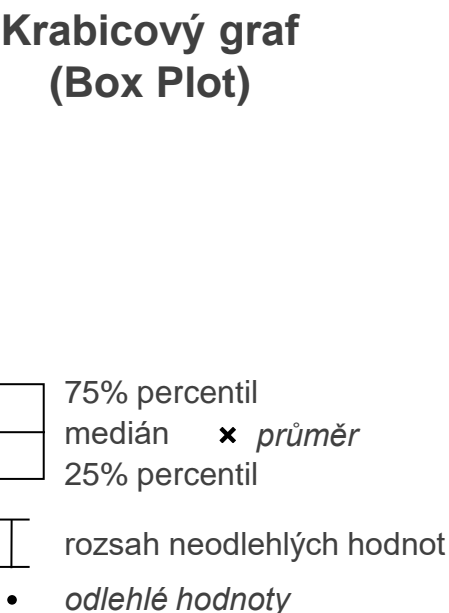
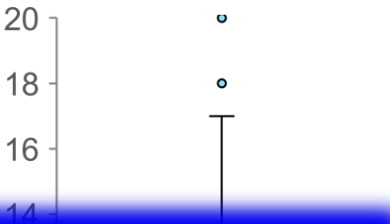
Jaké máme znaky?

Znaky, které mohou nabývat pouze spočetně mnoho hodnot

– omezené množství hodnot

– *Příklad:*

KPE	četnost
0	8
1	11
2	11
3	10



Diskrétní znaky

– Rovná se? Větší x menší? O kolik? Kolikrát?

13	1
14	4
15	1
16	1
17	1
18	1
19	0
20	1
chybějící	3
celkem	104

Studenti zubního lékařství (n=101)

	KPE index
medián	5
5%-95% percentil	0-14
průměr	5,7
SD	4,6

Znaky, které nabývají více hodnot, které nelze seřadit

– Více kategorií, které nelze seřadit

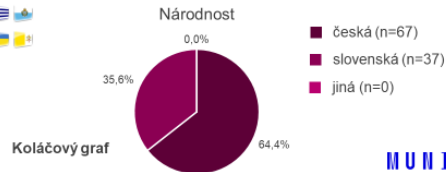
– Obvykle textové hodnoty

– Příklad:



– Rovná se?

Národnost	n (%)
česká	67 (64,4 %)
slovenská	37 (35,6 %)
jiná	0 (0,0 %)
celkem	104 (100,0 %)



20 Vědecká příprava pro ZL – Úvod do Biostatistiky

MUNI
MED

Nominální znaky

Znaky, které nabývají dvou hodnot

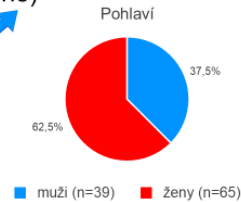
– Pouze dvě kategorie

– Obvykle se kódují pomocí číslic 1 (přítomnost znaku/ano) a 0 (nepřítomnost znaku/ne)

– Příklad:



– Rovná se?



Pohlaví	n (%)
muži	39 (37,5 %)
ženy	65 (62,5 %)
celkem	104 (100,0 %)

18 Vědecká příprava pro ZL – Úvod do Biostatistiky

MUNI
MED

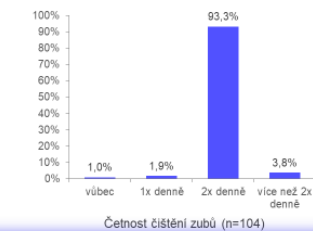
Binární znaky

Znaky, které nabývají více hodnot, které lze seřadit

– Několik kategorií, které lze vzájemně seřadit

– Příklad: četnost čištění zubů

– Rovná se? Větší x menší?



Četnost čištění zubů	n (%)
vůbec	1 (1,0 %)
1x denně	2 (1,9 %)
2x denně	97 (93,3 %)
více než 2x denně	4 (3,8 %)
celkem	104 (100,0 %)

Sloupcový graf

22 Vědecká příprava pro ZL

MUNI
MED

Ordinální znaky

Znaky, které mohou nabývat libovolných hodnot (v určitém rozmezí)

– Měření, jejichž výsledek nabývá

libovolných hodnot v určitém rozmezí

(intervalu)

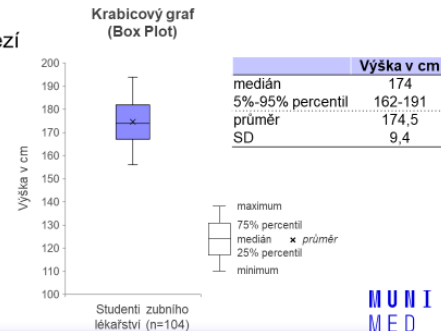
– Příklad:



– Rovná se? Větší x menší? O kolik?

Kolikrát?

24 Vědecká příprava pro ZL – Úvod do Biostatistiky



MUNI
MED

Spojitě znaky

Znaky, které mohou nabývat pouze spočteně mnoho hodnot

– omezené množství hodnot

– Příklad:

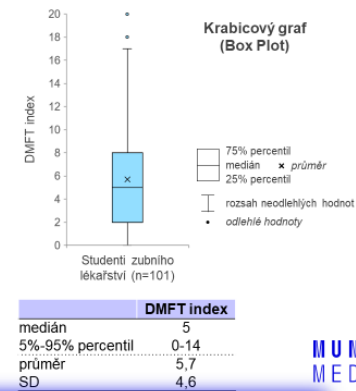


– Rovná se? Větší x menší?

O kolik? Kolikrát?

26 Vědecká příprava pro ZL – Úvod do Biostatistiky

DMFT	četnost
0	8
1	11
2	11
3	10
4	5
5	11
6	11
7	6
8	5
9	2
10	5
11	4
12	2
13	1
14	4
15	1
16	1
17	1
18	1
19	0
20	1
chybějící	3
celkem	104



MUNI
MED

Diskrétní znaky



Nominální znaky



Binární znaky



Ordinální znaky



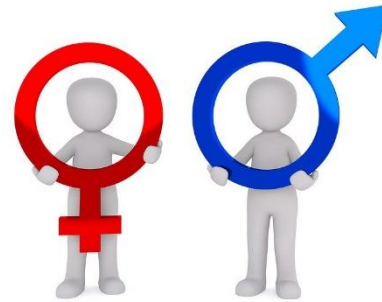
Spojité znaky



Diskrétní znaky



Nominální znaky



Binární znaky



Ordinální znaky

Lze s nimi zacházet
jako s **kategoriálními znaky**



Diskrétní znaky

Lze s nimi zacházet
jako se
spojitými znaky



Spojité znaky

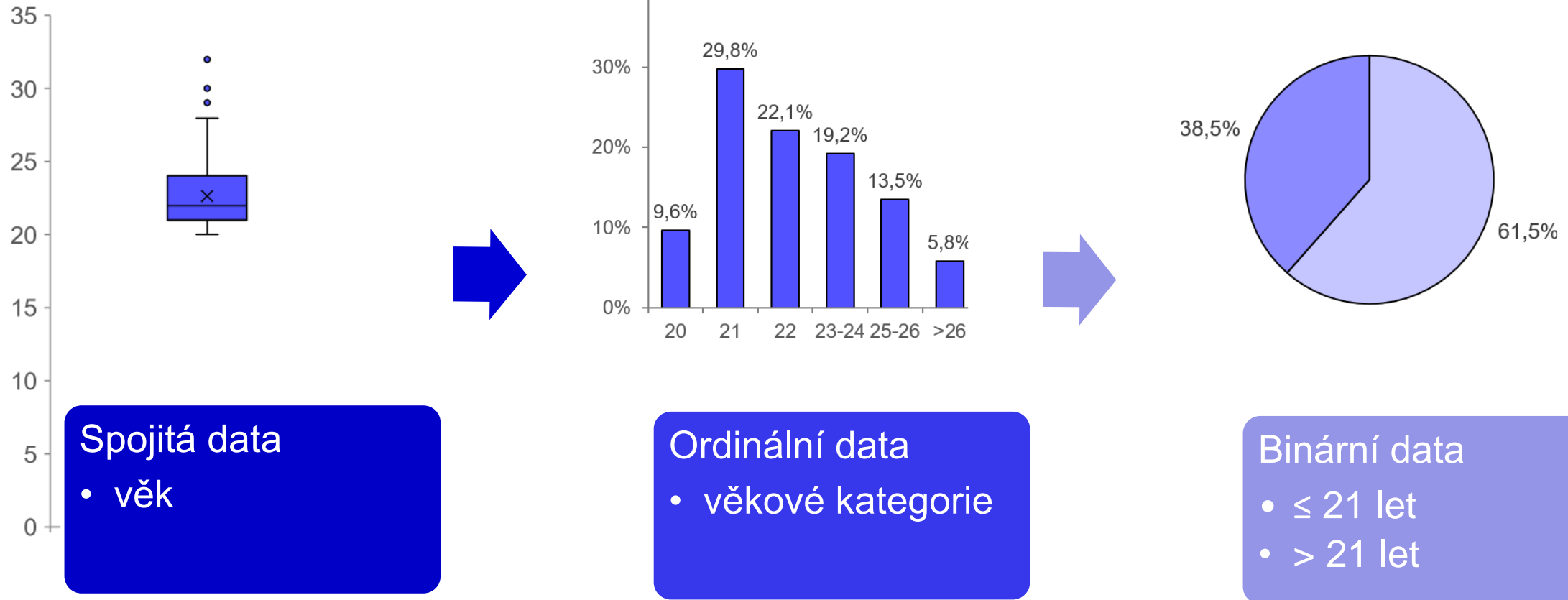


Diskrétní znaky



Ordinální znaky

Možnost převodu dat



Motivace

M U N I
M E D

Cíle popisné sumarizace dat

Zpřehlednit

Shrnout

Podklad pro
stanovení
hypotéz

Odhalit odlehlé a
chybné hodnoty

Odhalit chybějící
hodnoty

- **sumarizace kategoriálních dat** → cílem popsat absolutní a relativní četnosti jednotlivých kategorií
- **sumarizace spojitých dat** → cílem popsat těžiště (míry polohy) a rozsah (míry variability) pozorovaných hodnot

Popisná sumarizace kategoriálních dat



Nominální znaky



Binární znaky



Ordinální znaky

Lze s nimi zacházet
jako s **kategoriálními**
znaky



Diskrétní znaky

Popisná sumarizace kategoriálních dat

Primární data

Jak často si
čistíte zuby

2

0

2

2

2

2

2

2

1

2

3

.

.

.

.

N=104

Kódování:

0 = vůbec

1 = 1x denně

2 = 2x denně

3 = více než 2x denně

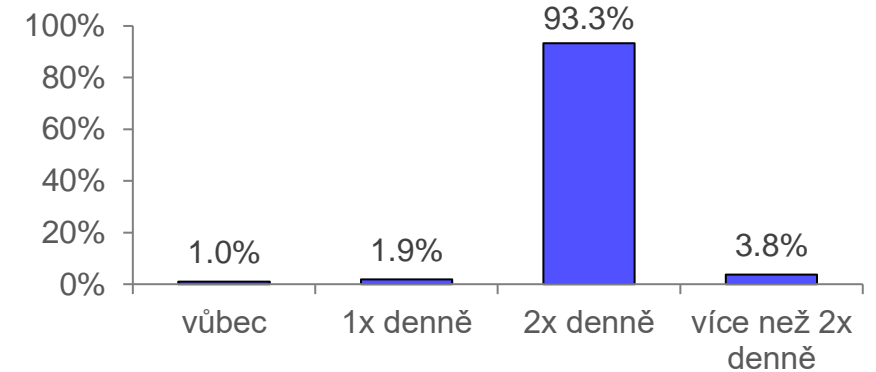
Frekvenční tabulka

Četnost čištění zubů	n (%)
vůbec	1 (1,0 %)
1x denně	2 (1,9 %)
2x denně	97 (93,3 %)
více než 2x denně	4 (3,8 %)
celkem	104 (100,0 %)

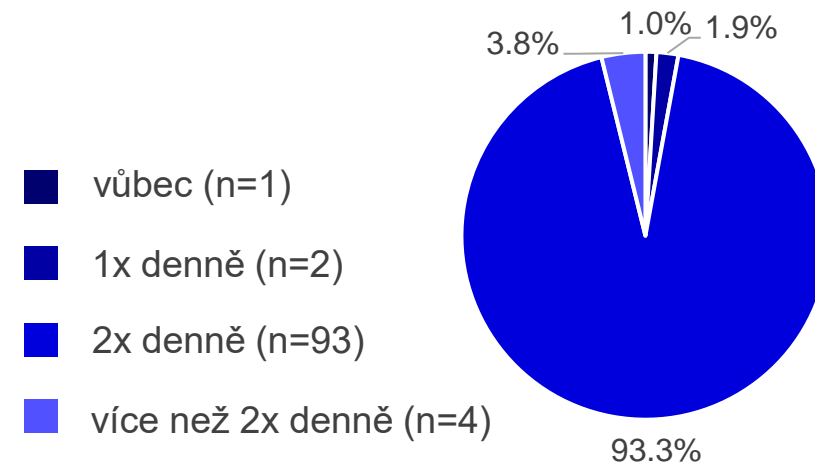
n – absolutní četnost dané kategorie

% – relativní četnost; výpočet jako $n/N \cdot 100$

Vizualizace



Četnost čištění zubů (N=104)



Popisná sumarizace **spojitých dat**

Lze s nimi zacházet
jako se
spojitými znaky



Spojité znaky



Diskrétní znaky



Ordinální znaky

Popisná sumarizace spojitých dat

Primární data

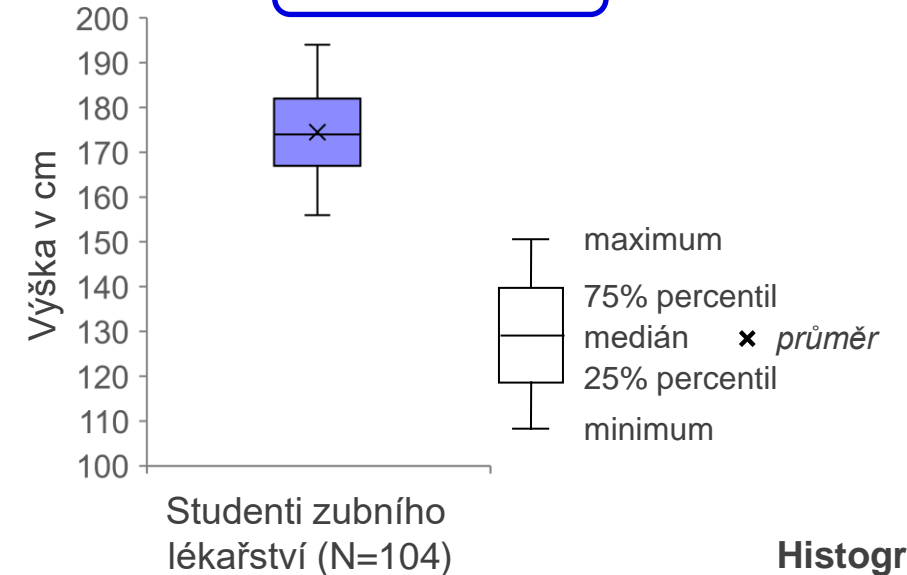
Výška

184
167
163
174
177
178
173
169
179
185
.
.
.
.
.
.
N=104

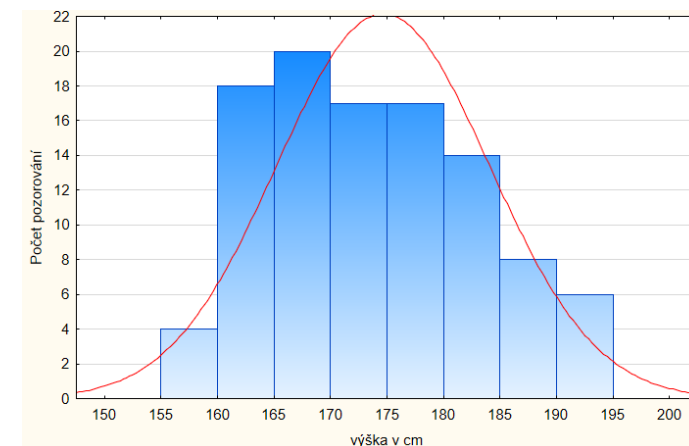
Tabulka popisných statistik

Výška v cm	
N	104
Průměr (Mean)	174,5
95% interval spolehlivosti průměru (confidence interval)	172,7-176,3
Medián (Median)	174
Směrodatná odchylka (SD) (Standard Deviation)	9,4
Minimum	156
Maximum	194
Dolní kvartil (Lower Quartile)	167
Horní kvartil (Upper Quartile)	182
5%-95% percentil	162-191

Vizualizace



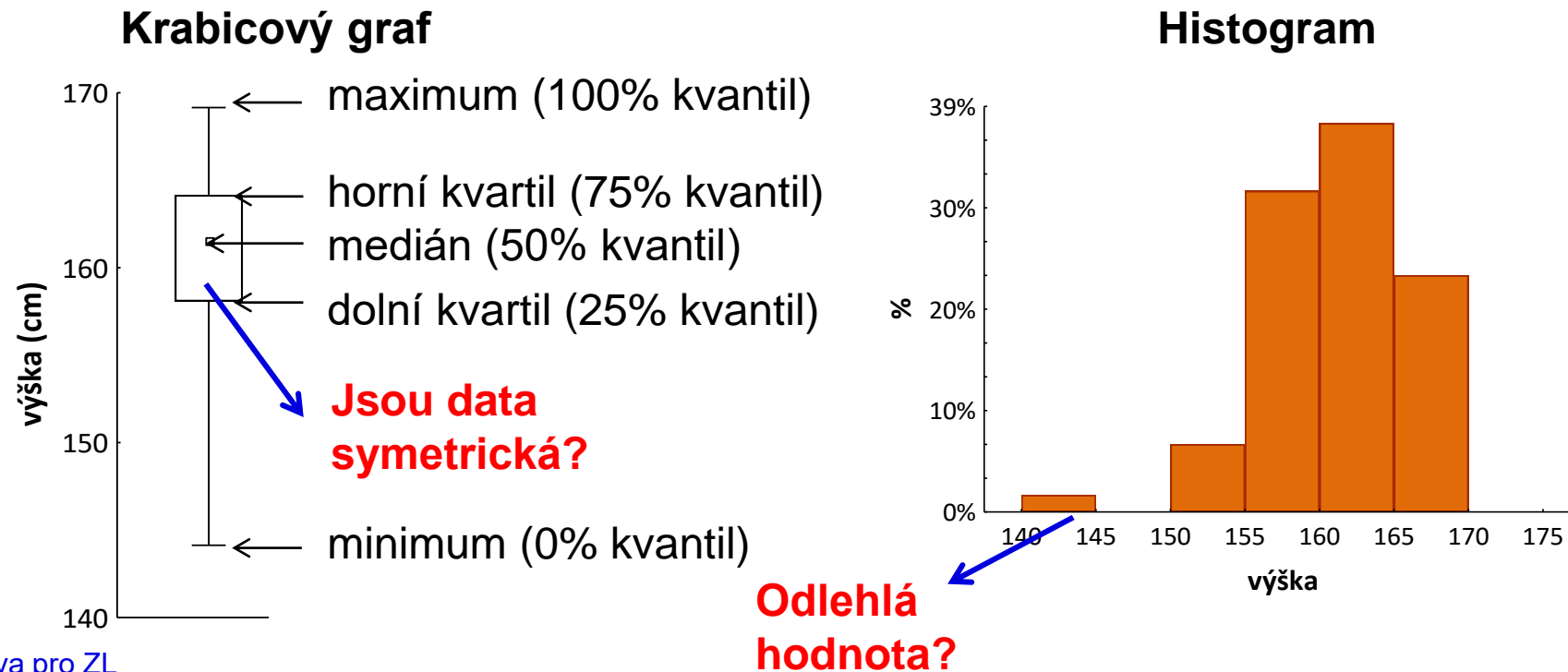
Histogram



Vizualizace spojitých dat

- **Vizualizace kvantitativních dat:** nejčastěji pomocí krabicového grafu nebo histogramu

Příklad: Popis výšky pacientů (cm)



Spojitá data – míry polohy I

- **Minimum a maximum** – nejmenší a největší pozorovaná hodnota nám dávají obraz o tom, kde se na ose x pohybujeme.
- **Průměr** (*mean*) – charakterizuje hodnotu, kolem které kolísají ostatní pozorované hodnoty. Je to „těžiště“ dat (součet rozdílů podprůměrných hodnot od průměru je stejný jako součet rozdílů nadprůměrných hodnot od průměru).

Vizualizace:

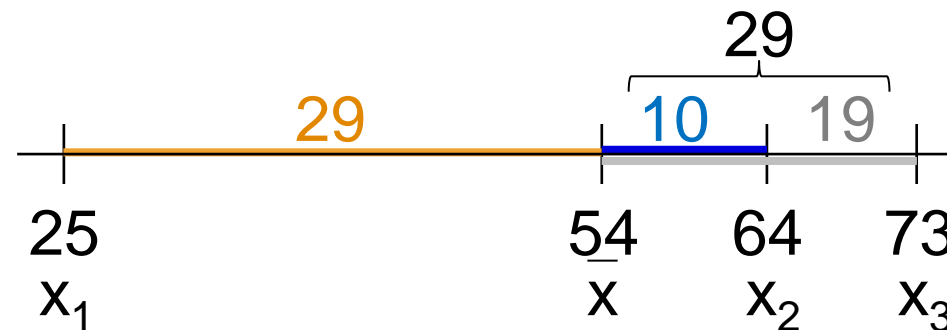
$$\bar{x} = (25+64+73) / 3 = 54$$

Příklad: $N = 8$

Data = 6 1 7 4 3 2 7 8

Součet dat = $6+1+7+4+3+2+7+8 = 38$

Průměr = $38 / N = 38 / 8 = 4,75$



$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

Spojitá data – míry polohy II

– **Medián** (*median*) – je prostřední pozorovaná hodnota. Dělí pozorované hodnoty na dvě půlky, půlka hodnot je menší a půlka hodnot je větší než medián.

– **Příklad 1:** $N = 9$

N liché $\rightarrow (n + 1) / 2$ pozice znamená 5.

pozice po seřazení

Data = 3,0 4,2 1,1 2,5 2,2 3,8 5,6 2,7

1,7

Seřazená data = 1,1 1,7 2,2 2,5 2,7 3,0

3,8 4,2 5,6

Medián = 2,7

– **Příklad 2:** $N = 8$

N sudé \rightarrow vypočítáme hodnotu „mezi“ 4.

$(n/2 - \text{tým})$ a 5. $(n/2 + 1 - \text{tým})$ prvkem po

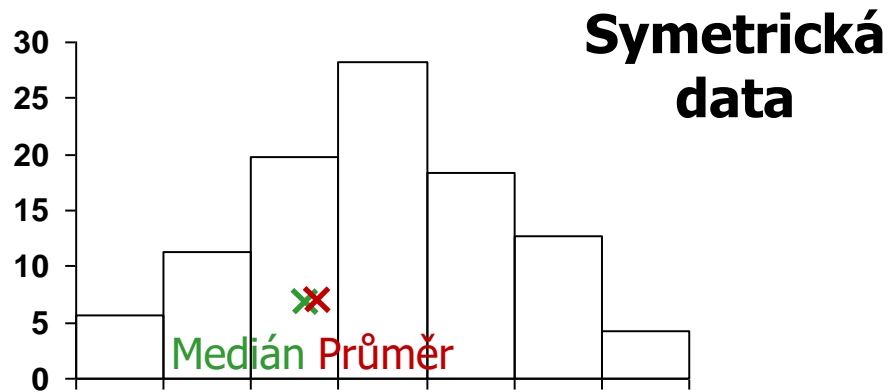
seřazení

Data = 6 1 7 4 3 2 7 8

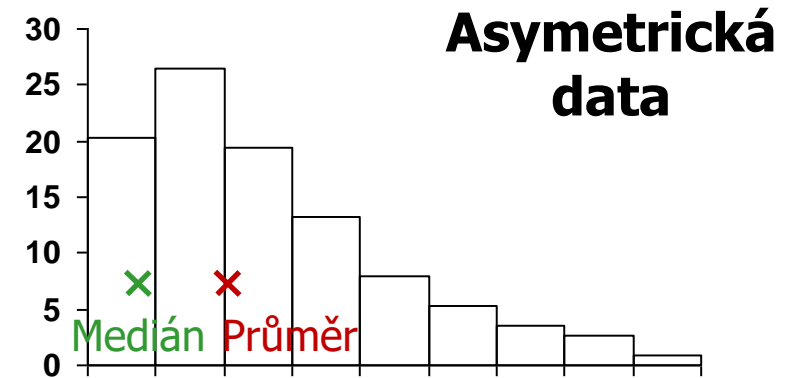
Seřazená data = 1 2 3 4 6 7 7 8

Medián = $(4 + 6) / 2 = 5$

Průměr vs. medián



- hodnoty mediánu a průměru téměř splývají
- medián i průměr dobrým odhadem frekvenčního středu dat (střední hodnoty)



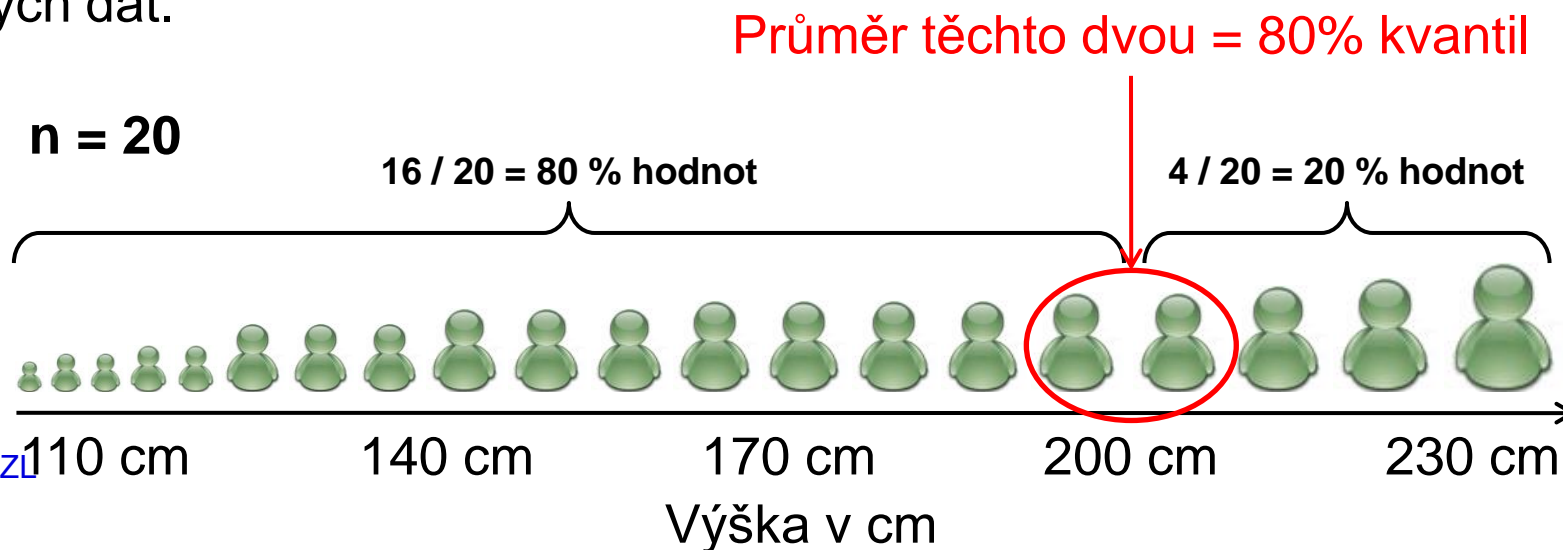
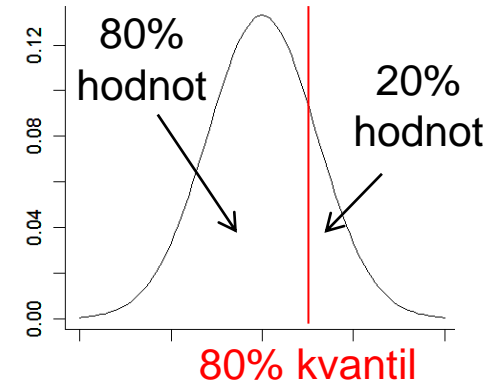
- hodnoty mediánu a průměru se liší
- průměr není vhodným odhadem frekvenčního středu dat (střední hodnoty)
- průměr je vhodný, pokud chceme charakterizovat spotřebu (léků, peněz apod.)

Kvantil (*quantile*)

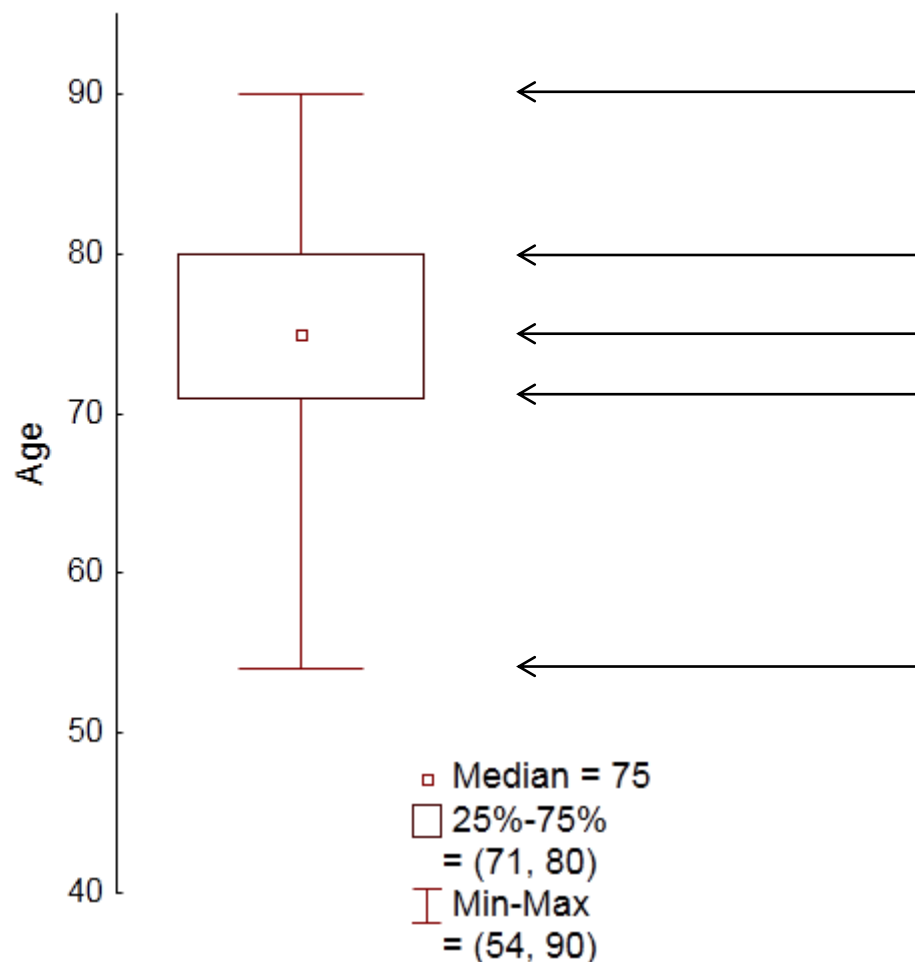
- Kvantil lze definovat jako číslo na reálné ose, které rozděluje pozorovaná data na dvě části:

$p\%$ kvantil rozděluje data na $p\%$ hodnot a $(100-p)\%$ hodnot.

- Příklad: Máme soubor 20 osob, u nichž měříme výšku. Chceme zjistit 80% kvantil souboru pozorovaných dat.



Významné kvantily



Maximum = 100% kvantil

Horní kvartil = 75% kvantil

Medián = 50% kvantil

Dolní kvartil = 25% kvantil

Minimum = 0% kvantil

Věk

90

80

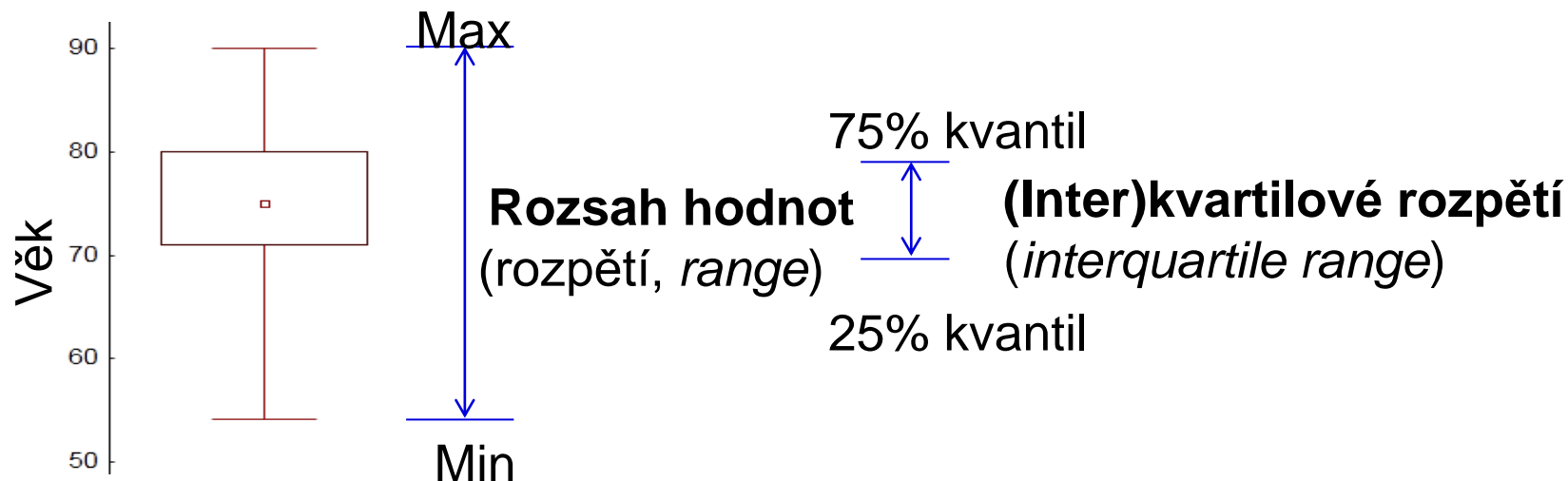
75

71

54

Spojitá data – míry variability I

- **Rozsah hodnot** (rozpětí, *range*) = maximum – minimum. Je to nejjednodušší charakteristika variability pozorovaných dat. Je snadno ovlivnitelný netypickými (odlehlymi) hodnotami.
- **Kvantilové rozpětí** je definováno $p\%$ kvantilem a $(100-p)\%$ kvantilem a je méně ovlivněno odlehlymi hodnotami. Speciálním případem je (inter)kvartilové rozpětí (= 75% kvantil – 25% kvantil), které pokrývá 50% pozorovaných hodnot.



Spojitá data – míry variability II

- **Rozptyl** – průměrný čtverec odchylky od průměru. Velmi ovlivnitelný odlehlými hodnotami.

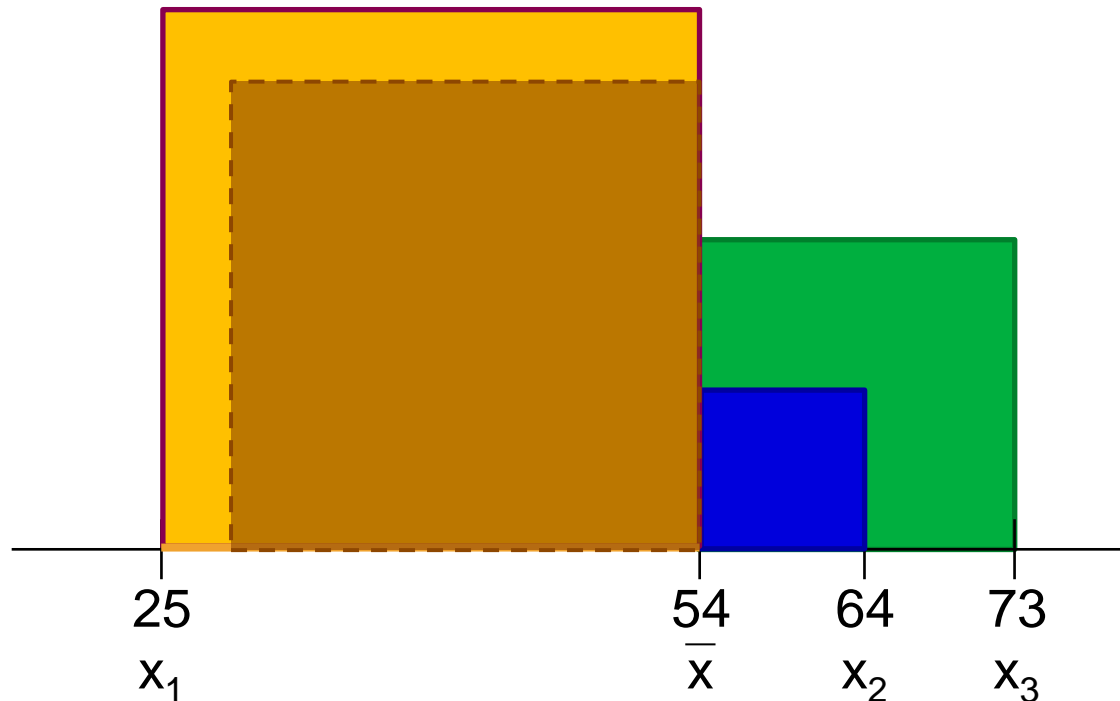
$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

- **Směrodatná odchylka** – odmocnina z rozptylu. Výhodou směrodatné odchylky je, že má stejné jednotky jako pozorovaná data.
- **Variační koeficient (koeficient variace)** – podíl směrodatné odchylky a průměru. Používá se na srovnání variability mezi datovými soubory. Často se vyjadřuje v procentech.

$$v = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \%$$

Výpočet rozptylu a směrodatné odchylky

- Příklad čtverců odchylek od průměru pro $n = 3$.
- Rozptyl je možno značně ovlivnit odlehlými pozorováními.



Rozptyl:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Směrodatná
odchylka:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$s = \sqrt{\frac{(25 - 54)^2 + (64 - 54)^2 + (73 - 54)^2}{2}} = \sqrt{651} = 25,5$$

Normální rozdělení

- Nejklasičtějším modelovým rozdělením, od něhož je odvozena celá řada statistických analýz je tzv. **normální rozdělení**, známé též jako **Gaussova křivka**.
- Popisuje rozdělení pravděpodobnosti spojité náhodné veličiny, např. výška v populaci, chyba měření ...
- Je kompletně popsáno dvěma parametry:

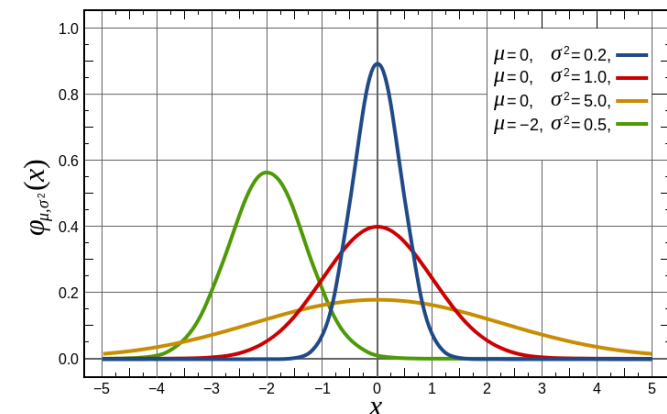
μ – střední hodnota

σ^2 – rozptyl

Označení: $N(\mu, \sigma^2)$

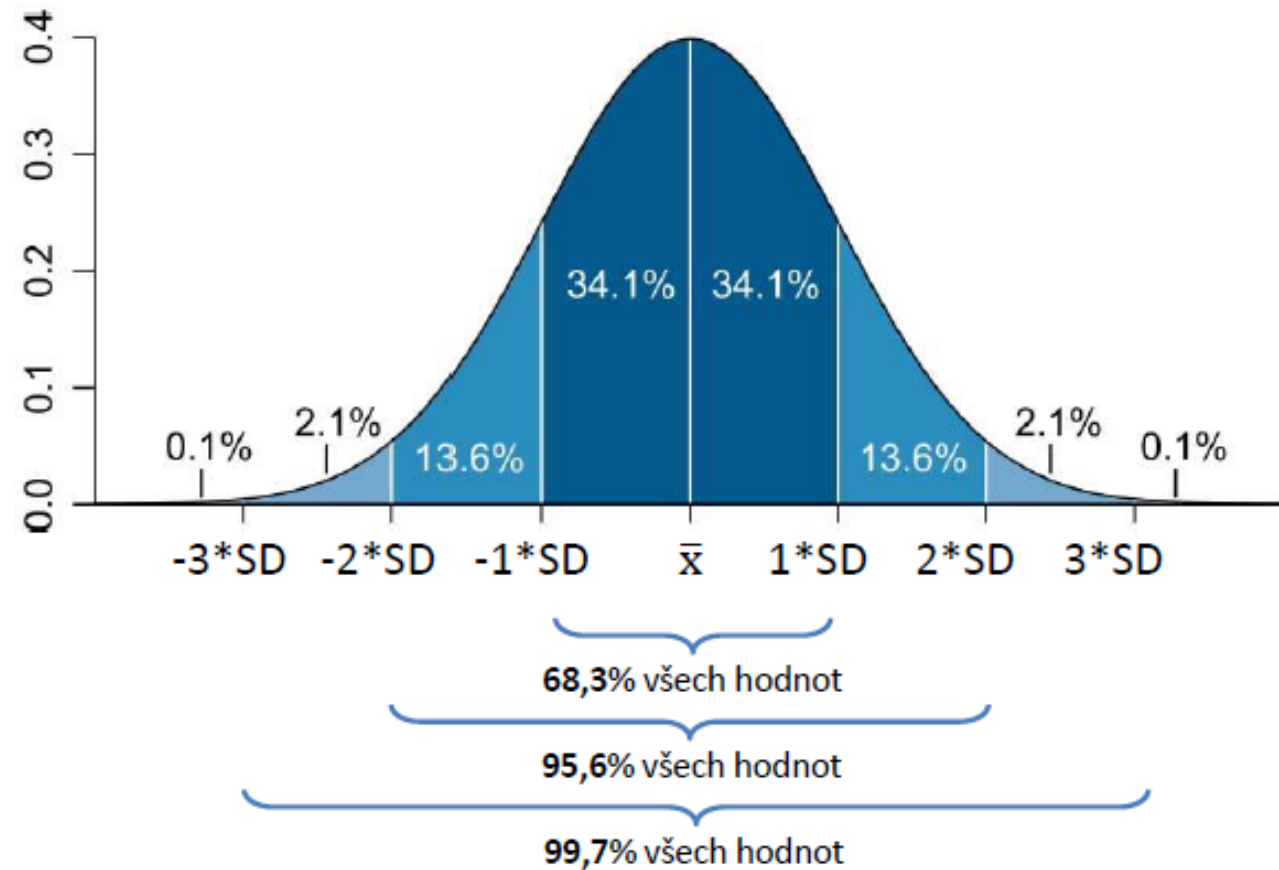


NORMALITA je klíčovým předpokladem řady statistických metod



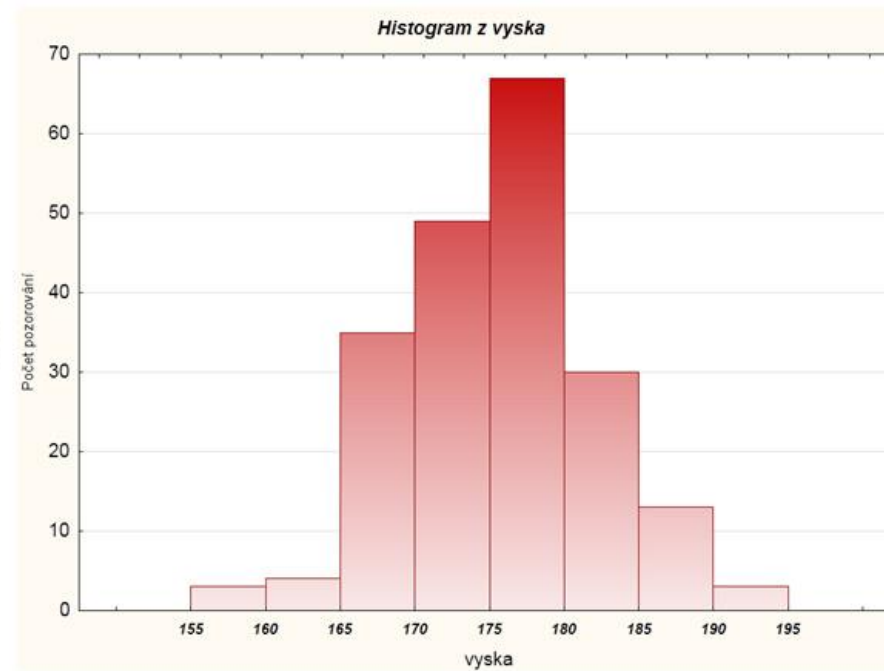
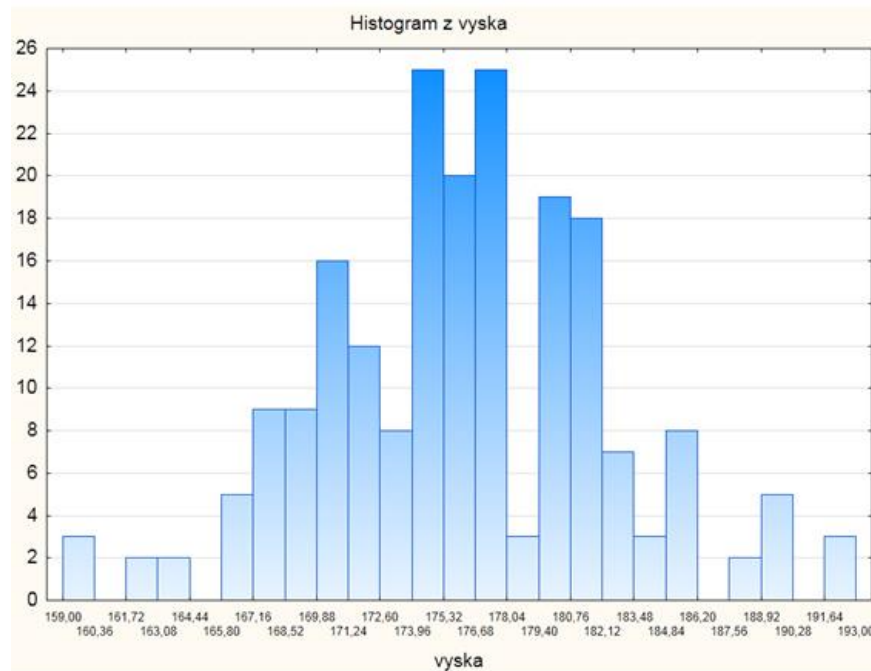
Pravidlo ± 3 SD (sigma)

- V rozmezí průměr ± 3 SD by se mělo vyskytovat **99,7 %** všech hodnot
- Použití:
 - orientační ověření normality
 - identifikace odlehlých hodnot



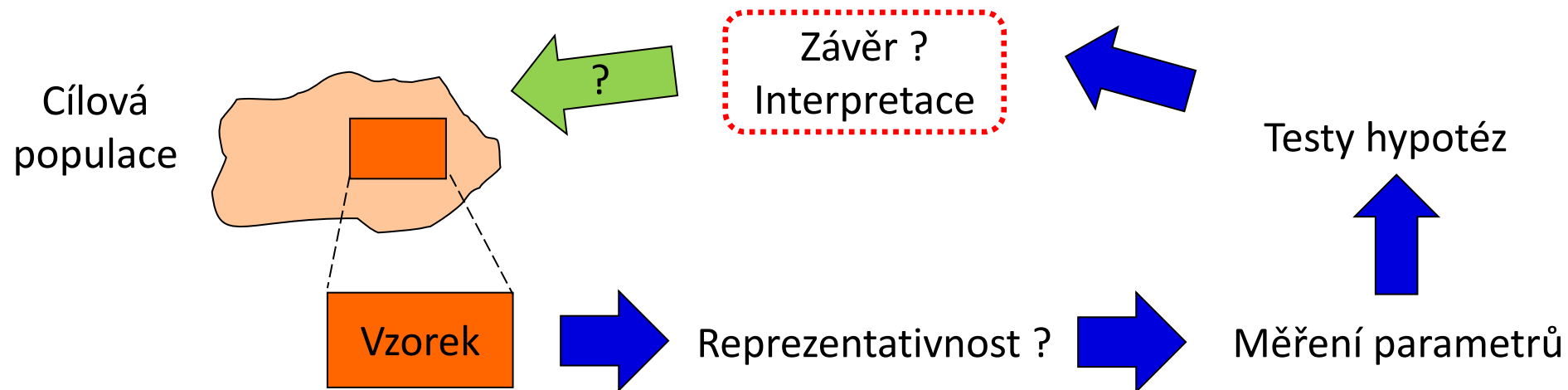
Vizuální ověření normality

- Pro hodnocení tvaru rozložení lze využít **histogram** (nevýhoda: nutné určit „vhodný“ počet sloupců)



Princip testování hypotéz

- Formulace hypotézy
- Výběr cílové populace a z ní reprezentativního vzorku
- Měření sledovaných parametrů
- Použití odpovídajícího testu → závěr testu
- Interpretace výsledků



Statistické testování – základní pojmy

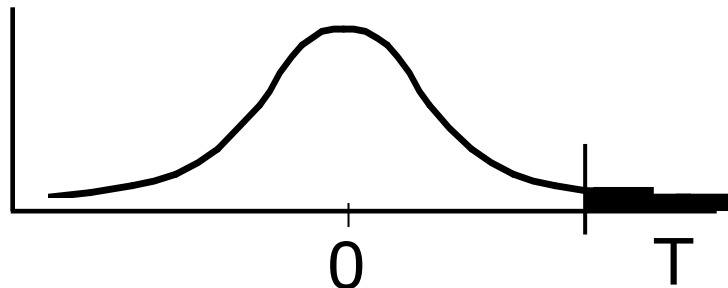
- Nulová hypotéza H_0
- Alternativní hypotéza H_A
- Testová statistika

H_0 : sledovaný efekt je nulový

H_A : sledovaný efekt je různý mezi skupinami

$$\text{Testová statistika} = \frac{\text{Pozorovaná hodnota} - \text{Očekávaná hodnota}}{\text{Variabilita dat}} * \sqrt{\text{Velikost vzorku}}$$

- Kritický obor testové statistiky



Statistické testování odpovídá na otázku, zda je pozorovaný rozdíl náhodný či nikoliv. K odpovědi na otázku je využit statistický model – testová statistika.

Stanovení hypotézy

Možné chyby při testování hypotéz

- I přes dostatečnou velikost vzorku a kvalitní design experimentu se můžeme při rozhodnutí o (ne)zamítnutí nulové hypotézy dopustit chyby.

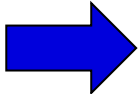
		Závěr testu	
		H_0 nezamítáme	H_0 zamítáme
Skutečnost	H_0 platí	<i>Správně</i> $1 - \alpha$	α Chyba I. druhu Falešně pozitivní závěr testu
	H_0 neplatí	β Chyba II. druhu Falešně negativní závěr testu	$1 - \beta$ <i>Správně</i>

Význam chyb při testování hypotéz

- Pravděpodobnost chyby 1. druhu

α  Pravděpodobnost nesprávného zamítnutí nulové hypotézy, **hladina významnosti**

- Pravděpodobnost chyby 2. druhu

β  Pravděpodobnost nerozpoznání neplatné nulové hypotézy

- Síla testu

$1-\beta$  Pravděpodobnostně vyjádřená schopnost rozpoznat neplatnost nulové hypotézy

Způsoby testování

- Testování H_0 proti H_A na hladině významnosti α můžeme provést třemi různými způsoby:
 1. **Kritický obor** neboli obor zamítnutí H_0 ,
 2. **Interval spolehlivosti**,
 3. **P-hodnota** (vyjadřuje pravděpodobnost za platnosti H_0 , s níž bychom získali stejnou nebo extrémnější hodnotu testové statistiky).

Způsoby testování: *P*-hodnota

- Významnost hypotézy hodnotíme dle získané ***p*-hodnoty**, která vyjadřuje pravděpodobnost, s jakou číselné realizace výběru podporují H_0 , je-li pravdivá.
- *P*-hodnotu porovnáme s hladinou významnosti α (stanovujeme ji na 0,05, tzn. připouštíme 5% chybu testu, tedy, že zamítneme H_0 , ačkoliv ve skutečnosti platí).
- *P*-hodnotu získáme při testování hypotéz ve statistickém softwaru.

Je-li $p \leq \alpha$, pak H_0 **zamítáme** na hladině významnosti α a **přijímáme** H_A .

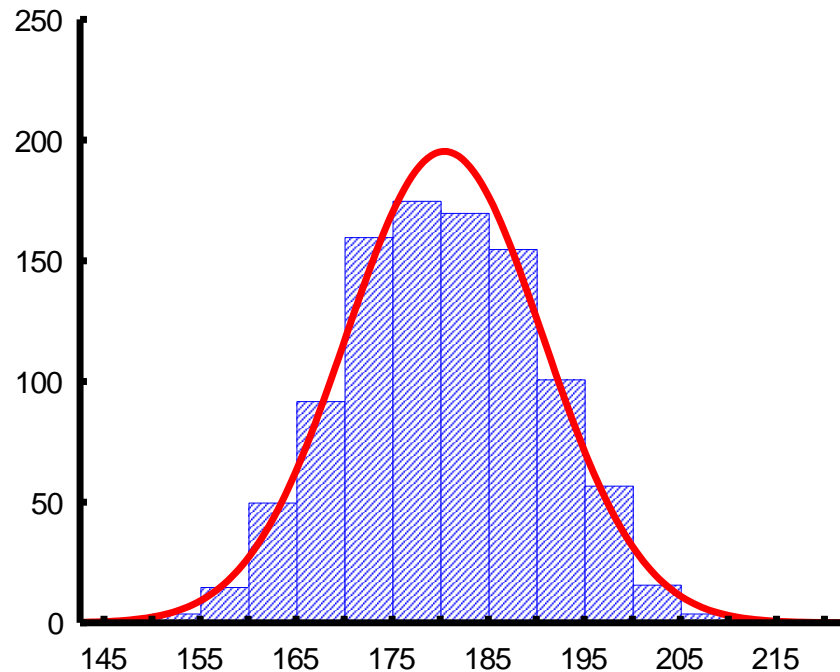
Je-li $p > \alpha$, pak H_0 **nezamítáme** na hladině významnosti α .

Poznámky k testování hypotéz

- **Nezamítnutí nulové hypotézy neznamená automaticky její přijetí!** Může se jednat o situaci, kdy pro zamítnutí nulové hypotézy nemáme dostatečné množství informace.
- **Dosažená hladina významnosti testu** (ať už 5 %, 1 % nebo 10 %) **nesmí být slepě brána jako hranice pro (ne)existenci testovaného efektu.**
- **Malá p-hodnota nemusí znamenat velký efekt.** Hodnota testové statistiky a p-hodnota mohou být ovlivněny velkou velikostí vzorku a malou variabilitou pozorovaných dat.
- **Na výsledky testování musí být nahlíženo kriticky** – jedná se o závěr založený „pouze“ na jednom výběrovém souboru.
- **Statistická významnost** indikuje, že pozorovaný rozdíl není náhodný, ale nemusí znamenat, že je významný i ve skutečnosti. Důležitá je i **praktická (klinická) významnost.**

Testy normality

- Testy normality testují nulovou hypotézu, že není rozdíl mezi zpracovávaným rozložením a normálním rozložením. Vždy je ovšem dobré prohlédnout si i histogram, protože některé odchylky od normality, např. bimodalitu některé testy neodhalí.



Chí-kvadrát test dobré shody

Vhodný pro větší datové soubory. Srovnává pozorované četnosti s očekávanými hodnotami v třídách podobně jako při tvorbě histogramu.

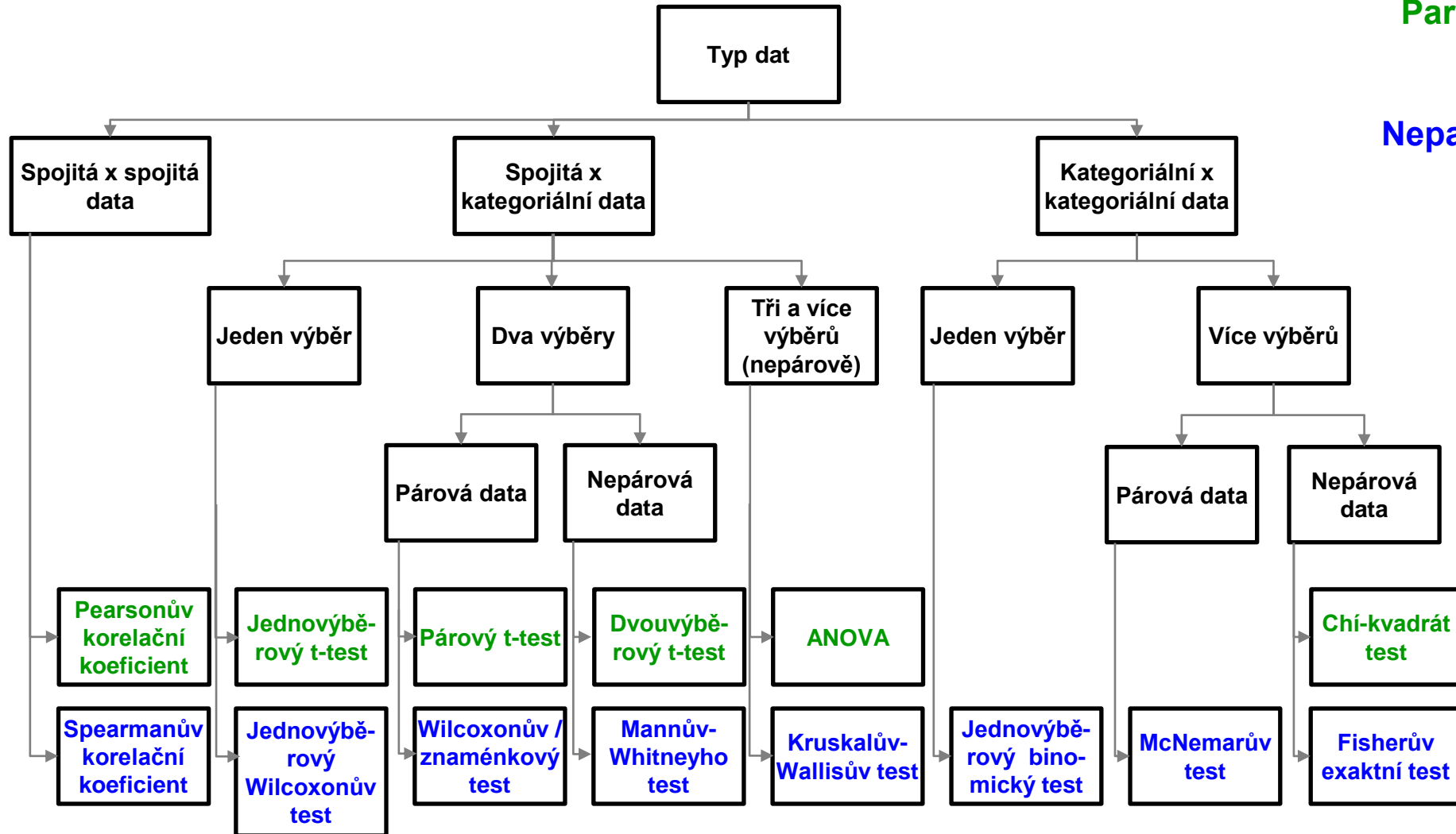
Kolmogorovův - Smirnovův test

Často používaný test, zaměřuje se zejména na distribuční funkci. Častěji se používá v jeho modifikaci – Lilieforsův test.

Shapirův-Wilkův test

Jde o neparametrický test použitelný i při velmi malých n (10) s dobrou silou testu. Je zaměřen na testování symetrie.

Základní statistické testy



Parametrické testy -
nutno ověřovat
předpoklady
Neparametrické testy

Poděkování kolegům z IBA LF MU

- Prof. RNDr. Ladislav Dušek, Ph.D.
- RNDr. Danka Harušťiaková, Ph.D.
- RNDr. Eva Koriťáková, Ph.D.
- RNDr. Jiří Jarkovský, Ph.D.
- RNDr. Tomáš Pavlík, Ph.D.



Použité zkratky

- KPE, kaz/plomba/extrakce
- SD, směrodatná odchylka

Genetické asociační studie a orální mikrobiom

doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

Stomatologická klinika, Ústav patologické fyziologie, Ústav lékařské genetiky,
Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie, Fakultní nemocnice Brno

Obsah přednášky

Genetické asociační studie a orální mikrobiom

- Genetické asociační studie
- Orální mikrobiom
- Studie:
 - zubní kaz (behaviorální intervence) (Bořilová Linhartová)
 - aftózní stomatitida (klinická experimentální studie) (Bořilová Linhartová)
 - parodontopatie (Bořilová Linhartová)
 - apikální periodontitida a odontogenní cysty (Szaraz, Daněk, Bořilová Linhartová)
 - zevní apikální kořenová resorpce po ortodontické léčbě (Bořilová Linhartová)

Představení výzkumného týmu

Lékařská molekulární genetika a farmakogenetika – RG Petry Bořilové Linhartové

- RG se zabývá základním a aplikovaným výzkumem onemocnění orofaciální oblasti, respiračního a gastrointestinálního traktu, i imunitního systému, řešíme tedy několik výzkumných témat, které lze souhrnně definovat jako výzkum v oblasti lékařské molekulární genetiky a farmakogenetiky.
- Převážně se zaměřujeme na analýzu kandidátních genů a jejich produktů souvisejících s predispozicí jedince ke komplexnímu onemocnění s využitím molekulárně biologických metod (qPCR, NGS, MS). Dominantně se věnujeme imunogenetice.
- Zároveň se také věnujeme studiu lidského mikrobiomu, vztahu hostitele a jeho mikrobioty ve zdraví a nemoci.
- Pracujeme také na farmakogenetických studiích.

Projekty

- Moderní biotechnologické a behaviorální přístupy ve výzkumu zubního kazu a strategie jeho prevence (17-30439A)
- Molekulární etiopatogeneze apikální periodontitidy a odontogenních cyst (NU20-08-00205)
- Hostitelský mikrobiom ve vztahu k rozvoji Barrettova jícnu a adenokarcinomu jícnu (NU20-03-00126)
- Využití nanovláken k aplikaci bioaktivních látek pomocí zubní nitě (FW02020042)

Představení výzkumného týmu

Lékařská molekulární genetika a farmakogenetika – RG Petry Bořilové Linhartové



Genetika komplexních orálních chorob

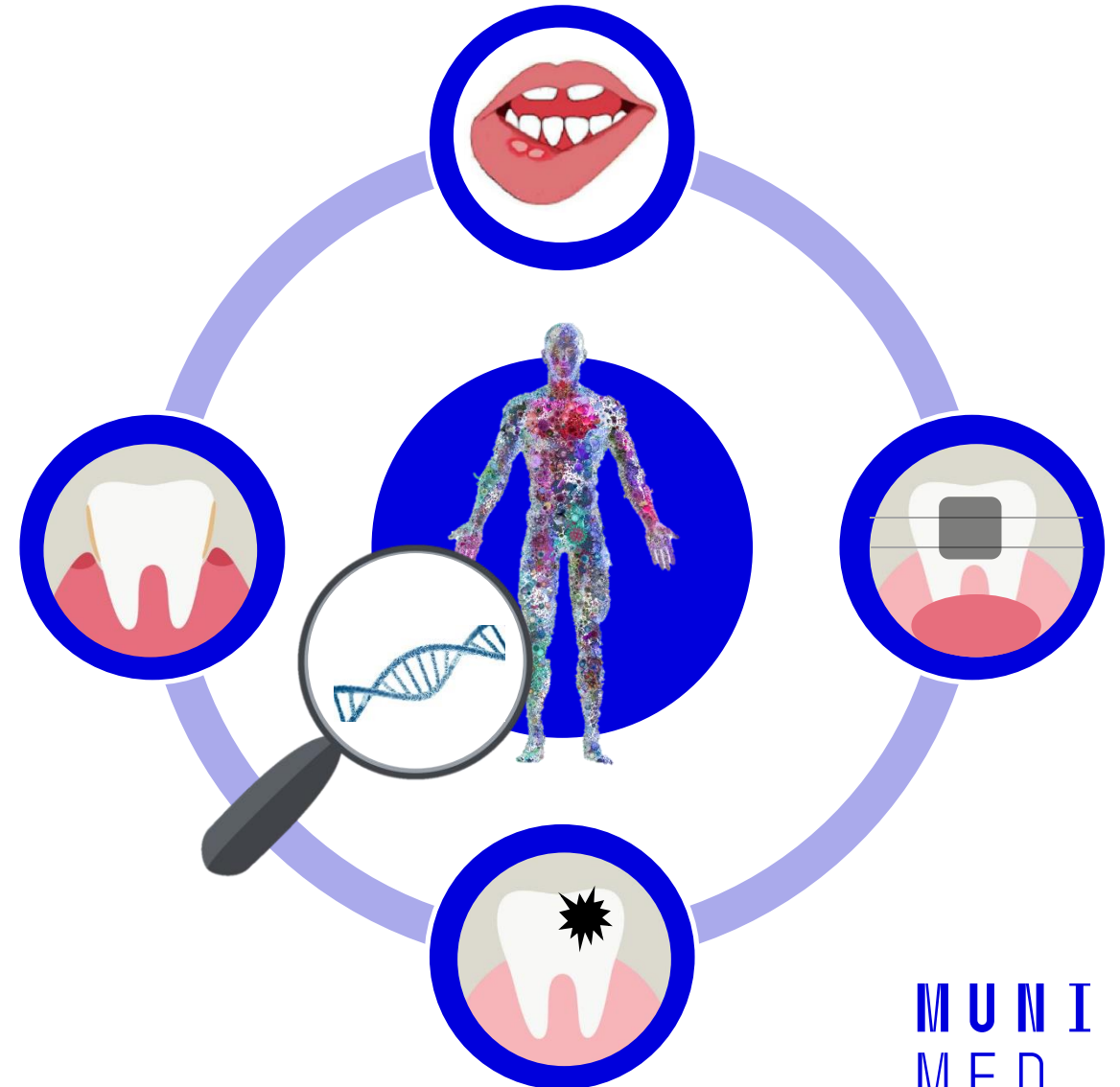
Orální choroby

- Recidivující aftózní stomatitida
- Zevní apikální kořenová resorpce
- Zubní kaz
- Gingivitida a parodontitida

Etiopatogeneze: imunitní faktory



Interleukiny
NOD-like receptor
Purinergrní receptor
Receptor pro vitamín D
ACE

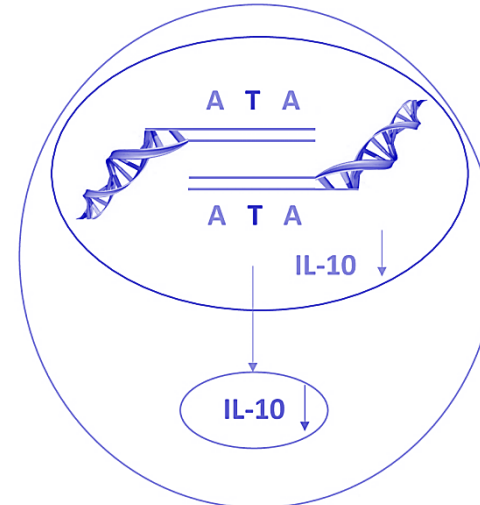
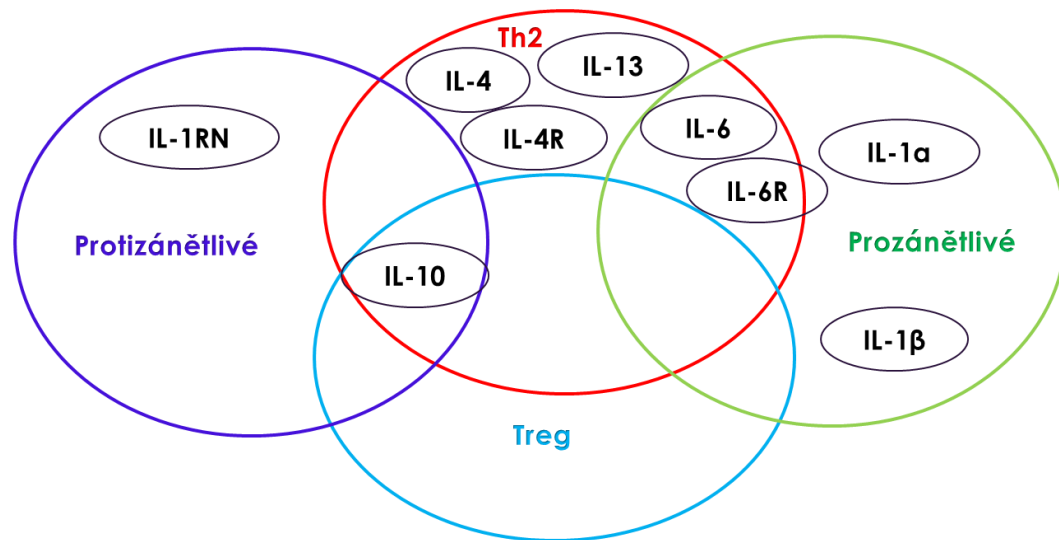
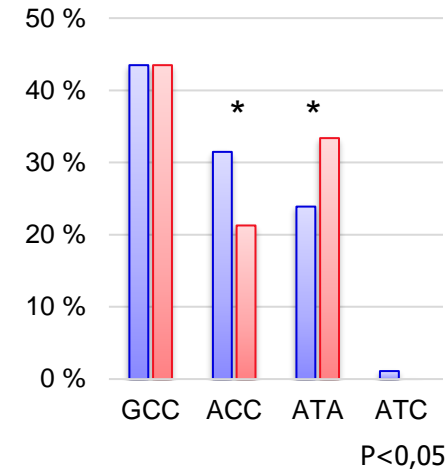


Recidivující aftózní stomatitida

Studie I a II.

- haplotyp ACC a genotyp CC protektivní k RAS (Írán)
[Najafi et al., 2014](#)
- ↓ transkripční aktivita *IL-10* u nositelů haplotypu ATA a produkce IL-10 u nositelů ATA/ATA
- ↓ c IL-10 ve tkáni aftózní léze i v séru pacientů s RAS
[Oleksyk et al., 2009](#)

IL-10 178 HC 74 RAS



Accepted: 16 May 2017
DOI: 10.1111/jop.12594

ORIGINAL ARTICLE

WILEY
Journal of Oral Pathology & Medicine

Association study of interleukin-1 family, interleukin-6, and its receptor gene polymorphisms in patients with recurrent aphthous stomatitis

Lydie Izakovicova Holla^{1,2} | Simona Valova^{1,2} | **Petra Borilova Linhartova¹** | Jirina Bartova³ | Jitka Petanova⁴ | Pavel Kuklinek⁵ | Antonin Fassmann¹

IF 2,237

Q1, DENTISTRY, ORAL SURGERY & MEDICINE

Q2 PATHOLOGY

European Journal of
Oral Sciences

Eur J Oral Sci 2018; 1–8
DOI: 10.1111/eos.12577
Printed in Singapore. All rights reserved

Recurrent aphthous stomatitis and gene variability in selected interleukins: a case–control study

Borilova Linhartova P. Janos J, Slezakova S, Bartova J, Petanova J, Kuklinek P, Fassmann A, Dusek L, Izakovicova Holla L. Recurrent aphthous stomatitis and gene variability in selected interleukins: a case–control study. Eur J Oral Sci 2018; 00: 1–8. © 2018 Eur J Oral Sci

IF 1,81

Q2 DENTISTRY, ORAL SURGERY & MEDICINE

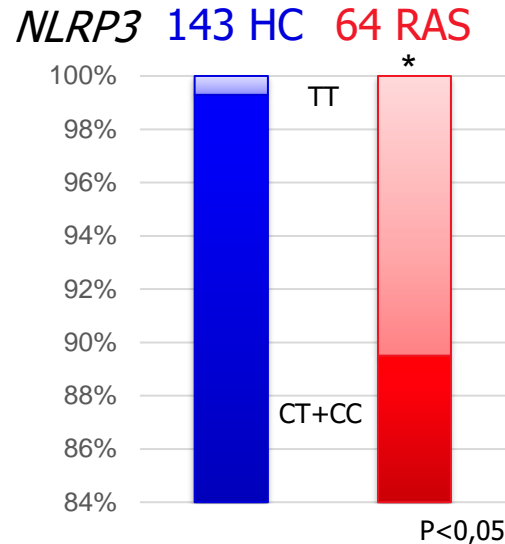
MUNI
MED

Recidivující aftózní stomatitida

Studie III.

- SNP *NLRP3* rs3806265 asociován s RAS (Írán)
- SNP *NLRP3* rs3806265 a rs4612666 MAF (26% vs. 14% a 16% vs. 33%)
[Bidoki et al., 2016](#)
- nikoliv aktivita *NLRP3* inflamazómu ALE
- ↓ exprese *NLRP3* u nositelů genotypu TT rs4612666 může ovlivnit rovnováhu CD4⁺ Th1/Th2

[Albanidou-Farmaki et al., 2007](#)



Accepted: 5 February 2018

DOI: 10.1111/jop.12694

ORIGINAL ARTICLE

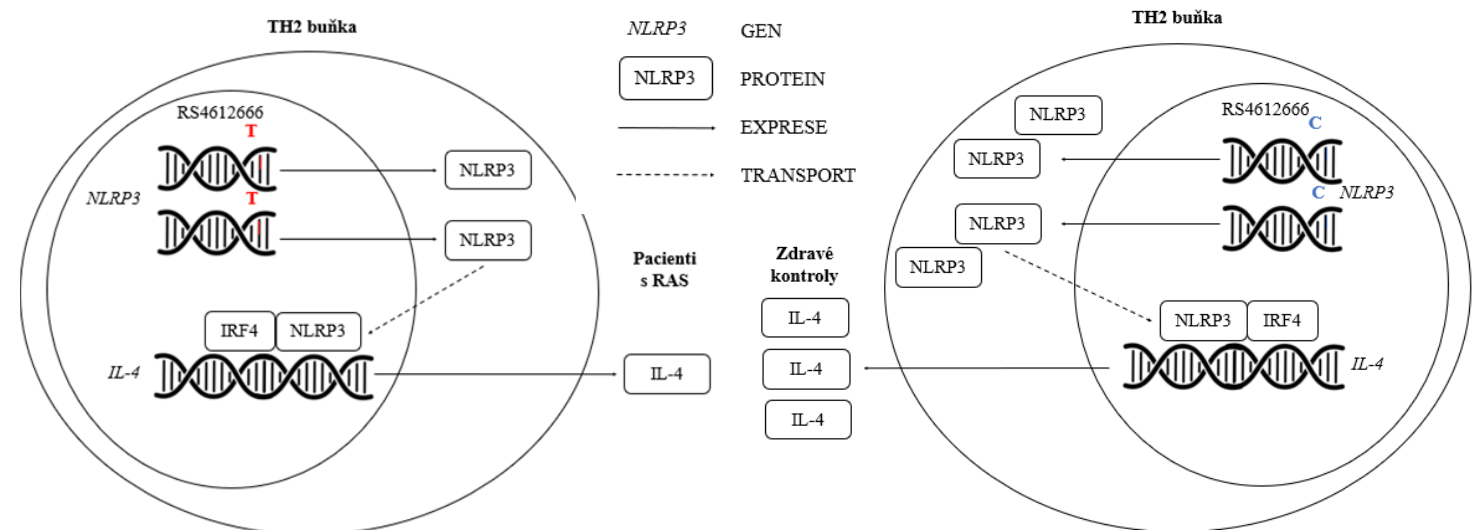
WILEY Journal of Oral Pathology & Medicine

Association of the NOD-like receptor 3 (*NLRP3*) gene variability with recurrent aphthous stomatitis in the Czech population

Simona Slezakova^{1,2} | **Petra Borilova Linhartova^{1,2}** | Lucie Masopustova³ | Jirina Bartova⁴ | Jitka Petanova⁵ | Pavel Kuklinek⁶ | Antonin Fassmann¹ | Ladislav Dusek⁷ | Lydie Izakovicova Holla^{1,2}

IF 2,03

Q2 DENTISTRY, ORAL SURGERY & MEDICINE
Q3 PATHOLOGY



Zevní apikální kořenová resorpce

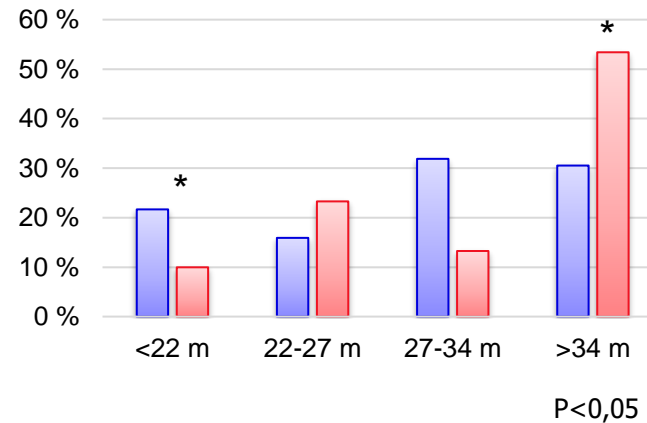
Studie I.

- doba trvání léčby ortodontickým aparátem pozitivně koreluje s přítomností EARR
- SNP *P2RX7* rs208294 (USA) a *P2RX7* rs1718119 (Portugalsko) asociovány s EARR
- ↑ sekrece prozánětlivého IL-1 β u nositelů alely G SNP *P2RX7* rs1718119 (gain of function)

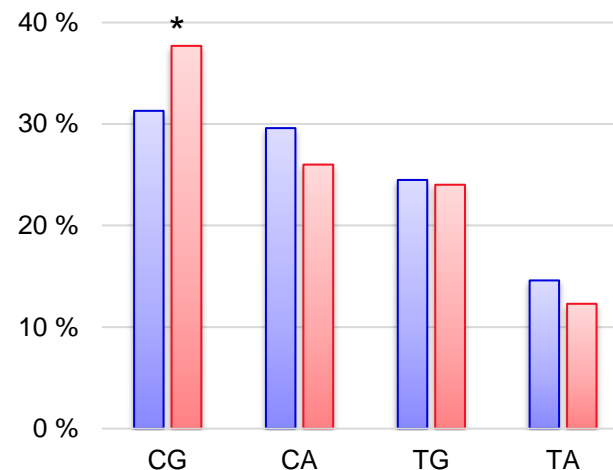
[Sharab et al., 2015](#)

[Pereira et al., 2014](#)

[Stokes et al., 2010](#)



P2RX7 69 HC 30 RAS



P<0,05

ORAL DISEASES

Leading in Oral, Maxillofacial, Head & Neck Medicine



Oral Diseases (2016) doi:10.1111/odi.12564
© 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd
All rights reserved
www.wiley.com

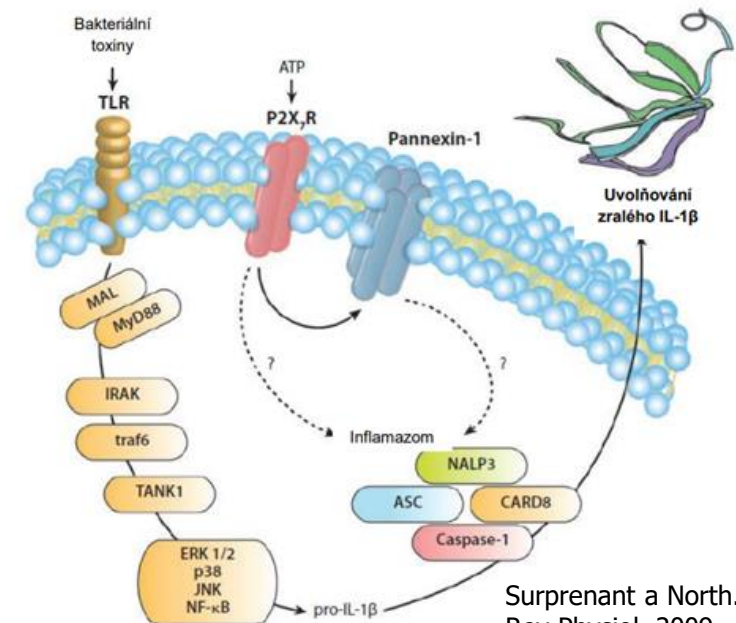
ORIGINAL ARTICLE

Genetic determinants and postorthodontic external apical root resorption in Czech children

P Borilova Linhartova^{1,2}, P Cernochova¹, J Kastovsky^{3,*}, Z Vrankova^{3,*}, M Sirotkova^{3,*}, L Izakovicova Holla^{1,*}

IF 2,31

Q1 DENTISTRY, ORAL SURGERY & MEDICINE

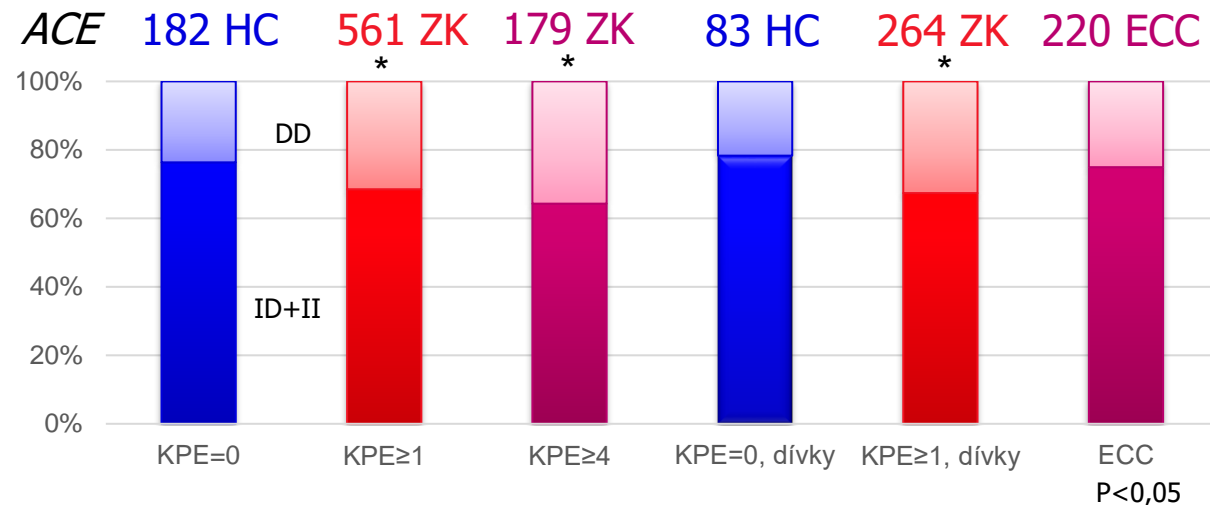


Surprenant a North. Annu Rev Physiol. 2009.

Zubní kaz a gingivitida

Studie I.

- SNP *ACE* I/D asociován se ZK (Polsko, 5-13 let), DD protektivní
[Olszowski et al., 2015](#)
- ↑ c ACE v séru u nositelů genotypu DD
[Rigat et al., 1990](#)
- *ACE* I/D vliv na uvolňování prozánětlivých mediátorů imunitními buňkami, genotyp DD rizikový pro CP
[Holla et al., 2001](#)
[Kang et al., 2015](#)



Caries Research

Original Paper

Caries Res 2016;50:89–96
DOI: 10.1159/000443534

Received: September 18, 2015
Accepted: December 21, 2015
Published online: February 27, 2016

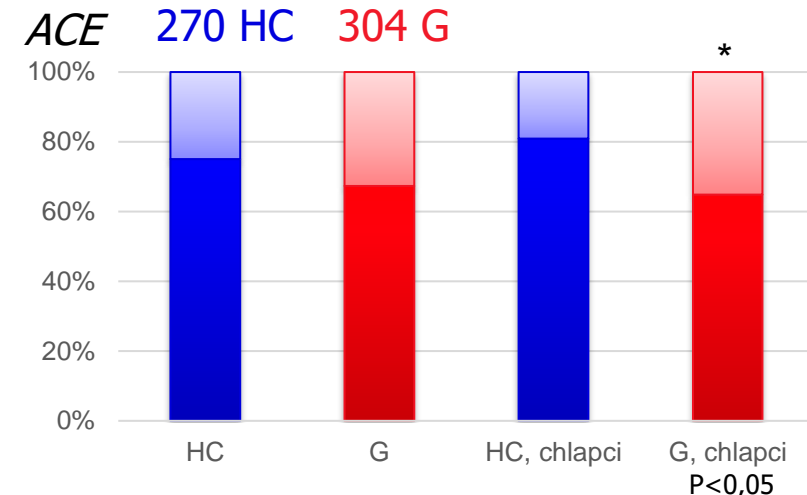
ACE Insertion/Deletion Polymorphism Associated with Caries in Permanent but Not Primary Dentition in Czech Children

Petra Borilova Linhartova^{a,b} Jakub Kastovsky^{a,b} Michaela Bartosova^{a,d}
Kristina Musilova^a Lenka Zackova^c Martina Kukletova^a Lubomir Kukla^d
Lydie Izakovicova Holla^{a,b}

IF 1,811

Q2 DENTISTRY, ORAL SURGERY & MEDICINE

[Wang et al., 2010](#)



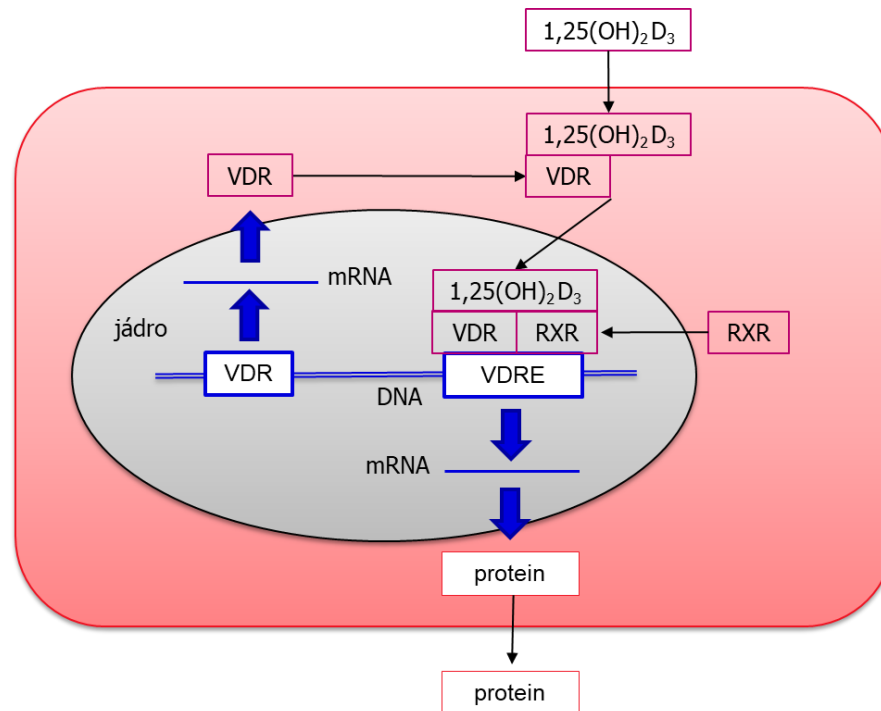
Zubní kaz a gingivitida

Studie II.

- SNP *VDR TaqI* byl asociován se ZK (Turecko, Čína)
a v metaanalýze s CP
[Hu et al., 2015](#)
[Cogulu et al., 2016](#)
[Deng et al. J Clin Periodontol. 2011.](#)
- ↑ transkripční aktivita, stabilita mRNA a c $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ v séru
u nositelů alely C
[Martelli et al., 2014](#)

– VDRE

- Upregulace:
imunomodulace, apoptóza,
diferenciace, autofágie
- Downregulace:
záněť, proliferace, angiogeneze

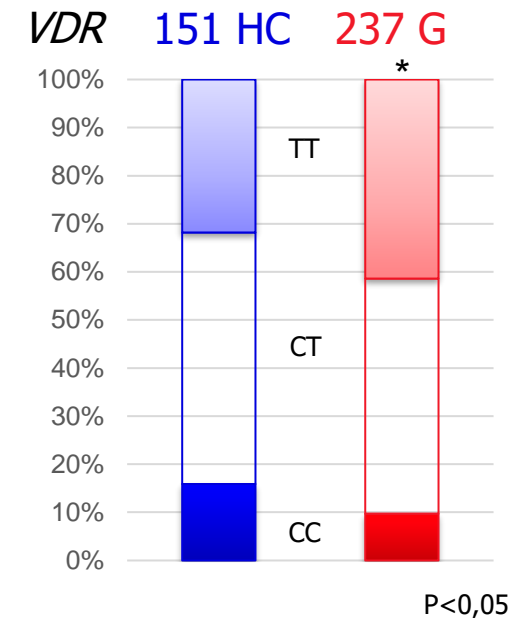


Vitamin D Receptor *TaqI* Gene Polymorphism and Dental Caries in Czech Children

Lydie Izakovicova Holla^{a,b} [Petra Borilova Linhartova^{a,b}](#) Jakub Kastovsky^{a,b}
Michaela Bartosova^{a,c} Kristina Musilova^a Lubomir Kukla^c Martina Kukletova^a

IF 2,188

Q2 DENTISTRY, ORAL SURGERY & MEDICINE



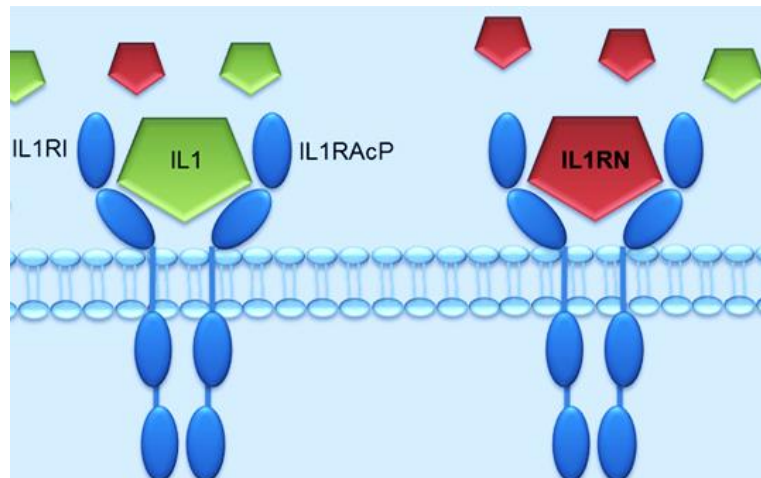
Parodontitida

Studie I.

- Metaanalýzy pro SNP, ne pro haplotypy
- ↑ c IL-1α a IL-1β v gingivální tkáni u pacientů s CP
- ↑ c IL-1β v gingivální tkáni u krys s DM
- 10x ↑ c IL-1RN v séru nositelů alely S

[Jiang et al., 2013](#)

[Danis et al., 1995](#)



[Gómez-Flores-Ramos et al., 2014](#)

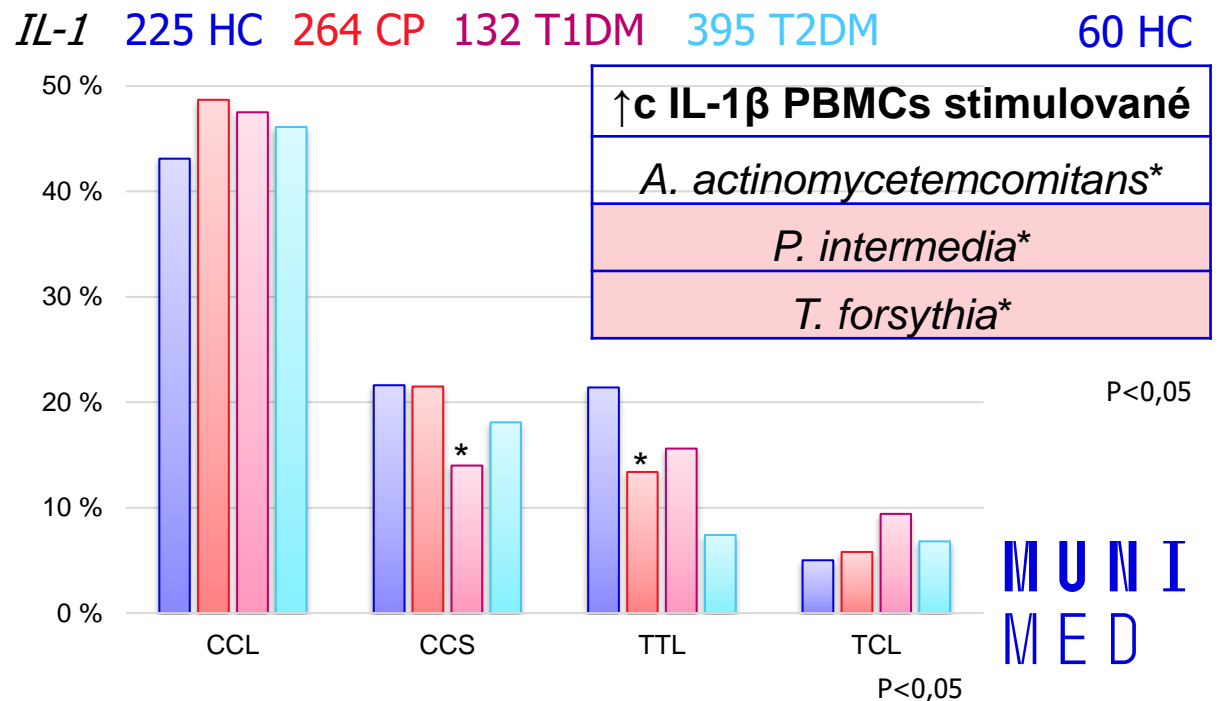
- SNP *IL-1B* a *IL-1RA* nemají vliv na c IL-1β v séru

P>0,05

Research Article

Interleukin-1 Gene Variability and Plasma Levels in Czech Patients with Chronic Periodontitis and Diabetes Mellitus

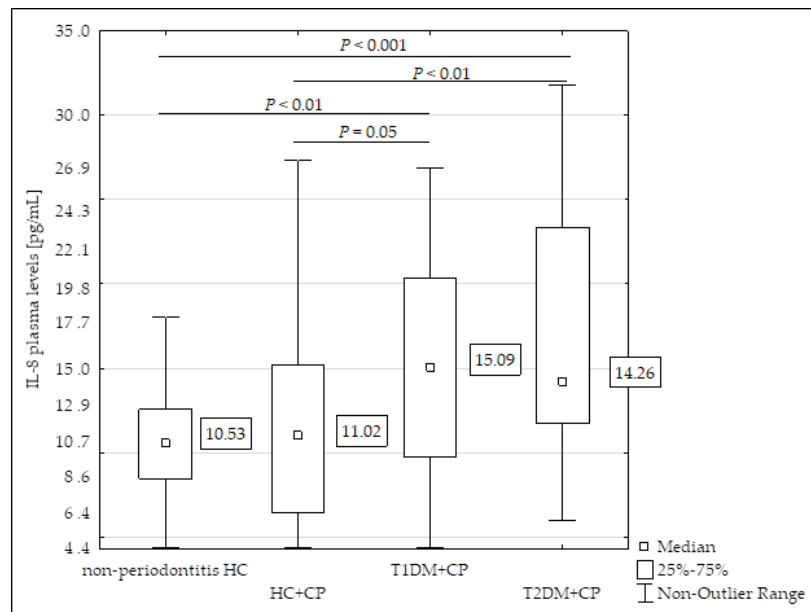
Petra Borilova Linhartova^{1,2}, Hana Poskerova¹, Marie Tomandlova,³
Jirina Bartova⁴, Katerina Kankova², Antonin Fassmann,¹
and Lydie Izakovicova Holla^{1,2}



Parodontitida

Studie II. a III.

- SNP *IL-8* nebyl asociován s CP (ČR)
[Borilova Linhartova et al., 2013](#)
[Viana et al., 2010](#)
- haplotypy *CXCR2* byly asociovány s CP (Brazílie)



- SNP *IL-8* a *CXCR2* nemají vliv na c *IL-8* v plazmě
 $P > 0,05$



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Differences in Interleukin-8 Plasma Levels between Diabetic Patients and Healthy Individuals Independently on Their Periodontal Status

Petra Borilova Linhartova ^{1,2,†}, Denisa Kavrikova ^{1,†}, Marie Tomandlova ³, Hana Poskerova ¹, Vaclav Rehka ⁴, Ladislav Dušek ⁵ and Lydie Izakovicova Holla ^{1,2,*}

IF 3,687

Q2 BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY

Q2 CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY

SNPs *CXCR2* +785/+1208

*A. actinomycetemcomitans**

*P. micra**

$P < 0,05$

Hindawi
Mediators of Inflammation
Volume 2019, Article ID 2061868, 8 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/2061868>



Research Article

Chemokine Receptor 2 (*CXCR2*) Gene Variants and Their Association with Periodontal Bacteria in Patients with Chronic Periodontitis

Denisa Kavrikova, ¹ Petra Borilova Linhartova ^{1,2,†}, Svetlana Lucanova, ¹ Hana Poskerova ¹, Antonin Fassmann, ¹ and Lydie Izakovicova Holla ^{1,2,*}

IF 3,549

Q2 CELL BIOLOGY

Q2 IMMUNOLOGY

**MUNI
MED**

Parodontitida

Studie IV.

- SNP *IL-17A* -197A/G (rs2275913) asociován s CP (Brazílie, Írán)
[Corrêa et al., 2012.](#)
[Saraiva et al., 2013](#)

[Zacarias et al., 2015](#)
[Kadkhodazadeh et al., 2013](#)

- ↑ c *IL-17* po in vitro stimulaci T buněk od nositelů alely A, upregulace *IL-17A* u pacientů s CP [Espinoza et al., 2011](#)

- ↑ monocytární produkce *IL-17* u pacientů s T1DM
[Mitani et al., 2015](#)

<i>IL-17A</i> -197	CP	c <i>IL-17</i> PBMCs stimulované <i>P. gingivalis</i> [pg/ml]	c <i>IL-17</i> nestimulované PBMCs [pg/ml]
AA+AG	19	1.51 (0.50-4.56)*	0.98 (0.25-8.53)*
GG	11	0.10 (0.00-1.51)	0.27 (0.00-0.54)

P<0,05

Hindawi Publishing Corporation
Mediators of Inflammation
Volume 2016, Article ID 2979846, 9 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/2979846>

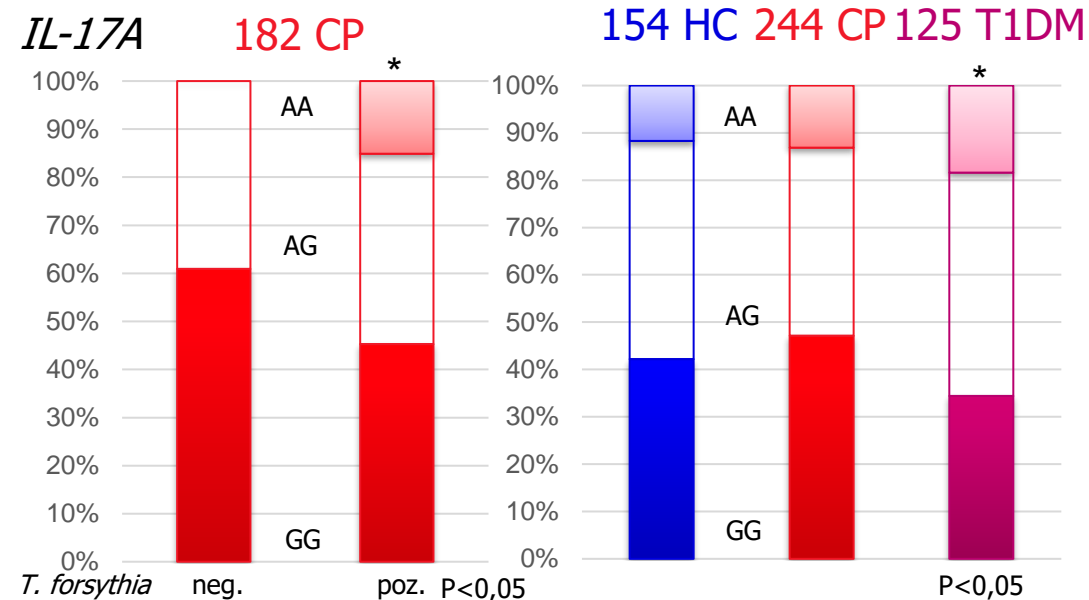


Research Article

Interleukin-17A Gene Variability in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus and Chronic Periodontitis: Its Correlation with *IL-17* Levels and the Occurrence of Periodontopathic Bacteria

Petra Borilova Linhartova,^{1,2} Jakub Kastovsky,^{1,2} Svetlana Lucanova,¹
Jirina Bartova,² Hana Poskerova,¹ Jan Vokurka,¹ Antonin Fassmann,¹
Katerina Kankova,² and Lydie Izakovicova Holla^{1,2}

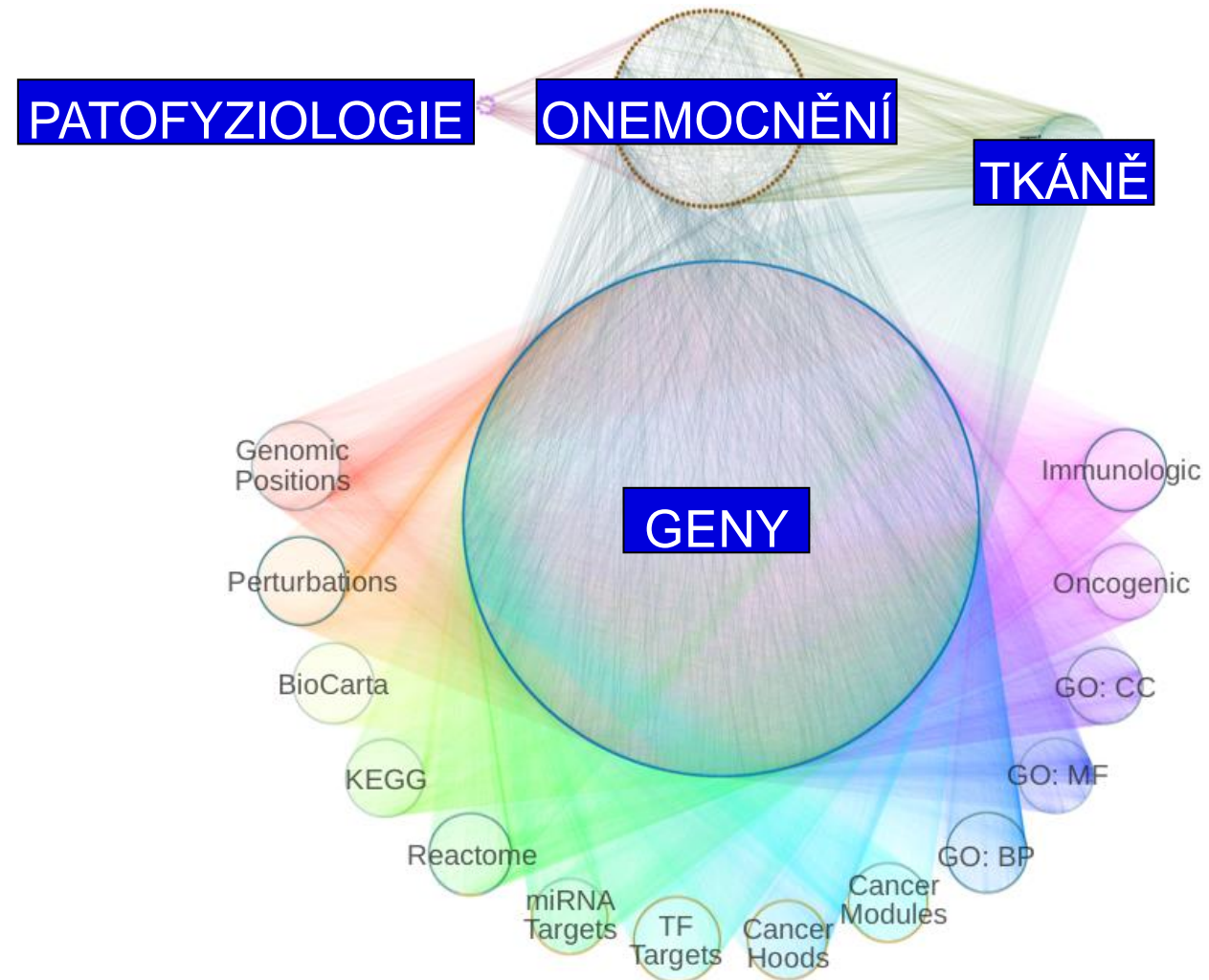
IF 3,232
Q2 CELL BIOLOGY
Q2 IMMUNOLOGY



Komplexní onemocnění

Genetické asociační studie

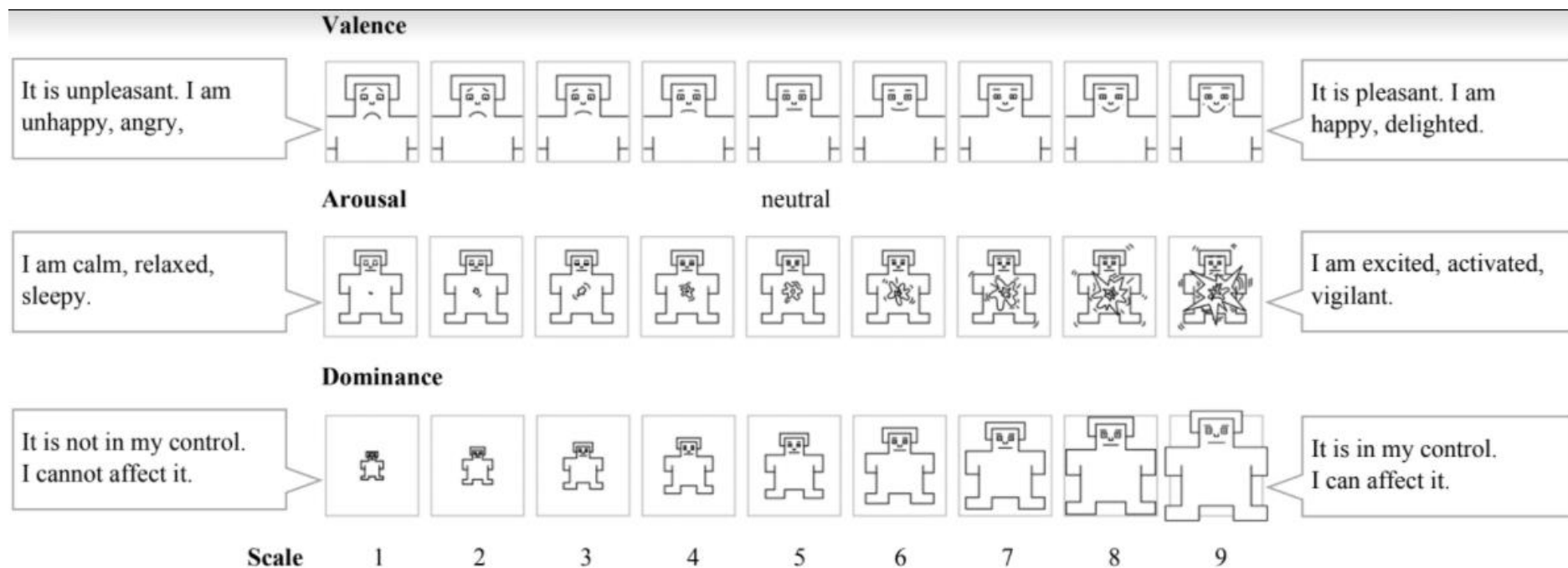
- Celogenomové studie (GWAS)
- Studie kandidátních genů
 - poziční x funkční
 - studie kontrol a případů
- Mezigenové interakce, interakce genů a prostředí
- Algoritmy
- Mezioborová spolupráce



[Himmelstein et al., 2015](#)

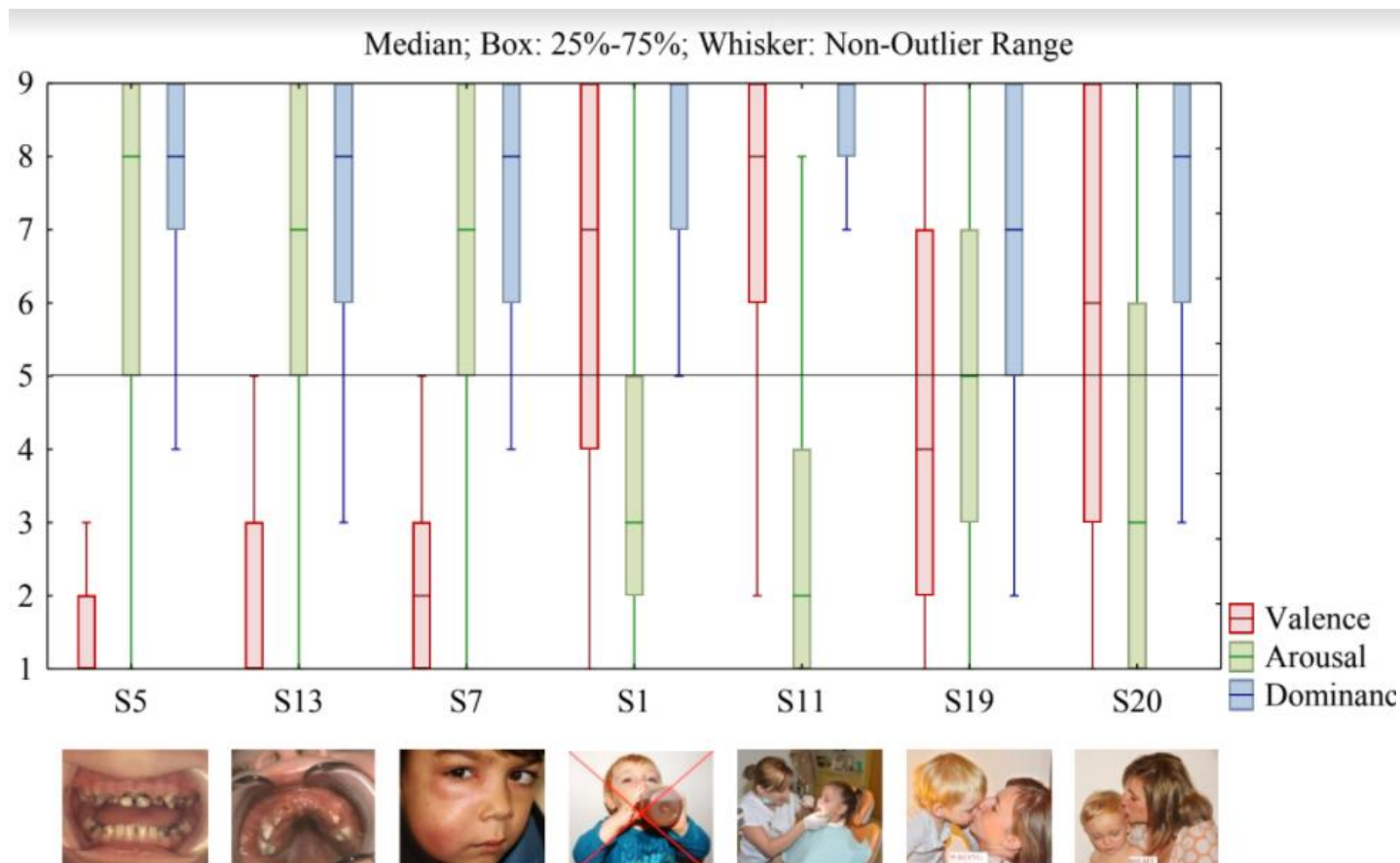
Zubní kaz v dočasném chrupu – ECC

Behaviorální intervence



ECC

Behaviorální intervence



Bartosova et al. *BMC Oral Health* (2019) 19:33
<https://doi.org/10.1186/s12903-019-0718-4>

BMC Oral Health

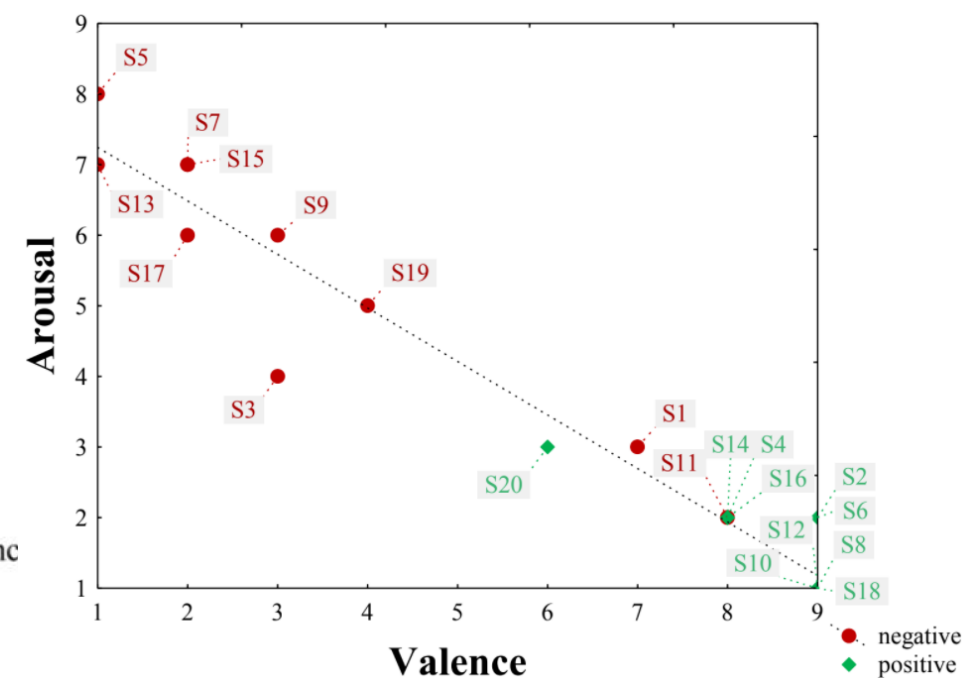
RESEARCH ARTICLE

Open Access



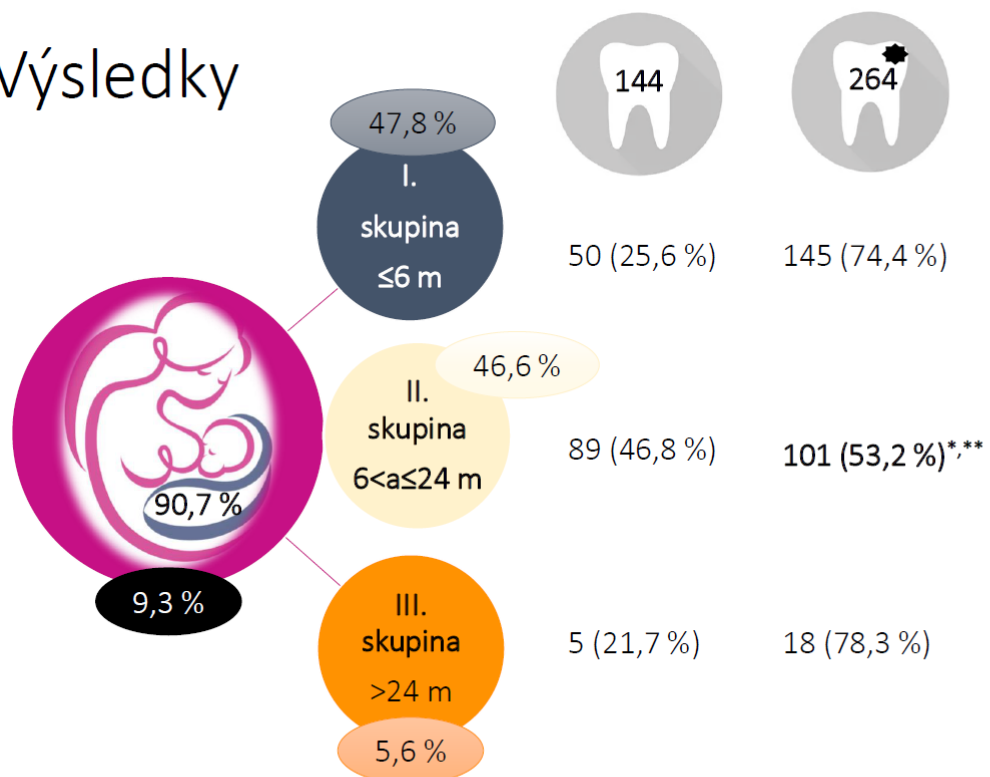
Emotional stimuli candidates for behavioural intervention in the prevention of early childhood caries: a pilot study

Michaela Bartosova¹, Miroslav Svetlak², Martina Kukletova¹, Petra Borilova Linhartova^{1,3}, Ladislav Dusek⁴ and Lydie Izakovicova Holla^{1,3,5*}



Kojení

Výsledky



- Jak dlouho bylo dítě kojeno?

12 m [6-18]

8 m [3-18]

*vs. I. skupina (P<0,001)

**vs. III. skupina (P<0,01)

ČESKÁ
STOMATO
ročník 118,
2018, 3,
s. 59–67

Vztah mezi kojením a výskytem závažného kazu raného dětství

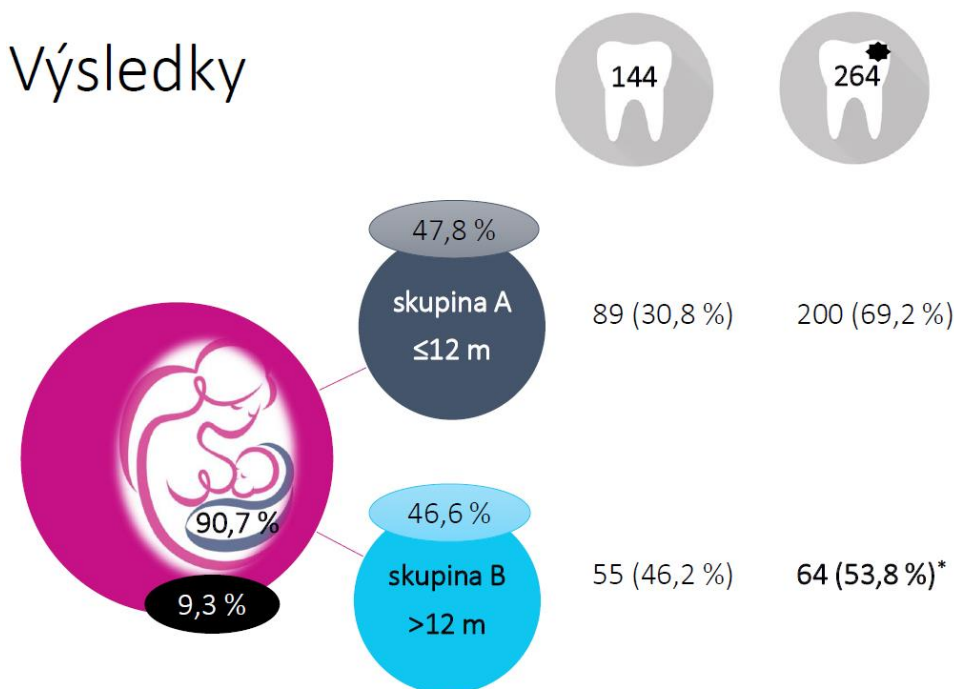
(Původní práce – retrospektivní klinická studie)

Relationship between Breastfeeding and Severe Early Childhood Caries

(Original Article – Retrospective Clinical Study)

Bořilová Linhartová P.^{1,2}, Kukletová M.¹, Izakovičová Hollá L.^{1,2}¹Stomatologická klinika LF MU a FN u sv. Anny, Brno²Ústav patologickej fyziológie LF MU, Brno

Výsledky



Lidská mikrobiota a mikrobiom

Úvod

– Mikrobiota

- Tvoří 1-3 % tělesné váhy člověka
- Komplexní ekosystém dle specifické lokalizace a podmínek
- 10x více bakterií než je buněk v lidském těle

– Mikrobiom je soubor genů všech mikroorganismů osidlujících lidské tkáně a tekutiny

- Jedinečný otisk
- Projekt
- 100x více genů mikrobiomu než v lidském genomu (27 tis. genů)



Characterization of the microbiomes of healthy human subjects at five major body sites, using 16S and metagenomic shotgun sequencing.

Enter HMP1



Characterization of microbiome and human host from three cohorts of microbiome-associated conditions, using multiple 'omics technologies.

Enter iHMP



MUNI
MED

Člověk

Filozofický pohled

- Mozek
 - Osobnost a myšlení
- Imunitní systém
 - Adaptivní IS
- Genom
 - Fenotyp



Lidská mikrobiota

- Eukaryota
 - Houby
 - Prvoci
- Bakterie
- Archaea
- Viry
- Spojivky
- Ústní dutina
- Dýchací cesty
- Mléčné žlázy
- GIT
- Kůže
- Urogenitální trakt

Lidská mikrobiota

Mozek

– Osa střevo-mozek

- Stres, deprese, autismus, PD, AD
- Regulace pomocí pre- a probiotik

– SCFA regulují GPR41-

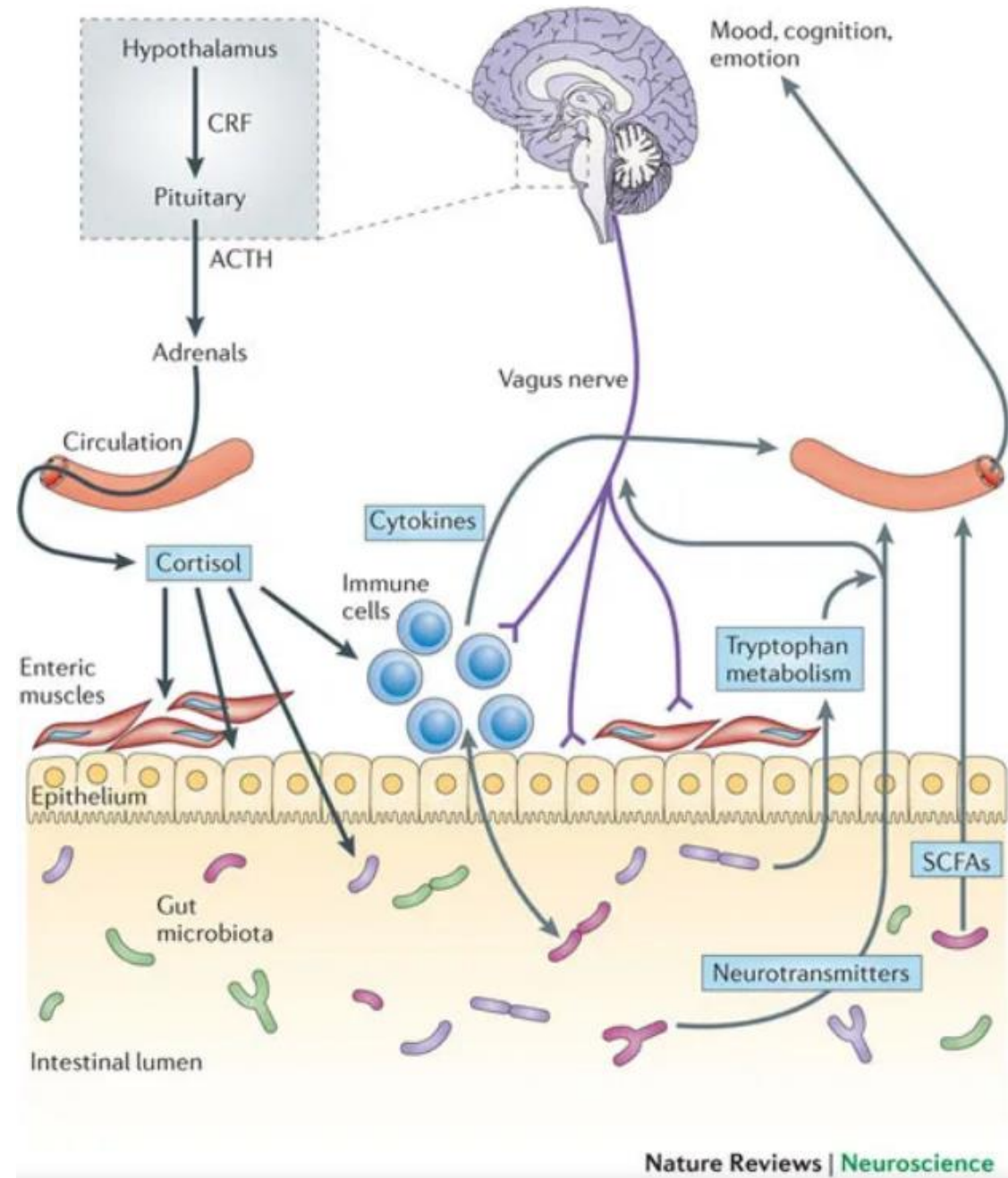
zprostředkovanou aktivitu

sympatického NS – E výdej

– Tryptofan má přímý vliv na spánek

– Neurotransmitery

– Cytokiny



Lidská mikrobiota

Imunitní systém

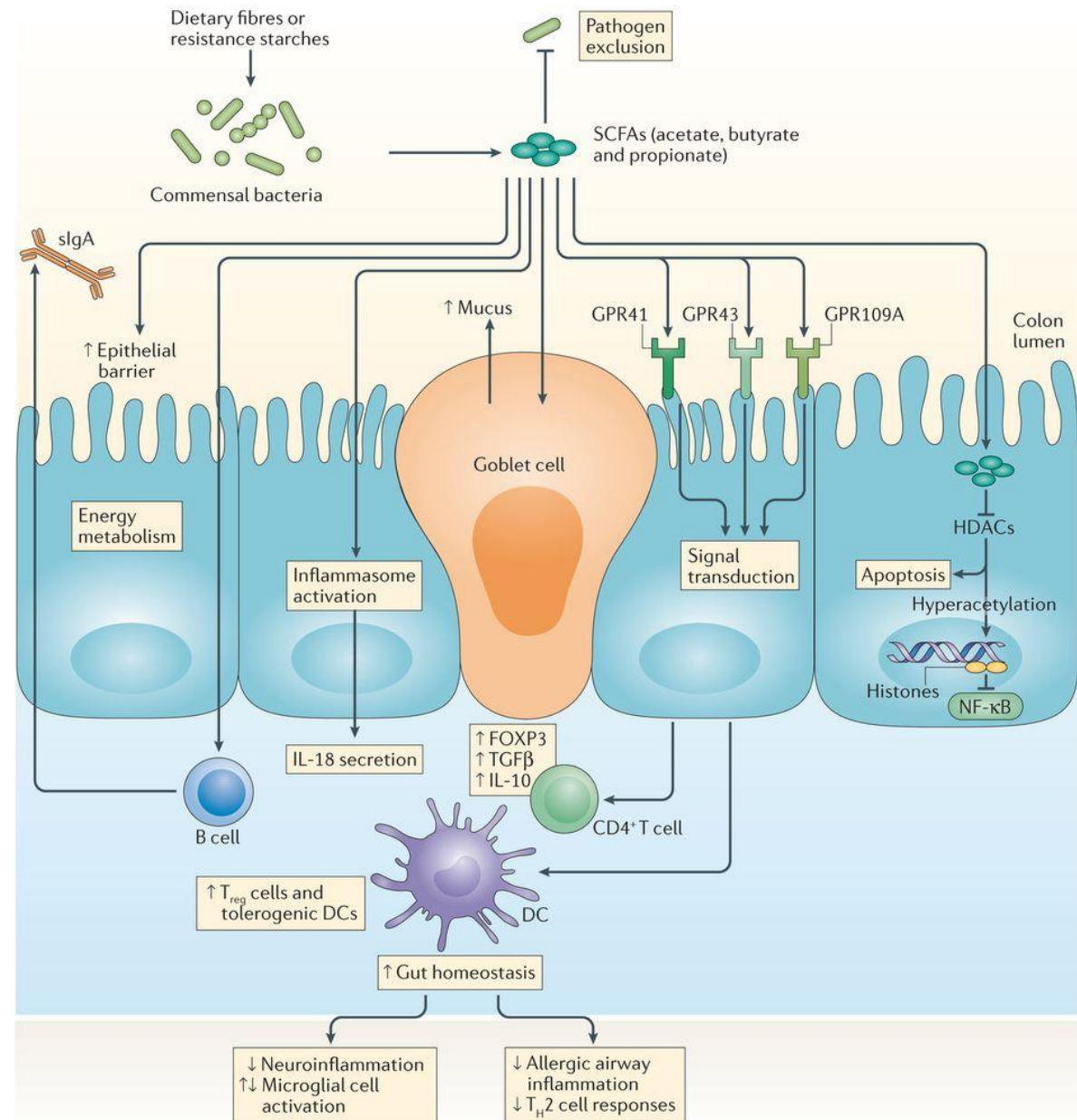
– SCFA

- Stimulace produkce střevního hlenu
- Diferenciace B buněk na plazmatické buňky produkující Ig
- Spojeny s protizánětlivým fenotypem (inhibice histonových deacetyláz)

– *Bacteroides fragilis* PSA

- Indukce CD4⁺ T lym profil – indukce Treg a suprese Th17 a Th1

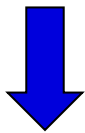
– Niacin, tryptofan, taurin (inflamazom)



Lidský mikrobiom

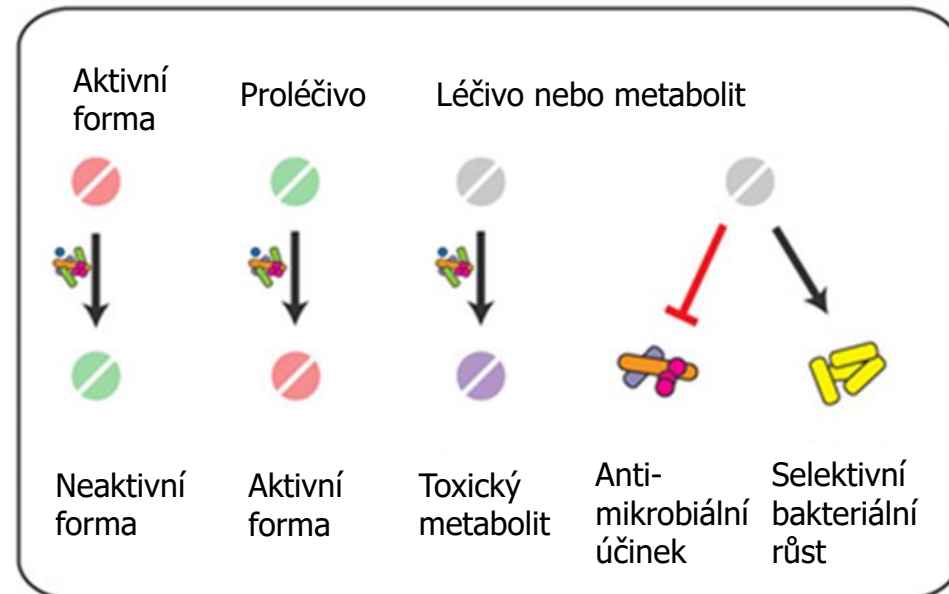
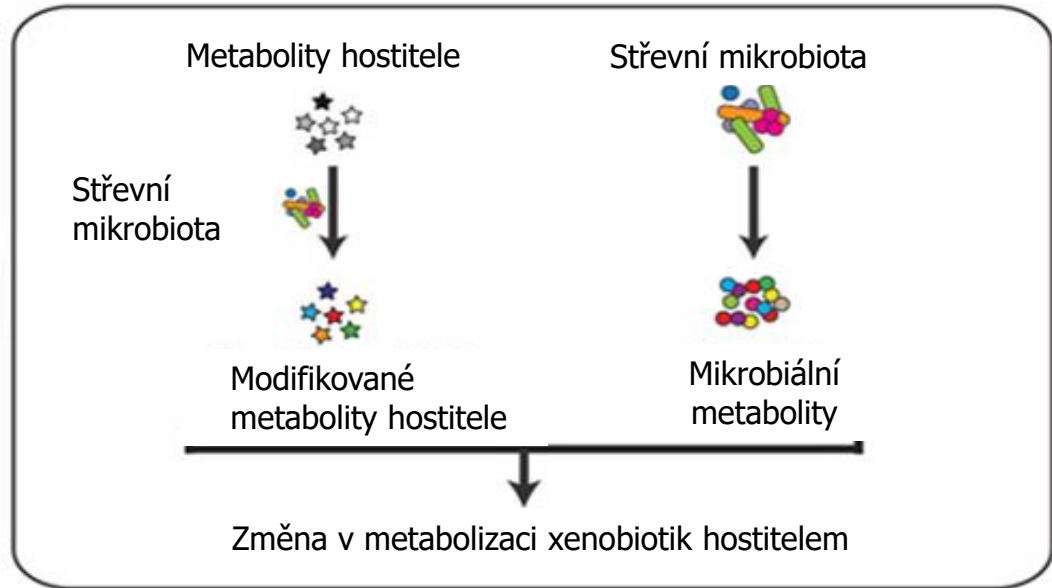
„Druhý genom“

- Epigenetické modifikace
- Metabolizace xenobiotik (nepřímo/přímo)



– Personalizovaná terapie

Př. *Eggerthella lenta* – běžně, jen specifický kmen s geny *cgr1* a *cgr2* inaktivuje digoxin (jejich operon inhibován Arg)

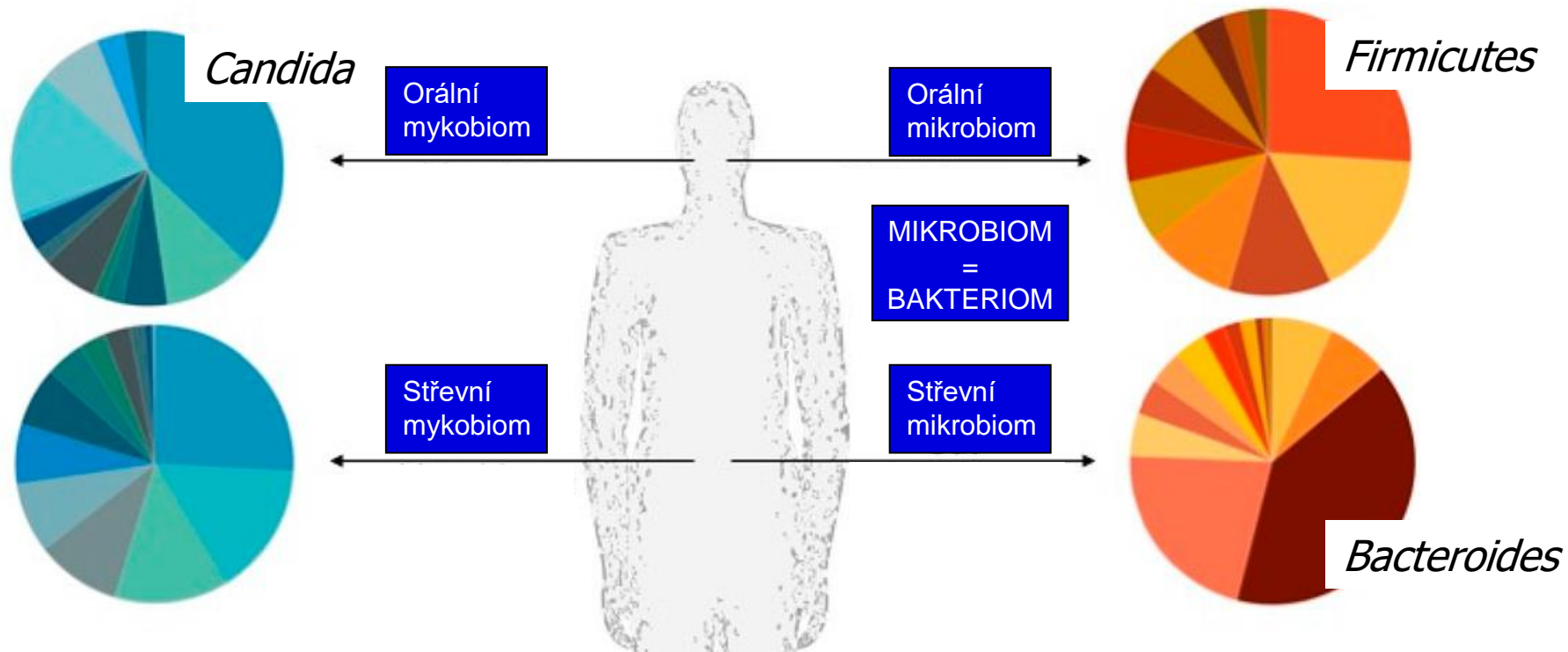


Komparace mikrobiomů

Orální vs. střevní

- Podobnost na rodové úrovni, ale rozmanitost druhová a v relativní abundanci

**Druhová
rozmanitost**



Komparace mikrobiomů

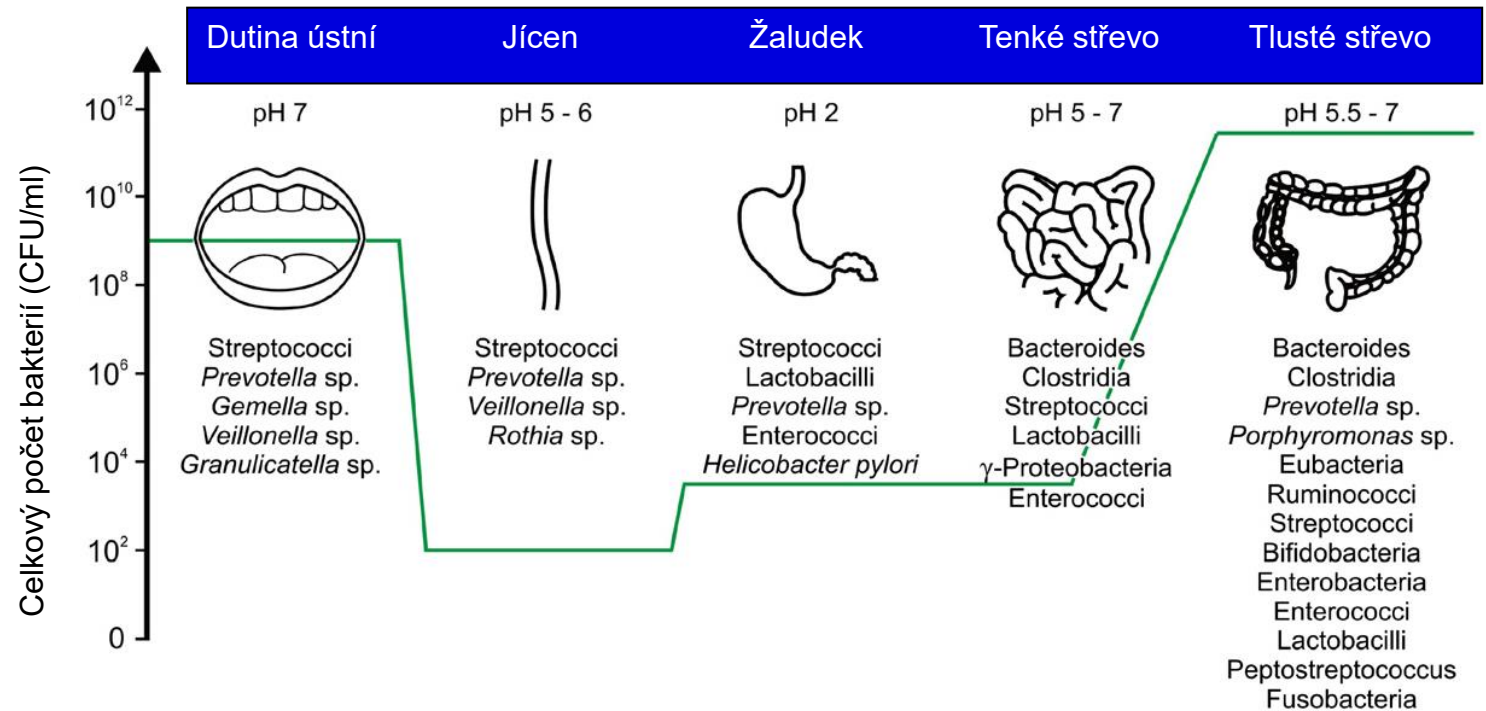
Orální mikrobiom – diagnostika

– Orální mikrobiom u pacientů s Barrettovým jícnem

- Zvýšený relativní výskyt *Firmicutes* a snížený *Proteobacteria*

– Možnost identifikovat pacienty s BE s 96,9% senzitivitou a 88,2% specificitou dle orálního mikrobiomu

- *Lautropia*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*



Orální mikrobiom

Ekosystémy

- 700 až 1000 bakteriálních druhů (HOMD, www.homd.org)

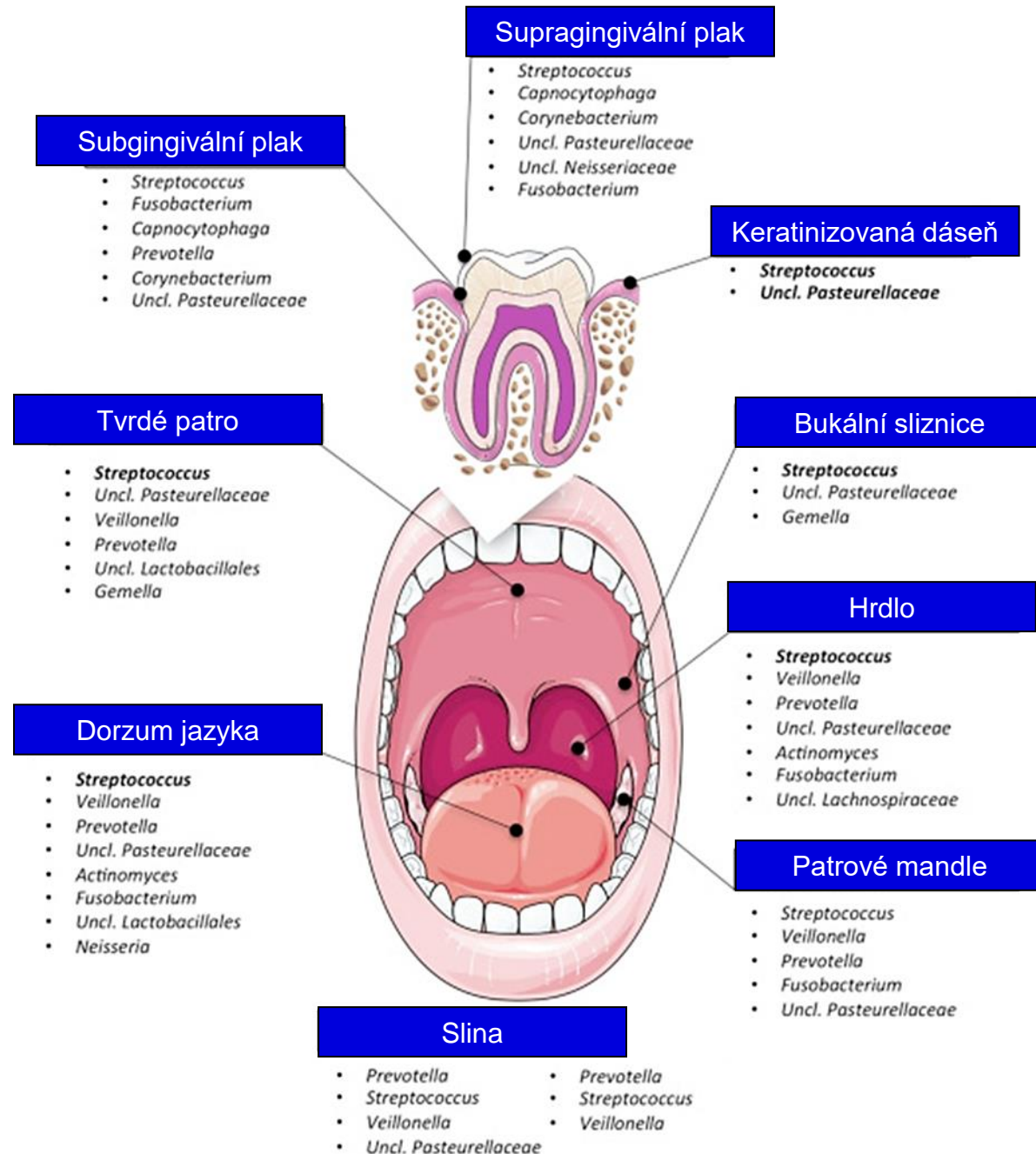
- c O₂, pH, endogenní nutrienty

- Povrchy měkkých a tvrdých tkání

- Tvorba biofilmů (maturace)
- Deskvamace sliznice

- Tekutiny

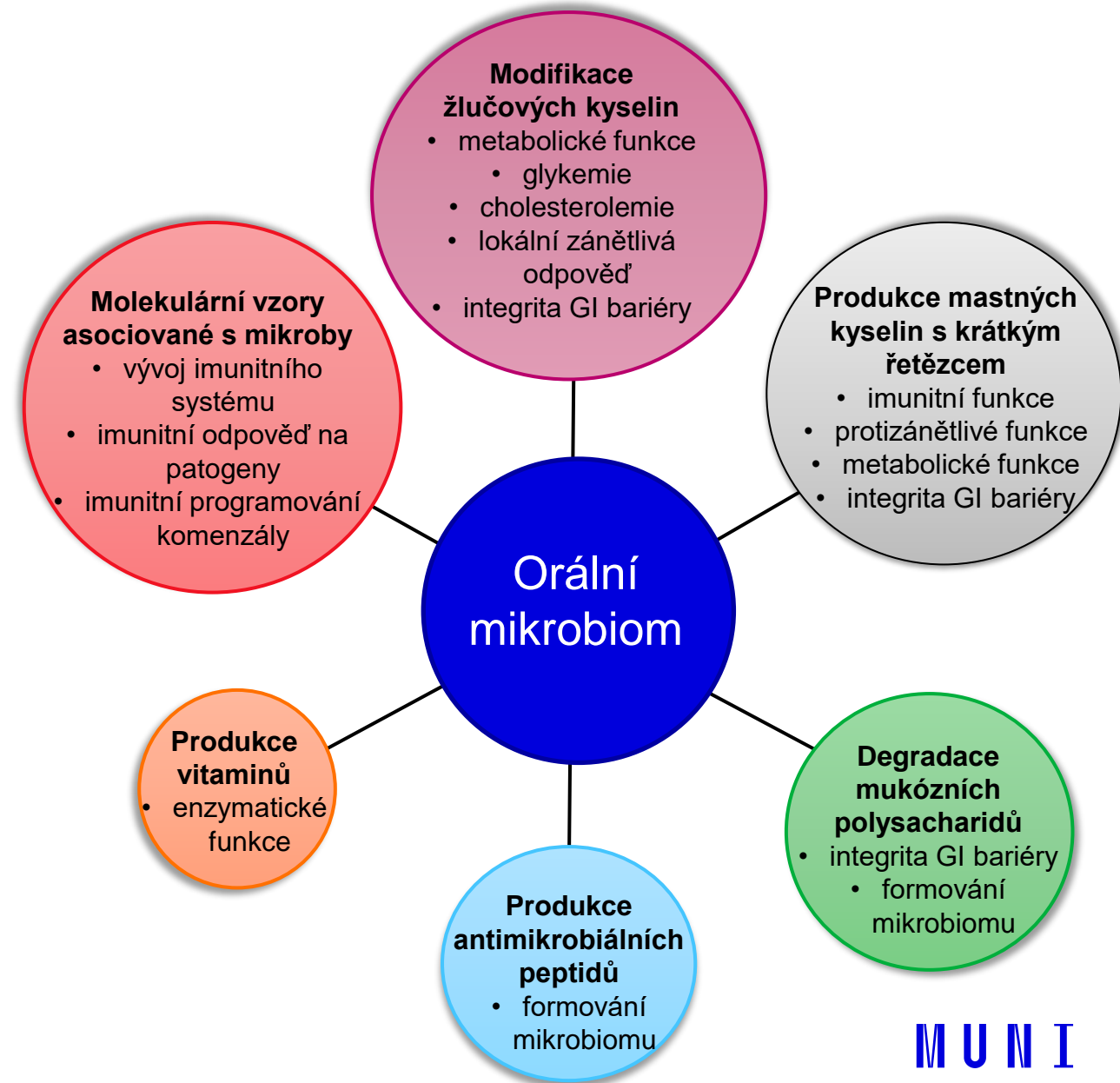
- Slina, gingivální tekutina



Orální mikrobiota

Funkce

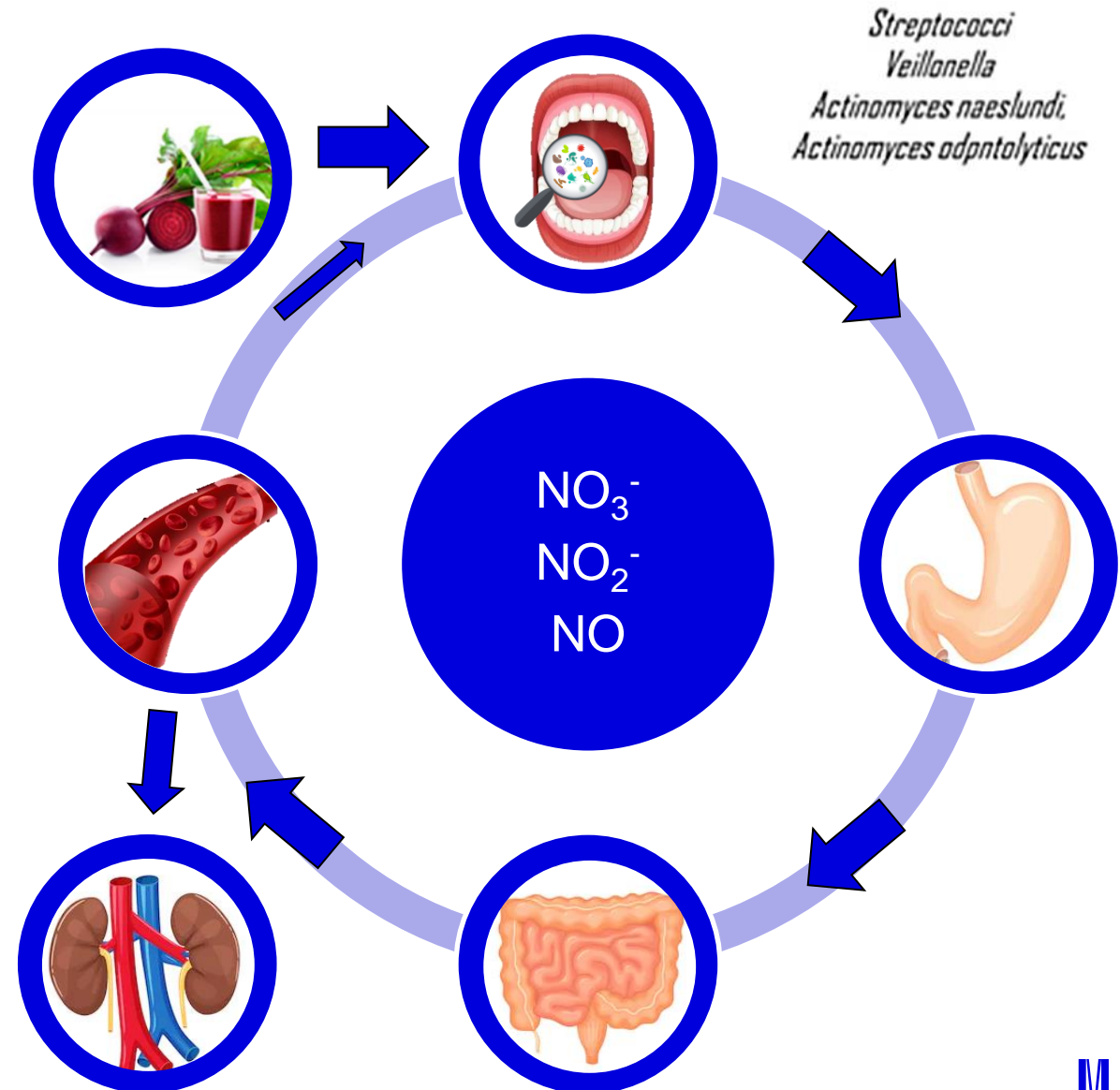
- Vliv na hostitelský imunitní systém
 - Vývoj a zrání buněk IS (SCFA, molekulární vzory asociované s bakteriemi)
 - Downregulace prozánětlivé a upregulace interferonové odpovědi
 - Bariéry – tvorba, integrita, podpora (hlen)
 - Kompetice s potenciálními patogeny
- Podíl na metabolizaci potravy a xenobiotik
 - Fermentace, modifikace žlučových kyselin
 - Enterosalivační okruh (NO)
 - Produkce vitamínů



Orální mikrobiota

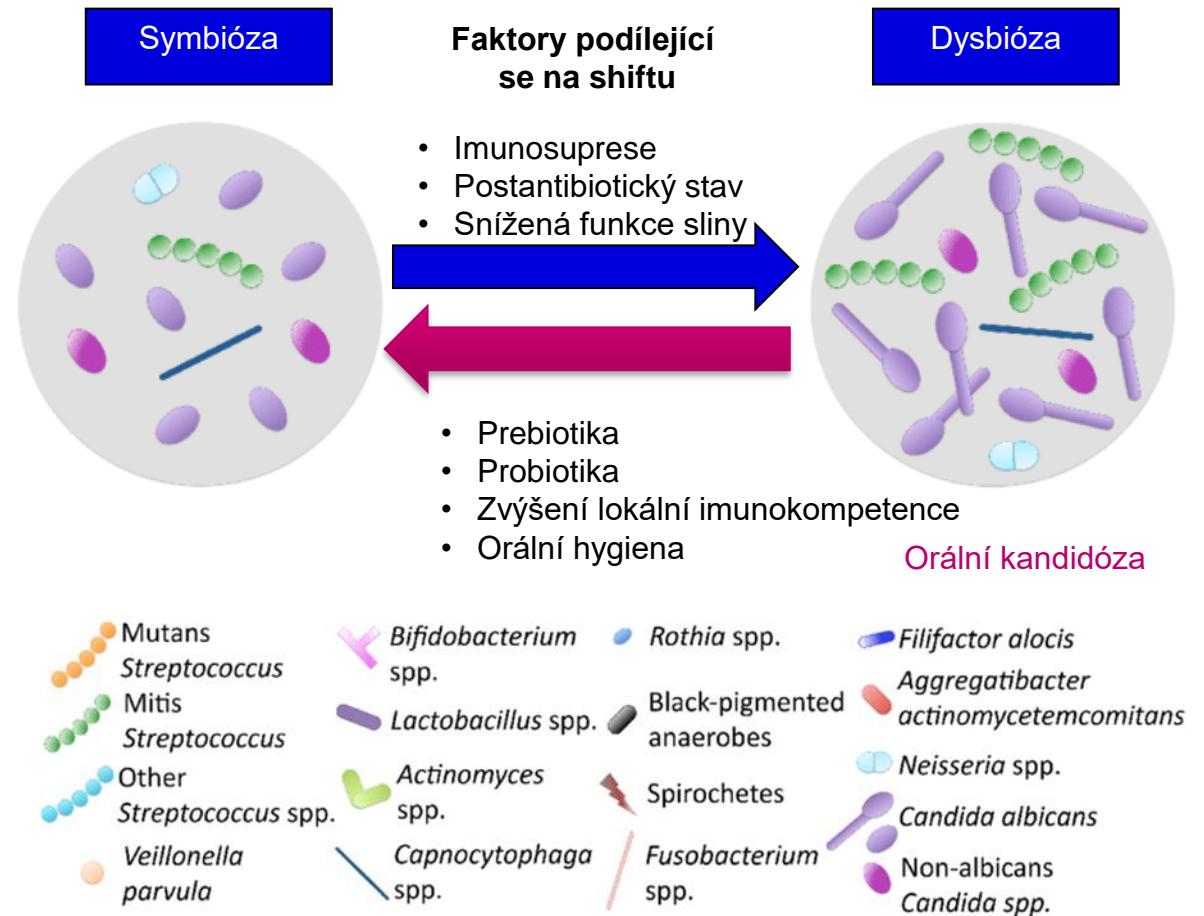
Funkce – enterosalivační okruh

- ¼ požitých dusičnanů
recyklována ve slinných žlázách
(sialin – aktivní transport)
- NO význam
 - Vazodilatace cév
(antihypertenzivum)
 - Stimulace sekrece žaludečního
hlenu
 - Antimikrobiální vlastnosti



Symbióza a dysbióza

- Mikrobiota obecně není pro člověka škodlivá
- Narušení homeostázy – kompetice
- Změna ve složení mikrobiomu koreluje s mnoha chorobami
- Řízená manipulace s mikrobiotou má terapeutický potenciál



Faktory ovlivňující orální mikrobiotu

Hostitel

- Pohlaví
- Imunitní systém
- Zdravotní stav
- Věk hostitele
 - Erupce zubů
 - Transmise
 - Mikroevoluce mikrobioty

- Genom
 - dvojčata MZ vs. DZ
 - interpopulační variabilita

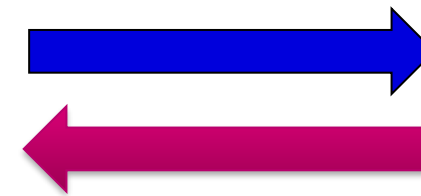
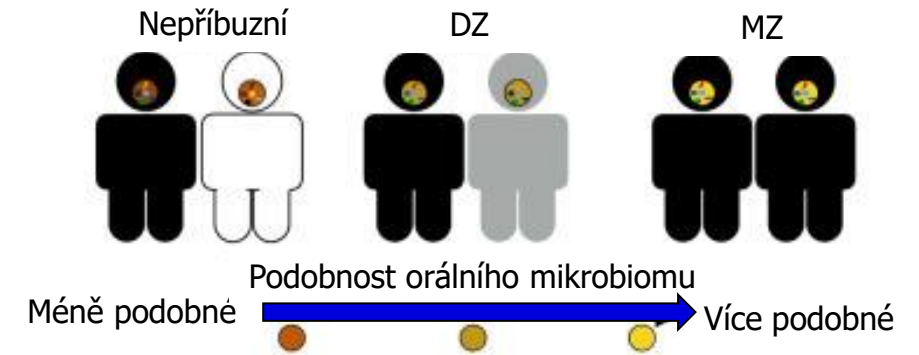
– Užívání xenobiotik

- Léčiva
- Alkohol
- Kouření

– Orální hygiena

– Dieta

- Fermentovatelné sacharidy

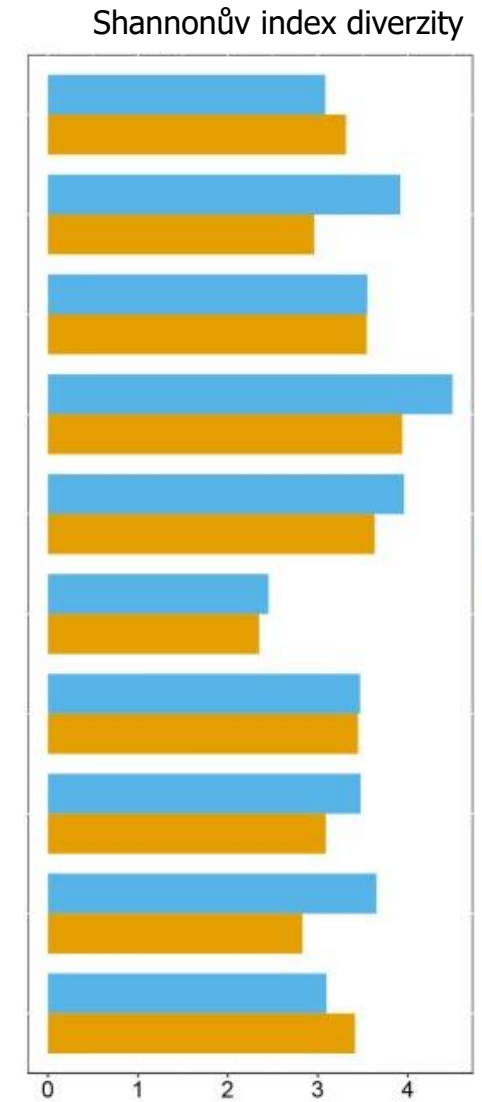
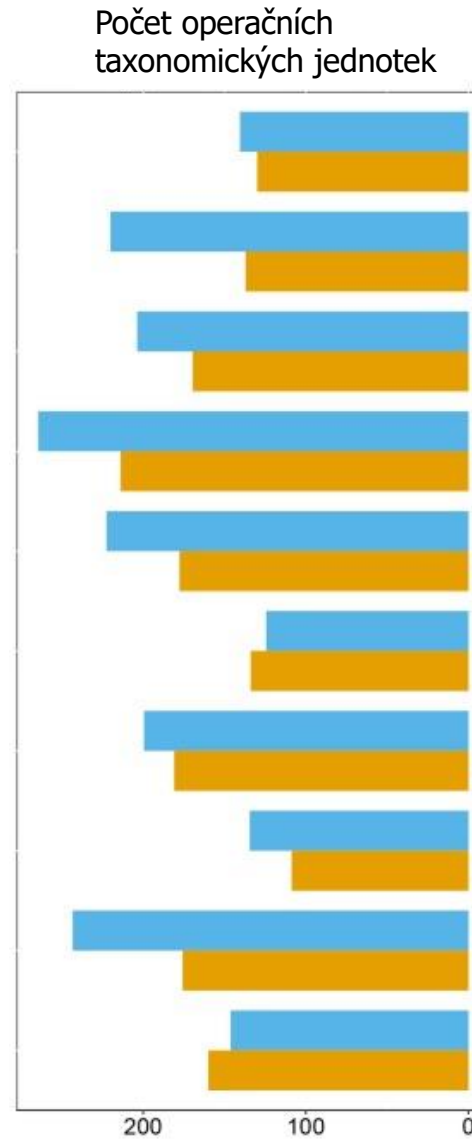


Vnější prostředí

Orální mikrobiom

Ústní voda

- Slina
- Ústní voda s 12% alkoholem

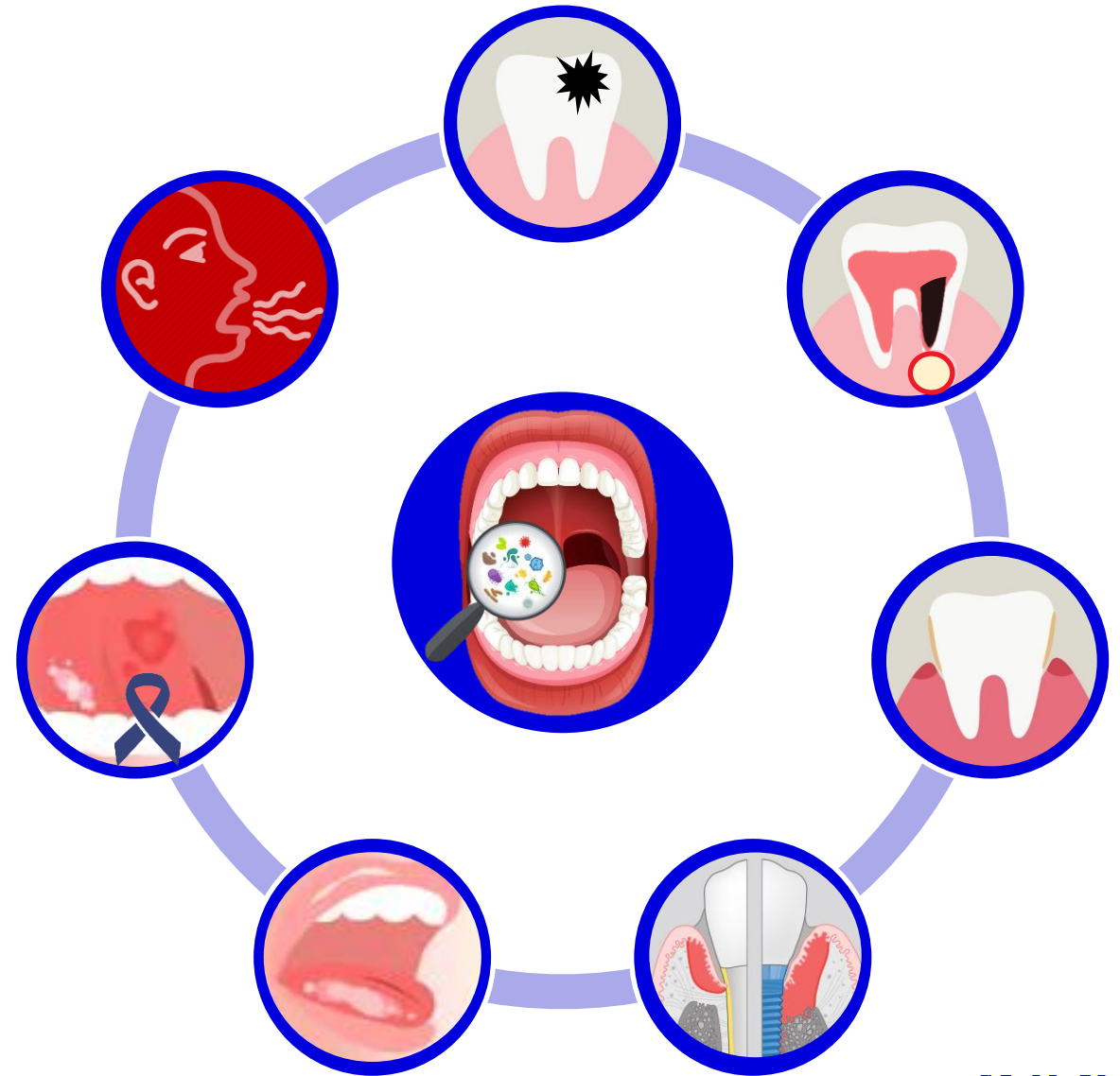


Ústní voda
Slina

Orální dysbióza

Orální choroby

- Zubní kaz
- Apikální periodontitida, radikulární cysta
- Parodontitida
- Periimplantitida
- Onemocnění sliznice dutiny ústní
 - Orální lichen planus, leukoplakie, SLE
- Nádorové onemocnění orofaciální oblasti
- Halitóza



Orální dysbióza

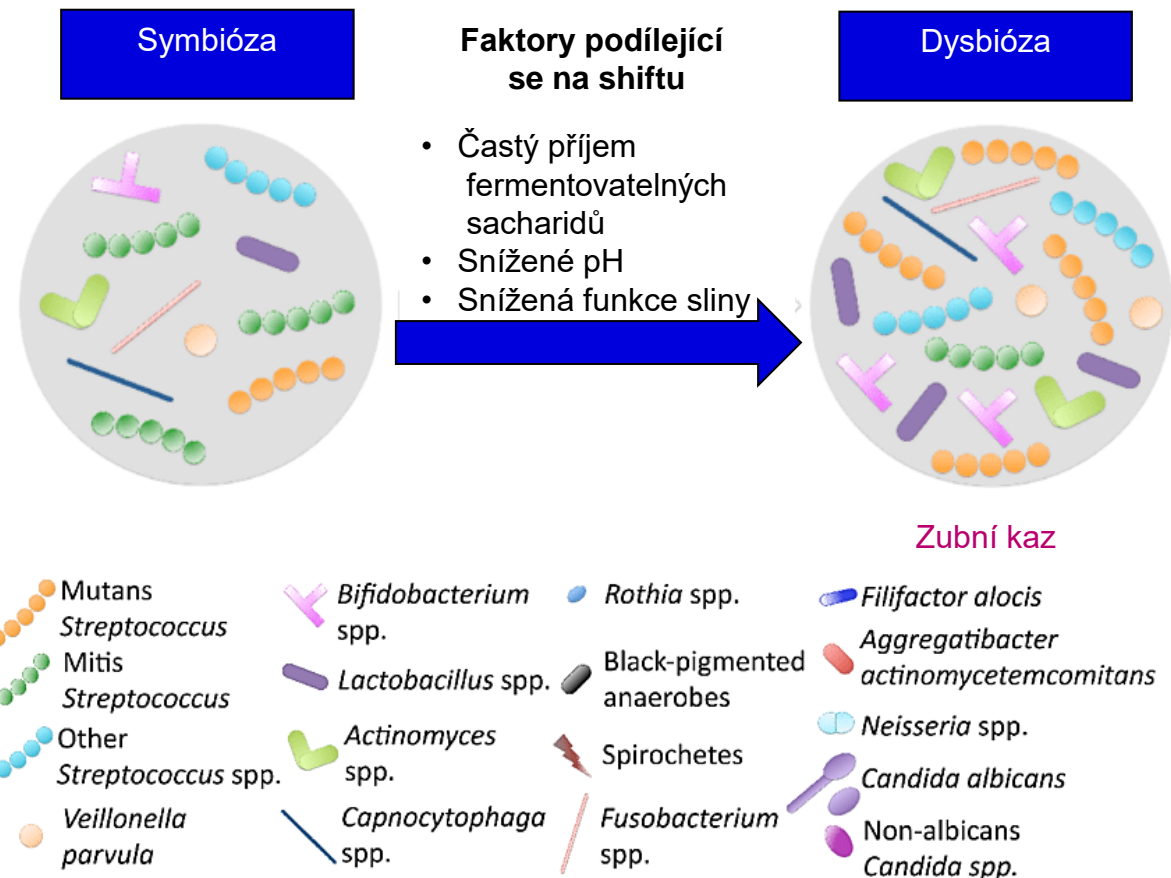
Zubní kaz

— Acidogenní/acidurické bakterie

- *Streptococcus mutans*
- *Lactobacillus* sp.
- *Bifidobacterium* sp.
- Další *Streptococcus* sp.

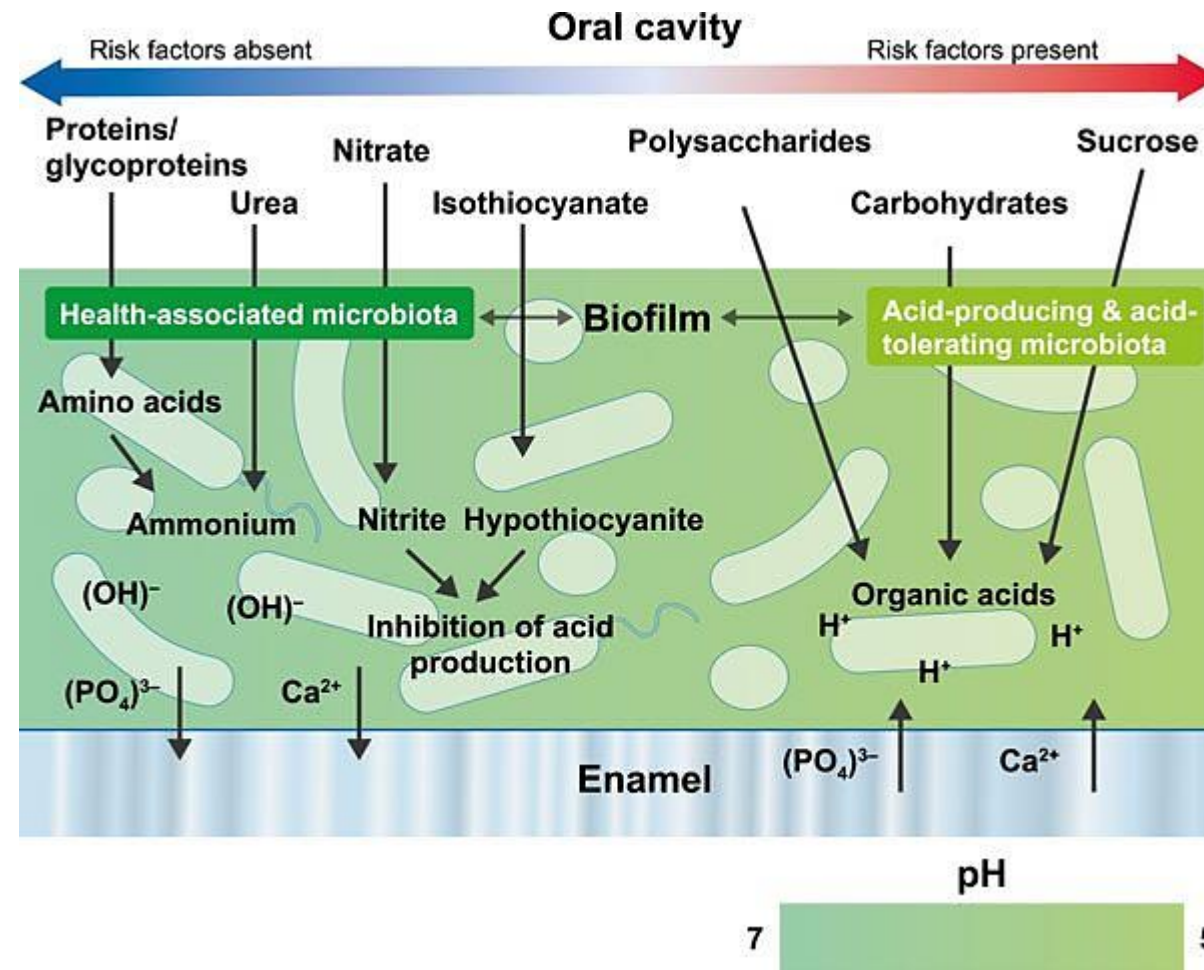
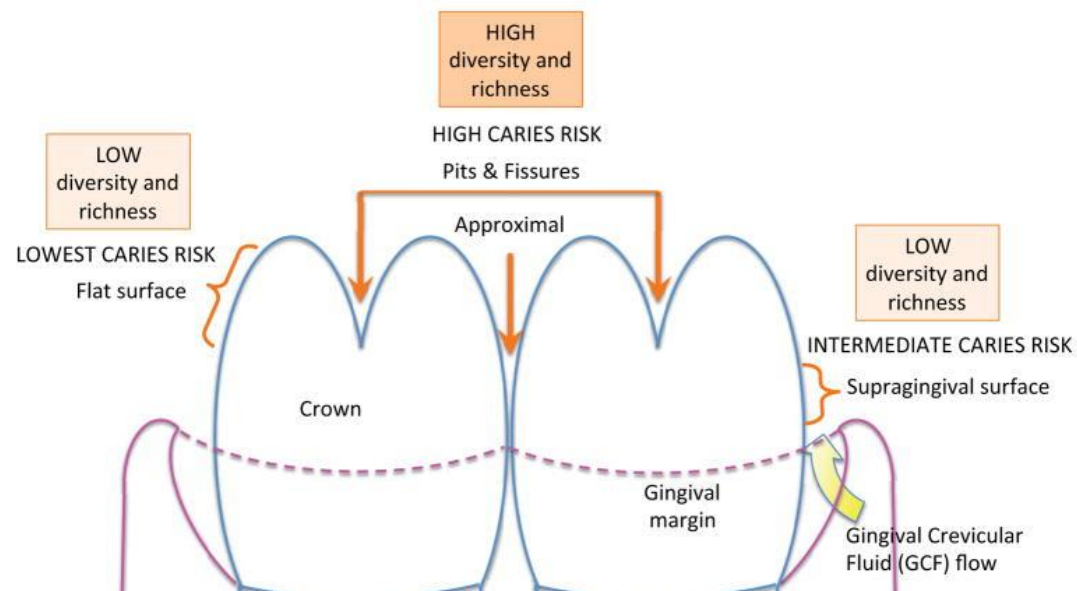
— Klíčové vlastnosti

- Produkce kyselin
- Tolerance kyselého pH
- Produkce exopolymerů
- Produkce intracelulárních polysacharidů



Orální dysbióza

Zubní kaz



Orální dysbióza

Zubní kaz

— sECC

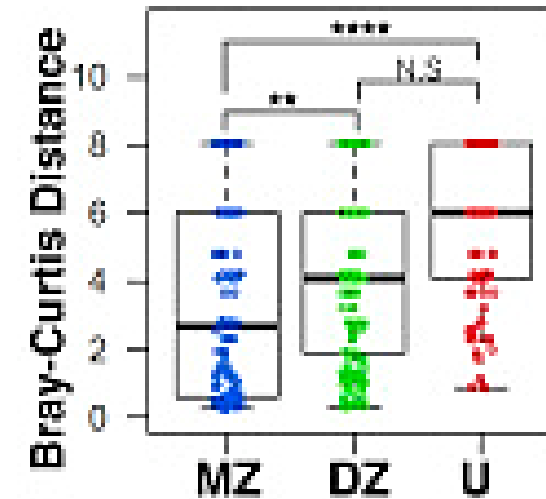
- *Streptococcus (mutans)*,
Porphyromonas a *Actinomyces*

— Synergické působení

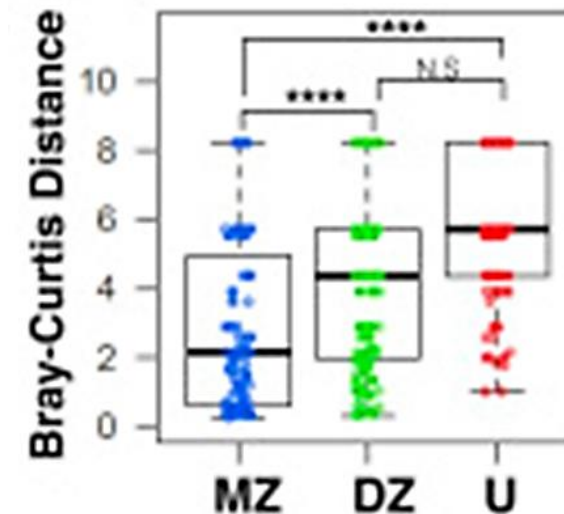
mikrobioty s acidogenními
vlastnostmi

— Interakce hostitele a mikrobioty

Sklovina



Zubovina



Orální dysbióza

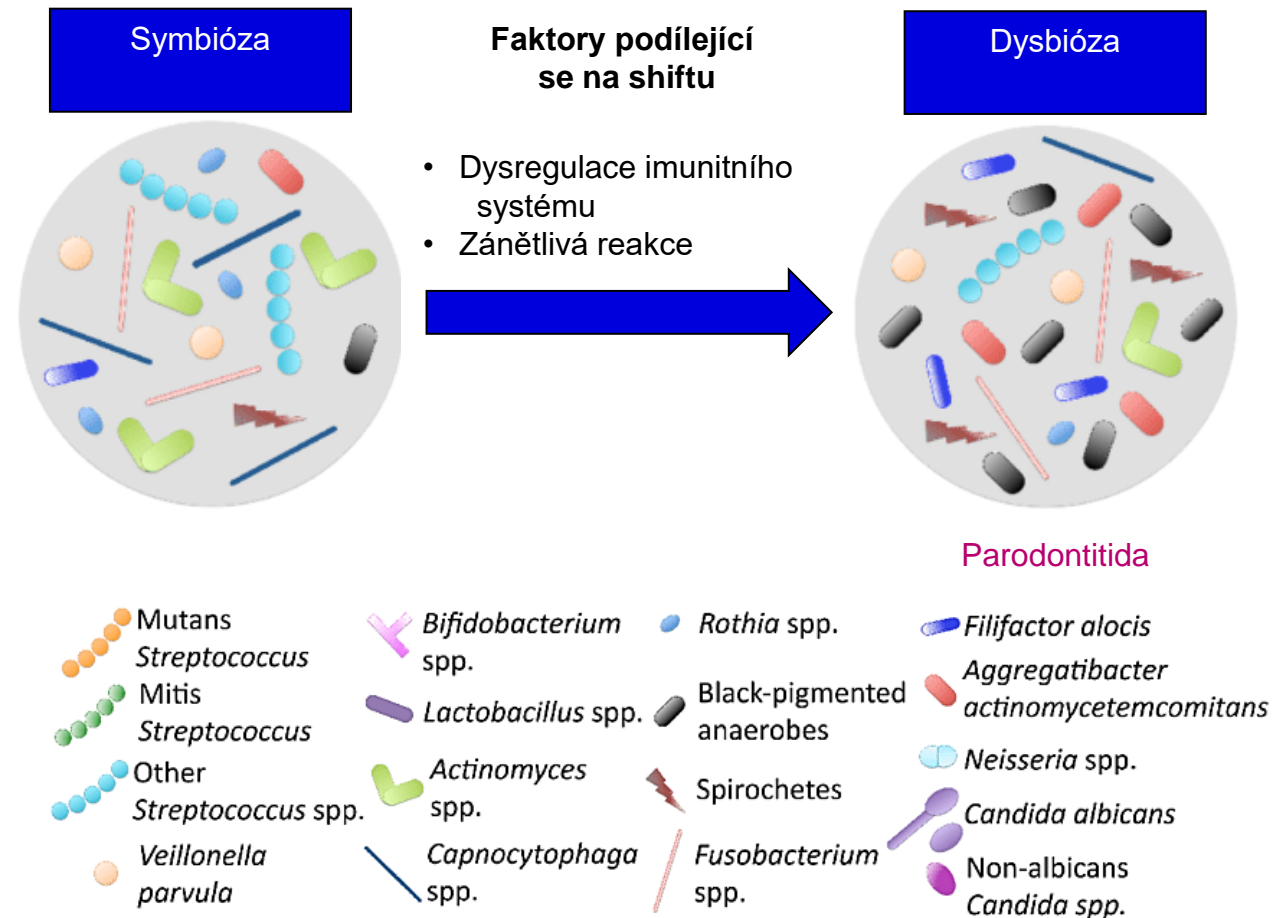
Parodontitida

— Anaerobní a proteolytické bakterie

- *P. gingivalis*
- *T. forsythia*
- *T. denticola*
- a další

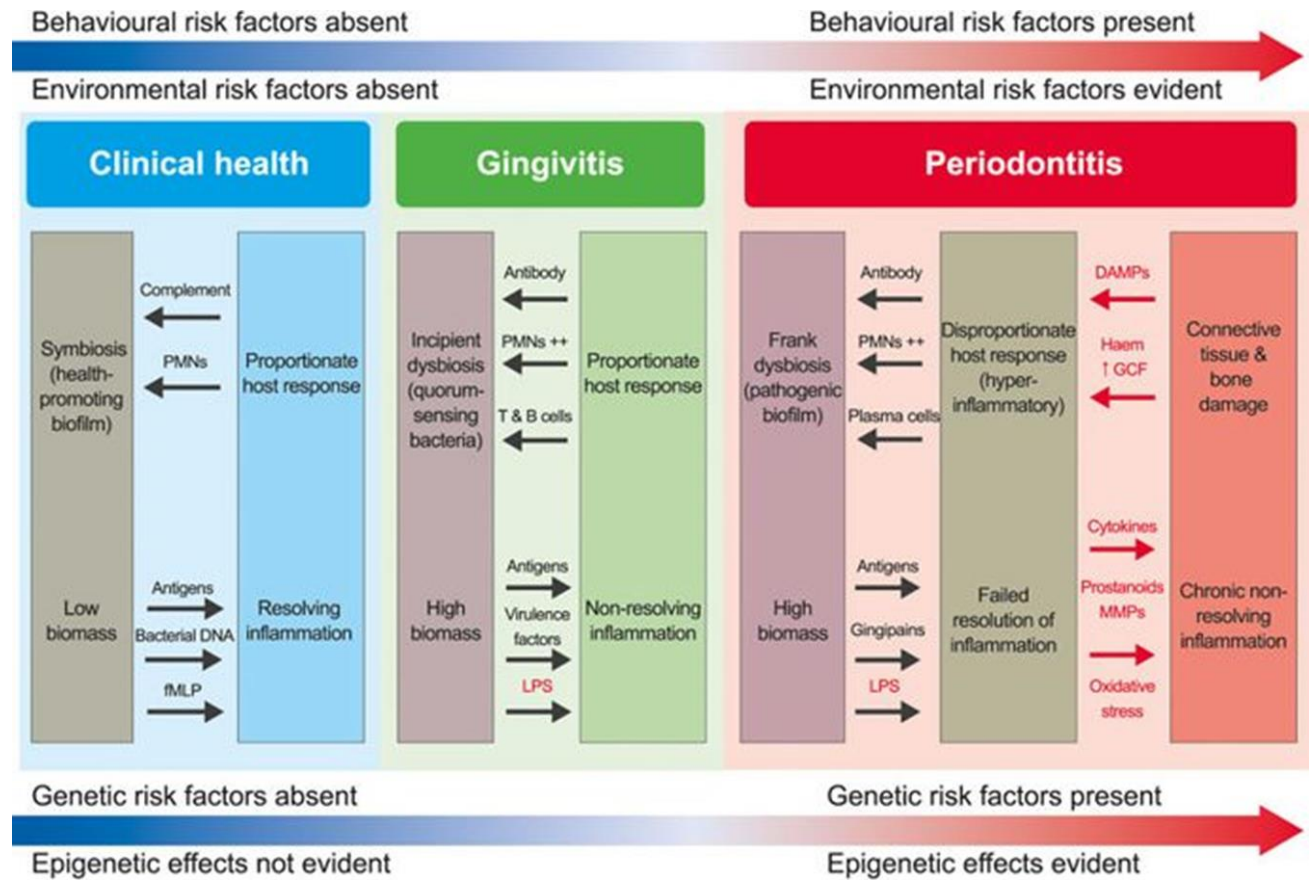
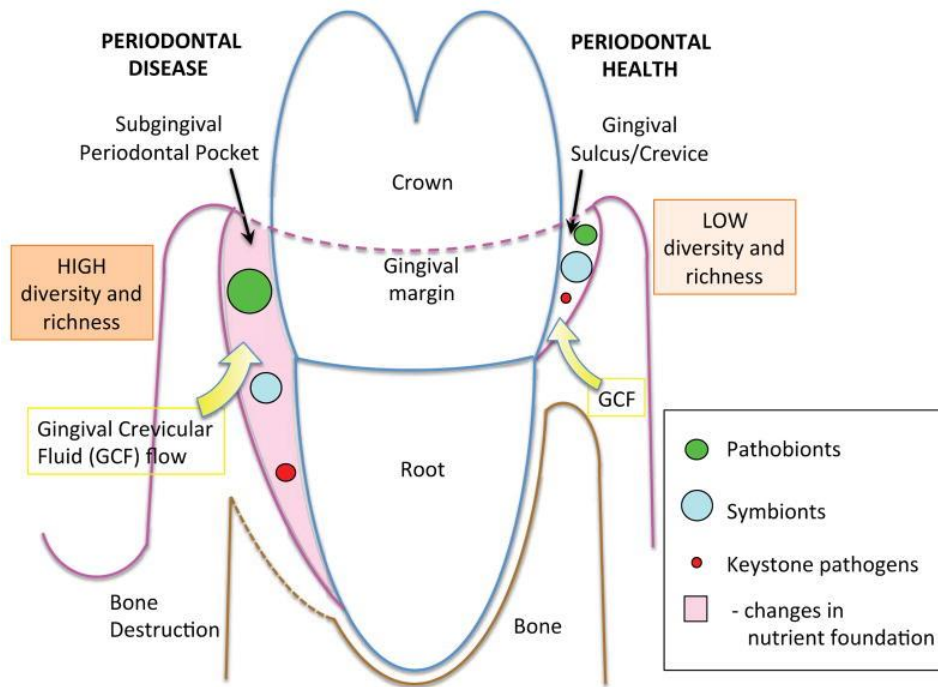
— Klíčové vlastnosti

- Produkce proteáz
- Produkce LPS
- Cytotoxiny
- Vyvolání prozánětlivé reakce (cytokiny)



Orální dysbióza

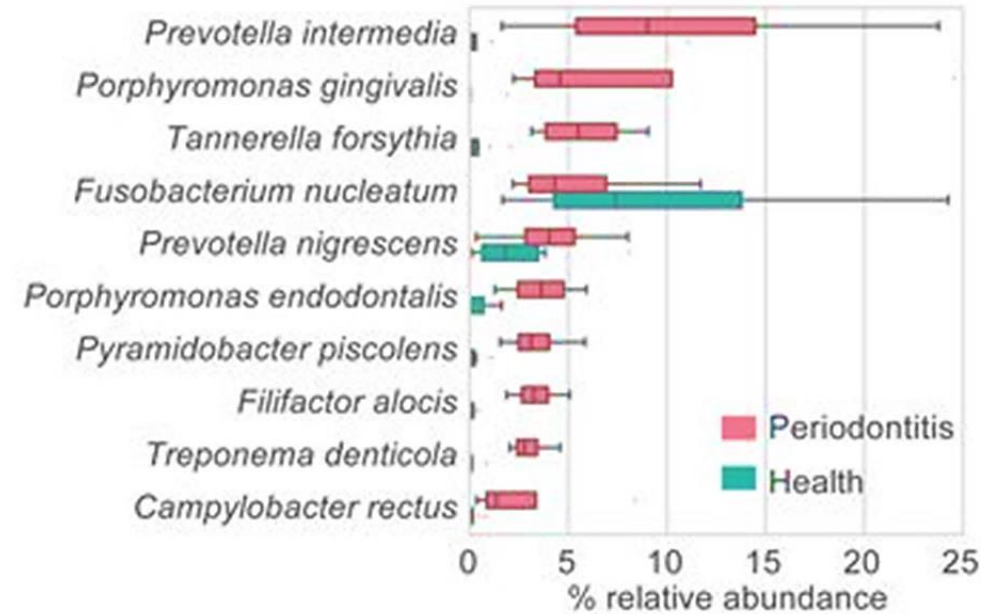
Parodontitida



Orální dysbióza

Parodontitida

- Metagenom a metatranskriptom
(diferenciální expresní analýza)
- 9 virulentních faktorů – 500x
více při dysbióze

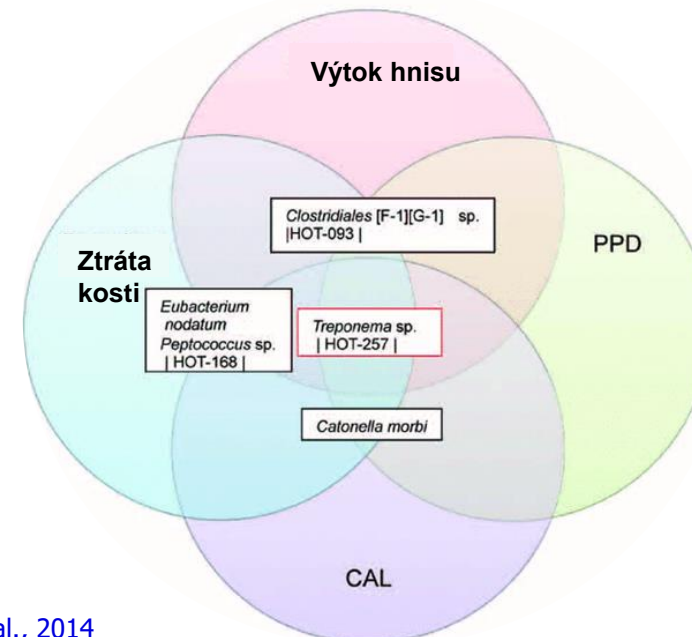
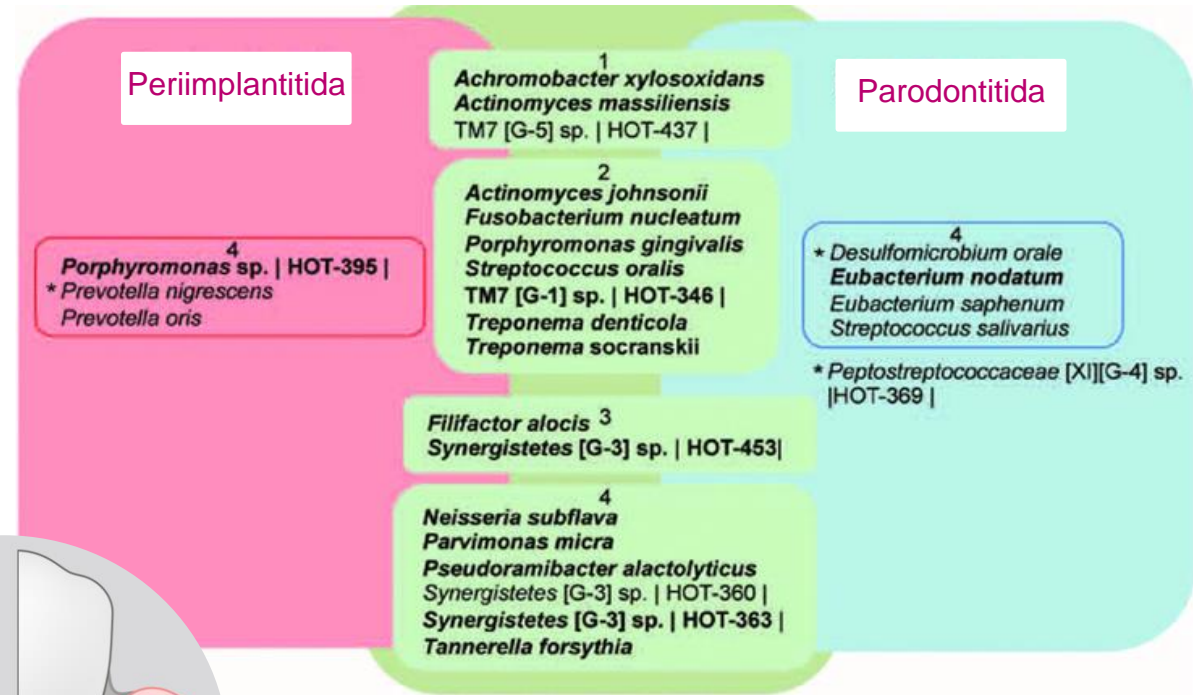
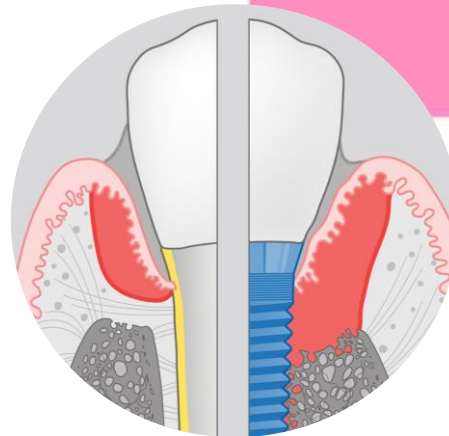


	Virulence factors	Organism
Adheze a kolonizace	<u>fimA type 1b</u>	<i>Po. gingivalis</i>
	<u>fimA type 1</u>	<i>Po. gingivalis</i>
	Immunoreactive 47 kD antigen	<i>Po. gingivalis</i>
	Hemagglutinin A (hagA)	<i>Po. gingivalis</i>
	Arginine deiminase (arcA)	<i>Po. gingivalis</i>
Povrchová proteáza, která hydrolyzuje prozánětlivé cytokiny	Serine protease <u>dentilisin</u>	<i>Tr. denticola</i>
	Flagellar motor switch protein (FlhG)	<i>Tr. denticola</i>
	fimA type 3	<i>Po. gingivalis</i>
	Arginine deiminase (arcA)	<i>My. arginini</i>

Orální dysbióza

Periimplantitida

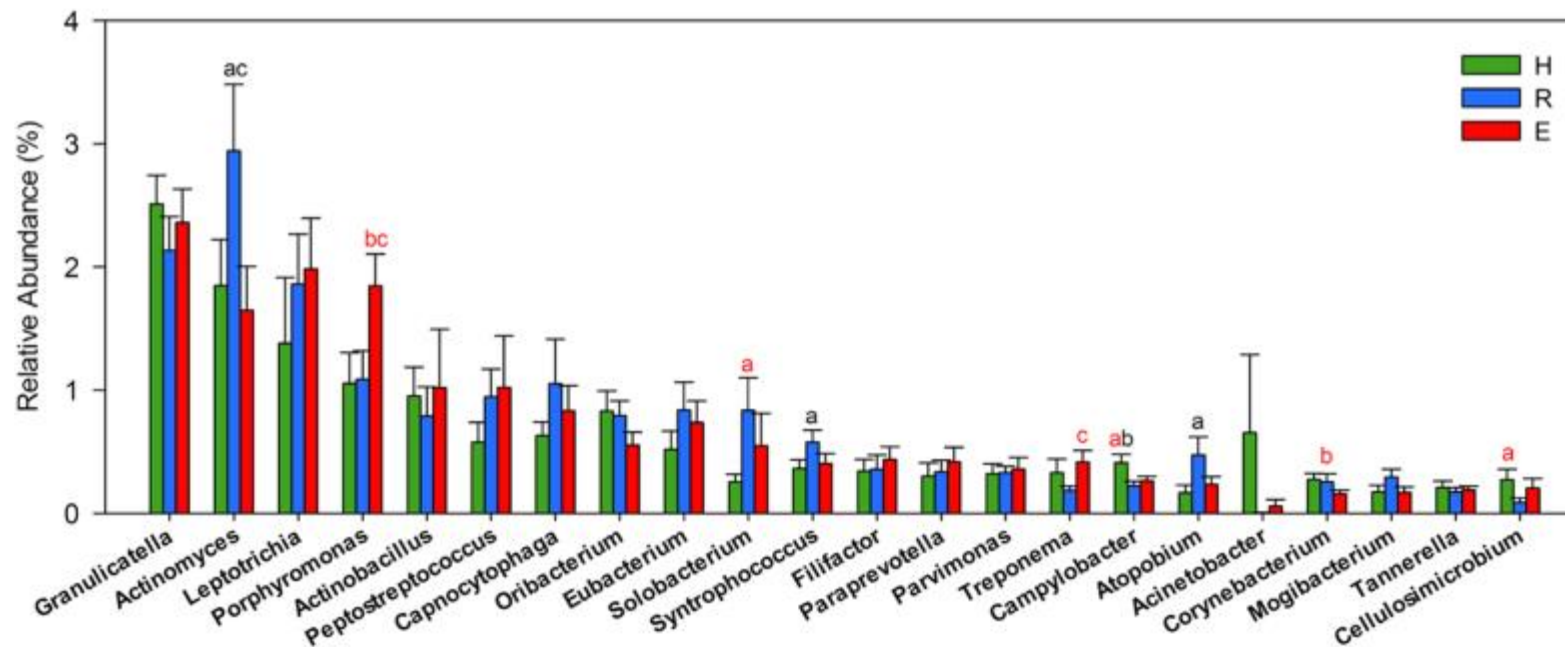
- *Prevotella nigrescens* významně zvýšený počet u periimplantitidy než u parodontitidy
- *Treponema sp.* asociovaná se 4 klinickými parametry



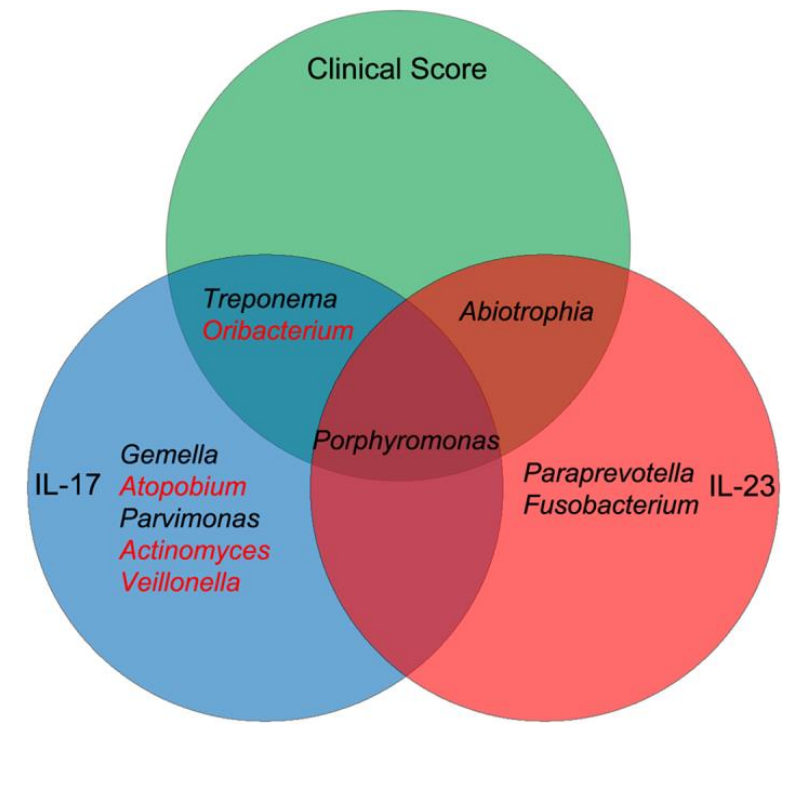
Orální dysbióza

Onemocnění sliznice dutiny ústní

– Orální lichen planus – erozivní, retikulární



Negativní korelace
Pozitivní korelace
s klinickými daty



Orální dysbióza

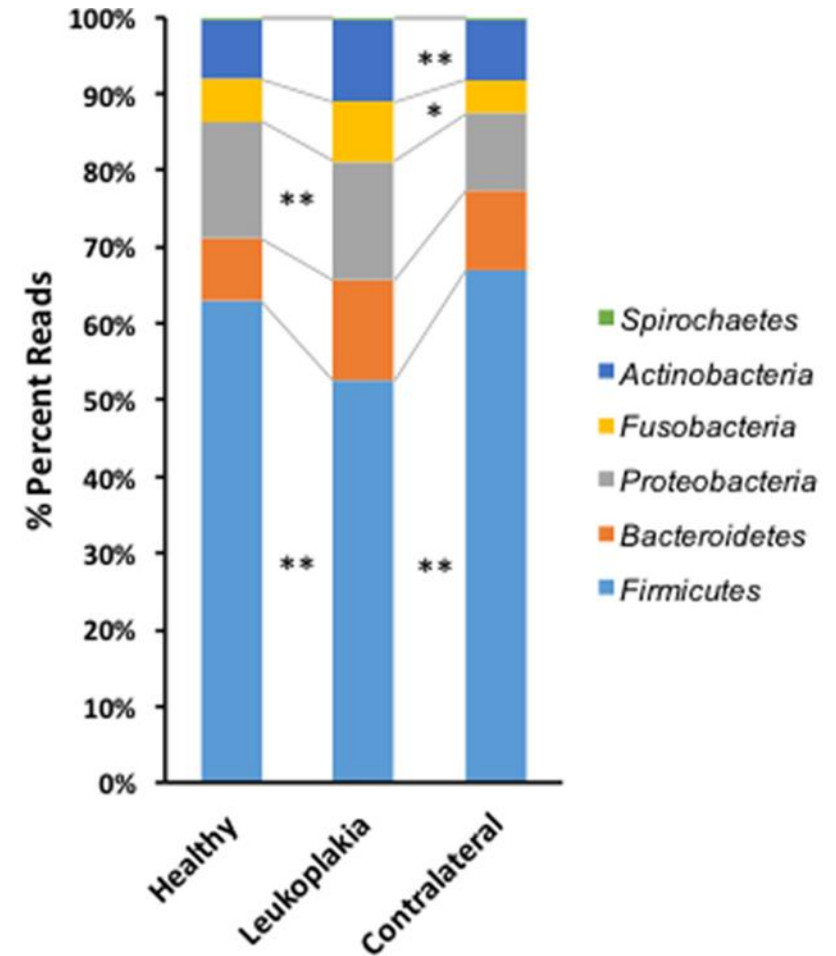
Onemocnění sliznice dutiny ústní

– Orální leukoplakie

- Zvýšený počet *Fusobacteria* a snížený počet *Firmicutes*
- U dysplázie *Leptotrichia* spp. a *Campylobacter concisus*... podobný profil jakou kolorektálního karcinomu
 - Asociace se specifickými změnami v expresi genů hostitele (např. zvýšení exprese prozánětlivého IL-8)

– Systémový lupus erythematoses (SLE)

- Zvýšený počet *Fretibacterium*, *Prevotella nigrescens* a *Selenomonas*



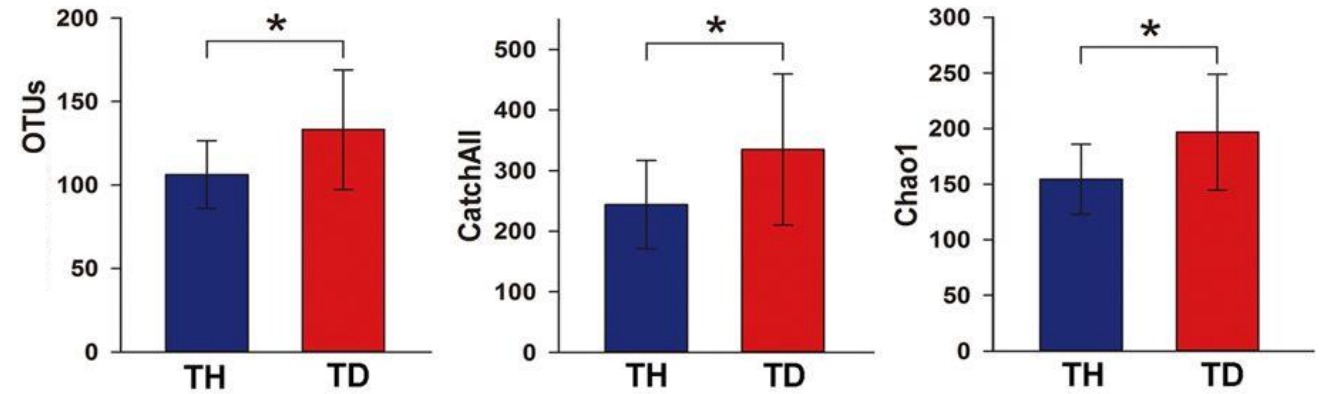
Orální dysbióza

Halitóza

- Větší četnost *Leptotrichia wadei* a *Peptostreptococcus stomatis* u dětí s halitózou
 - Na jazyku rozdíly v α diverzitě ve slině ne
- Up/down regulace genů v dráze související s H_2S metabolizací
 - Vyšší mikrobiální produkce
 - Menší využití H_2S u dětí s halitózou

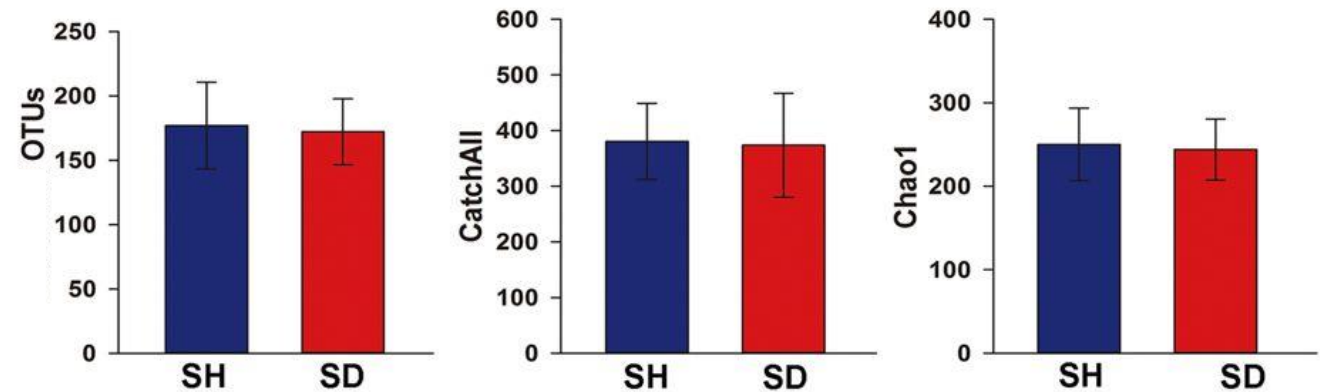
A

Dorzum jazyka



B

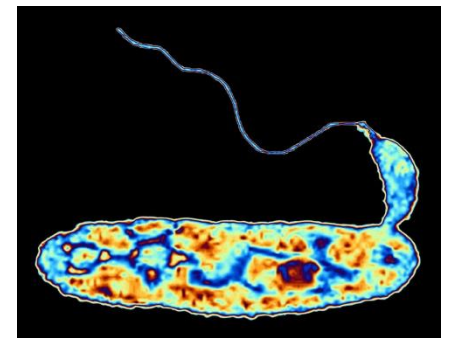
Slina



Orální mikrobiota

Prevence a léčba orální dysbiózy

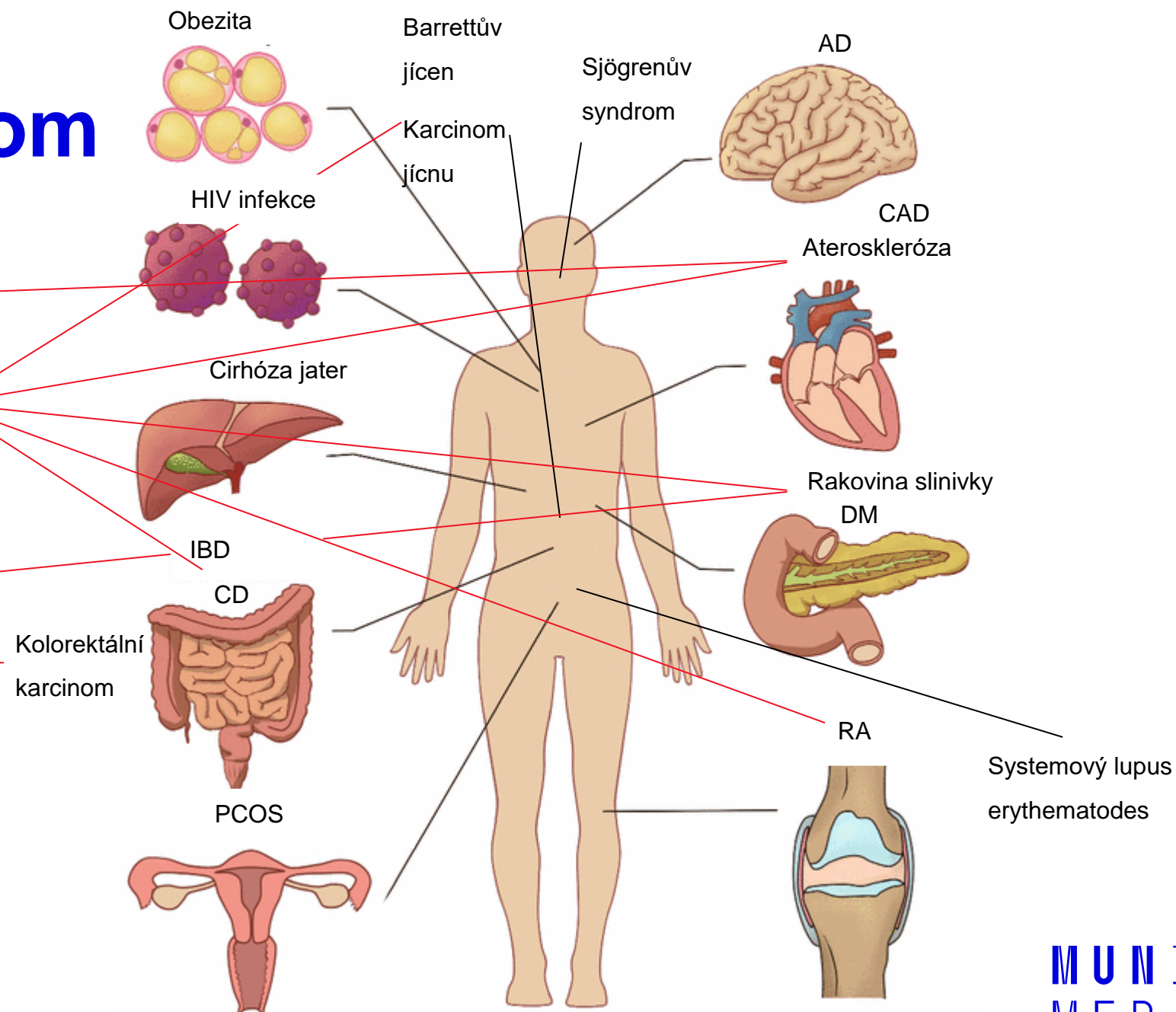
- Precizní orální hygiena a péče zubního lékaře
- Dieta, kouření, alkohol
- Prebiotika a probiotika
- Vakcinace
 - fúzní protein 2. generace z proteinů bakterií *S. mutans* (rPAc) a *E. coli* (flagelin KF)
 - intranazální vakcína na zvířecím modelu
- Antibiotika, antimykotika
- Predátoři BALOs
 - *Bdellovibrio*, *Bacteriovorax* a *Peredibacter* = *Bdellovibrio*-a podobné organizmy k usmrcení anaerobních G⁻ bakterií



Orální mikrobiom

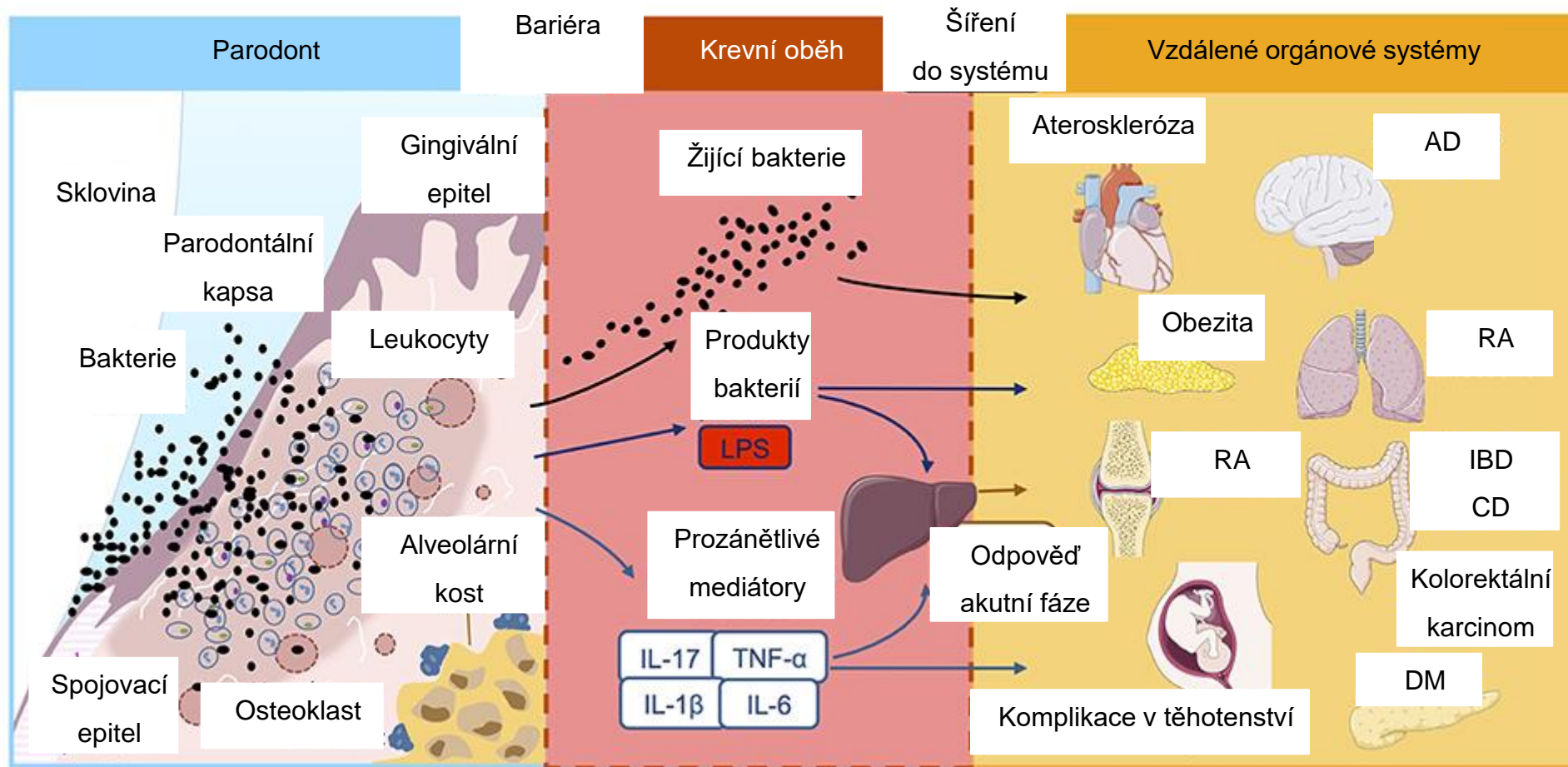
Systémové choroby

- *Streptococcus mutans*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- *Fusobacterium nucleatum*



Orální mikrobiom

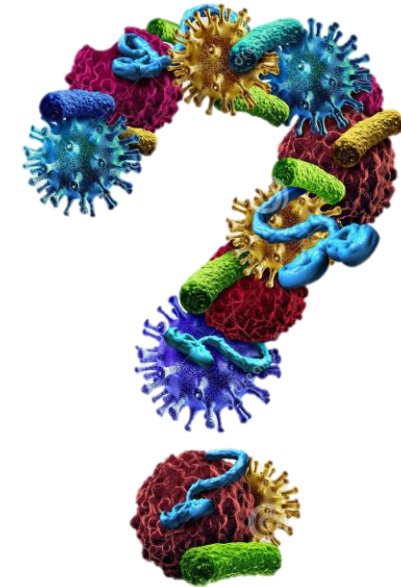
„Leaky mouth“?



Lidský mikrobiom

Otázky

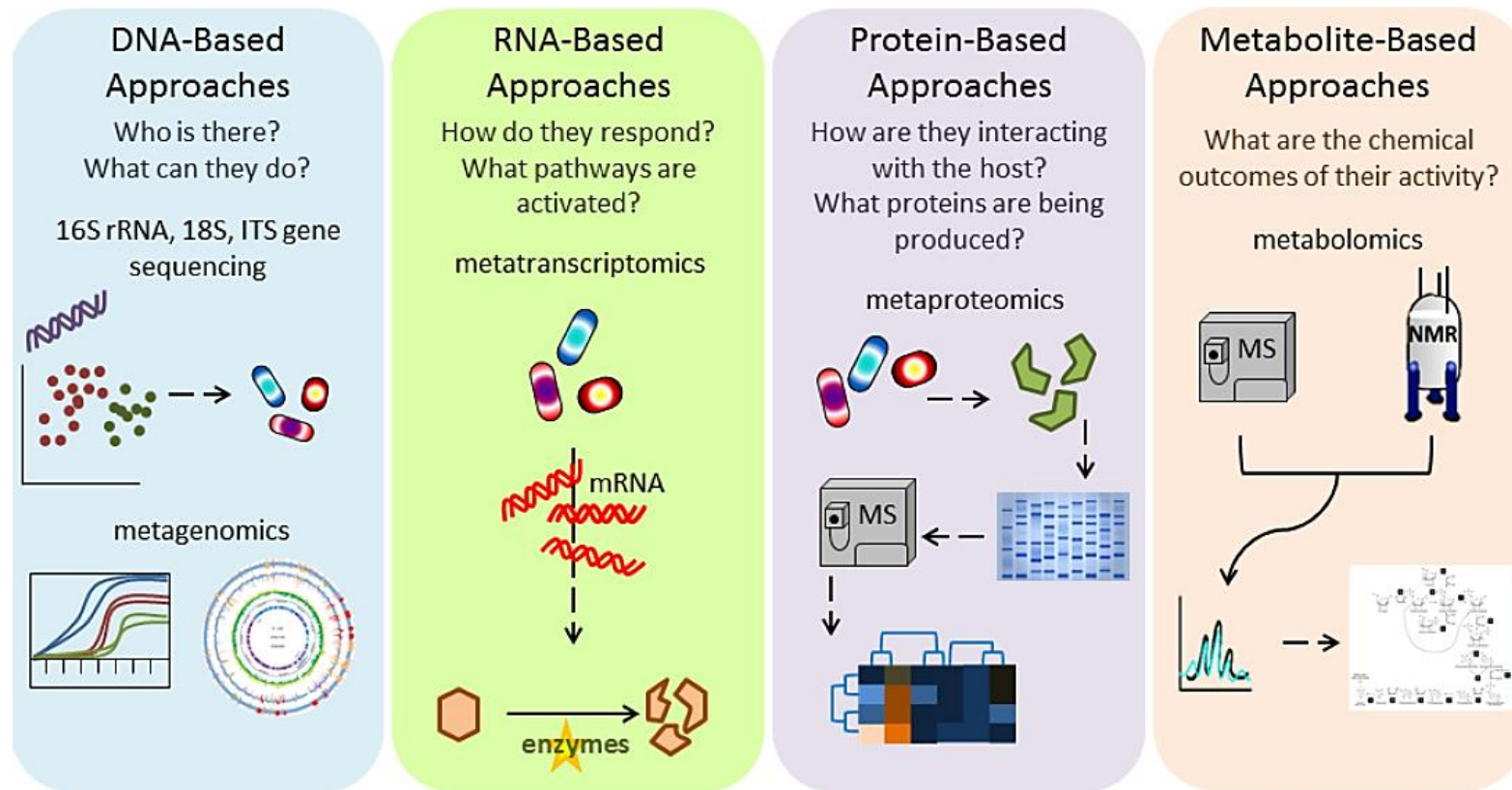
- Jak vznikají mikrobiální komunity a jak se regenerují?
- Jaké mechanismy regulují mikrobiální složení?
- Které MO se podílejí na zdraví a nemoci?
- Do jaké míry se liší mikrobiální společenství mezi zdravými jedinci, kteří nejsou ve spojení?
- Existuje u lidí základní mikrobiom v dané lokalitě?
- Jak se mění mikrobiální složení v průběhu času, mezi prostředím nebo tělesnými lokacemi?
- Jak lze manipulovat s mikrobiální složení s ohledem na léčbu?



Orální mikrobiom

Vize

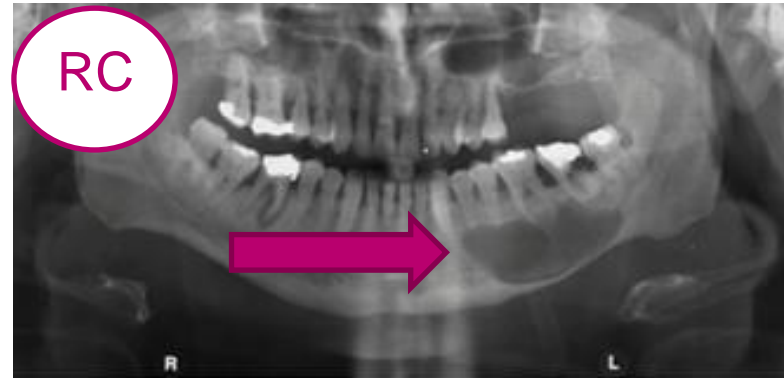
- Interakce mezi hostitelem a orálním mikrobiomem – kombinace přístupů



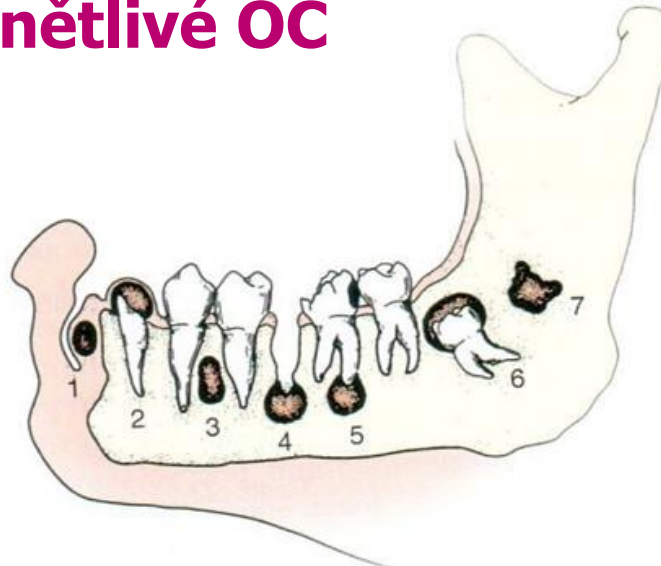
Molekulární etiopatogeneze AP a OC

Odontogenní cysty

- 1) gingivální
- 2) erupční
- 3) parodontální
- 4) reziduální
- 5) radikulární
- 6) folikulární
- 7) odontogenní keratocysta



Zánětlivé OC

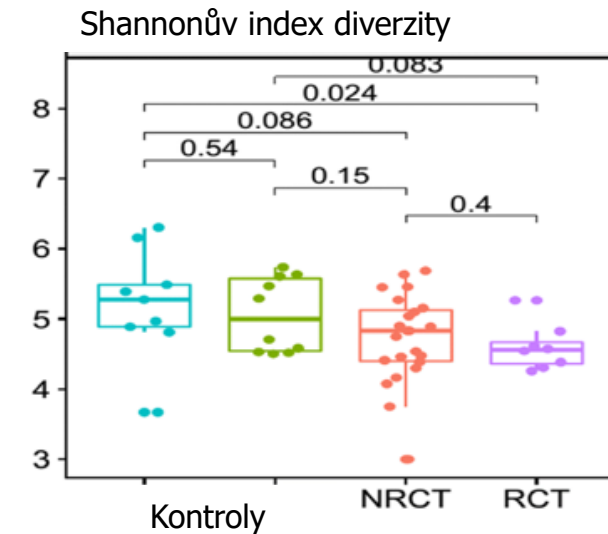
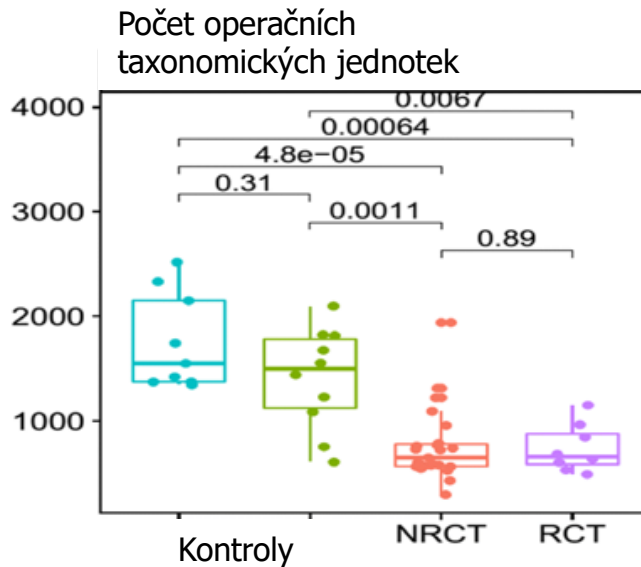
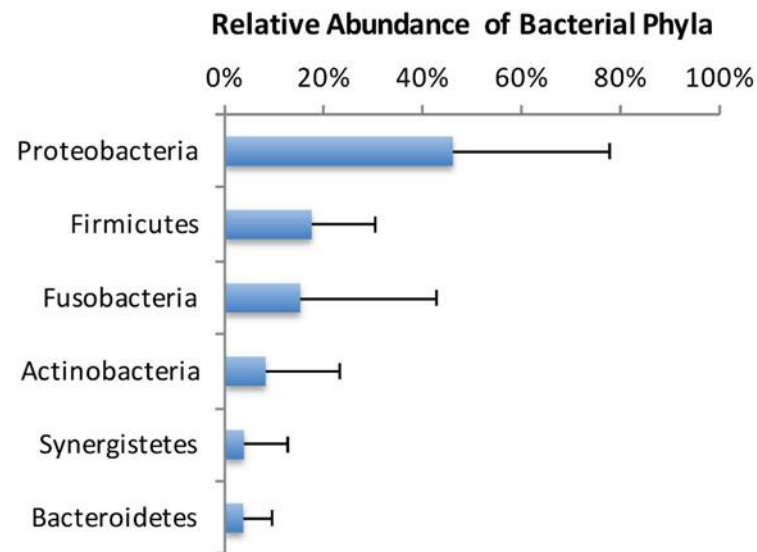
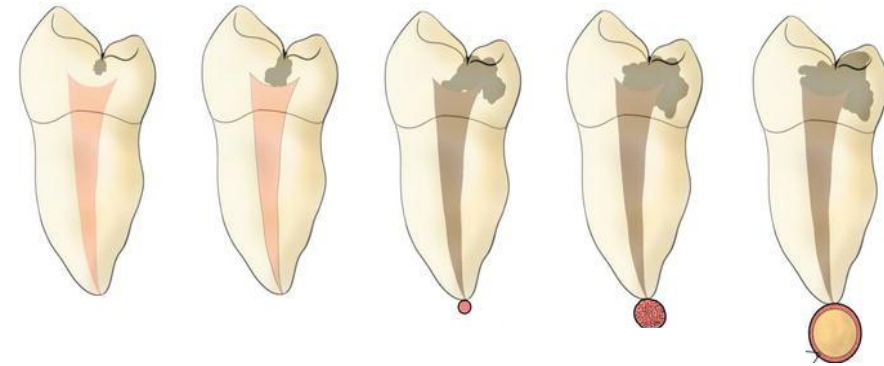


Vývojové OC

Úvod

Apikální periodontitida a radikulární cysta

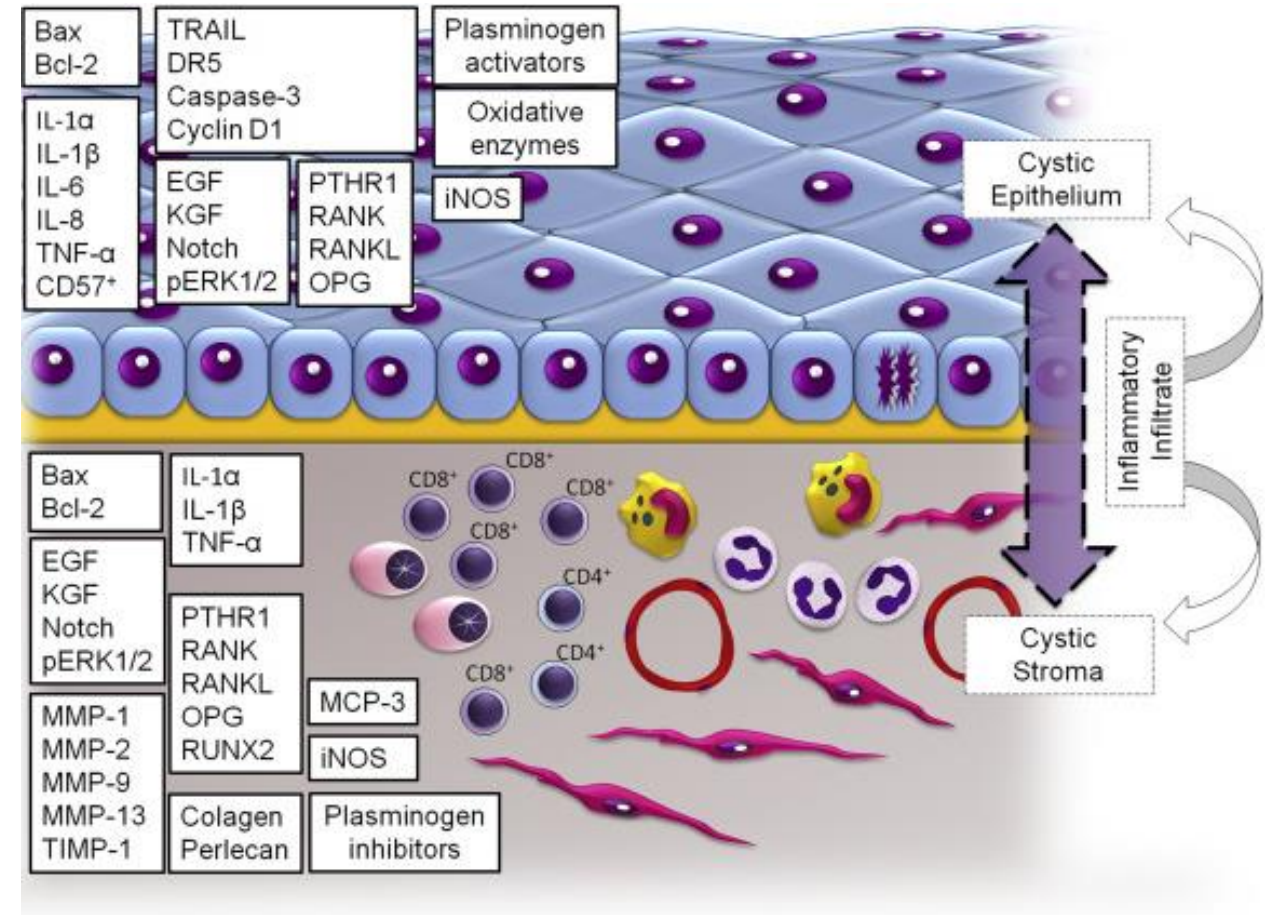
- Snížená bohatost a rozmanitost komunity u AP oproti kontrolám



Orální dysbióza

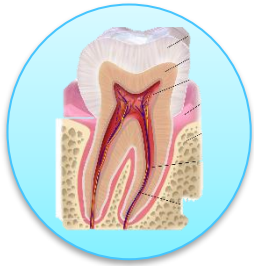
Apikální periodontitida a radikulární cysta

- *Lactococcus lactis* asociován se vznikem periapikálního granulomu
- Anaerobní taxony (*F. nucleatum*, *P. intermedia*) nejrozšířenější ve vzorcích RC
- Ve vzorcích RC větší počet předpokládaných metabolických drah (G-bakterie) souvisejících s biosyntézou LPS
 - subklinický prozánětlivý marker



Kandidátní geny

AP a RC



MMP-1
MMP-2
MMP-3
MMP-8
RANK
RANKL



IL-1
IL-6
IL-8
TLR-4
Fc receptor
TBX21
HSPA1L
HSPA6
VDR



IL-6
IL-17A
IL-22
SSP1
NOS
MMP-9
TLR-2
CB2
MYD88

Vývojové OC

PTCH1
PKD1
GLI1
MMP-2

Ameloblastom

MMP-9

Spolupráce

AZV panel 08 Biomedicínské technologie

Animální výzkum

- Animální model
 - SHH signalizace (genové exprese, aktivace a inhibice dráhy)
 - Terapie nanočásticemi



Humánní výzkum

- Genové exprese v tkáni a cystické tekutině

Klinická část

- Selekcce pacientů
- Vyšetření pacientů
- Odběr vzorků
- Vyšetření tkáně na patologii



Humánní výzkum

- Analýza mikrobiomu
- Genetické asociační studie

Projekt

Anotace

- **determinace rizikových faktorů** rozvoje RC, FC a OKC
- **nalezení nových markerů** pro predikci jejich vzniku a pro jejich diferenciální diagnostiku s využitím moderních biomedicínských technologií
- **návrh panelu markerů** pro predikci vzniku OC a jejich diferenciální diagnostiku

Projekt

Cíl - studium etiopatogeneze AP a OC: 1) Humánní výzkum

- (i) sledování **mikrobiomu** kořenového kanálku a tekutiny v RC k determinaci rizikových mikrobiálních profilů a možné spojitosti se vznikem RC u pacientů s AP,
- (ii) v designu case-case studie **zjištění genetické predispozice** ke vzniku RC u pacientů s AP a **multivariační analýza** s mikrobiálním profilem, nebo k zjištění predispozice k vývoji OKC,
- (iii) stanovení a srovnání expresních profilů genů zapojených v imunoregulaci, odontogenezi a kancerogenezi v OC, příp. **selekce markerů** pro agresivní formy OC

Projekt

Design 1) Humánní výzkum

– Kritéria pro zařazení do studie:

- česká/slovenská národnost, věk více než 18 let, podpis informovaného souhlasu

– Kritéria pro vyřazení ze studie:

- Rameno AP/RC: systémová onemocnění (diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, autoimunitní choroby, imunodeficience, nádorové onemocnění), těhotenství a kojící ženy
 - Subprojekt mikrobiom: užívání ATB méně než 2 měsíce před zařazením do studie
- Rameno vývojové OC a ameloblastom + retinovaný zub: nádorové onemocnění, těhotenství, kojící ženy
- Mimo: pacienti s polycystickými chorobami a Gorlin-Goltzovým syndromem

Projekt

Design 1) Humánní výzkum

- (i) **mikrobiom** (bakteriom a mykobiom) – metagenomická analýza, qPCR
 - zubní plak vs. bukální stěr vs. KK: 50 pacientů s AP bez RC vs. 50 pacientů s AP s RC
 - KK vs. CT: 50 pacientů s AP s RC
- (ii) **genetická asociační studie** (case-case studie) – qPCR, SNaPShot, sekvenace
 - 100 pacientů s AP bez RC vs. 100 pacientů s AP s RC
 - 50 pacientů s FC vs. 10 pacientů s OKC vs. 10 pacientů s ameloblastomem,
- (iii) **stanovení a srovnání expresních profilů** – RNAScope
 - 50 pacientů s RC/50 pacientů s FC/10 pacientů s OKC/10 pacientů s ameloblastomem, vs. u pacientů s AP bez RC ve tkáni váčku/ve tkáni z okolí retinovaného zubu u pacientů bez OC

Projekt

Odběry

Pacienti s <u>retinovaným</u> zubem	50	9 ml periferní krev EDTA 4°C	x	x	<ul style="list-style-type: none"> • 1x bakteriální kultura 4% PFA 4°C • 30 mg zkumavka - 80°C 	x
Pacienti s <u>odontogenní</u> keratocystou	10	9 ml periferní krev EDTA 4°C	x	x	<ul style="list-style-type: none"> • 1x nádor 4% PFA 4°C • 30 mg zkumavka - 80°C 	1 ml a více zkumavka - 80°C
Pacienti s <u>ameloblastomem</u>	10	9 ml periferní krev EDTA 4°C	x	x	<ul style="list-style-type: none"> • 1x nádor 4% PFA 4°C • 30 mg zkumavka - 80°C 	x

	Celkový počet	DNA analýza	Mikrobiální analýza (celkem 3 vzorky)	Kultivace kvasinek	Histologická analýza	Odběr cystické tekutiny
Pacienti s apikální periodontitidou - granulomem	100	9 ml periferní krev EDTA 4°C	<ul style="list-style-type: none"> • 1x bakterie z kořene zubu *steril. čep - 20°C *v případě extrakce zubu zkumavka -80°C • 2x bakterie ze zubního plaku kartáček -80°C • 2x bakterie z bukalní sliznice kartáček - 80°C 	1x odběr zubního plaku Amiesova půda -20°C 1x bakterie z bukalní sliznice kartáček -80°	<ul style="list-style-type: none"> • 1x GRAM 0,5-1 cm x 0,5-1 cm 4% PFA 4°C • 30 mg zkumavka - 80°C granulom	x
Pacienti s radikulární cystou	100	9 ml periferní krev EDTA 4°C	<ul style="list-style-type: none"> • 1x bakterie z kořene zubu *steril. čep - 80°C *v případě extrakce zubu zkumavka -80°C • 2x bakterie ze zubního plaku kartáček -80°C • 2x bakterie z bukalní sliznice kartáček - 80°C 	1x odběr zubního plaku Amiesova půda -20°C 1x bakterie z bukalní sliznice kartáček -80°	<ul style="list-style-type: none"> • 1x cystická tekutina 4% PFA 4°C • 30 mg zkumavka - 80°C 	1 ml a více zkumavka - 80°C
Pacienti s folikulární cystou	50	9 ml periferní krev EDTA 4°C	x	x	<ul style="list-style-type: none"> • 1x cystická tekutina 4% PFA 4°C • 30 mg zkumavka - 80°C 	1 ml a více zkumavka - 80°C

Projekt

Pilotní data

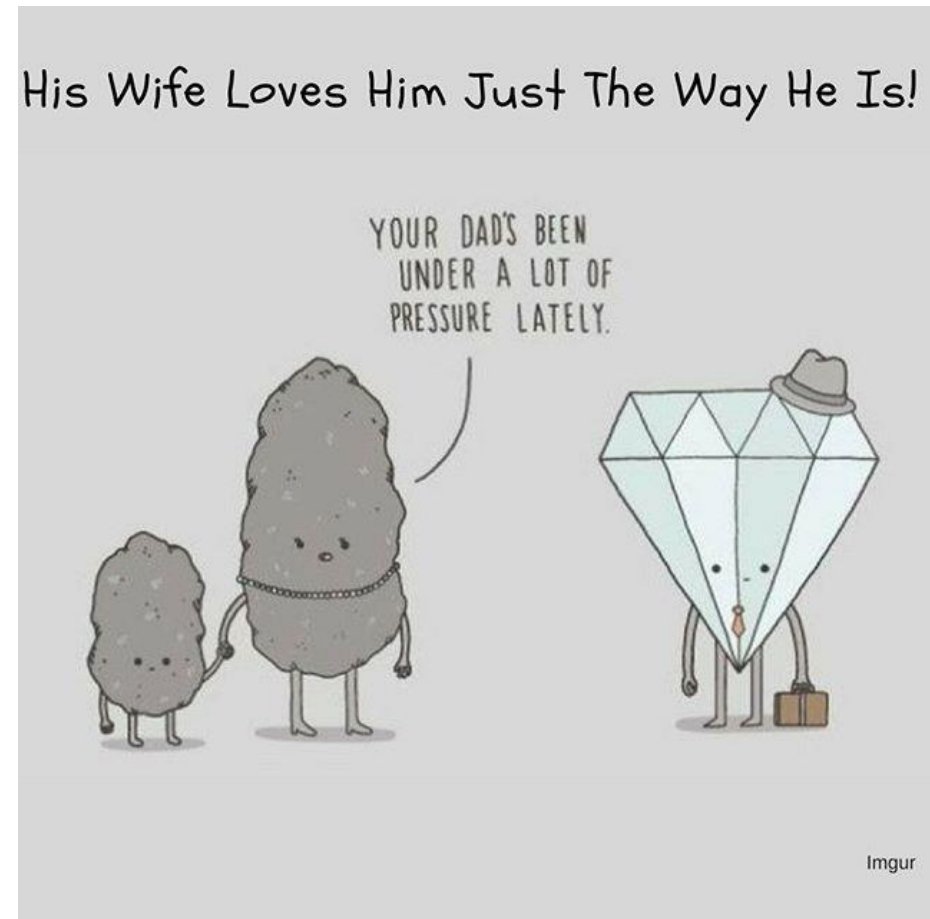
Cíl - studium etiopatogeneze AP a OC: 2) Animální výzkum

- (i) vyvinutí animálního (myšího) modelu pro studium OC,
- (ii) analýza **příčin vzniku OC** se zaměřením na poruchy funkce primárních cilií,
- (iii) odhalení změn signalizace podílející se na patogenezi OC se zaměřením na dráhu Sonic hedgehog (SHH),
- (iv) **testování vlivu cílených změn SHH signalizace** na formování OC u našich modelových zvířat,
- (v) aplikace **nanodiamantů** do modelových zvířat a determinace jejich vlivu na iniciaci a progresi OC s cílem nalézt nové **potenciální možnosti léčby** tohoto onemocnění.

Projekt

Shrnutí

- **Novost** projektu spočívá
 - v jeho **komplexnosti** a sledování interakcí mezi hostitelským **mikrobiomem a genetickou predispozicí**
 - v determinaci efektu **nanodiamantů** na vznik a rozvoj OCs v animálním modelu – nové **terapeutické možnosti**



Lipoxiny a resolviny v léčbě parodontitidy Využití nanovláken k aplikaci bioaktivních látek pomocí zubní nitě

MDDr. Filip Hromčík

doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

Představení výzkumníka

Stomatologická klinika FNUSA, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, externisté

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
U SV. ANNY
V BRNĚ



Lydie Izakovičová Hollá
Filip Hromčík
Jak Vokurka



Martin Faldyna
Eduard Göpfert
Monika Vicenová

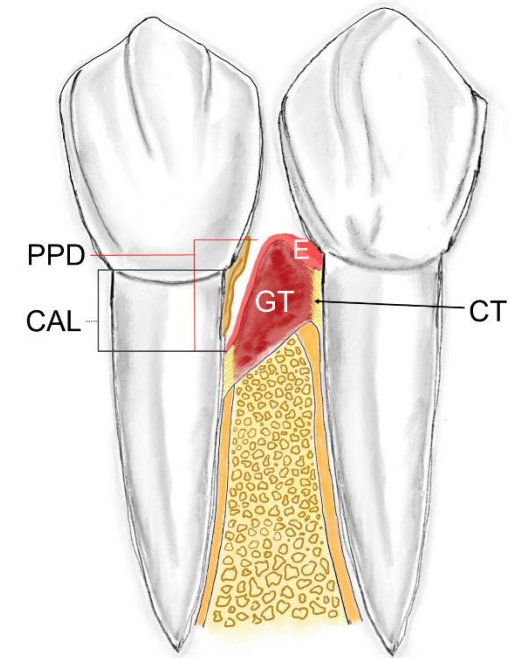


I. ústav patologie FN USA
Klinika dětské onkologie FN Brno

Markéta Hermanová
Michal Kýr

Lipoxiny a resolviny v léčbě parodontitidy

Granulační tkáň (GT) není špatná
nedostatečná „resolution phase“
nedostatek lipoxinů a resolvinů



Grafika: [Hromčík 2020](#)

Lipoxiny a resolviny v léčbě parodontitidy

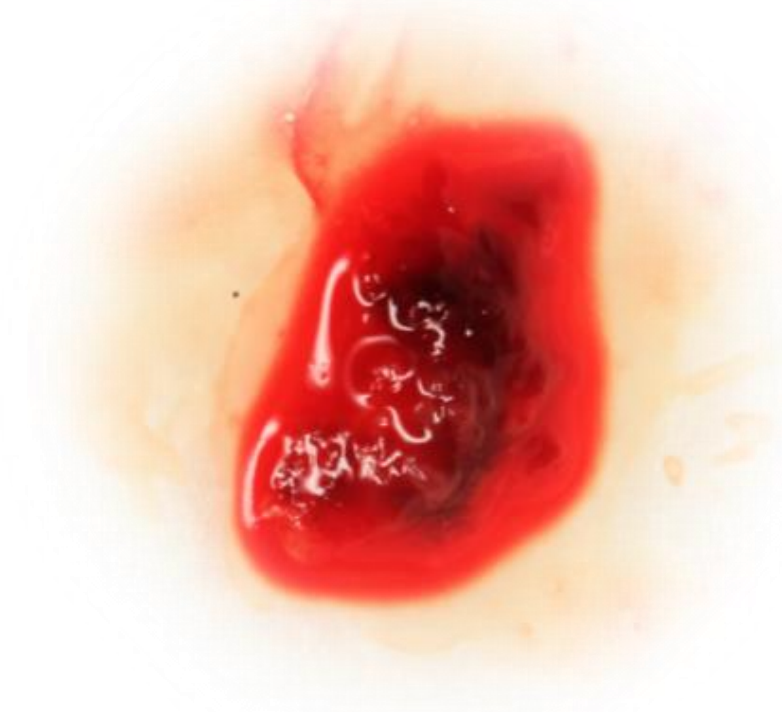
ASA + omega-3 mastné kyseliny + GT



+

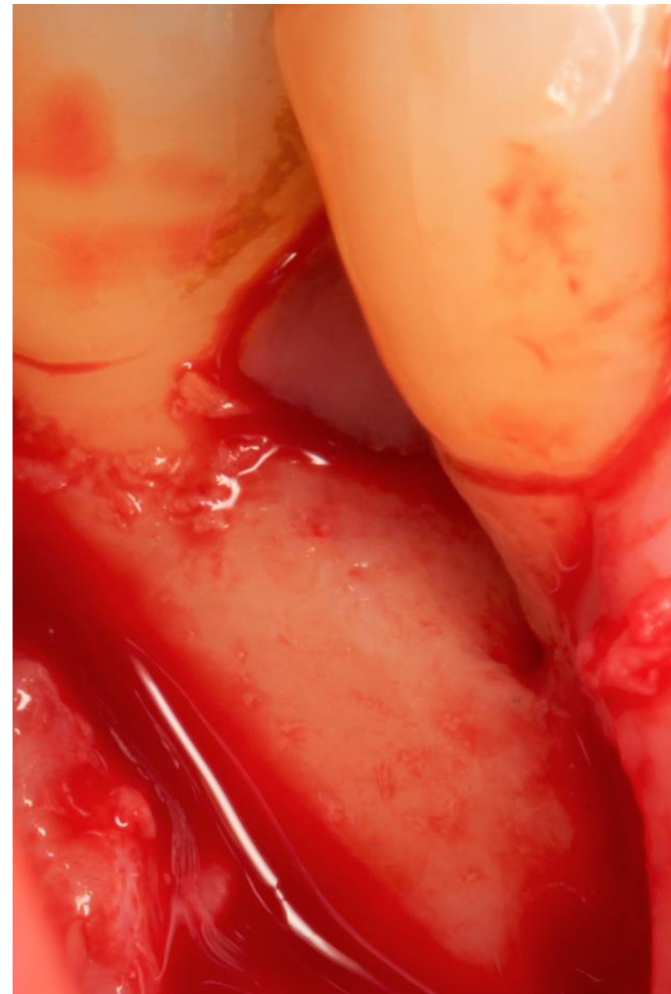


+

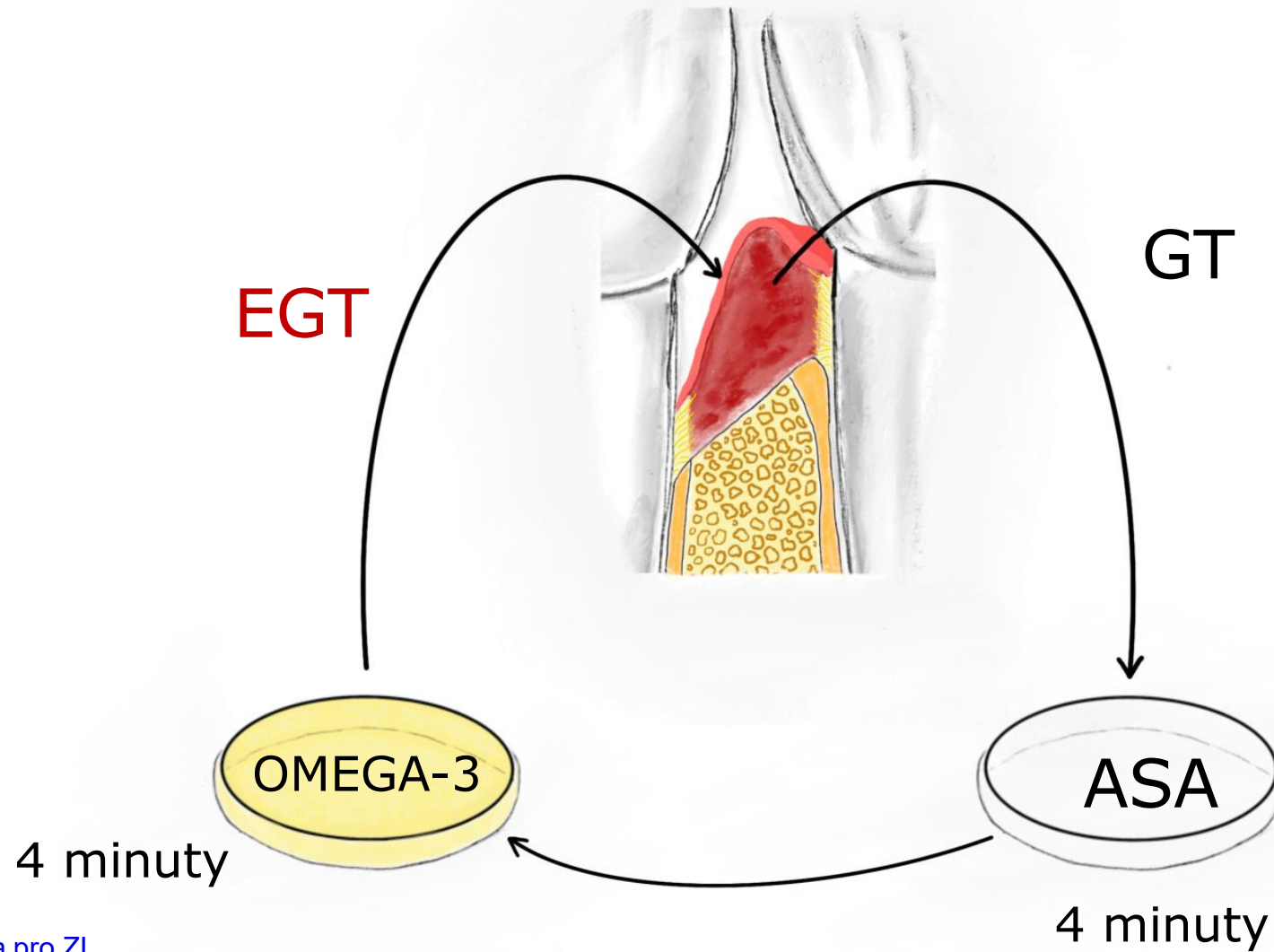


indukce endogenní syntézy lipoxinů a resolvinů

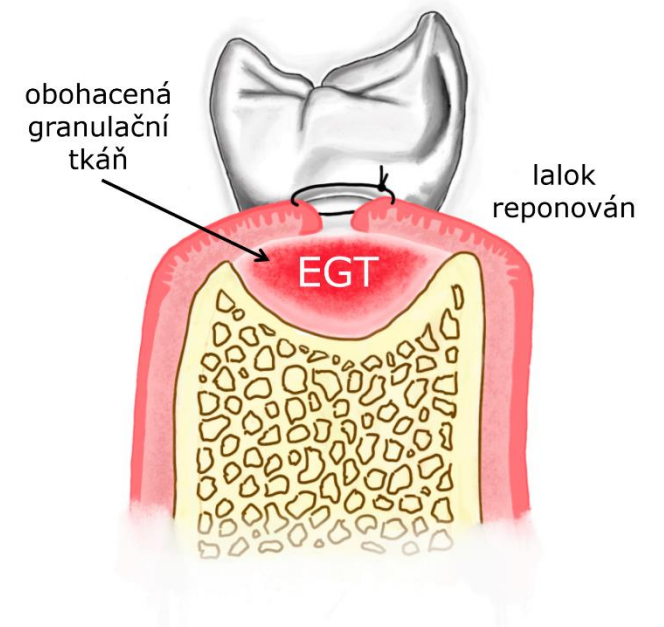
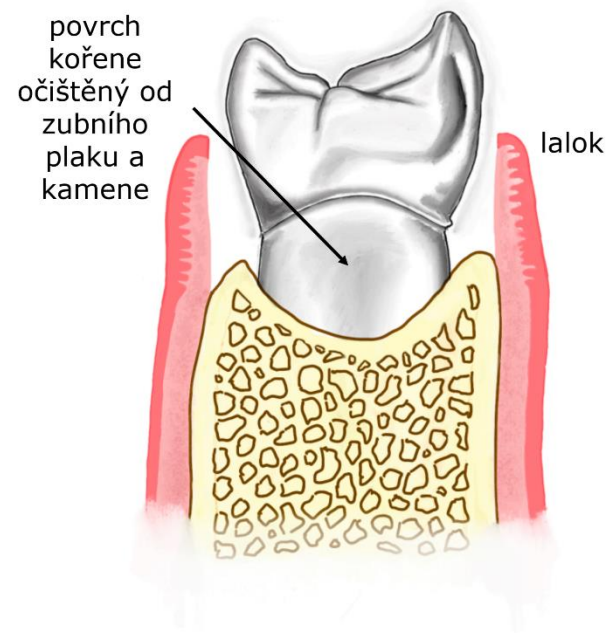
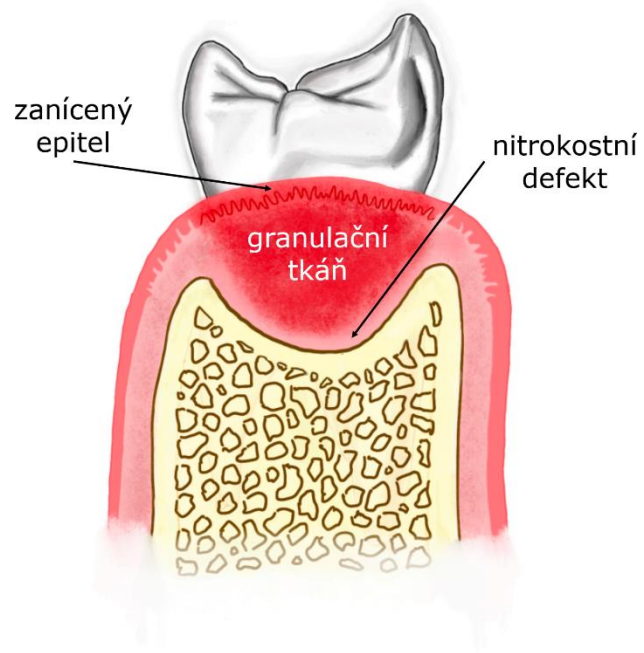
Léčba vertikálních parodontálních defektů



Enhanced granulation tissue = EGT



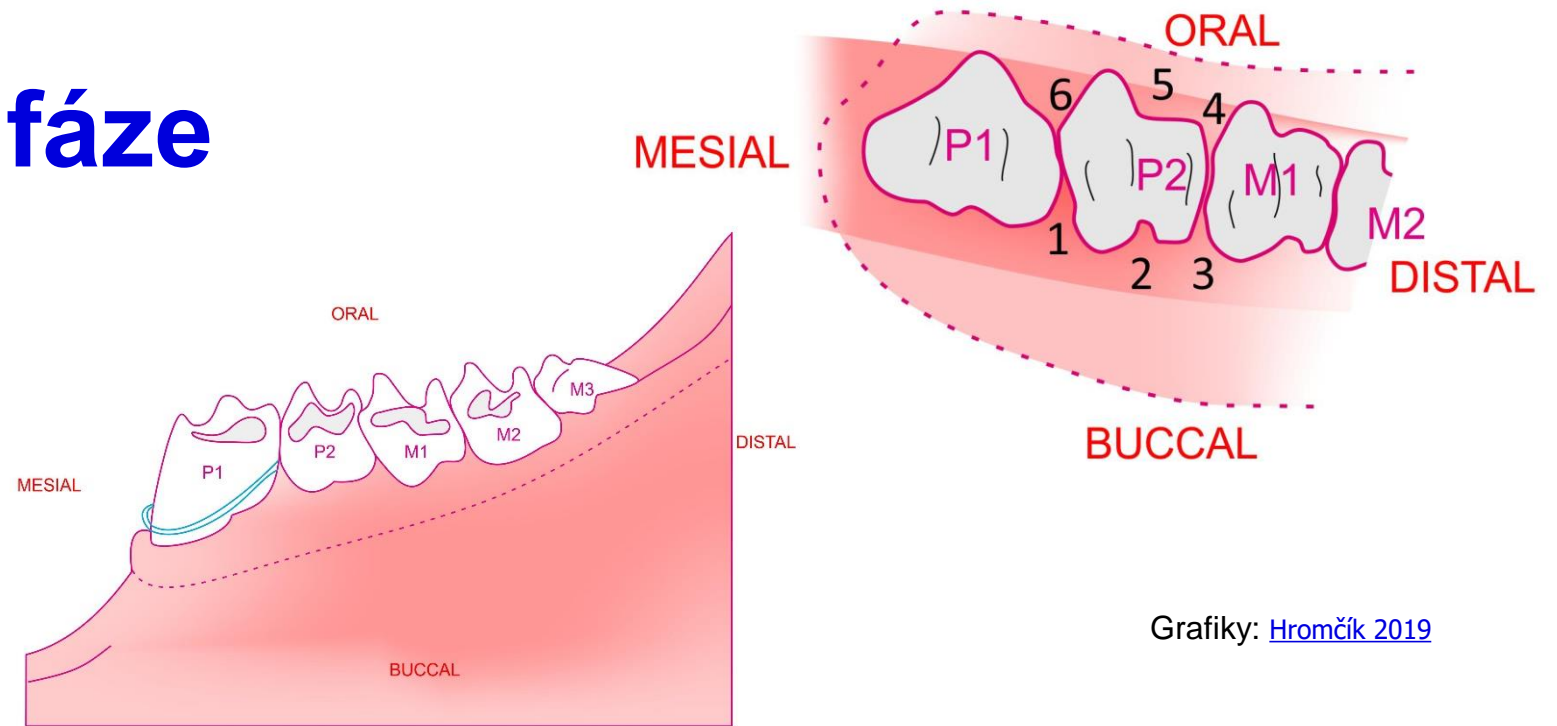
EGT



Grafika: [Hromčík 2020](#)

Experimentální fáze

- 48 králíků
- ligature-induced periodontitis



Grafiky: [Hromčík 2019](#)

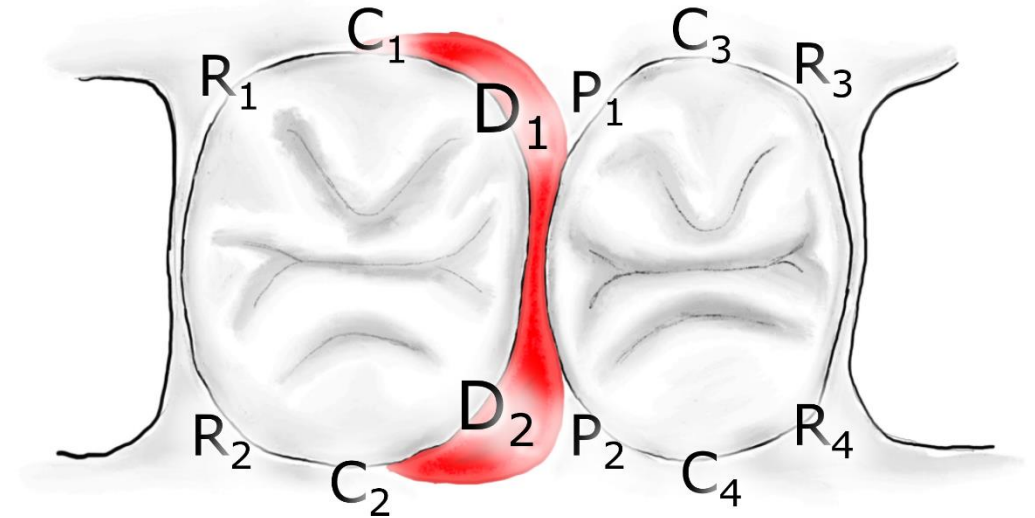
Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2019; 163:XX.

Granulation tissue enriched by aspirin and omega-3 fatty acids in healing experimental periodontal lesion

Filip Hromcik^{a,b}, Jan Vokurka^{a,b,†}, Eduard Gopfert^c, Martin Faldyna^c, Marketa Hermanova^{b,d,#}, Michal Kyr^{b,e,#},
Monika Vicenova^{c,#}, Lydie Izakovicova Holla^{a,b}

Klinická fáze

- 19 pacientů, 38 ošetřených defektů
- primární parametry: sondáž (PPD), úroveň attachmentu (CAL)
- výsledek: o 1 mm větší zisk CAL ve skupině EGT ($p < 0,05$)
- submitted



Grafika: [Hromčík 2020](#), RTG: Hromčík 2019

Využití nanovláken k aplikaci bioaktivních látek pomocí zubní nitě

Wikinomist, s. r. o., Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Technická univerzita v Liberci, Univerzita obrany



František Janda

Pavel Nešetřil

Magdaléna Chupíková



Petra Bořilová Linhartová
Zdeněk Daněk
Filip Hromčík
Jan Křivánek

Jiří Kučera
Filip Růžička
Lydie Izakovičová Hollá



TECHNICKÁ
UNIVERZITA
V LIBERCI
www.tul.cz

Eva Kuželová-Košťáková
David Lukáš
Petr Mikeš

Věra Jenčová
Jan Valtera



Zdeněk Pokorný

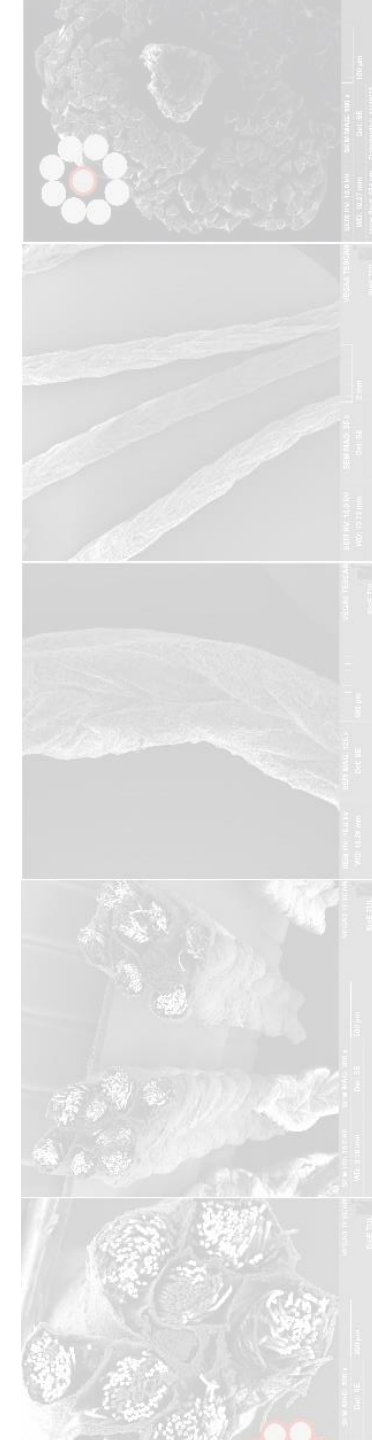
Zdeněk Joska

David Dobrocký

TAČR TREND

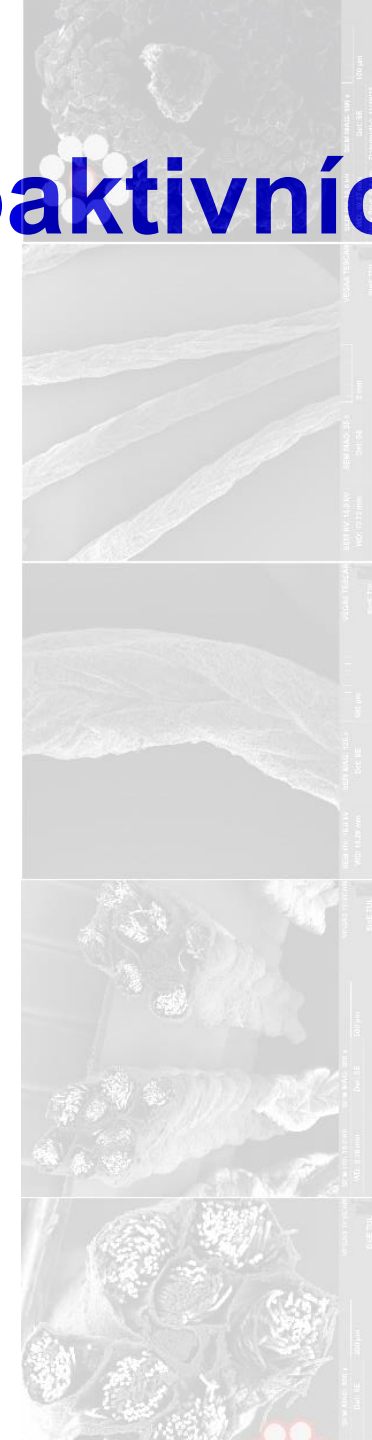
Cíle

- technologie a materiál pro výrobu niti s nanovláknennou vrstvou
- antimikrobiální vlastnosti bioaktivních látek a probiotik
- obohacení nanomateriálu bioaktivními látkami
- simulace in vivo podmínek
- klinické testování
- prototyp a jeho výroba
- změny na sklovině a dentinu po použití niti



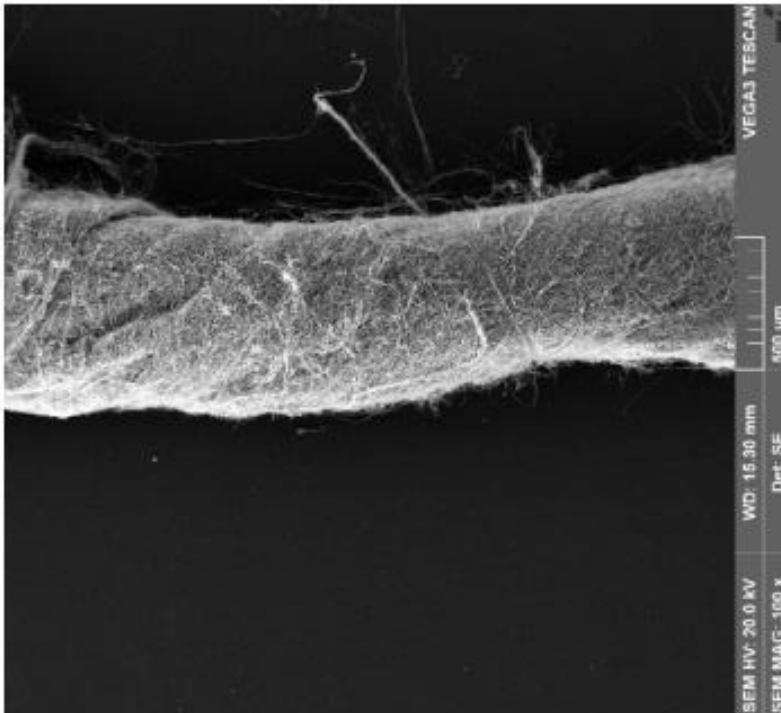
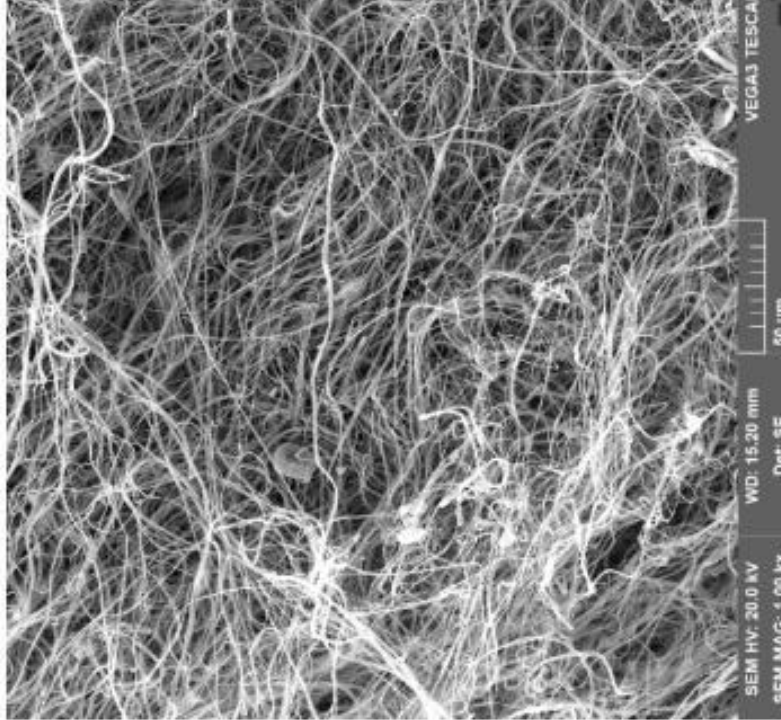
Využití nanovláken k aplikaci bioaktivních látek pomocí zubní nitě

- projekt na 4 roky
- kandidátní látky – tělu vlastní bioaktivní molekuly:
 - sekreční imunoglobulin A, laktoferin, osteopontin
- probiotika:
 - *Lactobacillus reuteri*
 - *Streptococcus salivarius*
 - *S. dentisani...*



Výstupy

- prototyp?
- patent?
- uplatnění na trhu, prodej



snímek: Technická univerzita Liberec

Použité zkratky

- FN USA – Fakultní nemocnice u svaté Anny
- FN Brno – Fakultní nemocnice Brno
- GT – granulační tkáň
- ASA – acetylsalicylová kyselina
- EGT – enhanced granulation tissue
- RTG – rentgenový snímek
- PPD – pocket probing depth
- CAL – clinical attachment level
- TAČR – Technologická agentura České republiky

Obstrukční spánková apnoe (nejen) u dětí z pohledu zubního lékaře & ortodontisty

MDDr. Zuzana Vranková

doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

Stomatologická klinika, Fakultní nemocnice u svaté Anny

Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

Představení doktoranda


MDDr. Zuzana Vranková

- od 2/2019 - Předatestační příprava v oboru Ortodoncie, FN USA, Brno
- od 9/2019 - Doktorské studium, LF MU
- Výzkumné zaměření: **Vrozené predispozice k ortodontickým anomáliím, jejich komplikace a léčba**

???

Co mají **OSA** a **VĚDA** společné se   ?

... **mnohem víc**, než se Vám na první pohled může zdát ... 

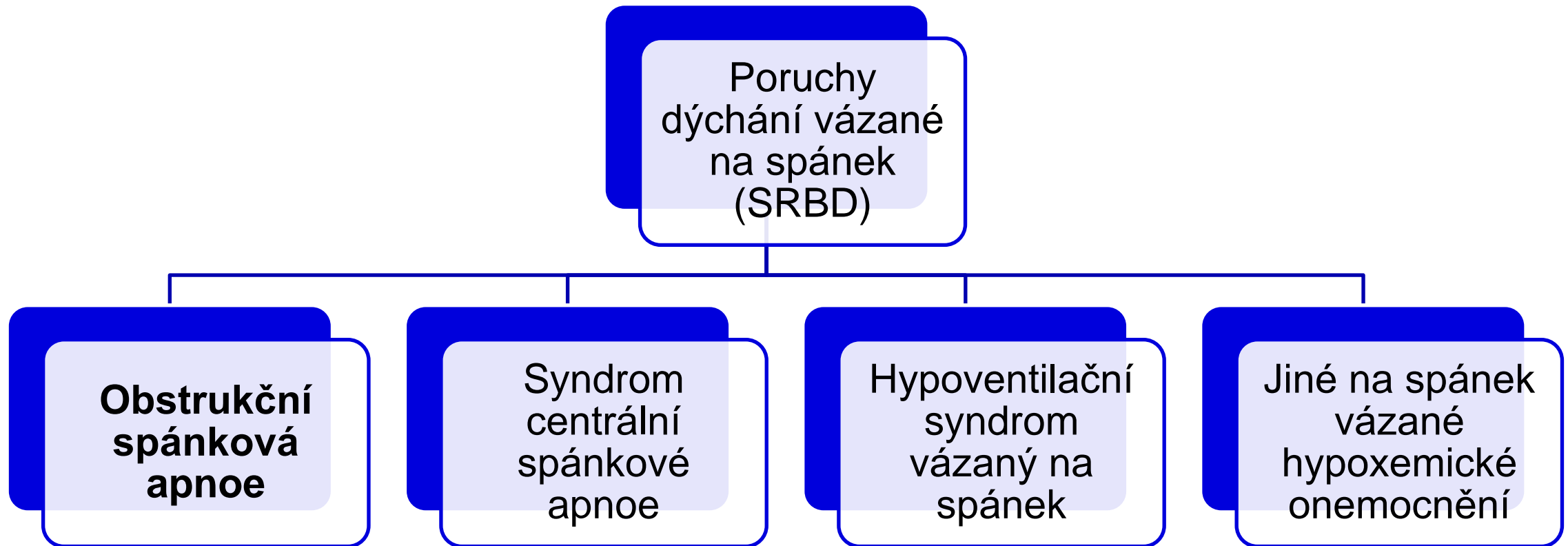
... a proto by vám „první pohled“, neměl vždycky stačit ... 

Obstrukční spánková apnoe v ordinaci zubního lékaře

Obsah přednášky

1. Co je to obstrukční spánková apnoe (OSA) a proč je důležité to vědět
2. Mechanismus vzniku OSA a rizikové faktory
3. OSA v dospělém a dětském věku
4. Příznaky OSA
5. Diagnostika a screening
6. Interdisciplinární spolupráce a zapojení zubních lékařů
7. OSA z pohledu ortodontisty

Co je to obstrukční spánková apnoe?



OSA může být skutečně život ohrožující!



OSA

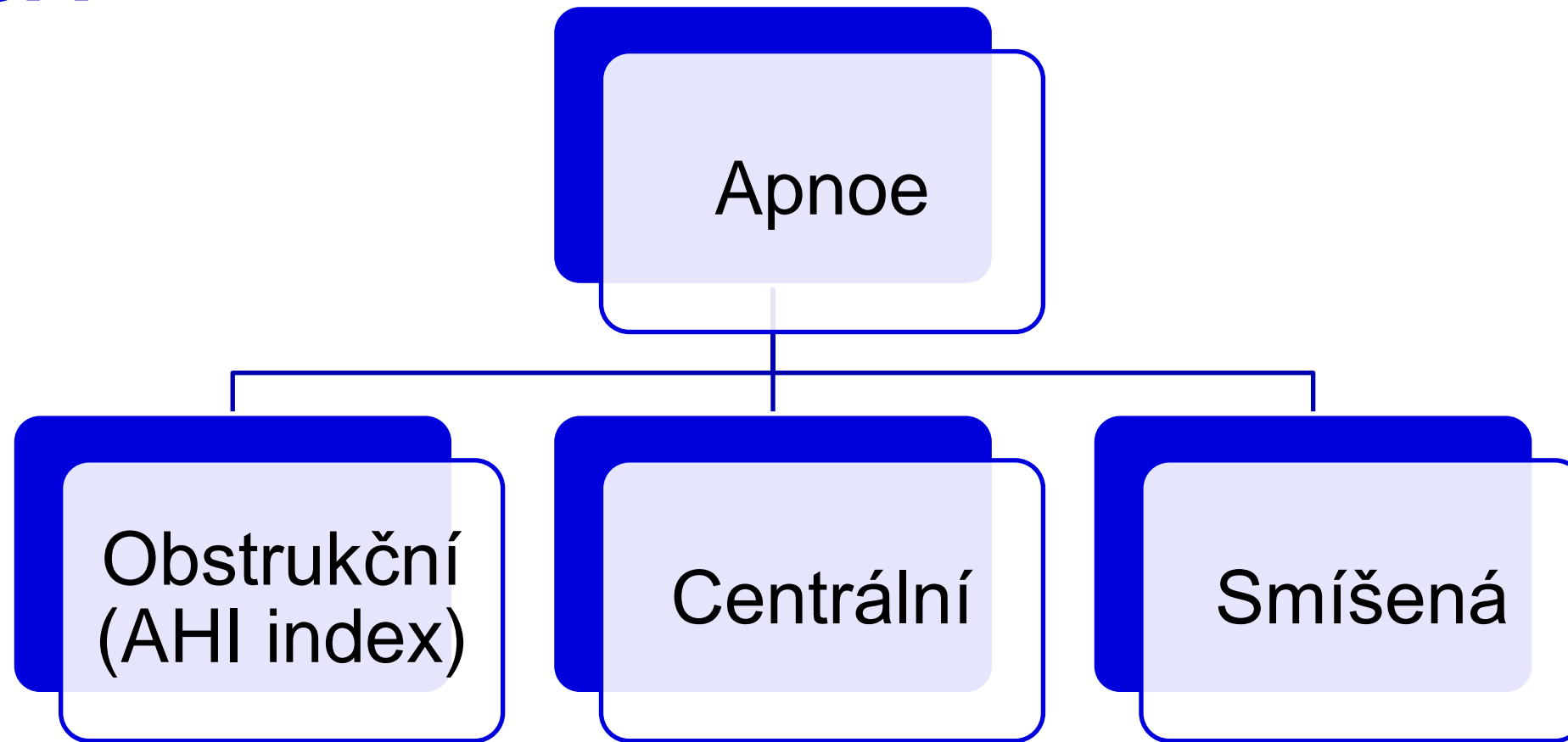
— Co je to apnoe?

Absence toku vzduchu po dobu nejméně 10 sekund nebo 2 dechové cykly

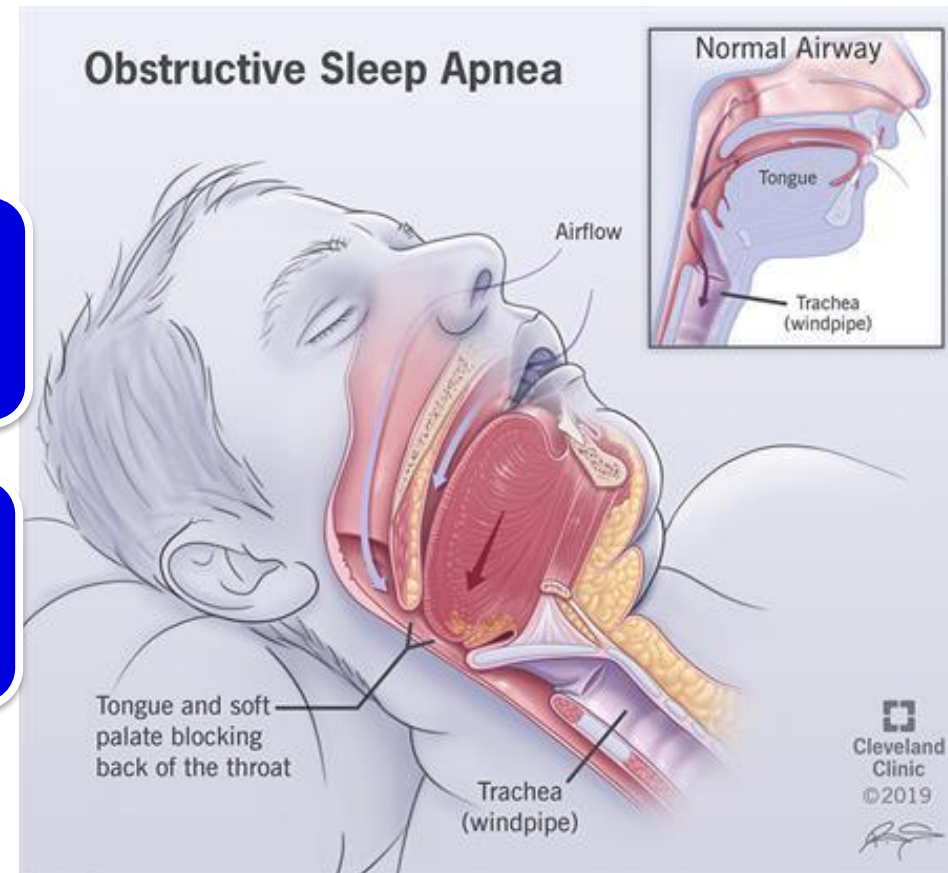
— Co je to hypopnoe?

Redukce toku vzduchu - na úrovni nosu, úst a zejména faryngu. Je často definována i jako pokles proudění vzduchu o alespoň 30% nebo ve spojení se snížením saturace hemoglobinu o nejméně 3%.

OSA



OSA



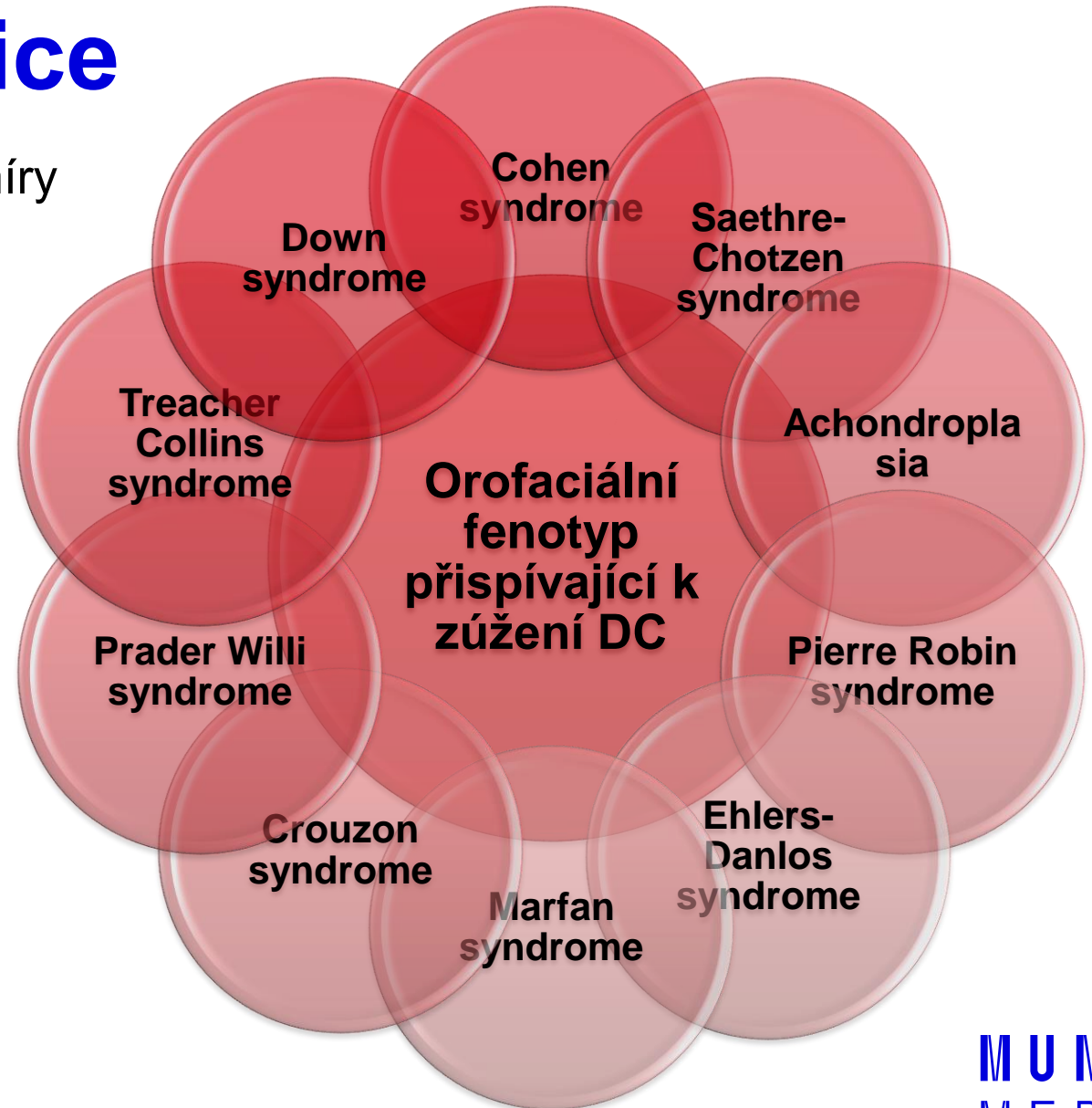
<https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/8718-sleep-apnea>

Rizikové faktory zapojené v etiopatogenezi OSA

- Nadváha / obezita / distribuce tuku
- Neuromuskulární faktory – abnormálně snížený tonus svalů během spánku
- Adenoidní vegetace
- Kraniofaciální malformace přispívající k zúžení HDC
- Genetické predispozice

Genetická predispozice

- Genetické pozadí jedince hraje do určité míry roli ve všech zmíněných faktorech
- Důležitost genetiky potvrzuje i familiární výskyt OSA (sledován už od roku 1978)
- Dědičnost se projevuje taky v kraniofaciálních znacích – nejvýrazněji ve velikosti, poloze a růstu čelistí
- Výrazná prevalence OSA u syndromových pacientů naznačuje možnost propojení genetického podkladu obou onemocnění



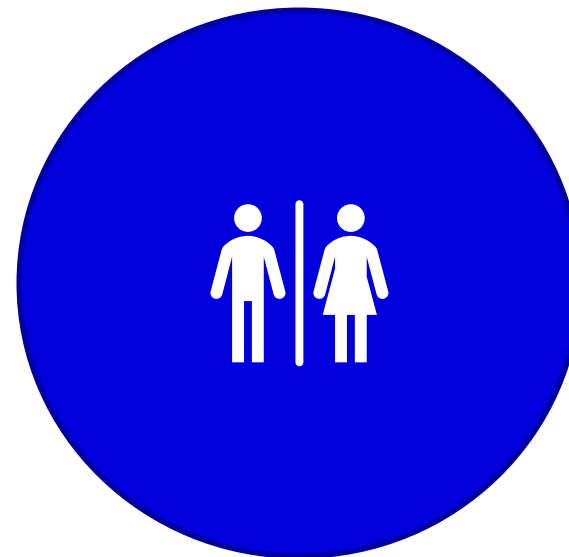
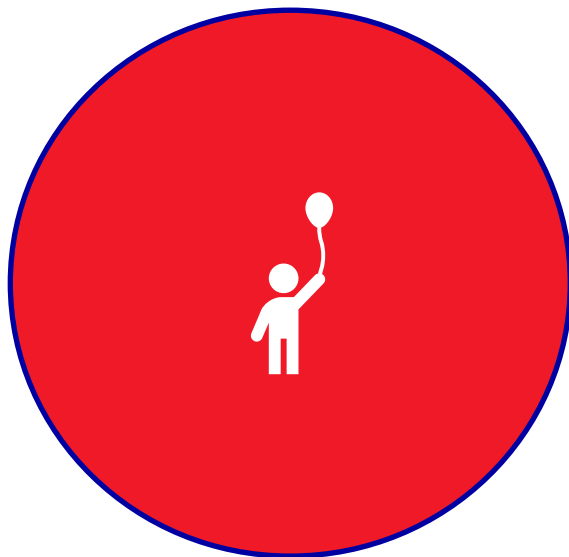
Diagnostika OSA

- Spánkové dotazníky (Epworthova spánková škála, Berlínský dotazník, STOP- BANG dotazník...)
- Polysomnografie a polygrafie (spánková laboratoř)
- Domácí monitorovací spánkové přístroje
- Noční pulzní oxymetrie
- Audio a videonahrávky
- ORL vyšetření
- Ortodontické vyšetření

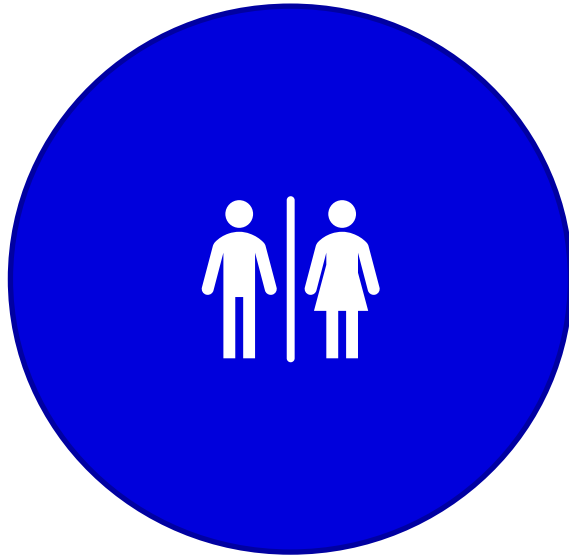
Dětský spánkový OSA dotazník

- K primárnímu záchytu a odhalení poruchy spánku slouží několik způsobů - oblíbené jsou dotazníky, jako napr.: *The Sleep-Related Breathing Scale of the Pediatric Sleep Questionnaire*, *18-item Obstructive Sleep apnea QoL* ...
- V České republice mezi nejčastěji používaný patří *Epworth Sleepiness Scale* (Epworthova spánková stupnice), existující v zahraničí i v **modifikované verzi pro děti**
- V **České republice neexistuje** dotazník použitelný **pro screening OSA v dětské populaci**
- Ve spolupráci s dětským ORL a neurologem a na základě fúze stávajících cizojazyčných dotazníků jsme vytvořili a aktuálně se pracuje na validaci **Dětského OSA dotazníku**

Obstrukční spánková apnoe



OSA v dospělém věku



Definice OSA

- **AHI** (apnea hypopnea index) – počet apnoických pauz a hypopnoe za hodinu času
- U dospělých platí :
- **AHI = 0–5** norma

AHI = 5–15 lehčí forma OSA

AHI = 15–30 středně závažná OSA

AHI > 30 závažná OSA

} patologie

Příznaky OSA u dospělých pacientů



- Únava – hlavně při monotónních činnostech
- Mikrospánek
- Bolesti hlavy
- Sexuální dysfunkce

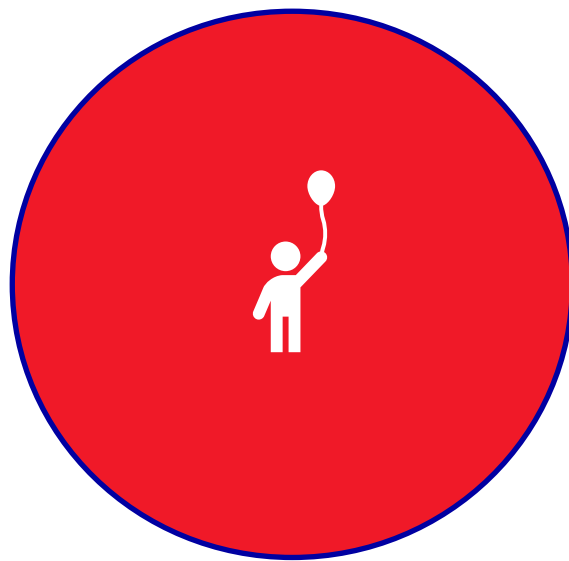


- Chrápaní
- Lapání po dechu
- Zvuky dušení se
- Neosvěžující spánek
- Zhoršení po požití alkoholu, myorelaxans, sedativ

OSA



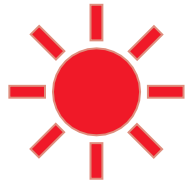
OSA v dětském věku



Definice OSA

- V roce 1976 prof. Guilleminault diagnostikoval u 8 dětí obstrukční spánkovou apnoe – **specifické projevy a rizika**
- Přerušení dýchání ve spánku po dobu 2 respiračních cyklů, doprovázené poklesem saturace a/nebo probouzející reakcí
- **AHI - statisticky abnormální je již nález AHI = 1**
- **AHI = 1- 4 – lehčí forma OSA**
AHI = 5 -10 – středně závažná OSA
AHI > 10 – závažná OSA

Příznaky OSA u dětí



- sucho v ústech, suché rty
- obtížné probouzení se
- dítě se budí neodpočaté, unavené
- rané bolesti hlavy
- denní nepozornost a hyperaktivita



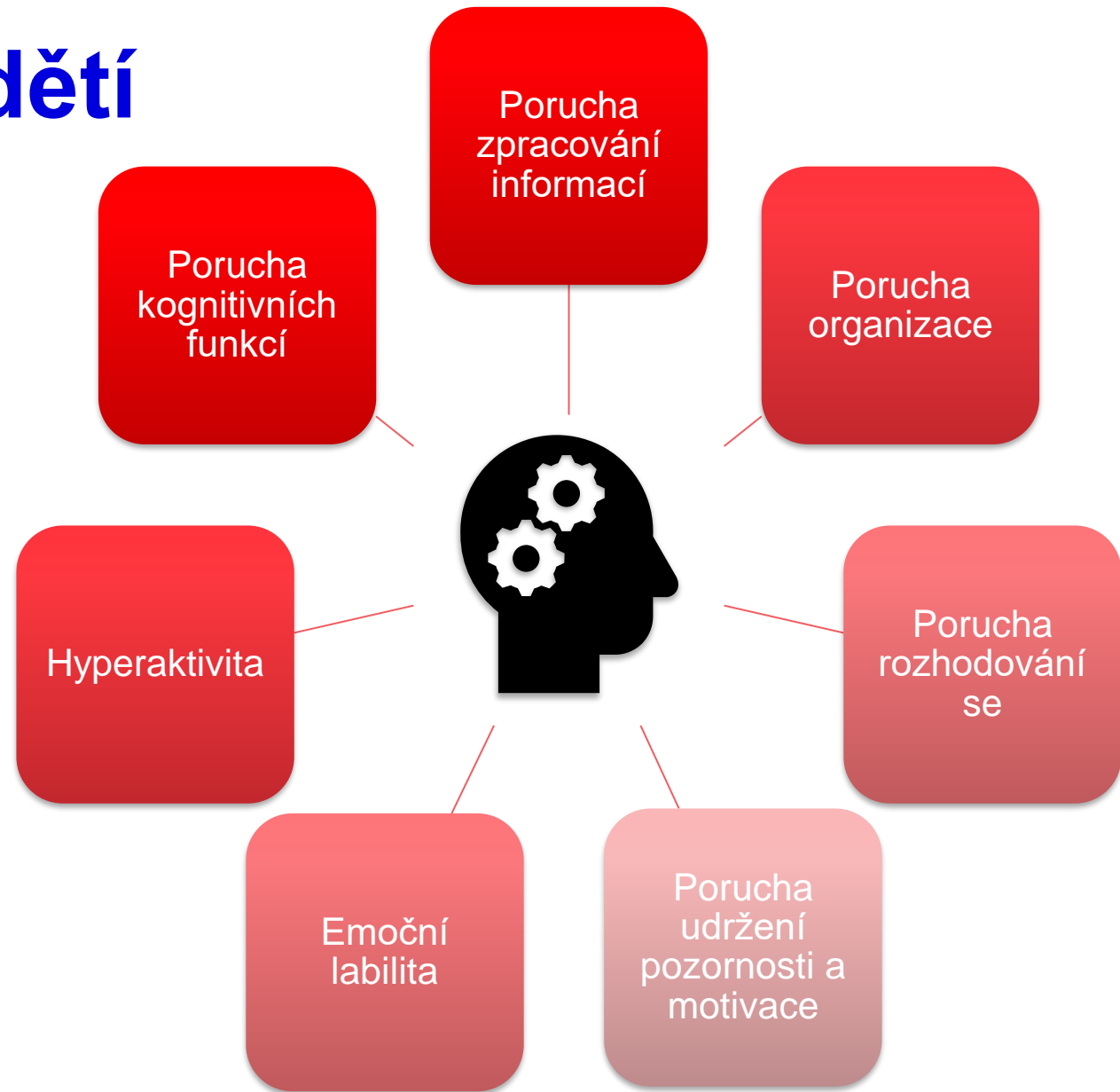
- chrápaní
- apnoické pauzy
- abnormální spánková poloha
- nadměrné pocení se
- neklidný spánek
- noční pomočování se
- NREM parasomnie

Příznaky OSA u dětí

Fragmentace spánku & hypoxie má vliv na:

- prefrontální kortex
- kognitivní exekutivní funkce
- poruchu zpracování informací

[Beebe et al., 2002](#)



... další možné následky OSA u dětí

- Neprospívání a zpomalení růstu
- Systémový zánět – zvýšení prozánětlivých cytokinů (OSA je určitou formou zánětu)
- Dysfunkce autonomního systému – aktivace sympatiku
- Zvýšení krevního tlaku oproti normě
- Remodelace srdečních oddílů
- Endoteliální dysfunkce, zvýšení cévní rezistence
- Metabolický syndrom – zvýšení hladin insulinu

Prevalence pediatrické OSA

- Výrazný nesoulad v rámci jednotlivých studiích: **0,1 – 13% (nejčastěji kolem 2-4%)**
- Shoda ve **výrazné poddiagnostikovanosti**
- **Děti trpící obezitou a nebo/ kraniofaciálními malformacemi – výrazně vyšší riziko výskytu OSA a to až do 68%**

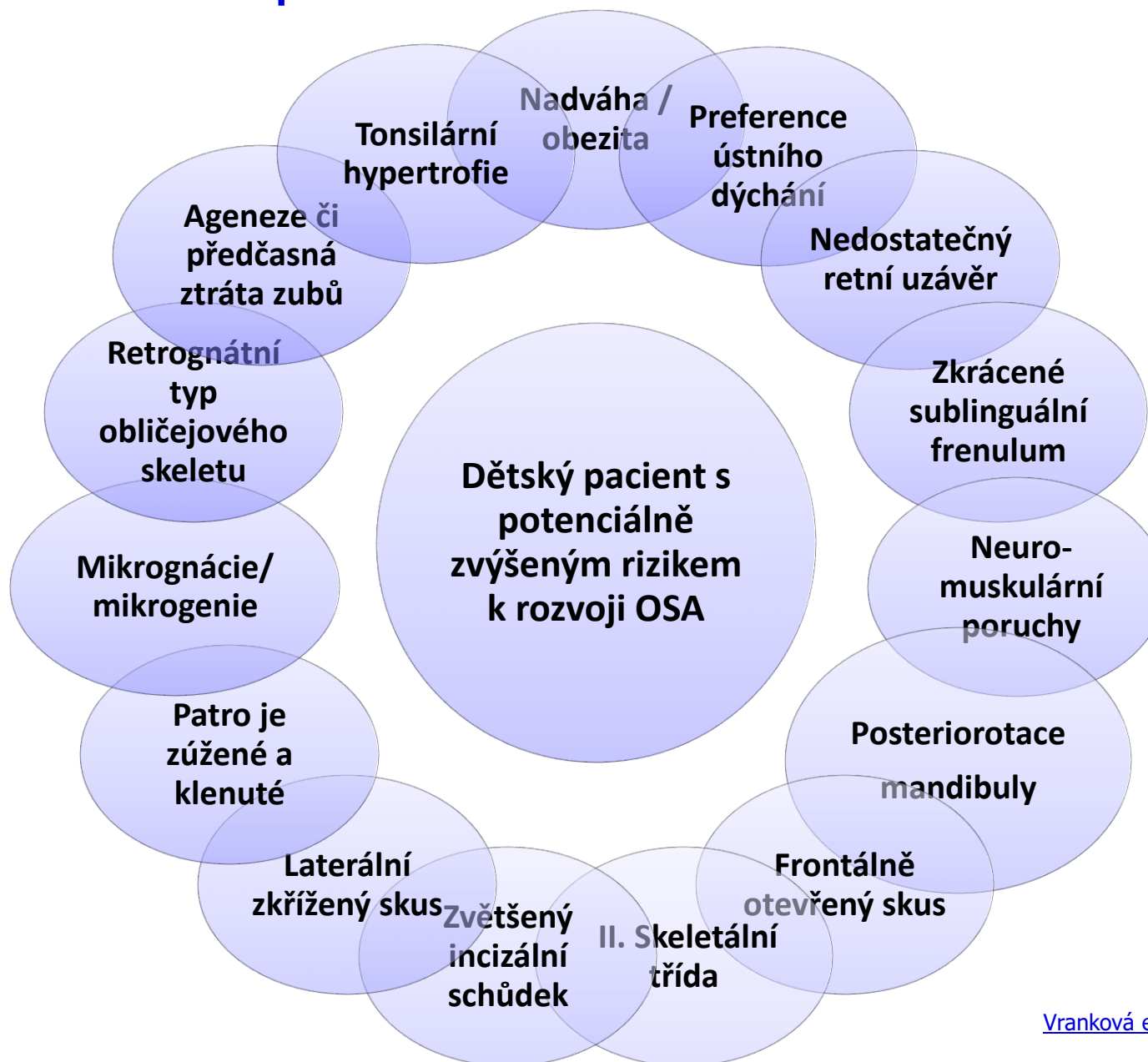
[Caron et al., 2015](#)

[Verhulst et al., 2008](#)

Na co u vstupního vyšetření nezapomenout

- Mezi rizikové faktory OSA u dětí, k jejichž diagnostice mohou přispět **zubní lékaři**, se řadí **krátká sublinguální uzdička, ústní dýchání, ageneze** či předčasná ztráta zubů a zejména **rizikové kraniofaciální malformace**
- Jelikož jsou ortodontisti specialisty, kteří se zabývají právě problematikou orofaciální oblasti i anomáliemi obličejového skeletu u rostoucích dětských pacientů, mohou zásadním způsobem přispět jak k **včasné diagnostice**, tak i k **neinvazivní léčbě** pacientů s dětskou OSA

Znaky orofaciální oblasti rizikové pro vznik OSA u dětí



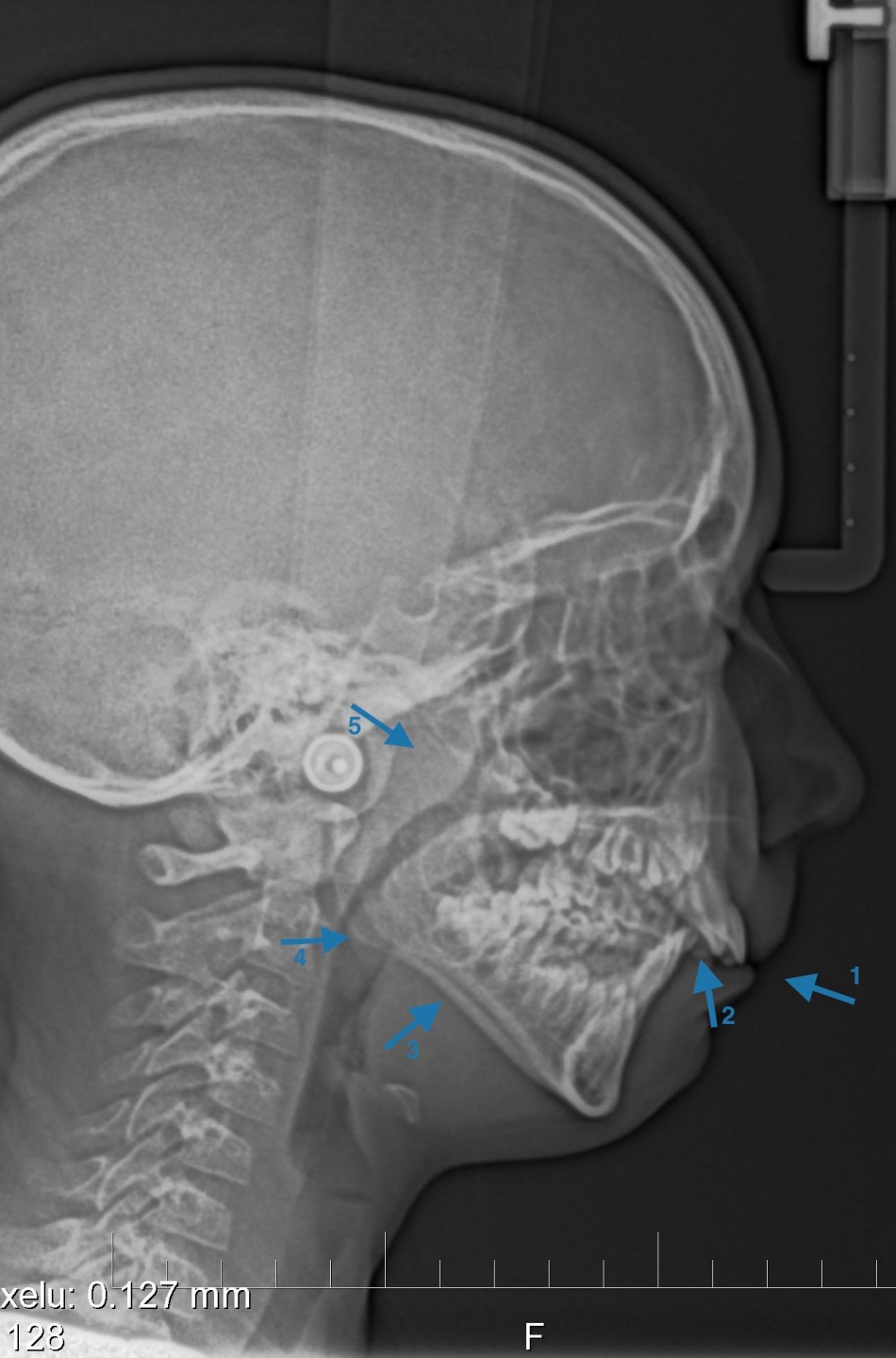
Zobrazovací metody používané v zubní ordinaci

- **RTG** – v rámci vstupního **ortodontického vyšetření** se standardně zhotovuje kefalometrický snímek, **telerentgen**, zobrazující v boční projekci lebku pacienta – snímek je limitován 2D rozměrem, ale při komplexním popise snímku je možné pozorovat **vliv skeletálního podkladu** ortodontické anomálie a **polohy čelistí na HDC**
- **CBCT** – Cone Beam výpočetní tomografie (CBCT, cone beam computer tomography) – možnost **3D zobrazení**, segmentování a analýza jednotlivých úseků HDC

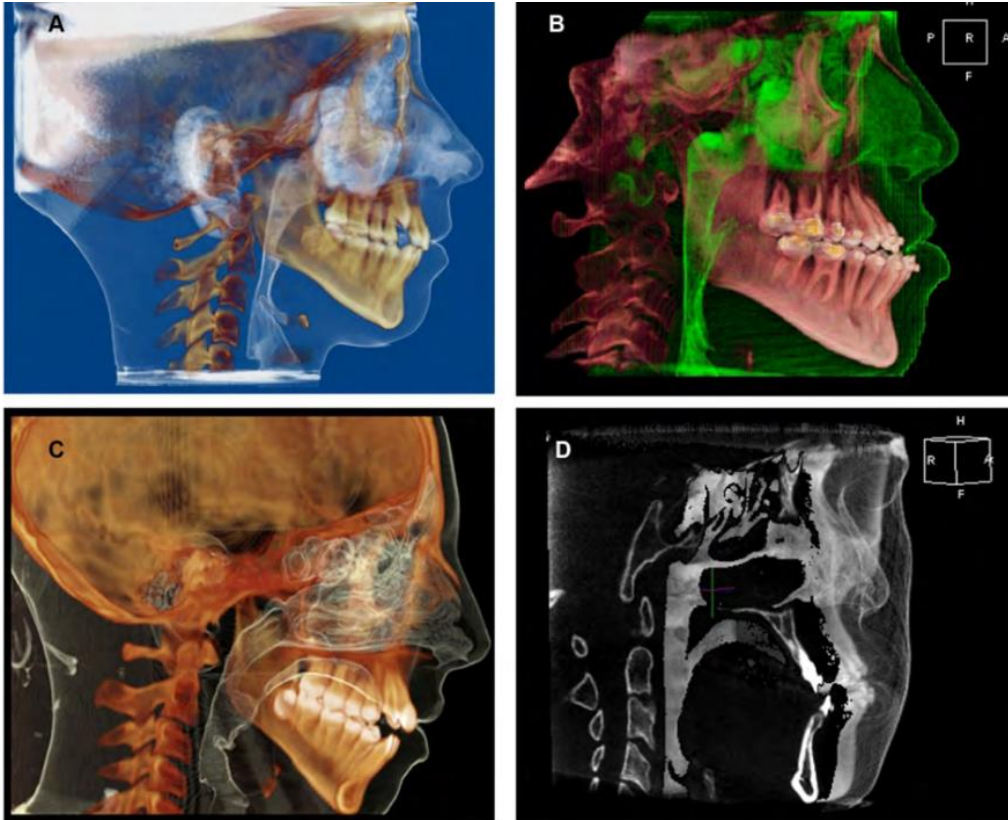
Kefalometrický snímek

Laterální kefalogram – šipky upozorňují na rizikové znaky:

- nedostatečný retní uzávěr (1)
- zvětšený incizální schůdek (2)
- posteriorotace mandibuly (3)
- tonsila lingvalis (4)
- hypertrofie nosní mandle (5)

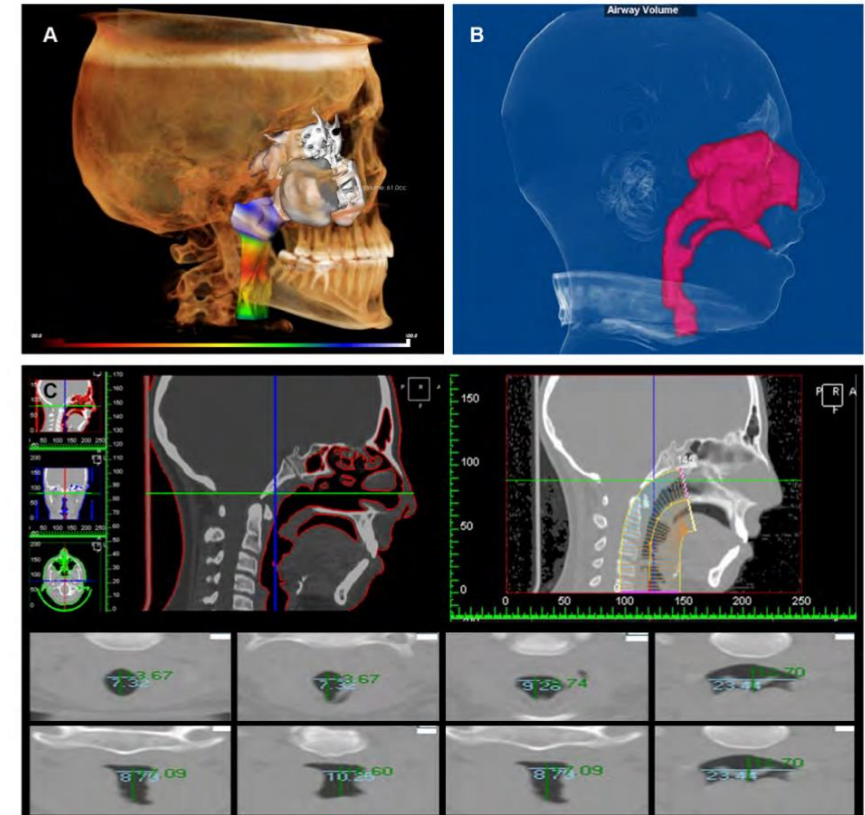


CBCT – zobrazení a analýza HDC



Při 3D analýze dýchacích cest získáváme informace o délce DC, jejich celkových a segmentálních objemech i MCSA

[Ghoneima et al., 2012](#)



Objem – zobrazující **CBCT snímky sloužící na analýzu DC** – na analýzu a měření objemů DC slouží několik různých softwarů (Dolphin, 3dMD, InVivoDental..)

CBCT – zobrazení a analýza HDC

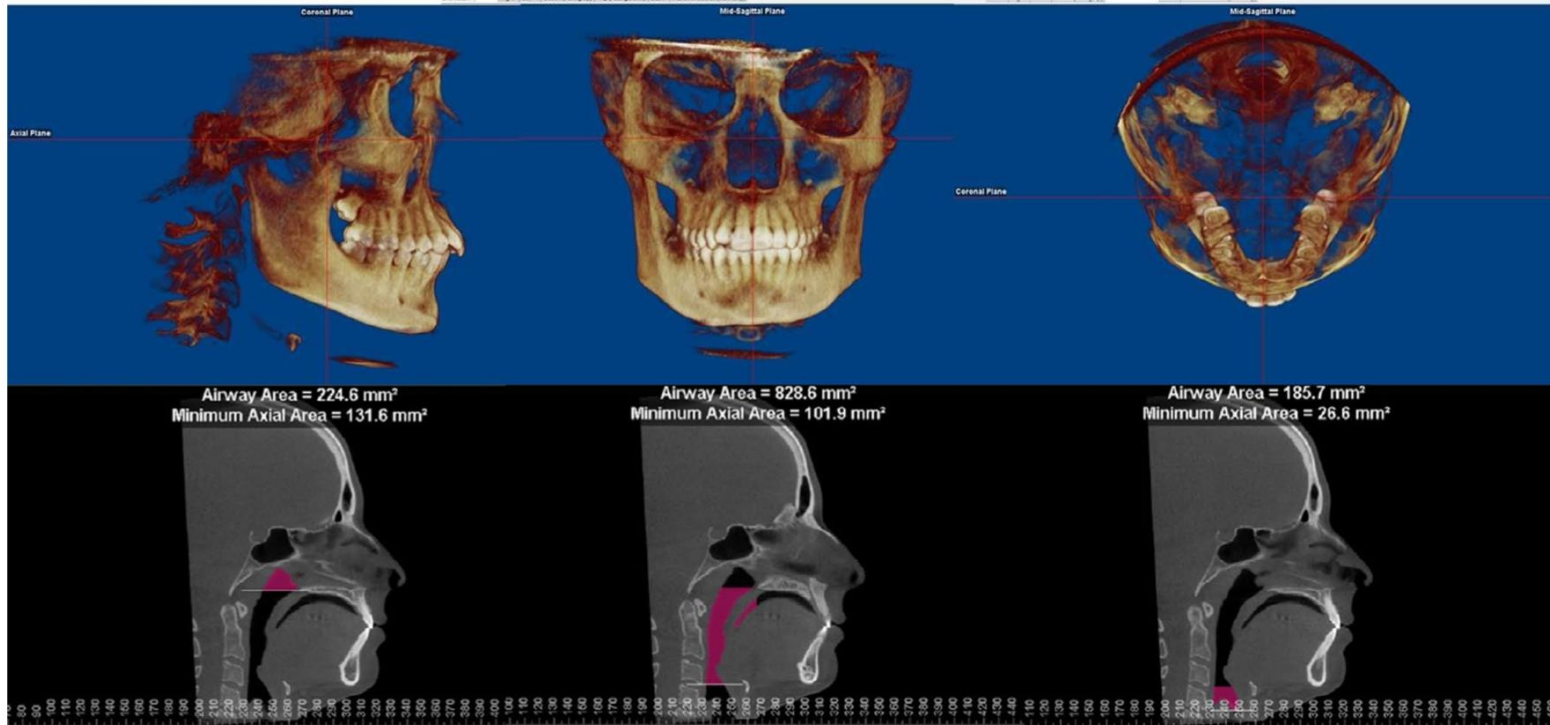


FIGURE 1 Skull orientation in the sagittal, frontal and transverse views, and airway subregions: nasopharynx, oropharynx and hypopharynx. Images rendered using Dolphin (dolphinimaging.com)

[Masoud et al., 2020](#)

Rekonstrukce jednotlivých analyzovaných úseků DC

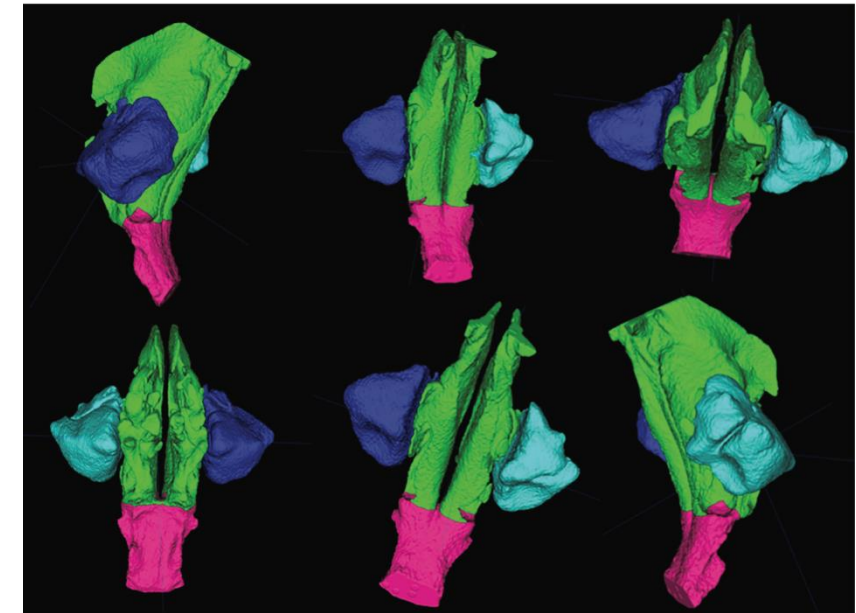
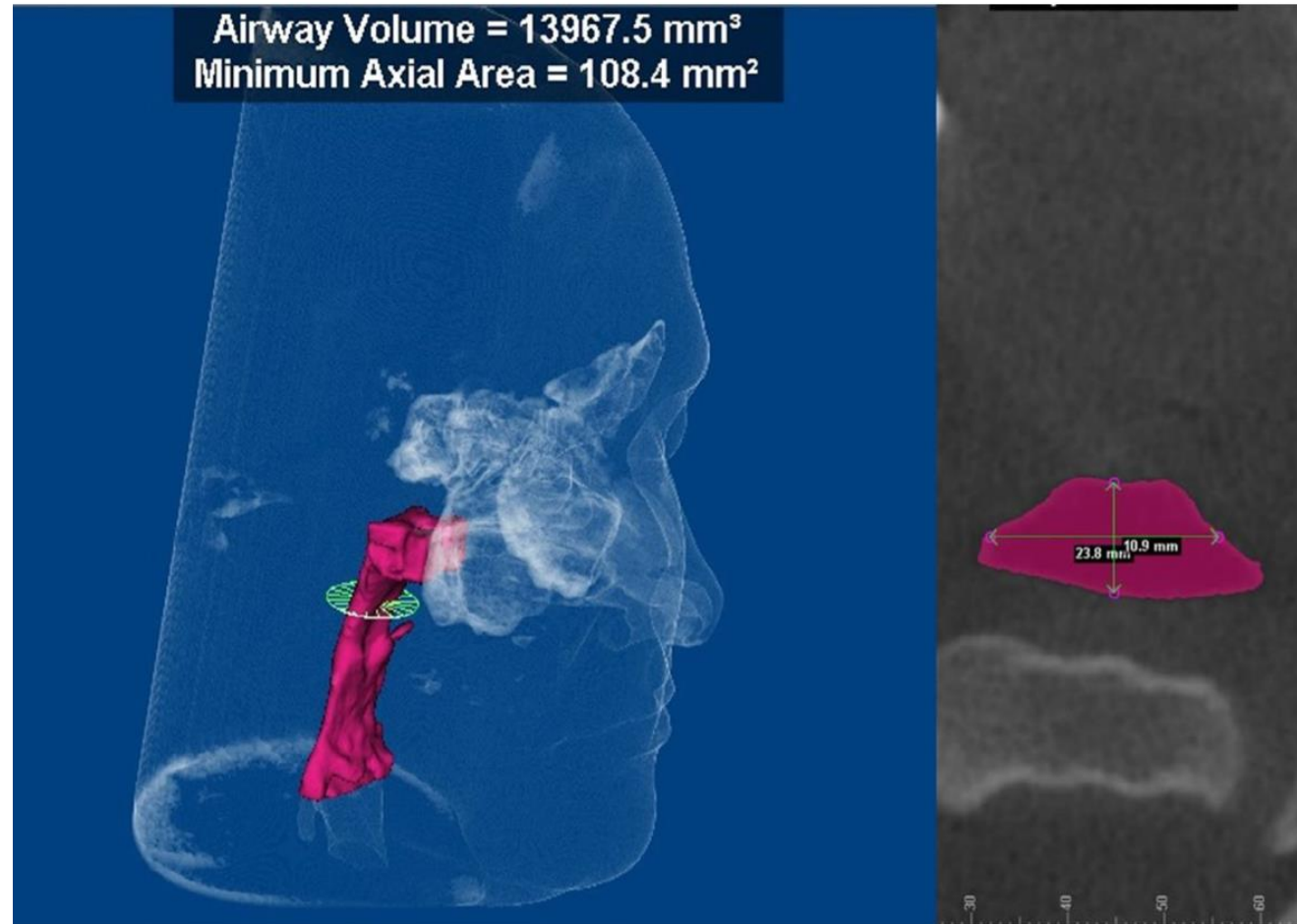


Figure 2. Multiple view of studied reconstructed volumes segmented into the different portions analyzed in this study: Nasal cavity, maxillary sinuses, and rhinopharynx.

[Lanteri et al., 2020](#)

CBCT – zobrazení a analýza HDC

Analýza objemu HDC – určení „MCSA“ (minimum cross-sectional area) – oblast v rámci HDC s nejužším průměrem a tedy místo vysoce rizikové pro kolaps a okluzi DC



[Masoud et al., 2020](#)

CBCT

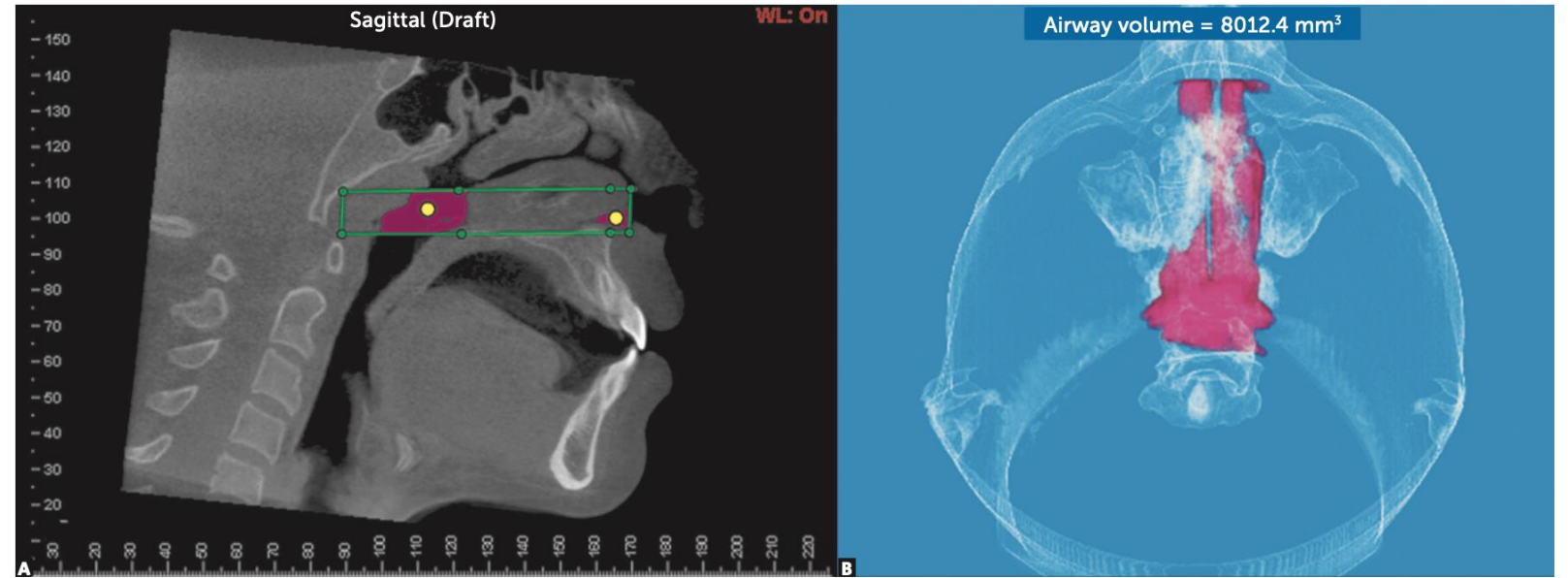


Figure 2 - Measurement of VNN: **A)** limits of the nasopharynx and nasal cavities (green), and **B)** airway volume calculation (pink).

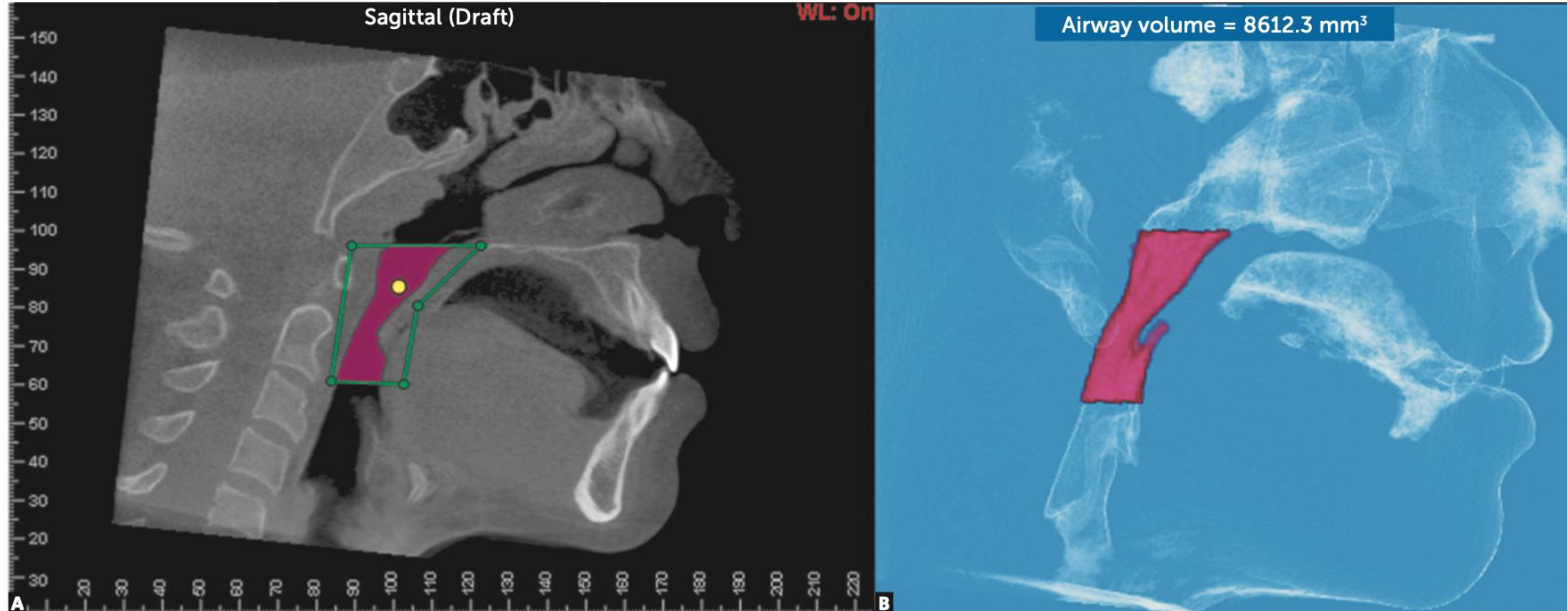


Figure 3 - Measurement of VO: **A)** Limits of the oropharynx (green), and **B)** Airway volume calculation (pink).

[Izuka et al., 2015](#)

Vývoj orofaciálního systému

- Pro správný vývoj orofaciálního systému u dětí jsou klíčové činnosti : **nosní dýchání, mastikace, polykání, sání (synchronizace)**
- **Svaly**, které se zapojují do těchto činností, **stimulují** postnatálně aktivní intermaxilární šev i formování alveolárního výběžku
- **Poruchy** v těchto činnostech narušuje fyziologický vývoj kraniofaciálního systému a vede k riziku vzniku kostních abnormalit, často přispívajících k snadnějšímu kolapsu HDC
- Vývoj obličejové oblasti probíhá výrazně mezi **narozením a 6. rokem**, následně v rámci **pubertálního růstového spurtu**

Vývoj orofaciálního systému

Krátké sublinguální frenulum

- pokud v indikovaném případě není frenulum včas uvolněno, jsou téměř vždy **narušeny** pro vývoj klíčové **funkce** – (sání, polykání, žvýkání či řeč),
- rovněž nedochází k **dostatečné stimulaci** patrového švu

Ageneze a předčasná ztráta zubů

- řada autorů se ve svých studiích zaměřuje na vliv ageneze či předčasné ztráty zubů na rozvoj kraniofaciálních struktur a případný vznik OSA
- přetrvává shoda, že ztráta zubů nebo jejich nezaložení ovlivňuje anatomii alveolárního výběžku
- nezávisle na příčině ztráty, u dětí je popisována abnormální orofaciální anatomie ve formě, která je riziková pro kolaps HCD ve spánku

[Huang et al., 2017](#)
[Ben-Bassat et al., 2009](#)

Ústní dýchání

- V letech 1981 a 1984 – studie na opicích – demonstrace **následků ústního dýchání na skelet obličeje**
- Uměle navozená **nosní obstrukce** – kompenzační změny s cílem adaptace na dýchání ústy
- U opic ve fázi růstu se po **odstranění nosní obstrukce** vytvořené kraniofaciální anomálie opět **zlepšily**

[Harvold et al., 1981](#)
[Vargervik et al., 1984](#)

Adaptační změny

- zadržovaný růst maxily
- zúžení maxily i mandibuly
- pootevřená ústa
- předsun DČ – dle druhu kompenzace se vytvořila u zvířat II. i III. Angle třída
- často tendence k dvojitému skusu
- jazyk - změny u zvířat se lišily, ale vedly k zabezpečení průchodnosti oropharyngu
- protlačování jazyka

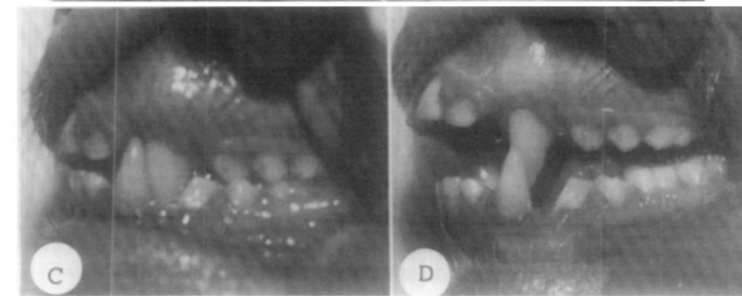
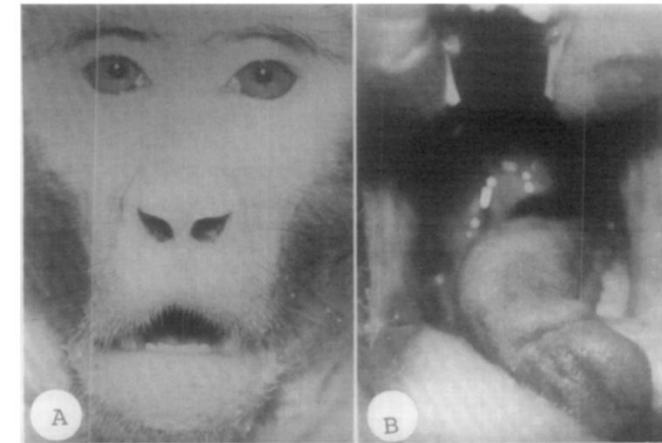


Fig. 2. Three years of oral respiration caused a notch in the upper lip and an open mouth posture (A), as well as a long and slender tongue with midline groove, an open pharyngeal port, and a dental malocclusion (B). The forward positioning and the rhythmic movements of the mandible produced a dual bite (C and D).

[Harvold et al., 1981](#)



Fig. 4. The animal lowered the mandible and protruded the tongue. Eighteen months of mouth breathing produced a notch in the upper lip (A) and a severe open-bite (B).

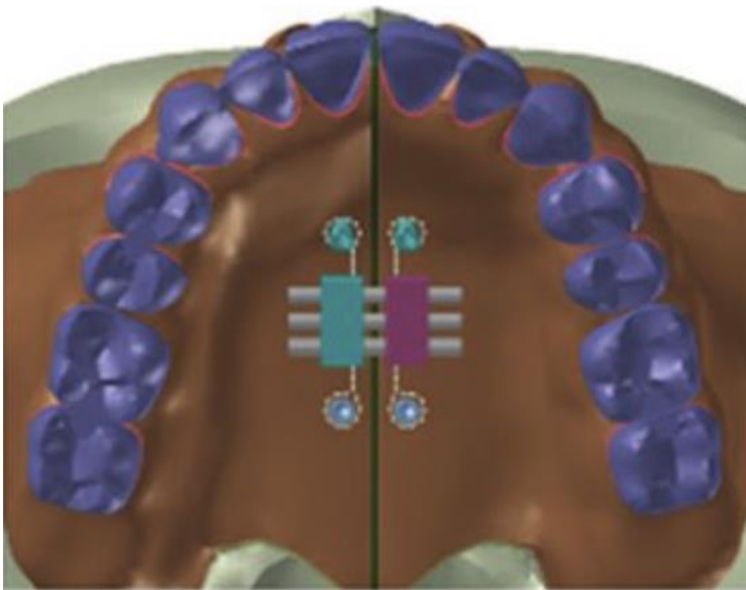
Ortodontická terapie u dětských OSA pacientů

- **Maxilární expanze** - nejčastěji používaný ortodontický přístup při léčbě OSA u dětí
- **Změna polohy dolní čelisti** – předsuny DČ
- **Myofunkční terapie** - aktivní i pasívní léčba

Ortodontická expanze HČ

- Dle **kotvení** dělíme ortodontické expanzní aparáty na: „bone – borne“ – kostně kotvené / „tooth-borne“ - dentálně kotvené / „hybrid“ – hybridní (kostně i dentálně kotvené)
- **Druhy** expanze – v závislosti na protokolu točení expanzního šroubu a síle:
- **rychlá maxilární expanze** - rapid maxillary expansion (**RME**) – rychlejší expanze/větší síla za kratší čas
- **pomalá maxilární expanze** - slow maxillary expansion (**SME**) –slabší síly a delší doba točení
- **chirurgicky asistovaná maxilární expanze** - surgically assisted maxillary expansion

[Lee et al., 2012](#)



<https://www.leone.it/english/orthodontics/>



<https://www.accutechortho.com/orthodontic-laboratory-products/expansion/rpe>

RME

- **RME** – poprvé představil v roce 1860 Dr. Angell a zpopularizoval ji zejména Dr. Haas
- Při expanzi dochází k **roztržení maxilárního švu** – trojúhelníkové rozšíření – maximum je v přední části a expanze klesá dorsálním směrem – poměr 2:1 (vyšší odpor lebečních kostí)
- Rozšiřují se částečně i ostatní sutury kolem maxily – (zygomaticomaxilární, frontomaxilární, zygomaticotemporální, pterygopalatální..)

RME

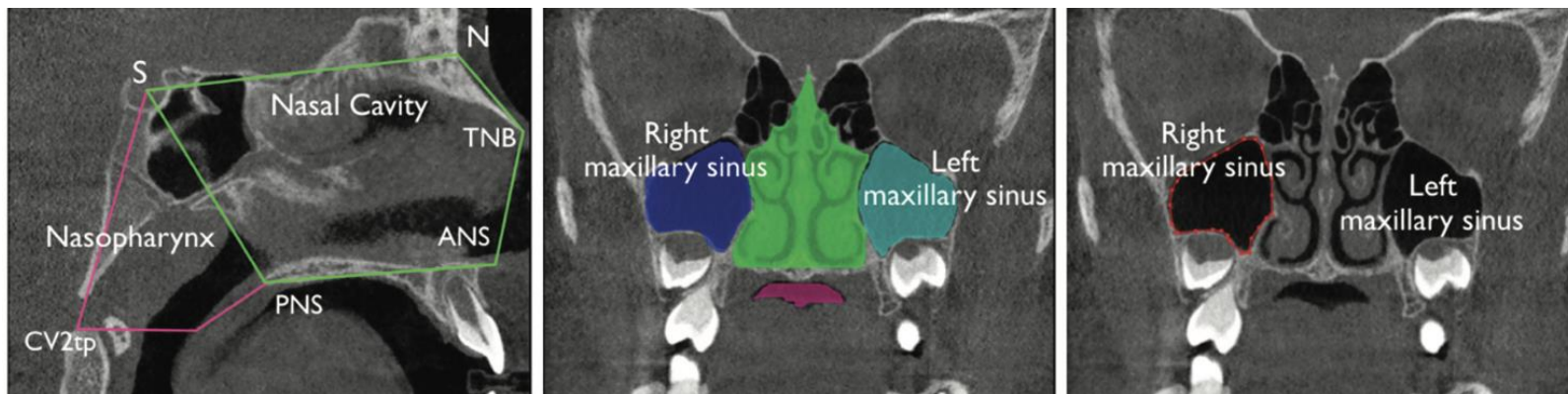
- Mnoho studií prokázalo efekt expanze maxily na:
 - signifikantní **nárůst objemu nosní kavity, nasopharyngu, rhinopharyngu i paranasálních dutin**
 - **snížení nosní rezistence, zlepšení ventilace a průchodnosti DC (vyšetření pomocí zobrazovacích technik, rhinomanometrie nebo PSG)**
 - **Pokles AHI a zlepšení OSA symptomů u dětí**

[Haas, 1961](#)

[Abdalla et al., 2019](#)

[Caprioglio et al., 2014](#)

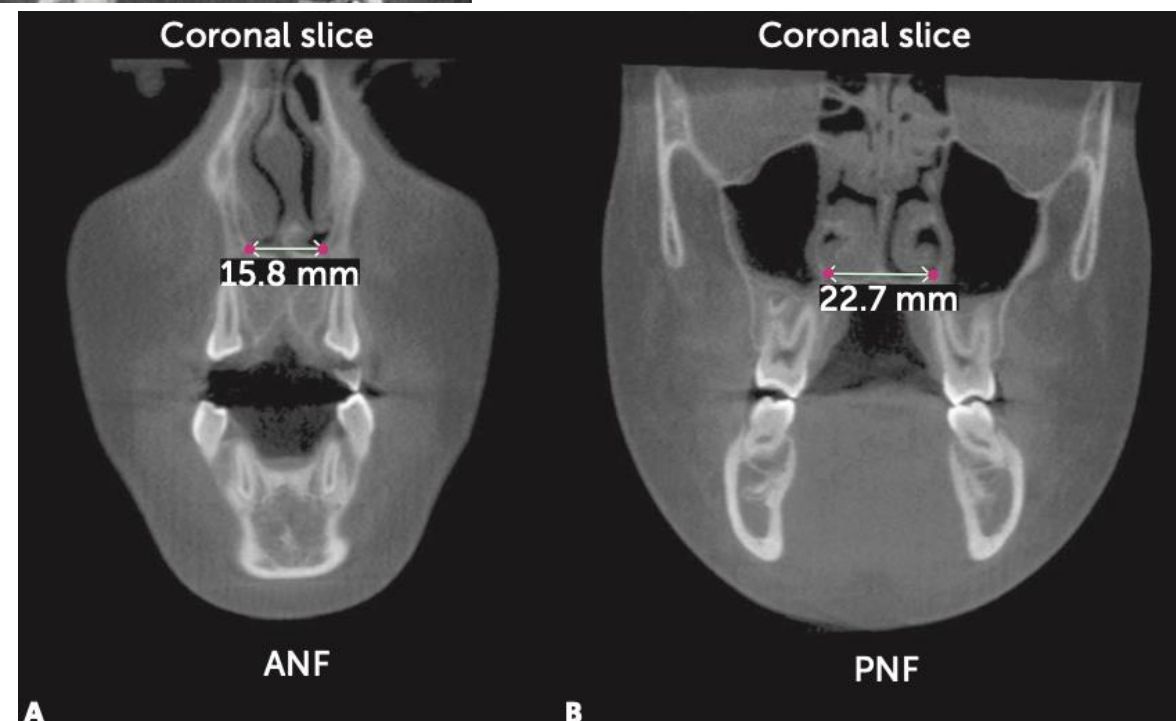
[Maspero et al., 2020](#)



[Lanteri et al., 2020](#)

Sagitální a koronální řezy CBCT –
zobrazující segmenty nosní kavity a
maxilárních sinů s možností měření
jednotlivých objemů

Měření šířky nosní spodiny
v přední části (ANF) (oblast
špičáků) a zadní části
(PNF) (oblast prvních
stálých molárů)



[Izuka et al., 2015](#)

Myofunkční terapie (MFT)

- Od roku 1918 – **správná poloha jazyka**, dosažená pomocí MFT, je popisována jako hlavní faktor vedoucí ke **stimulaci** maxilárního i mandibulárního **růstu a dýchání nosem**
- MFT je souhrnem izotonických a izometrických cvičení ovlivňujících rty, jazyk, orofaryngeální struktury jako měkké patro či laterální stěnu hltanu
- Úkolem je zajistit **správné držení hlavy, pozici jazyka na patře oproti horním zubům, polykání, mastikaci, řeč a artikulaci**
- Aktivní a denně prováděná MFT může ve spojení s další léčbou vést k úplné remisi OSA až u 60 % dětí
- Absence MFT může být spojena s recidivou SRBD

[Huang et al., 2017](#)

[Guilleminault et al., 2015](#)

[Guilleminault et al., 2013](#)

Předsuny dolní čelisti

- Několik studií zaměřených na analýzu změn v HDC po použití ortodontických aparátů sloužících na předsun DČ prokázalo :
 - po terapii aparátem Twin Block, se u dětí **zvýšil sagitální rozměr oro- a hypofaryngu**
 - korekcí polohy mandibuly se také **zlepšily délka, tloušťka a sklon měkkého patra**
 - došlo ke **zlepšení symptomů OSA**, jakož i profilu pacientů a **výsledků jejich spánkových dotazníků i PSG**
 - kefalometrické analýzy prokázaly významné **zvětšení prostoru dýchacích cest**, změnu úhlu pozice mandibuly vůči lební bázi a konvexitě obličeje, které naznačují zvýšení růstu mandibuly a změnu délky měkkého patra, zmenšení maxilo-mandibulární diskrepance v sagitální i vertikální rovině a rozšíření HCD

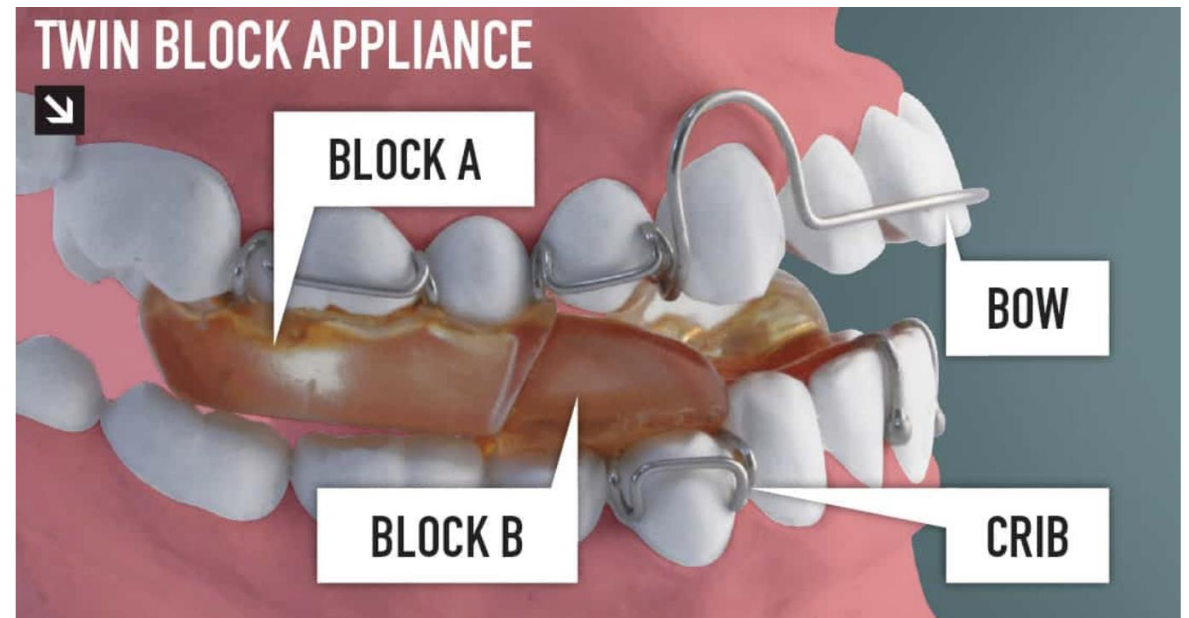
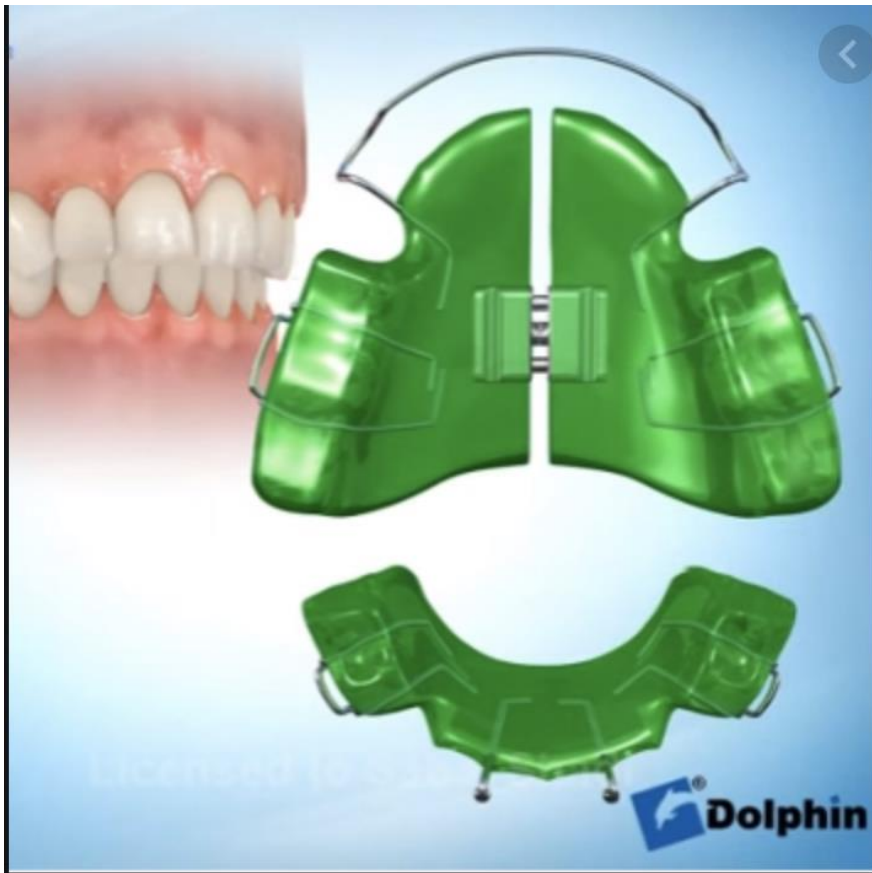
[Zhang et al., 2013](#)

[Ghodke et al., 2014](#)

[Galeotti et al., 2016](#)

TWIN BLOCK

https://www.youtube.com/watch?v=UI_-wfutrQw

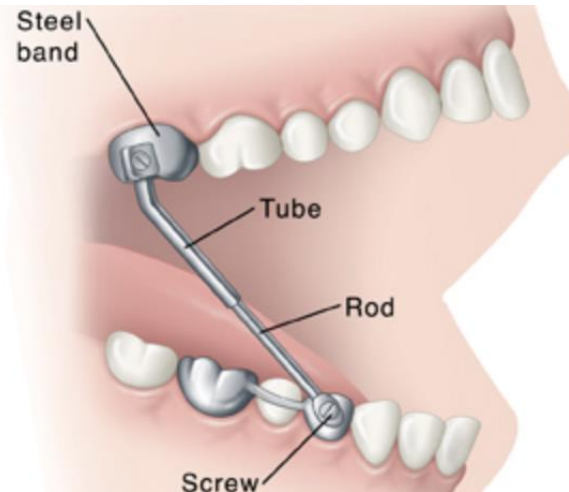


<https://www.orthodonticsuites.co.uk/blogs/news/twin-blocks-or-functional-appliances>

HERBSTŮV APARÁT

- <https://www.youtube.com/watch?v=yB8ps1Z1EgU>
- po terapii byl prokázán:
 - nárůst objemu DC v části orofaryngu i laryngu
 - snížená četnost probouzení u dětí trpících II. skeletální třídou a OSA
 - zlepšené dýchání a snížení OSA příznaků u pacientů po léčbě

[Schütz et al., 2014](#)
[Iwasaki et al., 2014](#)



<https://www.fairview.org/patient-education/40051>



Fig 6. Example of a subject treated with the Herbst appliance: **A**, before treatment, the retropositioned mandible was associated with a reduced pharyngeal airway; **B**, after treatment, a more anterior placement of the mandible significantly (yellow arrow) enlarged the pharyngeal airway (blue arrow).

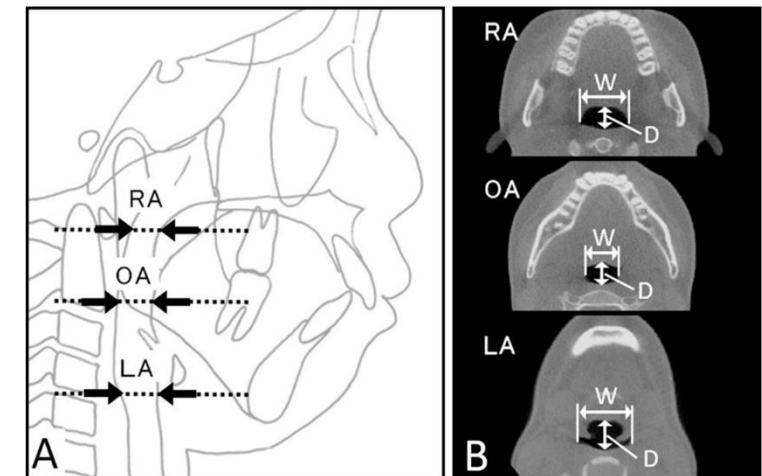


Fig 5. Measurement of the pharyngeal airway cross-sections. **A**, RA, Retropalatal airway; OA, oropharyngeal airway; LA, laryngopharyngeal airway. **B**, Cross-sectional areas of the pharyngeal airway. D, Depth; W, width.

[Iwasaki et al., 2014](#)

Kazuistiky

Sofia, 7 let



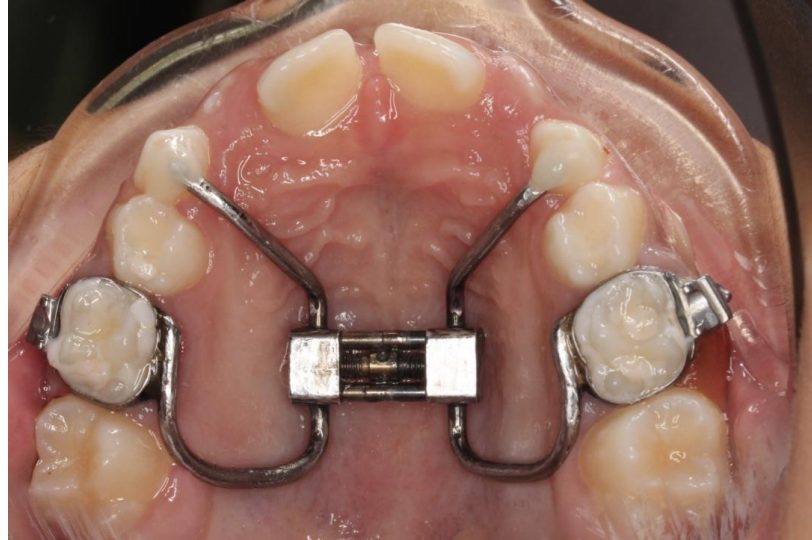


313 Vědecká příprava pro ZL

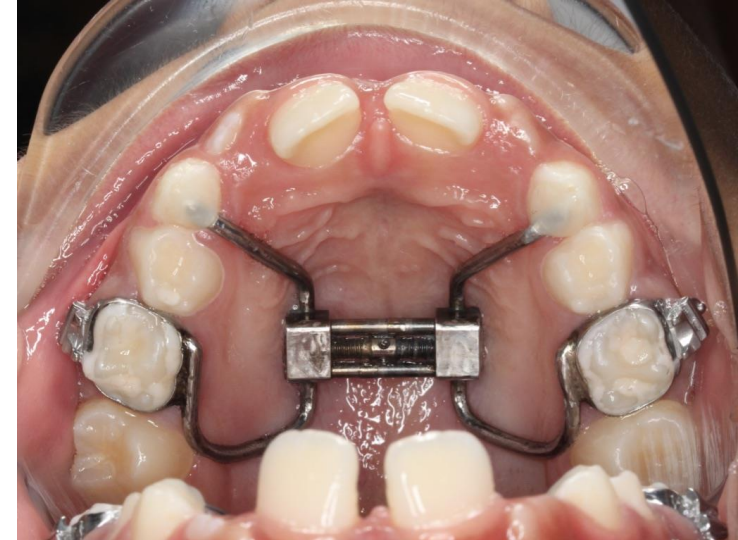




5/8/19



26/8/19



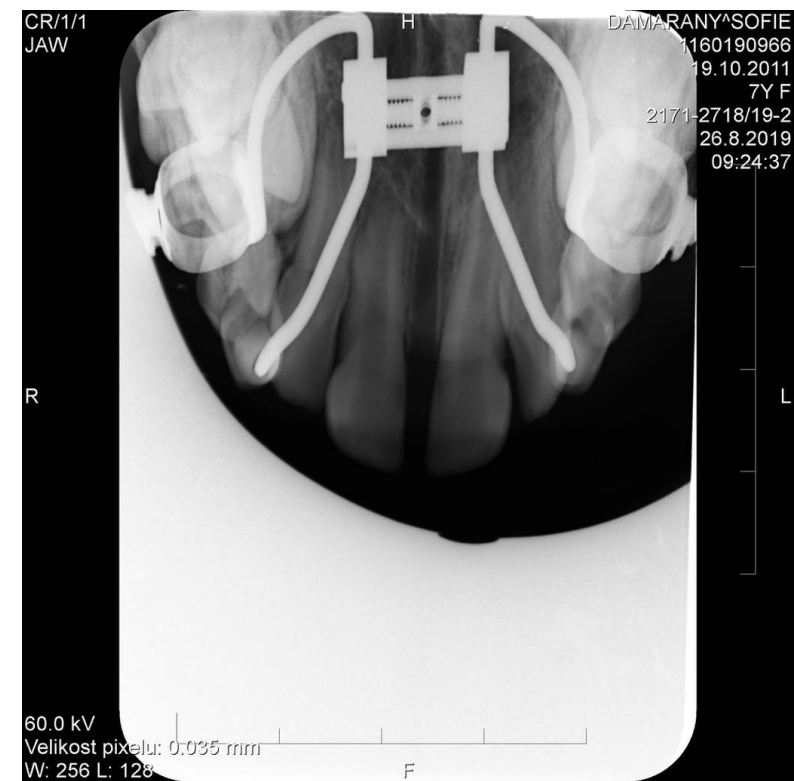
2/9/19



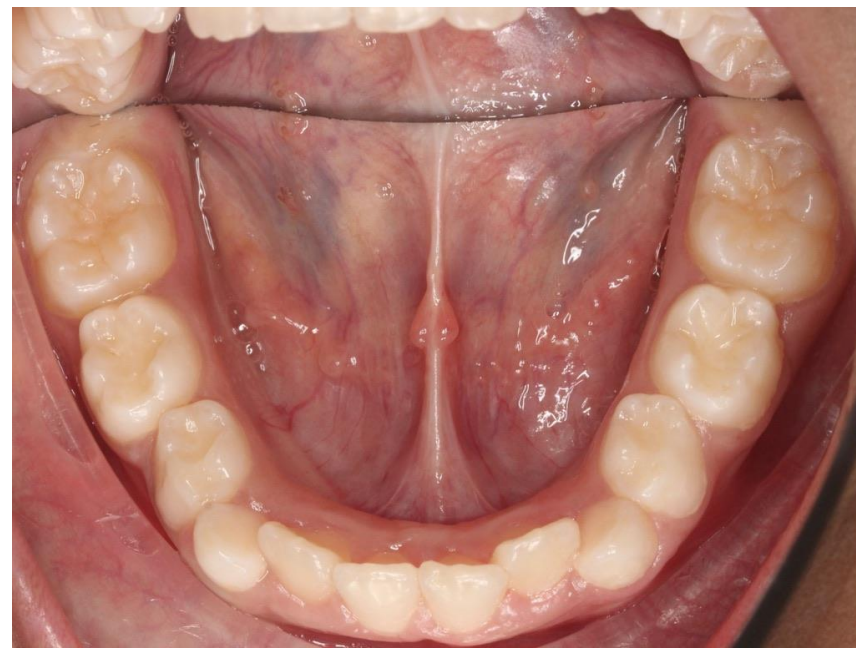
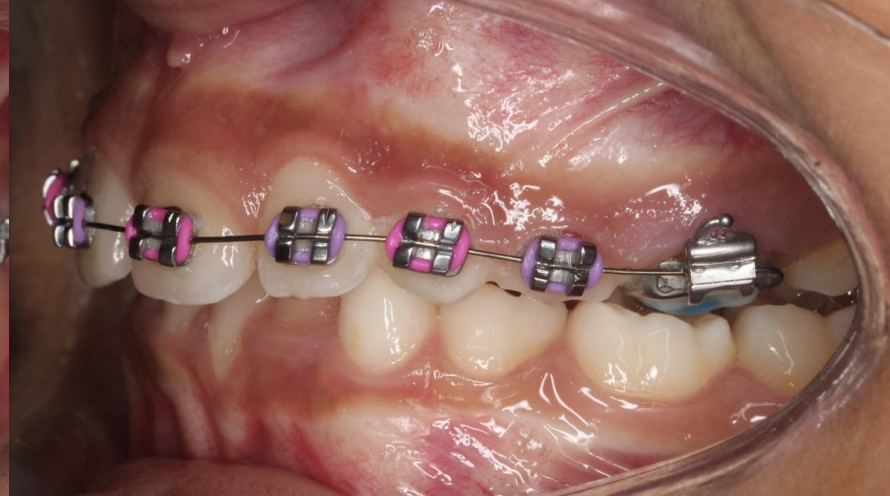
8/1/20



7/7/20



314 Vědecká příprava pro ZL

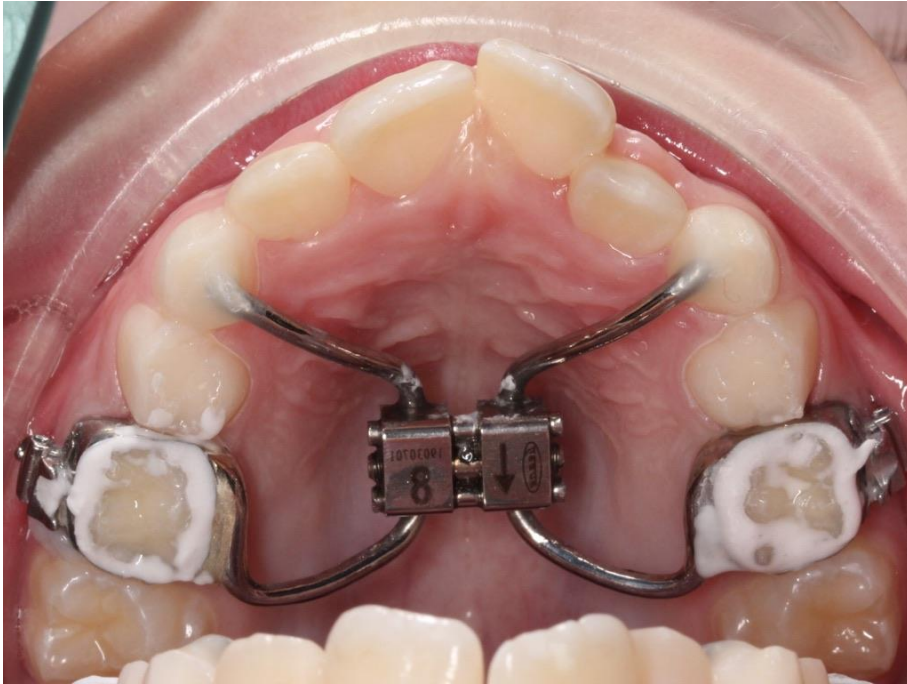


Adam, 8 let

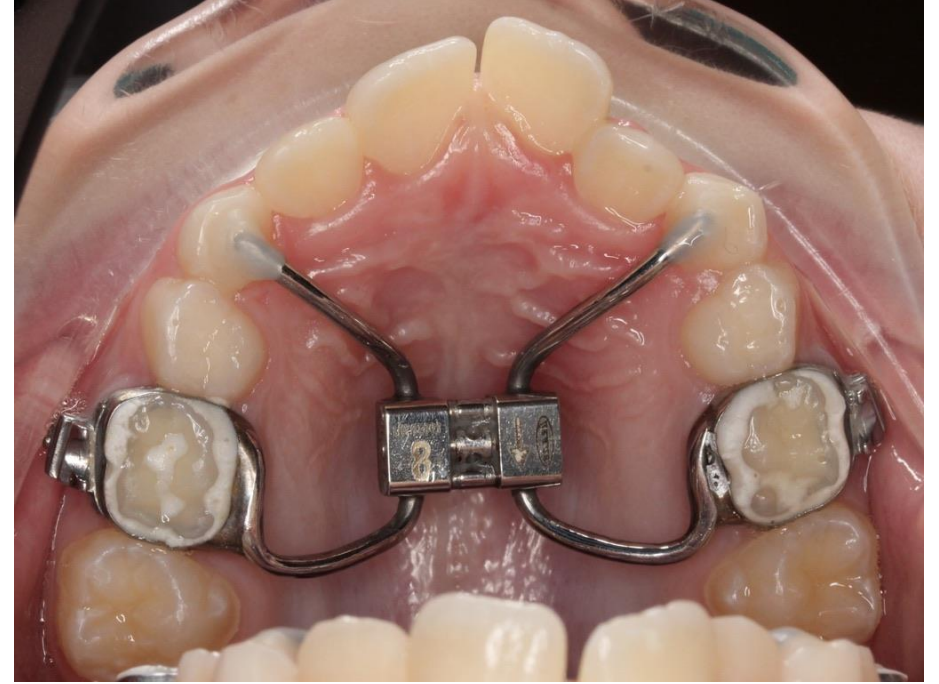




9/10/19



18/10/19

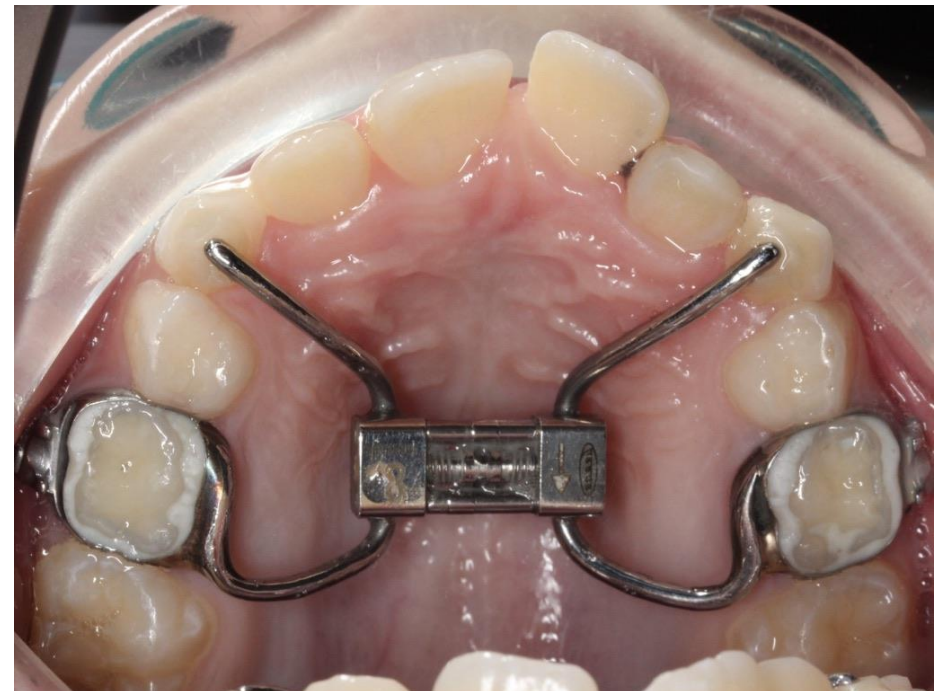


24/10/19



318 Vědecká příprava pro ZL

6/11/19



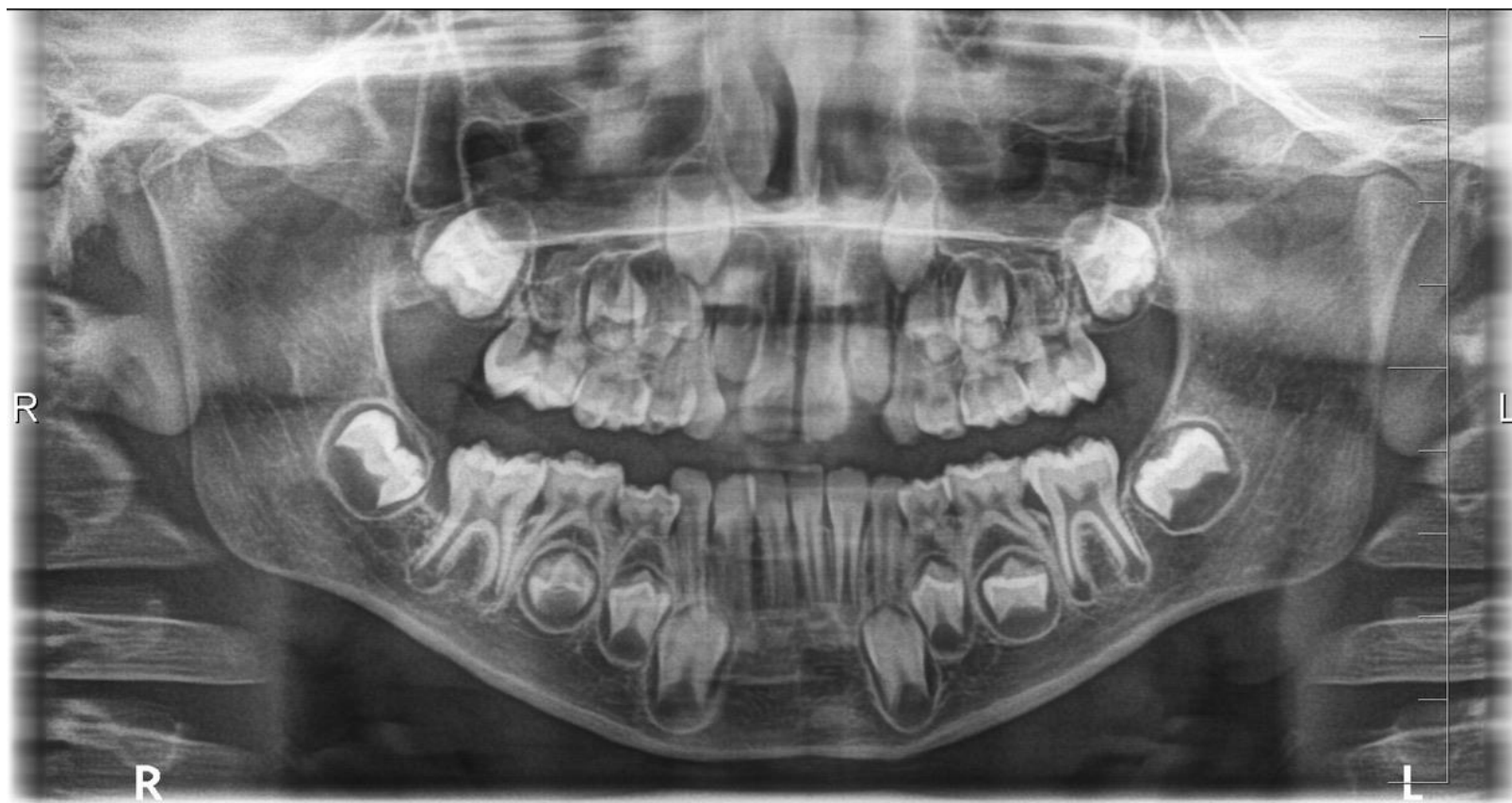
2.Fáza terapie - TWIN BLOCK



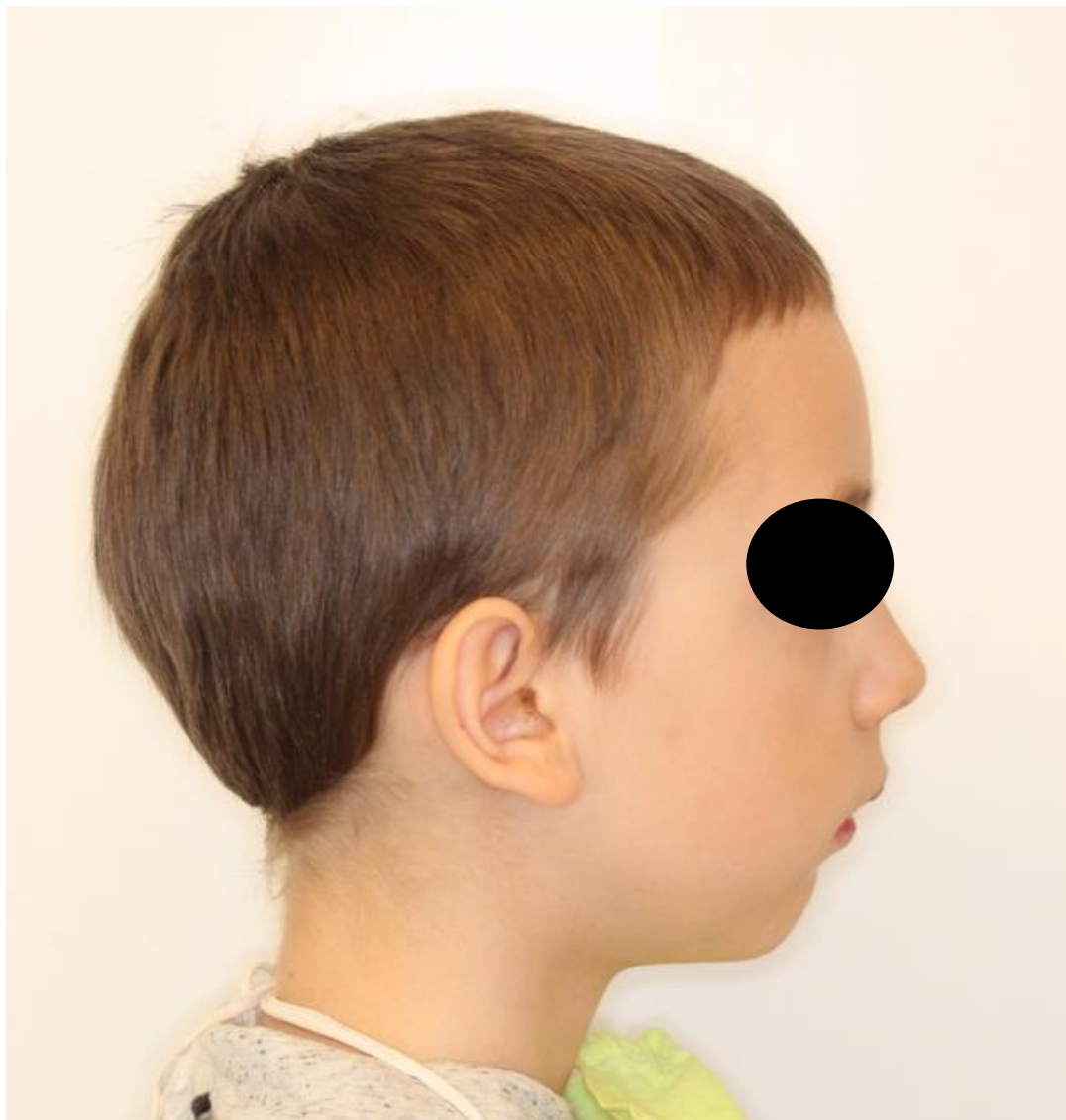




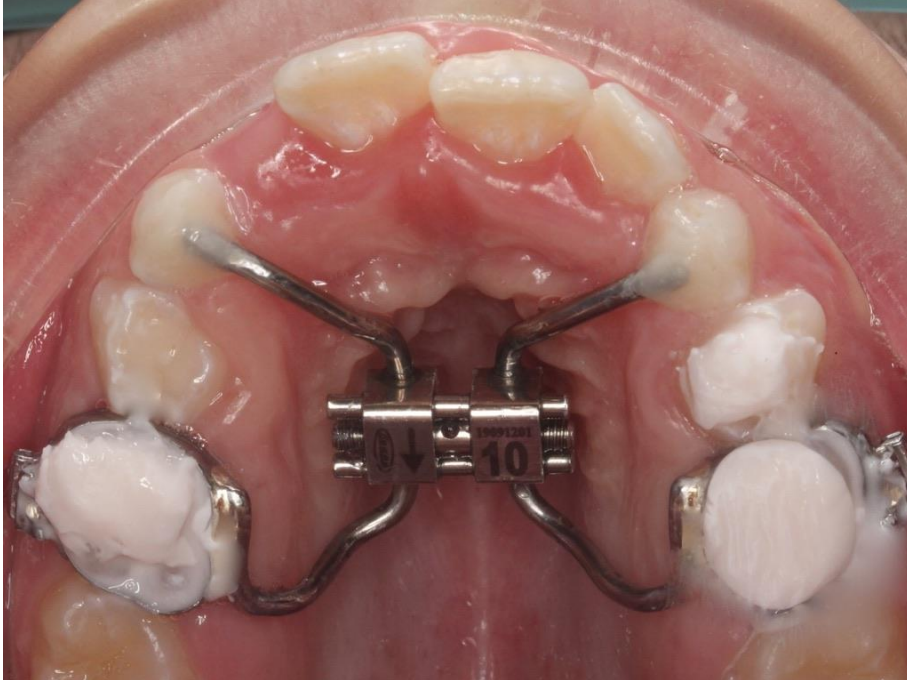
Jan, 8 let







28/5/20



11/6/20



18/6/20



325 Vědecká příprava pro ZL

2/7/20



Take home message

1. Zubní lékaři jsou specialisty na orofaciální oblast a precizním vyšetřením můžou zásadně přispět k zachytu a diagnostice OSA
2. Při (nejen) dětské OSA by měla být snaha o co nejvčasnější záchyt (zvětšuje se škála terapeutických možností) a následné vhodné zvolení kauzální terapie
3. Ortodontická léčba může být hodnotnou léčbou u dětí s OSA, u nichž jsou přítomny kraniofaciální anomálie

Použité zkratky

OSA – obstrukční spánková apnoe

SRBD - poruchy dýchání vázané na spánek

AHI index – apnoe-hypopnoe index

HDC – horní dýchací cesty

CBCT - Cone Beam výpočetní tomografie

PSG – polysomnografie

MFT - myofunkční terapie

RME - rychlá maxilární expanze

SME - pomalá maxilární expanze

Vrozené vývojové anomálie orofaciální oblasti (rozštěpové vady)

MUDr. Alena Bryšová, Ph.D.

Stomatologická klinika, Fakultní nemocnice u svaté Anny
Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

Obsah přednášky

- Výzkumné projekty našeho týmu
- Rozštěpy rtu a patra – teorie
- Rozštěpy rtu a patra – výzkumná část
- Proč se stát výzkumníkem

Představení výzkumníka

MUDr. Alena Bryšová, Ph.D.

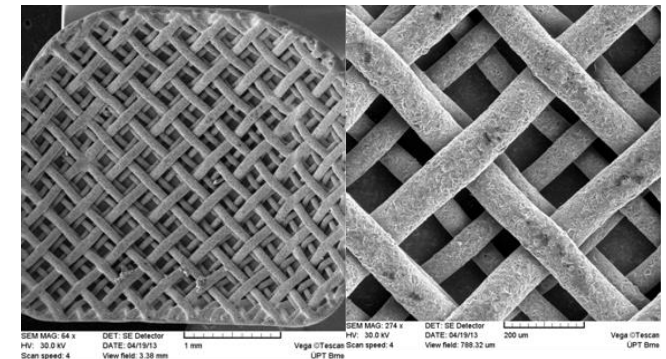
- Ortodontista na Stomatologické klinice FN USA
- Učitel pregraduálních a postgraduálních studentů v oboru ortodoncie – LF MU Brno
- Soukromá ortodontická praxe

Výzkum ortodontických zámků a adhezivních materiálů

Tým : MUDr. Alena Bryšová, Ph.D. – FNUSA a LF MU Brno, Prof. RNDr. Bohumil Vlach, CSc.
- Fakulta stavební VUT Brno, Ing. Filip Mika, Ph.D. - ÚPT AV ČR

Cíle výzkumu:

- Srovnání pevnosti vazby adhezivních materiálů k lepení ortodontických zámků
- Morfologie baze ortodontických zámků
- Srovnání fraktur ve sklovině po odstranění ortodontických zámků



Výzkum léčby stěsnání fixním lingválním aparátem

Tým : MUDr. Alena Bryšová, Ph.D. ,MDDr. Dušan Kuric, MDDr. Mariana Raszková – FNUSA
a LF MU Brno

Cíle výzkumu:

- Srovnání výsledné inklinace dolních řezáků pacientů se stěsnáním léčených lingválním aparátem a konvenčním vestibulárním aparátem
- Srovnání změny mezišpičkové vzdálenosti pacientů se stěsnáním léčených lingválním aparátem



Současný výzkum

Hodnocení růstu horní čelisti u rozštěpových pacientů po operaci rtu neonatálně

Tým : MDDr. Margarita Rousi, MUDr. Alena Bryšová Ph.D., prof. MUDr. Lydie Izakovičová Hollá, Ph.D. –

Stomatologická klinika FNUSA a LF MU Brno

MUDr. Jitka Vokurková, Ph.D., MUDr. Olga Košková, Ph.D. – Klinika dětské chirurgie, Dětská nemocnice

FN Brno

Cíle výzkumu:

- Hodnocení pětiletého indexu pacientů s jednostranným celkovým rozštěpem po operaci rtu neonatálně v 5 letech
- Hodnocení Goslon yardstick indexu pacientů s jednostranným celkovým rozštěpem po operaci rtu neonatálně v 9-10 letech

Rozštěpy rtu a patra

- nejčastější vrozená vývojová vada orofaciální soustavy
- lokalizace ve viditelné oblasti obličeje
- zatěžuje své nositele morfologicky, funkčně i sociálně
- vyskytuje se samostatně, nebo jako součást syndromů



Výskyt rozštěpů

- 1 rozštěp na 500 - 800 živě narozených (v ČR 1,87: 1000)
- výrazně vyšší incidence rozštěpů u potracených plodů (1 rozštěp na 50 potracených plodů)
- Rozdíly v incidenci dle :

pohlaví	chlapci : dívky	3 : 1
postižené strany	vlevo : vpravo	2 : 1
etnika	asijská populace	1: 500
	afroamerická populace	1 : 2000

sezónní incidence

Etiologie

- Rozštěpová vada vzniká nespojením obličejových výběžků a patrových desek v 2-3 měsíci těhotenství
- **75% nejasná etiologie**
experimentálně zjištěno, že několik podprahových impulsů působících společně dokáže vyvolat rozštěp, stejně jako jeden silný faktor
- **Genetické vlivy – 10 %**
defekt jednoho nebo více genů, vada má prokazatelně genetickou závislost, rodinná zátěž

[Burdi A.R., 2006](#)

Rozdělení rozštěpů – Burianova klasifikace 1954

A. TYPICKÉ ROZŠTĚPY:

I. skupina: (rozštěp rtu vždy přítomen)

1. rozštěp rtu - jednostranný
- oboustranný
2. rozštěp rtu a čelisti - jednostranný
- oboustranný
3. rozštěp rtu, čelisti a patra (celkový rozštěp)
- jednostranný
- oboustranný

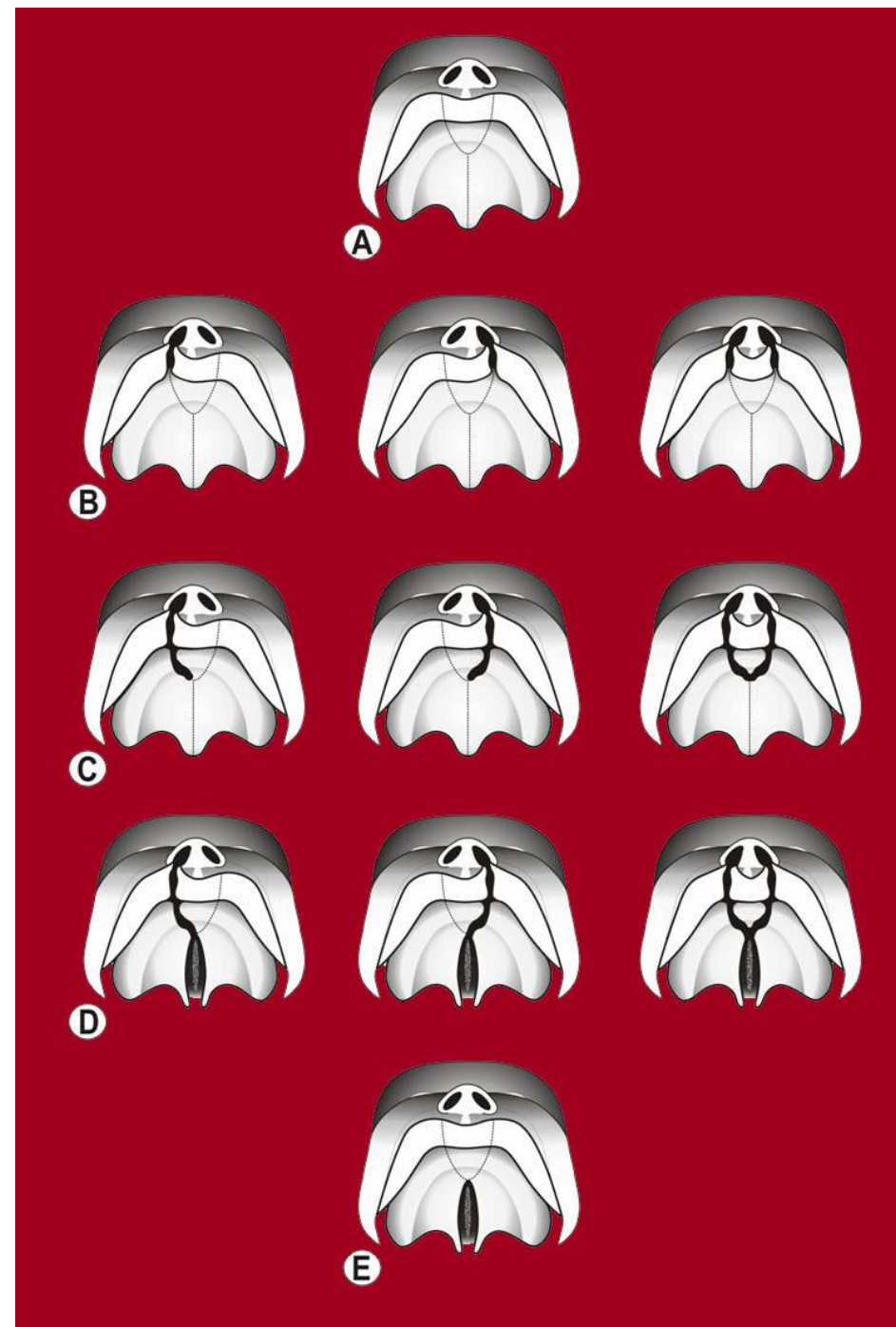
II. skupina:

1. izolovaný rozštěp patra
2. submukózní rozštěp patra
3. insuficientní patro

B. ATYPICKÉ ROZŠTĚPY:

- I. příčné rozštěpy
- II. horní střední rozštěpy
- III. dolní střední rozštěpy
- IV. šikmé rozštěpy

Rozdělení rozštěpů



Rozštěpy obličeje jsou spojeny s :

- Esteticky nepříznivým dopadem na vzhled dítěte
- Problémy s polykáním
- Problémy s příjmem potravy
- Negativním ovlivněním vývoje řeči
- Časté záněty středouší
- Záněty horních cest dýchacích
- **Dentice :**
- Numerické anomálie dentice (hypodoncie, hyperodoncie)
 - Ve vztahu k ostatní populaci se objevuje 8x častěji
- Morfologické anomálie dentice
- Podvývoj horní čelisti – zkřížený skus, obrácený skus, posun střední čáry
- Retinované řezáky, špičáky



Multidisciplinární péče o pacienta s rozštěpem

- Rozštěpová centra – Praha, Brno
- Péče o rozštěpové pacienty je multidisciplinární, dlouhodobá a systematická






VĚK	TYP OPERACE
0-3 měsíce	PRIMÁRNÍ REKONSTRUKCE RTU
7-12 měsíce	PRIMÁRNÍ REKONSTRUKCE PATRA
3-8 roku	SEKUNDÁRNÍ KOREKCE RTU, PATRA A NOSU
8-12 let	IMPLANTACE SEKUNDÁRNÍHO KOSTNÍHO ŠTĚPU DO ALVEOLU
OD 17 let	ORTOGNÁTNÍ CHIRURGIE, SEKUNDÁRNÍ KOREKCE RTU A NOSU

VĚK	ORTODONTICKÁ LÉČBA
NOVOROZENEC	OBTURÁTORY (zlepšení podmínek kojení) MOLDING -příprava na operaci rtu, sblížení segmentů rozštěpu
3 - 6 let	OBTURÁTORY (pro zlepšení nácviku řeči) SNÍMACÍ APARÁTY
6 - 9 let	SNÍMACÍ A FIXNÍ APARÁTY, PROTRAKČNÍ MASKA (řešení šířky horní čelisti a překusu)
9 - 13 let	FIXNÍ APARÁTY - definitivní řešení tvaru horního a dolního oblouku, postavení zubů a skusu ortodonticko-chirurgická distrakce horní čelisti
14 a více	FIXNÍ APARÁTY, dlouhodobá stabilizace

Pětiletý index podle Atacka (Atack et al., 1997)

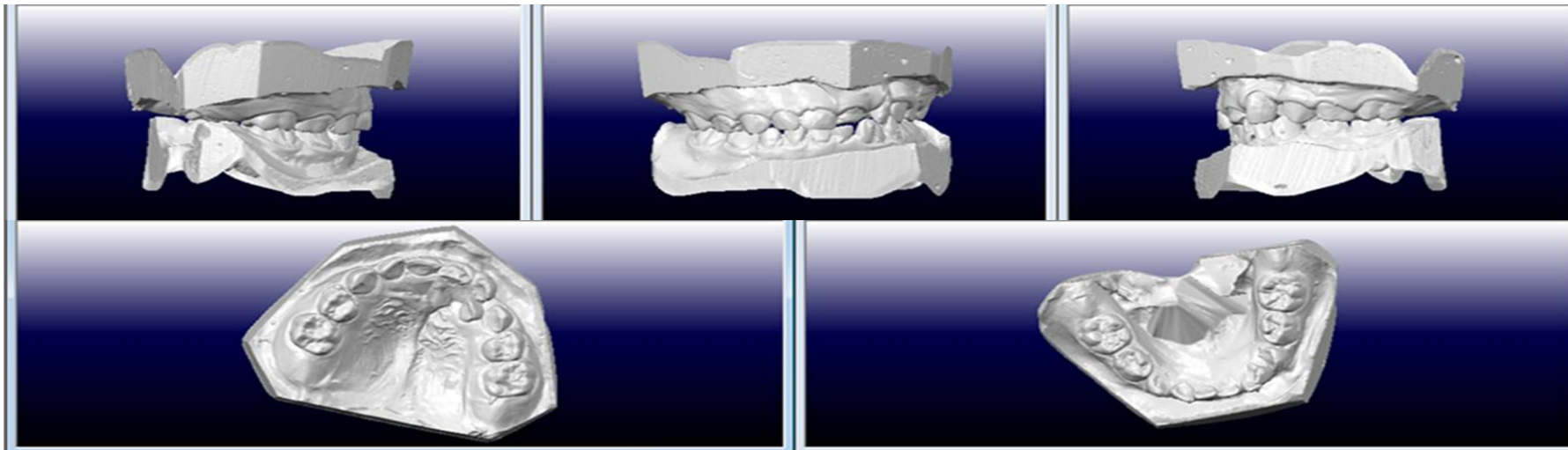
[Atack et al., 1997](#)

- 1997 Atack
- Měření ve věku pěti let
- Rozděluje do 5 skupin– 1 je nejlepší a 5 je nejhorší
- Hlavním kritériem pro zařazení do jedné z pěti skupin je sagitální, transversální a vertikální vztah zubních oblouků
- Hodnocení lze provádět na sádrových diagnostických modelech, 3D digitální modelech nebo na fotografiích pětiletých dětí s celkovým jednostranným rozštěpem
- Prognóza dalšího vývoje vztahu oblouků a budoucí rozsah ortodontické či ortodonticko-chirurgické péče

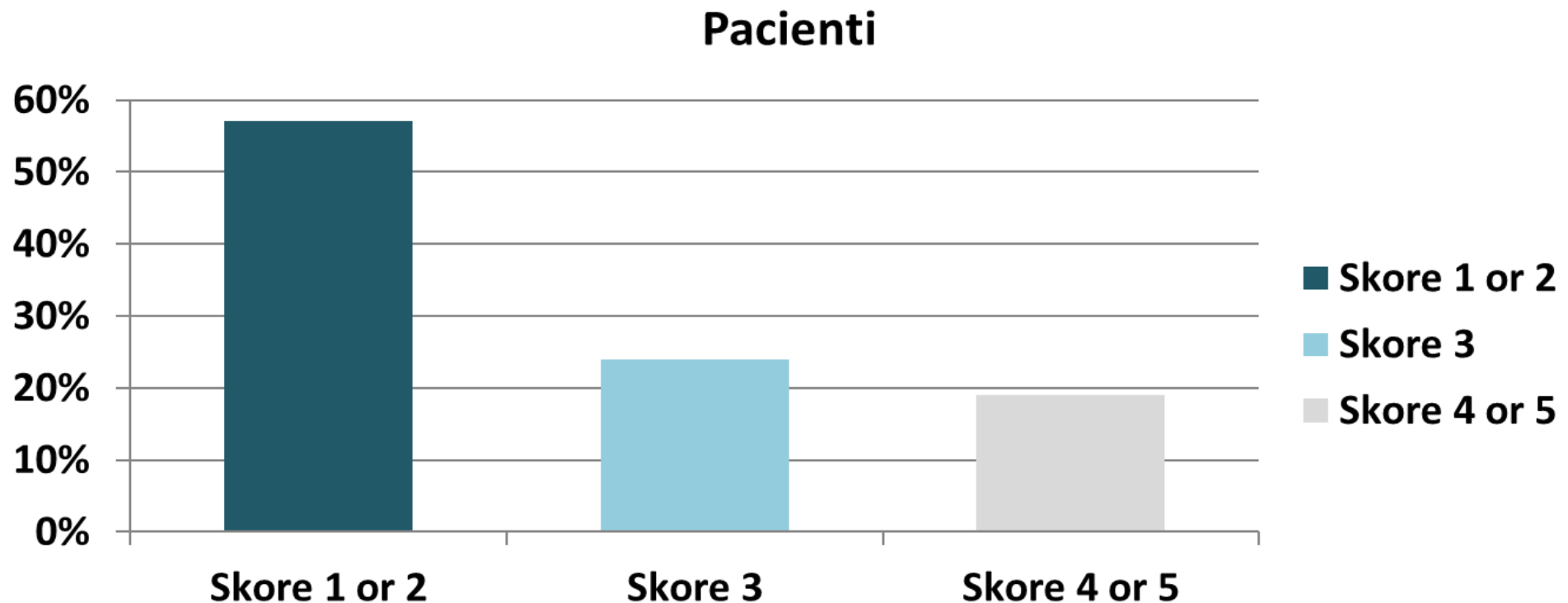
Skupina	Obecné rysy/znaky Atack – pětiletý index	Dlouhodobé výsledky	
1	Fyziologický překus Bez zkříženého/otevřeného skusu Fyziologický růst horní čelisti a patra	Výborný	
2	Fyziologický překus Jednostranný zkřížený skus, tendenci ke zkříženému skusu +/- tendenci k otevřenému skusu v oblasti rozštěpu	Dobrý	
3	Atetní skus, nebo retroklinace řezáků Jednostranný zkřížený skus +/- tendenci k otevřenému skusu v oblasti rozštěpu	Uspokojivý	
4	Obrácený skus s retroklinací nebo proklinací řezáků Jednostranný zkřížený skus, tendenci k oboustrannému zkříženému skusu +/- tendenci k otevřenému skusu v oblasti rozštěpu	Neuspokojivý	
5	Obrácený skus s proklinací řezáků Oboustranný zkřížený skus Podvývoj horní čelisti a patra (menší růst horní čelisti a patra)	Neuspokojivý	

Metodika měření našeho výzkumu

- Studijní modely 46 pacientů narozených v letech 2009 až 2013
- Jednostranný celkový rozštěp
- Všichni pacienti byli operováni **jedním chirurgem**, se **stejným protokolem** - neonatální operace rtu a uzavření měkkého a tvrdého patra od 7. do 12. měsíců



Výsledky



Průměrné skóre : 2,42

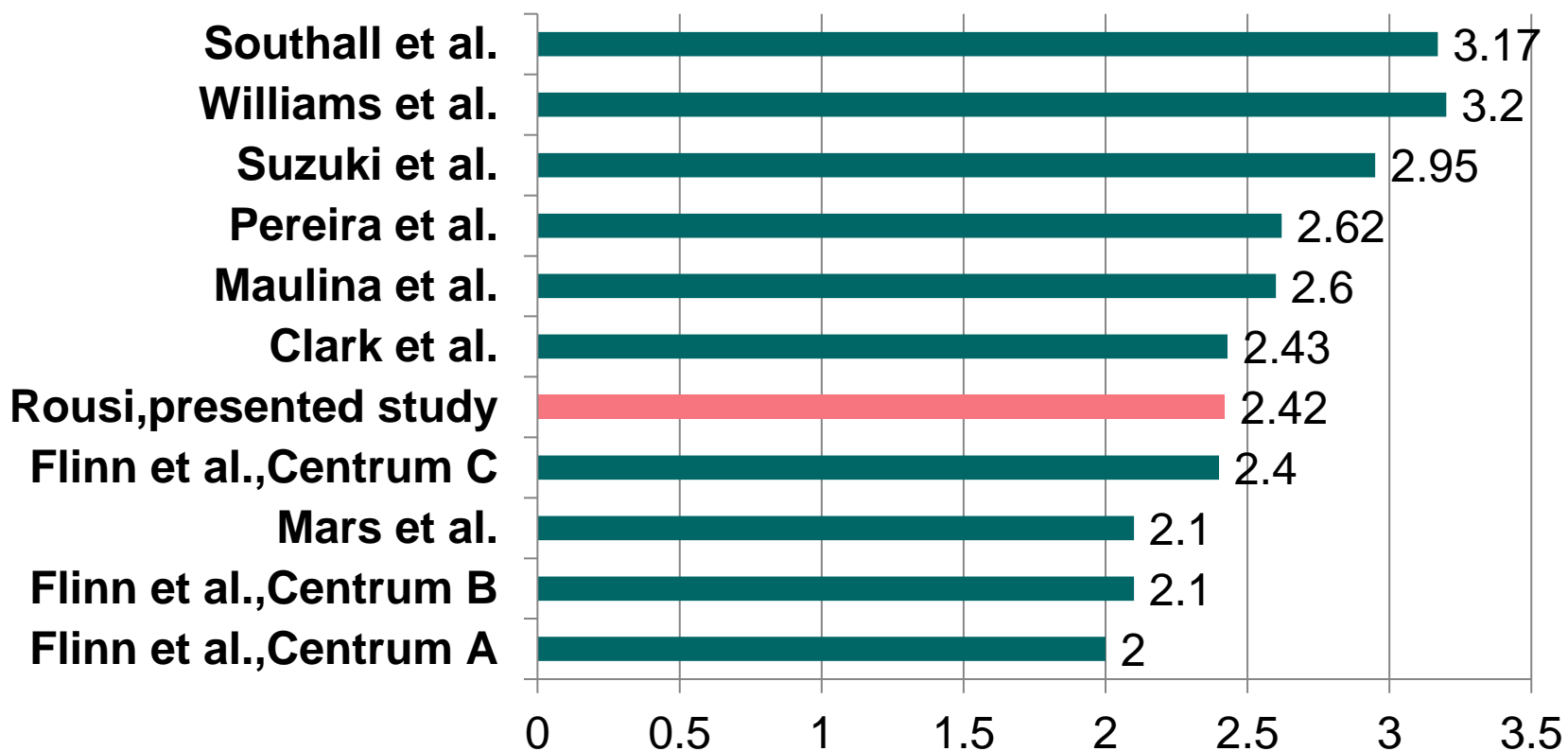
SD: 1,04

Hodnota medianu: 2,0

Srovnání výsledků s obdobnými studiemi

Tato srovnání jsou možná díky realizaci projektů Eurocleft a Eurocran

[Shaw et al., 2001](#), [European Collaboration on Craniofacial Anomalies \(EUROCRAN\), 2003](#)



Závěr výzkumu

Operace pacientů s rozštěpem vždy ovlivňuje růst horní čelisti¹ , nicméně načasování (neonatálně nebo ve 3.měsicích života) neovlivňuje velikost růstu horní čelisti

Výsledky naší studie ukázaly, že korekce rozštěpu rtu neonatálně a uzavření měkkého a tvrdého patra od 7. do 12. měsíců vedou k velmi uspokojivému výsledku růstu horní čelisti a mezičelistních vztahů a jsou srovnatelné s výsledky center s odlišným operačním protokolem

[Schweckendiek et Doz., 1978](#)

Výzkumná činnost – proč se stát výzkumníkem

- příležitostí k nabytí nových a rozšíření již nabytých znalostí
- cestou k vašemu dalšímu odbornému růstu
- příležitostí k navázání mezioborové spolupráce se špičkovými českými i zahraničními pracovišti
- možnost účastnit se významných českých i zahraničních projektů
- aplikace výzkumu do praxe
- absolvování mezinárodních stáží, konferencí ...

Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

doc. PharmDr. Jan Gajdziok, Ph.D.

Ústav farmaceutické technologie,
Farmaceutická fakulta, Masarykova univerzita Brno

Představení výzkumníka a jeho týmu

doc. PharmDr. Jan Gajdziok, Ph.D. + PharmDr. Jan Elbl + Ph.D. studenti

Ústav farmaceutické technologie, Farmaceutická fakulta, MUNI

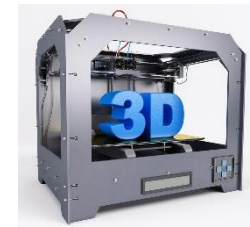


- Vývoj, formulace a hodnocení aplikačních forem a mikroforem se zaměřením na těžce rozpustná a obtížně vstřebatelná léčiva, inovativní lékové formy, DDS pro individualizovanou terapii, atd.
- Inovace a optimalizace technologických procesů – poslední krok ve vývoji léku
- Využití inovativních pomocných látek

Tiskové technologie pro individualizovanou terapii

Mikročásticové systémy pro plicní aplikaci

In situ formující gelové soustavy



TÝM – HYPOTÉZA – INTERDISCIPLINARITA – PŘÍPRAVA – CESTY – CHYBY (králík, rosuvastatin, klinika, motivace)

Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Obsah přednášky

- Dutina ústní jako aplikační místo léku
- Používané orální lékové formy
- Inovativní terapeutické systémy a jejich výzkum a vývoj
- Orální filmy
- Tiskové technologie v přípravě lékových forem



Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Dutina ústní jako aplikační místo léku

DÚ (bukální a sublingvální sliznice) – výhodná oblast pro aplikaci řady léků s lokálním i systémovým účinkem

Výhody orální aplikace:

- dostatečný povrch, bohaté prokrvení, přístupnost, dobrá permeabilita nekeratinizovaných oblastí
- obcházení first-pass efektu
- vysoká přijatelnost pro pacienta
- snadné a rychlé odstranění přípravku v případě potřeby
- rychlá regenerace sliznice
- přítomnost slin - dostatečné množství vodného média pro rozpuštění API
- nízká enzymatická aktivita a neagresivní prostředí
- možnost využít mukoadheze



Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Dutina ústní jako aplikační místo léku

Nevýhody a omezení:

- malá absorpční plocha ve srovnání se střevem (100-200 cm²)
- silné bariérové vlastnosti keratinizovaných oblastí sliznice dutiny ústní
- slizová vrstva schopná vazby léčiva
- kontinuální sekrece slin vedoucí k ředění a odplavování API do nižších partií GIT
- agresivní vliv nápojů, potravin, žvýkání a mluvení
- potenciální patologický stav dutiny ústní

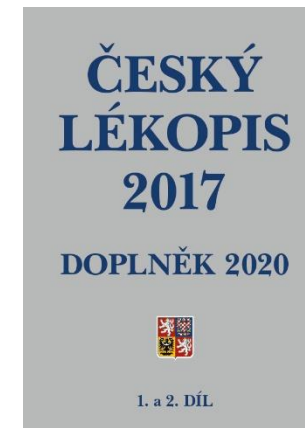


Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Používané orální lékové formy

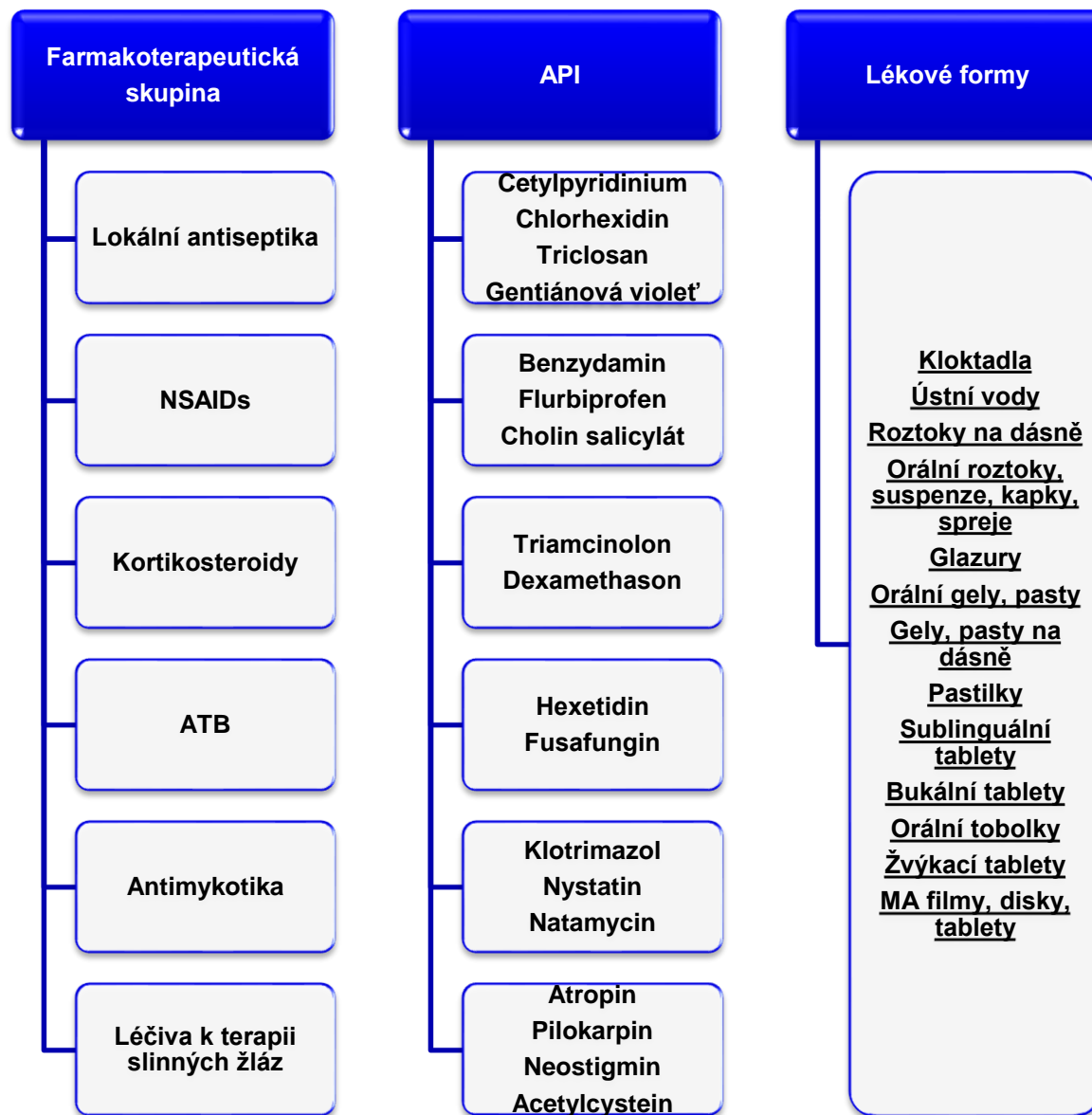
Orální přípravky (Oromucosalia)

- pevné, polotuhé nebo tekuté přípravky obsahující jednu nebo více LL, určené k podání do ústní dutiny a/nebo ústní části hltanu k dosažení místního nebo systémového účinku
- dle lékopisu lze orální přípravky rozdělit do dvou základních kategorií:
 - lékové formy s *mukoadhezivními* vlastnostmi
 - formulace, u kterých mukoadhezivní vlastnosti nejsou požadovány (*orodispergovatelné*)



Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Používané orální lékové formy



Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Inovativní terapeutické systémy a jejich výzkum a vývoj

Bukální filmy

- delší setrvání na sliznici dutiny ústní – mukoadheze
- krytí – snížení bolestivosti, zvýšení účinnosti lokální léčby

Filmy dispergovatelné v ústech

- diseminované léze horní části dýchacích a polykacích cest
- rychlé rozpouštění / rozpad



Výrobce	Obchodní název	Účinná látka	Indikace
Novartis	Theraflu	dextrometorfan/ difenhydramin	nachlazení
	Gas-X	simetikon	nadýmání
Pfizer	Listerine	silice	ústní hygiena
	Sudafed	fenylefrin HCl	nazální kongesce
InnoZen	Chloraseptic	benzokain/mentol	bolest v krku
	Suppress	mentol	dráždivý kašel
Glaxo	NiQuitin	nikotin	odvykání kouření
Sandoz	Sildenafil Sandoz	sildenafil	erекtilní dysfunkce
Orajel	Ultra Canker Film	benzokain/mentol	bolest v krku
MonoSol Rx	Zuplenz	ondansetron	nauzea, zvracení
	Suboxone	buprenorfin/naloxon	závislost na opioidech
Tesa Labtec	Zolmitriptan Rapidfilm	zolmitriptan	migréna
Hexal AG	Risperidon HEXAL	risperidon	schizofrenie
Meda	Breakyl buccalfilm	fentanyl	průlomová bolest

Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Orální filmy – vlastnosti a složení

- komfortní, diskretní LF
- výhodnější vlastnosti než bukalními a ODT
- nestabilita ve vlhkém prostředí
- omezená velikost a hmotnost



Filmotvorné polymery

- zajišťují mechanickou odolnost filmu a vhodné chování při aplikaci
- určují typ OF (BMF: deriváty celulosy, chitosan, karbomery; ODF: pullulan, deriváty škrobu)

Plastifikátory

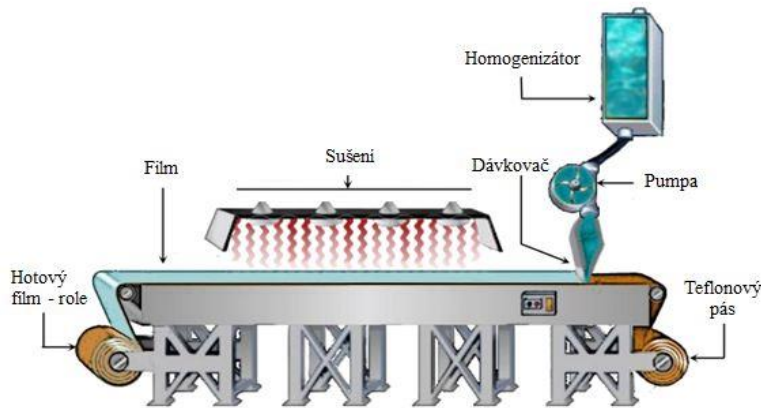
- Snižují teplotu skelného přechodu polymerů, tím zvyšují flexibilitu a redukují křehkost filmů (např. glycerol, propylenglykol, sorbitol)

Další

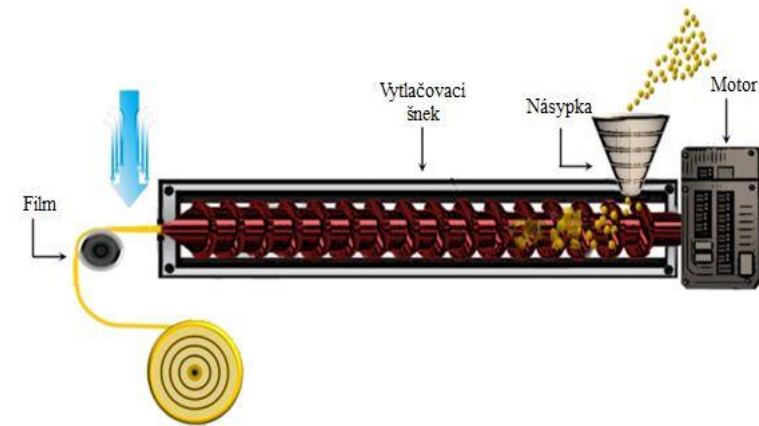
- rozpouštědla, plniva, barviva, chuťová korigencia, urychlovače vstřebávání, stimulatory tvorby slin, aj.

Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Orální filmy - metody přípravy a výroby



metoda odpařování rozpouštědla
(solvent casting)



extruze taveniny
(hot-melt extrusion)



metoda tisku léčiva
(printing methods)

- elektrostat. zvlákňování
- sprejové nanášení
- impregnace

Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Orální filmy – solvent casting technologie

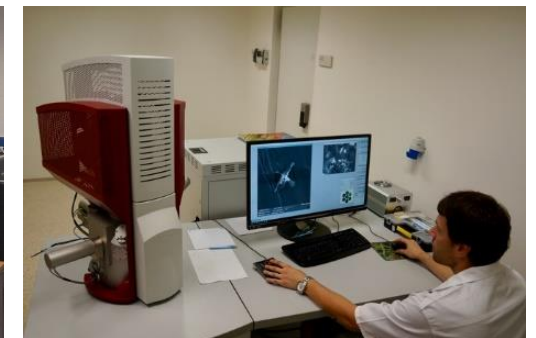
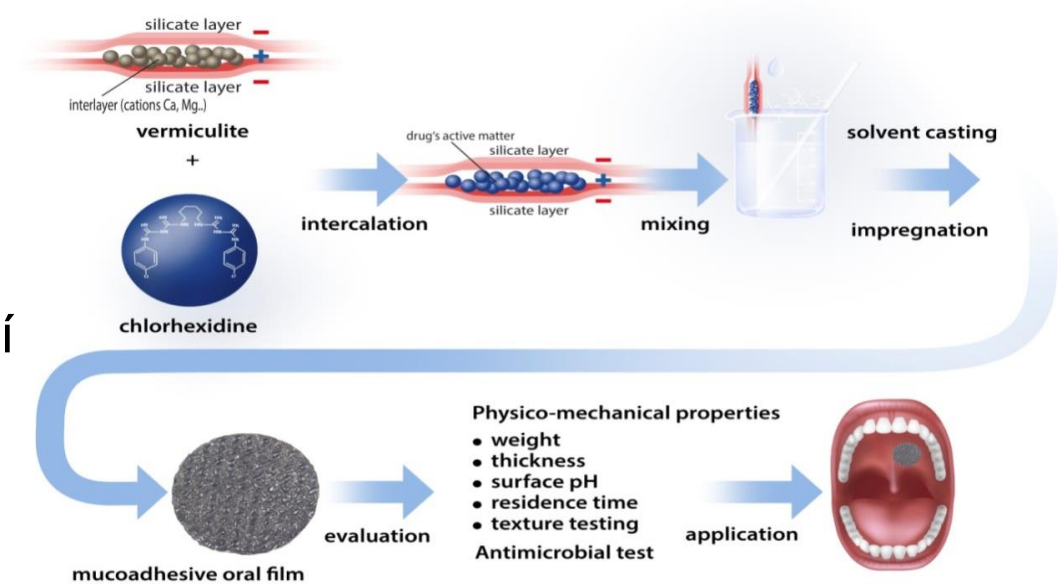
MAF

- mukoadhezivní vrstva – NaCMC, POE, hyaluronan, chitosan x krycí vrstva (EC, kostní tmel)
- nystatin, CPX, chlorhexidin, nanokompozity – modifikace uvolňování (směr, čas), setrvání

ODF

- filmotvorné maltodextriny, plastifikátory, desintegranty
- BZD, bisulepin, moxastin

358 Vědecká příprava pro ZL

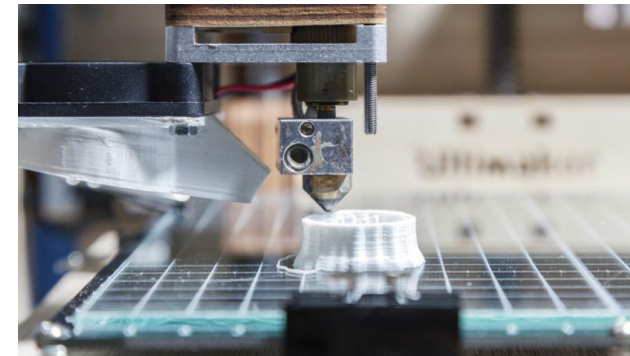


MUNI
MED

Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Tiskové technologie v přípravě lékových forem

- 2D (inkjet) i 3D (mSSE)
- Relativní jednoduchost procesu
- Perspektiva praktického uplatnění – GAMU 2020 – řešení uživatelského rozhraní a právního rámce
- **Individualizace** dávky, kombinace léčiv, přesná depozice, flexibilita návrhu (velikost, tvar, forma)
- Nové funkcionality DDS – smart, maskování chuti, zvyšování patient compliance a adherence



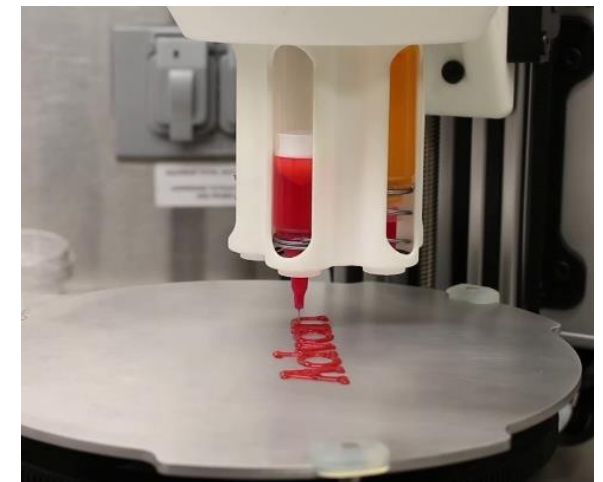
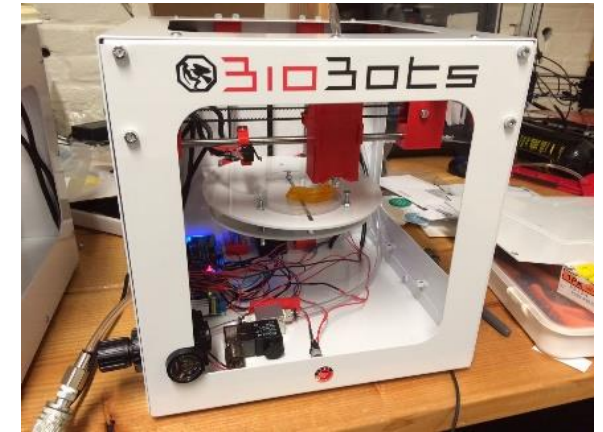
ZipDose® technologie - patent Aprecia



Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Orální filmy – printing technologie

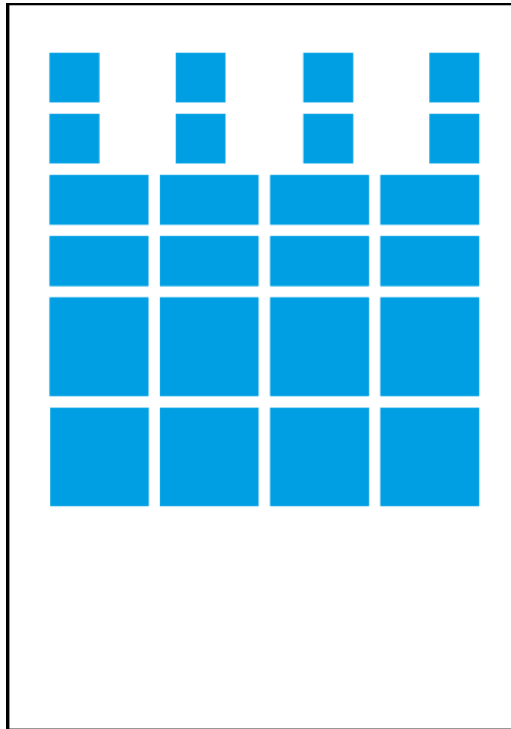
- Rychlá a nízkonákladová modifikace výroby v malých šaržích
- Možnost definovat dávku, typ uvolňování, tvar, velikost, barvu atd.
- LF s vlastnostmi nedosažitelnými klasickou výrobou (kompartmentalizace, komplexní tvary)
- Pre/klinická fáze výzkumu nových léčiv
- LF na míru pacientovi - dávka, forma, stabilita (příprava v čase potřeby)
- Příprava/výroba v místě potřeby – rozvojové země (outbreak)



Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Orální filmy – 2D tisk

- Vhodné pro nízké dávky, citlivé API
- Přesnost depozice při vícevrstevném tisku



Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Orální filmy – 3D biotisk

- Aplikace principů a techniky 3D tisku pro tisk biomateriálů do podoby jak lékových forem, tak biomedicínských objektů (implantáty, tkáně, orgány, aj.), nahrazujících své přírodní ekvivalenty
- Tisk bioinkoustů (bioinks = směsi buněk a mezibuněčné hmoty)
- 3 fáze:
 - Pre-processing (mapování tkáně a tvorba 3D modelu)
 - Processing (tisk objektů z bioinkoustu pomocí 3D tiskárny)
 - Post-processing (maturace vytištěných objektů v biorekátorech)



Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

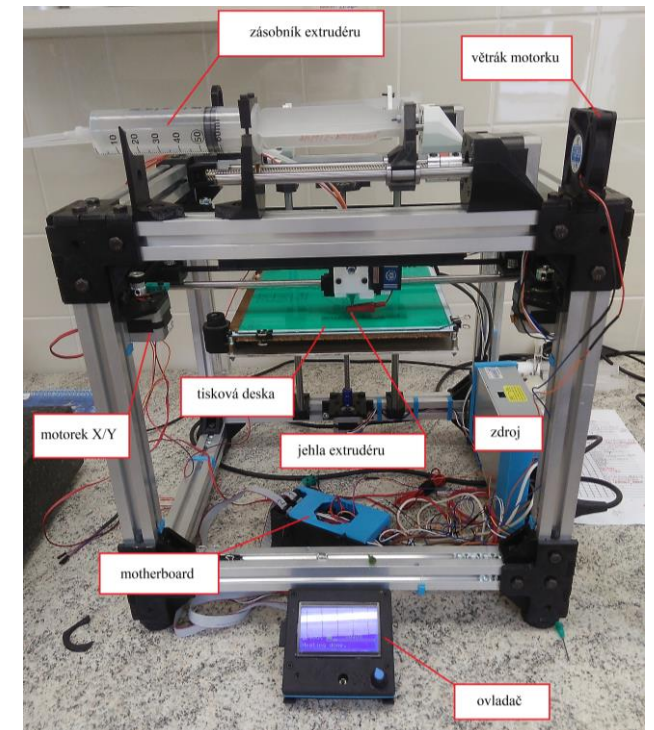
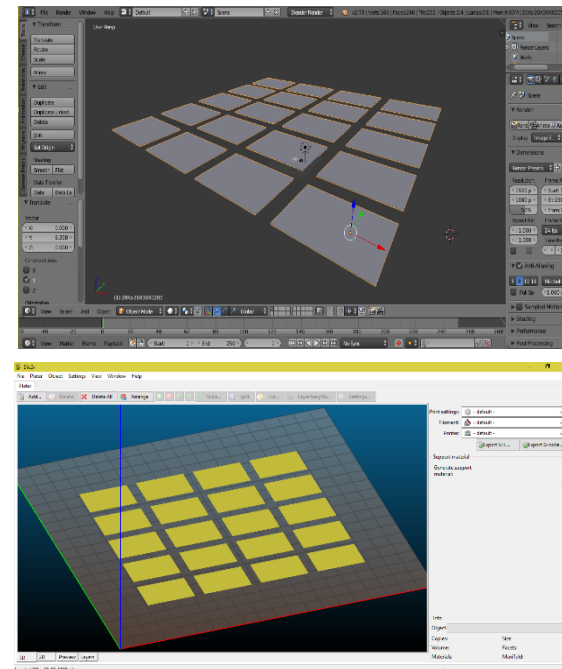
Orální filmy – 3D biotisk

- Laserový biotisk (Laser-based bioprinting)
 - využívá laserovou energii pro vzorkování bioinkoustů v trojrozměrném uspořádání
 - laser - energie - teplo - odpařování kapaliny - ejekce bioinkoustu do dané pozice
- Kapkovací biotisk (Droplet-based bioprinting)
 - aplikace bioinkoustu na substrát ve formě kapek
- Mikroextruzní biotisk (Microextrusion-based bioprinting)
 - extruze bioinkoustu ze zásobníku přes trysku tlakem vzduchu či mechanickou silou na podklad

Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

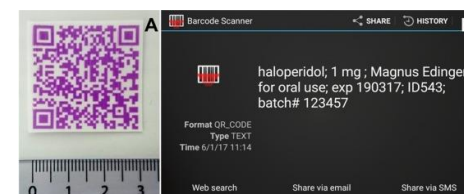
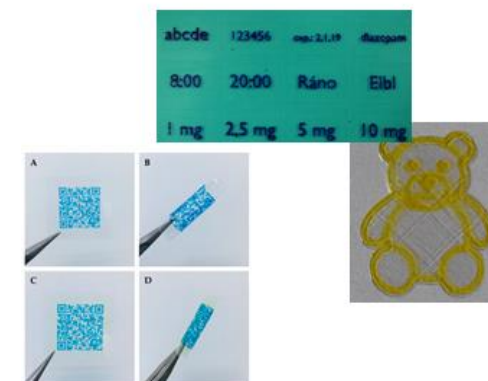
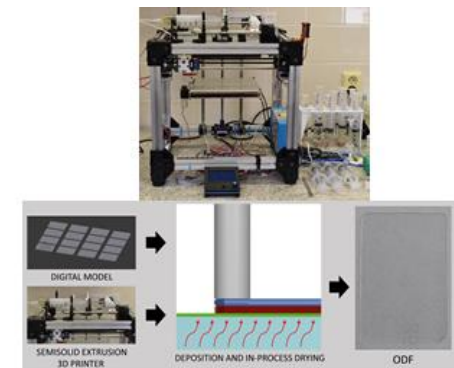
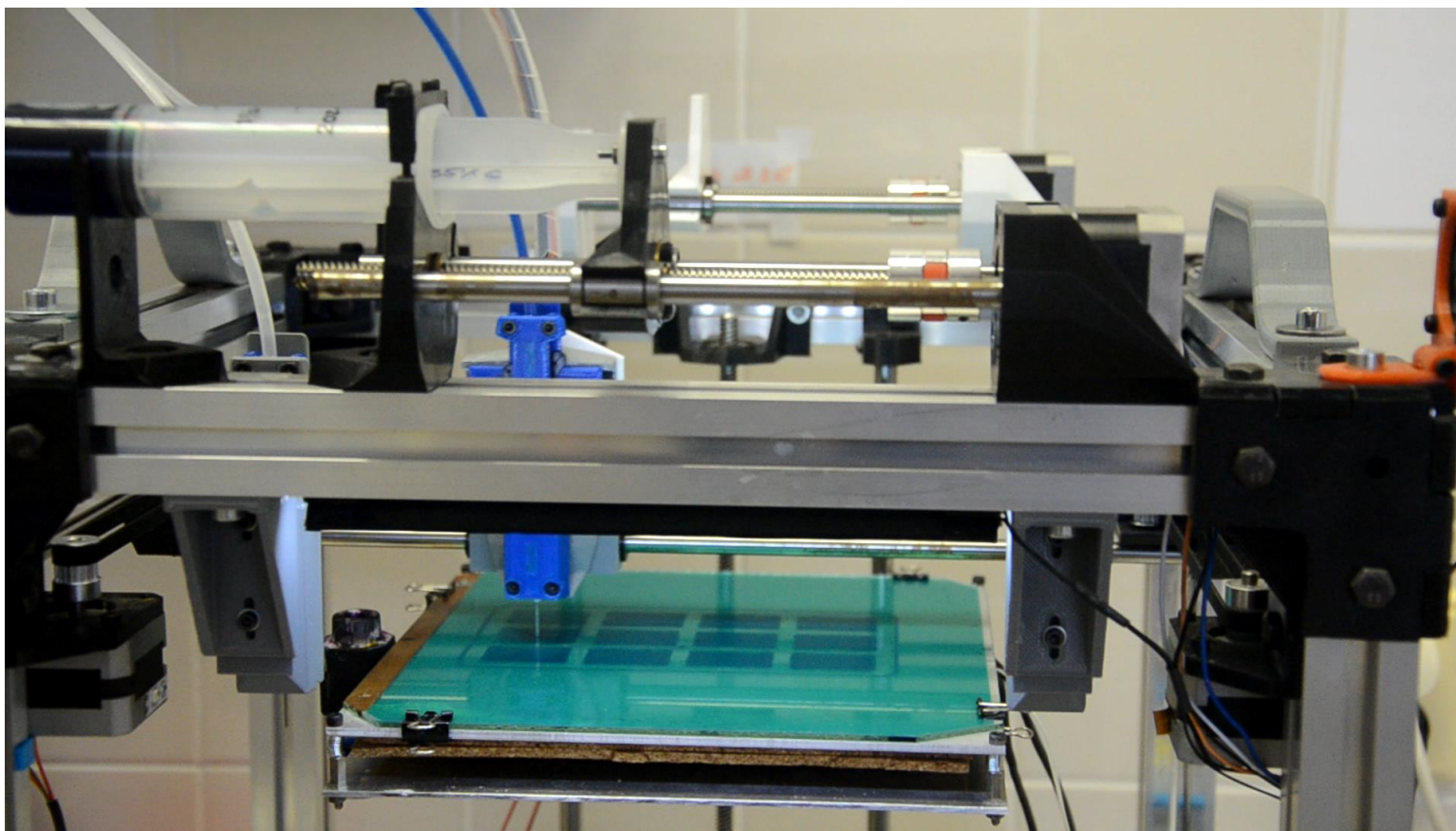
Orální filmy – 3D biotisk

- Příprava ODF metodou 3D tisku obměnami kombinací plastifikátorů a filmotvorných polymerů s cílem přípravy optimální nosné matrice pro potenciální zpracování LL
 - Využití 3D tiskárny a optimalizace jejího nastavení pro tisk ODF o rozdílném složení
 - Hodnocení fyzikálně mechanických vlastností připravených ODF
-
- typ: HyperCube Evolution (dle Scott3D, USA)
 - princip 3D tisku: mikroextruzní pístový tisk
 - firmware: Marlin (Open Source)
 - princip ovládání: systém převodních řemenů
 - 3D orientace pohybu:
 - extrudér = osa X (vlevo/vpravo) a Y (vpřed/vzad)
 - tisková deska = osa Z (nahoru/dolů)



Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Orální filmy – 3D biotisk



Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Orální filmy – publikace

GAJDOŠOVÁ, M., VETCHÝ, D., MUSELÍK, J., GAJDZIOK, J., JUŘICA, J., VETCHÁ, M., HAUPTMAN, K., JEKL, V.: Bilayer mucoadhesive buccal films with prolonged release of ciclopirox olamine for the treatment of oral candidiasis: In vitro development, ex vivo permeation testing, pharmacokinetic and efficacy study in rabbits, International Journal of Pharmaceutics, in press.

ELBL, J., GAJDZIOK, J., KOLARCZYK, J.: 3D printing of multilayered orodispersible films with in-process drying, International Journal of Pharmaceutics, 2020, 575, 118883.

PECHOVÁ, V., GAJDZIOK, J., MUSELÍK, J., VETCHÝ, D.: Development of orodispersible films containing benzydamine hydrochloride using modified solvent casting method. AAPS PharmSciTech, 2018, 19 (6), 2509-2518.

DANĚK, Z., GAJDZIOK, J., DOLEŽEL, P., LANDOVÁ, H., VETCHÝ, D., ŠTEMBÍREK, J.: Buccal films as a dressing for the treatment of aphthous lesions. Journal of Oral Pathology and Medicine, 2017, 46 (4), 301-306.

LUKÁŠOVÁ, I., MUSELÍK, J., VETCHÝ, D., GAJDZIOK, J., GAJDOŠOVÁ, M., JUŘICA, J., KNOTEK, Z., HAUPTMAN, K., JEKL, V.: Pharmacokinetics of ciclopirox olamine after buccal administration in rabbits. Current Drug Delivery, 2017, 14 (1), 99-108.

WALICOVÁ, V., GAJDZIOK, J., PAVLOKOVÁ, S., VETCHÝ, D.: Design and evaluation of mucoadhesive oral films containing sodium hyaluronate using multivariate data analysis. Pharmaceutical Development and Technology, 2017, 22 (2), 229-236.

WALICOVÁ, V., GAJDZIOK, J., VETCHÝ, D.: Orodispergovatelne filmy, technologie jejich výroby a specifické pomocné látky pro přípravu. Chemické listy, 2016, 110 (6), 424-429.

JEKL, V., HAUPTMAN, K., MINARIKOVA, A., KOHUTOVA, S., KNOTEK, Z., GAJDZIOK, J., MUSELIK, J., SEDLAK, L., VETCHÝ, D.: Pharmacokinetic study of benzylpenicillin potassium after intramuscular administration in rabbits. Veterinary Record, 2016; 179 (1), 18-U59.

GAJDOŠOVÁ, M., VETCHÝ, D., DOLEŽEL, P., GAJDZIOK, J., LANDOVÁ, H., MUSELÍK, J., ZEMAN, J., KNOTEK, Z., HAUPTMAN, K., JEKL, V.: Evaluation of mucoadhesive buccal films containing nystatin. Journal of Applied Biomedicine, 2016, 14, 247-256.

GAJDZIOK, J., HOLEŠOVÁ, S., ŠTEMBÍREK, J., PAZDZIORA, E., LANDOVÁ, H., DOLEŽEL, P., VETCHÝ, D.: Carmellose mucoadhesive oral films containing vermiculite/chlorhexidine nanocomposites as innovative biomaterials for treatment of oral infections. BioMed Research International, 2015, art. nr. 580146.

Výzkum a vývoj moderní orální lékové formy

Orální filmy – projekty

Projekt programu výzkumu a vývoje Ministerstva zdravotnictví "Moderní léková forma pro terapii orálních kandidóz", identifikační kód NT14477, zahájení 2013-05-01, ukončení 2015-12-31

Projekt programu výzkumu a vývoje Ministerstva zdravotnictví " Mukoadhezivní filmy určené ke krytí slizničních defektů dutiny ústní ", identifikační kód NT11396, zahájení 2011-01-01, ukončení 2013-12-31

Projekt programu ALFA "Modifikované materiály pro léčbu chronických a akutních ran a prevenci chirurgických infekcí ve zdravotnictví" č. TA 01010244, zahájení 2011-01-01, ukončení 2013-12-31

Projekt programu "Trvalá prosperita" "Nové farmaceutické produkty na bázi polysacharidů", evidenční číslo 2A-1TP1/073, zahájení 2006-01-01, ukončení 2011-12-31 (člen řešitelského týmu) RICHTER, J.: Nové farmaceutické produkty na bázi polysacharidů. MPO 2A-1TP1/073.

LANDOVÁ, H., GAJDZIOK, J., VETCHÝ, D., ČUJANOVÁ, M., KOVÁŘOVÁ, M., HAVLOVÁ, E., JAKEŠOVÁ, B., JUŘENOVÁ, L.: Formulace a hodnocení mukoadhezivních flexibilních filmů připravených metodou impregnace. IGA VFU Brno No. 4/2011/FaF.

VETCHÝ, D., LANDOVÁ, H., GAJDZIOK, J., WALICOVÁ, V., KOVÁŘ, M., KULTANOVÁ, L., SZETEIOVÁ, S.: Bukální filmy pro lokální terapii kandidových infekcí. IGA VFU Brno No. 78/2012/FaF.

VALTUSOVÁ, M., VETCHÝ, D., GAJDZIOK, J., DOLEŽEL, P., LANDOVÁ, H.: Moderní léková forma pro lokální antimykotickou terapii. IGA VFU Brno No. 96/2013/FaF.

WALICOVÁ, V., GAJDZIOK, J., KULHÁNKOVÁ, A., VETCHÝ, D., VALTUSOVÁ, M., FABÍKOVÁ, M.: Příprava a hodnocení matricových orálních filmů jako potenciálních nosičů léčiv. IGA VFU Brno No. 308/2015/FaF.

HOŘAVOVÁ, H., BLAHÁČKOVÁ, D., GAJDZIOK, J.: Bioprinting - návod a instruktážní video pro předměty "Lékové formy vyšších generací" a "Cvičení diplomantů". IVA VFU Brno No. 2019FaF/3130/77.

Použité zkratky

- DÚ – dutina ústní
- API – active pharmaceutical ingredient
- LL – léčivá látka
- NSAIDs – non-steroidal anti-inflammatory drugs
- ATB – antibiotika
- MA – mukoadheze/mukoadhezivní
- LF – léková forma
- ODT – orodispergovatelná tableta
- OF – orální film
- BMF – bukální mukoadhezivní film
- ODF – orodispergovatelný film
- MAF – mukoadhezivní film
- NaCMC – sodná sůl karmelosy
- POE – polyoxyethylen
- CPX – cyklopiroxolamin
- EC - ethylcelulosa
- BZD – benzydamin
- mSSE – micro-semisolid extrusion
- DDS – drug delivery system

Mukoadhezivní filmy určené ke krytí defektů sliznice dutiny ústní

Podpořeno z programového projektu IGA MZ ČR 2011-2013 s reg. č. NT11396

MUDr. et MUDr. Zdeněk Daněk, Ph.D.

Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie, Fakultní nemocnice Brno

Mukoadhezivní filmy určené ke krytí defektů sliznice dutiny ústní

Cíl výzkumu

Stomatitis aphtosa – aphtosis minor



+



?

=



Mukoadhezivní filmy určené ke krytí defektů sliznice dutiny ústní

Členové týmu



Ústav technologie léků

doc. PharmDr. Jan Gajdziok, Ph.D.

doc. PharmDr. Mgr. David Vetchý, Ph.D.

Příprava a vývoj mukoadhezivní
lékové formy



Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie FN Brno

MUDr. et MUDr. Zdeněk Daněk, Ph.D.

Klinické testování



Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie FN Ostrava

MUDr. et MUDr. Jan Štembírek, Ph.D.

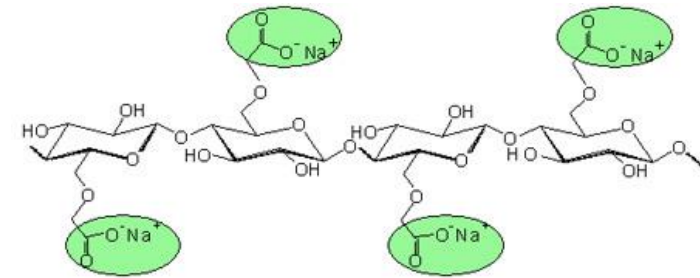
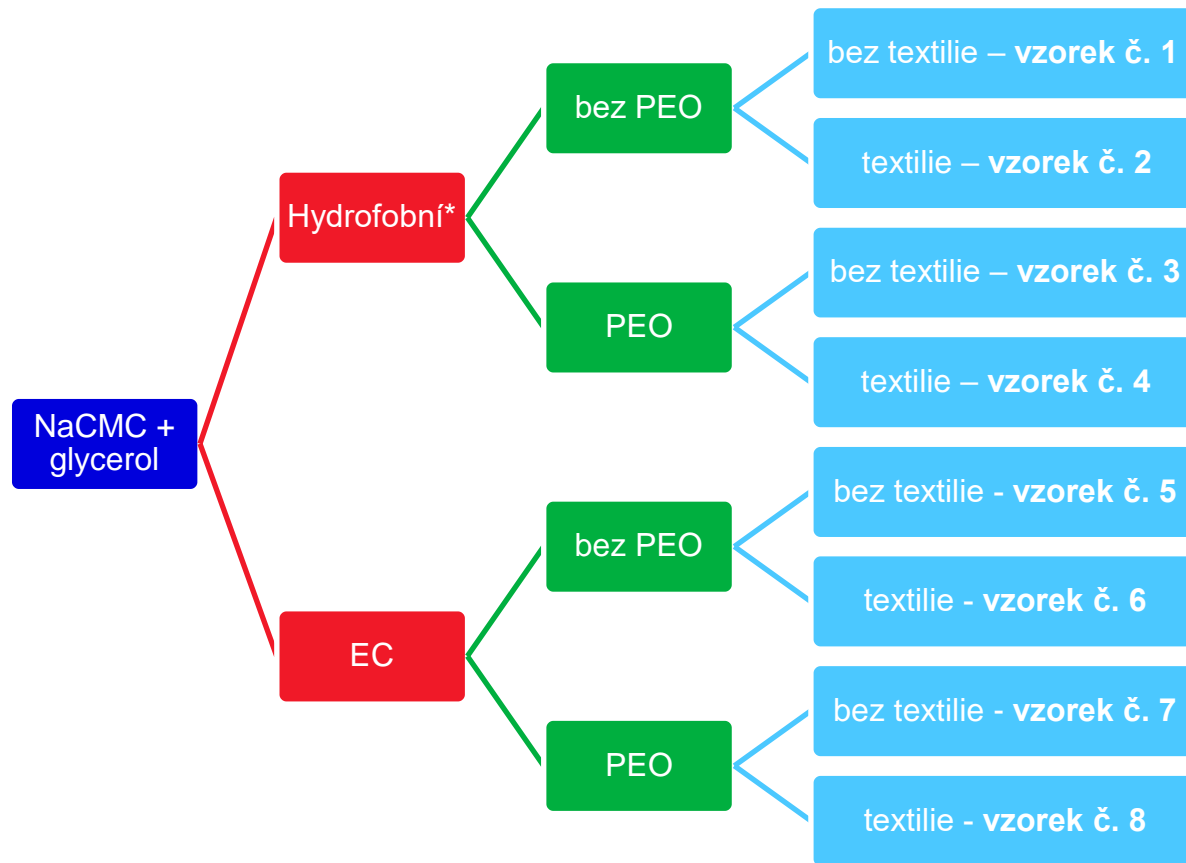
Klinické testování

Mukoadhezivní filmy

- Krycí vrstva a mukoadhezivní vrstva – mukoadhezivní polymery
 - schopnost vytvářet s biologickými povrchy adhezivní interakce (slizová vrstva)
 - vhodný polymer musí splňovat
 - netoxičnost, nedráždivost, biodegradabilita
 - odolný v prostředí fyziologického pH v dutině ústní
 - viskózně-elastické vlastnosti
 - rychlé přilnutí ke sliznici
 - stabilita



Příprava mukoadhezivních filmů



**sodná sůl
karboxymethylcelulózy
(Na-CMC)**

EC – etylcelulóza

PEO – polyetylenoxid

NaCMC - sodná sůl karboxymethylcelulózy

* směs bílého včelího vosku a bílé vazelíny

Pilotní studie

– Klinický test na 22 dobrovolnících (11 žen, 11 mužů)

- Schváleno EK FNO (č. 152/2011)
- Hodnoceno pomocí **hodnotícího dotazníku**, informovaný souhlas
- 3 filmy od každého vzorku

– Sledované parametry:

- Doba setrvání filmu
- Příčina uvolnění filmu
- Způsob uvolnění filmu
- Subjektivní pocity během aplikace
- Vzhled filmu

Vzorek 1		1	2	3
Doba setrvání filmu na sliznici (min)		110	40	85
Pocit překážení v ústech (ano/ne)		ne	ne	ne
Pocit tlaku (ano/ne)		ne	ne	ne
Pocit zvýšeného slinění (ano/ne)		ne	ne	ne
Chuť/pachut' (ano-jaká/ne)		ne	ne	ne
Příčina uvolnění filmu	Spontánně	x	x	
	Mluvením			
	Při pití			x
Mechanismus uvolnění filmu	Odloupnutí celé krycí vrstvy			
	Postupné olupování krycí vrstvy	x		x
	Odlepení celého filmu		x	
Bolest (ano/ne)		ne	ne	ne
Otok (ano/ne)		ne	ne	ne
Svědění (ano/ne)		ne	ne	ne
Palení (ano/ne)		ne	ne	ne
Celková reakce (nevolnost, zvracení)		žádná	žádná	žádná
Problémy při aplikaci (jaké)		žádné	žádné	žádné
Hodnocení vzhledu filmu (1-nejlepší až 5-nejhorší)		2	1	1
Hodnocení vzhledu filmu (slovné – deformace filmu, změna barvy, polámani)		Mírně olámané okraje		
Jiné postřehy				Způsobeno teplým nápojem

Pilotní studie

Klinický test:

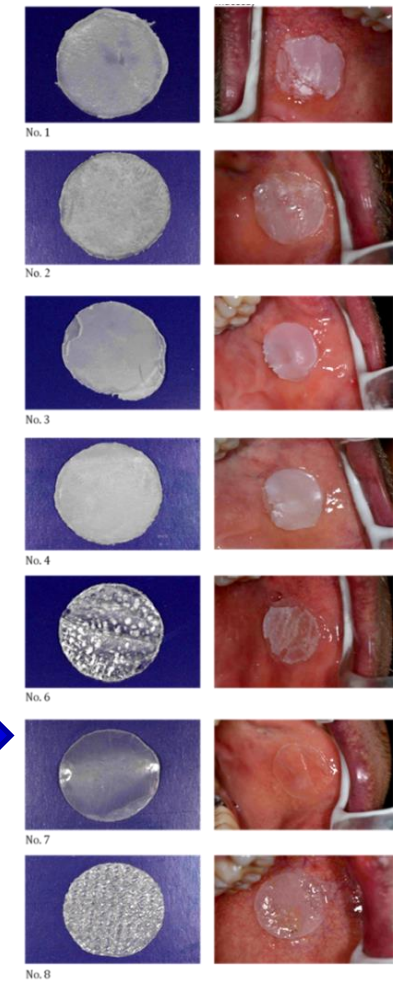
22 dobrovolníků

(11 žen, 11 mužů)

vybrán film č.7

– NaCMC + PEO + EC

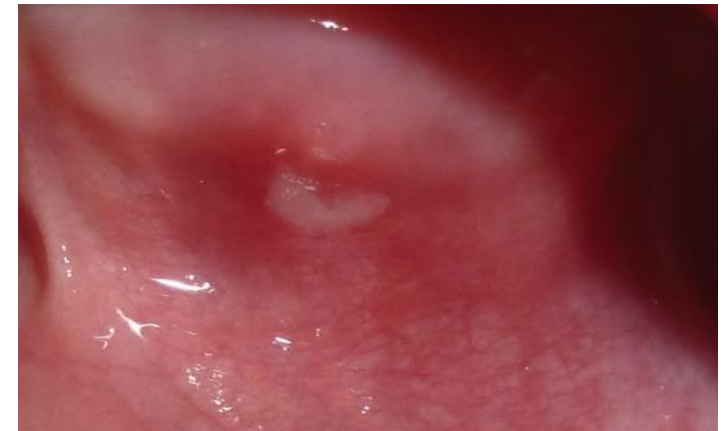
Vzorek	Průměr [min]	SD [min]	min [min]	max [min]
1	74.18	5.13	68.27	77.55
2	65.29	2.61	62.27	66.86
3	87.26	6.06	81.64	93.68
4	71.05	3.15	68.05	74.32
5	-	-	-	-
6	53.24	5.38	47.41	58.00
7	98.12	1.75	96.18	99.59
8	81.00	8.47	73.86	90.36



[Vetchý et al., 2014](#)

Klinická studie – terapie aftozního onemocnění dutiny ústní

- Vybrání pacienti s **aphtosis minor**
- Příčina multifaktoriální, odhad postižení populace 5-60%
- Přesný mechanismus vzniku není zatím plně znám
- Ohraničené epiteliální nekrózy až vředy s cirkulárním erytémem
- Výskyt na nekeratinizující sliznici
- Defekty do 1cm
- Neexistuje kauzální léčba



Klinická studie – terapie aftozního onemocnění dutiny ústní

- Schváleno EK FNO (č. 25/2013)
- Hodnoceno pomocí hodnotícího dotazníku, informovaný souhlas
- 36 pacientů
 - kontrolní skupina 18 – léčena pomocí Mundisal gelu
 - experimentální skupina 18 – léčena pomocí mukoadhezivního filmu + Mundisal gelu

Vědecká příprava pro ZL


Hodnotící dotazník – skupina pacientů léčená pomocí krycího filmu

1) Vyplňuje pacient

Počet dní výskytu aftů před zahájením terapie:

Hodnocení bolesti na stupnici od 1 -10 (viz. obr)	I. den			II. den			III. den			IV. den			V. den		
	R*	P	V	R	P	V	R	P	V	R	P	V	R	P	V

* R – ráno, P – v poledne, V – večer



Doba setrvání filmu na sliznici (min)	I. den			II. den			III. den			IV. den			V. den		
	R*	P	V	R	P	V	R	P	V	R	P	V	R	P	V

	I. den	II. den	III. den	IV. den	V. den
Problémy při aplikaci**					
Příčina uvolnění***					
Jiné postřehy****					

** 0 - žádné, 1 - nepřilnutí filmu ke sliznici, 2 - srolování filmu, 3 - nemožnost rozlíst krycí a lepicí vrstvu, 5 - obtížná dostupnost léze

*** 0 - žádná, 1 - spontánní, 2 - mluvením, 3 - při pití, 4 - při jídle

**** 0 - žádné, 1 - pachuť, 2 - diskomfort, 3 - překážení v ústech, 4 - zvýšené slinění, 5 - olupování filmu

2) Vyplňuje lékař

Měření léze (prováděno lékařem)	I. den	III. den	V. den
Velikost nekrózy + halo (mm)			
Velikost nekrózy (mm)			
Potřizemí fotodokumentace A-N			

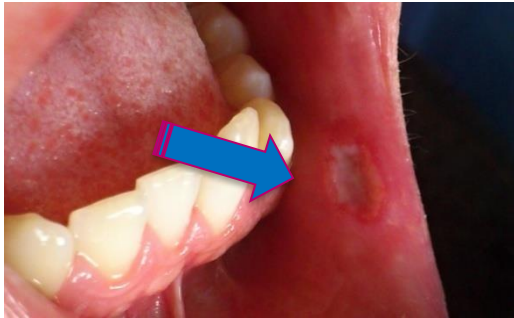
– Subjektivní:

- Hodnocení bolesti – VAS
- Kritérium vyléčení VAS ≤ 2

– Objektivní:

- doba setrvání léčiva vs. film
- měření velikosti léze

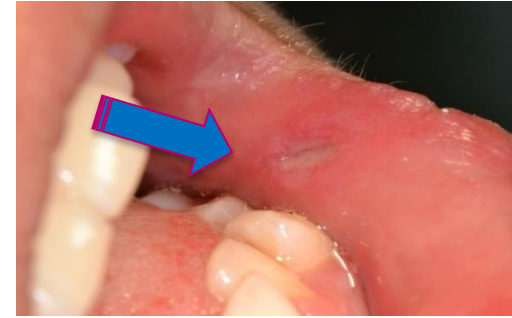
Klinická studie - terapie aftozního onemocnění dutiny ústní



Den č. 1



Den č.3



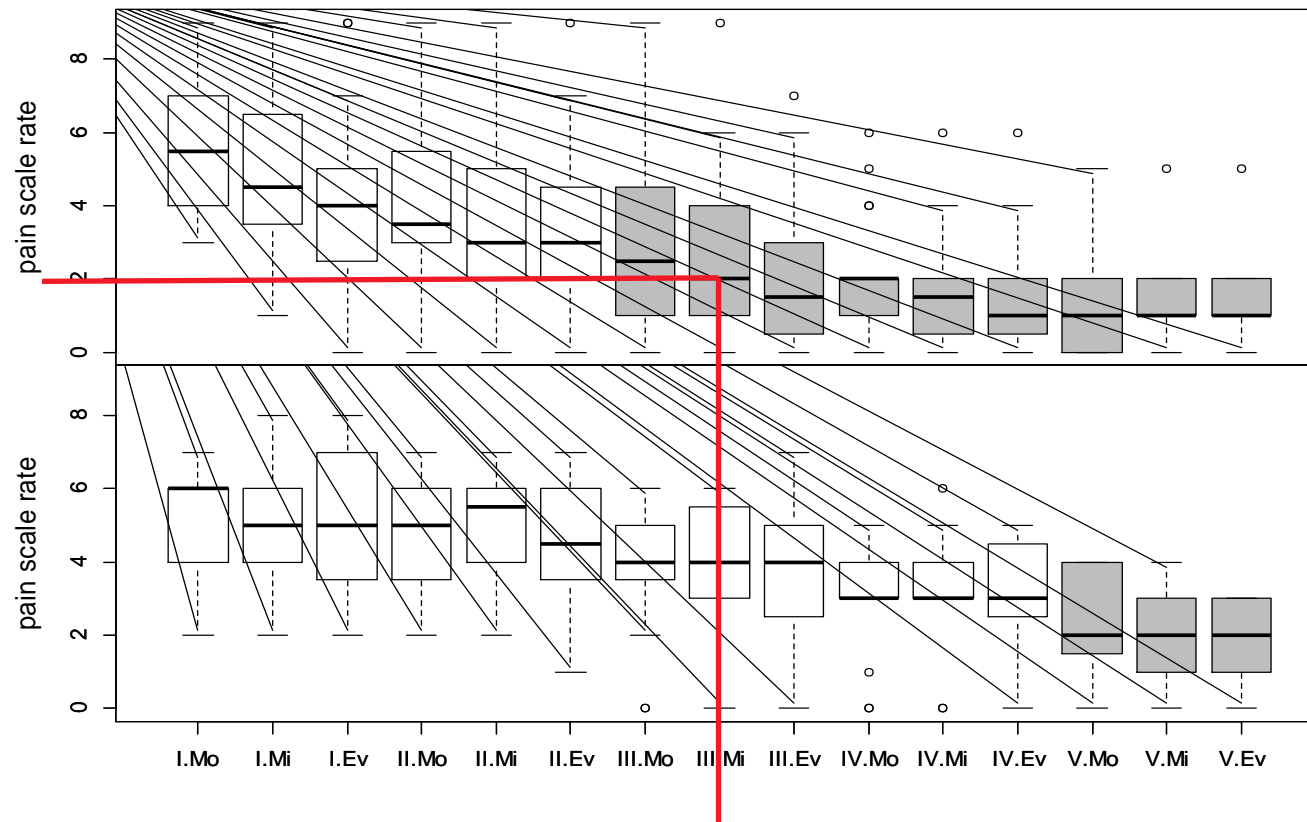
Den č. 5

Kontrolní skupina



Experimentální skupina
s mukoadhezivním
filmem

Klinická studie - terapie aftozního onemocnění dutiny ústní



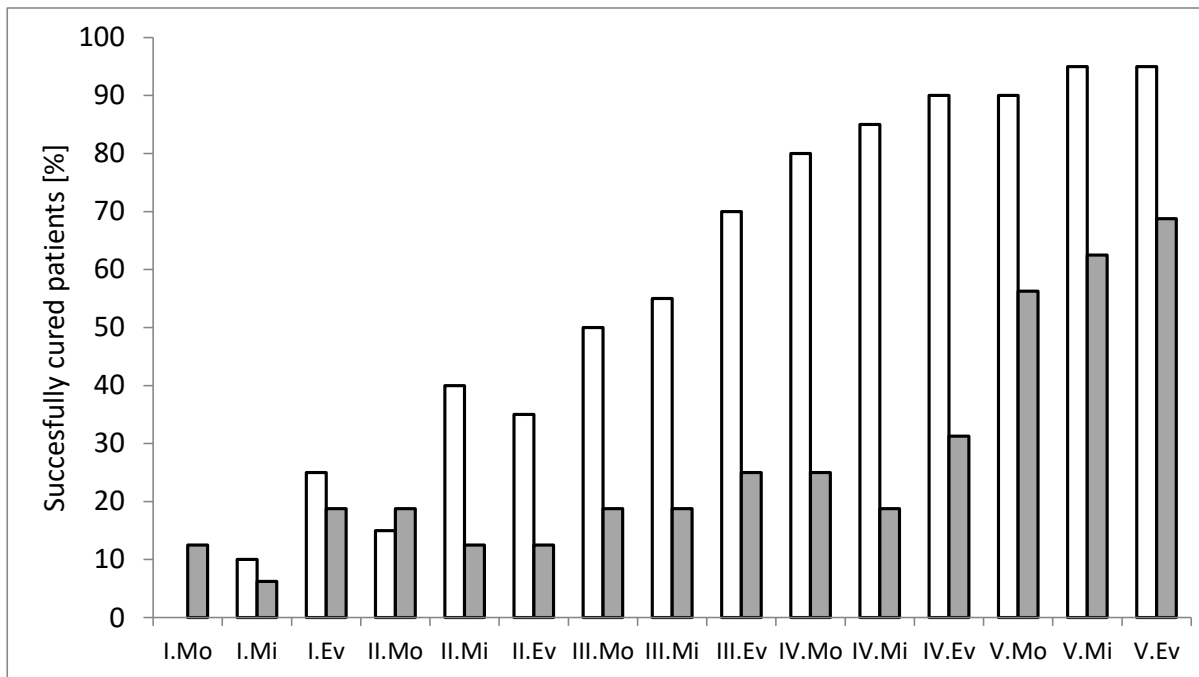
Krabicové grafy zaznamenávající
BOLEST v jednotlivých časových
bodech

experimentální skupina (nahore)

kontrolní skupina (dole)

(Tukey-Kramerův test s
Nemenyiho úpravou, $p < 0,05$)
(Mo – ráno, Mi – poledne, Ev –
večer)

Klinická studie - terapie aftozního onemocnění dutiny ústní



Relativní **počet (%) úspěšně vyléčených** pacientů v jednotlivých časových bodech

experimentální skupina (bílé sloupce)

kontrolní skupina (šedé sloupce)

(Mo – ráno, Mi – poledne, Ev – večer)

Klinická studie - terapie aftozního onemocnění dutiny ústní

Velikost lézí

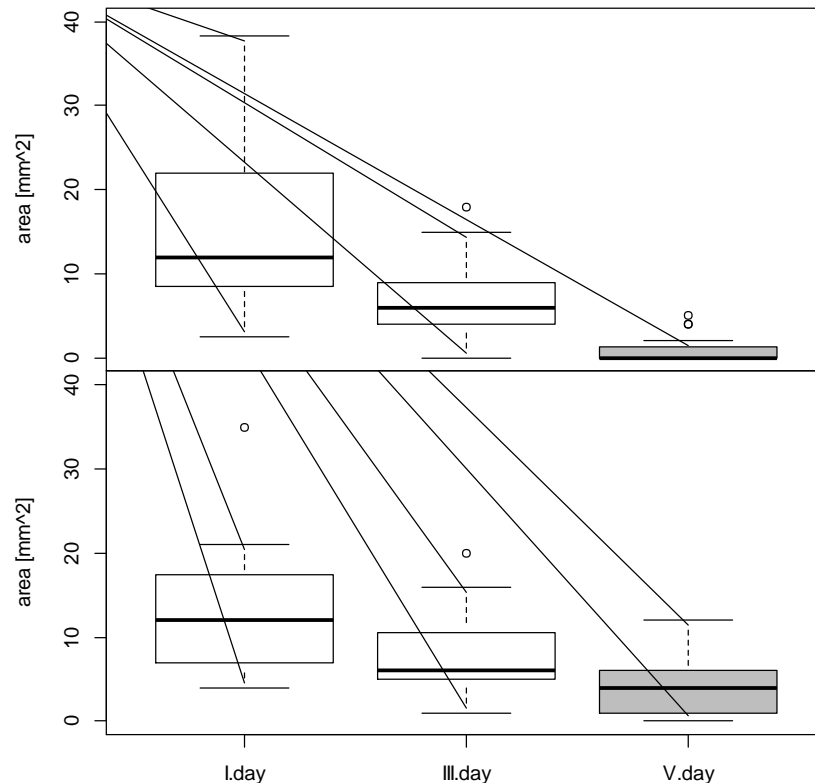
v experimentální (nahore)

a kontrolní (dole) skupině

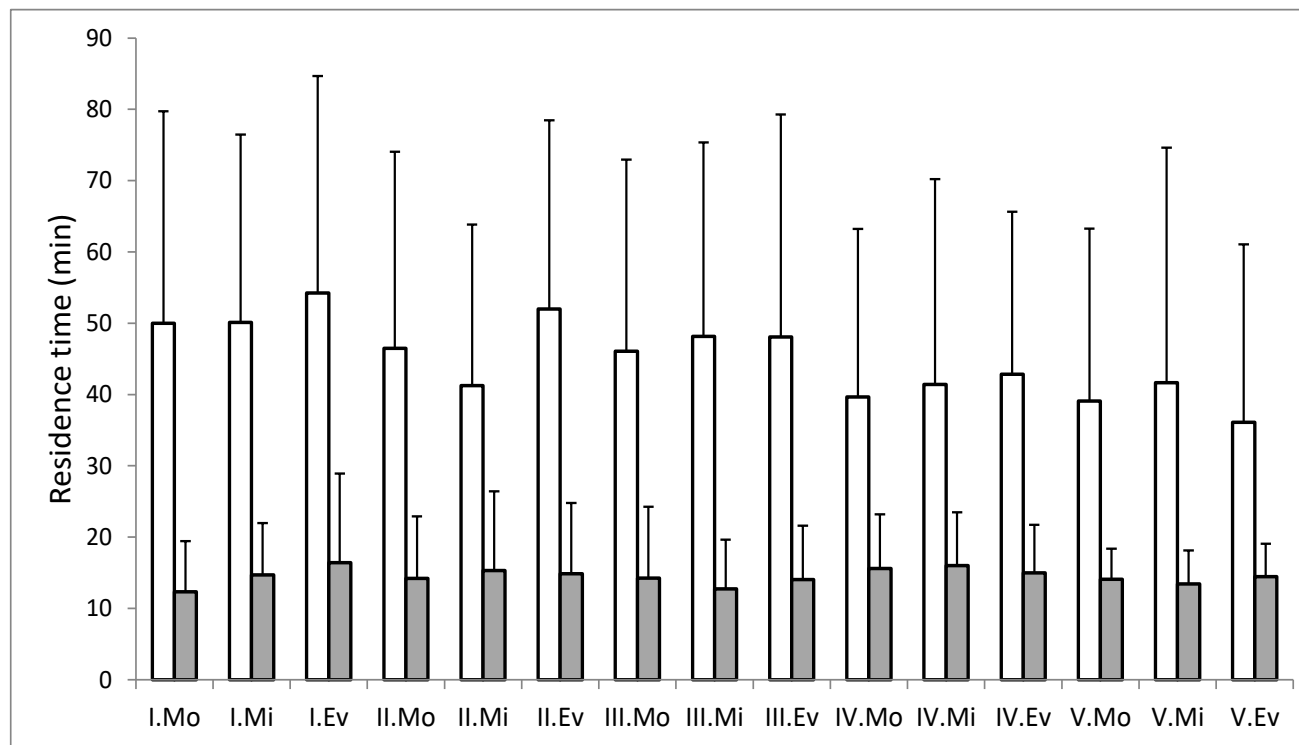
1., 3. a 5. den terapie.

Boxy zvýrazněné šedou barvou znázorňují časové body statisticky významně odlišné od prvního záznamu

(Tukey-Kramerův test s Nemenyiho úpravou, $p < 0,05$)



Klinická studie - terapie aftozního onemocnění dutiny ústní



Doba setrvání

filmu na sliznici (bílý sloupec) je **3,17x delší** než doba setrvání gelu na sliznici u kontrolní skupiny (šedý sloupec).

(t-test, $p < 0.001$)

(Mo – ráno, Mi – poledne, Ev – večer)

Daněk Z, Gajdziok J, Doležel P, Landová H, Vetchý D, Štembírek J. Buccal Films as a Dressing for the Treatment of Recurrent Aphthous Stomatitis. J Oral Pathol 2017, Apr;46(4):301- 306

Klinická studie - terapie aftozního onemocnění dutiny ústní

Výsledky

Snížení bolestivosti

Experimentální skupina - **3.den**

Kontrolní skupina - **5.den**

Experimentální skupina - **3,17x delší kontakt léčiva** s lézí než kontrolní skupina

Překrytí léze



Prodloužení doby kontaktu léčiva



Rychlejší hojení

Mukoadhezivní filmy určené ke krytí defektů sliznice dutiny ústní

Vize

Inkorporace nanokompozitního nosiče látek do mukoadhezivního filmu
(patent)

Zlepšení vlastností mukoadhezivních filmů, prodloužení doby setrvání
filmu na sliznici

Klinické studie

Budoucnost  **převedení do praxe**

Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku

Podpořeno z prostředků Lékařské fakulty MU Juniorský výzkumník – ROZV/28/LF4/20

MUDr. et MUDr. Zdeněk Daněk, Ph.D.

Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie, Fakultní nemocnice Brno

doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

Stomatologická klinika, Ústav patologické fyziologie, Ústav lékařské genetiky,
Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku



Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku

Faktory ovlivňující orální mikrobiom – alkohol

- Asociace s celkovým složením orálního mikrobiomu a množstvím specifických taxonů

- Zvýšený počet *Neisseria* (metabolizace etanolu na acetaldehyd!!!)

- Vyčerpání komenzálů, prostor pro potenciální patogeny

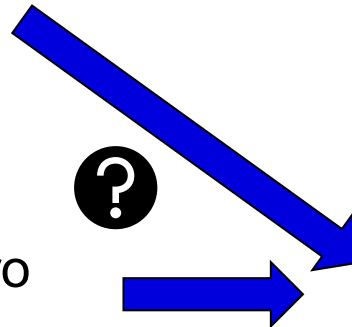


Nadměrné užívání alkoholu

- 2 a více nápojů/den



- 3 a více nápojů/den

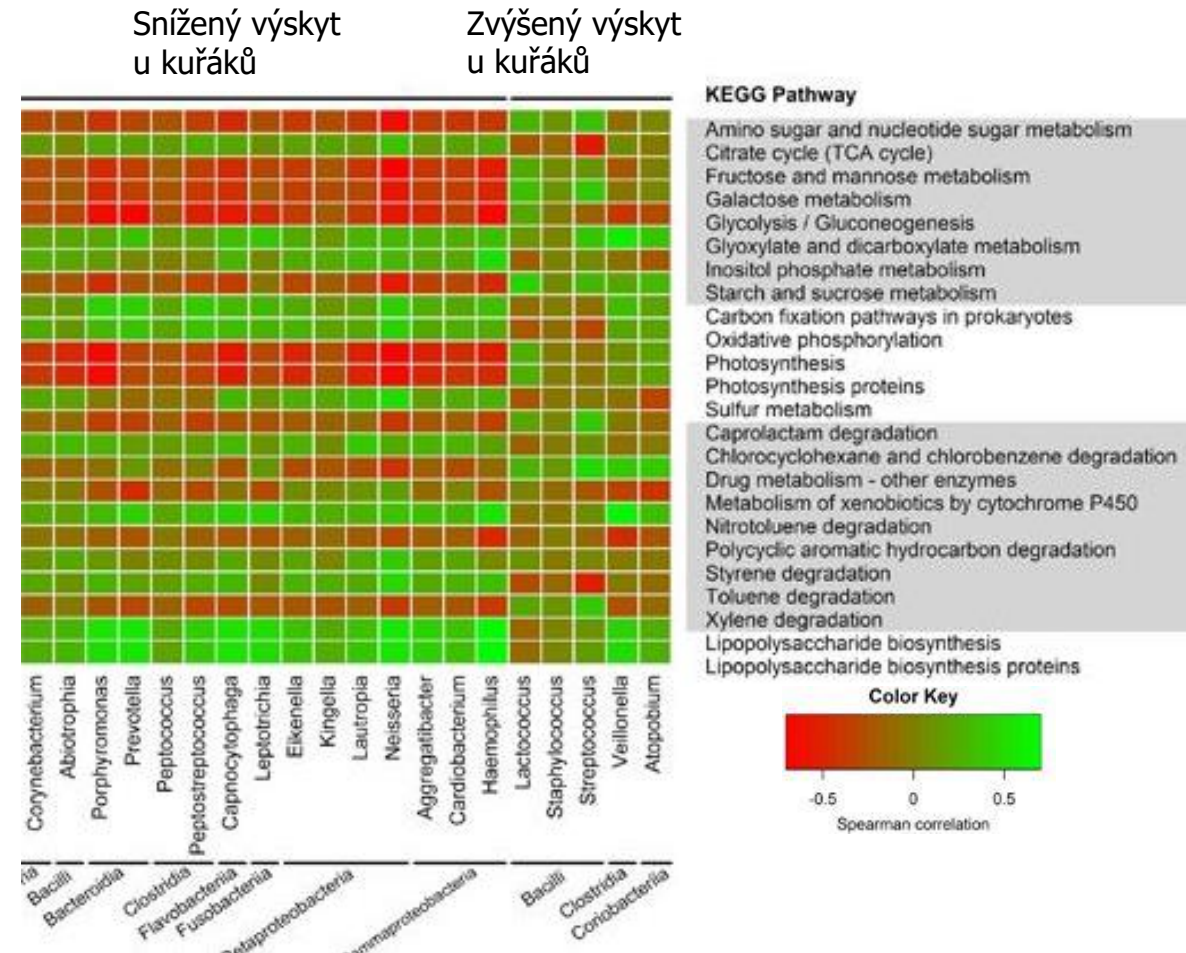


Nádorové onemocnění hlavy a krku
Nádorová onemocnění GIT
Parodontitida

Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku

Faktory ovlivňující orální mikrobiom – kouření

- Rozdíly mezi kuřáky a nekuřáky
- Nebyl rozdíl mezi bývalými kuřáky a nekuřáky
 - Změny nejsou permanentní
- Může podporovat anaerobní orální prostředí a bakteriální komunitu se změněnou schopností xenobiotické degradace



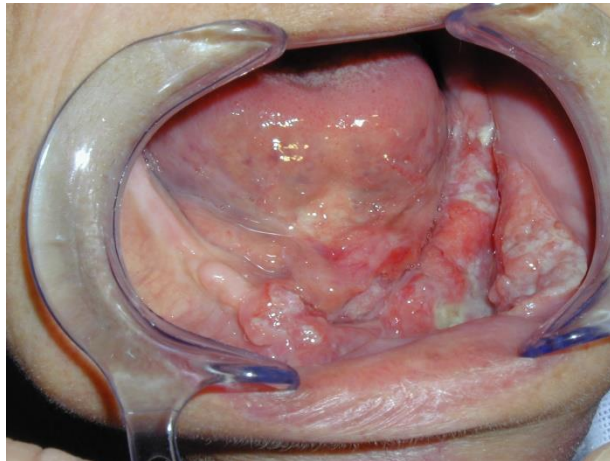
[Wu J. et al., 2016](#)

Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku

Spinocelulární karcinom ústní dutiny (OSCC)

- nejčastěji se vyskytující malignita v orofaciální oblasti
- incidence 4,2/100 000 obyvatel
- mortalita 2,2/100 000 obyvatel

Národní onkologický registr ČR



Spinocelulární karcinom hrany jazyka



Spinocelulární karcinom spodiny dutiny ústní

Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku

Spinocelulární karcinom ústní dutiny (OSCC)

- Častý záchyt pozdních stádií
- Špatná prognóza
- Hledání biomarkerů pro včasnou diagnostiku
- Prognostické biomarkery



Pokročilé stádium spinocelulárního karcinomu alveolu dolní čelisti

Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku

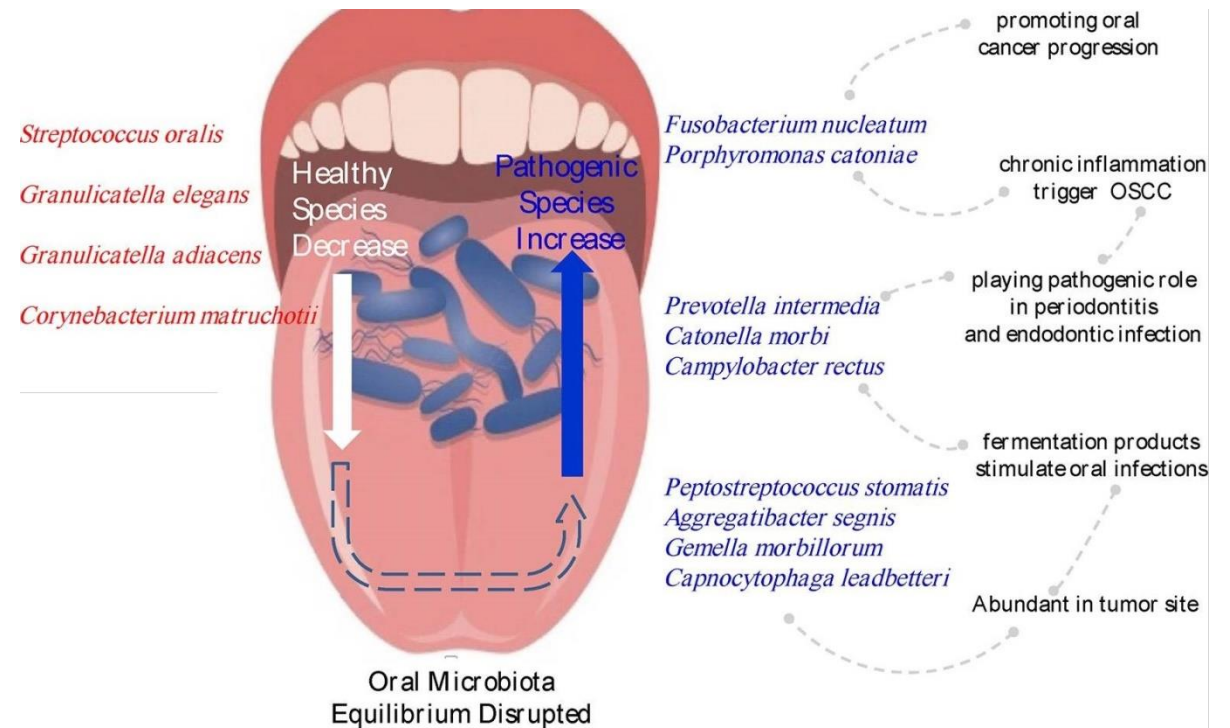
Vztah orální mikrobioty a spinocelulárního karcinomu ústní dutiny

Rizikové faktory

Alkohol Kouření Malhygiena



DYSBIÓZA

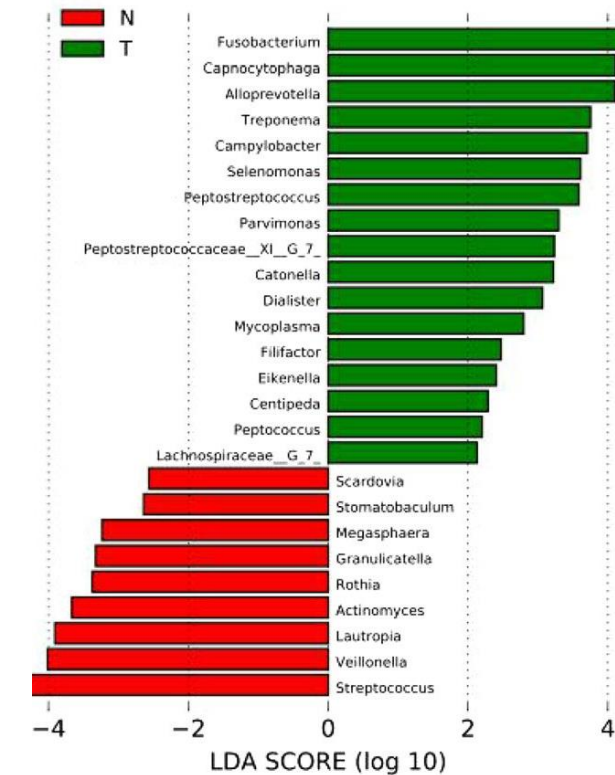
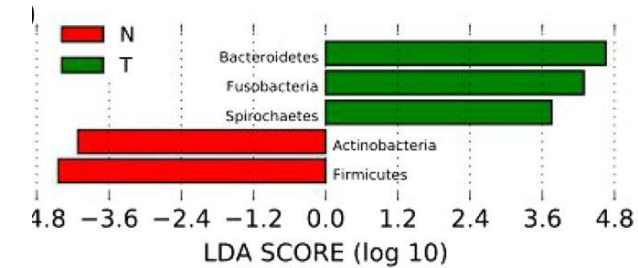


Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku

Spinocelulární karcinom ústní dutiny

Orální dysbióza

- Větší bakteriální diverzita ve vzorcích získaných z tumoru než z normální orální sliznice
- Několik operačních taxonomických jednotek asociovaných s *Fusobacterium* – dobrý diagnostický potenciál pro OSCC



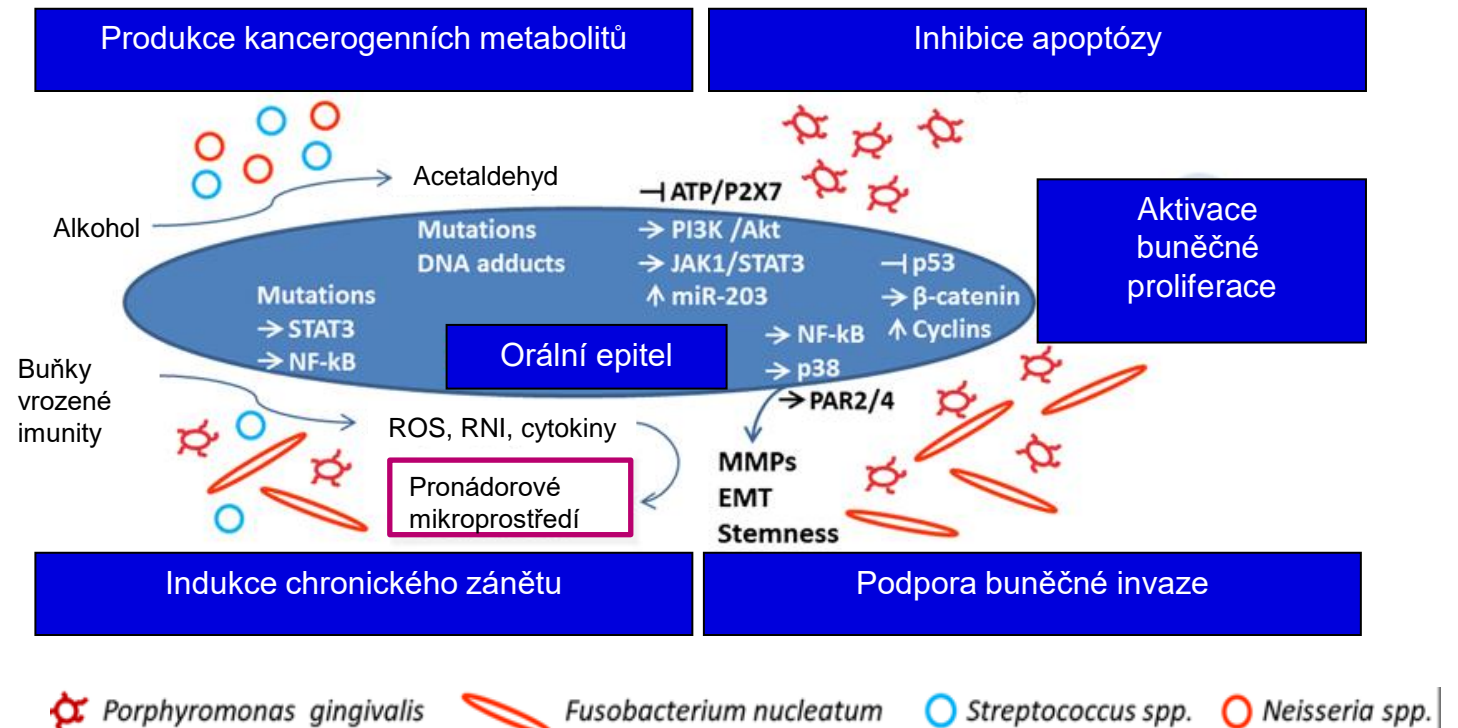
Zhao et al., 2017

Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku

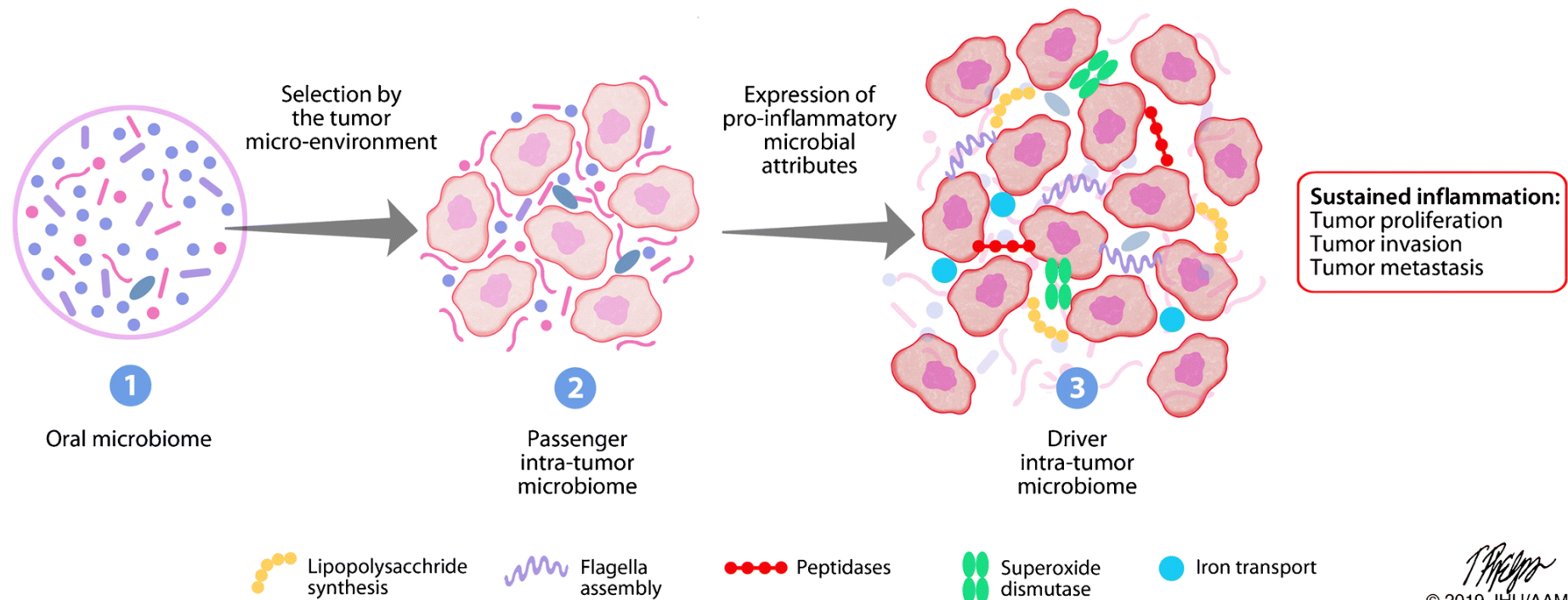
Spinocelulární karcinom ústní dutiny
Orální dysbióza

– *P. gingivalis* a *F. nucleatum*
asociované s OSCC, ale etiologie
nejasná

- narušená funkce původně „pasivního“ mikrobiomu v mikroprostředí nádoru
- přispívá k progresi nádoru tím, že udržuje chronický zánět?



Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku



Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku

Cíle studie

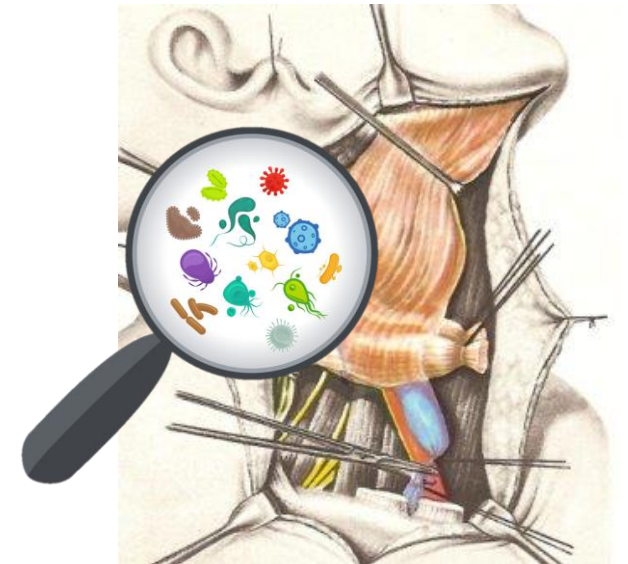
- Determinace rizikových faktorů (orálního mikrobiomu) pro rozvoj nádorového bujení
- Analýza vzájemných interakcí mezi mikrobiotou a hostitelem v kontextu orálního spinocelulárního karcinomu
- Průkaz či vyloučení přítomnosti bakteriální DNA v metastaticky postižených lymfatických krčních uzlinách
- Komparace orální mikrobioty pacientů s orálním spinocelulárním karcinomem v závislosti na stavu jejich dentice



Orální mikrobiom u pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku

Originalita výzkumného projektu

- Orální mikrobiom jako prediktivní marker
- Druhová rozmanitost intratumorózní mikrobioty
- Přítomnost mikrobioty v metastatické tkáni



3D Virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti

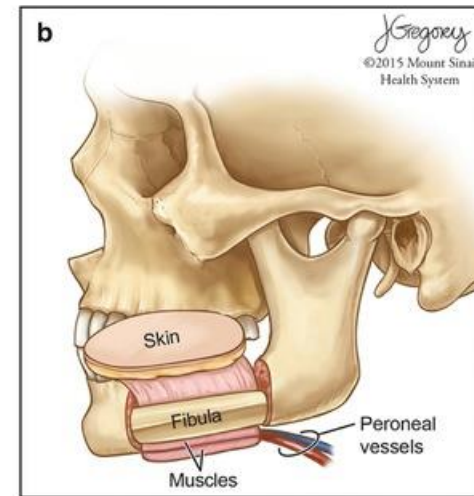
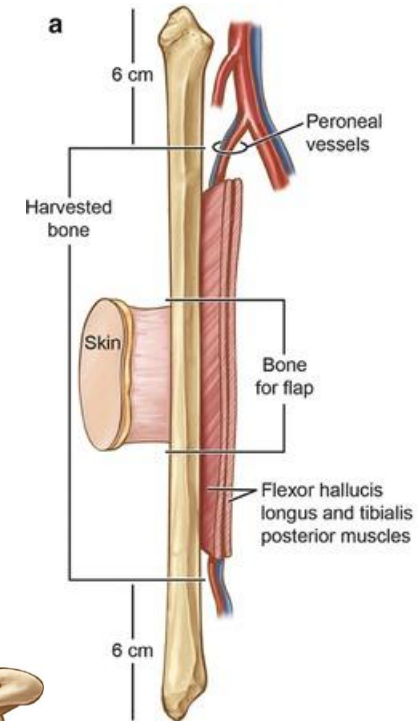
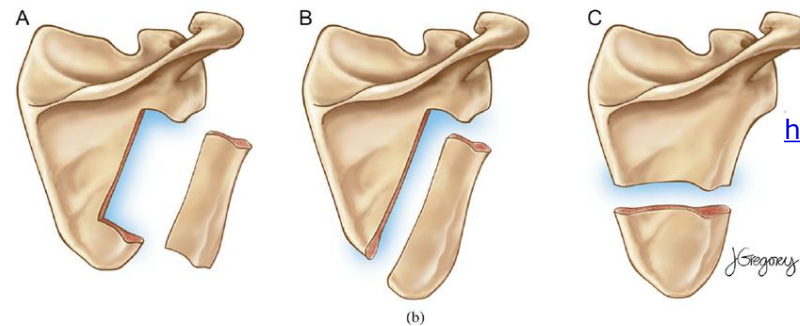
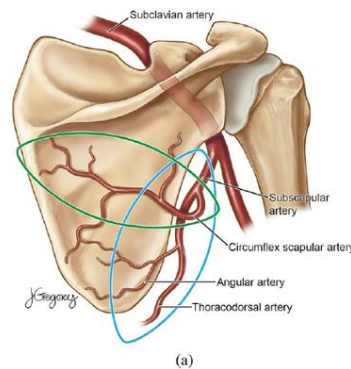
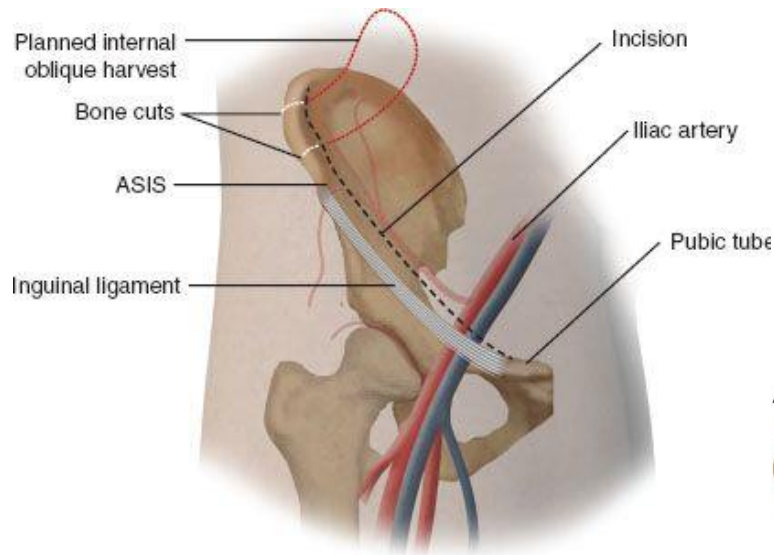
Projekt spolupráce a vývoje s komerční sférou

MUDr. et MUDr. Zdeněk Daněk, Ph.D.

Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie, Fakultní nemocnice Brno

3D virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti

Rekonstrukce dolní čelisti volným lalokem



https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-43854-2_3

3D virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti

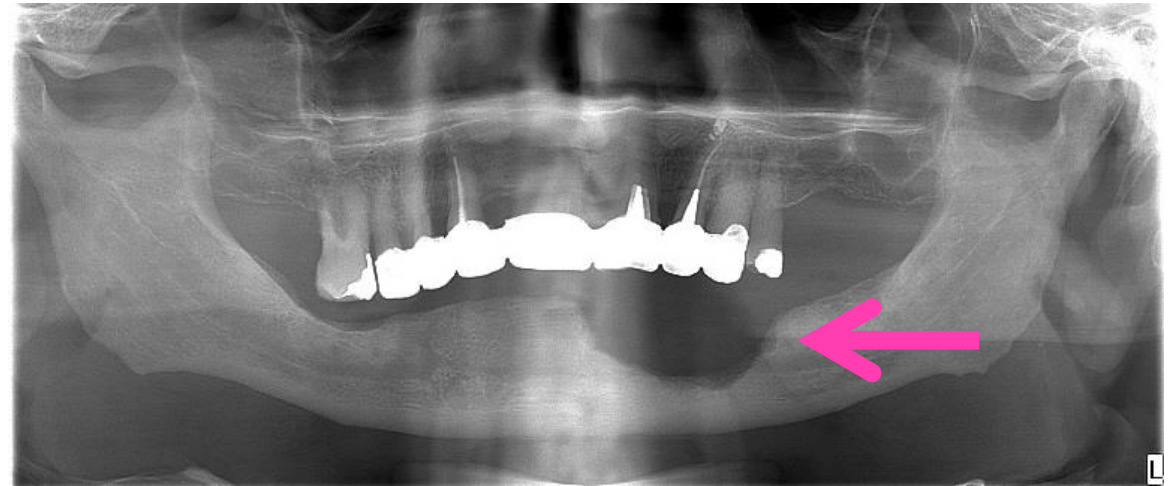
Rekonstrukce mandibuly vaskularizovanou fibulou – kazustika

- Spinocelulární karcinom processus alveolaris mandibulae l.sin – G1
- T4aN0M0
- Resekce čelisti s přerušením kontinuity



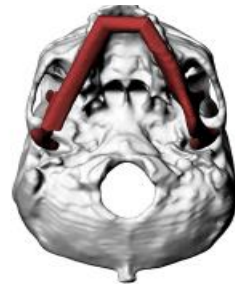
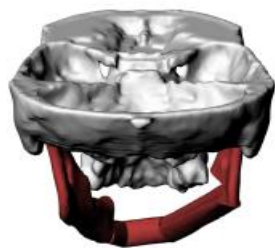
- Nutnost rekonstrukce k obnovení funkce

(bez rekonstrukce invalidizace pacienta permanentní tracheostomií a gastrostomií)



3D virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti

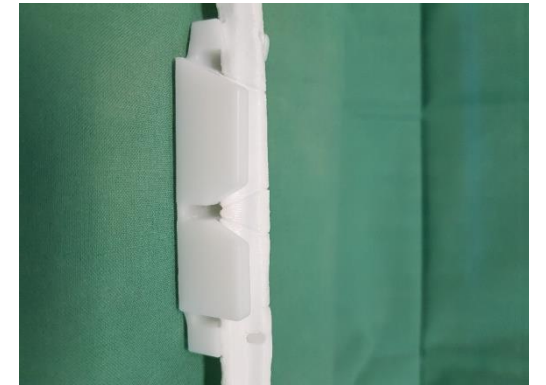
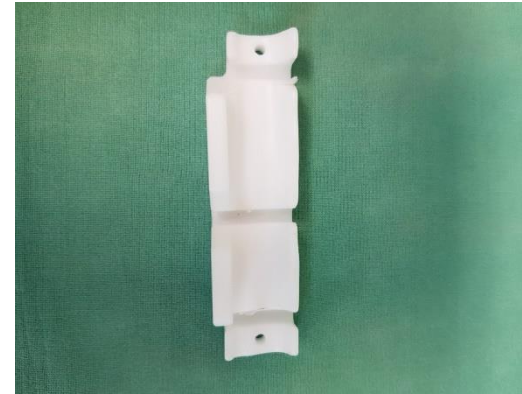
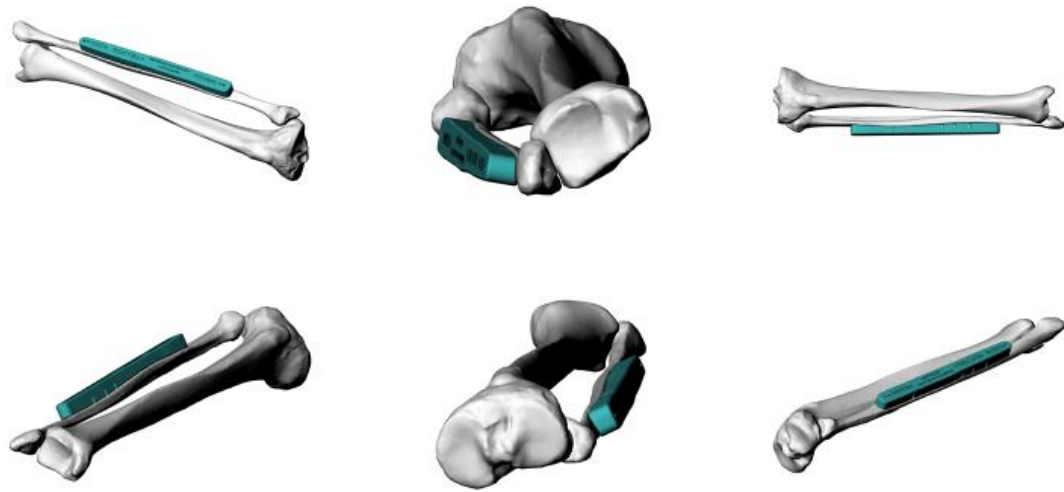
3D plánování rekonstrukce dolní čelisti



Virtuální a tištěný model čelisti s přeneseným fibulárním štěpem
(v porovnání z původním tvarem mandibuly)

3D virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti

3D plánování rekonstrukce dolní čelisti



Virtuální a tištěný model fibuly s řezací šablonou

3D virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti

3D plánování rekonstrukce dolní čelisti



Tištěný model mandibuly s řezacími šablonami

3D virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti

3D plánování rekonstrukce dolní čelisti



Předoperační příprava osteosyntetické titanové dlahy

3D virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti

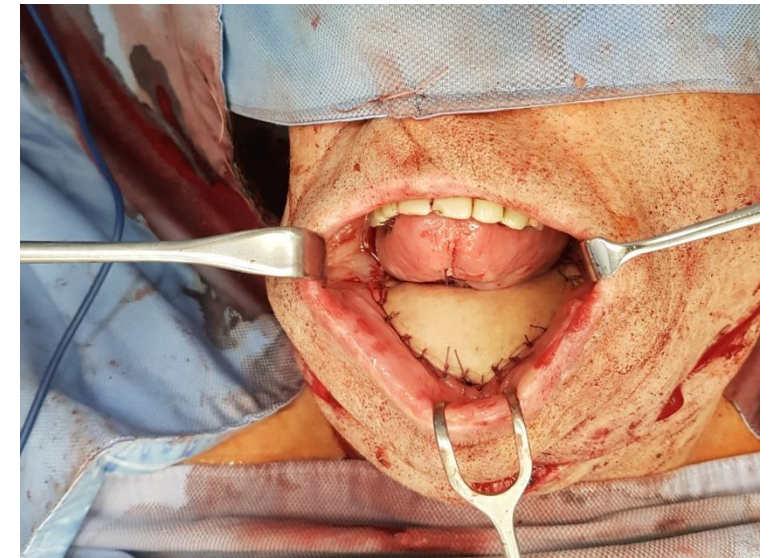
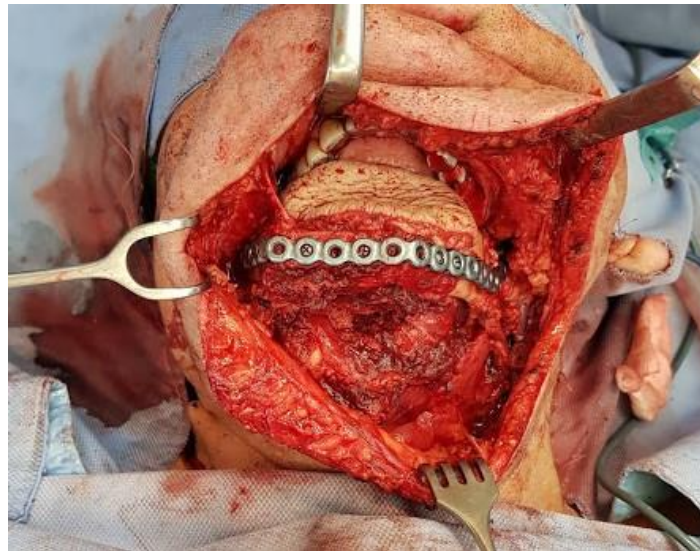
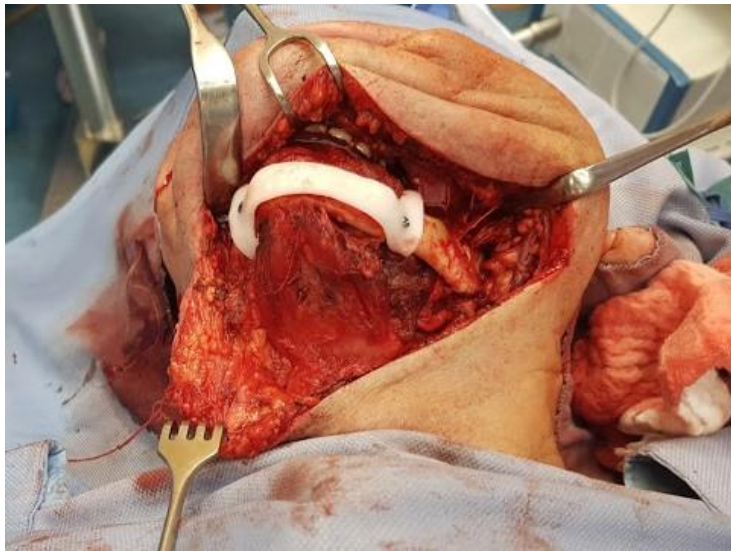
Perioerační fáze rekonstrukce dolní čelisti – odběr štěpu



Odběr fibulárního štěpu, přiložení řezací šablony na fibulu a positioning štěpu do rekonstrukční dlahy

3D virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti

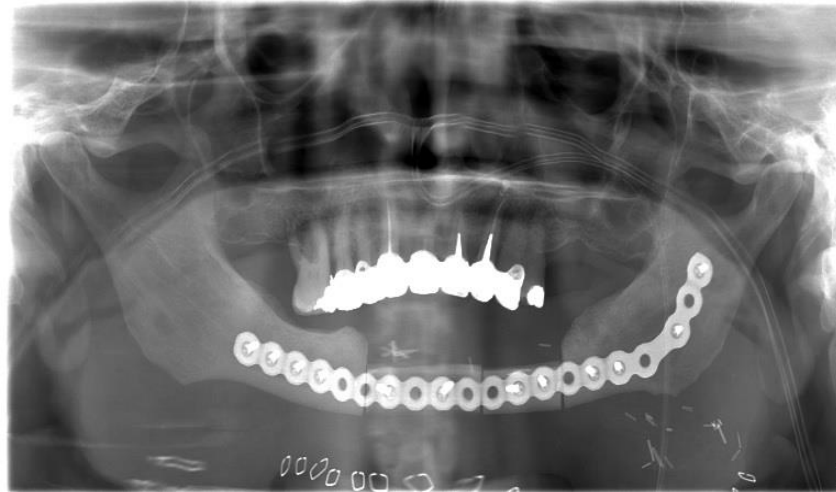
Perioerační fáze rekonstrukce dolní čelisti



Resekce tumoru, positioning štěpu a finální rekonstrukce měkkých tkání dutiny ústní

3D virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti




Pooperační stav rekonstrukce dolní čelisti



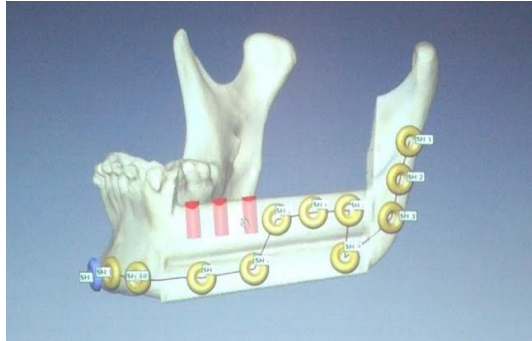
Stav půl roku po zhojení v dutině ústní, situace na rentgenu, výsledný outcome pacienta

3D virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti

Ekonomika 3D plánování rekonstrukce dolní čelisti

	<p>150.000,- Kč</p> <ul style="list-style-type: none">• plánování• řezací šablony• rekonstrukční tištěná individuální dlahy<ul style="list-style-type: none">• není v ČR
	<p>100.000,- Kč</p> <ul style="list-style-type: none">• plánování• řezací šablony• rekonstrukční tištěná individuální dlahy
<p>Česká cesta</p> 	<p>50.000,- Kč</p> <ul style="list-style-type: none">• plánování• řezací šablony• rekonstrukční dlahy Synthes + ZP

3D virtuální plánování a rekonstrukce dolní čelisti



Biologická přesnost

Potřebujeme ji?



Tištěné osteosyntetické dlahy na míru

vs.

Konvenční osteosyntetické dlahy



Je snaha o absolutní přesnost při plánování rekonstrukčních operací tou správnou cestou?



Použité zkratky

- EC – etylcelulóza
- PEO – polyetylenoxid
- NaCMC – sodná sůl karboxymethylcelulózy
- EK FNO – Etická komise Fakultní nemocnice Ostrava
- VAS – vizuální analogová škála bolesti
- IS – imunitní systém
- NO – oxid dusný
- MZ – monozygotní dvojčata
- DZ – dizygotní dvojčata
- GIT – dastrointestinální trakt
- OSCC – spinocelulární karcinom ústní dutiny
- ČR – Česká Republika
- G1 – dobře diferencovaný karcinom

Moderní metody při studiu vývoje a udržování vitality zubu

Mgr. Jan Křivánek, Ph.D.

Ústav embryologie a histologie

Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Představení výzkumníka a jeho týmu

Jan Křivánek, Ústav Histologie a Embryologie, LF, MU

- Naše výzkumná skupina se zabývá primárně studiem **vývoje zubu**, jeho **regenerace**, **reparativních procesů**, **fyziology** a studiem **funkční mikrostruktury**.
- Studujeme procesy, které vedou ve vývoj komplexních orgánových systémů od počátečních **kmenových buněk** po plně diferencované funkční soustavy.
- Drtivá většina našeho výzkumu probíhá **in vivo**. Jako modelový systém využíváme řadu různě **geneticky upravených myších kmenů** a nejnovější metody genetického značení, vizualizačních metod nebo **transkriptomiky na jednobuněčné úrovni** (scRNA-seq).
- Některé výsledky získané ze studia vývojových a regeneračních procesů v modelových systémech **kombinujeme s poznatky humánní medicíny** a snažíme se tak poodhalit potenciál lidské **regenerativní medicíny**.

<https://www2.med.muni.cz/histology/jan-krivanek/>



@KrivanekLab

Moderní metody při studiu vývoje a udržování vitality zubu

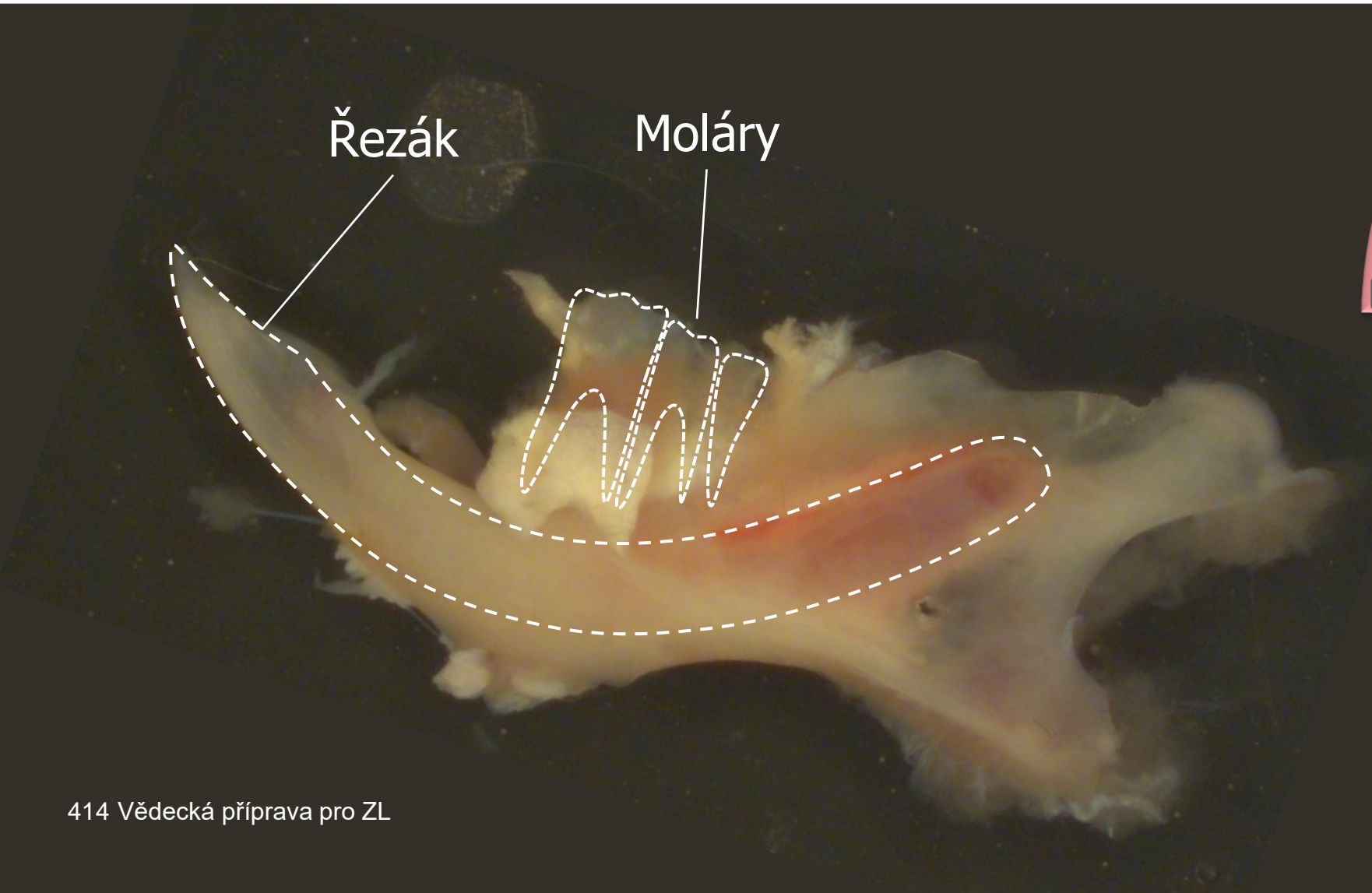
Obsah přednášky

- Zub = živý orgán
- Kontinuálně rostoucí zuby jako modelový systém pro studium vývoje – Proč myš?
- Možnosti genetického mapování vývoje *in vivo*
- Single-cell RNA-seq (Transkriptomika na úrovni jednotlivých buněk)
- Moderní 3D zobrazovací metody (lightsheet a konfokální mikroskopie, live-imaging, μ CT, FIB-SEM)

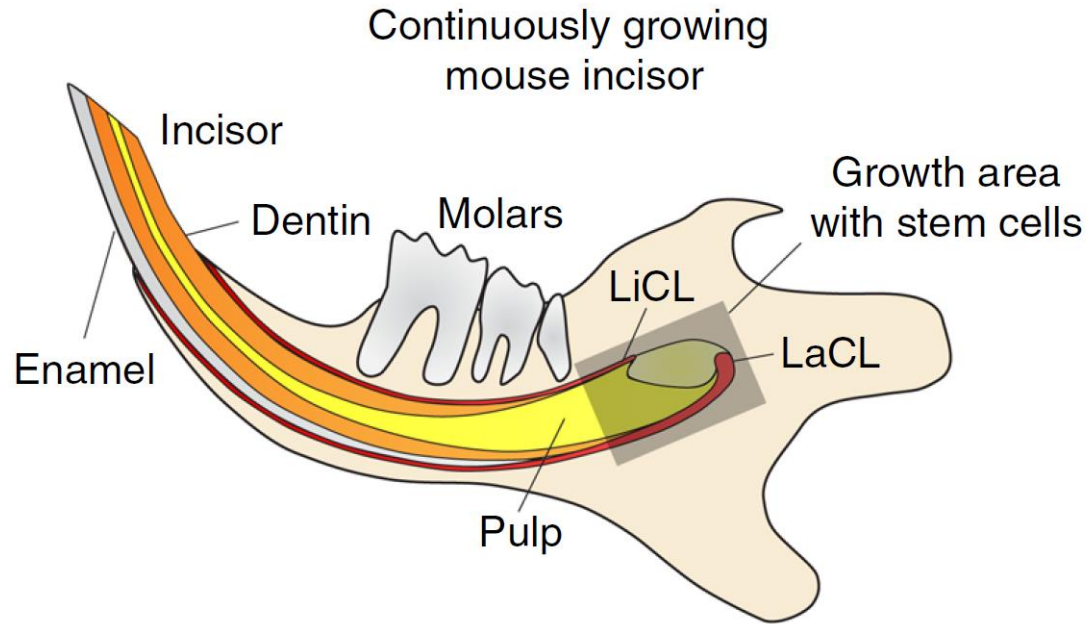
Zub = živý orgán

- **Primární funkce** zubů: Příjem a zpracování potravy
- **Sekundární funkce** zubů: Artikulace řeči, nonverbální komunikace, senzorické vlastnosti
- **V dospělém zubu je neživá pouze sklovina** (avaskulární, bez nervů, bez buněk), zbytek zubu je živá, inervovaná, cévně zásobená a metabolicky aktivní tkáň
- **Zub reaguje na podněty z okolí** – tvorba terciárního dentinu, zánět, aktivace kmenových buněk, změny v ukotvení do zubního lůžka (princip ortodoncie)

Kontinuálně rostoucí řezáky – Proč myš?



Kontinuálně rostoucí řezáky – Proč myš?

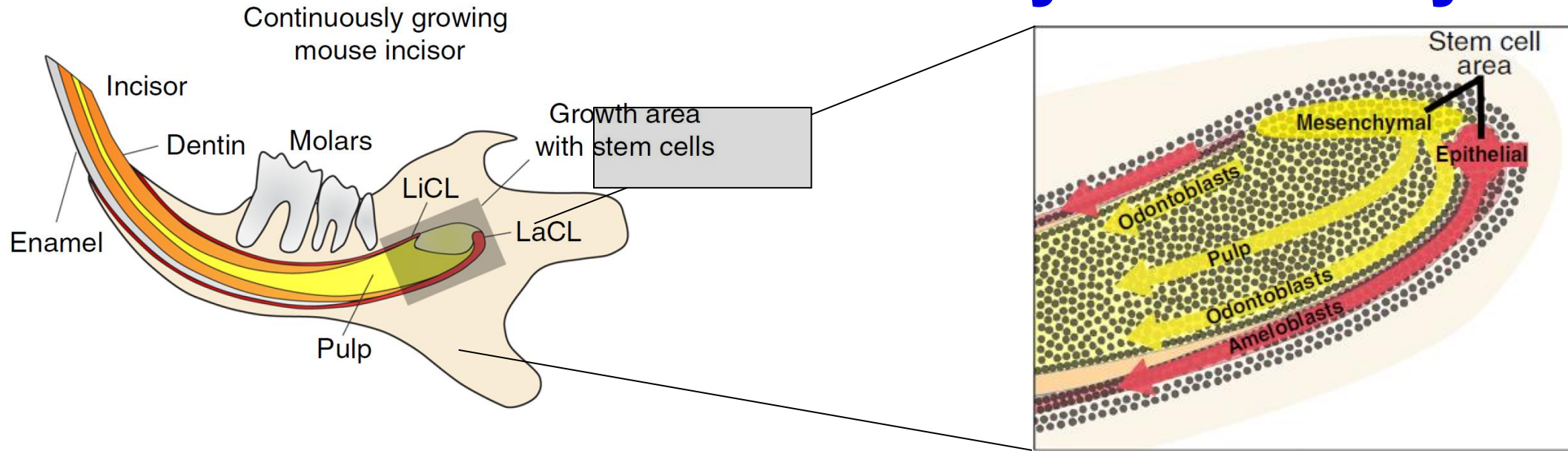


- Charakteristické znaky myší dentice
 - Zubní vzorec 1-0-0-3
 - Monofyodontní, heterodontní chrup
 - Hypselodontní řezáky
 - Brachyodontní stoličky



μCT sken myší hlavy se zvýrazněnou sklovinou

Kontinuálně rostoucí řezáky – Proč myš?



- **Kontinuálně rostoucí komplexní orgán** – doba kompletní obnovy zubu jsou asi 4 týdny
- **Přesně řízený růst a jeho kontrola** – po uštípnutí konce zubu dochází k akceleraci růstu
- Kontinuálně aktivní **nika kmenových buněk dvojího typu** (mezenchymální a epiteliální)
- Možnost studia **epitelo-mezenchymálních interakcí** a diferenciačních procesů
- **Modelový systém** pro studium amelogeneze a dentinogeneze i celkově odontogeneze

Proč myš?

- **Myš je modelový organismus savců**
 - Relativně snadná péče a manipulace
 - Biologická podobnost s člověkem
 - Krátká generační doba, krátká doba gravidity
 - Vyšší množství potomků ve vrhu (5-15)
 - Dostupné inbrední kmeny
 - Osekvenovaný a detailně studovaný genom
 - Dostupné **desetitisíce různých genetických modifikací**



>11500 kmenů geneticky
definovaných myších kmenů

417 Vědecká příprava pro ZL
(1. 10. 2020)



6440 ofenotypovaných mutací
různých genů

(1. 10. 2020)



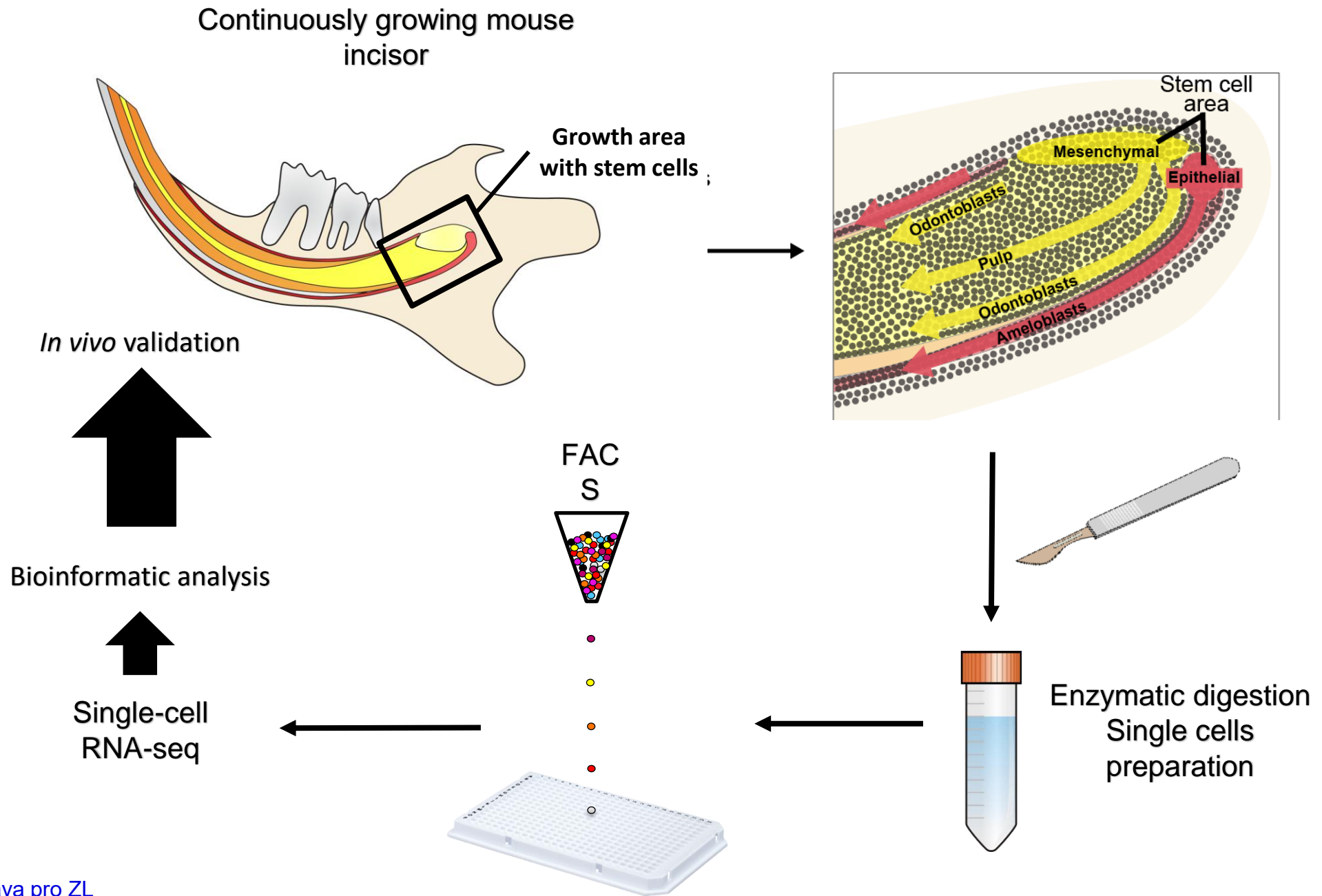
Expresní databáze během vývoje i v
dospělosti

a další...

MUNI
MED

Single-cell RNA-seq

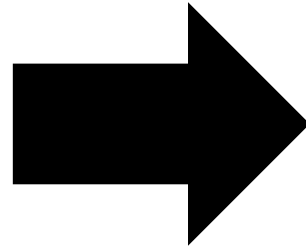
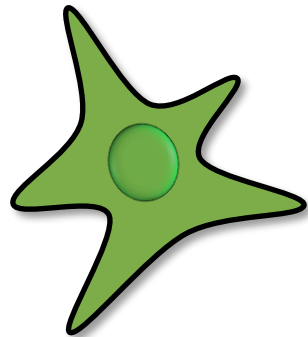
Analýza genové exprese na úrovni jednotlivých buněk



Proč je scRNA-seq tak revoluční metoda?

Northern blot	Desetitisíce buněk nutných pro analýzu exprese 1 genu
qRT-PCR	Tisíce buněk nutných pro analýzu exprese 1 genu
Chip array	Tisíce buněk nutných pro analýzu exprese desítek až stovek genů
Single cell RNA-seq	Analýza exprese tisíců genů z každé jednotlivé buňky

1 buňka
(každá
buňka)



“KOMPLETNÍ”
transkriptom

Kódující geny
Transkripční faktory
Ligandy
Receptory
Strukturní geny
...
miRNA's
Spliced variants
RIK's
...

Jaký typ informace získáme?

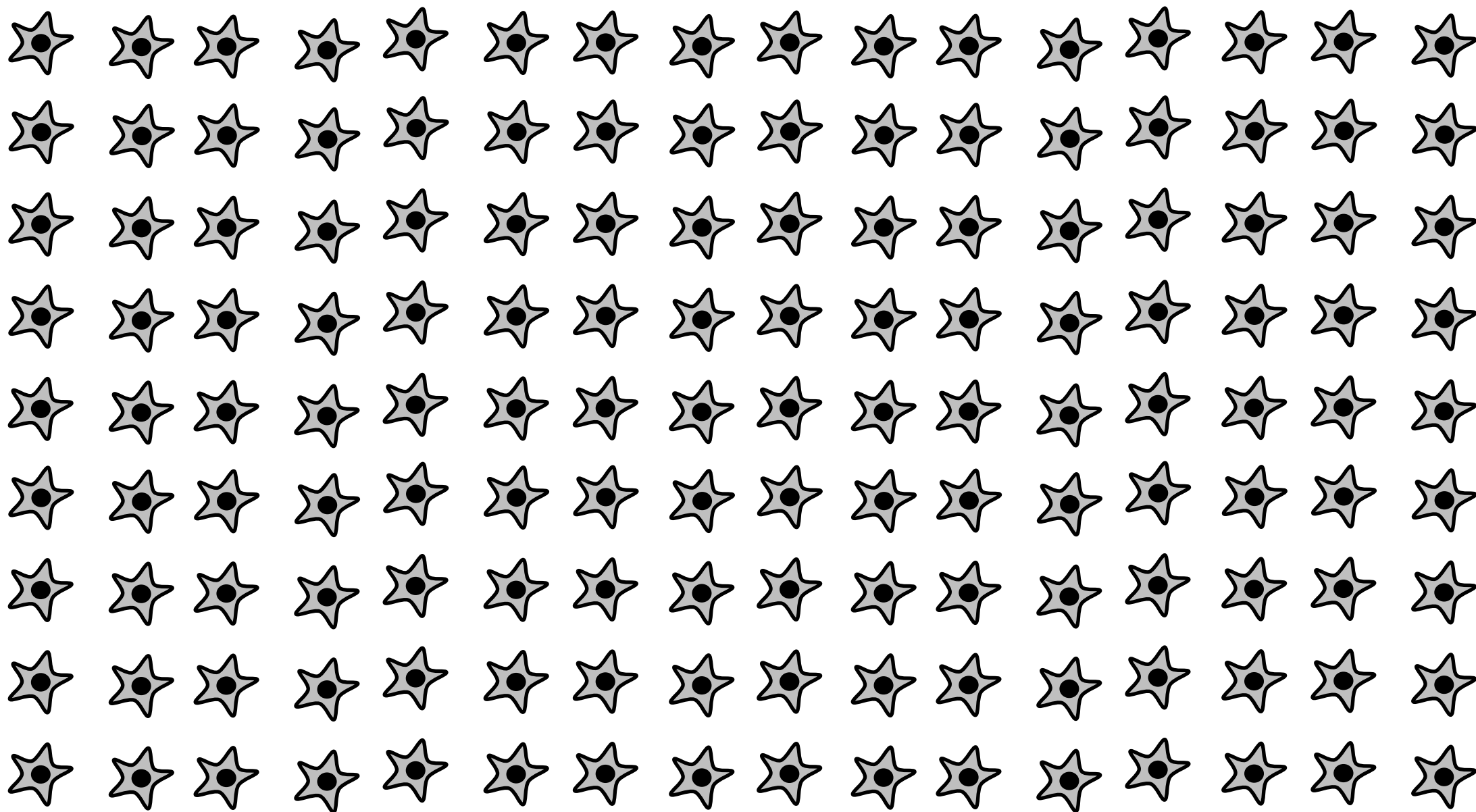
- **Kvalitativní** informace o genové expresi
- **Kvantitativní** informace o genové expresi



“Hardcore bioinformatická analýza“

- **Klastrování buněk** podle podobnostech na základě jejich genové exprese
- Definování hlavních a menších buněčných populací
- Identifikace dosud neznámých buněčných populací
- **Zjištění exprese nových genů ve známých nebo neznámých populacích**
- **Zjištění funkce neznámých buněčných populací**
- **Mapování „Gene Regulatory Network“ → sledování vývojových drah**
- **Vytvoření interakčního schématu – vzájemná interakce různých buněčných typů (ligandy a receptory)**

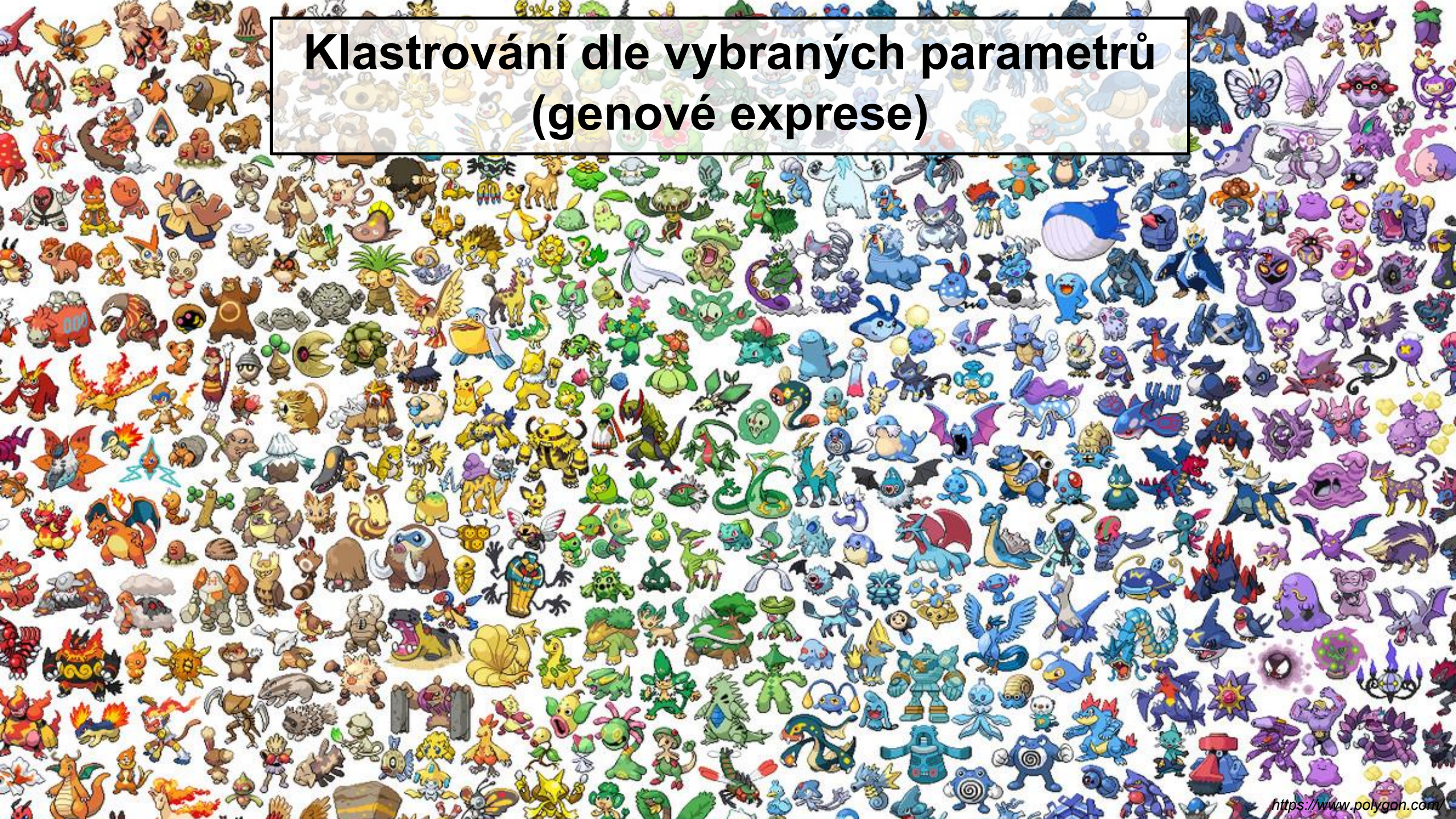
Izolované buňky



Analyzované buňky

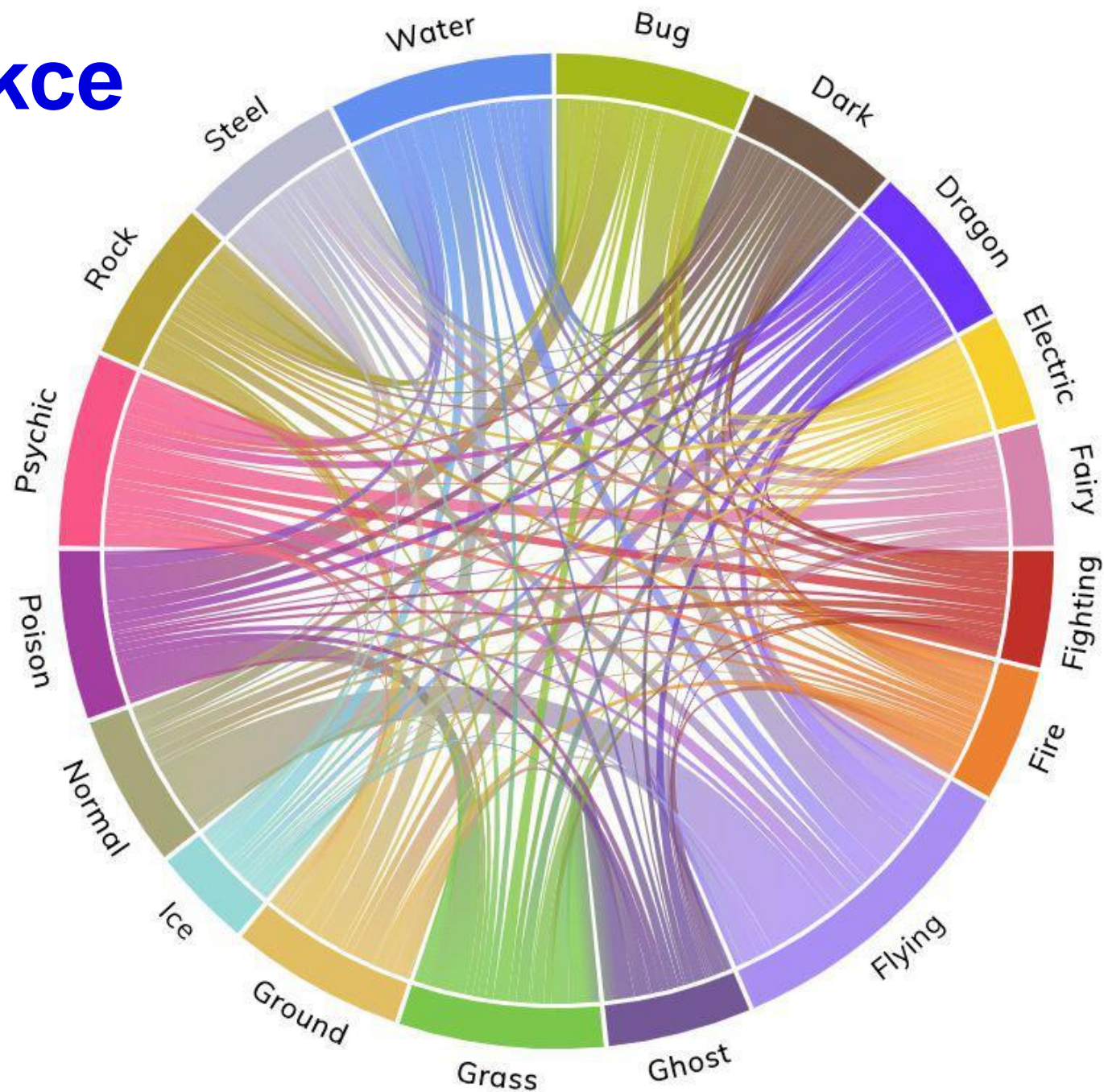


Klastrování dle vybraných parametrů (genové exprese)



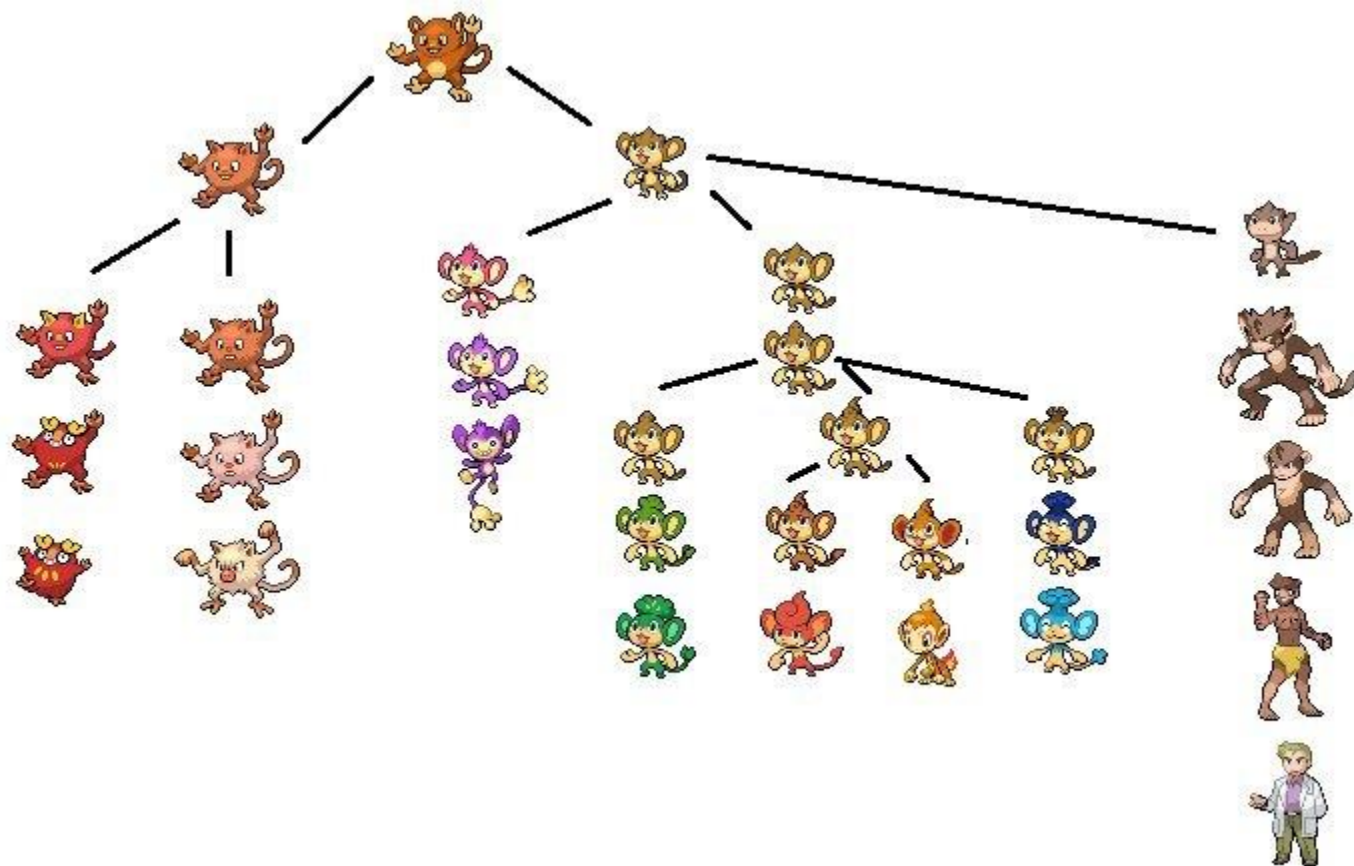
Vlastnosti a interakce

Analýzou vlastností (**hodnot genové exprese**) jednotlivých buněk můžeme předpovědět jak budou tyto buňky vzájemně interagovat (**exprese různých kombinací ligandů a receptorů**) a jak jsou na tyto interakce připravené (**exprese efektorových genů různých signálních cest**)



Vývoj

Analýzou podobností v genové expresi jednotlivých buněk jsme schopni předpovědět nejen jaké buňky jsou si podobnější nebo rozdílnější, ale také **určit která buňka je vývojově mladší** (více „kmenová“) nebo **vývojově diferencovanější** („dospělejší“).



Tvorba „Dental Cell Type Atlas“

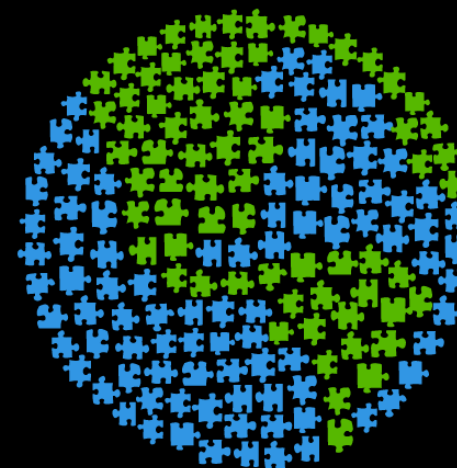
Komplexní
orgán v žijícím
organismu



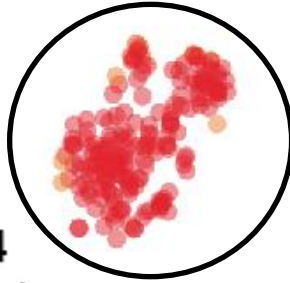
scRNA-seq



Analýza



Cdh5
Plvap
Tie1
Ptpnb
Eltd1
Ecscr
Robo4
Ushbp1
Myct1
Podxl



t-SNE

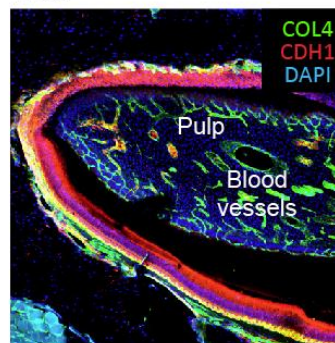
(T-distributed Stochastic Neighbor Embedding)

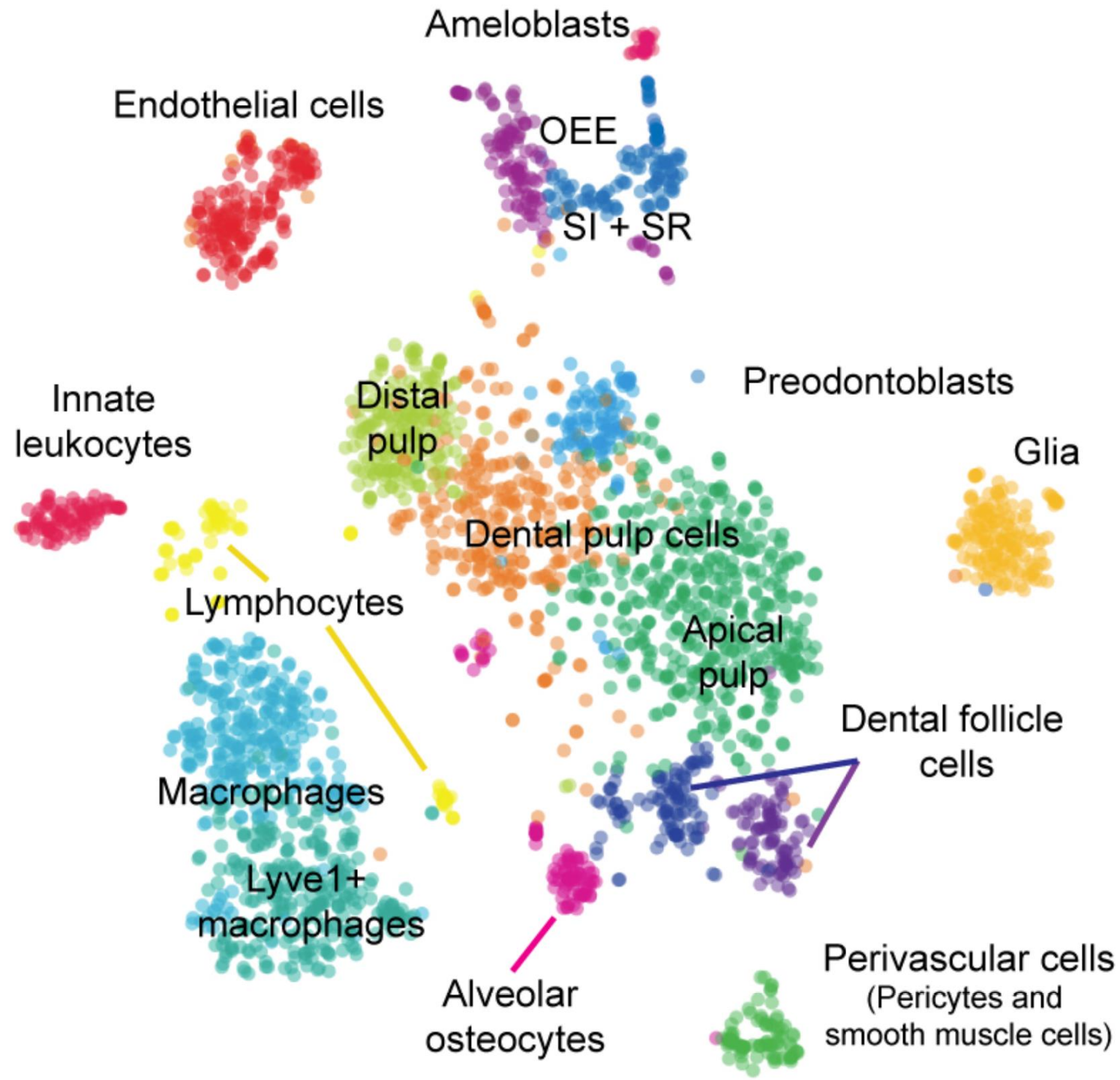
Machine learning algorithm for visualization

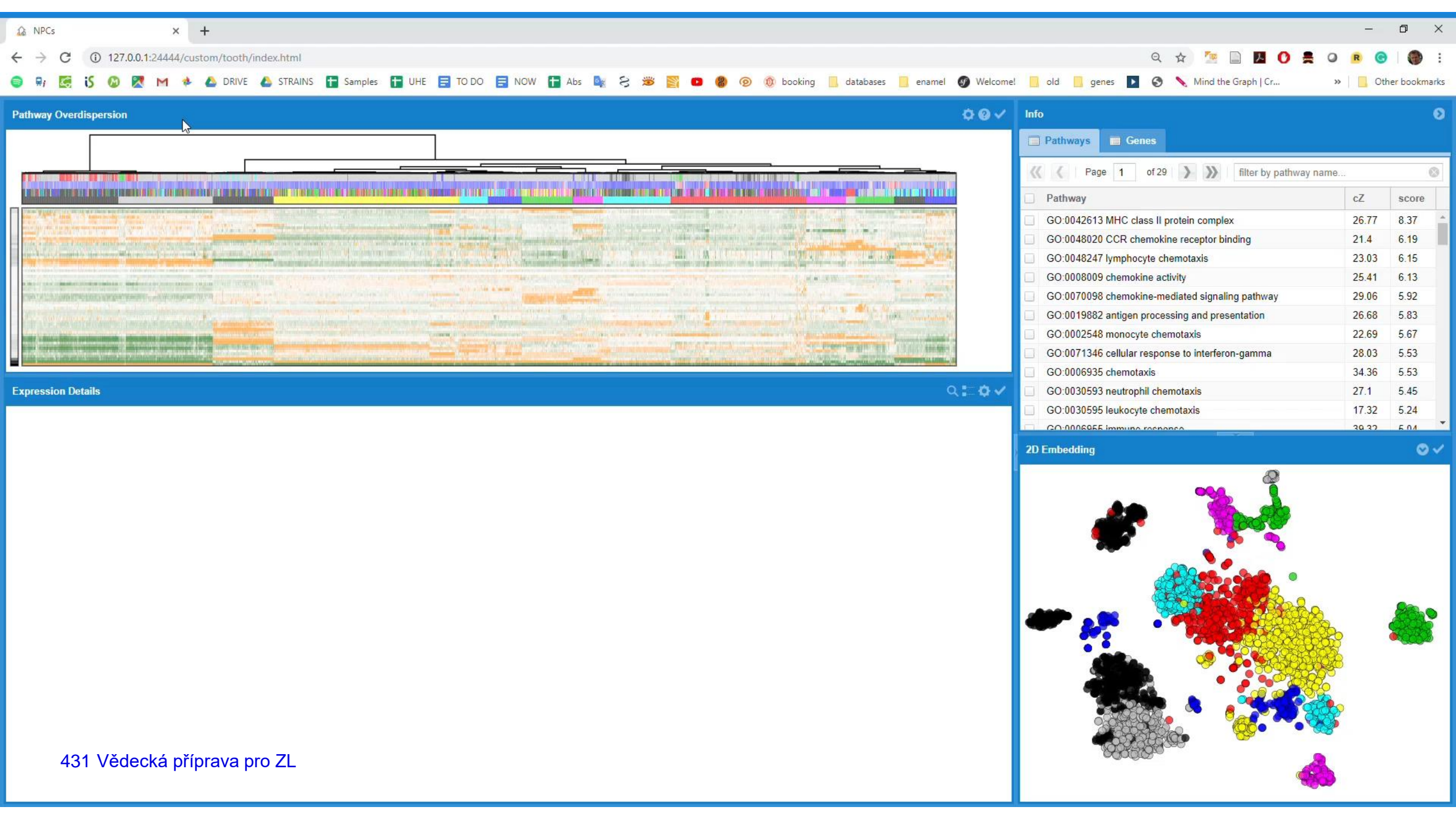
Nonlinear dimensionality reduction technique

Endothelial cells

Cdh5
Plvap
Tie1
Ptpnb
Eltd1
Ecsr
Robo4
Ushbp1
Myct1
Podxl



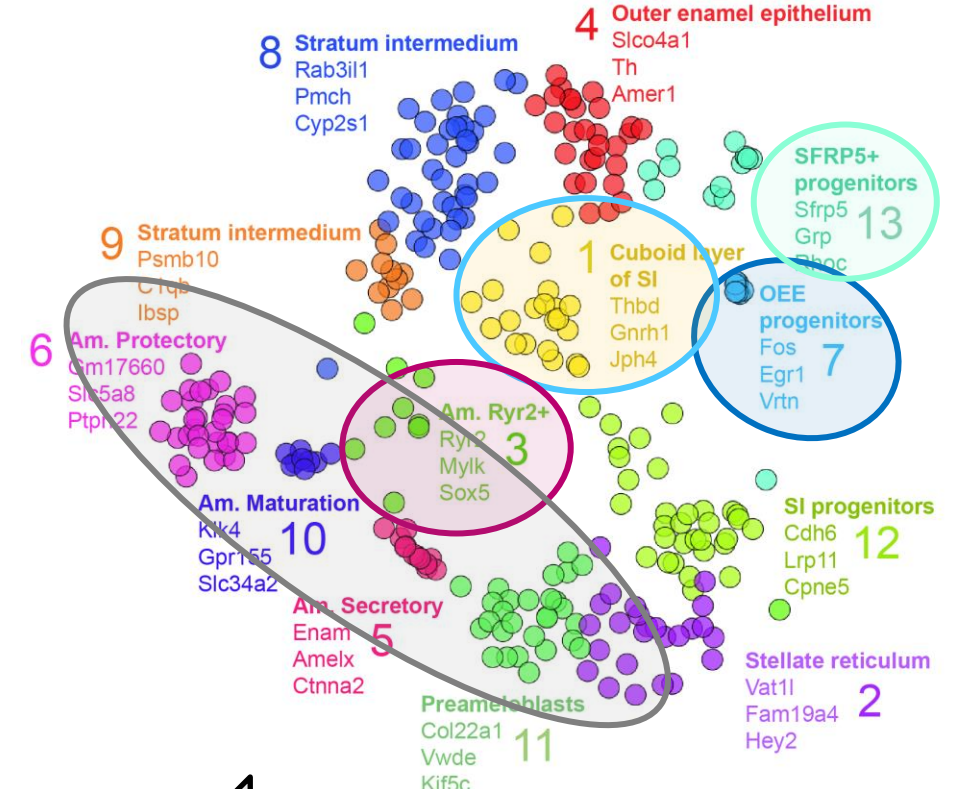
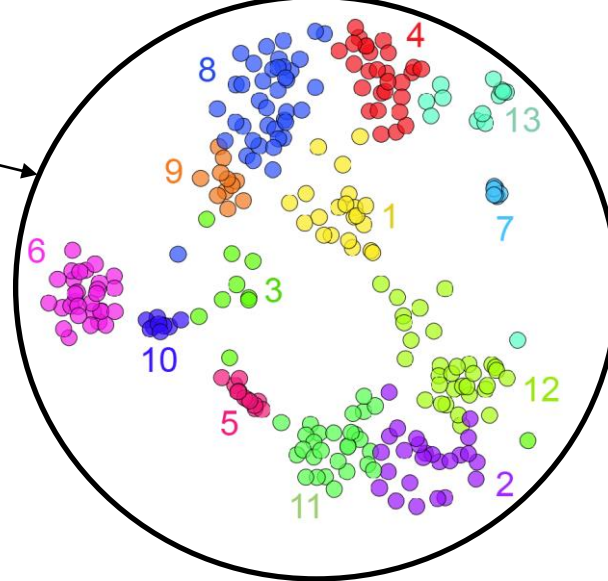
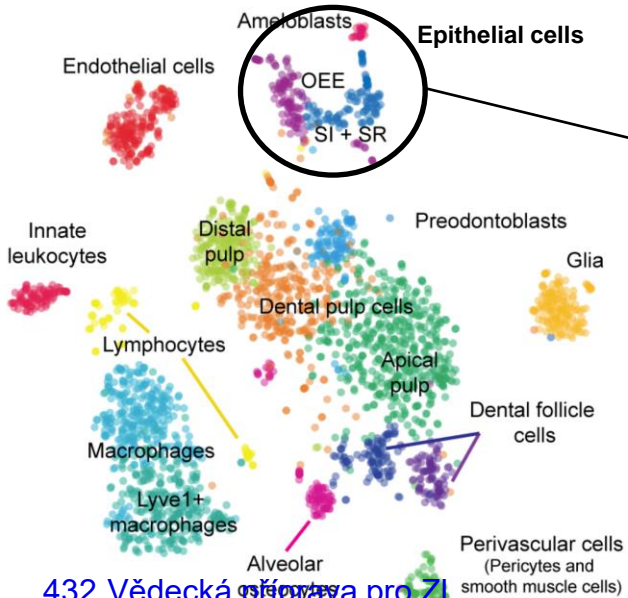
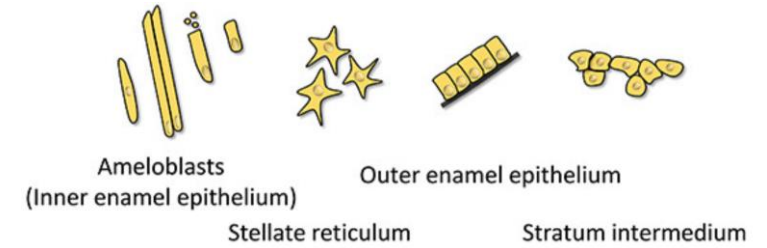




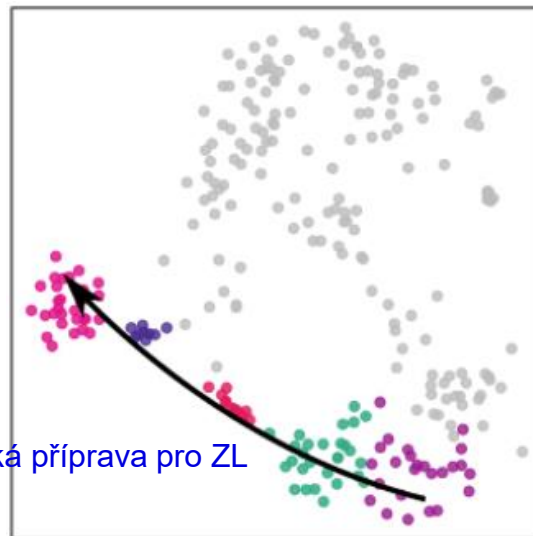
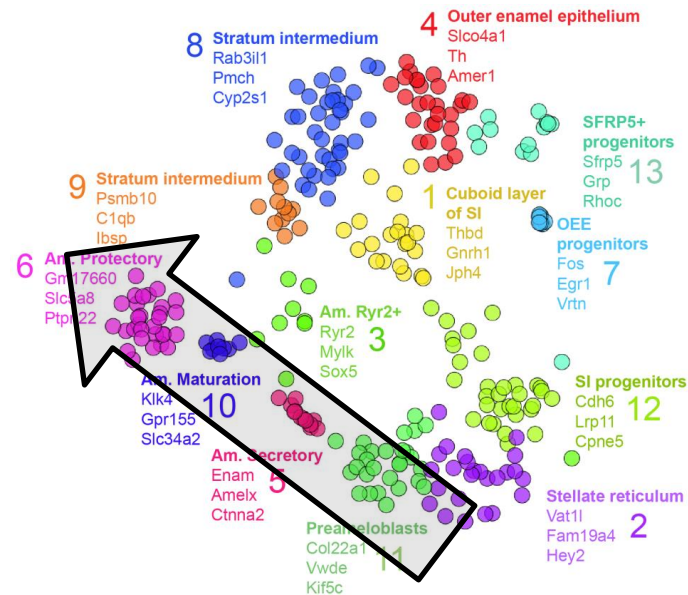
Detailní analýza dentálního EPITELU



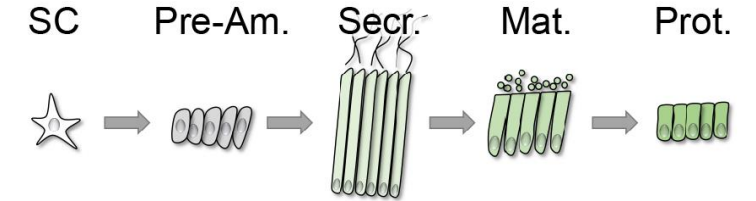
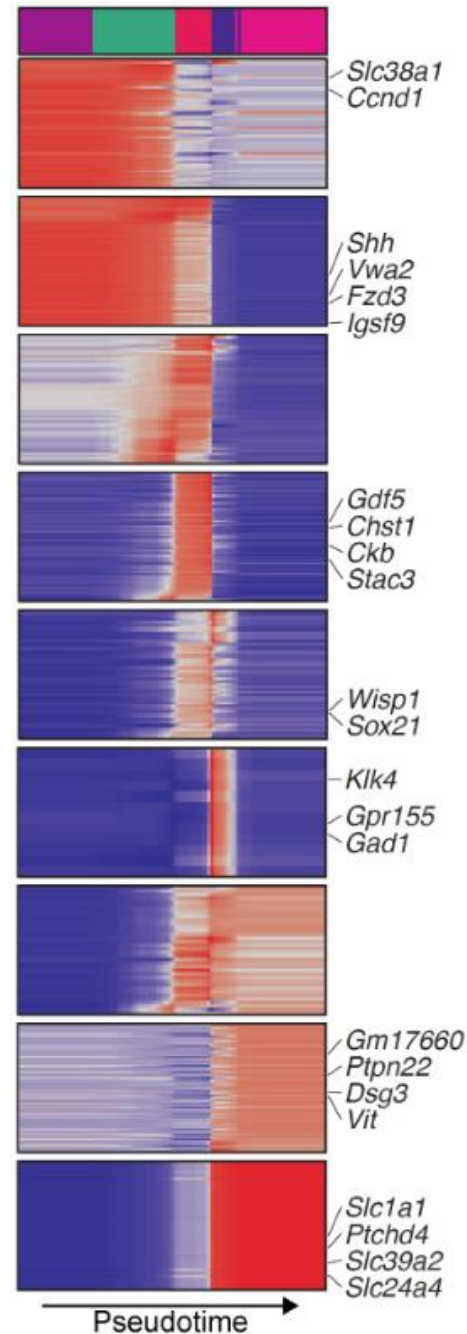
Dental cell types of epithelial origin



Diferenciační trajektorie ameloblastů



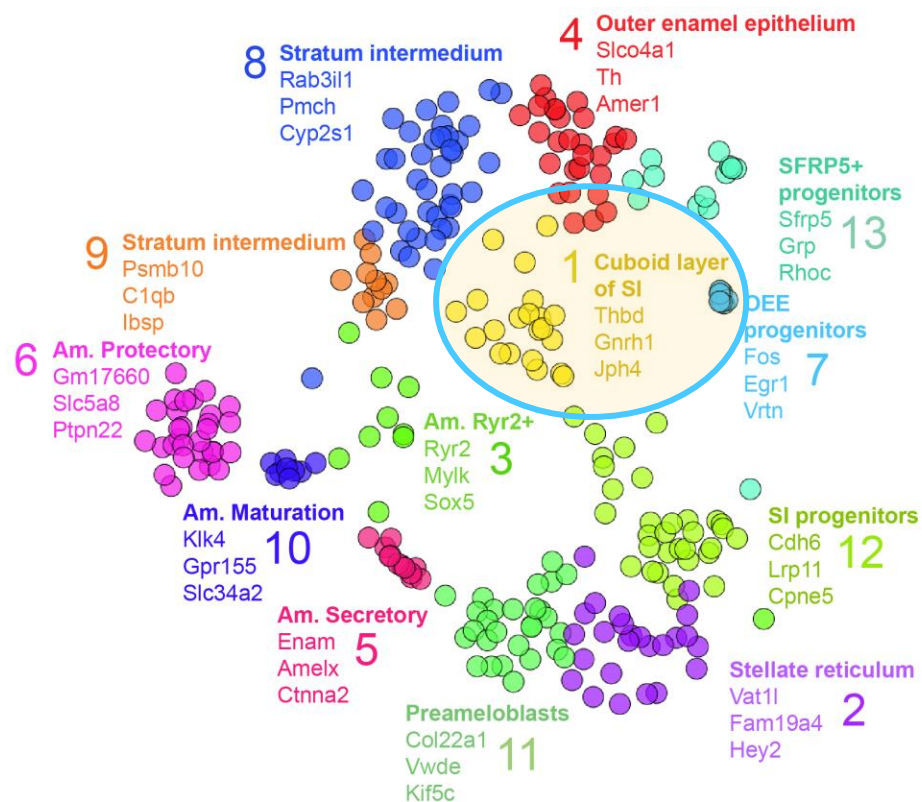
433 Vědecká příprava pro ZL



Transition from preameloblasts into all ameloblast stages mapped

Cuboidal layer

nově popsáný buněčný typ v zubu



Oxygen and ion transportation

Backbone - junctional complexes

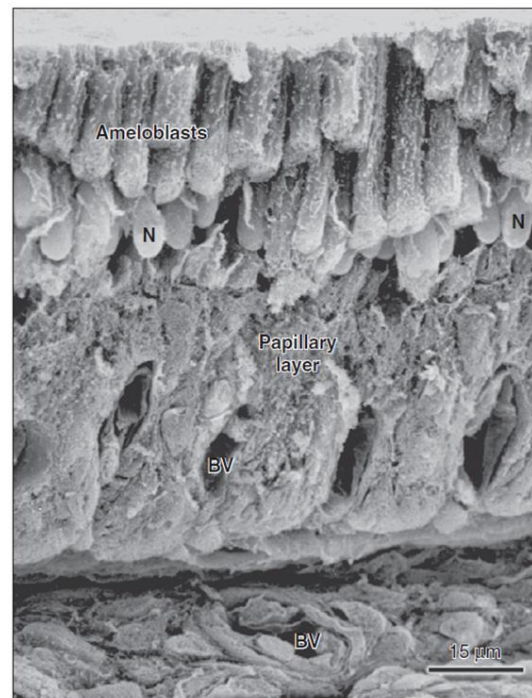
Supportive role in ameloblasts differentiation

Cygb, Nphs

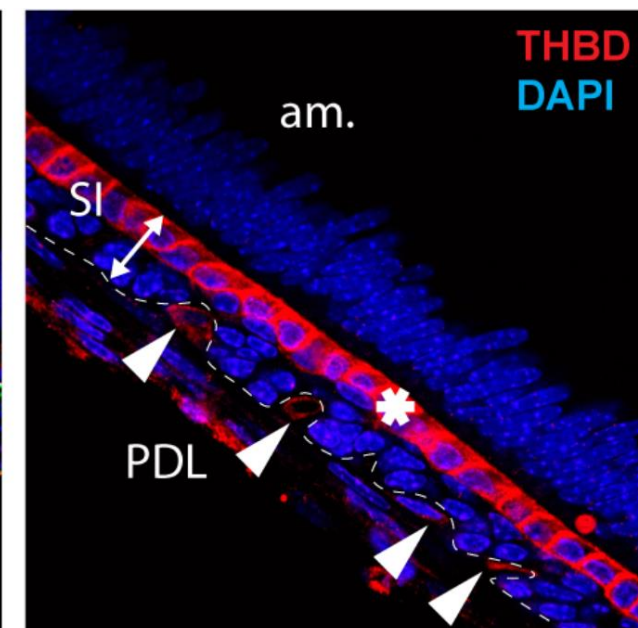
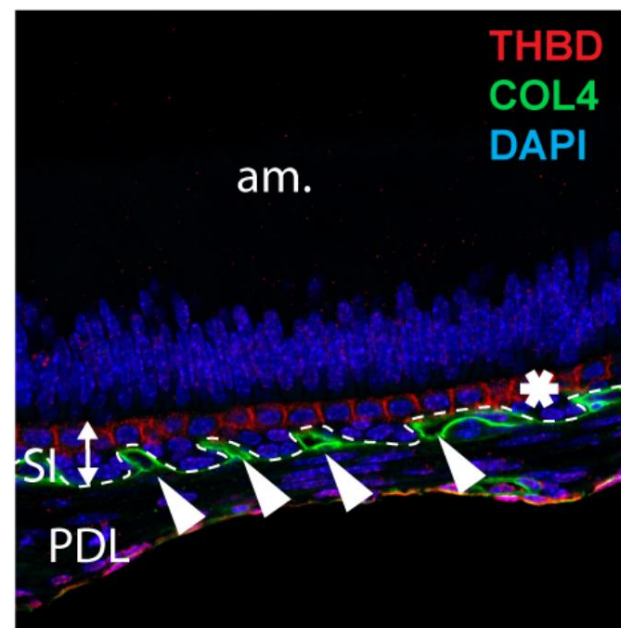
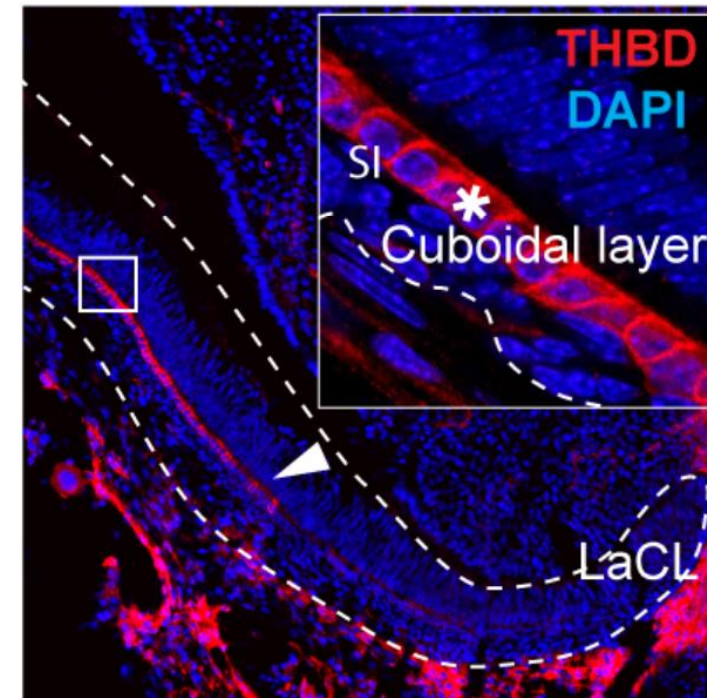
Kirrel2, Jph4

Gnrh1, Paqr5

434 Vědecká příprava pro ZL

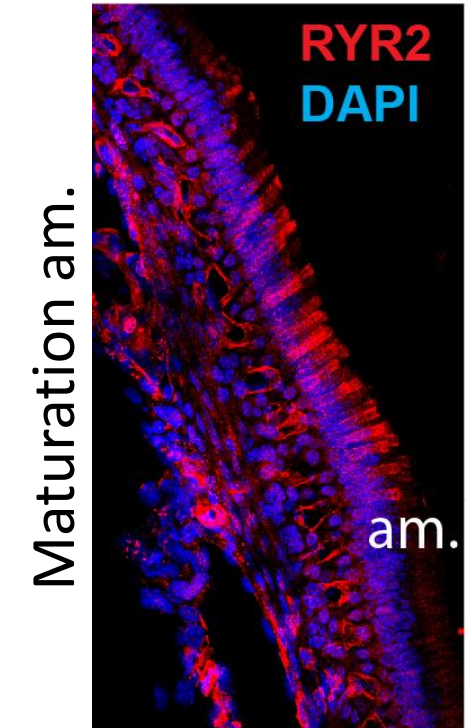
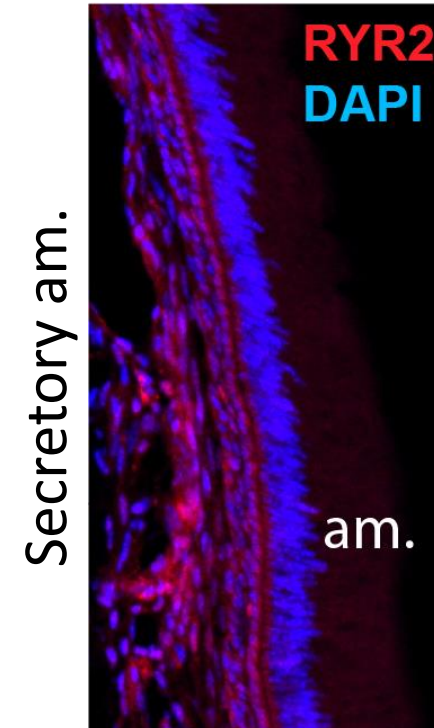
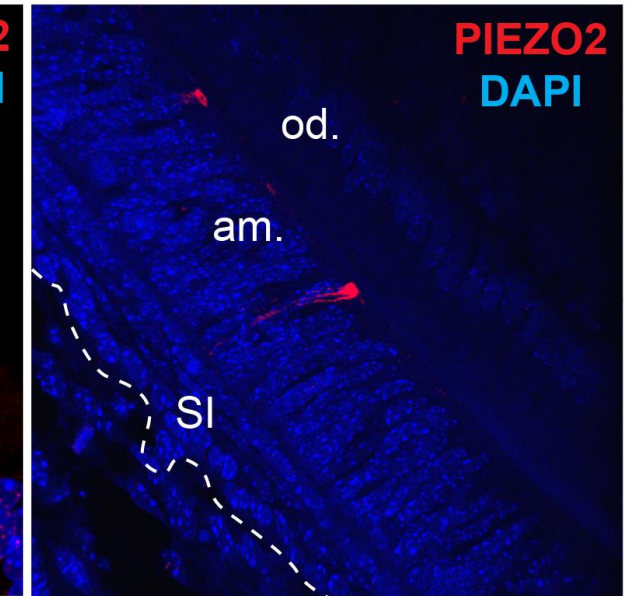
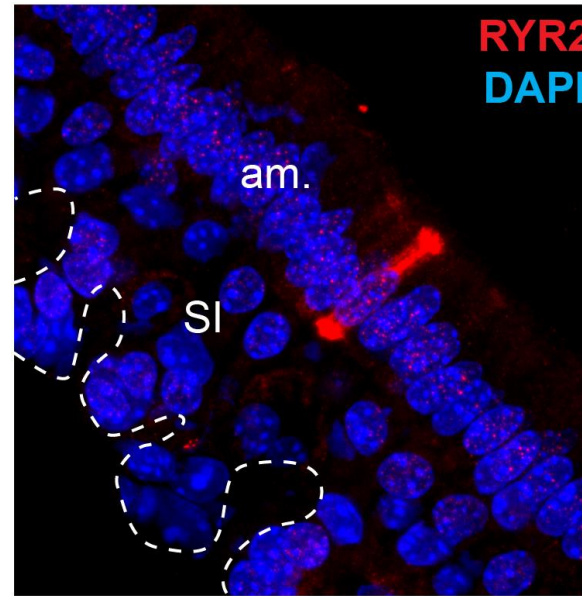
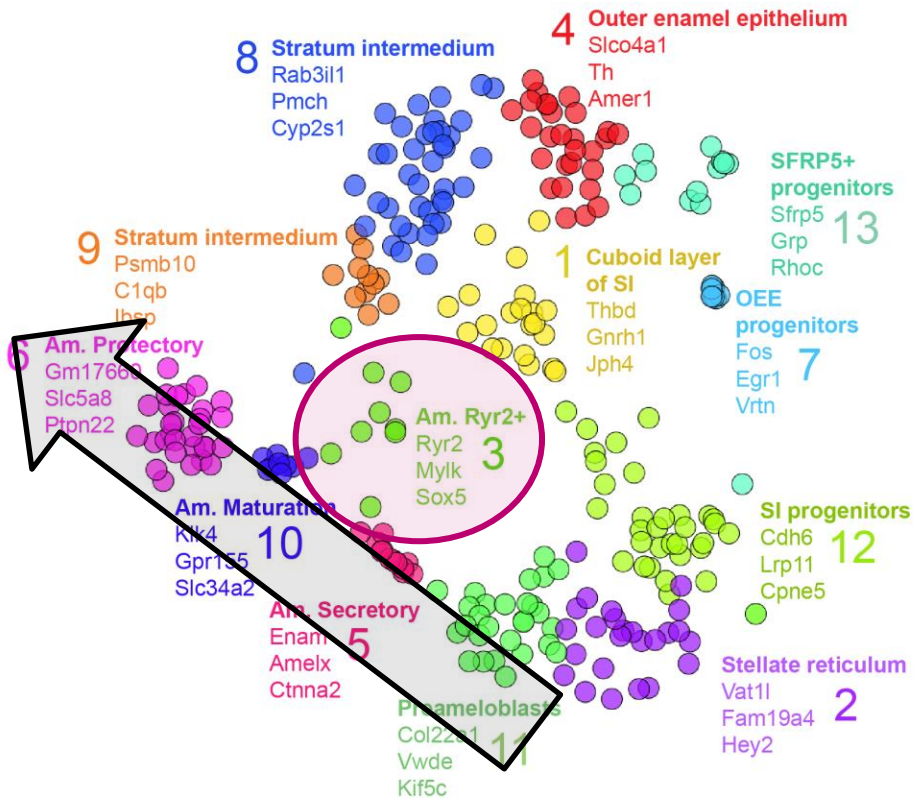


<https://pocketdentistry.com/7-enamel-composition-formation-and-structure/>



Krivanek et al. 2020

RYR2⁺ ameloblasty

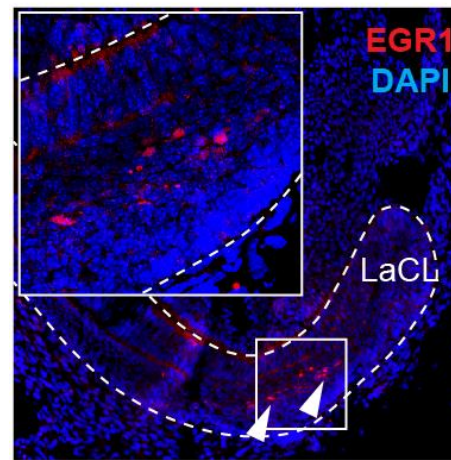
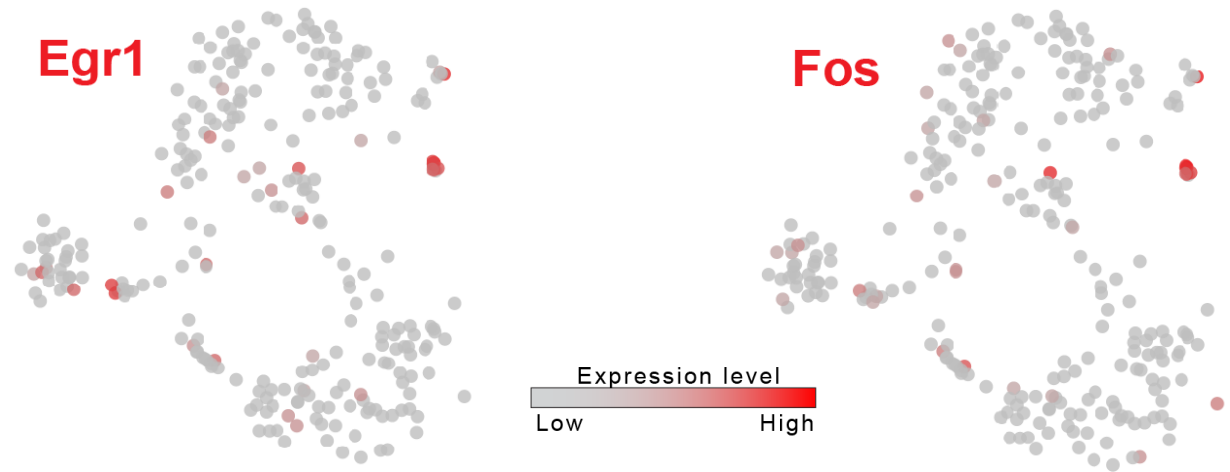
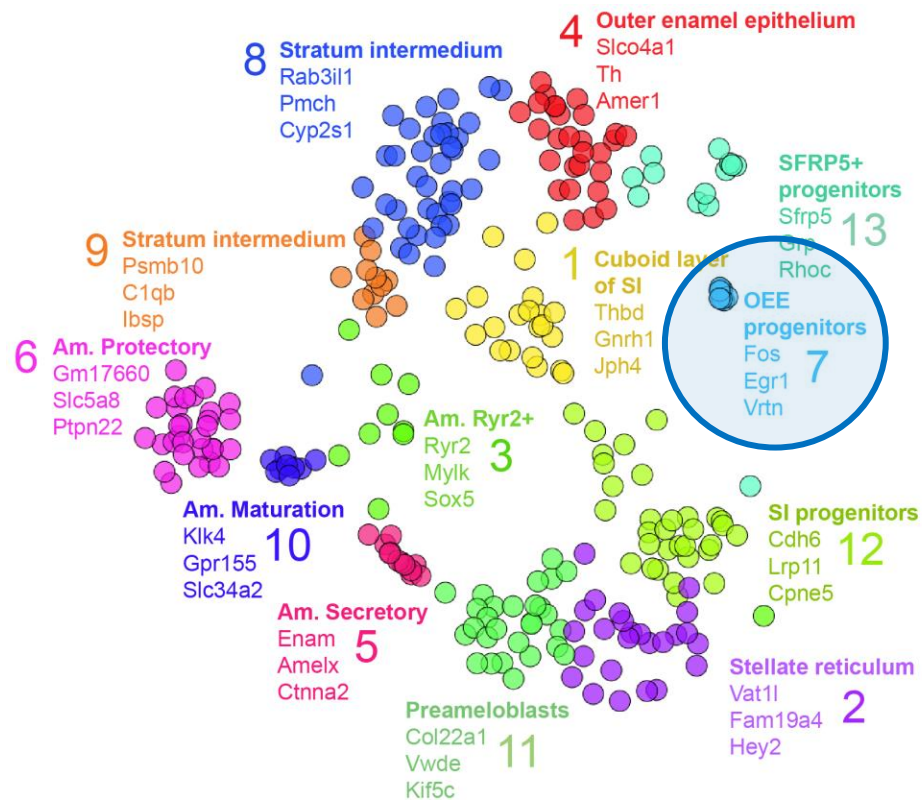


Cation channels
Trpm6

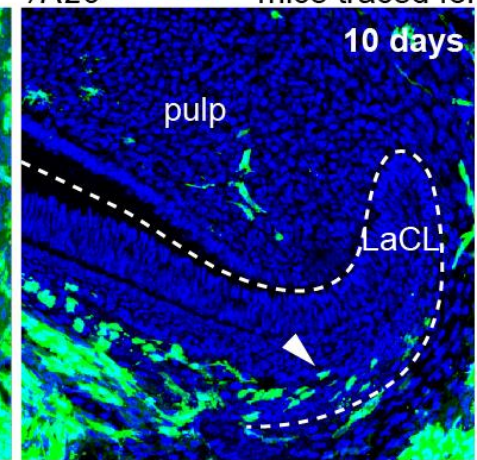
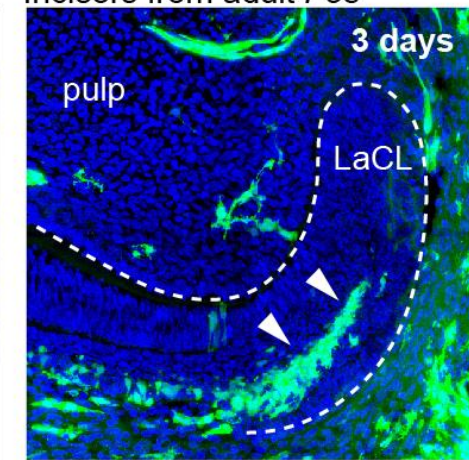
Piezo2, Trpm2, Trpm3,

Calcium-dependent genes
Itpr1, Ryr1, Ryr2

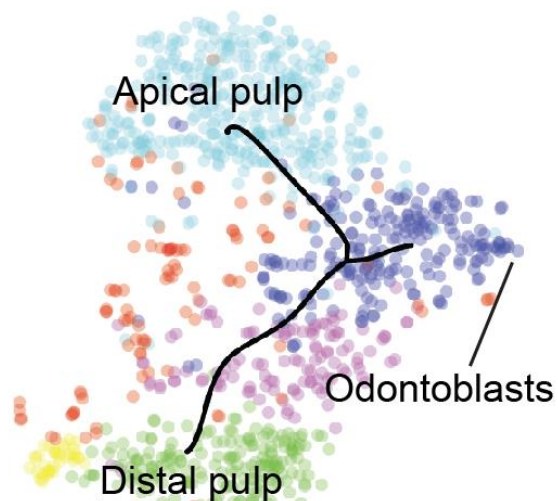
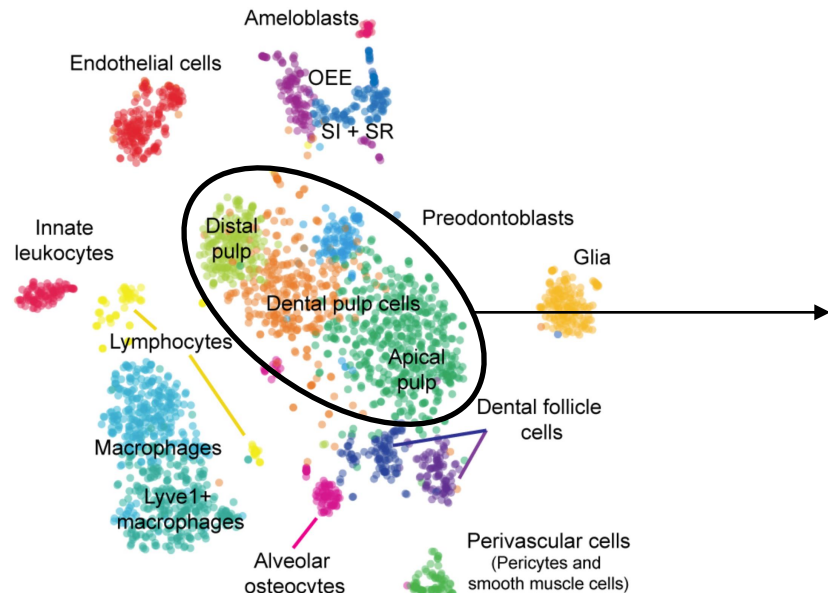
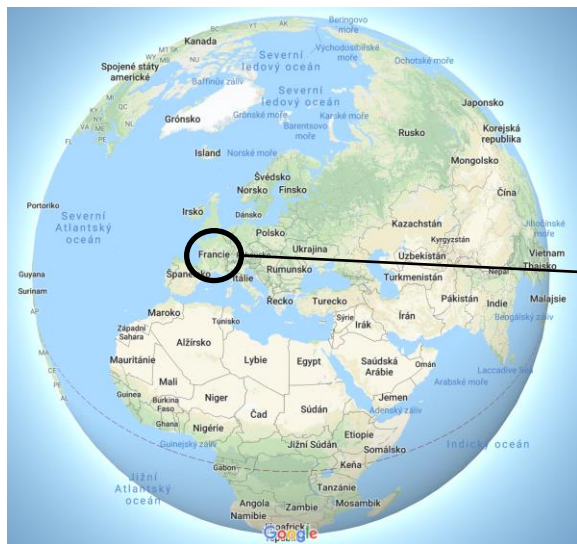
OEE progenitory



Incisors from adult *Fos^{CreERT2}/R26^{ZsGreen1}* mice traced for

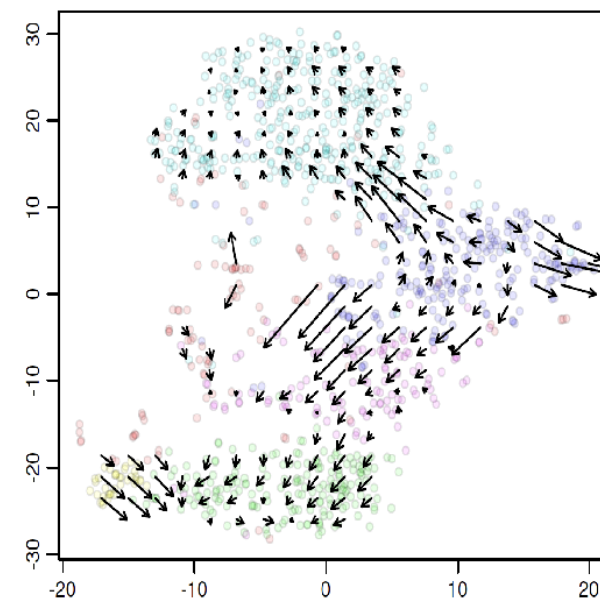


Detailní analýza dentální PULPY

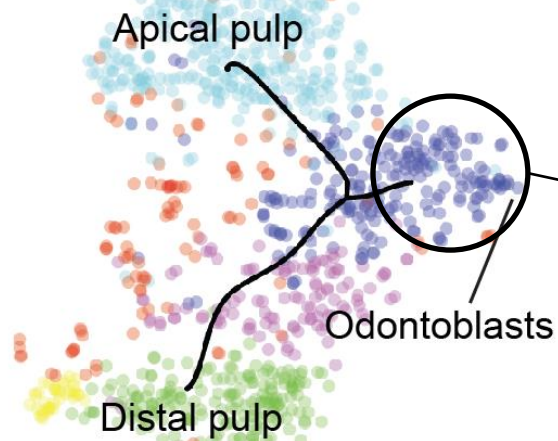
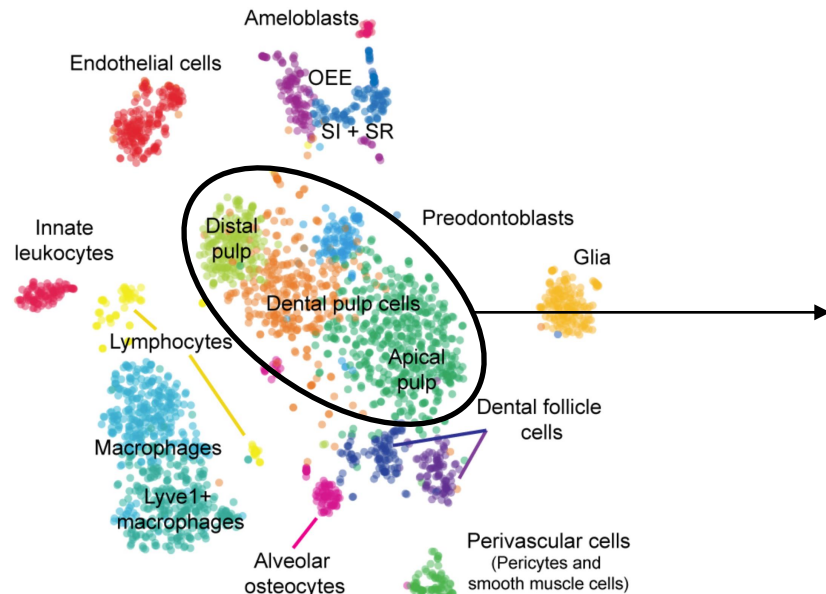
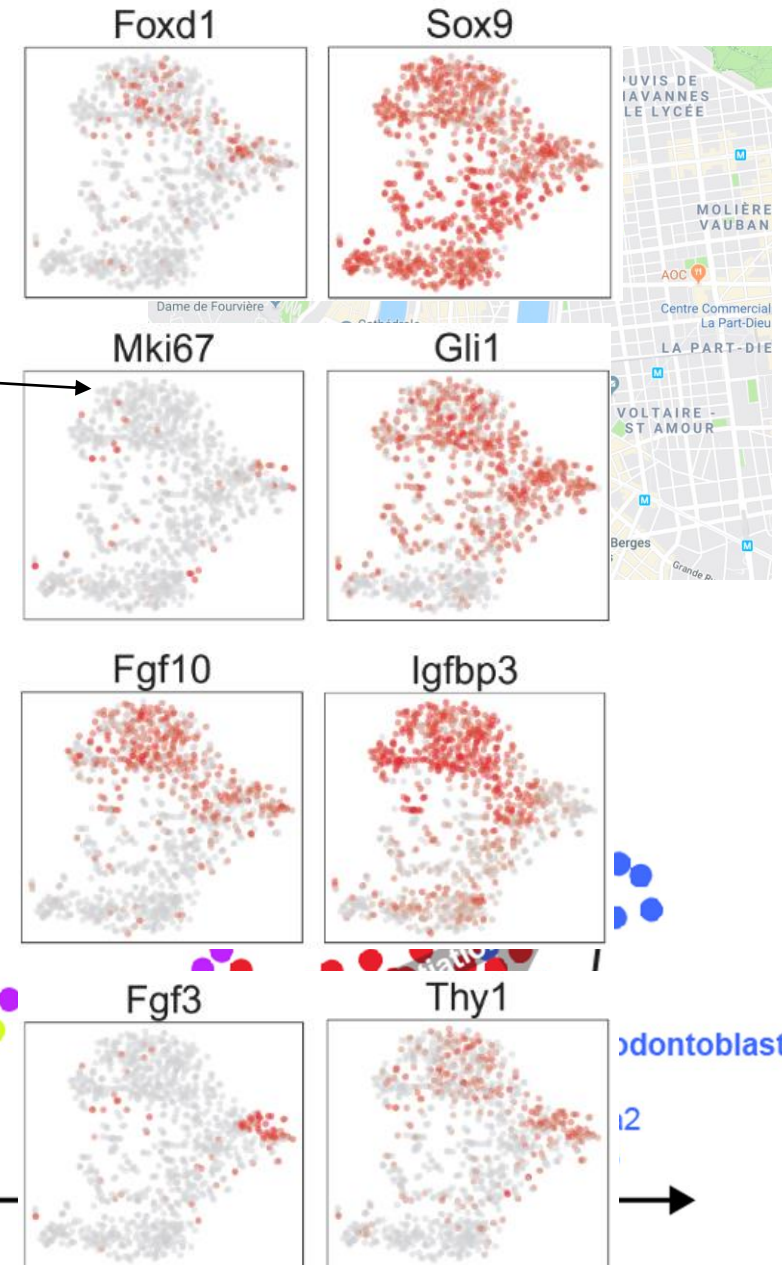


437 Vědecká příprava pro ZL

RNA-velocity analysis

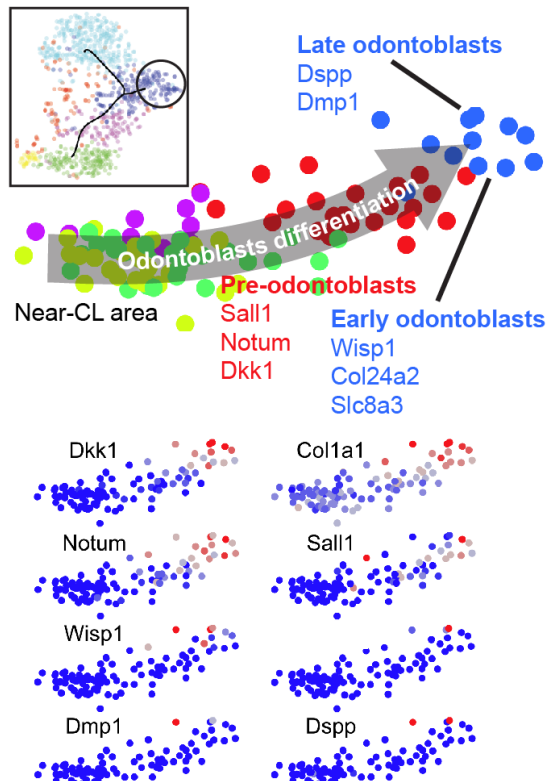


Detailní analýza dentální PULPY

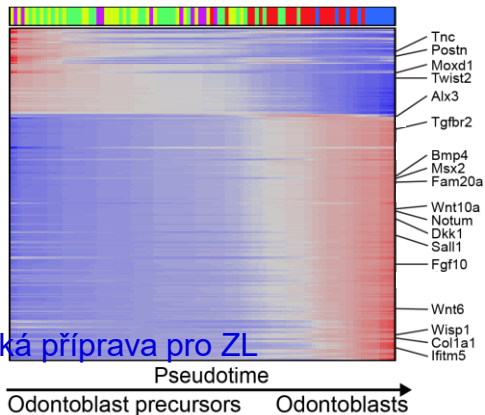


438 Vědecká příprava pro ZL

Odontoblast branch analysis

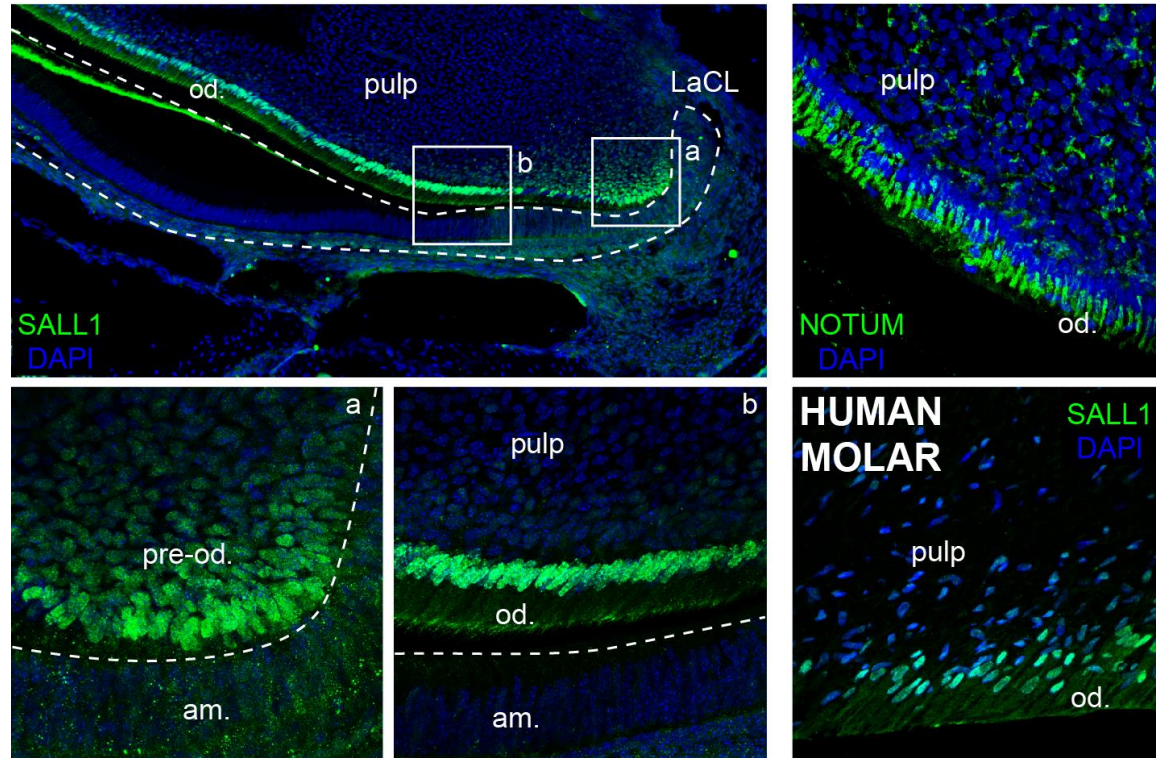


Odontoblasts branch differentiation

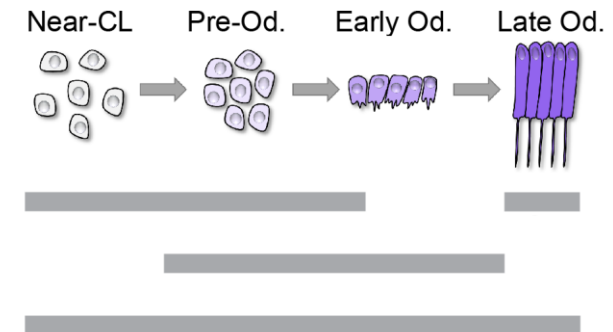


439 Vědecká příprava pro ZL

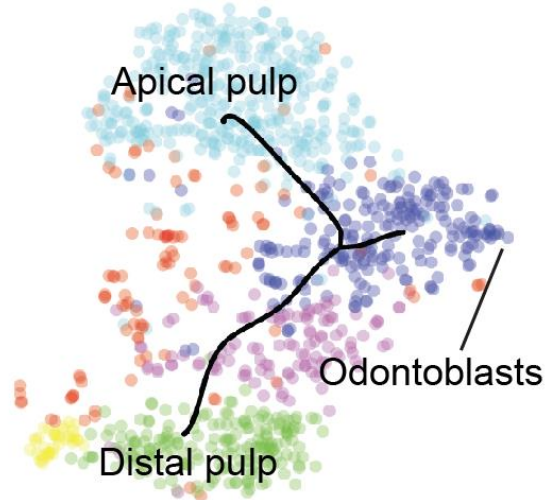
Validation of identified odontoblast branch



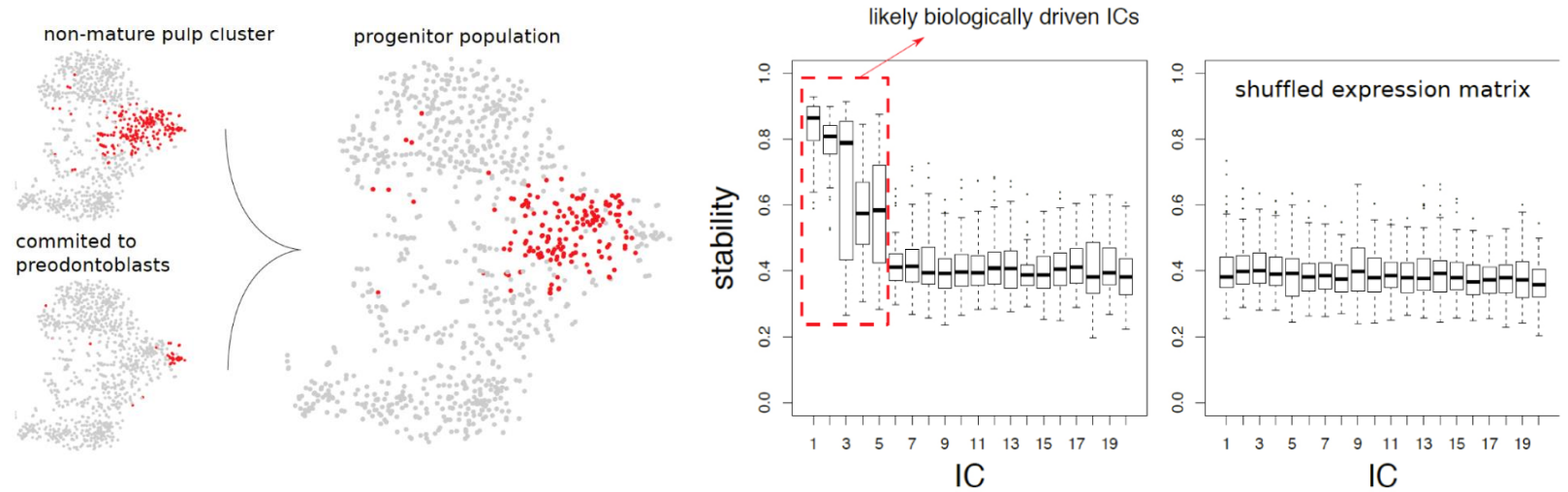
Building the map
leading into
ODONTOBLAST
specification



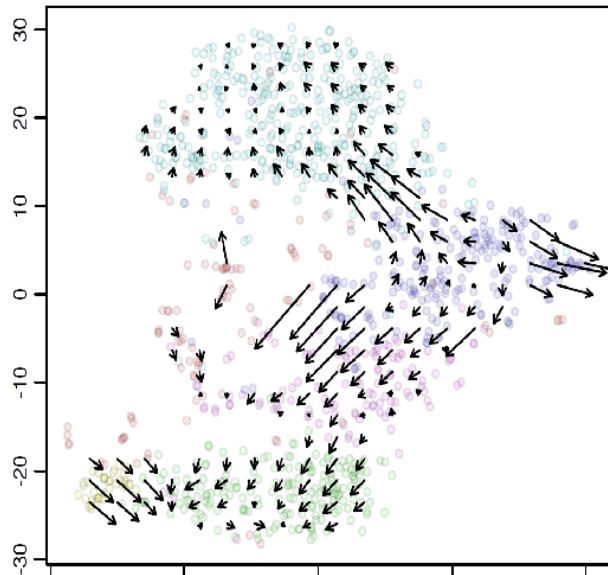
Analýza VÝVOJOVÉ DYNAMIKY zubní pulpy



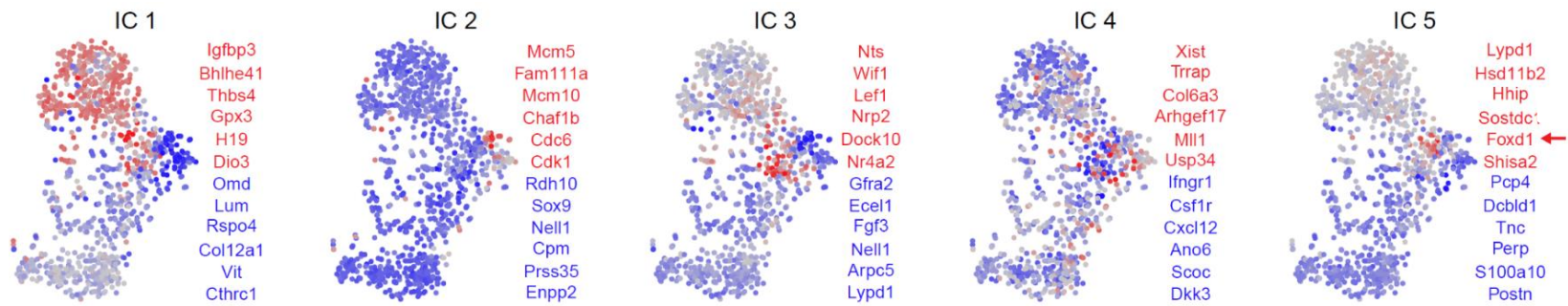
Non-mature population selection



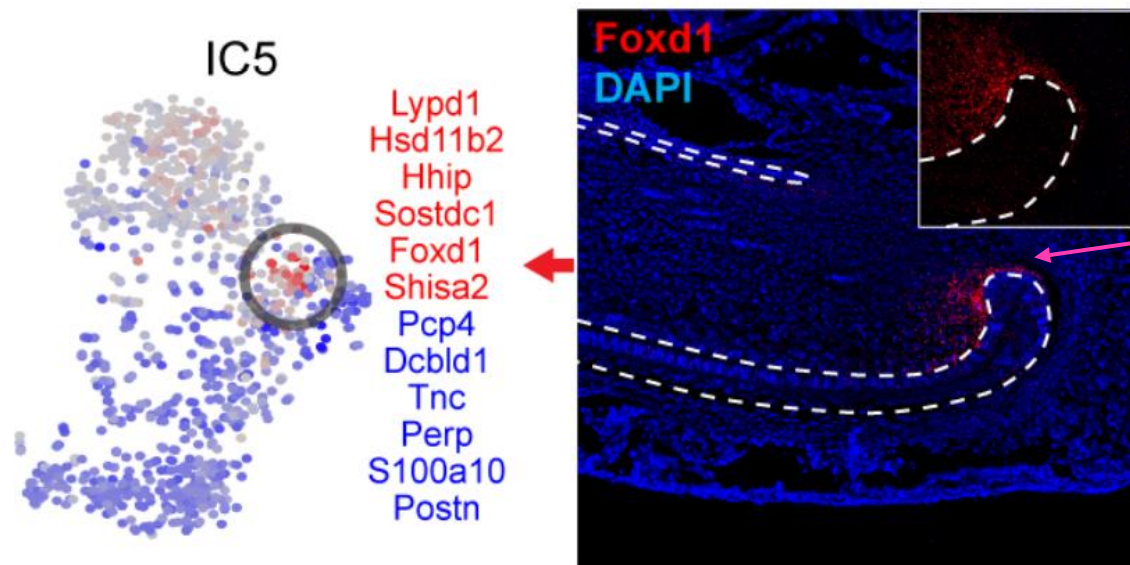
RNA-velocity analysis



Individual components analysis



Identification of FoxD1⁺ stem cells



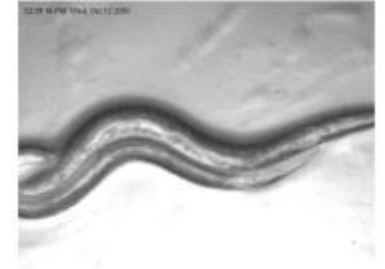
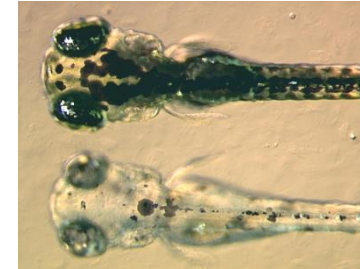
Nově objevená populace
mezenchymálních buněk v těsné
blízkosti labiální cervikální kličky

Jak zjistit funkci nově popsanych Foxd1⁺ buněk v kontinuálně rostoucím myším řezáku?

Sledování vývoje *in vivo*

- **Přímé pozorování**

- Jednoduchost, přesnost
- Metodu je možné využít pouze u transparentních organismů – často využíváno u bezobratlých, případně ryb nebo obojživelníků. Klasické modelové organismy: *D. rerio* nebo *C. elegans*



- **Využití barviv vázajících se na buňky nebo extracelulární matrix (např. Dil, Calcein)**

- Relativně jednoduchá aplikace
- Nespecifita, nutnost přesné manipulace, krátkodobost značení (vyředování, nestabilita)

- **Značení pomocí analogů tymidinu (BrdU, EdU)**

- Sledování aktivity dělících se buněk
- Přesná metoda, možno využít univerzálně bez ohledu na modelový organismus nebo dobu aplikace
- (omezeno pouze na buňky, které nově tvoří DNA)

Sledování vývoje *in vivo*

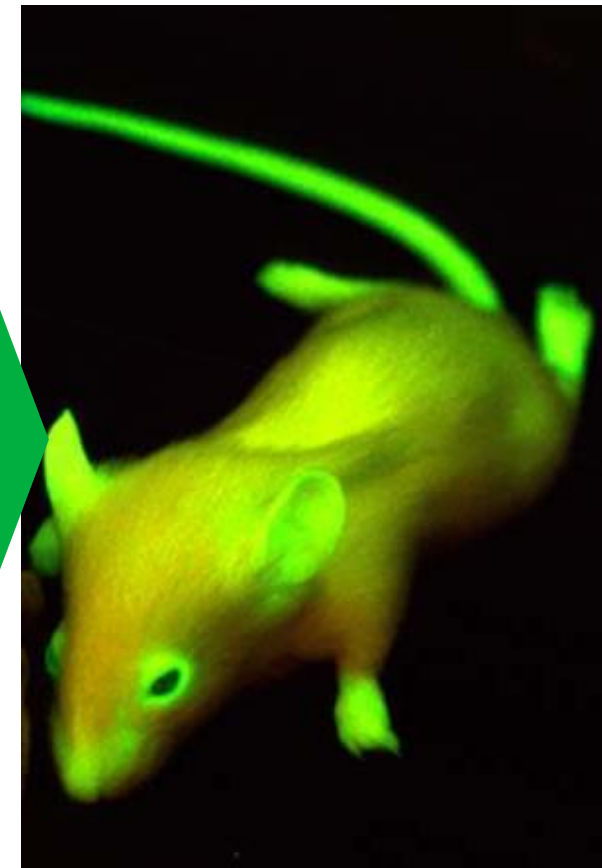
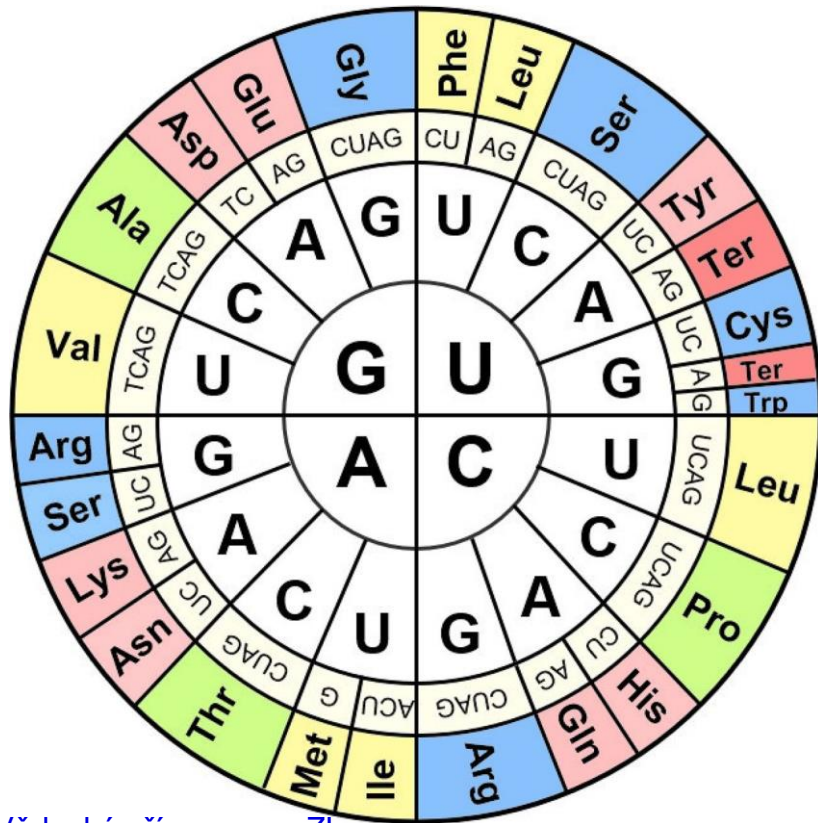
- **Genetické metody**
- Přesné cílení, vysoká specifita, velmi široké možnosti uplatnění, různorodost, dostupnost mnoha již připravených systémů, variabilní využití
- Nevýhody: Náročná a dlouhodobá příprava nových konstruktů
- Mezi genetické metody spadá celá řada různorodých metod. Mezi nejrozšířenější patří systémy:
- Cre/CreERT2
- Floxed
- TetON/TetOFF
- Cell barcoding

Lineage tracing!

Metoda umožňující provést řízené genetické změny v konkrétních buňkách

Kde se vzal GFP?

- Genetický kód je univerzální napříč druhy
- Možnost tvořit hybridní organismy – základní předpoklad genetického inženýrství

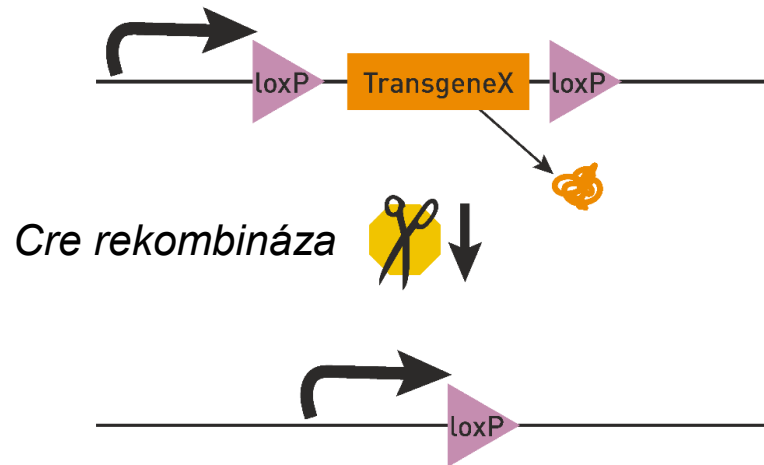


1



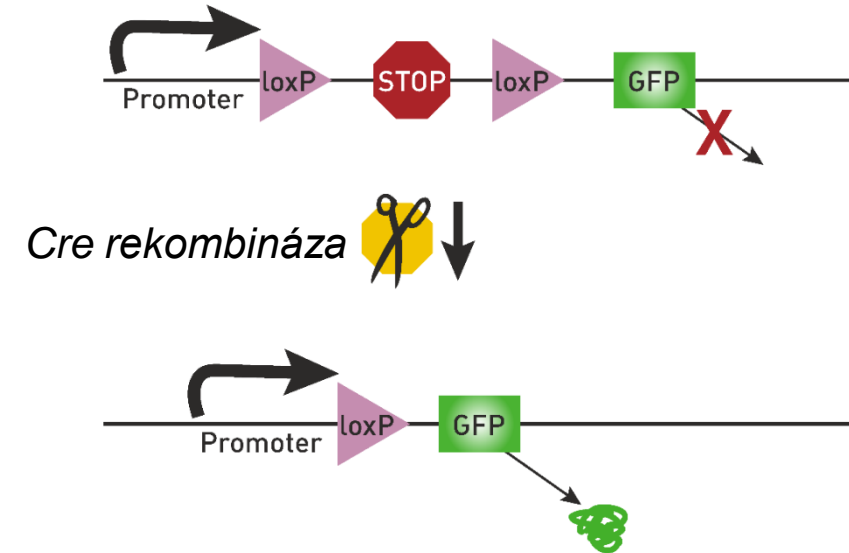
2

Vystřížení (trans)genu ohraničeného LoxP místy



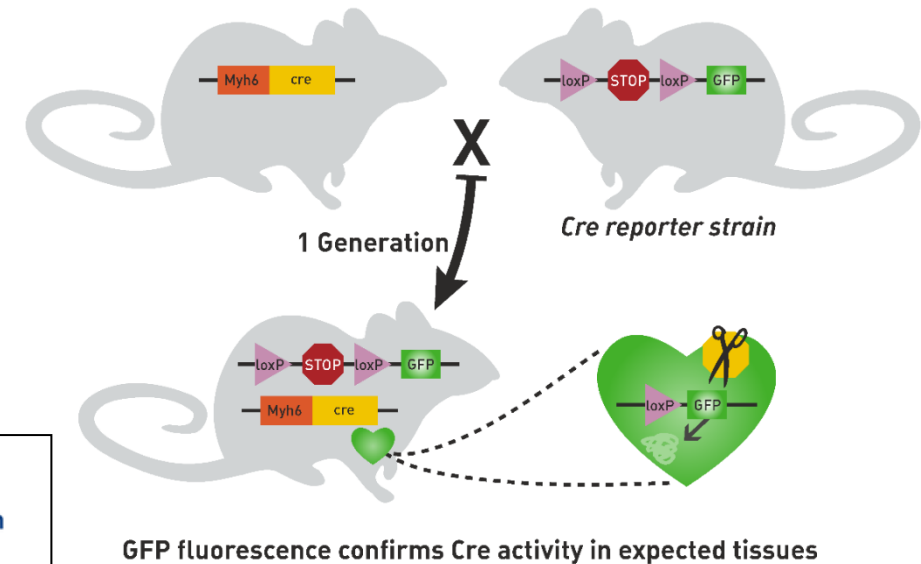
3

Vystřížení STOP sekvenční ohraničené LoxP místy



4

Tkáňově-specifická exprese GFP



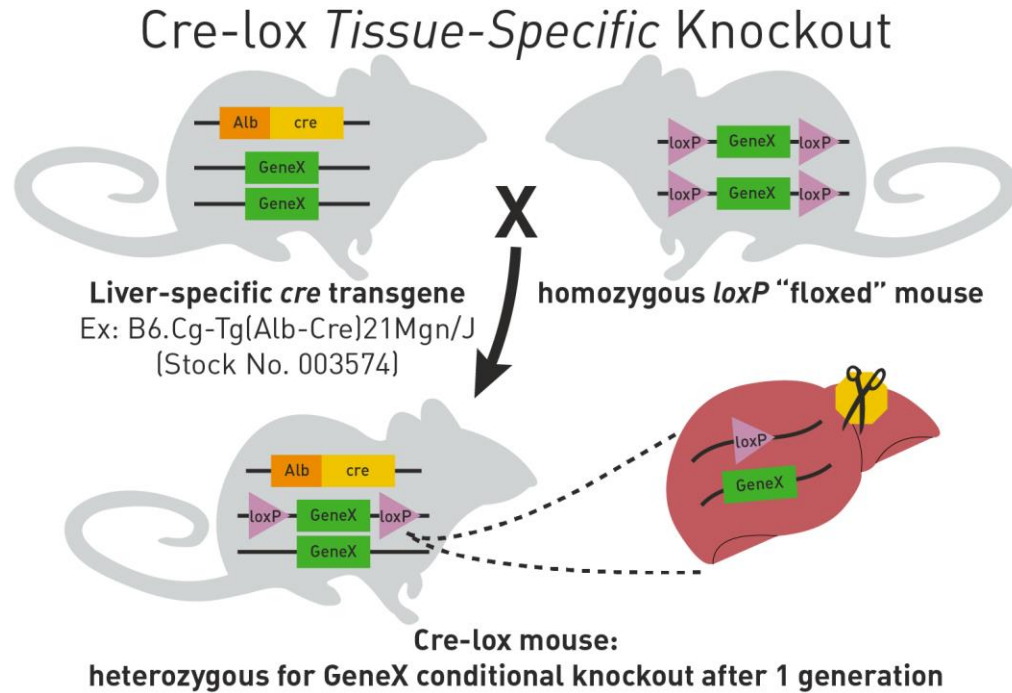
Blog Post | September 23, 2011

447 Vědecká příprava pro ZL CRE LOX BREEDING FOR BEGINNERS, PART 1

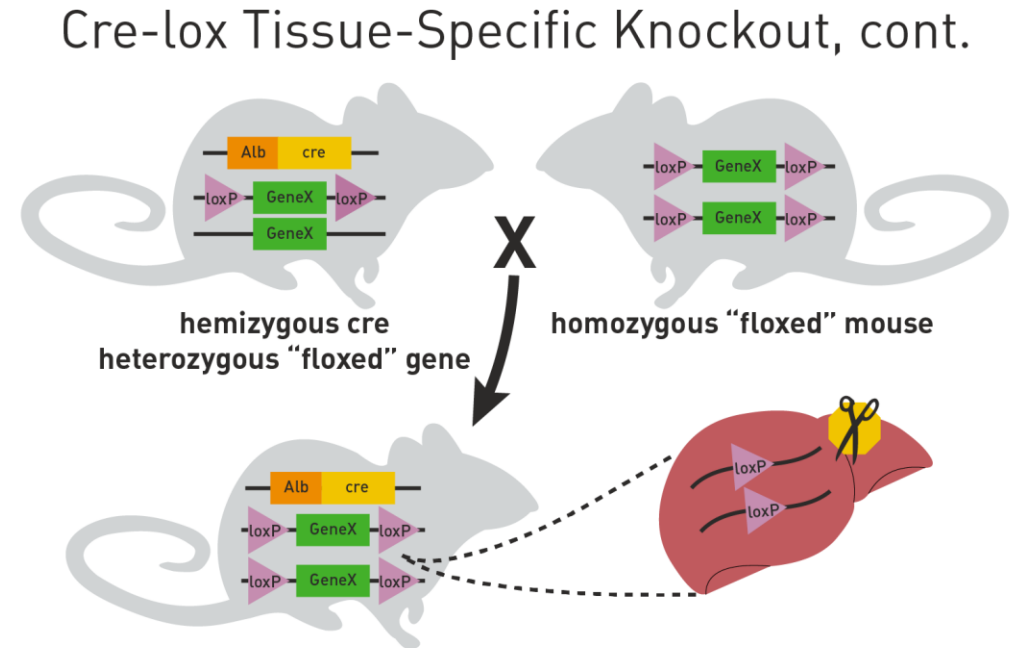
Peter Kelmenson



Knockout v heterozygotní formě



Knockout v homozygotní formě

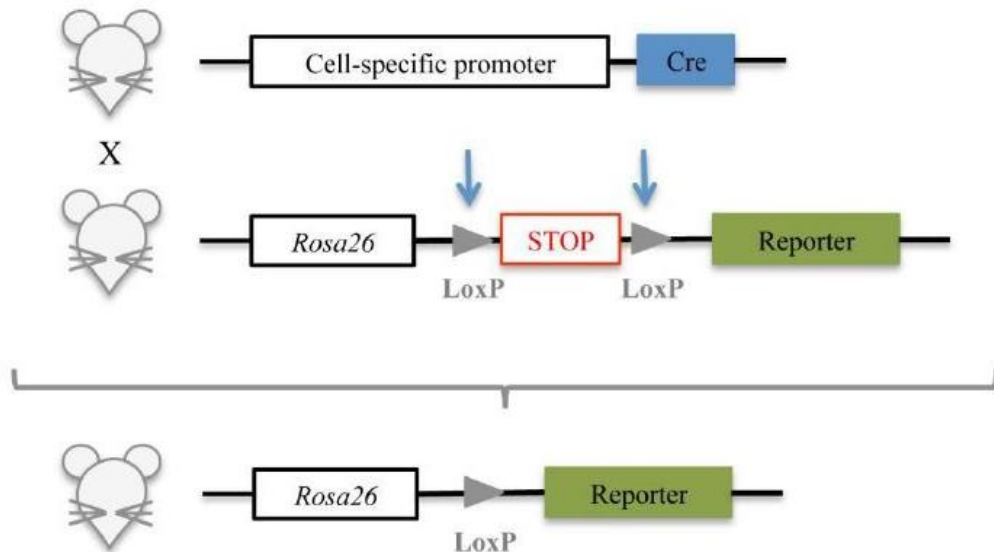


- Stejně probíhá získávání jiných transgenních organismů
- Mendelovská dědičnost

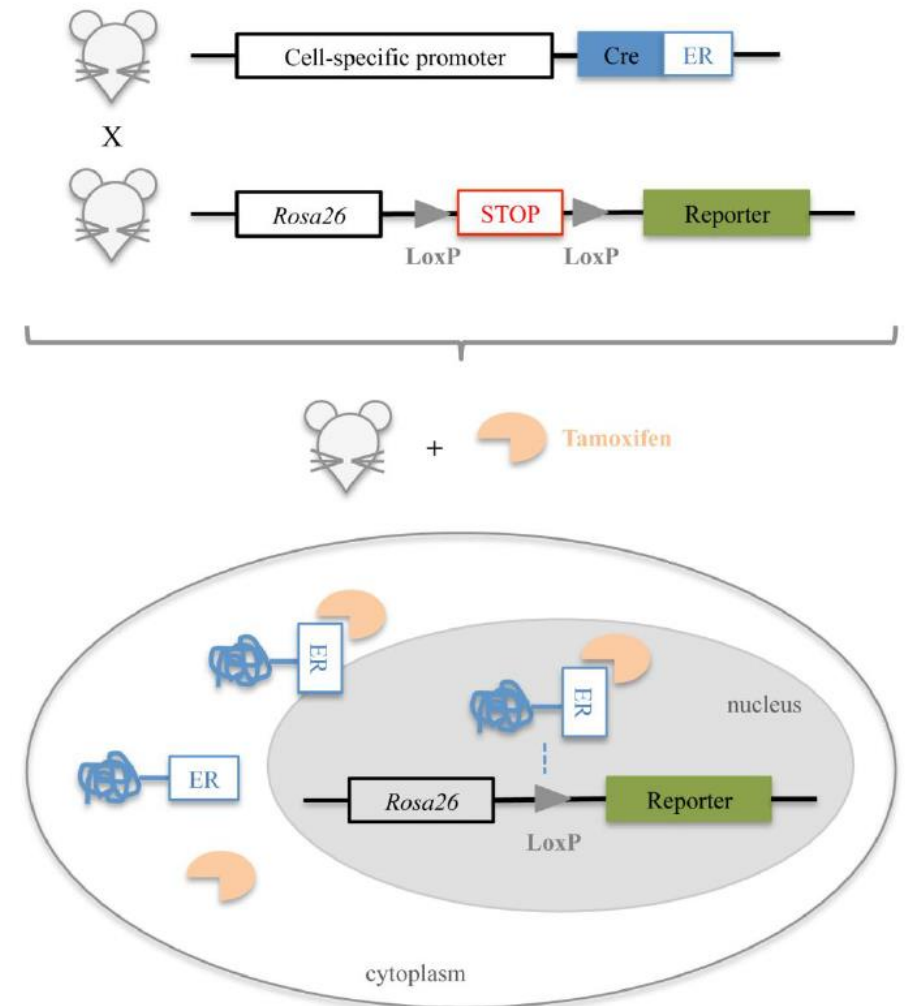
Konstitutivní vs. inducibilní systém

- U konstitutivního systému dochází ke stabilním genetickým změnám bez možnosti jejich ovlivnění
- V inducibilním systému můžeme genetickou změnu iniciovat – načasovat

Konstitutivní

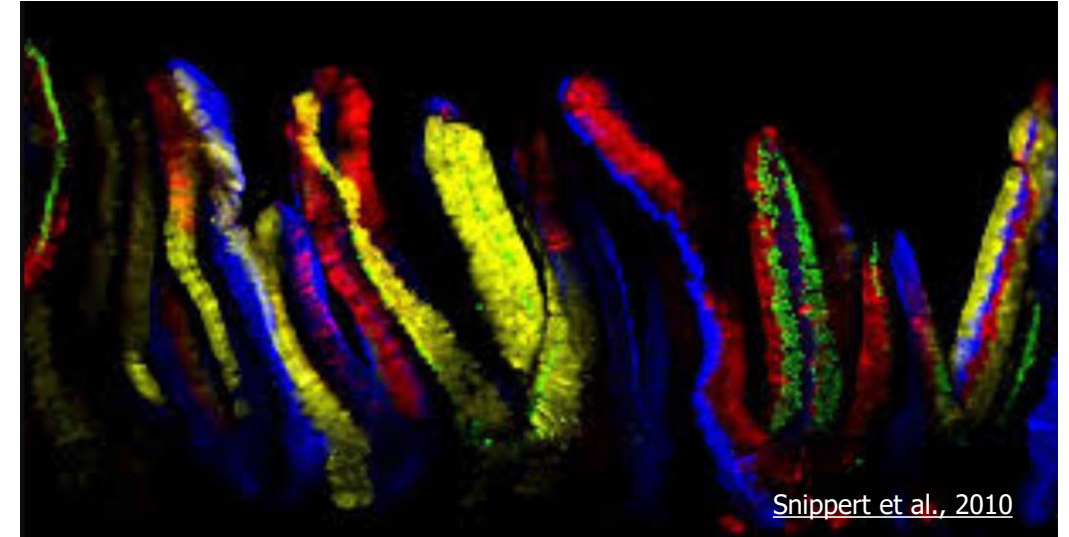


Inducibilní

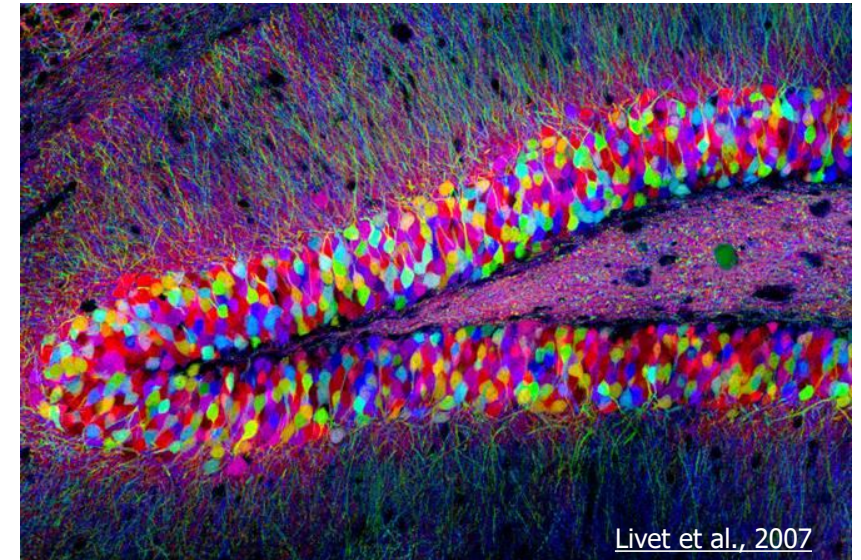
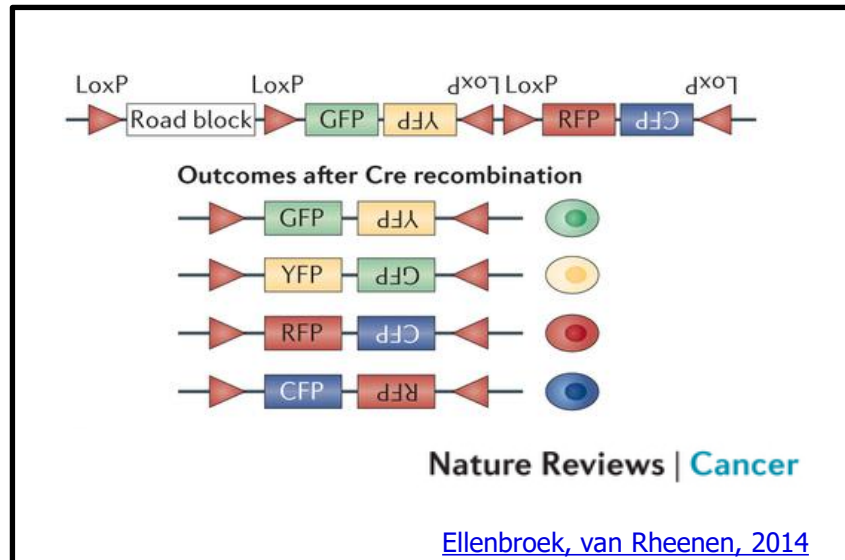


Vícebarevné systémy

- Transgen obsahuje více genů kódující různé fluorescenční proteiny
- Dochází k náhodné expresi těchto fluorescenčních proteinů
- Možnost klonálního genetického trasování

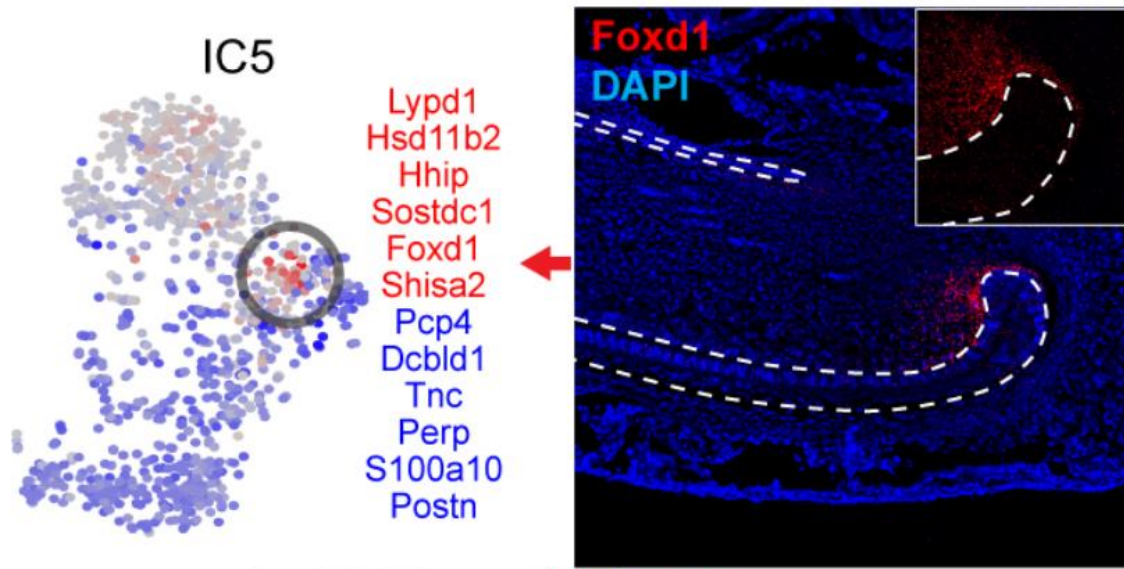


Confetti (Brainbow 2.1)



Praktické využití

Identification of FoxD1⁺ stem cells



Využití *Foxd1*^{CreERT2} myšího kmene k mapování Foxd1⁺ buněk *in vivo*

Identifikace nového typu dentálních mezenchymálních kmenových buněk!

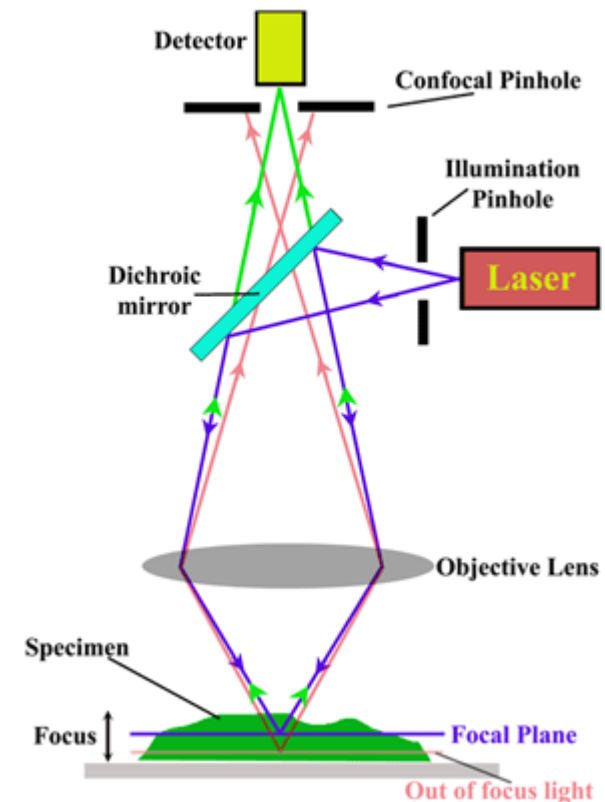
Moderní 3D/4D zobrazovací metody

- Zobrazení na základě **fluorescence**
 - Konfokální mikroskopie, Lightsheet mikroskopie, Live-imaging (time-lapse)
- Zobrazení pomocí **3D elektronové mikroskopie**
 - FIB-SEM (Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy)
 - SEM + sectioning
 - TEM + tilt series
- Metody **počítačové tomografie (CT)**
 - microCT
 - nanoCT

3D/4D zobrazení na základě fluorescence

- **Konfokální mikroskopie**

- Využití laserů pro excitaci fluoroforů
- Detekce odraženého světla o definované vlnové délce po průchodu přes **pinhole** – detekce světla pouze z jedné „zaostřené“ roviny
- Zvětšení rozlišení klasické fluorescenční mikroskopie
- Možnost poskládat jednotlivé snímky a následné vytvoření 3D obrazu
- Kombinace různých barev/fluoroforů
- Limitem je samotná vlnová délka světla (maximální rozlišení je polovina vlnové délky)

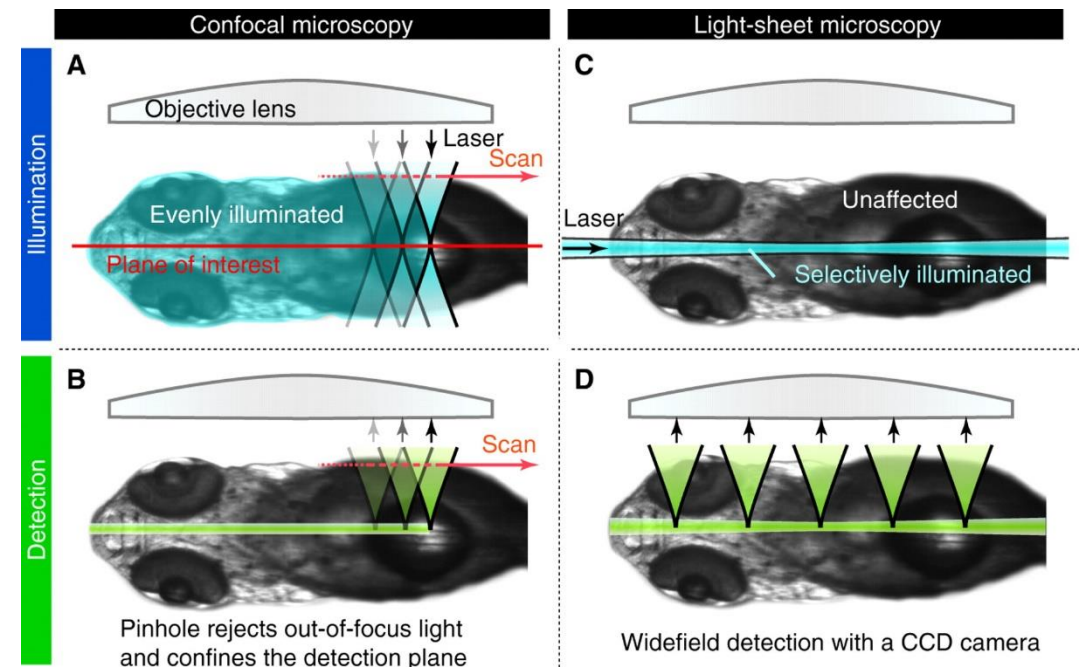


3D/4D zobrazení na základě fluorescence

■ Lightsheet mikroskopie

- Stejné principy jako u konfokální mikroskopie
- Excitační laser/y iluminuje vzorek ze strany pod úhlem 90°
- Možnost využít dvou laserů
- Zvýšení rychlosti (snížení fototoxicity)
- Možnost otáčení vzorku během skenování

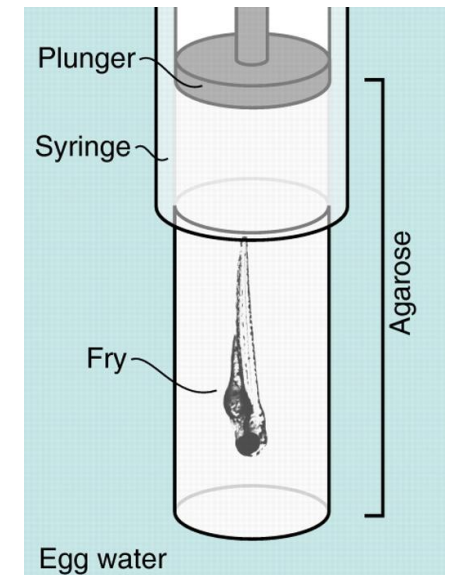
Konfokální i Lightsheet mikroskopie umožňují snímání i formou **time-lapse** – nezbytnost pro **sledování vývoje v čase**.



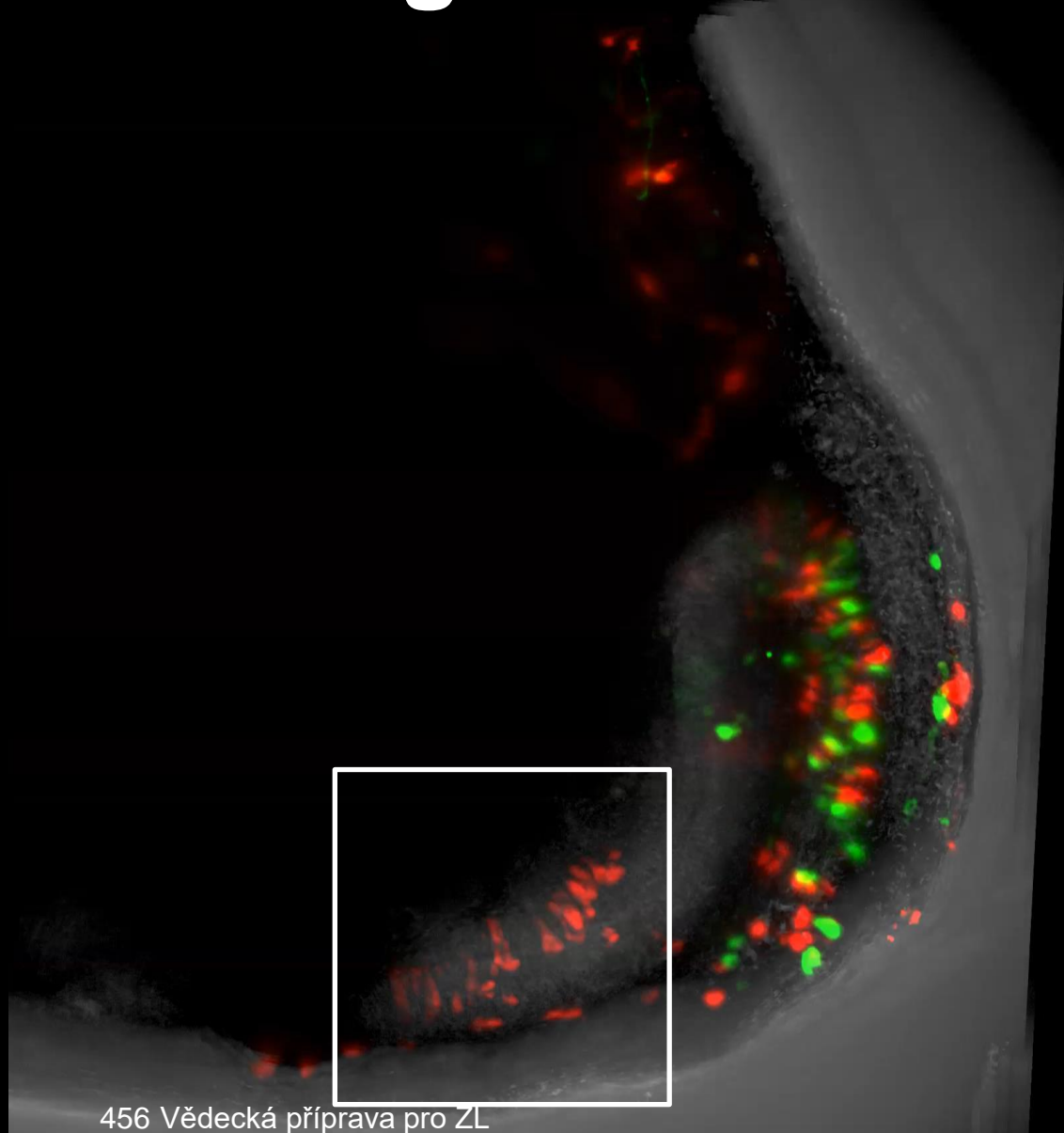
3D/4D zobrazení na základě fluorescence

Příklady využití Lightsheet mikroskopie:

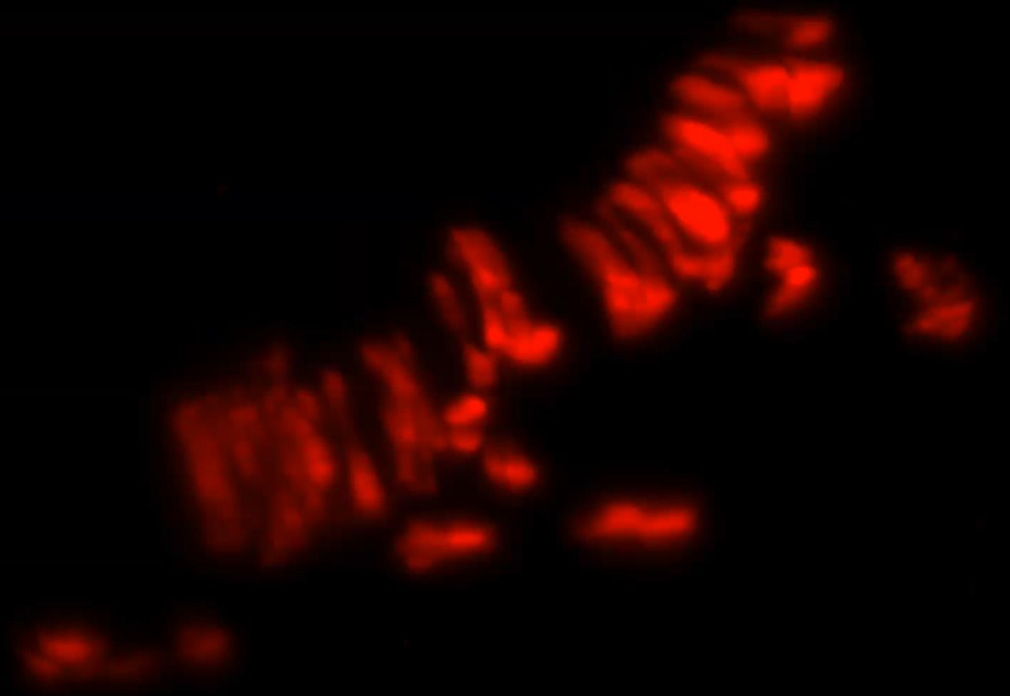
- Calcium releasing in brain: <https://youtu.be/lppAwkek6DI>
- Zebrafish development: <https://youtu.be/-WaseO2Vw5Q>
- Zebrafish development <https://youtu.be/yk7TWOtrphM>
- Beating heart <https://youtu.be/bQ4GWJ7F7eU>
- Adult mouse brain <https://youtu.be/-QJIBQkDH00>



Lightsheet mikroskopie (live imaging)

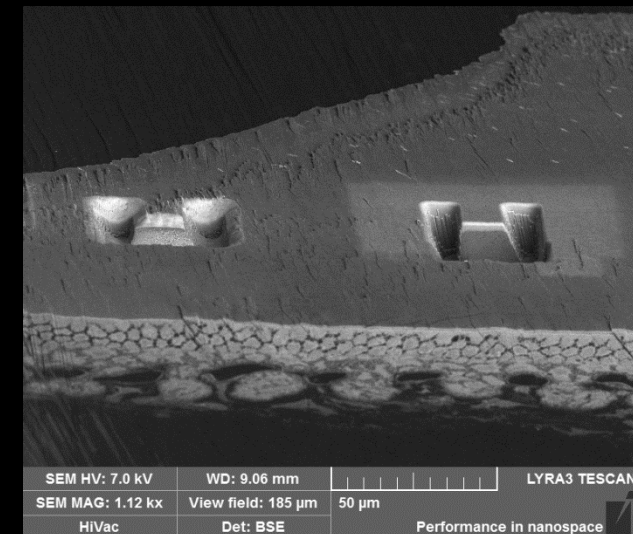
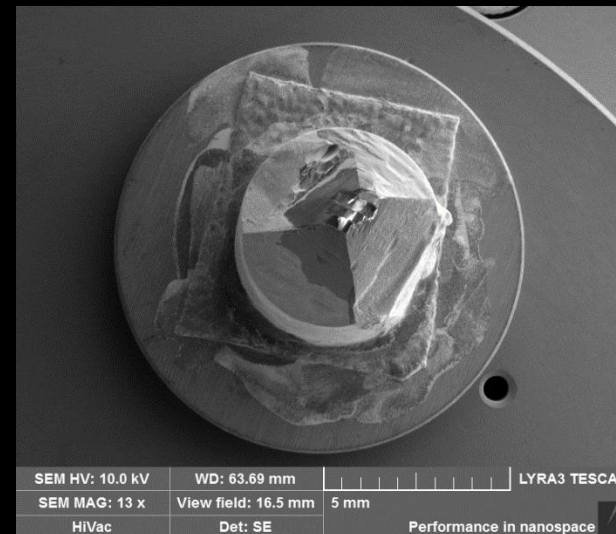


456 Vědecká příprava pro ZL

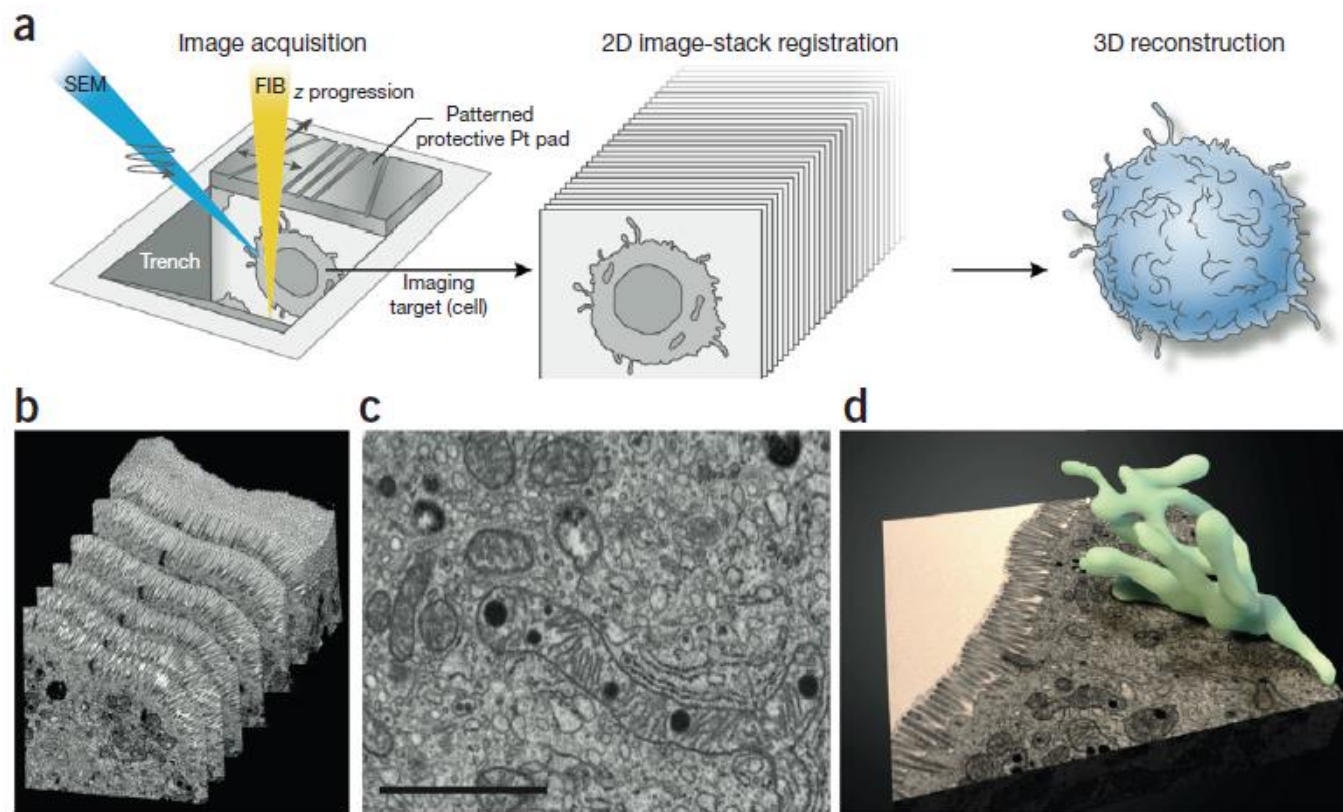


3D elektronová mikroskopie

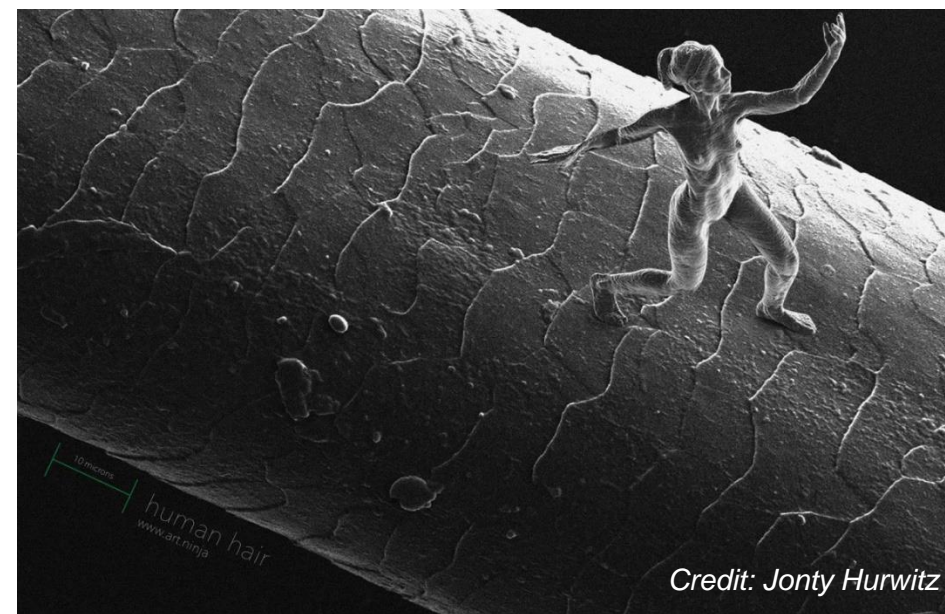
- **FIB-SEM** (Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy)
 - Využití fokusovaného iontového (Gallium, Xenon) svazku pro **přesné odřezávání tenkých plátků** vzorku **v kombinaci se skenovací elektronovou mikroskopií**
 - Umožňuje **vysoké rozlišení** na úrovni SEM včetně následné 3D rekonstrukce
 - Náročná příprava vzorku, dlouhá doba snímání, vysoká cena, technicky náročný proces
 - Při snímání **dochází ke kompletnímu zničení vzorku**, nemožnost sledování objektů v čase



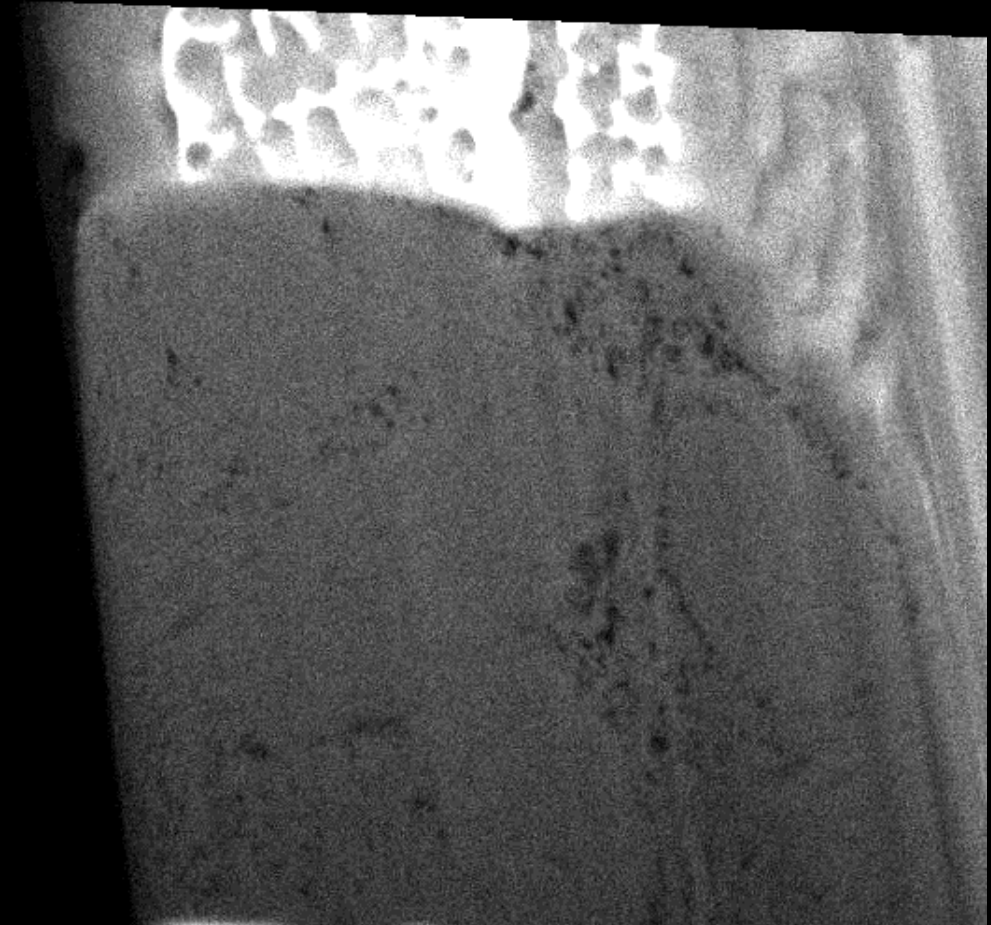
FIB-SEM



[Narayan et Subramaniam, 2015](#)



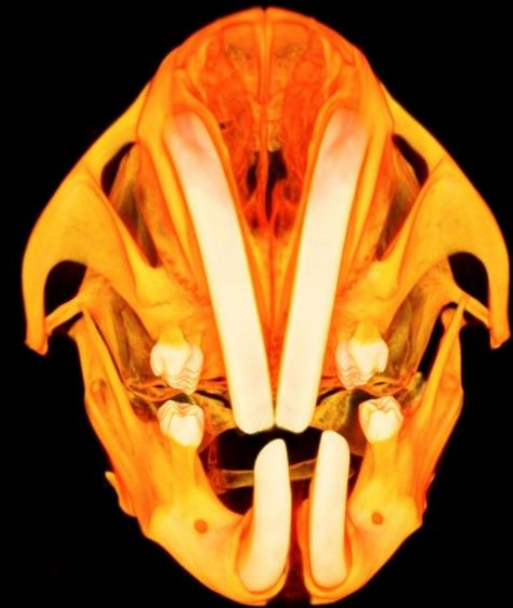
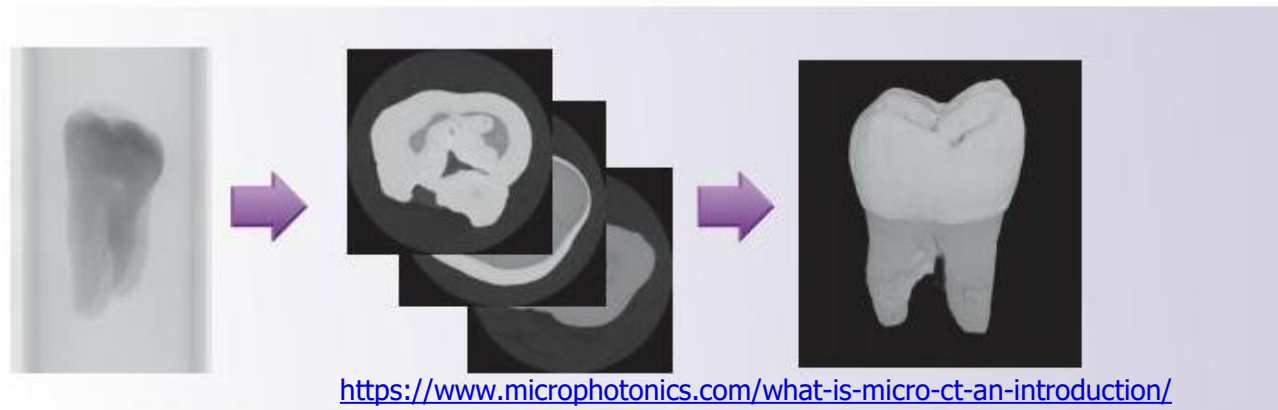
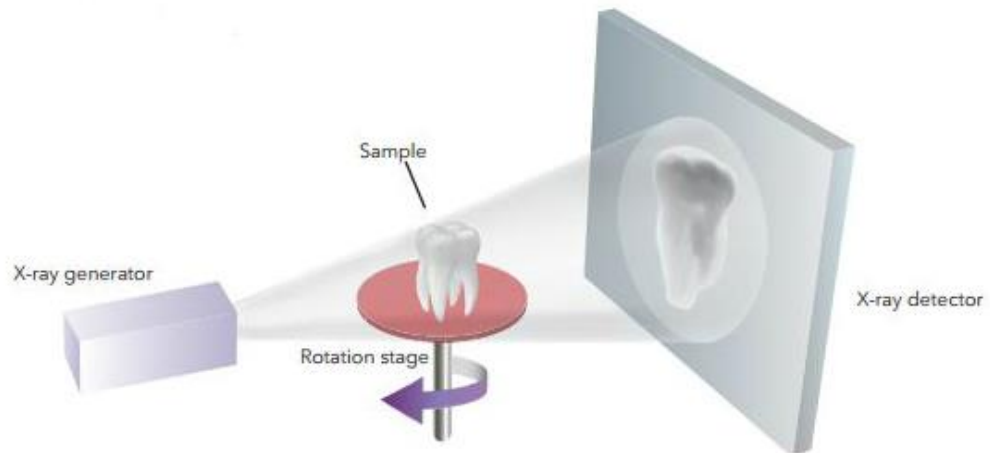
FIB-SEM



Metody počítačové tomografie (CT)

- Využití techniky počítačové tomografie s adaptací na malé vzorky (microCT / nanoCT)
- Rentgenové záření v kombinaci s rotací vzorku
- Zobrazení 3D struktury vzorku
- Rutinně používaná technika pro zobrazení tvrdých tkání
- Při požadavku zobrazení měkkých tkání nutno použít různé kontrastní techniky
- Nemožnost sledování objektů v čase, vzorky jsou fixované

μ CT



Použité zkratky

- FACS - Fluorescence-activated cell sorting, Fluorescenčně-řízené třídění buněk
- LaCL - Labial Cervical Loop, Labiální cervikální klička
- LiCL - Lingual Cervical Loop, Linguální cervikální klička
- scRNA-seq - single-cell RNA-sequencing, sekvenování mRNA na úrovni jednotlivých buněk
- tSNE - T-distributed Stochastic Neighbor Embedding
- OEE - Outer Enamel Epithelium, vnější sklovinný epitel
- (BrdU, EdU) - Bromodeoxyuridine, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
- GFP - Green Fluorescent Protein, Zelený Fluorescenční protein
- FIB-SEM - Focused Ion Beam – Scanning Electron Microscopy
- TEM - Transmisní Elektronová Mikroskopie
- CT - Computed Tomography (μ CT, micro computed tomography)
- Pokemon - Poketto Monsutá – kapesní příšerky

Odontogeneze – využití alternativních modelových organismů

doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno

Laboratoř molekulární morfogeneze

Marcela Buchtová (ÚŽFG/OFIŽ MU)

- Vývoj kraniofaciálních struktur a příčiny vzniku souvisejících malformací
- Komparativní odontogeneze
- Úloha kmenových buněk ve vývoji zubů
- Patogeneze spinocelulárního karcinomu, odontogenních tumorů a cyst v ústní dutině

Odontogeneze

Obsah

- Komparativní odontogeneze (tradiční vs. netradiční modelové organizmy, jejich výhody a nevýhody)
- Morfogeneze a regulace vývoje náhradních generací zubů
- Příčiny redukce vývoje náhradních generací u některých modelových organizmů se zaměřením na buněčné a molekulární procesy

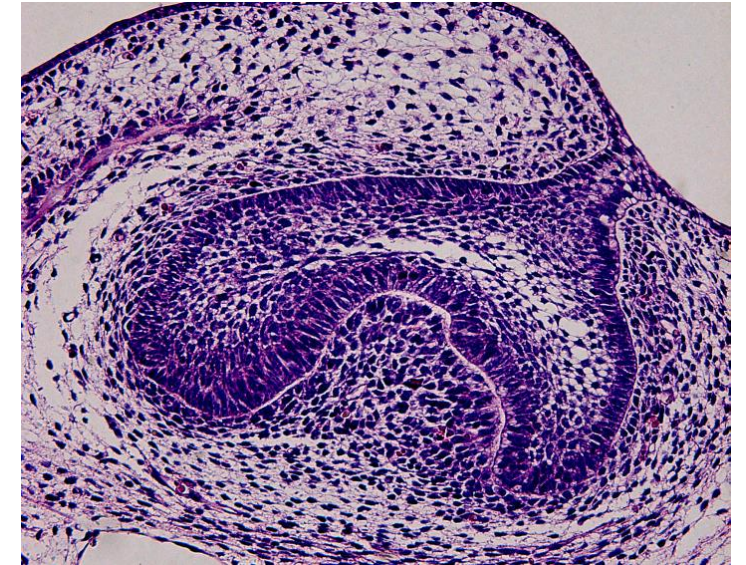
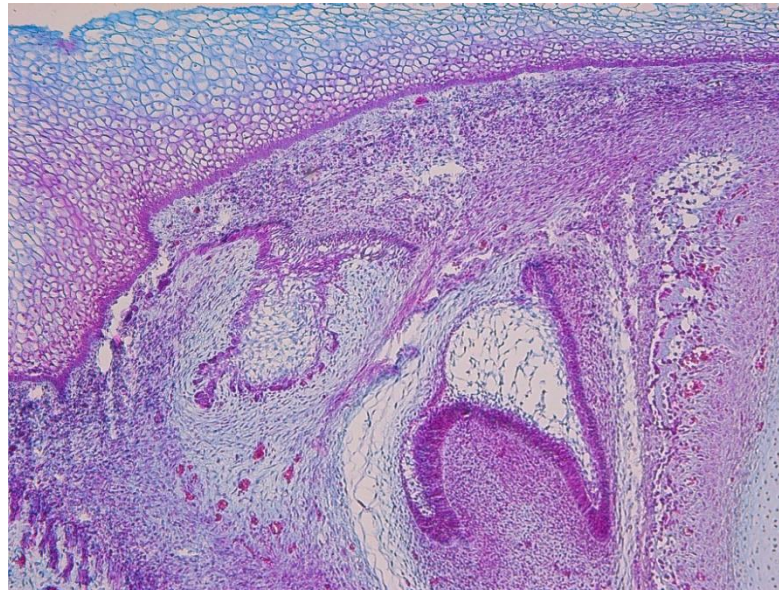
Počty generací zubů

- Monofyodontní dentice
- Difyodontní dentice
- Polyfyodontní dentice

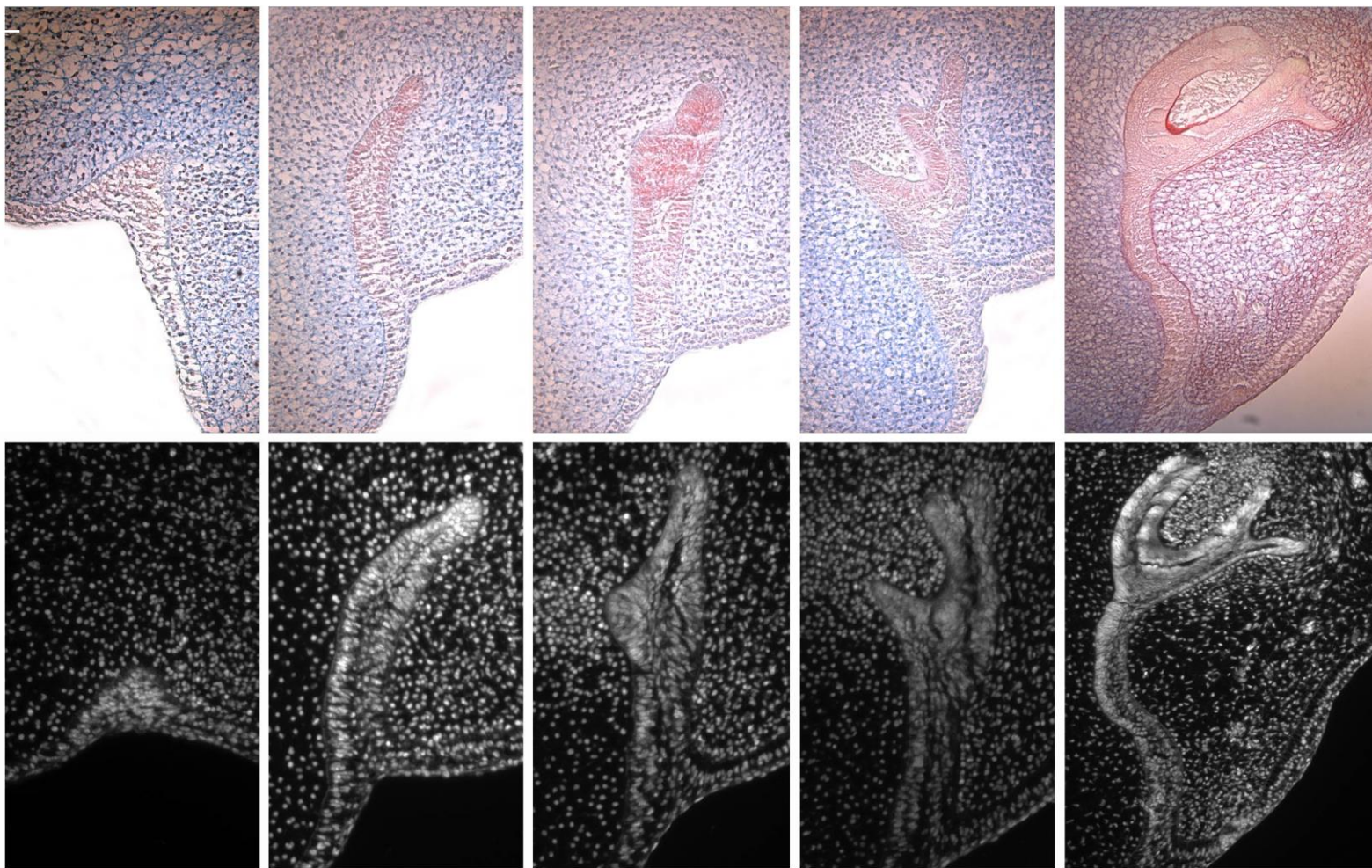


Co je základem pro formování náhradních generací zubů?

- zubní lišta – druhově specifické rozdíly ve velikosti, délce trvání

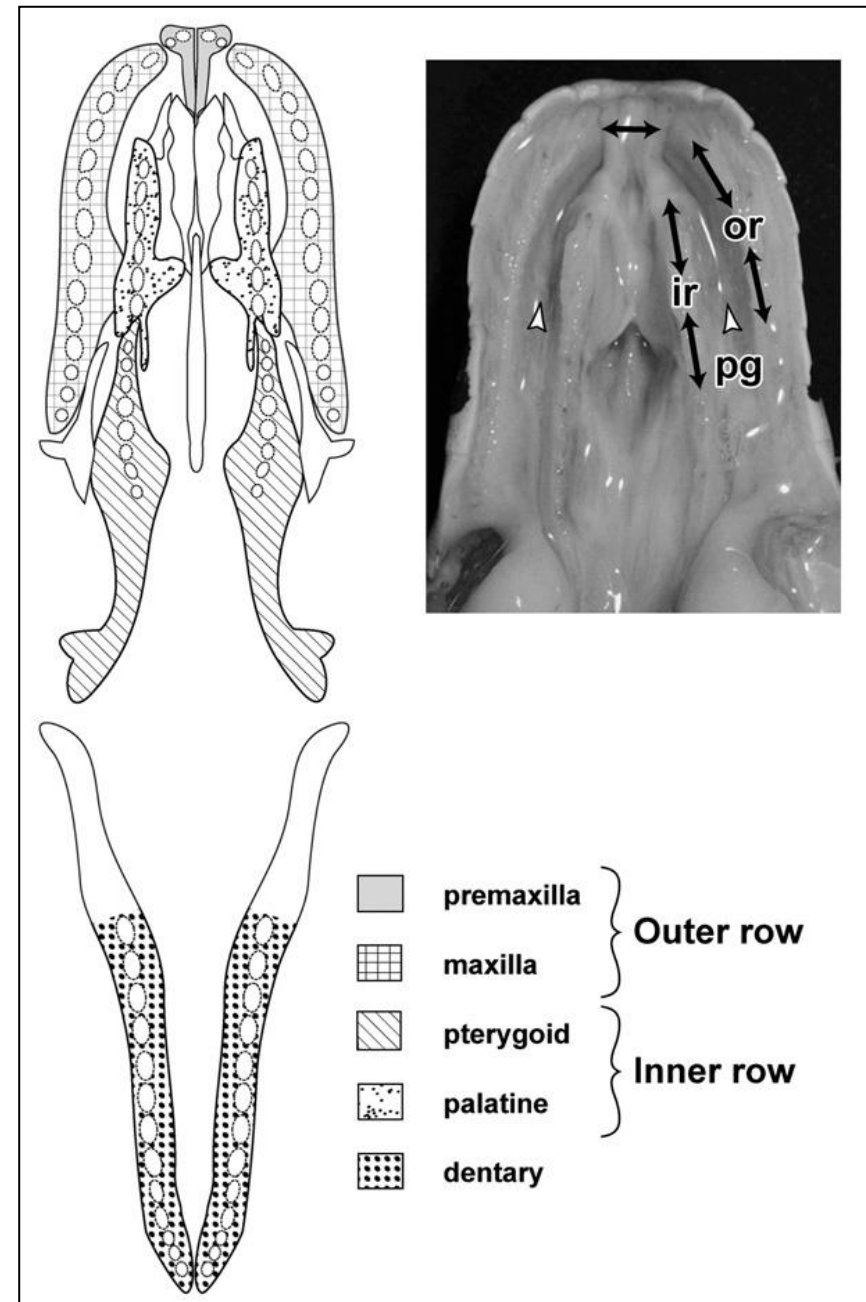


Zubní lišta vzniká z epitelového ztluštění

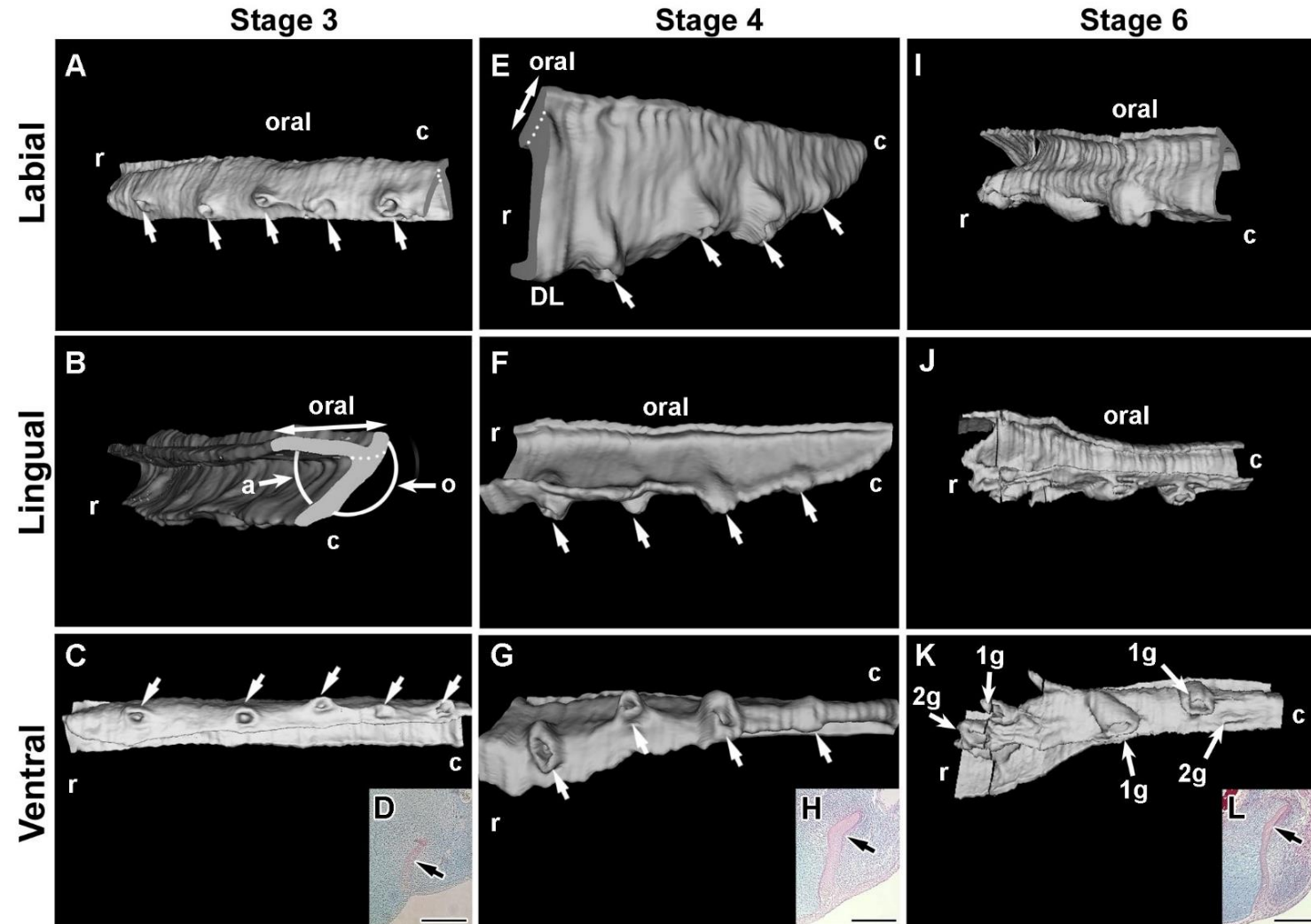


Polyfyodontní dentice

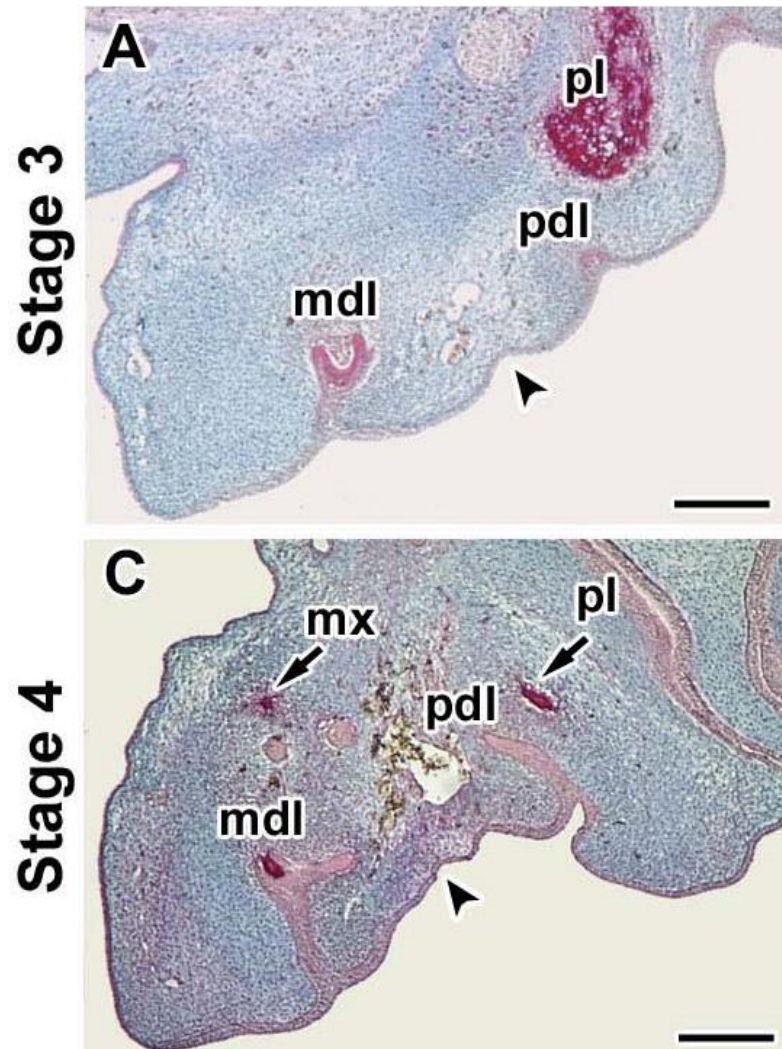
- Homodontní dentice



Zubní lišta – kontinuální struktura podél čelisti

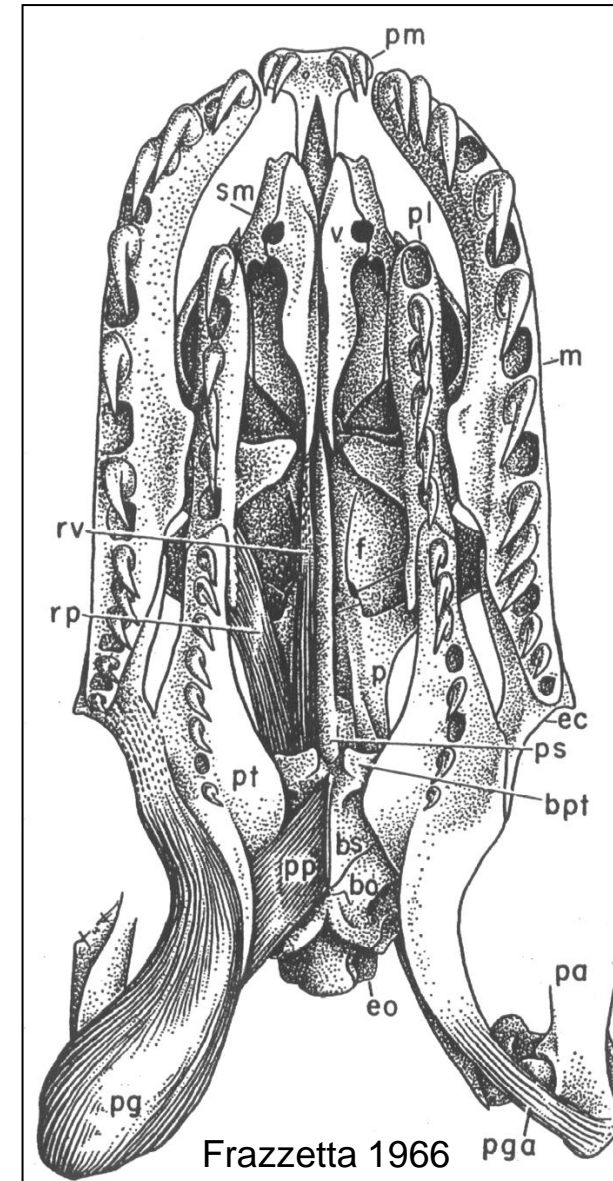


Vnější vs. vnitřní zubní řada

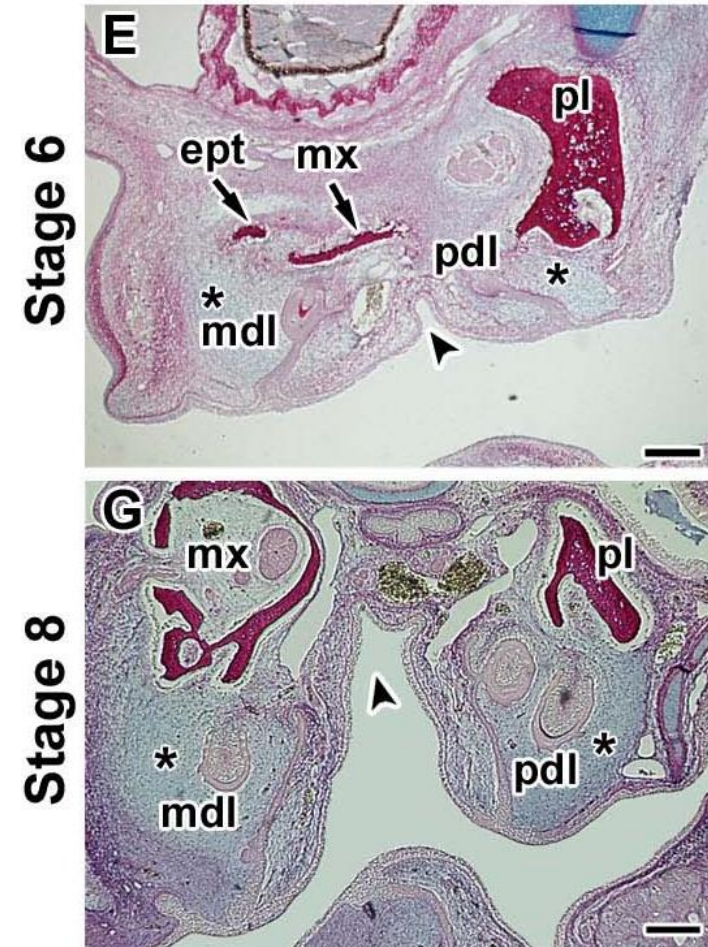
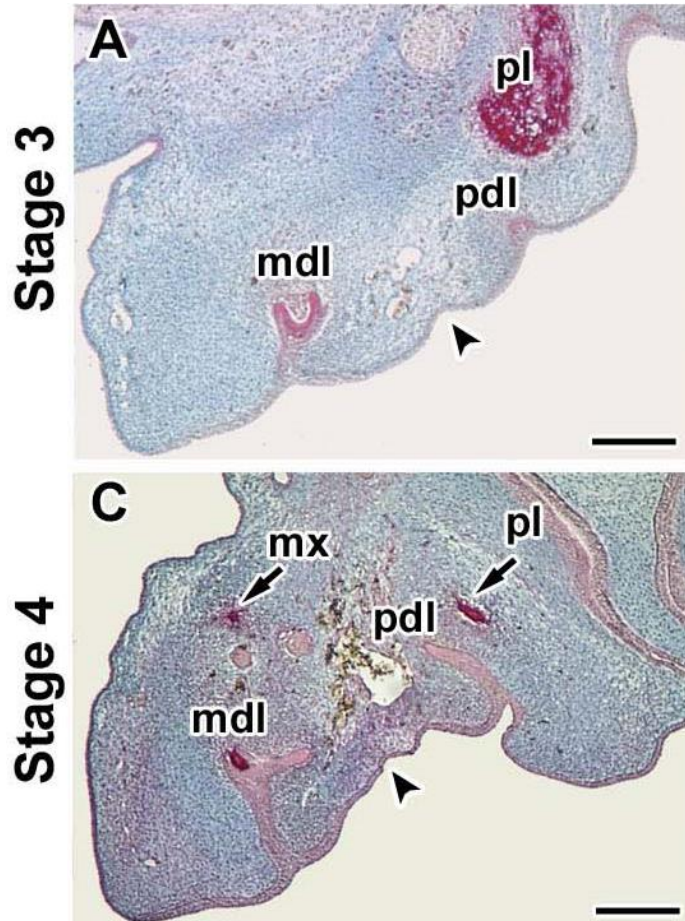


471 Vědecká příprava pro ZL

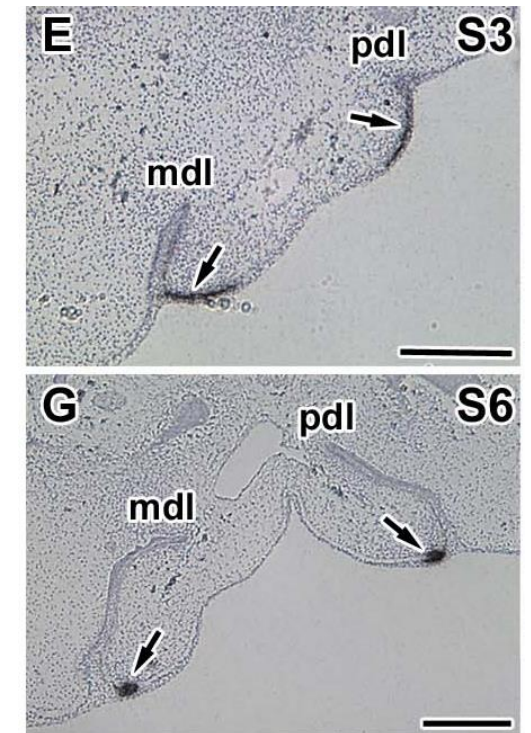
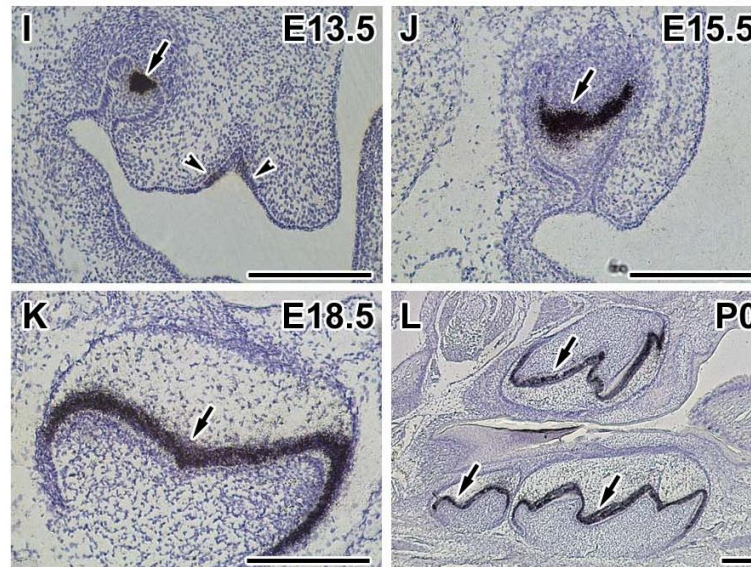
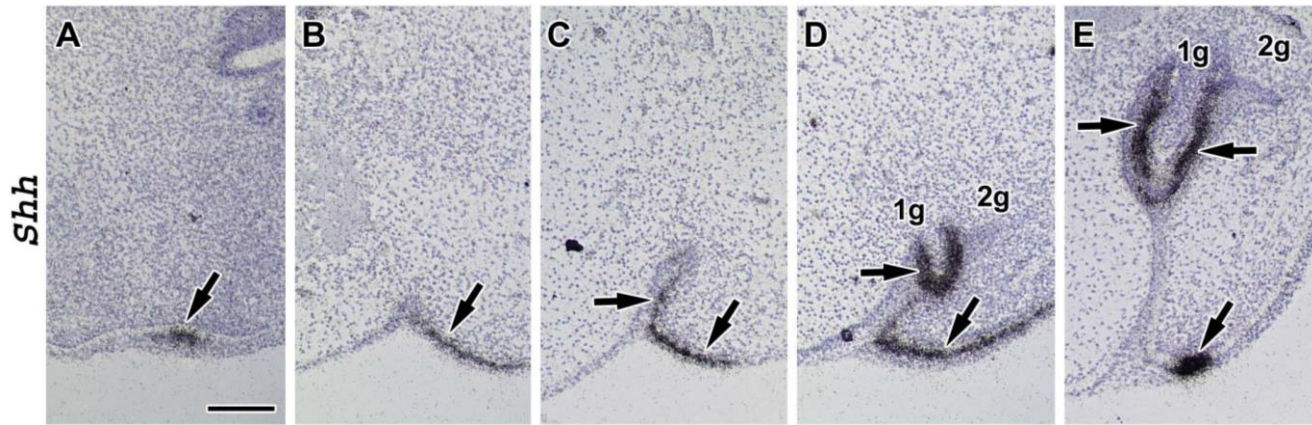
[Buchtova et al. 2007](#)



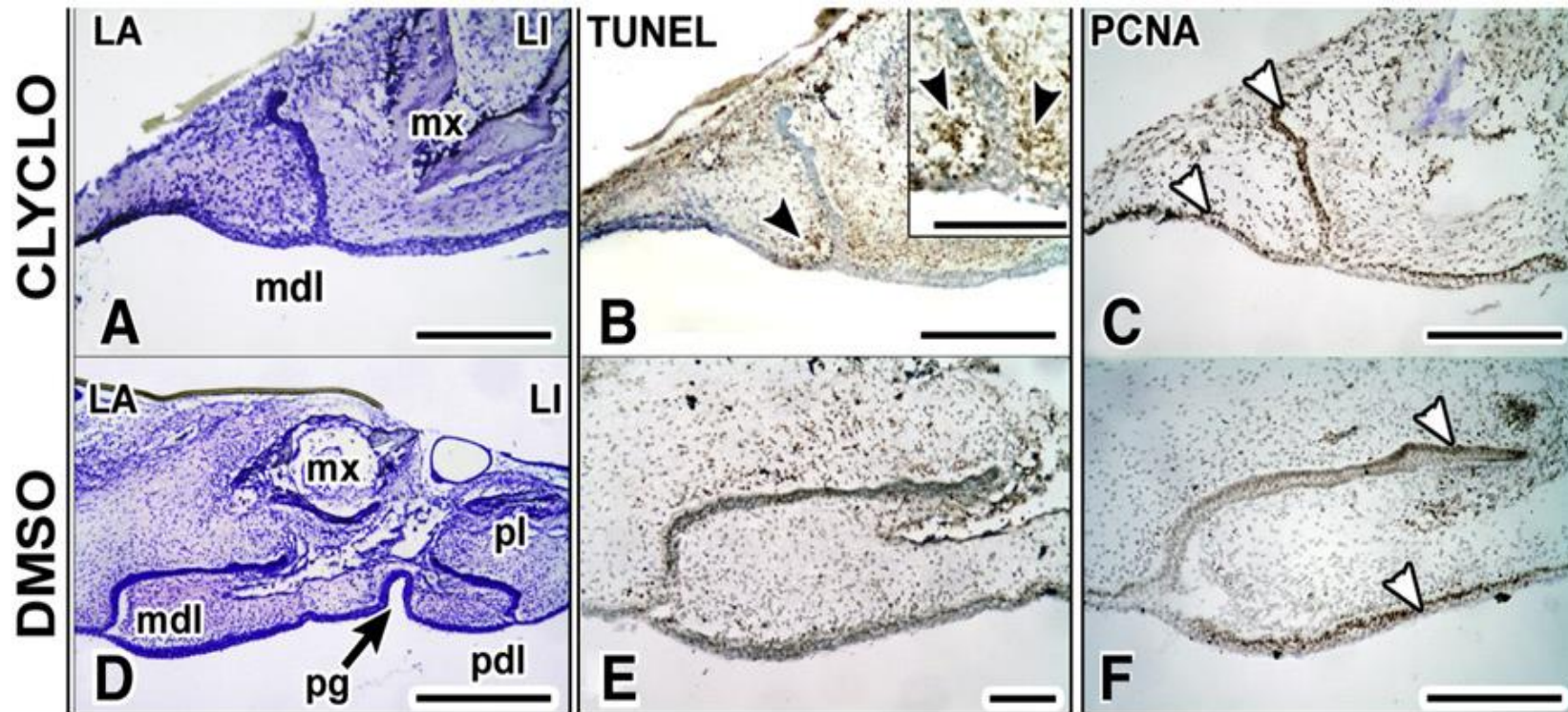
Zrcadlově obrácené zubní lišty v horní čelisti



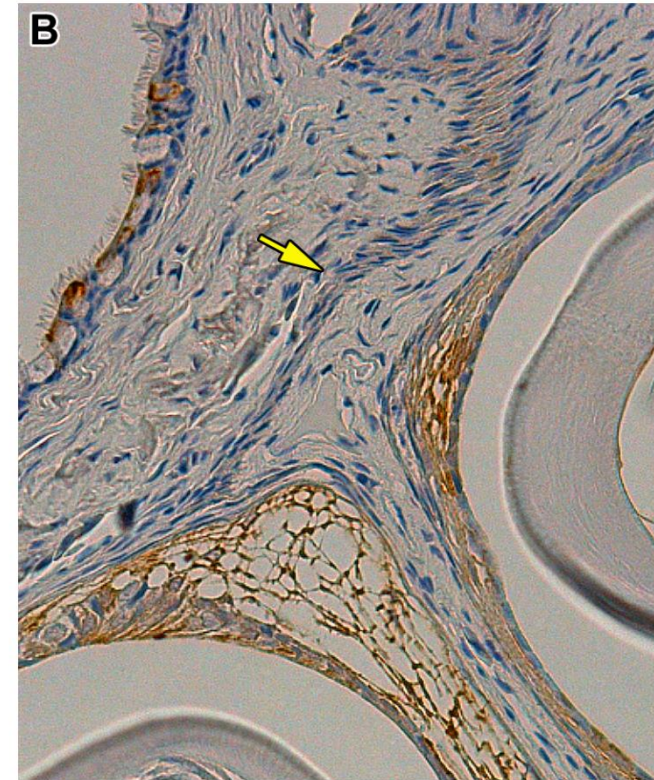
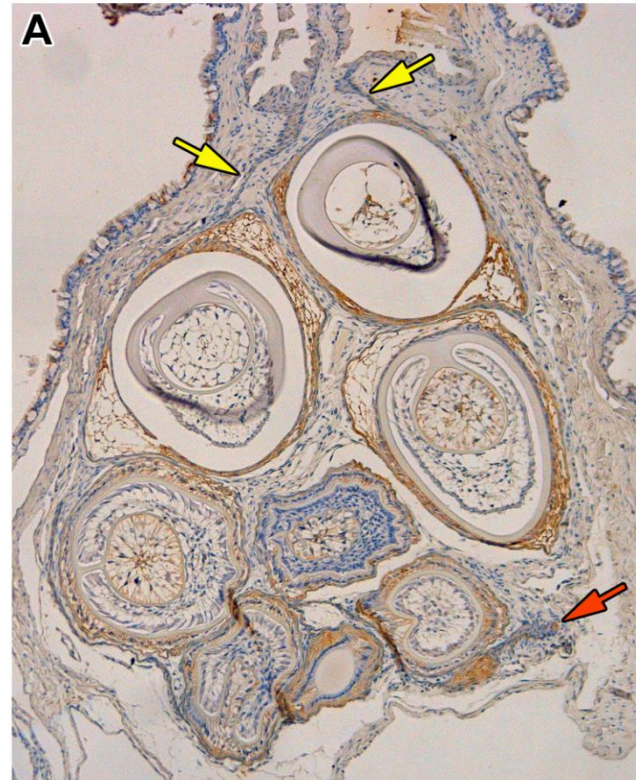
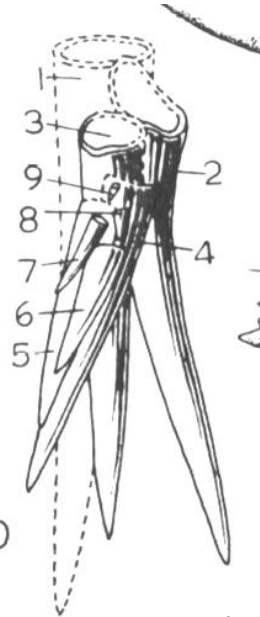
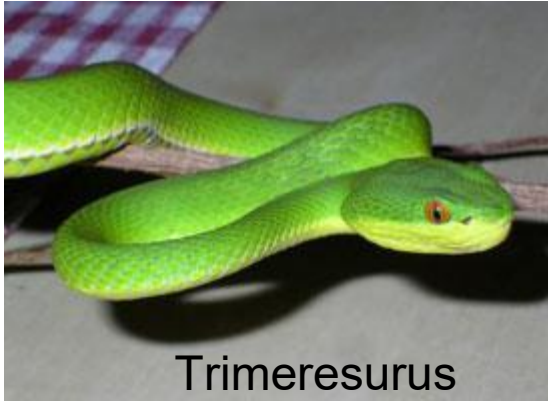
Shh exprese v zubní liště



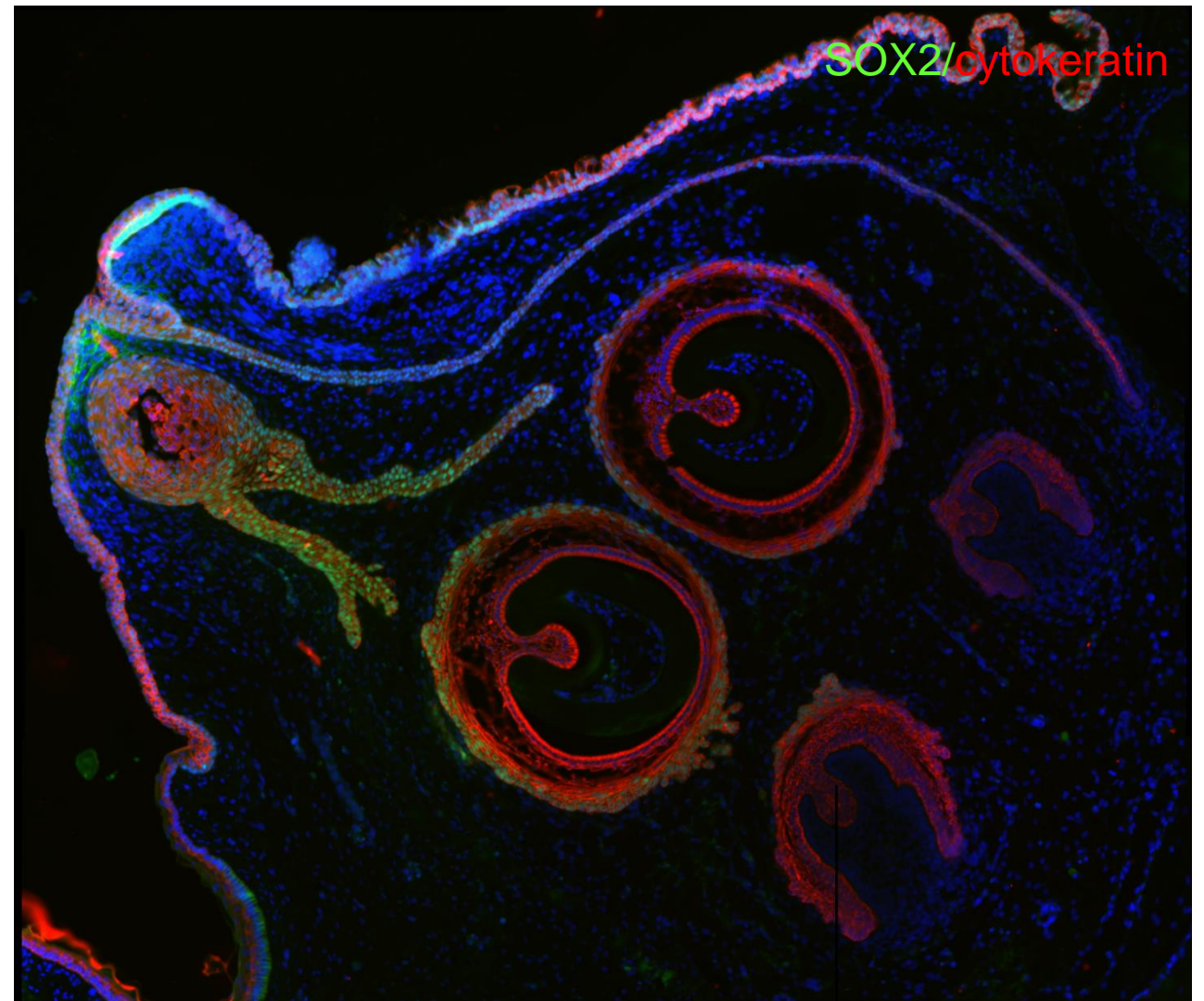
SHH reguluje asymetrický růst zubní lišty



Vyvíjí se jedové zuby ze zubní lišty?



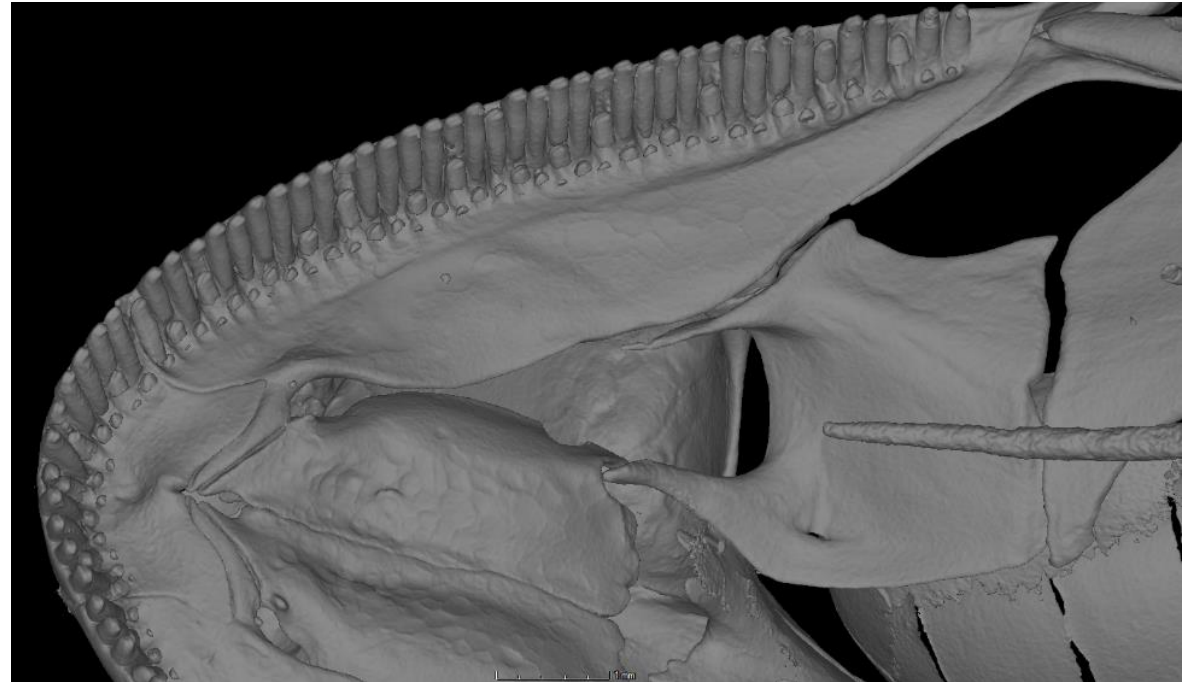
Zubní lišta kobry



Výhody využití plazů pro studium odontogeneze

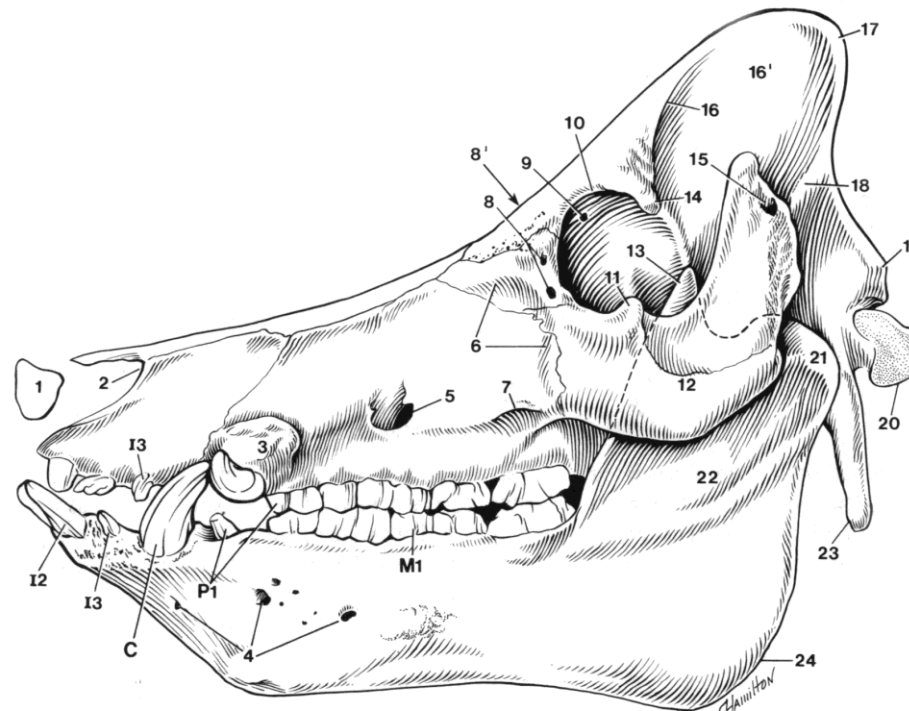
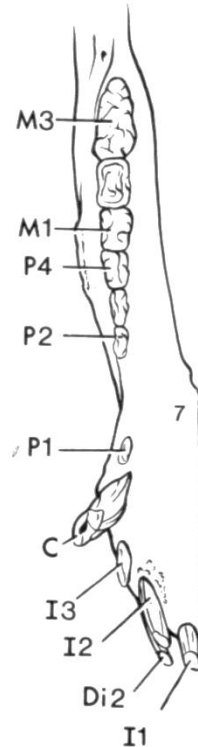
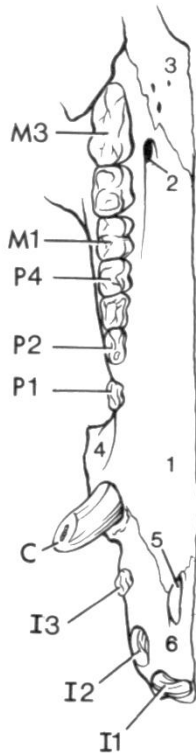
Výzkum polyfyodontní dentice může odpovědět:

- Jak je náhradní zubní lišta iniciována?
- Jak je zubní lišta udržována?
- Jak jsou dodržovány rozestupy mezi zubními zárodky?
- Jak jsou regulovány kmenové buňky v zubní liště?

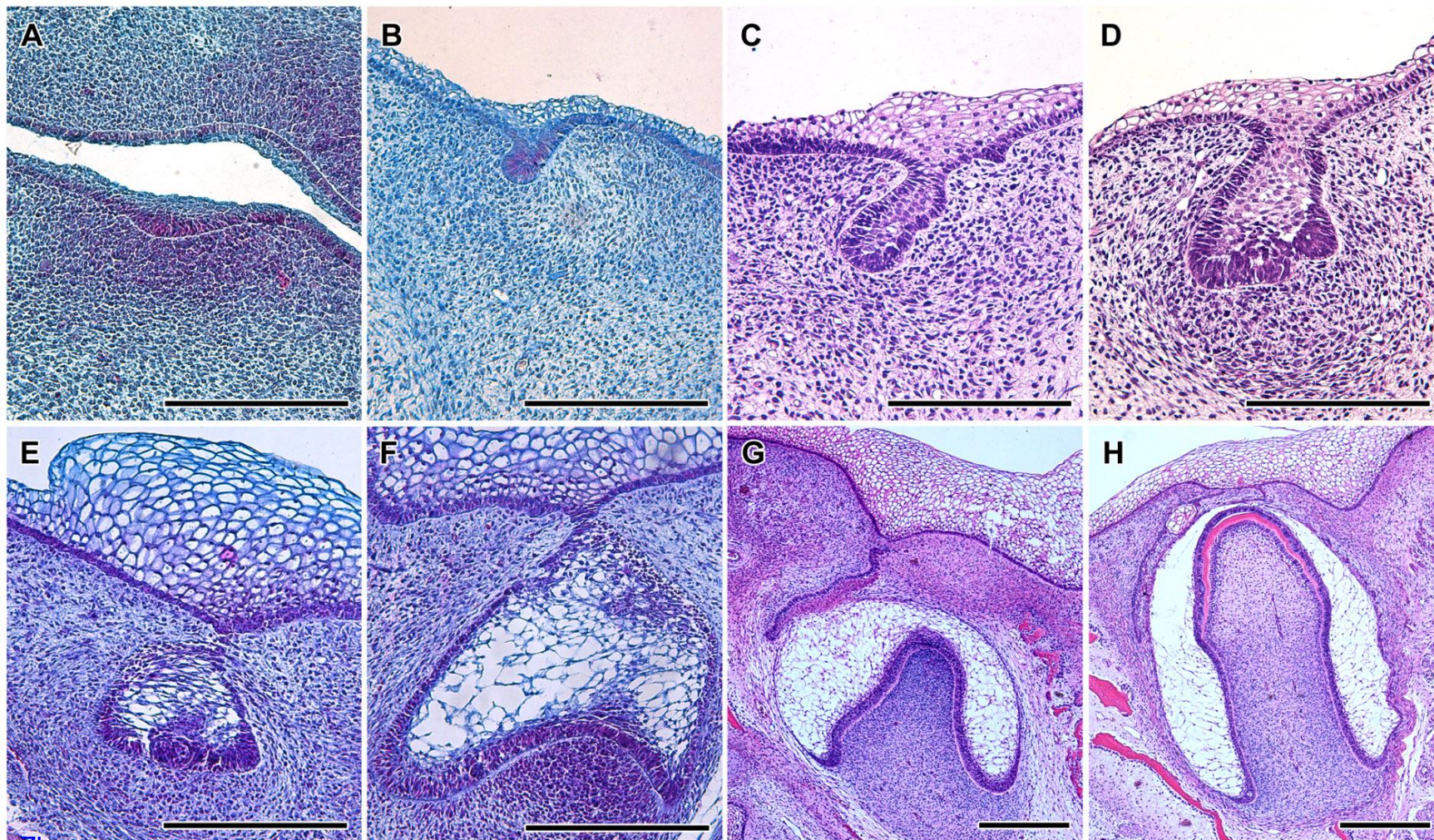


Difyodontní dentice

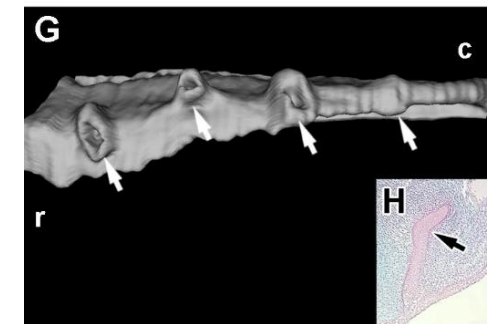
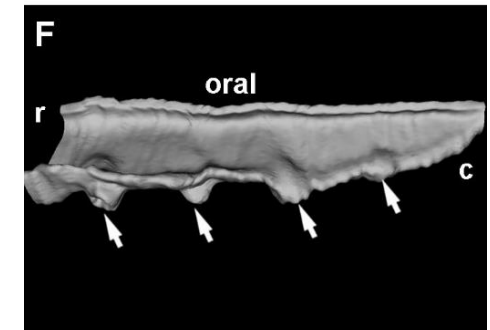
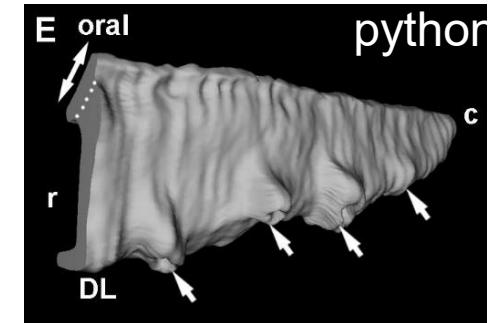
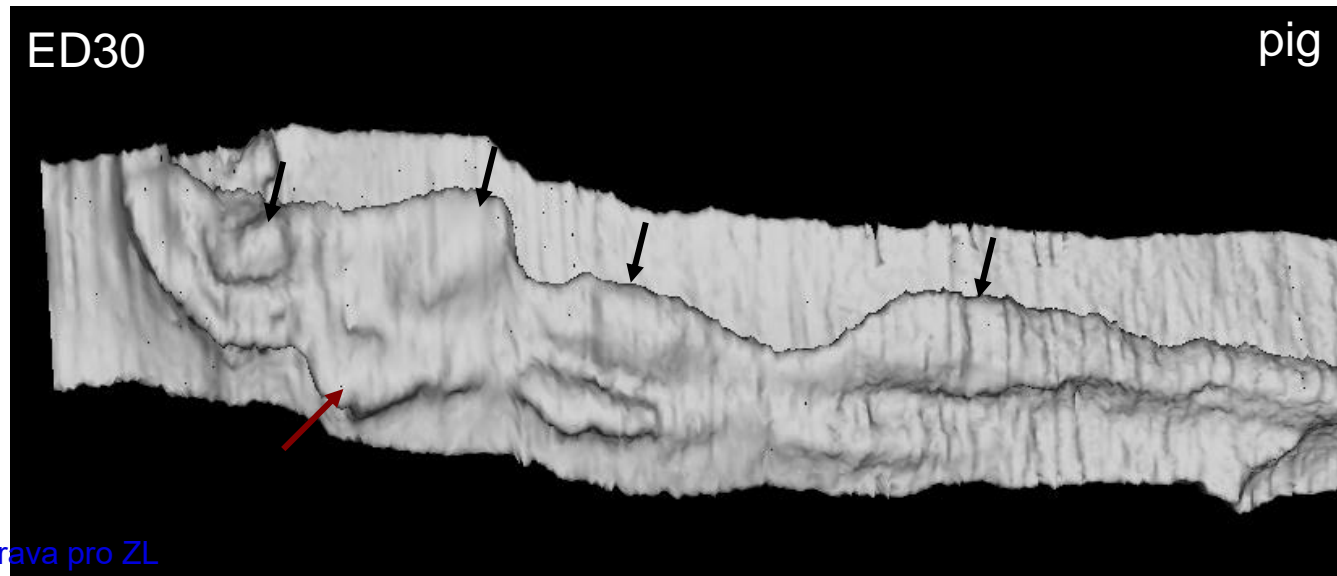
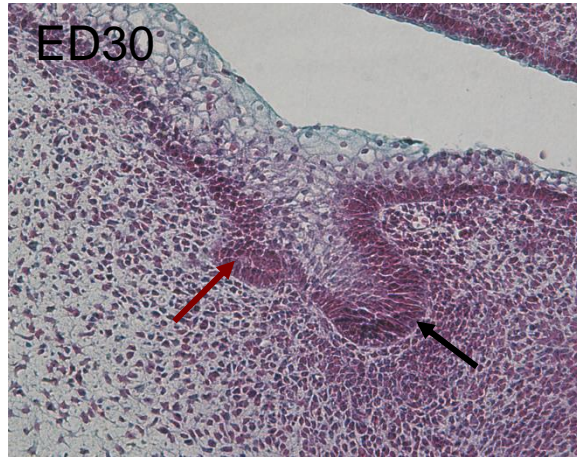
První generace - $i3/3 \ c1/1 \ p1/1 \ m3/3 = 32$
Druhá generace - $I3/3 \ C1/1 \ P4/4 \ M3/3 = 44$



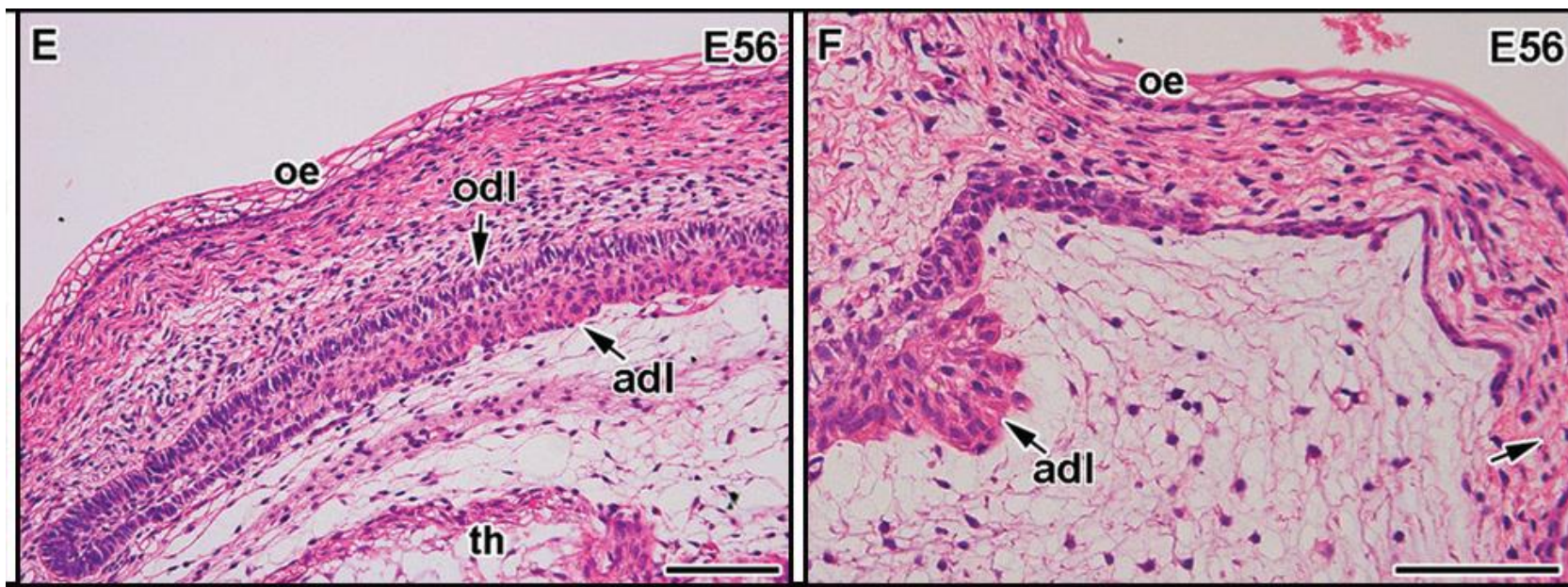
Iniciace náhradní zubní lišty



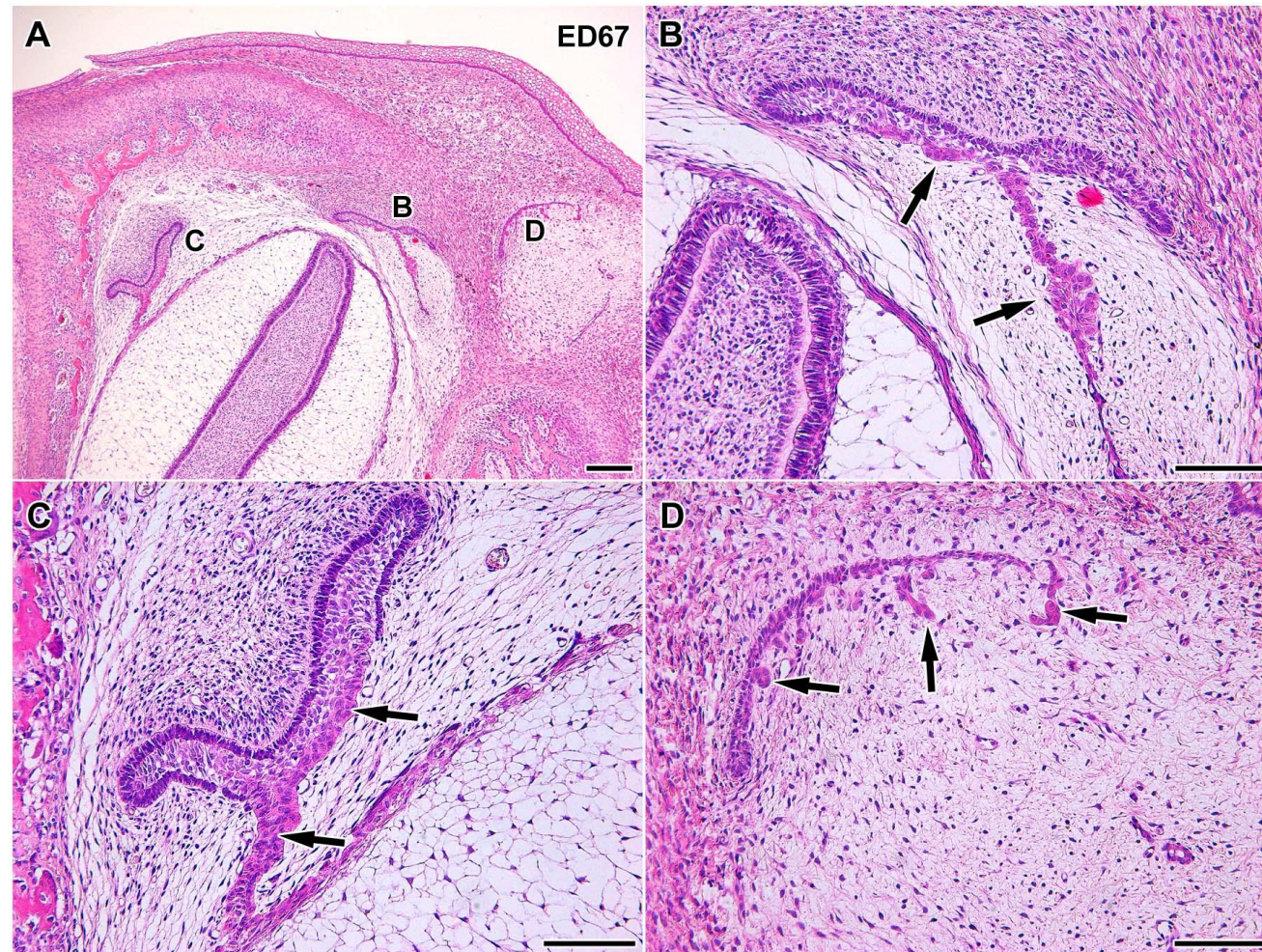
Mezizubní lišta je opožděná ve vývoji



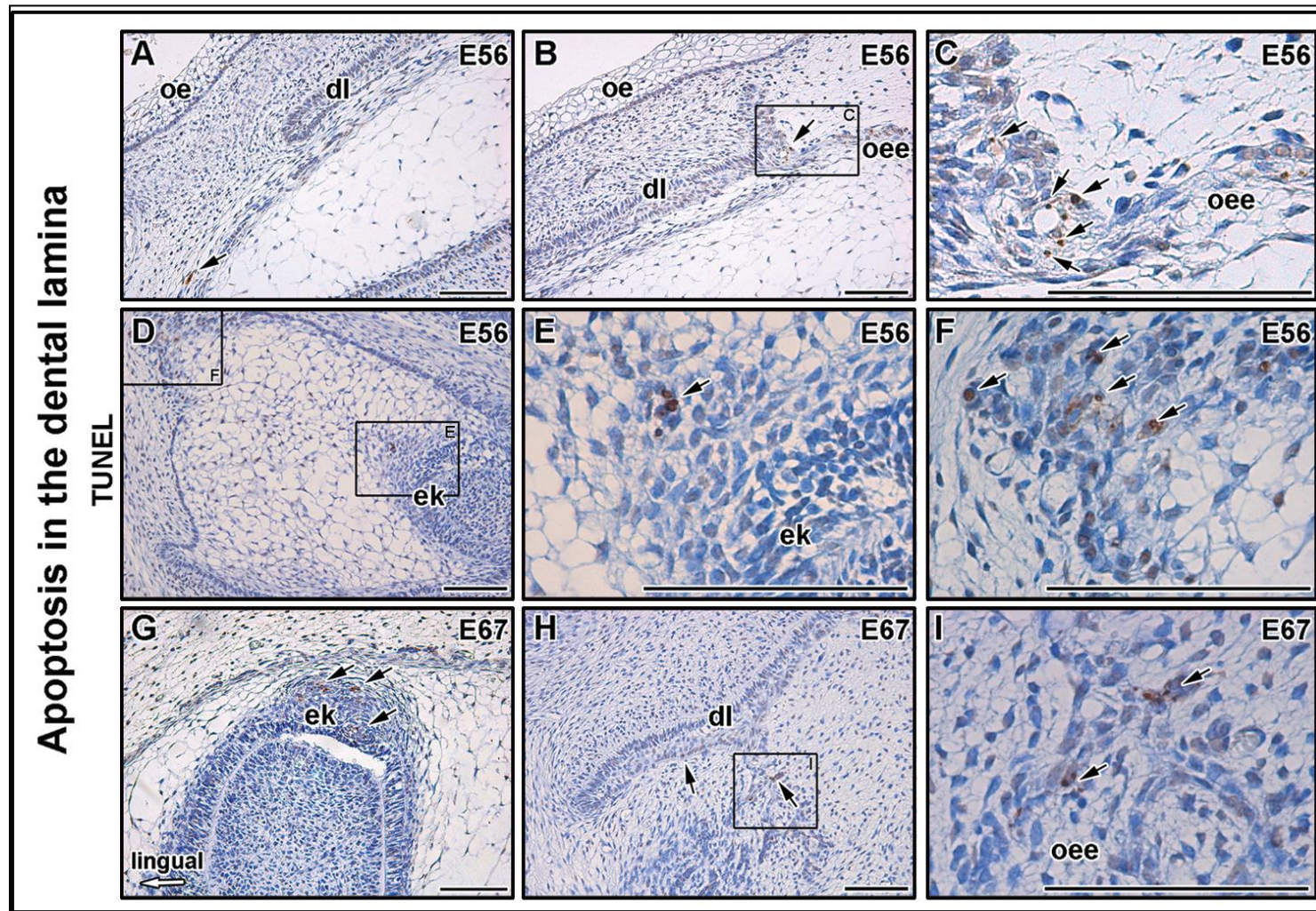
Raná regrese zubní lišty u difyodontní dentice



Fragmentace zubní lišty v embryonální periodě

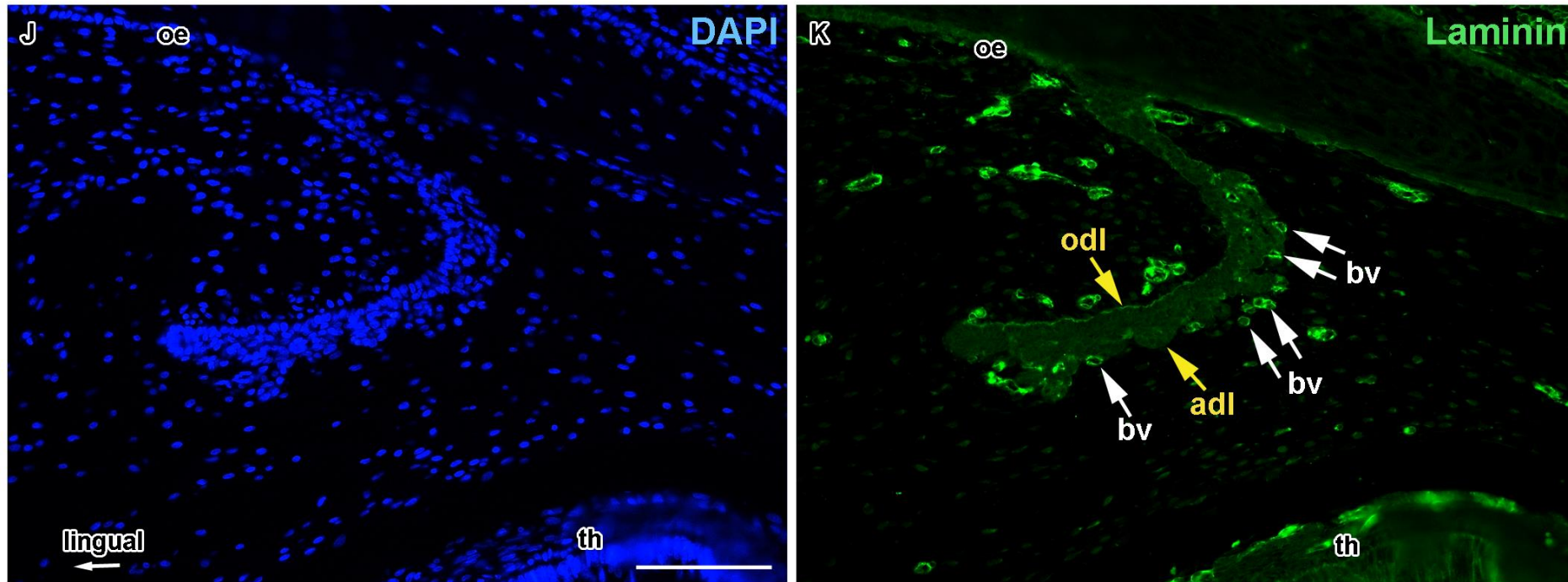


Úloha buněčné smrti během fragmentace zubní lišty



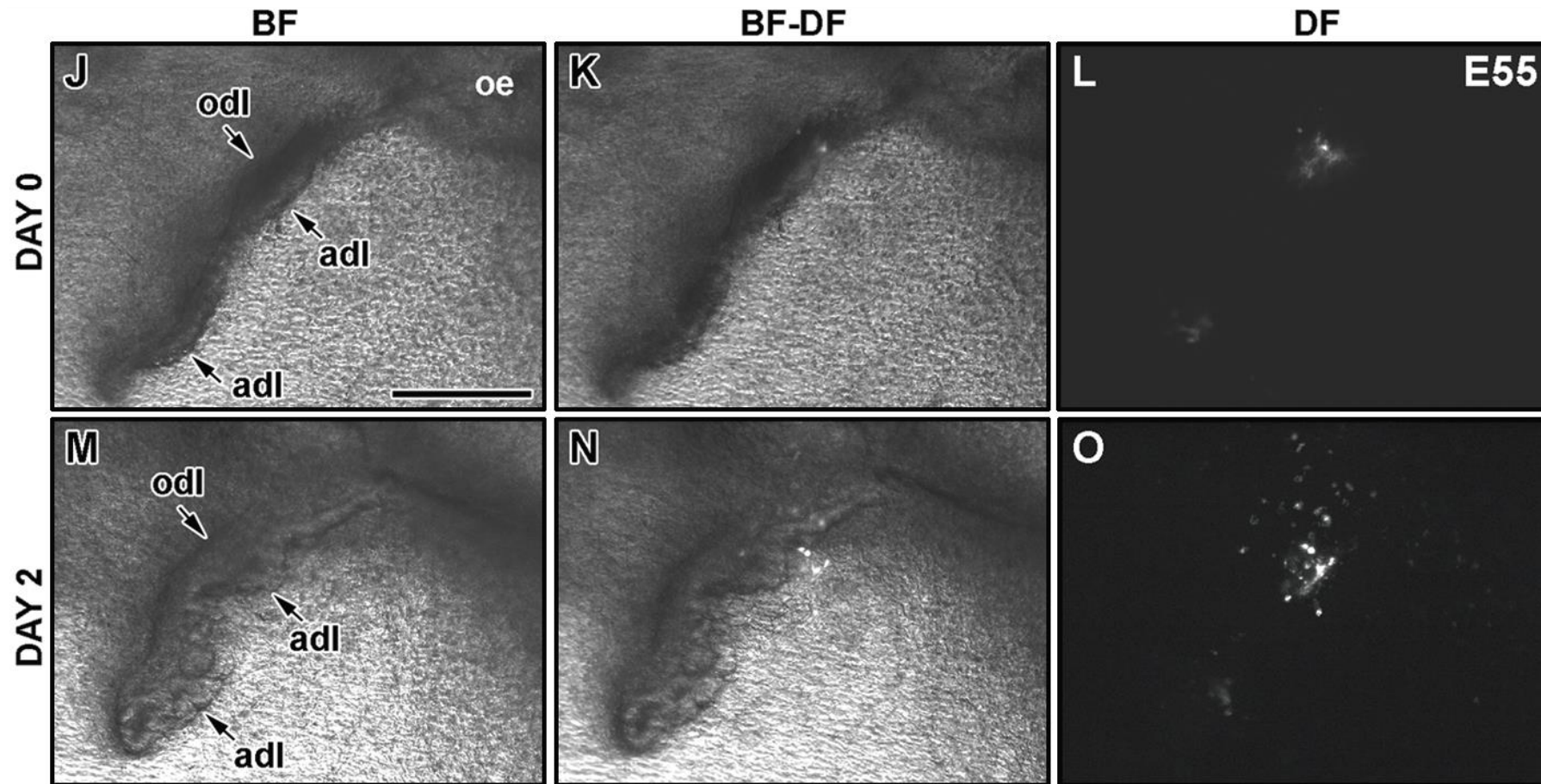
[Buchtova et al. 2012](#)

Fragmentace zubní lišty začíná narušením bazální membrány

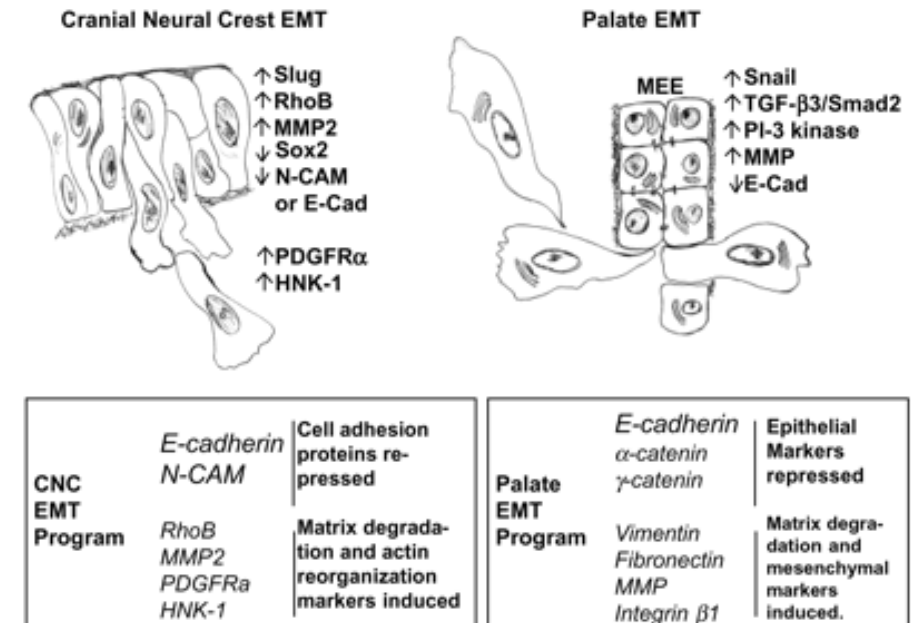
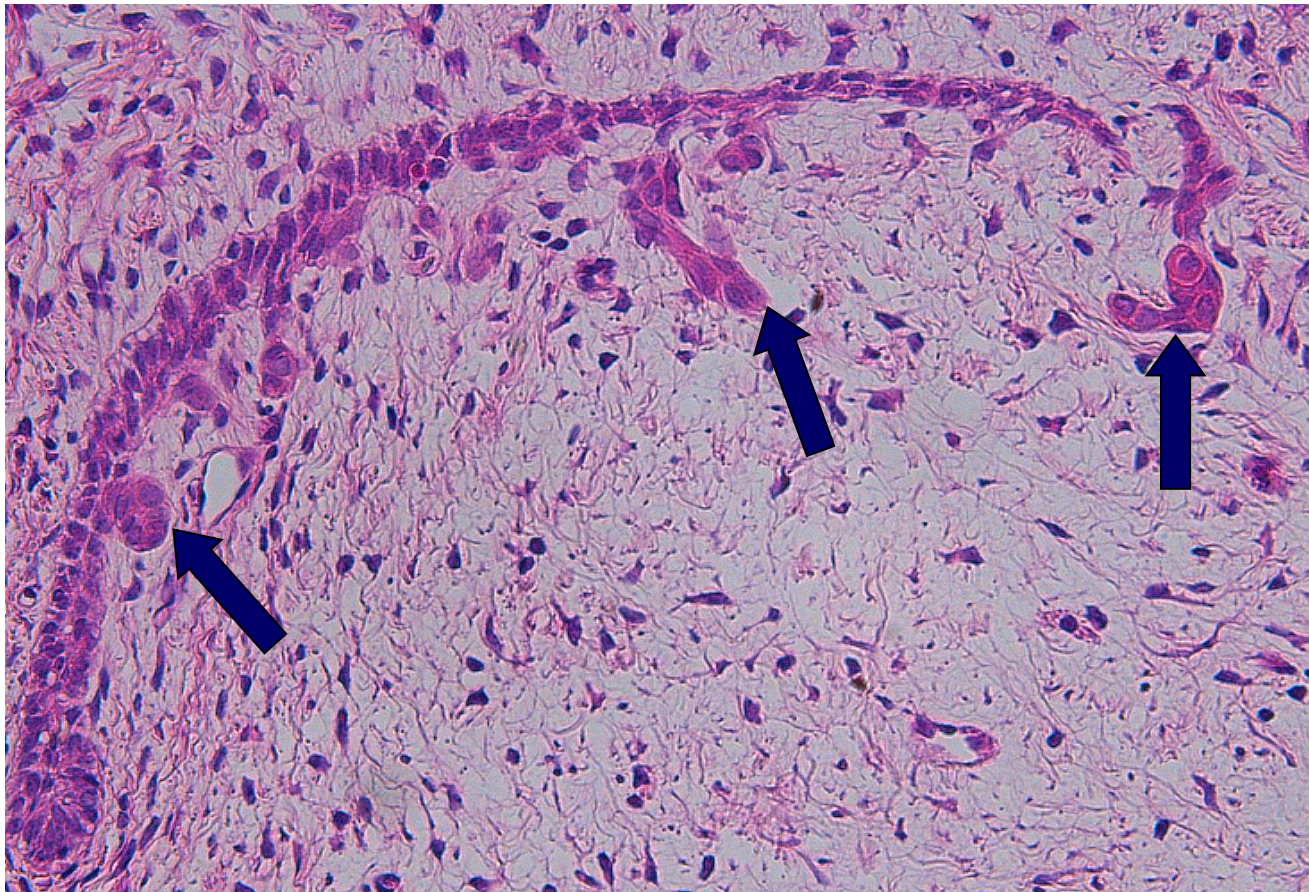


[Buchtova et al. 2012](#)

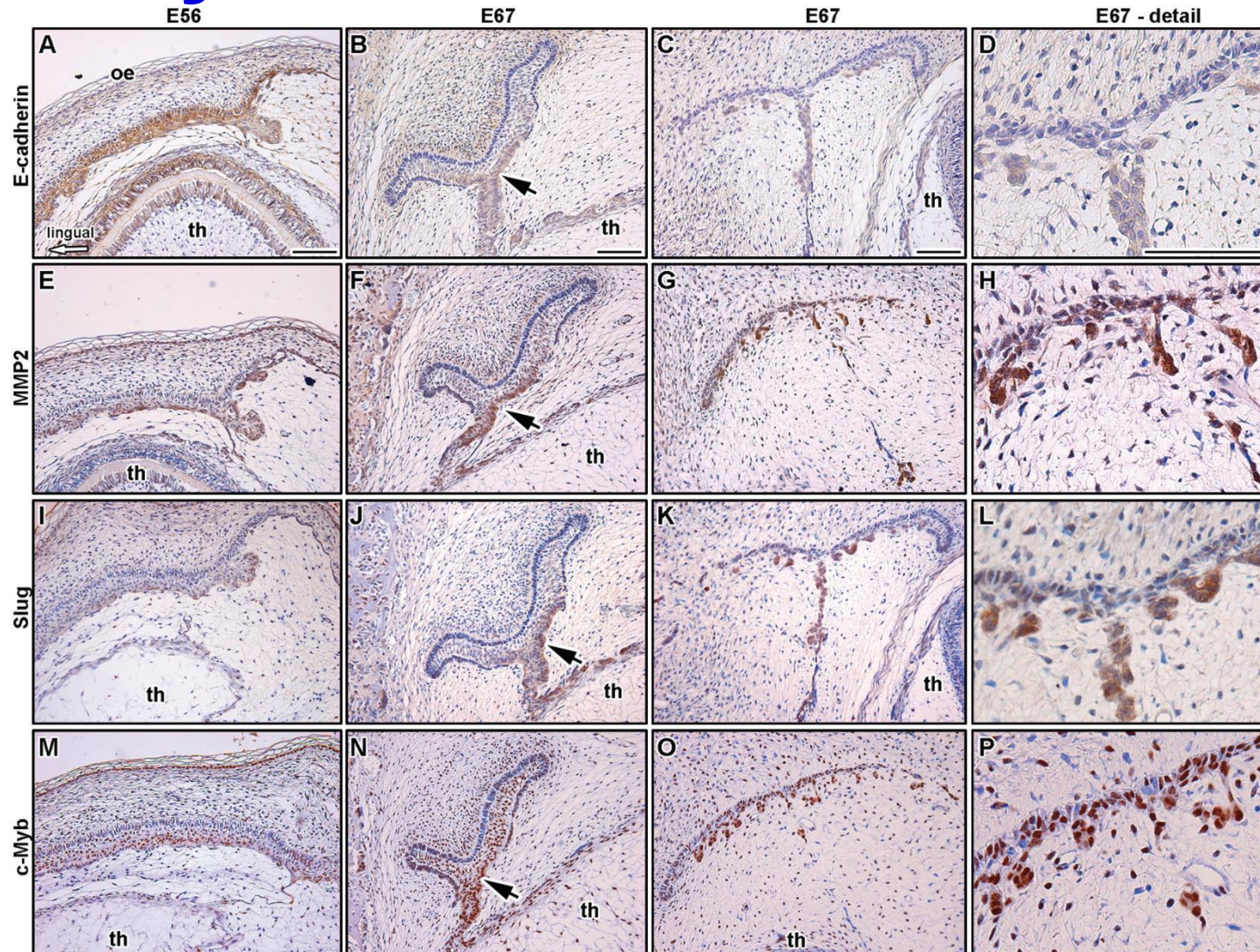
Migrace buněk zubní lišty



Transformace epitelových buněk zubní lišty do mezenchymálních

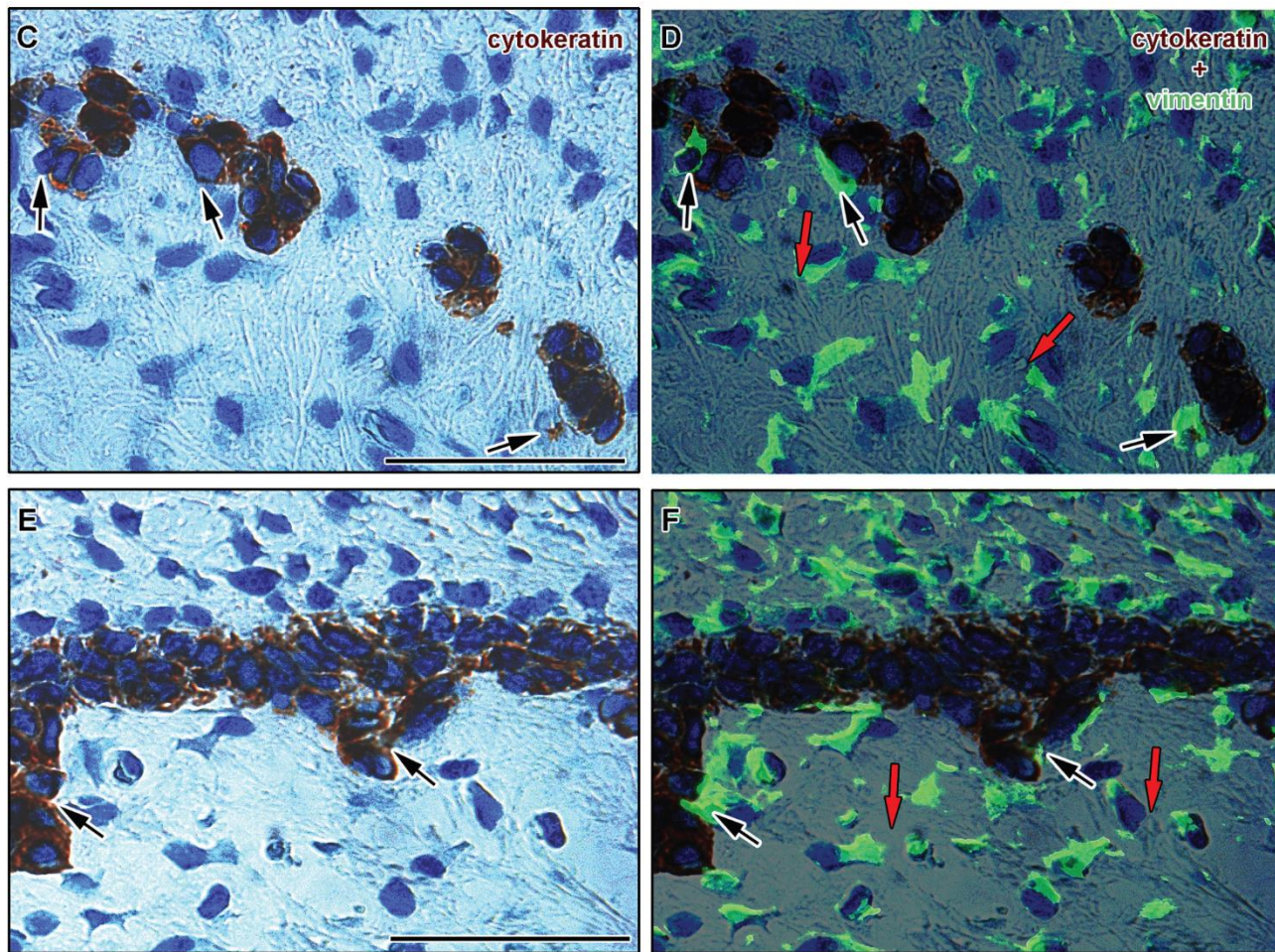


Transformace epitelových buněk zubní lišty do mezenchymálních



[Buchtova et al. 2012](#)

Buňky umístěné ve směru migrace vykazují překryv exprese cytokeratinu a vimentinu



Proč se u člověka netvoří třetí generace zubů?

- dochází k fragmentaci a degradaci zubní lišty
- zubní lišta ztrácí schopnost tvořit náhradní zubní generace již během prenatální periody

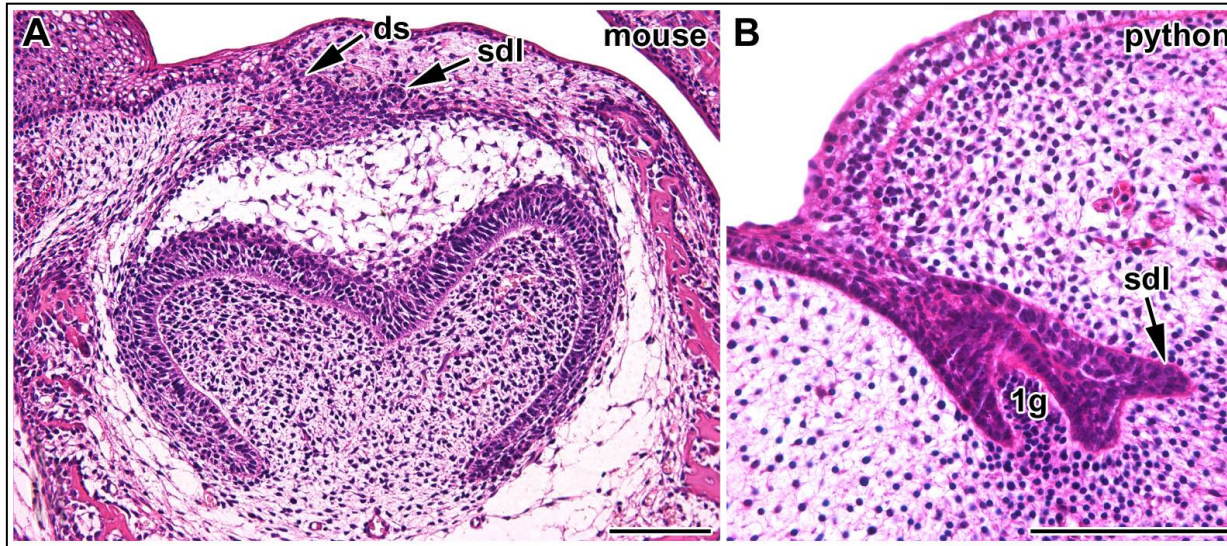


Je náhradní zubní lišta iniciována i u monofyodontních druhů?

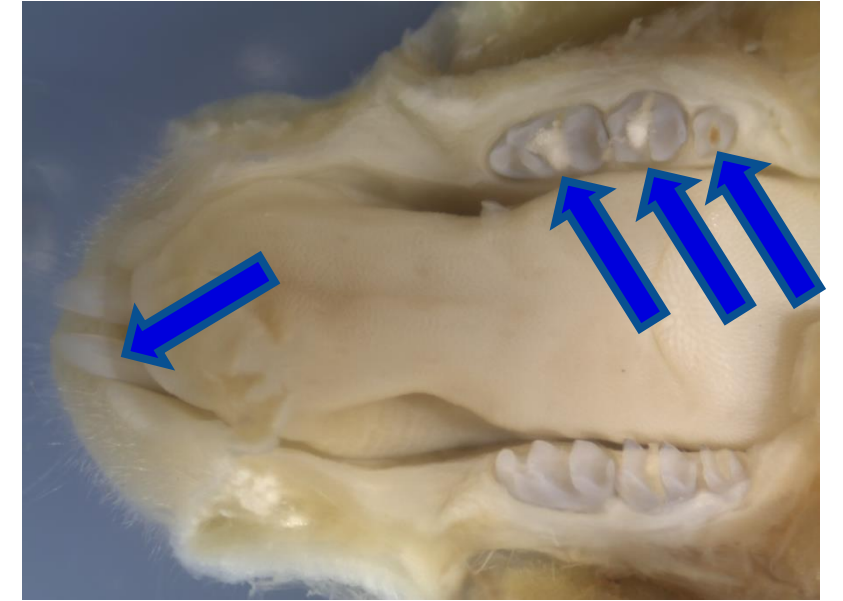


Proč nedochází k výměně zubů u myší?

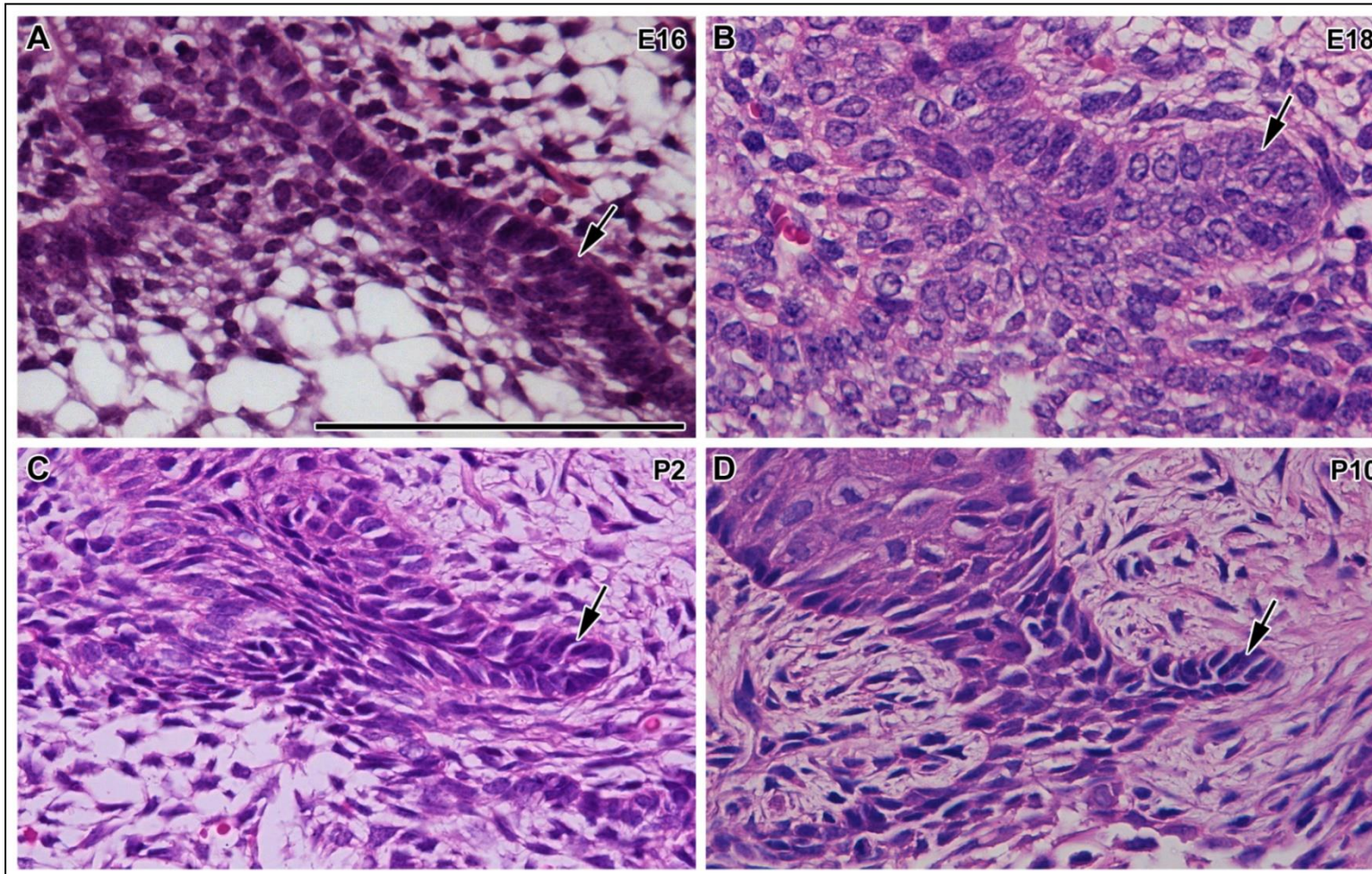
Zubní vzorec: 1-0-0-1
Monofyodontní



náhradní zubní lišta (sdl)
zubní stopka (ds)

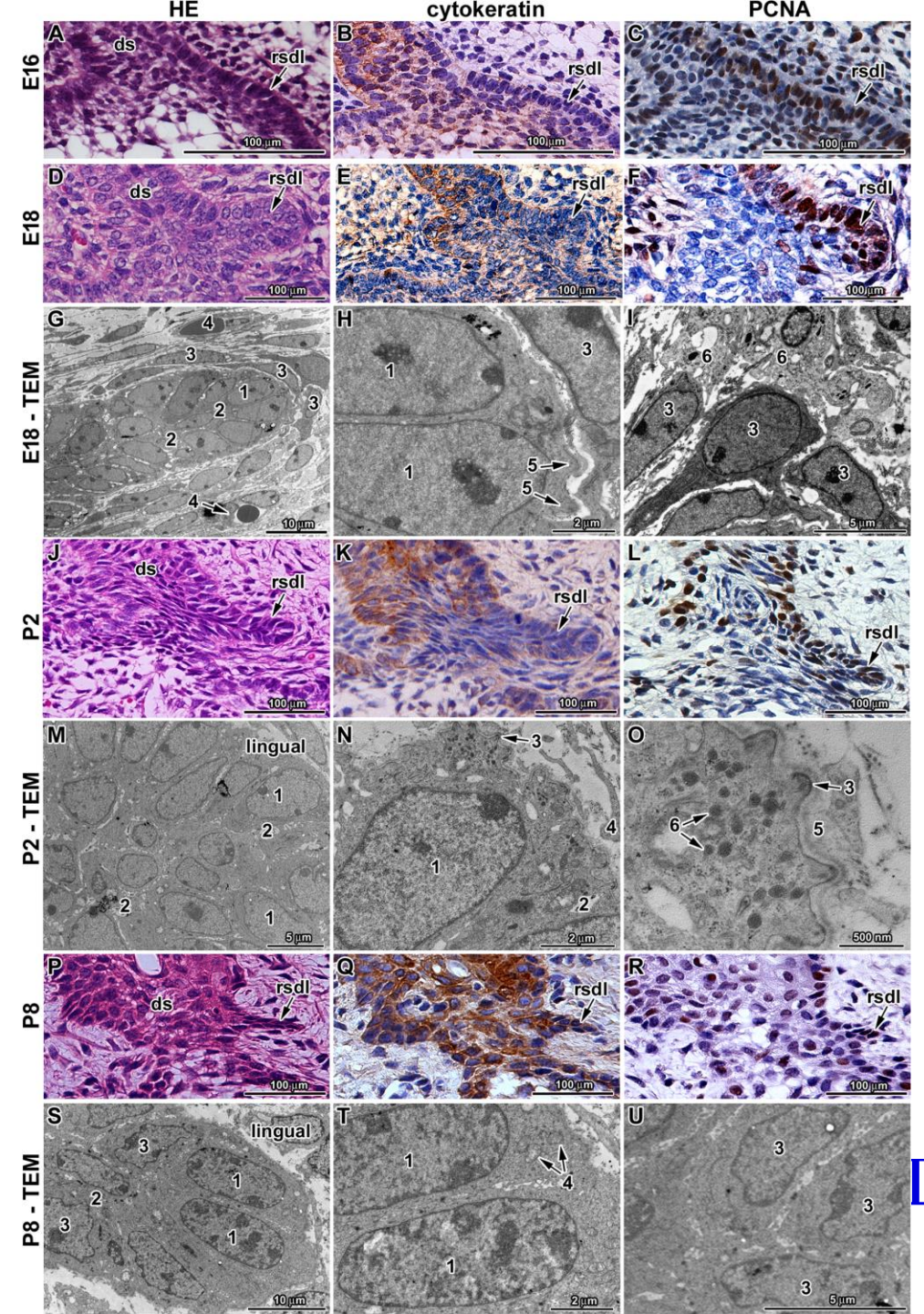


Náhradní zubní lišta se vyvíjí v pozdní fázi embryonálního vývoje



Degradace zubní lišty nastává u myši během postnatálních stádií

- redukována proliferace
- exprese cytokeratinu zvýšena
- tvorba epitelových záhybů s četnými lysozomy
- degradace jader

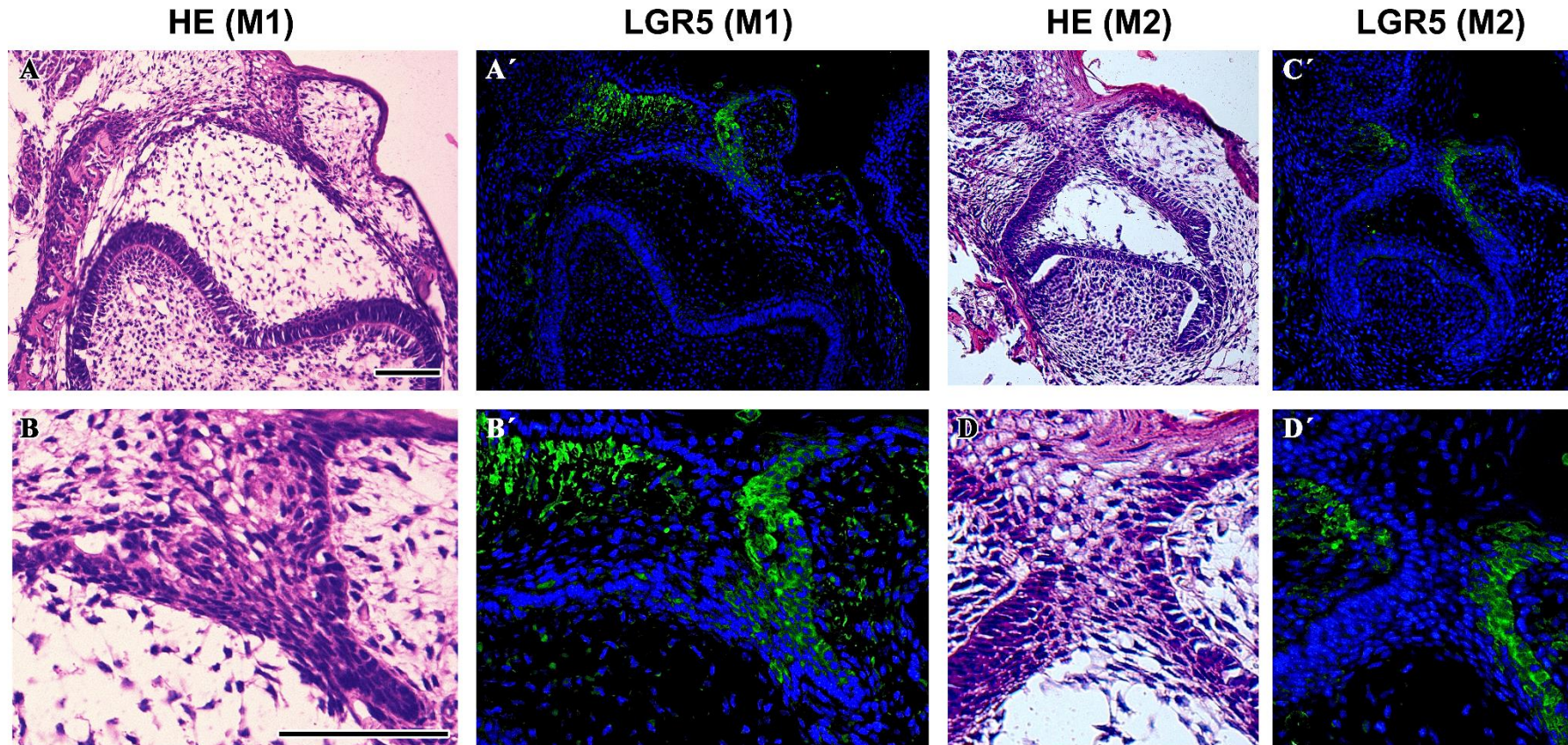


Jsou v rudimentální zubní liště lokalizované progenitorové buňky?

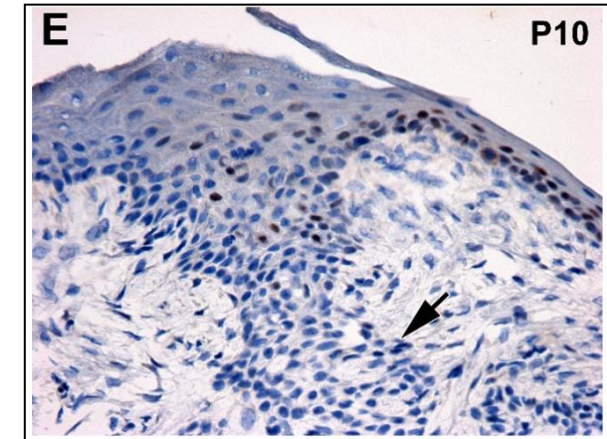
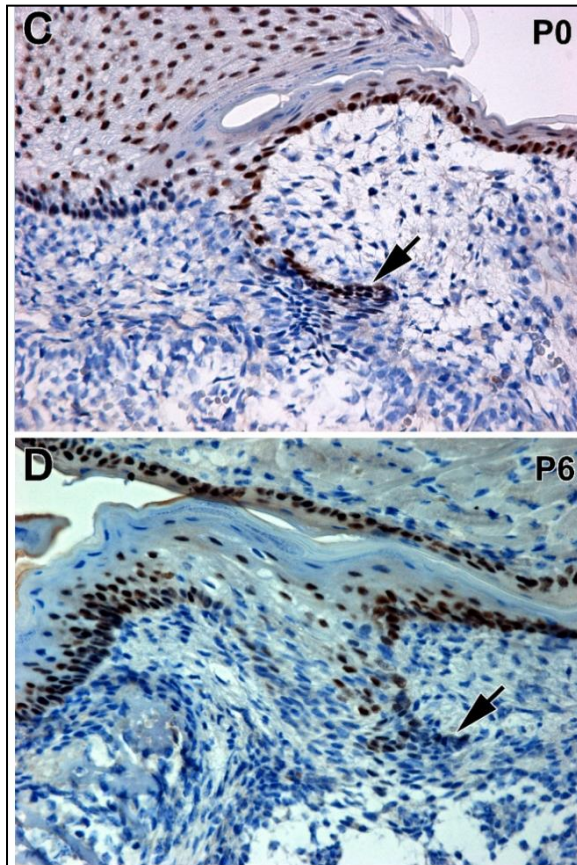
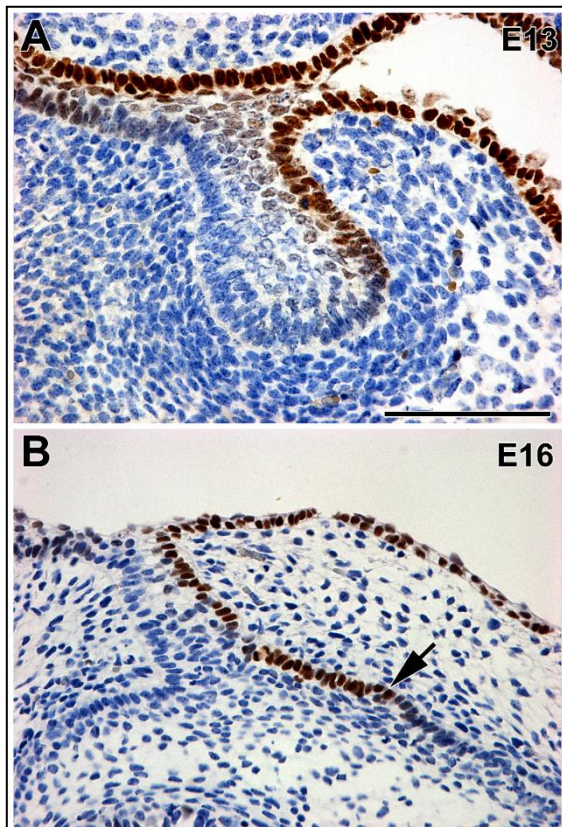
Hypotéza:

Sox2/Lgr5 mohou hrát úlohu v restrikci náhradní zubní lišty

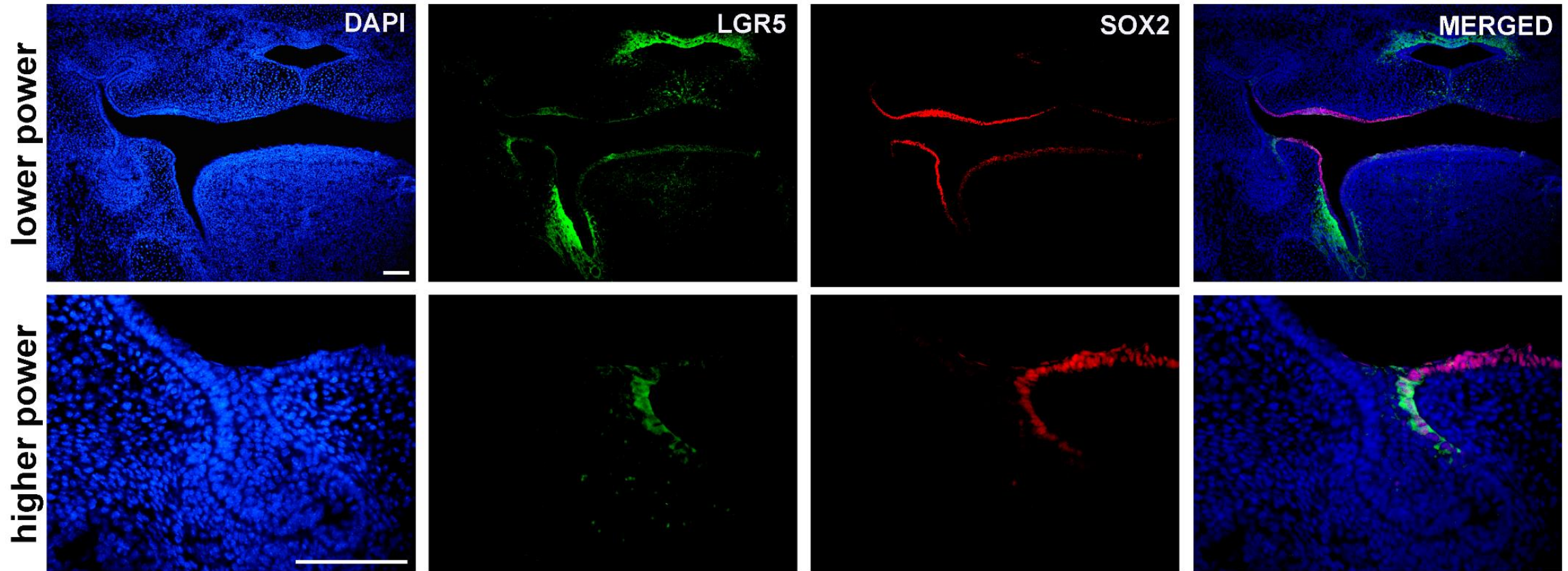
Kde jsou progenitové buňky lokalizované během odontogeneze?



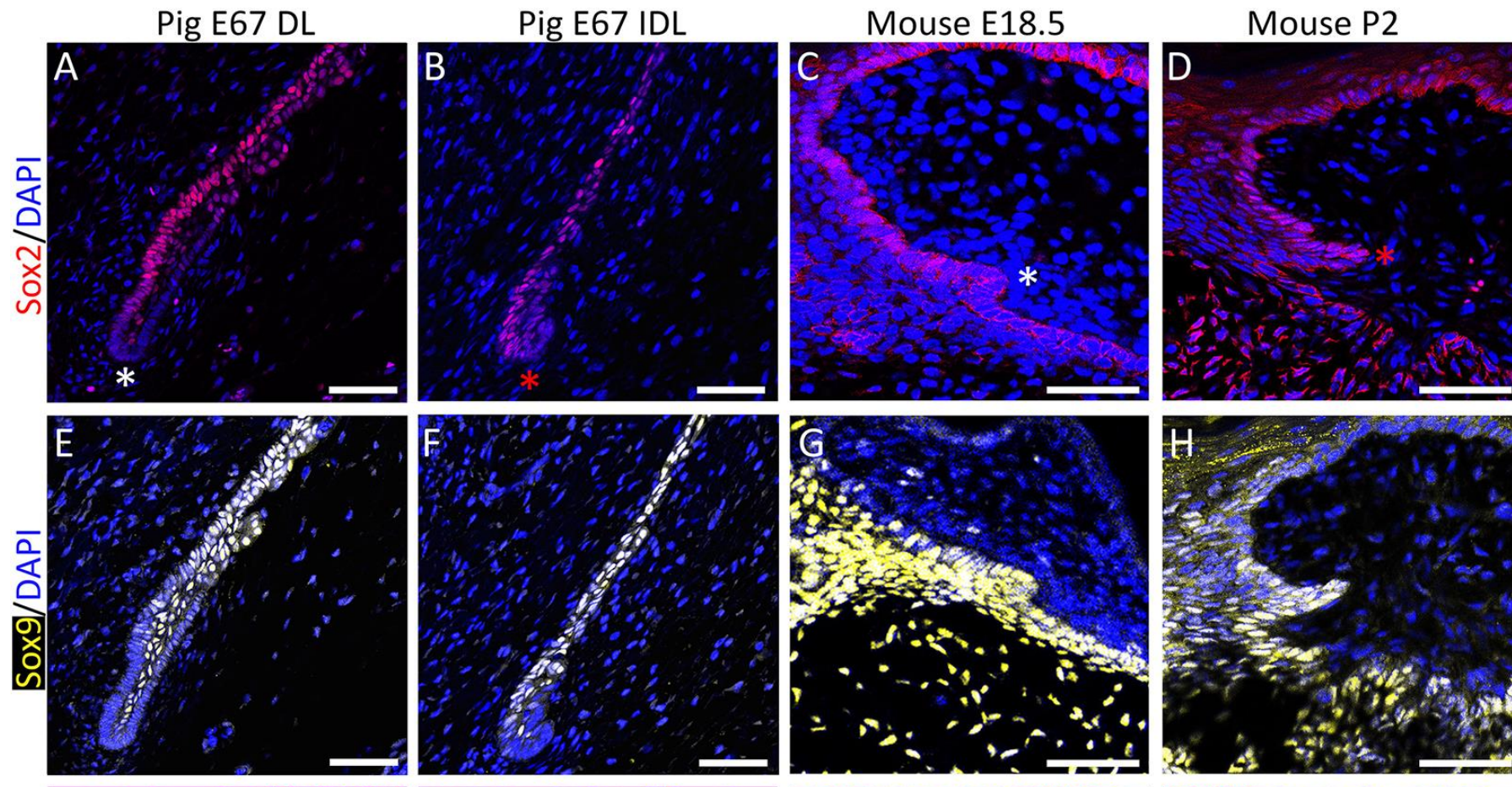
Progenitorový marker SOX2 je exprimovaný v zubní stopce a v rudimentální zubní liště



Překrývají SOX2-pozitivní buňky LGR5-pozitivní doménu?

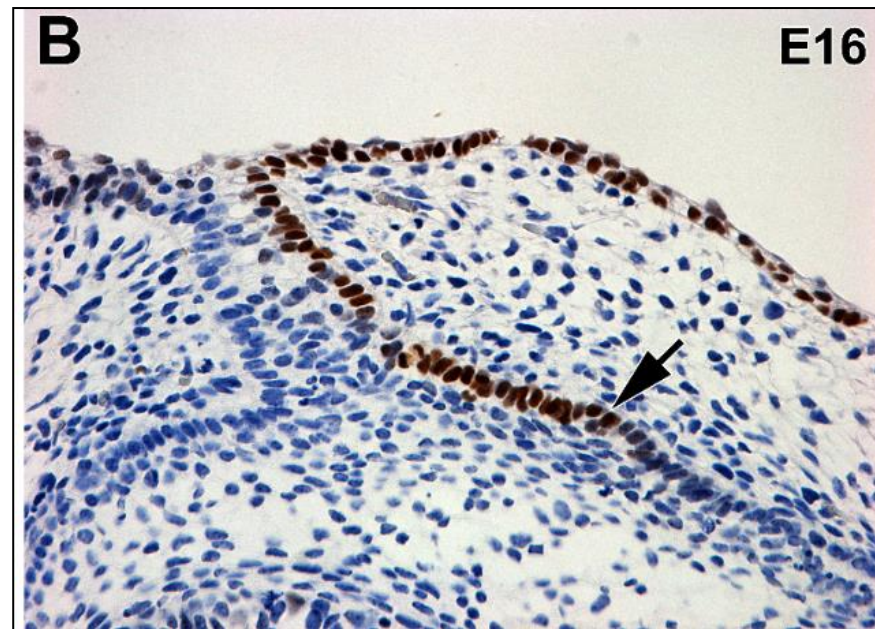


Rozdíly v signalizaci náhradní zubní lišty



Můžeme iniciovat tvorbu náhradní zubní lišty u monofyodontních druhů?

- úloha Sox2 v inhibici aktivace kanonické WNT signalizace



Sox2^{CreERT2/+};Ctnnb1^{lox(ex3)}

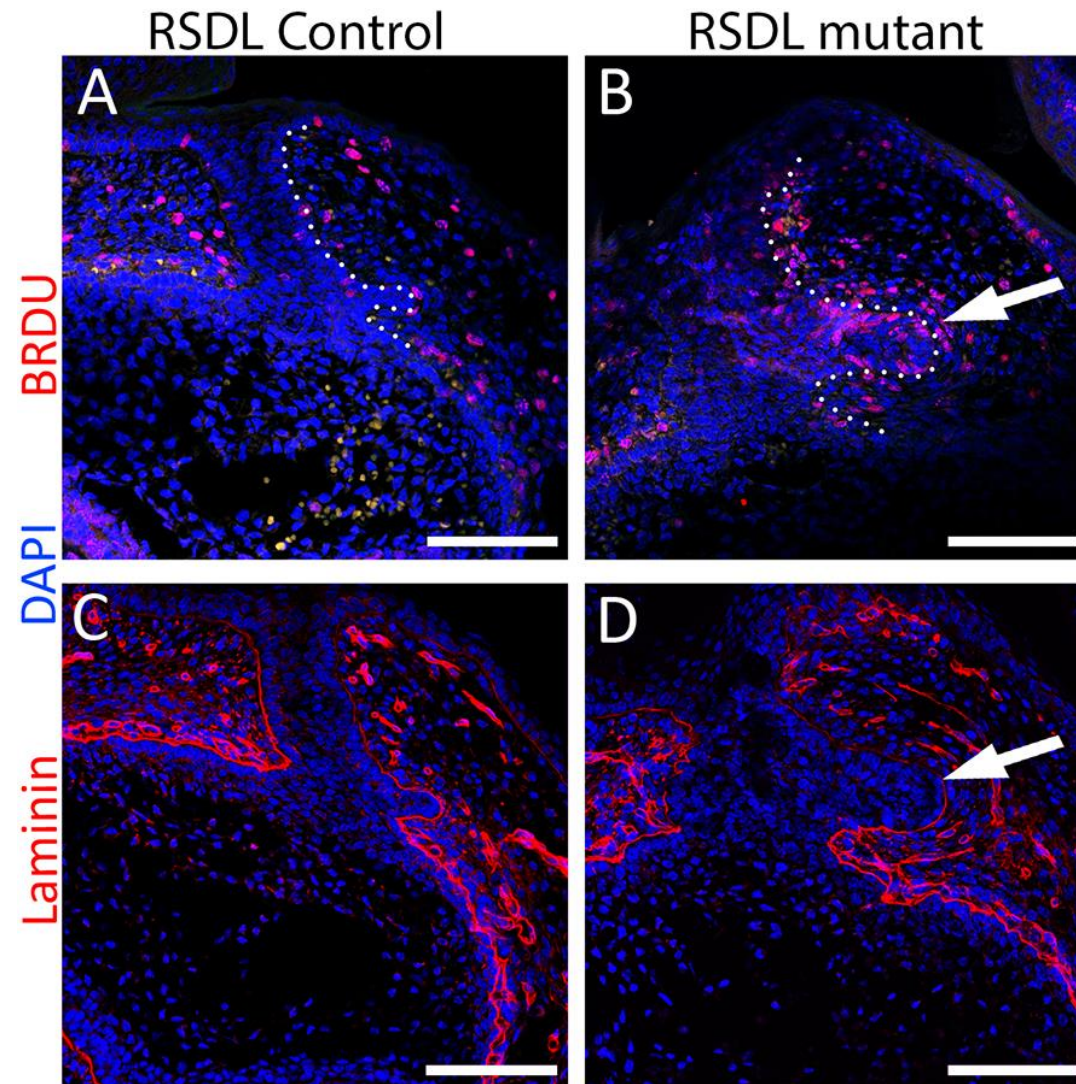
Iniciace náhradní zubní lišty

- lokalizovaná proliferace a vaskularizace

Sox2^{CreERT2/+};Ctnnb1^{lox(ex3)}

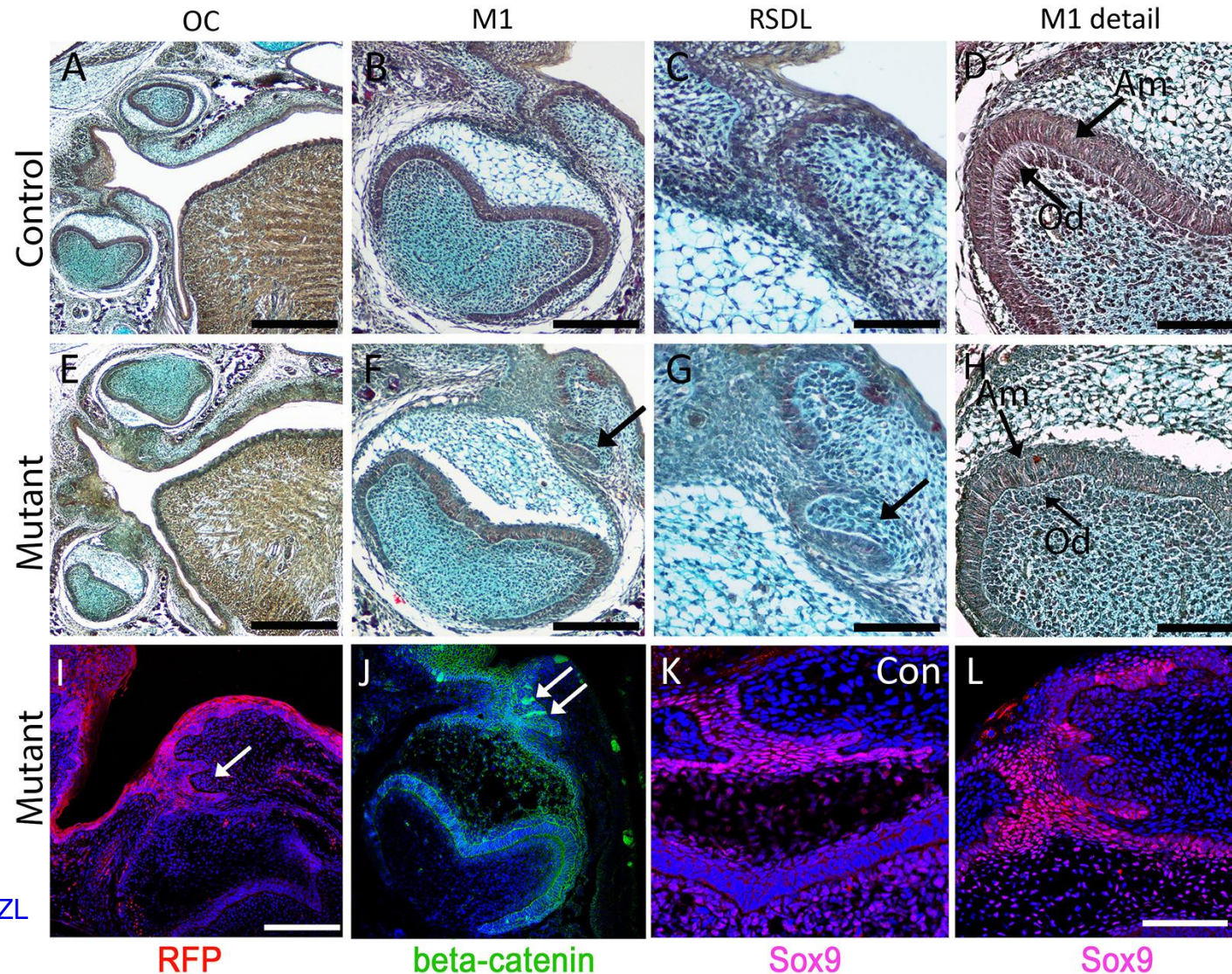
E16→E18.5

500 Vědecká příprava pro ZL



[Popa et al. 2019](#)

Stabilizace Wnt/ β -kateninové signalizace

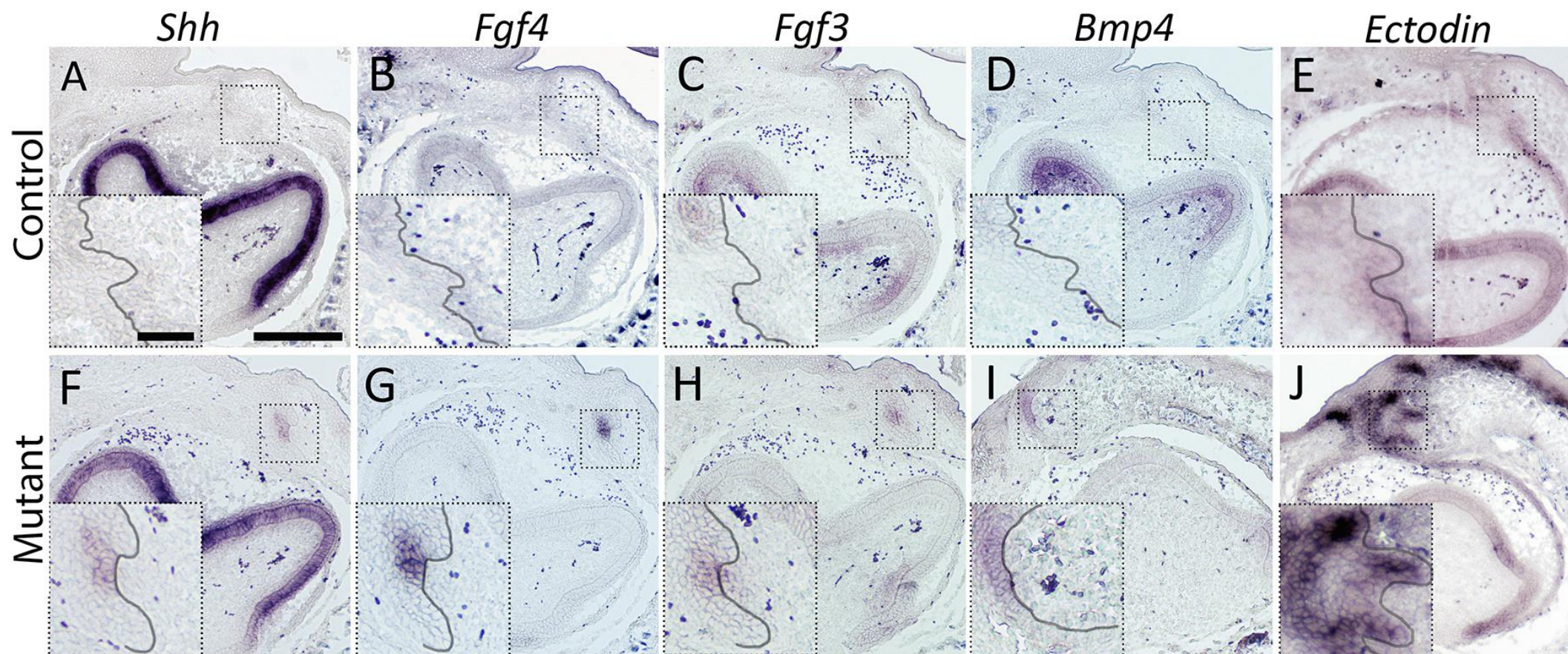


Sox2^{CreERT2/+}; *Ctnnb1*^{lox(ex3)}

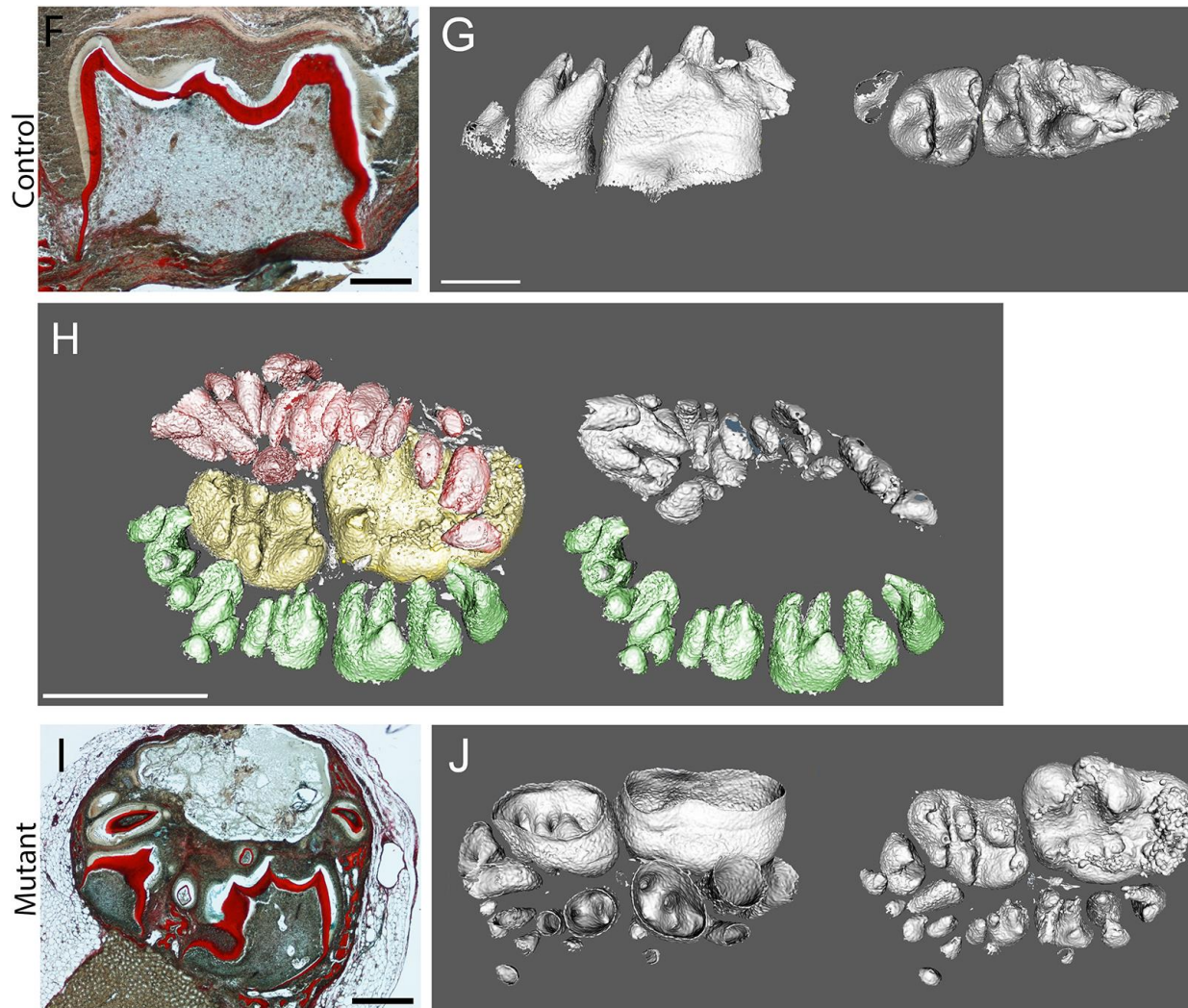
E15.5 → E18.5

[Popa et al. 2019](#)

Exprese odontogenních markerů v nadpočetných zubních základech



Nadpočetné zubní základy mineralizují a tvoří zubní kořeny

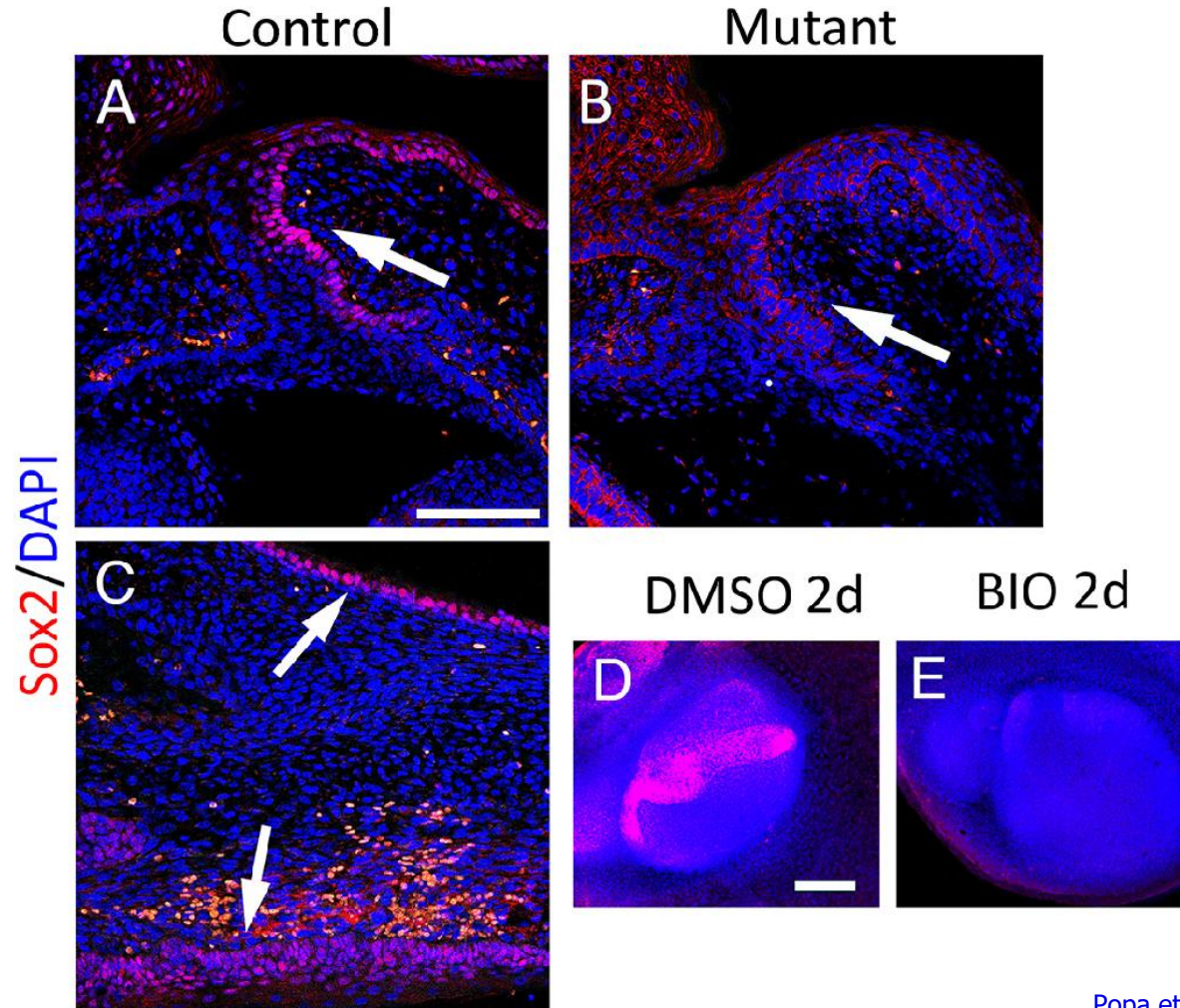


$Sox2^{CreERT2/+}; Ctnnb1^{lox(ex3)}$

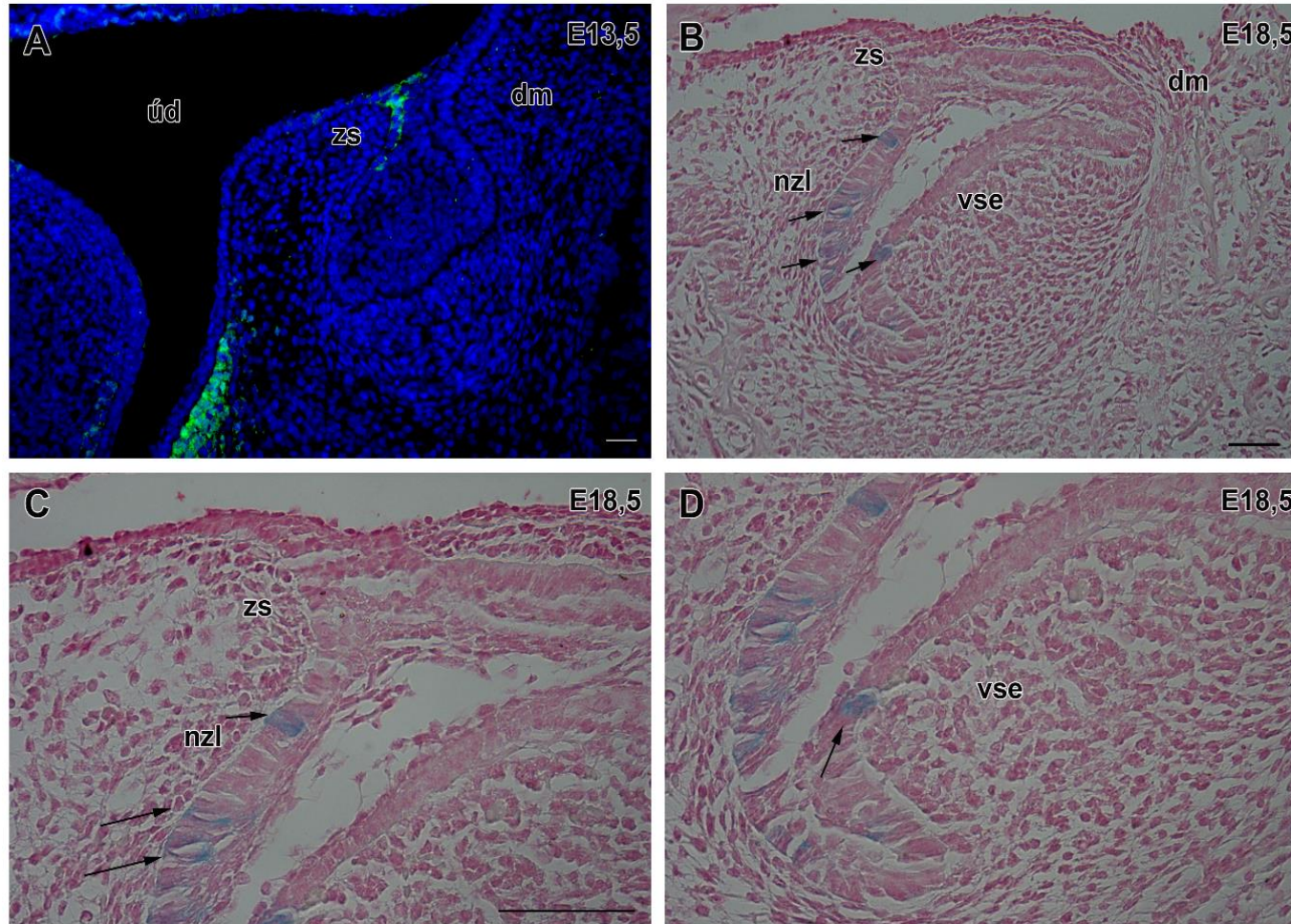
E17.5

- 2 týdny v ledvinové kapsule

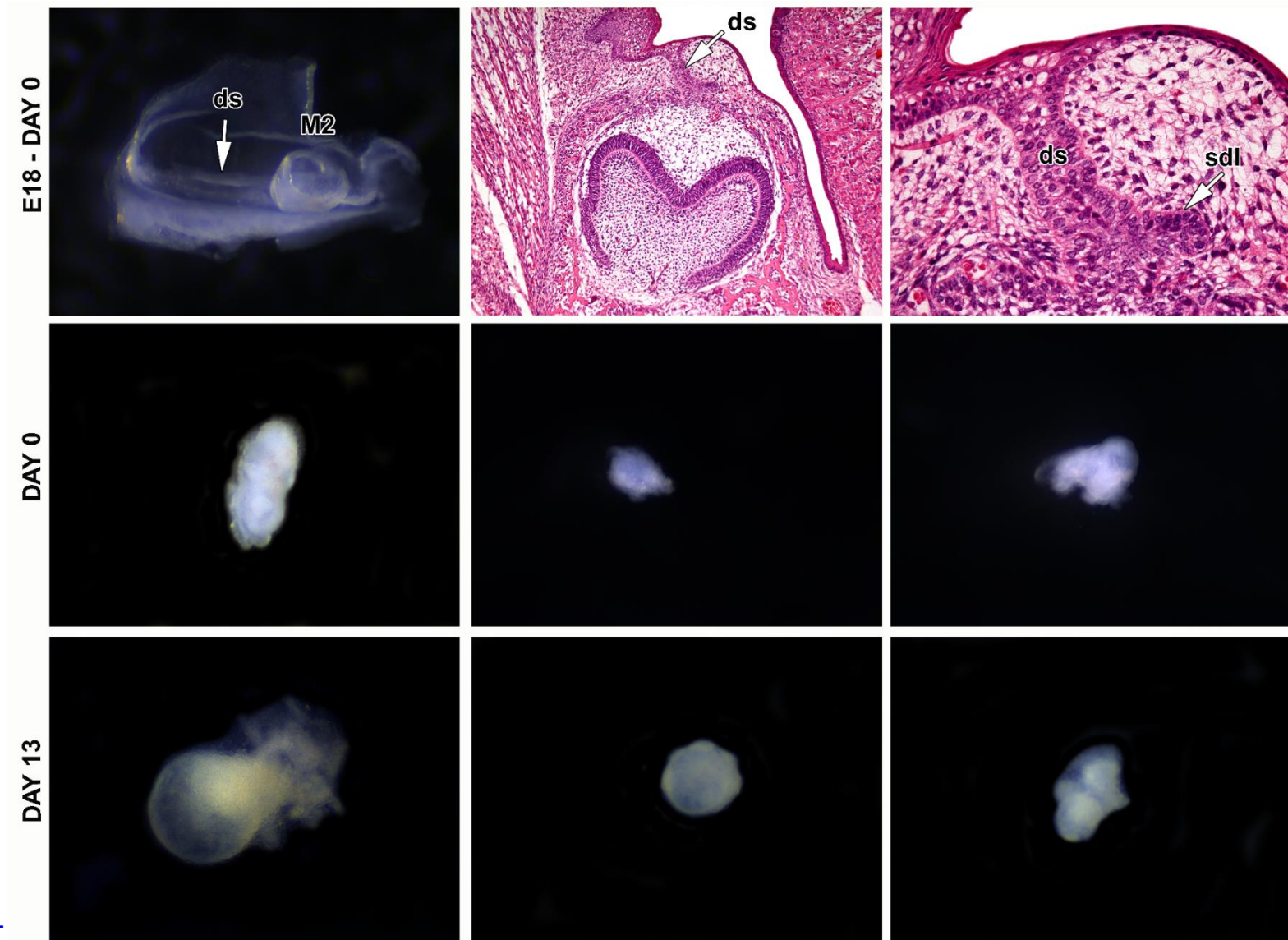
Wnt/ β -kateninová aktivace vede ke snížení exprese SOX2



Jaký je osud LGR5-pozitivních buněk?



Zubní organoidy



Shrnutí

- K narušení zubní lišty dochází u difyodontních druhů již během prenatální periody
- Epitelo-mezenchymová transformace přispívá k odstraňování epitelových buněk
- Nalezli jsme novou niku kmenových buněk uplatňující se během odontogeneze
- Náhradní zubní lišta je iniciována i u monofyodontních druhů, ale podstupuje regresní změny, včetně keratinizace a ztráty kmenových buněk

Shrnutí

- Detailní znalost signalizace během vývoje je nutná pro pochopení rozdílů v růstu zubní lišty mezi polyfyodontními a monofyodontními druhy
- Jak je regulován přechod mezi regresí či zachováním zubní lišty?
- Co indukuje degradaci zubní lišty?

Shrnutí

- Pochopení vývojových procesů pomůže odhalení příčin degradace náhradní zubní lišty ve spojitosti s některými poruchami vývoje náhradních generací u člověka a dále k porozumění evolučním trendům vedoucím k difyodoncii u savců

Poděkování

Ústav živočišné fyziologie a genetiky

Jan Štembírek

Hana Dosedělová

Kristýna Olbertová

Marie Landová

Iveta Putnová

King's College, London

Abigail S. Tucker

Elena Popa

UBC, Vancouver

Joy M. Richman

Virginia Diewert

MU, Brno

Jana Dumková

Aleš Hampl

Dobromila Klemová



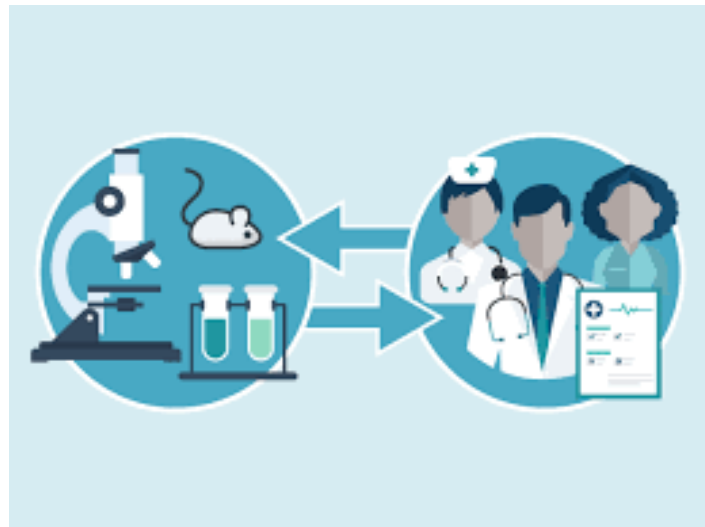
IEM, Praha

Oldřich Zahradníček

IMG, Praha

Ladislav Kořínek

Dušan Hrčkulák



Translační výzkum v biologických vědách: výzvy a možnosti

MUDr. Serhiy Forostyak, PhD, CSO

Klinika popálenin a plastické chirurgie FN Brno

Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

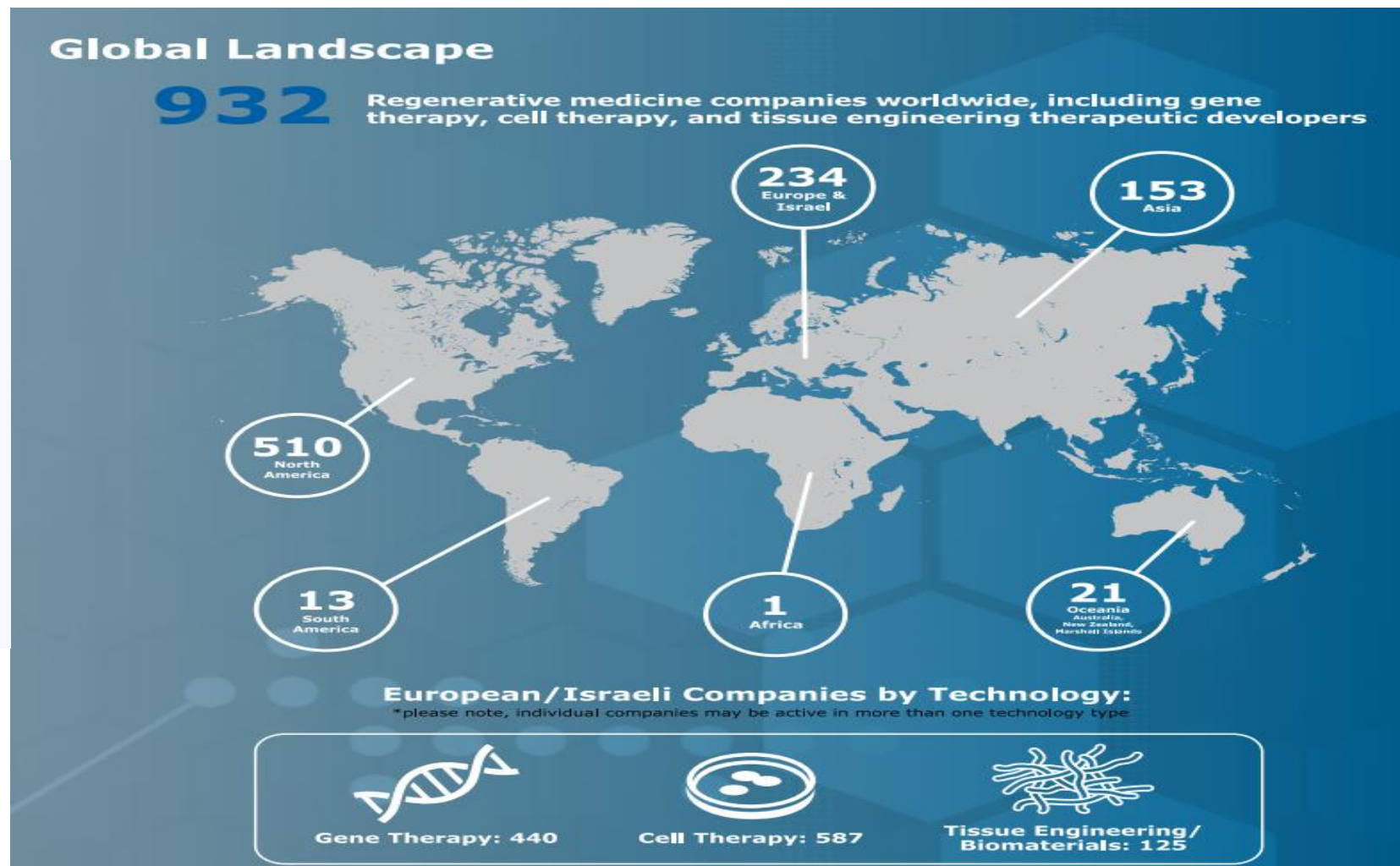
Primecell Bioscience, Ostrava

Obsah:

1. Dlouhá cesta od základního výzkumu k pacientovi: typy regulačních cest
2. Translační cesty směrem ke klinické aplikaci (ATMP, tkáňové transplantace)
3. Zkušenosti České Biotechnologické společnosti Primecell
4. Transplantace tkání: kosti a kostních produktů
5. Souhrn

1. Dlouhá cesta od základního výzkumu k pacientovi: typy regulačních cest

Klinické testy po celém světě



Klinické testy po celém světě

1,069

Clinical Trials Underway
Worldwide by End of Q2 2019

Ph. I: 358
Ph. II: 617
Ph. III: 94

Number of Clinical Trials Utilizing Specific RM/AT Technology: Q2 2019



Gene Therapy

Total: 366
Ph. I: 117
Ph. II: 219
Ph. III: 30



Gene-Modified Cell Therapy

Total: 410
Ph. I: 187
Ph. II: 207
Ph. III: 16



Cell Therapy

Total: 249
Ph. I: 49
Ph. II: 168
Ph. III: 32



Tissue Engineering

Total: 44
Ph. I: 5
Ph. II: 23
Ph. III: 16

Klinické testy EU

EU Market: Klinické testy v buněčné/genové terapii (přehled)

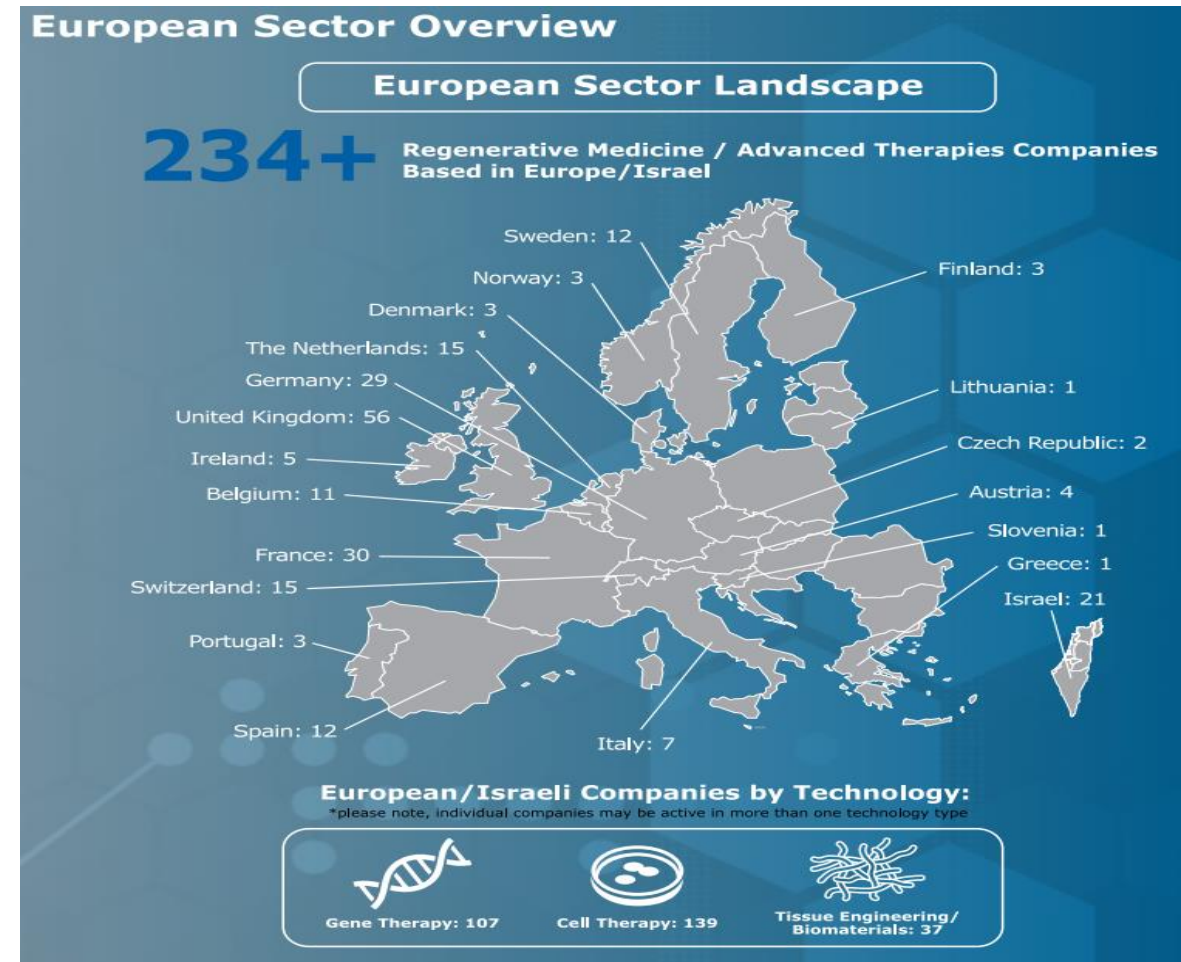
Current Stem Cell Trials (2017)			
Ocata Therapeutics	6	SanBio	3
CHA Biotech	3	Celgene	60
Pfizer	29	StemCells	53
GSK	30	Genzyme (Sanofi)	60
Bayer	14	Teva	7
Mesoblast International	27	MedImmune	8
Millennium Pharmaceuticals	51	Janssen	35
AstraZeneca	7	Seattle Genetics	7
Merck	21	Baxter Healthcare	3
Chimerix	4	InCyte Corp	2
Eisai	6		

Source: Kelly Scientific

Ph. I:
42

Ph. II:
139

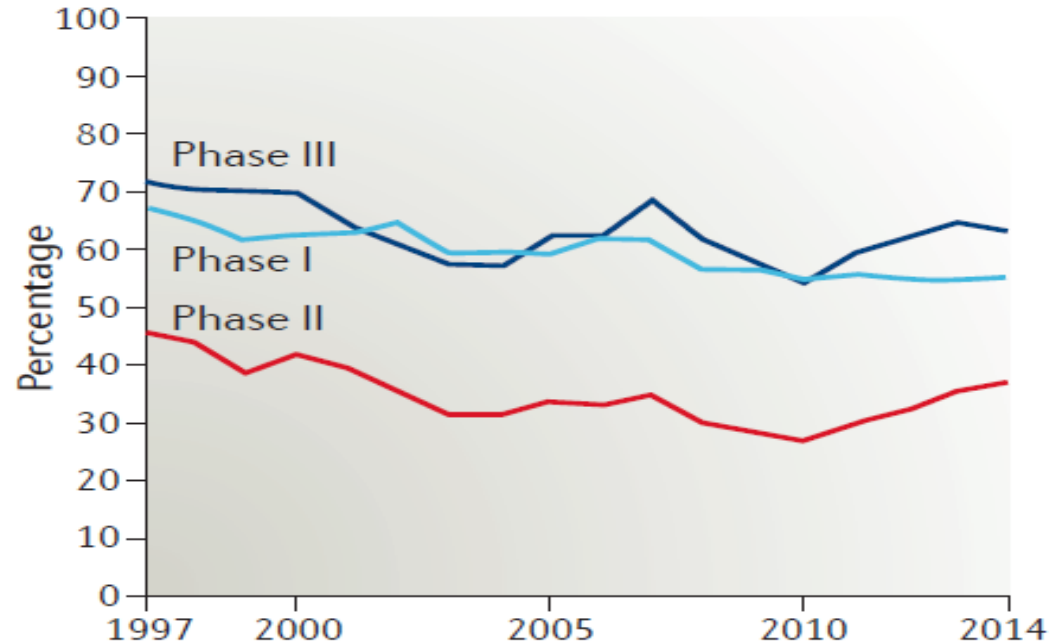
Ph. III:
35



Míra úspěšnosti klinických testů po celém světě

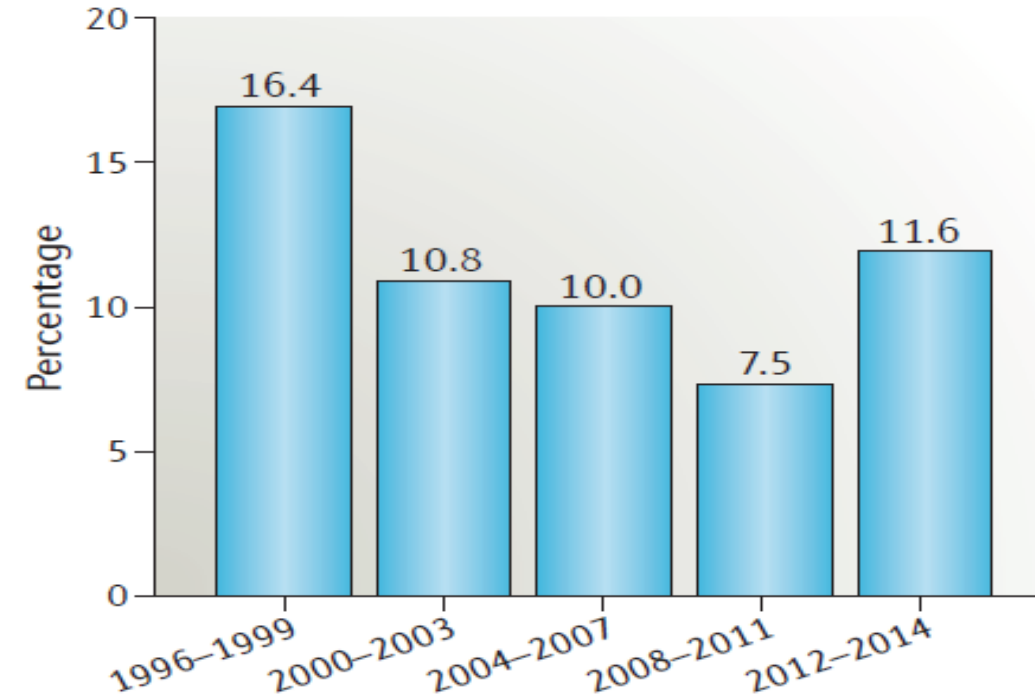
a Success rates by phase

Percentage likelihood of moving to next phase, 3-year rolling average*



b Cumulative success rate Phase I to launch

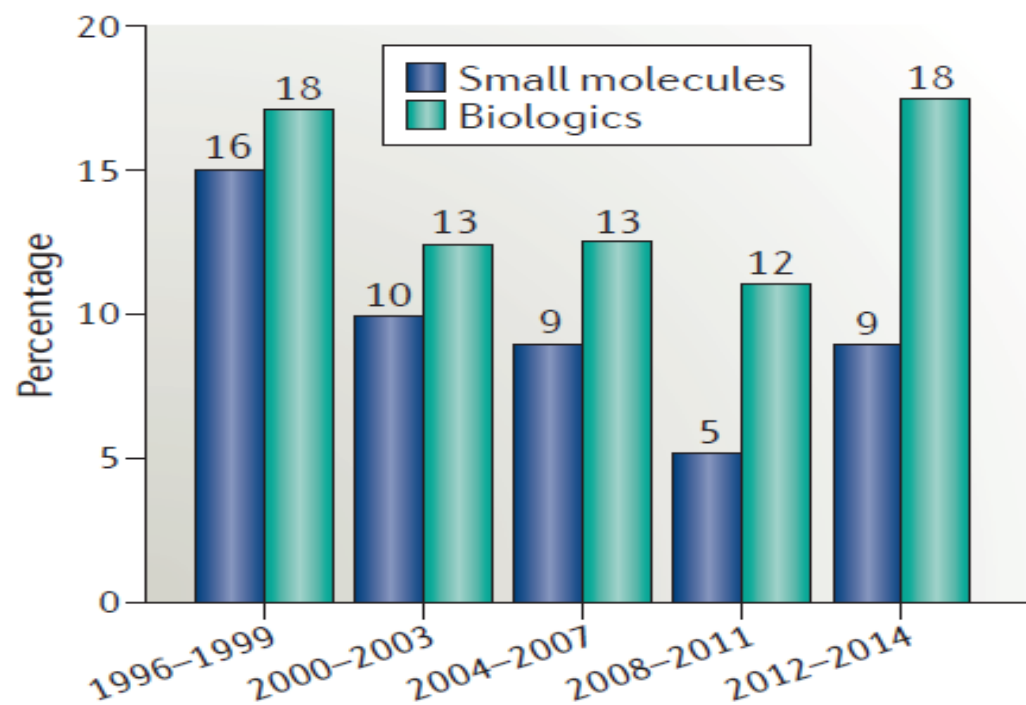
Percentage likelihood of moving from Phase I to launch



Míra úspěšnosti klinických testů po celém světě

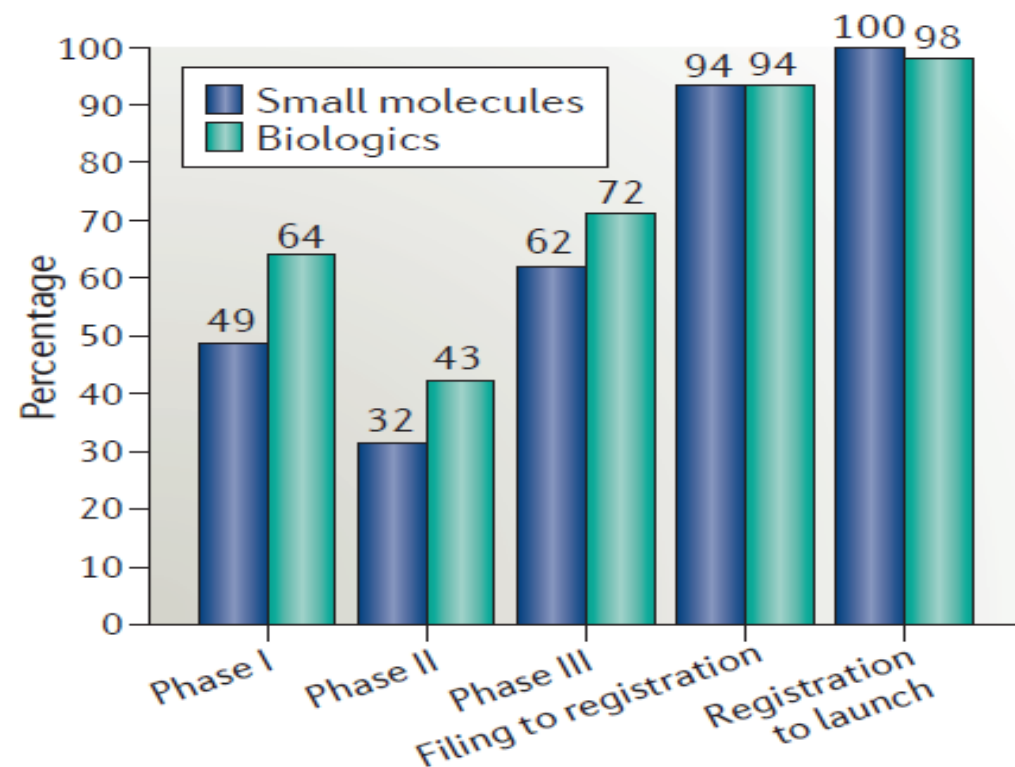
a Cumulative success rates over time

Percentage likelihood of moving from Phase I to launch



b Success rate by phase, 2012-2014

Percentage likelihood of moving to next phase



Míra úspěšnosti klinických testů po celém světě

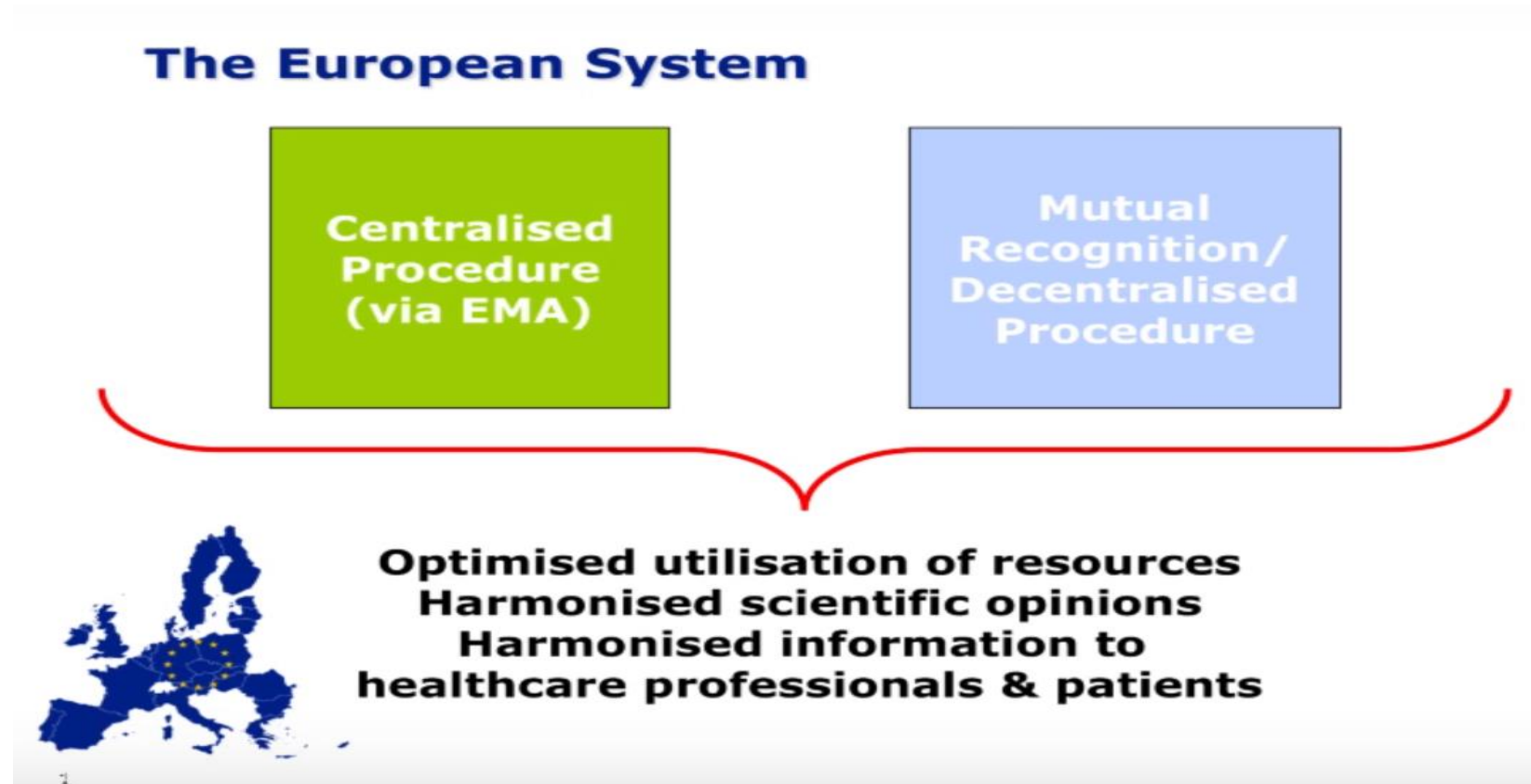
Table S1 | **Number of products and phase transitions included in the calculation**

		1996-1999	2000-2003	2004-2007	2008-2011	2012-2014*	2012-2015*
Number of products included in the calculation**		2603	2965	3776	5144	4808	5558
Number of phase transitions	Phase I	755	909	1119	1893	1351	1835
	Phase II	602	600	758	1116	875	1159
	Phase III	324	275	288	309	296	400
	Filed	240	228	177	202	175	250
	Approved	246	209	160	202	160	245
	Total	2167	2221	2502	3722	2857	3889

Celosvětová cesta léčivého přípravku k pacientovi, krok za krokem



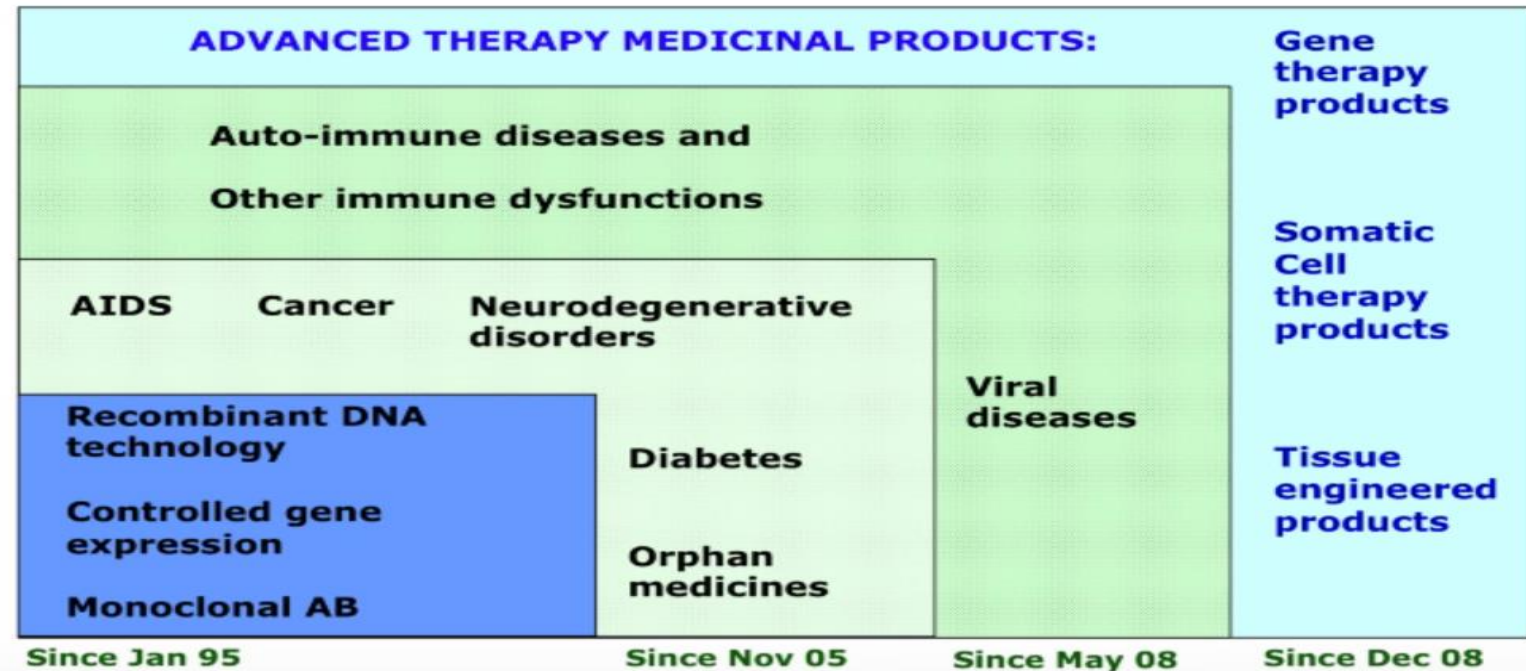
Postupy schvalování léčiv v EU



Postupy schvalování léčiv v EU



Eligibility: "Mandatory Scope"



Postupy schvalování léčiv v EU



Eligibility "Optional Scope"



Art 3(3) Generic of a product authorised via EMA

The centralised procedure attracts most innovative medicines. Decentralised and MRP mainly do generics and new indications for existing products

Hodnocení léčiv, krok za krokem

1. Počáteční hodnocení a seznam otázek (o 120)
2. Pozastavení 1
3. Další hodnocení a seznam nevyřešených otázek (do 180.dne)
4. Pozastavení 2
5. Další konzultace (do 210. dne)
6. Závěrečná diskuse a přijetí stanoviska (67 dní)
7. Možné přezkoumání



Hodnocení léčiv, krok za krokem

Posuzování žádosti o **registraci nového léčivého přípravku** trvá 210 “aktivních” dnů. Tato doba aktivního hodnocení je čas, který odborníci EMA stráví hodnocením důkazů poskytnutých žadatelem na **podporu žádosti o registraci**.

Tato doba je přerušena jednou nebo dvěma „**hodinovými zastávkami**“, během nichž žadatel připravuje odpovědi na jakékoli otázky vznesené výborem **CHMP**.

Maximální doba zastavení závisí na tom, jak dlouho si žadatel myslí, že bude trvat, než odpoví, musí však být schválen výborem CHMP.

První zastávka obvykle trvá 3 až 6 měsíců a druhá 1 až 3 měsíce.

Celkově lze říci, že hodnocení nového léku obvykle trvá **přibližně rok**.

EU, typy schválení

Type of Approvals



Normal:

Comprehensive data

Exceptional Circumstances:

- Comprehensive data not available and cannot be provided
- Must meet criteria (rarity, medical ethics, state of scientific knowledge)

Conditional Approval:

- Comprehensive data not available; to be provided after approval
- Must fulfil scope (orphan drugs, emergency threats, serious and life-threatening diseases)
Approval valid for 1 year, renewable



**2. Translační cesty směrem
ke klinické aplikaci (ATMP, tkáňové
transplantace, LP)**

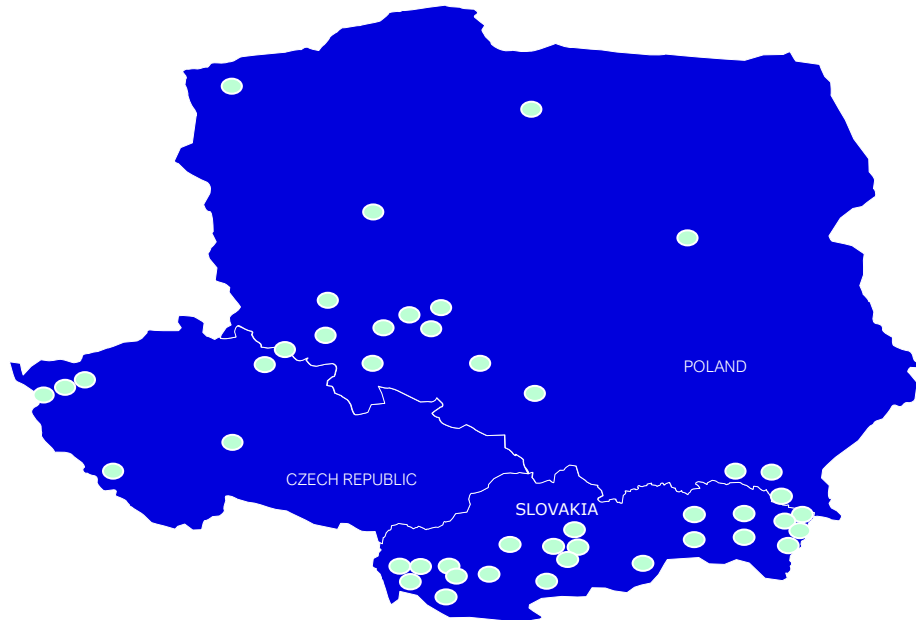
**3. Zkušenosti České
Biotechnologické společnosti
PrimeCell**



PrimeCell BioScience a.s. je biomedicínsko-biotechnologická společnost zaměřená na vývoj a klinické testování biologických léčivých přípravků a technologií

<https://www.primecell.eu/>

PrimeCell – patří mezi důležité hráče v zdravotní péči v Evropě s vlastní sítí nemocnic



Regenerativní medicína
Vnitřní lékařství
Onkologie
Ophthalmologie
Psychiatrie
Orthopaedie
Neurologie
Chirurgie



PrimeCell zaměření a praxe

Klinické testy

Fáze I/II B
(výjimečně fáze III)

Klíčové translační směry:

- i. Nemodifikované buňky
- ii. Geneticky modifikované buňky
- iii. Imunoterapie
- iv. Génová terapie
- v. Zařízení a lékařské technologie

Kooperativní výzkum s top institucemi :

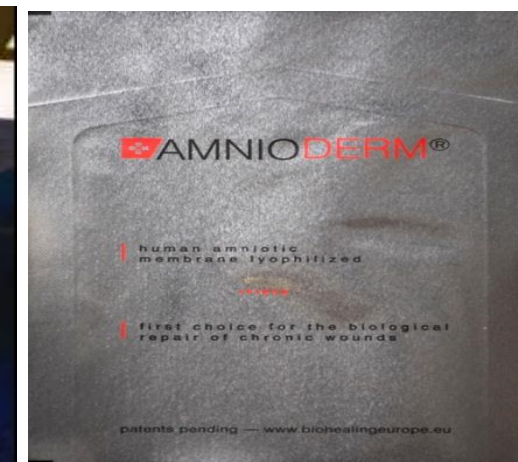
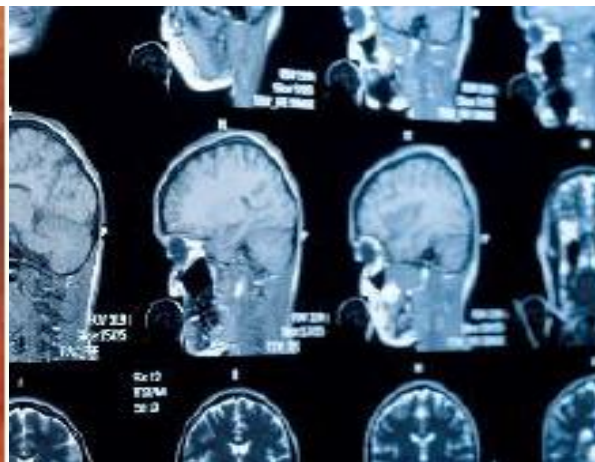
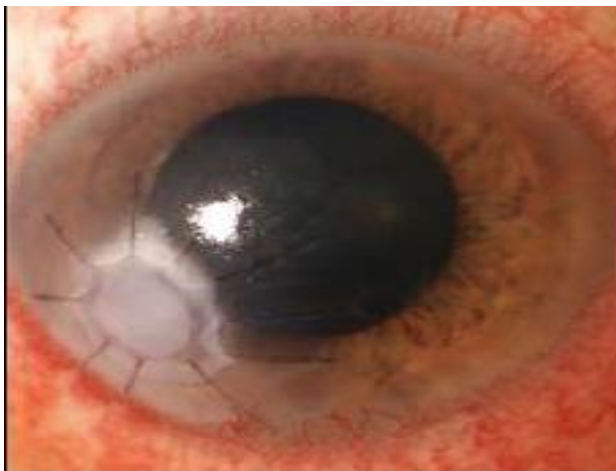
- Česká republika (CVUT, VŠCHT, IKEM, Ústav Experimentální medicíny AS, Biotechnologický institut AS, FNUSA-ICRC, Masarykova Univerzita, UOCHB)
- EU/UK/USA (Cambridge Uni, Exeter Uni, MIT, N+S Carolina, D.C., NY, California)
- Israel (Ben Gurion University, Weizmann institut)
- Korea

Kooperativní
výzkum –
Ekosystém
s
akademickými
institucemi



PrimeCell zaměření a praxe

Využití amniotické membrány v ČR/SR



- Oftalmologie
- Neurochirurgie
- Chronické rány
- Popáleniny

 Národní centrum tkání a buněk™

 primecell
Bioscience™

 AMNIODERM®

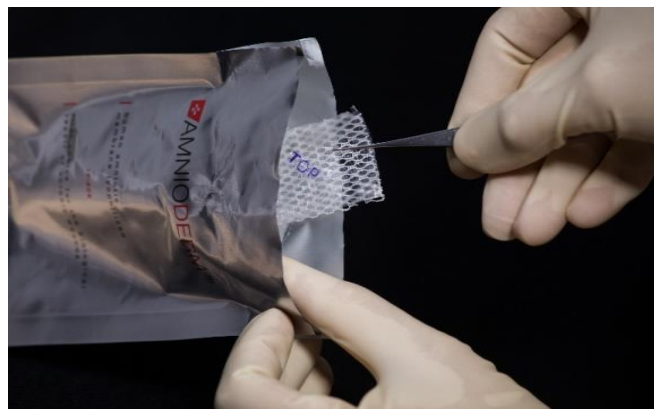
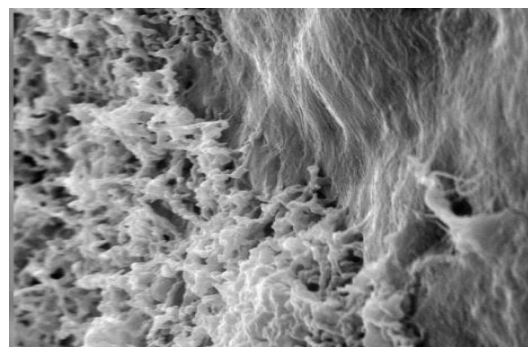
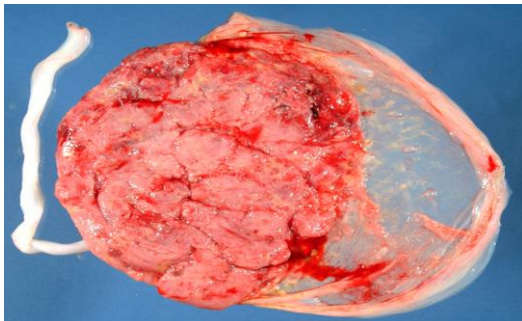
PrimeCell zaměření a praxe

Perinatální tkáně (AM / ACH) obsahují ≥ 200 biologicky aktivních molekul

Cytokine	Content (pg/mg)			
	Amnion		Chorion	
	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation
TIMP-4	5992.97	2414.42	5958.01	665.55
bFGF	4455.74	1382.91	4276.23	1354.65
TGF- α	3207.53	728.49	4215.82	343.1
PDGF-AA	2151.35	1382.41	4564.91	1465.36
TIMP-2	227.86	104.84	377.95	91.3
HGF	132.05	13.63	147.79	17.47
PIGF	118.72	27.77	114.63	28.28
PDGF-BB	82.93	60.67	151.47	55.82
EGF	77.08	7.26	5.13	4.05
VEGF	29.74	64.24	186.49	354.15
IL-8	28.36	21.01	84.88	22.13
SDF-1 α	26.64	0	26.64	0
TGF- β 1	16.64	0	25.77	27.08
TIMP-1	4.49	1.68	18.77	20.54
IL-6	2.96	0.92	9.93	2.13
IL-10	1.27	0.91	1.69	0.61
IL-4	0.86	0.1	0.99	0.51
GCSF	0.69	1.08	0.91	0.46

The amount of each cytokine in each sample was normalized to the dry mass of tissue.

PrimeCell zaměření a praxe



533 Vědecká příprava pro ZL

 **AMNIODERM®**

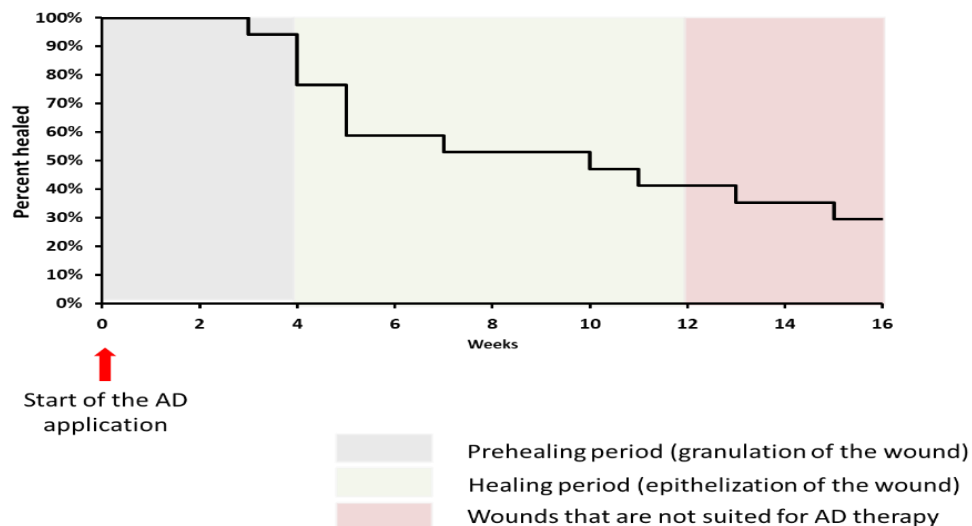
- Výroba pomocí patentované technologie **AMNIPUR®** (číslo patentu 307603)
- Podmínky GMP
- Kód SEC(Single European Code)
- **Bezpečnost** (kompletní sérologické testování:
 - HIV 2
 - HIV 1
 - HBs Ag
 - HBc total Ab
 - HCV Ab
 - HTLV 1,2 Ab
 - *Treponema pallidum* Ab
- **5letá trvanlivost (exspirací)**

**MUNI
MED**

Využití amniotické membrány v ČR

Chronické rány

Progrese hojení u pacientů



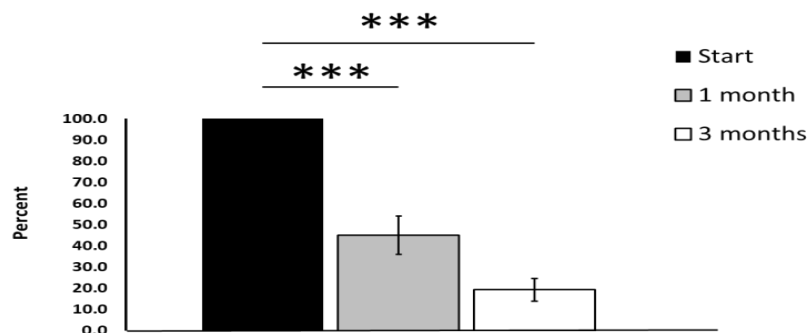
W1, 14 cm²



W2, 12 cm²

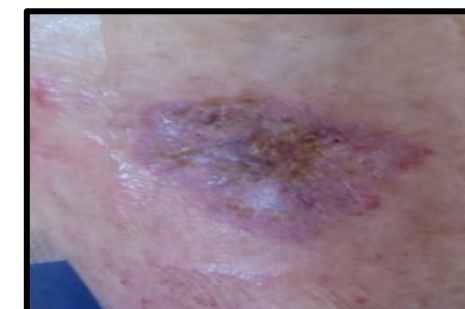


Procento uzavření u chronických rán



Forostyak et al., in preparation

* $p \leq 0.05$
 ** $p \leq 0.01$
 *** $p \leq 0.001$



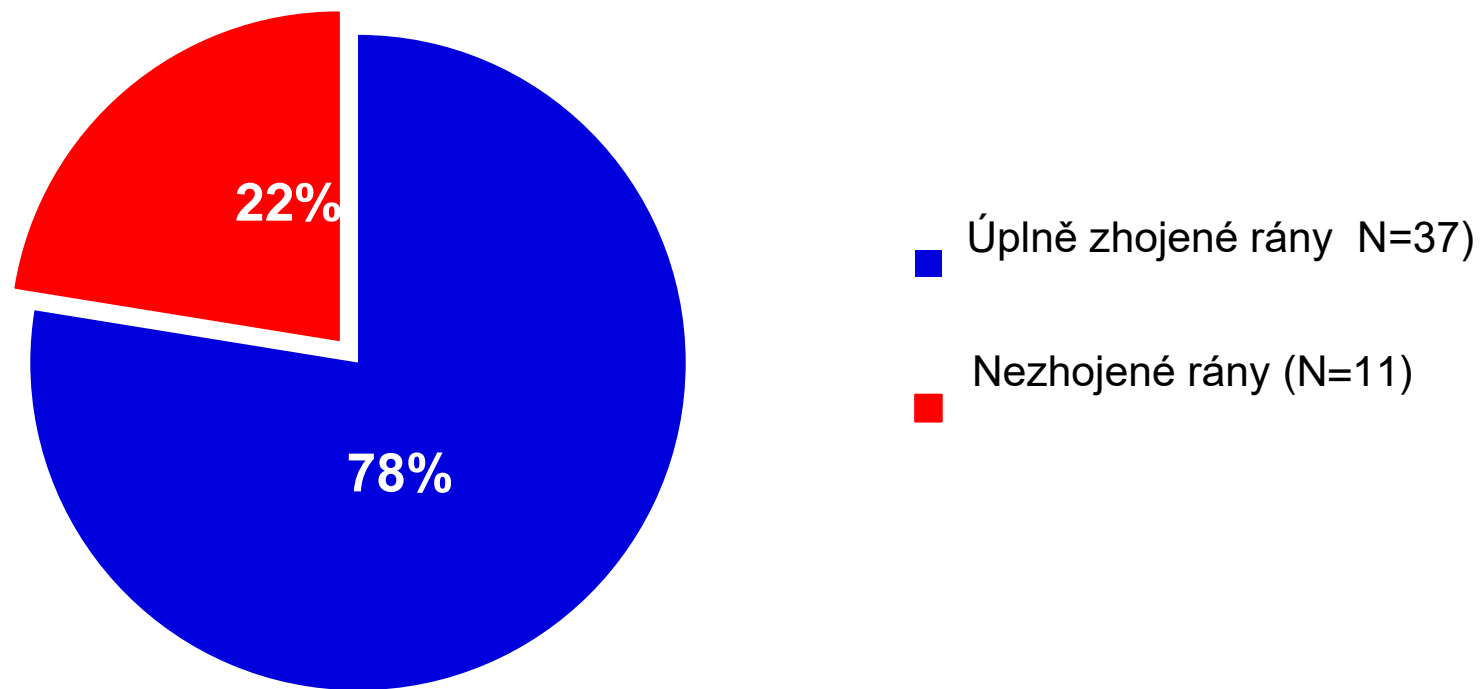
W6, 0 cm²



Využití amniotické membrány v ČR

Chronické rány

Procento zhojených /regenerovaných chronických ran po aplikaci
AMNIODERM®



Využití amniotické membrány v ČR

Chronické rány



Fig. 1 Demonstrates a healing process of burns. A wound bed has been prepared with hydrosurgery (A), followed by immediate application of AmnioDerm® (B). On the 5th day of AmnioDerm® application has been observed robust epitheliation of the wound (C) enabling a full wound closure and total healing at the 7th day of therapy (D).

Využití amniotické membrány v ČR

Chronické rány



Plodová membrána zabraňuje:

- Úniku mozkomíšního moku
- Tvorbě pseudomeningokél
- Pooperační infekci
- Zjizvení pleny a intradurální adhezí
- Přenosu nemoci

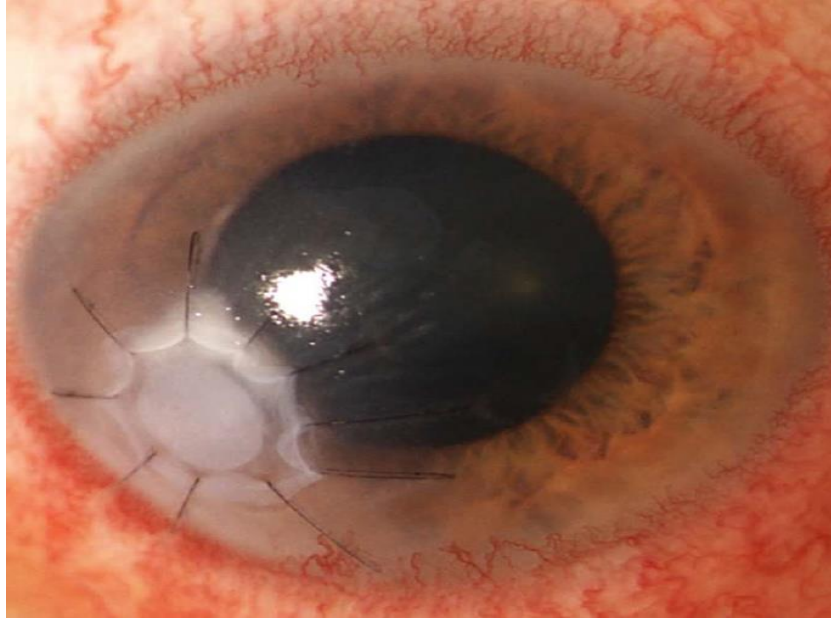
Inhibuje:

- Zánětlivé reakce

Male, 29	Defect location :	F-T I. sin.
	Etiology:	Decompression craniotomy + edema
	Dg.:	KCP + fr. scapula

Využití amniotické membrány v ČR

Chronické rány



Indikace

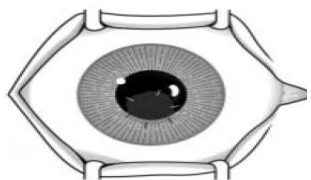
- Mechanická a chemická poranění očí,
- Pterygium
- Eroze a vředy rohovky
- Oční keratopatie
- Keratitida různého původu

Efekty

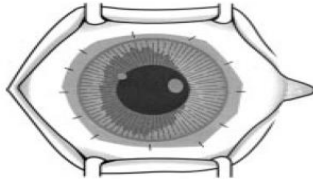
- Promotér epitelizace
- Inhibitor fibrózy

Výsledky:

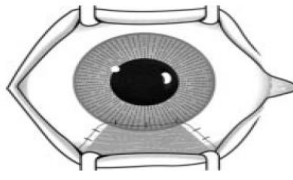
- Usnadňuje regeneraci rohovky
- Zabraňuje vaskularizaci rohovky
- Zabraňuje jizvení a vadám zraku



*paracentral corneal
epithelial defect*

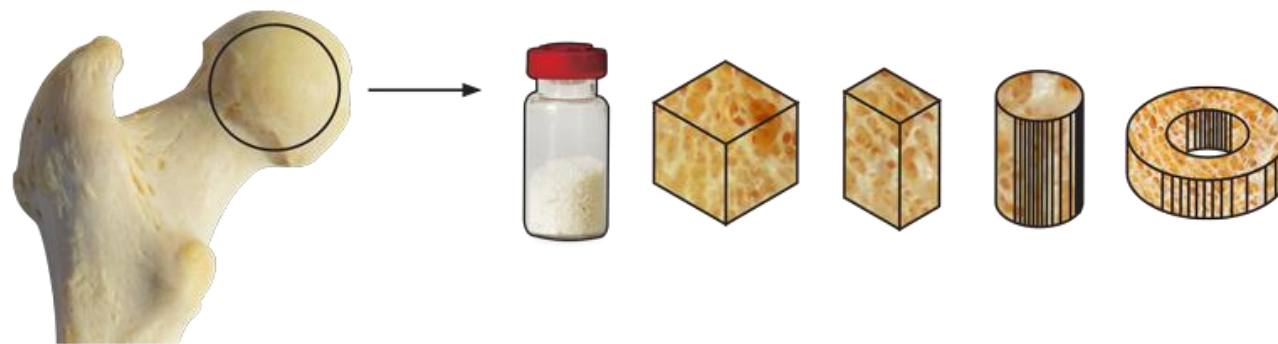


*Whole corneal
surface (after
peritomy)*

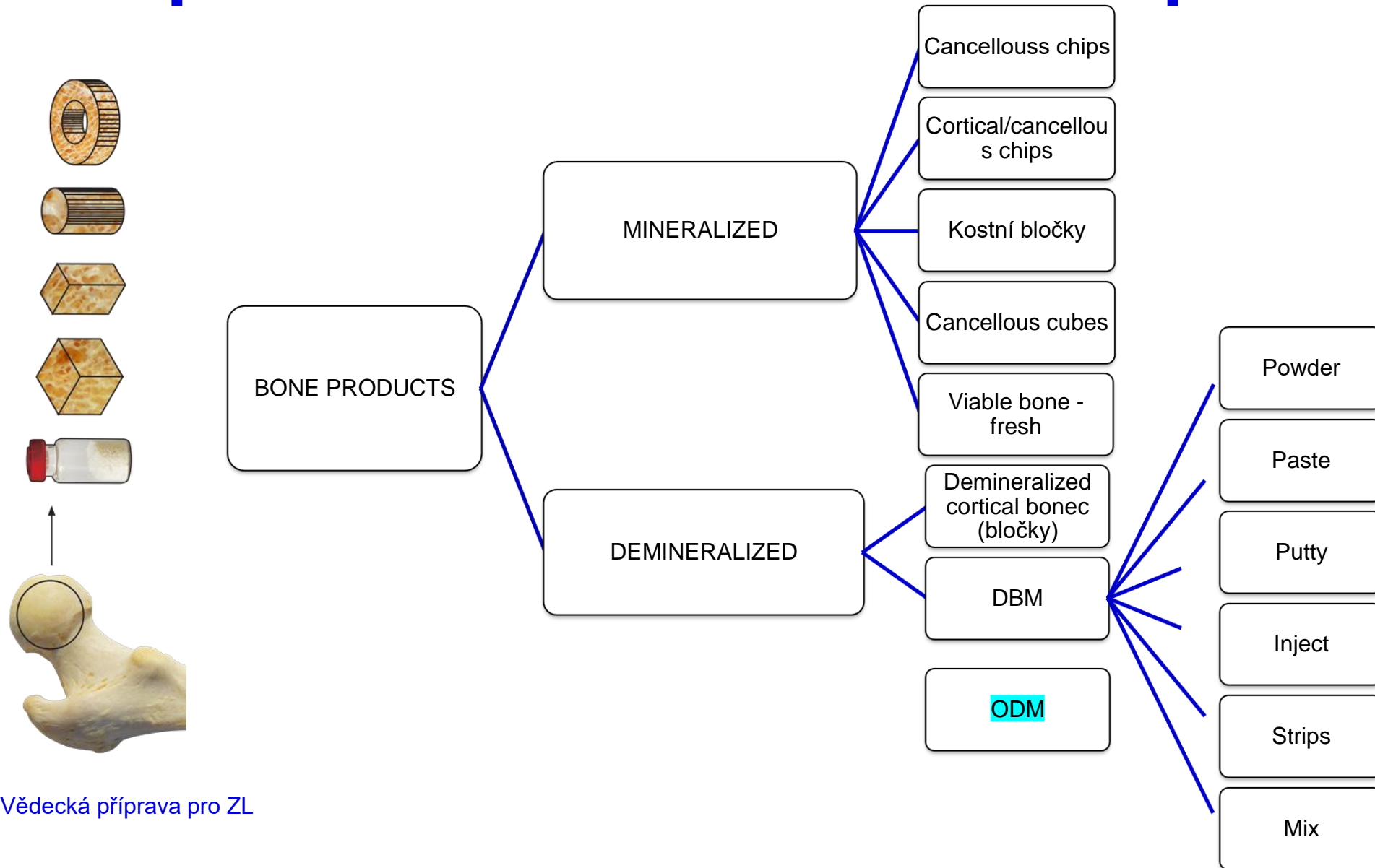


*Conjunctival defect
(after excision of
pterygium)*

4. Transplantace tkání: kost a kostní produkty



Transplantace tkání: kost a kostní produkty



Transplantace tkání: kost a kostní produkty

1. Vývoj

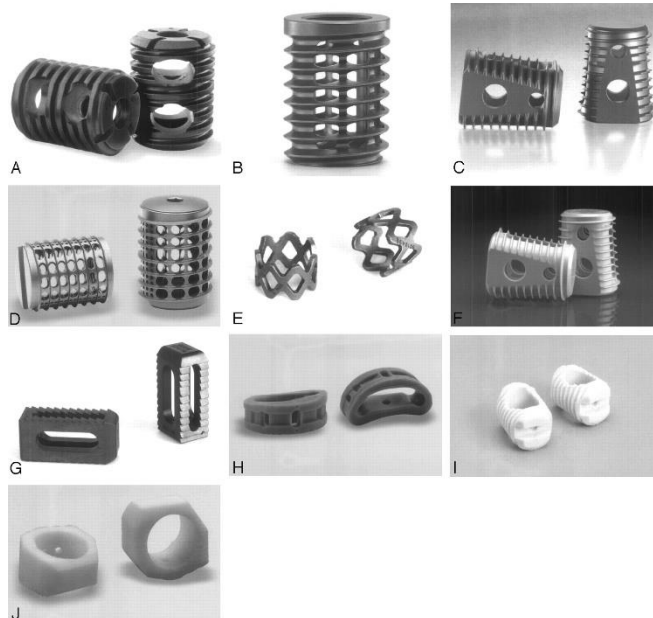
- LTB
- Produkt pro spinální chirurgii
- Produkt pro dentální nebo oro/maxilofaciální chirurgii
- Produkt pro ortopedie/traumatologie

2. Regulatory strategy & pathway

- Zákon 296/2008 Sb. (LTB)

Transplantace tkání: kost a kostní produkty

- **Alogenní materiály:**
 - Alogenní kostní štěpy
 - Kostní náhrady (trikalcium fosfát nebo hydroxyapatit) se nevyrovnají svojí osteokondukcí a osteoindukcí vlastní kostní tkáni a současně osteoprodukci nemají.
- **Xenogenní**



Spondylochirurgie: **Actifuse**, **ProOssal**, atd.

Dentální implantologie

Straumann Bone ceramic® – syntetická kost

Geistlich Bio-Oss®

Fúzní klece (fusion cages), pro augmentační materiál

Transplantace tkání: kost a kostní produkty

Autologní materiály - vlastní kost je nejkvalitnějším materiálem, je získávána nejčastěji z lopaty kosti kyčelní, což často vede k bolesti v místě odběru - donor site pain a výsledkem je sice ztráta bolesti operovaného segmentu, ale vytvoření nového zdroje bolestí v odběrové ploše.

Základní funkce kostního štěpu:

- a) Osteoindukce** - schopnost podporovat růst nové kostní tkáně.
- b) Osteokondukce** – schopnost podpořit migraci osteogenních buněk do místa kostního defektu či do místa zlomeniny.
- c) Osteogeneze** - je schopnost syntézy nové kosti z buněk dárcovského štěpu
 - Klinicky nejvýznamnější růstové faktory, zejména kostní morphogenický protein (BMP)

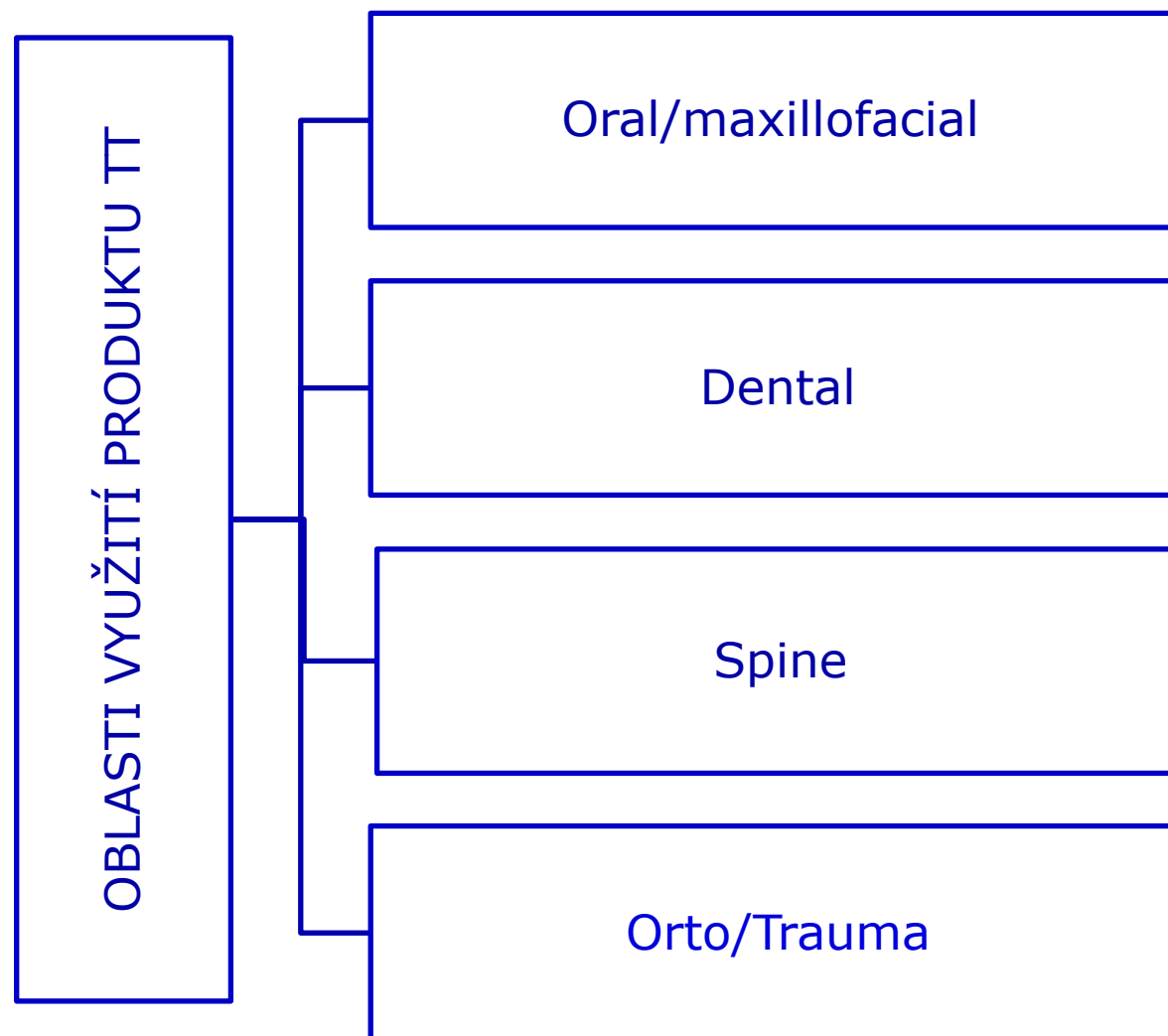
Kostní morfogenetický protein (BMP-2 –bone morphogenetic protein)

- Řadí se mezi růstové faktory beta, podporuje formaci kostí a chrupavek
- Významný efekt regenerace in vivo při aplikaci na kostní defekt

Transplantace tkání: kost a kostní produkty

Growth Factor	Source	Receptor Class	Function
Transforming growth factor beta (TGF- β)	Platelets, bone extracellular matrix, cartilage matrix	Serine threonine sulfate	Pleiotropic growth factor stimulates undifferentiated mesenchymal cell proliferation
Bone morphogenetic protein (BMP)	Osteoprogenitor cells, osteoblasts, bone extracellular matrix	Serine threonine sulfate	Promotes differentiation of mesenchymal cells into chondrocytes and osteoblasts, promotes differentiation of osteoprogenitors into osteoblasts, influences skeletal pattern formation
Fibroblast growth factors (FGF)	Macrophages, mesenchymal cells, chondrocytes, osteoblasts	Tyrosine kinase	Mitogenic for mesenchymal cells, chondrocytes, and osteoblasts
Insulin-like growth factors (IGF)	Bone matrix, osteoblasts, chondrocytes	Tyrosine kinase	Promotes proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Platelets, osteoblasts	Tyrosine kinase	Mitogen for mesenchymal cells and osteoblasts; macrophage chemotaxis

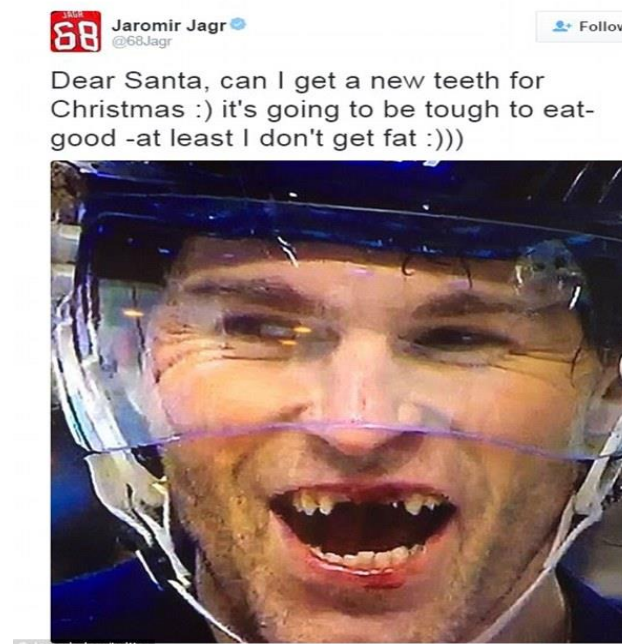
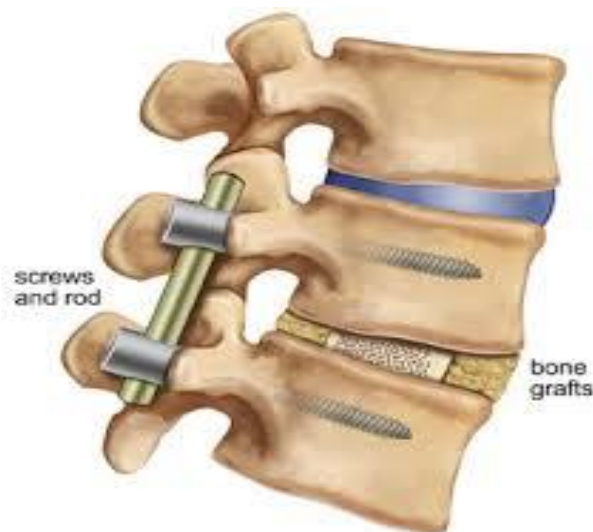
Transplantace tkání: kost a kostní produkty



Transplantace tkání: kost a kostní produkty

Příklady použití:

1. Spinální fúze (připojení dvou nebo více obratlů kostním štěpem)
2. Stav po ztrátě zubů (extrakce zubů, parodontitida, trauma, jiné)
3. Cysty, nádory atd.
4. další



Transplantace tkání: kost a kostní produkty

Degenerativní změny páteře (bederní nebo hrudní), fraktury obratlů, nádory

- Nejčastější: výhřez meziobratlové ploténky a zúžení páteřního kanálu (stenóza) – obě onemocnění jsou důsledkem výše uvedených degenerativních změn
 - **Výhřez ploténky** – uvolnění vnitřní – měkké části ploténky do páteřního kanálu skrze trhlinu v obvodové – pevnější části ploténky. V páteřním kanálu tato uvolněná část dráždí nerv nebo jej utlačuje. To vede k bolesti a v některých případech i k poruše funkce nervu
 - **Zúžení páteřního kanálu** způsobují vyklenující se meziobratlové ploténky, zvětšené a degenerativně změněné meziobratlové klouby

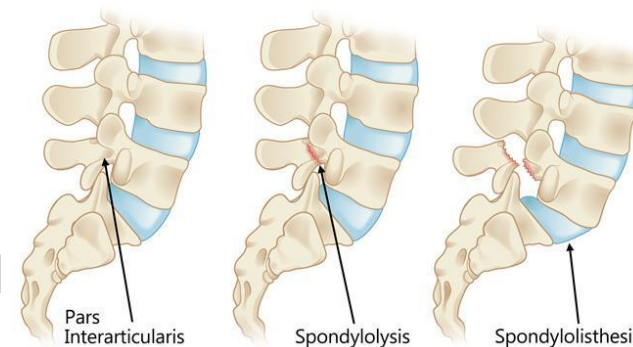


Transplantace tkání: kost a kostní produkty

Spondylochirurgie - chirurgický obor zabývající se chirurgickou terapií chorob páteře - úrazy, vrozené vady a deformity, tumory, poúrazové deformity, degenerativní změny

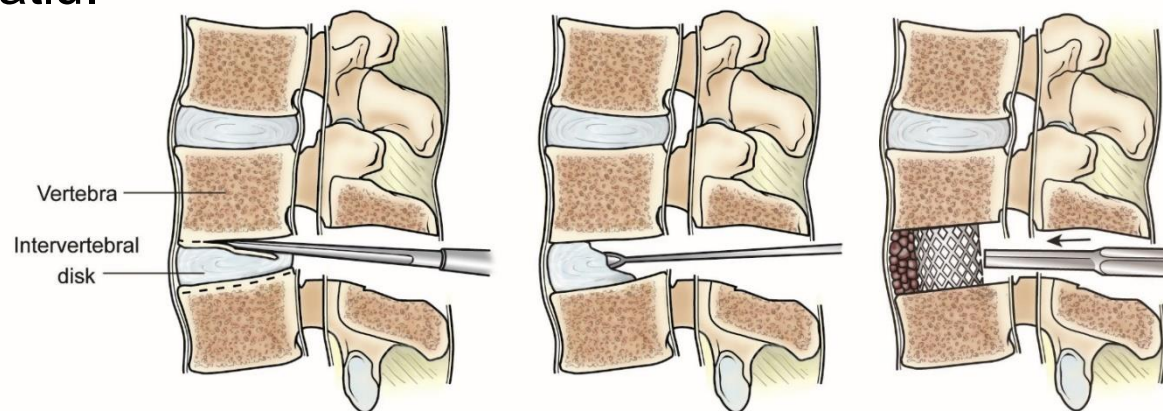
Degenerativní změny páteře (bederní nebo hrudní), fraktury obratlů, nádory

- degenerativní změny (vrozené, nebo získané dosud neznámým procesem) mohou vést k tzv. nestabilitě určitého úseku páteře.
- Sousední obratle se kvůli změnám meziobratlové ploténky a samotných obratlů pohybují vůči sobě více než je normální. Může dojít až k situaci, kdy se jeden obratel posune vůči druhému dopředu a vytvoří se tak jakýsi „schod“ či „posun“ spondylolistesa.



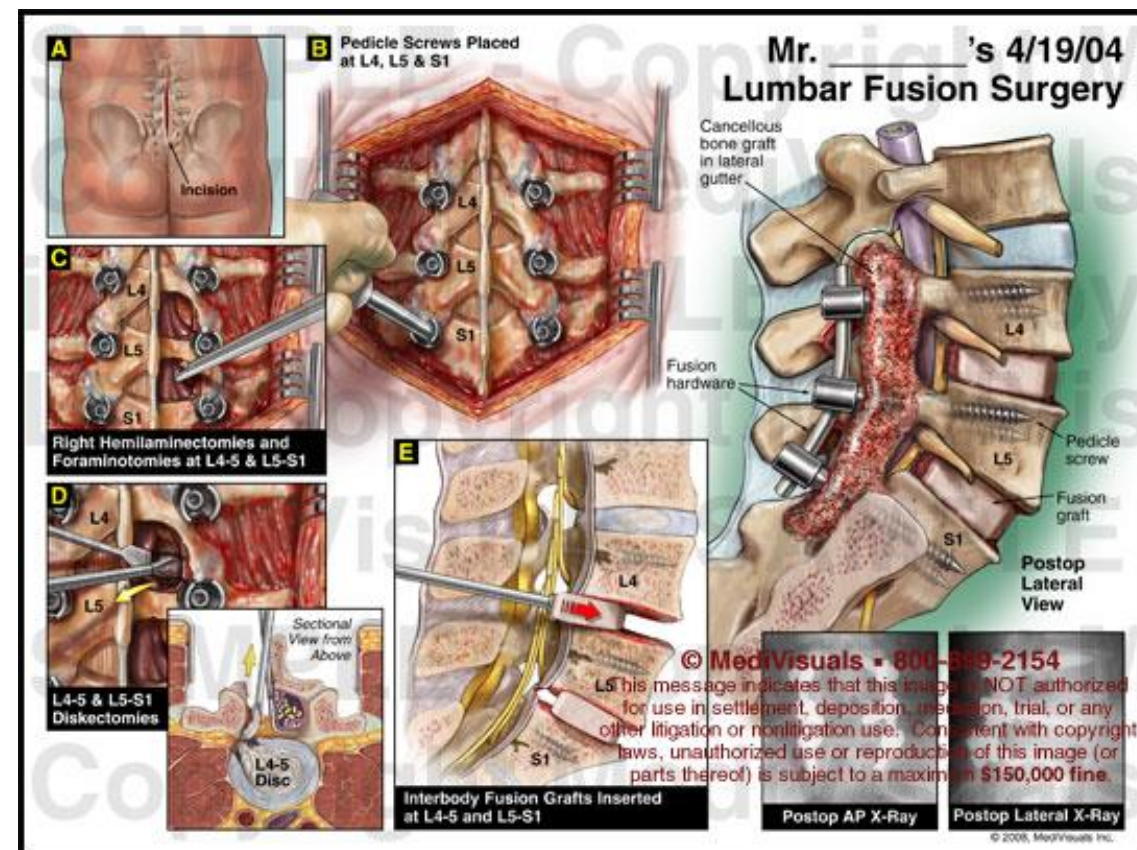
Transplantace tkání: kost a kostní produkty

- Operační léčba - tam, kde neoperační léčba selhává, obtíže trvají nebo se i přes léčbu zhoršují.
- Podstatou každé operace je vždy odstranění útlaku nervů (případně míchy) při zachování stability páteře. Při operacích se často používají různé fixátory - implantáty k zajištění stability páteře, šrouby, tyče nebo dlahy.
- Jako náhrada meziobratlové ploténky se používají speciální klícky vyplněné kostní drtí, které umožní srůst sousedních obratlů.



Transplantace tkání: kost a kostní produkty

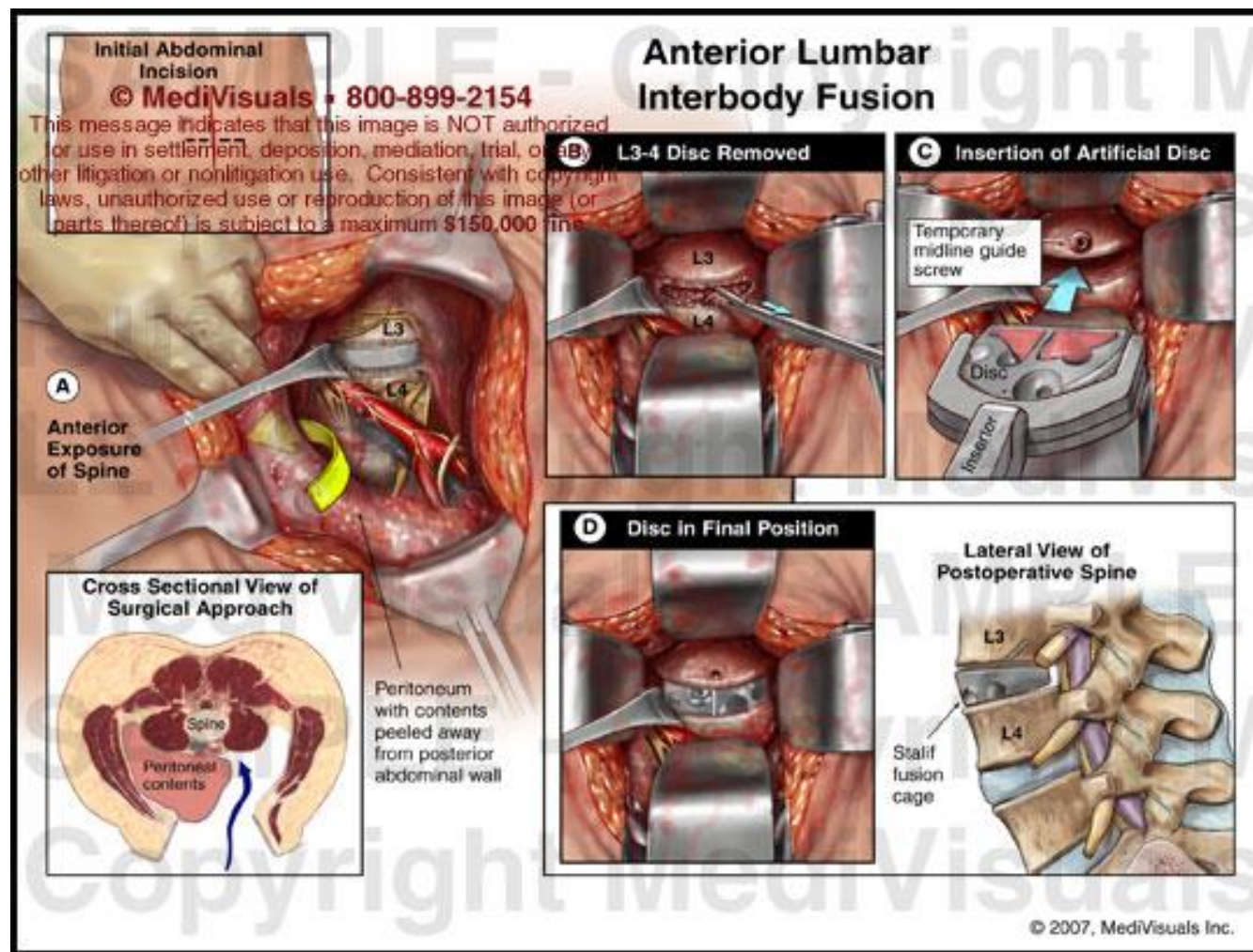
- Používány jsou následující operační techniky:
 - PLIF (Posterior Lumbar Interbody Fusion) – prostřednictvím zadního přístupu dosahuje chirurg páteře, poté uvolní nervy odstraněním obratlového oblouku, zesílených vazů a částí zvětšených kloubů, odstraní meziobratlovou ploténku a nahradí ji výše zmíněnou klíčkou



Transplantace tkání: kost a kostní produkty

- TLIF (Transforaminal Lumbar Interbody Fusion) – podobná techniku jako PLIF. Liší se tím, že páteřní kanál není nutné otevírat odstraněním obratlového oblouku. Meziobratlová ploténka je odstraněna a náhrada je vložena přístupem více „ze strany“
- Instrumentovaná a neinstrumentována posterolaterální déza - není odstraněna meziobratlová ploténka a srůstu sousedních obratlů je dosaženo pomocí kostní drtě uložené na příčné výběžky obratle
- ALIF (Anterior Lumbar Interbody Fusion) - chirurg dosahuje páteře předním přístupem přes dutinu břišní kolem břišních orgánů a cév, odstraní meziobratlovou ploténku a nahradí ji klíčkou vyplněnou kostní drtí

Transplantace tkání: kost a kostní produkty



Exhibit# 406266-01X

Transplantace tkání: kost a kostní produkty

Implantologie

Chybějící zuby

Stavy po ztrátě zubů z různých příčin:

- **Pardontitida**
- **Extrakce zubů**
- **Trauma, jiné**

Transplantace tkání: kost a kostní produkty

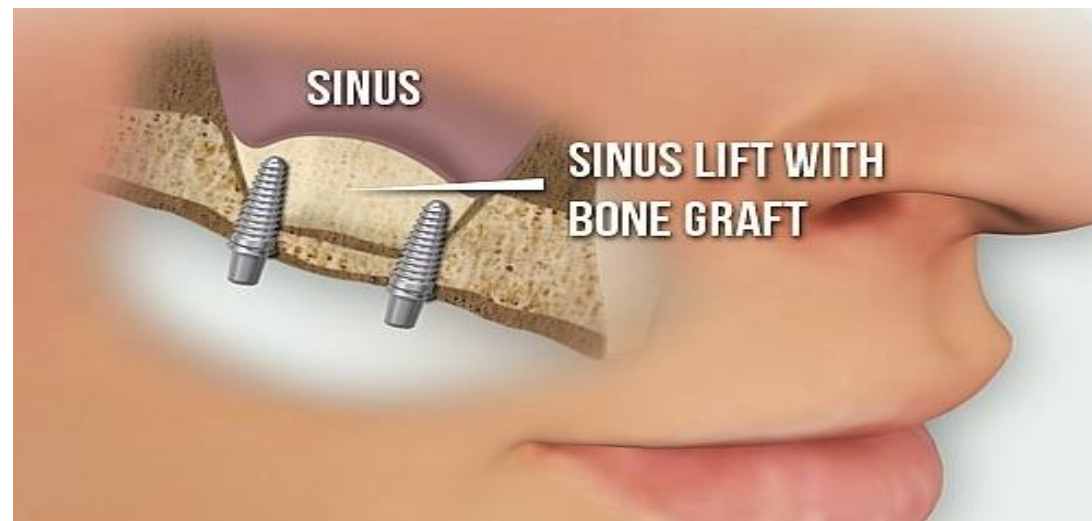
AUGMENTACE – výplň vlastní kosti v případě nedostatku alveolární kosti vzhledem k atrofii.

1. Augmentace kostním autotransplantátem – pooperační bolest, narušení pevnosti a stability kosti, riziko infekce

2. Augmentace alogenním materiálem (syntetické, xenogenní, allogenním štěpem)

SINUS LIFT

vytvoření kosti v čelistní dutině, kdy po bočním přístupu je nadzvednuta výstelka dutiny a vzniklý prostor je následně vyplněn augmentačním materiálem



Transplantace tkání: kost a kostní produkty

mineral part of bovine bone – úspěšně používán již 25 let

- Za léčbu je odpovědný implantolog - konzervativnost chirurga, který je naučený používat současné materiály
- Dlouhodobě používané materiály od renomovaných značek
- Psychologické zábrany – tkáň od zemřelého dárce/riziko přenosu infekce – informovaný souhlas v souvislosti s prakticky kosmetickým zákrokem

Transplantace tkání: kost a kostní produkty

Délka současné standardní léčby:

Spondylochirurgie - fúze

Celková doba pobytu v nemocnici 5-7 dnů, poté je pacient propuštěn do domácího ošetřování nebo přeložen např. do péče rehabilitačního nebo neurologického oddělení v místě bydliště nebo ve Vaší spádové nemocnici. Základem je aktivní rehabilitace, individuální cvičení a vhodný pohyb, režimová opatření a často i změna životního stylu včetně redukce nadváhy

Augmentace v implantologii – běžně provádí stomatologické ambulance a stomatochirurgické kliniky - zubní implantáty se můžou zavádět současně a nechávají se vhojovat devět měsíců.

Transplantace tkání: kost a kostní produkty

Náklady na současnou léčbu:

Spondylochirurgie

- VZP ceník – konvenční kostní štěpy

Implantologie

- Léčba implantátem s augmentací není hrazena VZP
- Samoplátci

Transplantace tkání: kost a kostní produkty

Ověření bezpečnosti a účinnosti dle ZoLTB:

- **Doložení bezpečnosti**
 - nastavení systému screeningu dárců - sérologické vyšetřování, vyšetřování 3NAT (nad rámec požadavků legislativy ČR),
 - zdravotnická dokumentace dárce
 - doložení osobní anamnézy
 - vyšetření těla dárce, hemodiluce
 - Posuzování zdravotní způsobilosti provádí lékař
 - Použití bezpečných a schválených materiálů v rámci zpracování
- **Doložení účinnosti produktu**
 - produkt nelze použít u člověka dříve než bude schválen SÚKL
 - literárními zdroji

DBM – PUTTY

- Zdrojem k výrobě je prášek z kortikální vrstvy dlouhých kostí
- Mix kostního prášku a glycerolu (kyselina hyaluronová, apod.)
- Poměr 65 % DBM, 35 % Glycerol (dle NHS)
- Poměr 31 % váhy DBM, 93 % objemu DBM + kyselina hyaluronová (dle MTF)
- Podpora růstu autologních buněk, které zapříčiňují osteogenezi
- Hydratovaný DBM ztrácí svůj osteogenní účinek přibližně po 5 týdnech
- Průměrná expirací produktů s nosičem je 2-3 roky, dle výrobce



- 1) <https://nhsbtdbe.blob.core.windows.net/umbraco-assets-corp/3750/170413-demineralised-bone-matrix-01.pdf>
- 2) <http://mtf.trellist-dev.com/docs/default-source/product/dbx-brochure.pdf>
- 3) https://www.aesculapimplantsystems.com/assets/base/doc/DOC_1248-ProSpace_DBM_Moldable_Putty_Paste_and_Cancellous_Chips_Data_Sheet.pdf
- 4) <https://bonegrafttoday.com/product/dbm-paste-1cc/>
- 5) <http://mtf.trellist-dev.com/docs/default-source/product/dbx-brochure.pdf>

DBM – INJECT

- Zdrojem k výrobě je prášek z kortikální vrstvy dlouhých kostí
- Přeplněná skleněná stříkačka
- „*DBP Putty with deliver system*“
- Poměr 31 % váhy DBM, 93 % objemu DBM + kyselina hyaluronová (dle MTF)
- Podpora růstu autologních buněk, které zapříčiňují osteogenezi
- Hydratovaný DBM ztrácí svůj osteogenní účinek přibližně po 5 týdnech
- Průměrná expirací produktů s nosičem je 2-3 roky, dle výrobce



DBM – MIX

- Zdrojem k výrobě je drť z kortikální a parenchymatózní části dlouhých kostí
- Mix kostního prášku a kyseliny hyaluronové (dle MTF)
- Eliminace potřeby kostního štěpu v kombinaci s DBM
- Poměr zastoupení kostí je 35 %
- Podpora růstu autologních buněk, které zajišťují osteogenezi



<http://mtf.trellist-dev.com/docs/default-source/product/dbx-brochure.pdf>

Souhrn

- EU je společným prostorem pro translační a klinický výzkum
- Partnerské projekty mají vyšší úspěšnost směrem k klinickému testování
- Současná úspěšnost klinických studií fáze I je 64%; Míra úspěšnosti klinických studií fáze II činí 43%
- Téměř 14% všech léků a 18% biologických produktu v klinických studiích získalo souhlas od EMA / FDA
- Míra schválení se pohybuje v rozmezí od 33,4% (vakcíny proti infekčním chorobám) do 3,4% (vyšetřovaná léčba rakoviny)
- Míra úspěchů biologií byla vyšší než u malých molekul
- Překlad know-how pro klinické testování v CEE je výrazně levnější, vysoká kvalita GCP a přístup na trh
- Regulační podpora a podpora výzkumu a vývoje je klíčem k úspěšné implementaci know-how do klinické praxe
- Transplantace tkání, biologické produkty a biomateriály se liší v regulačních cestách
- Materiály a produkty na bázi tkání mají široké uplatnění a indikace v regenerativní medicíně
- Regulatorně zaražení produktu je klíčové pro transfer k pacientům a rutinní použití

Kolokvium

doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

Poděkování

- Podpořeno z projektu **MUNI/FR/1406/2019 Vědecká příprava pro Zubní lékařství.**

Recenzovali:

- **RNDr. Mária Hovořáková, Ph.D.**

Ústav histologie a embryologie. 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova Praha

- **doc. MUDr. Jakub Suchánek, Ph.D.**

Stomatologická klinika, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Informace o duševním vlastnictví

- Tato prezentace je autorským dílem vytvořeným zaměstnanci Masarykovy univerzity.
- Studenti kurzu/předmětu mají právo pořídit si kopii prezentace pro potřeby vlastního studia.
- Jakékoliv další šíření prezentace nebo její části bez svolení Masarykovy univerzity je v rozporu se zákonem.

M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A