

VYUŽITÍ MLPA TECHNIKY K PRŮKAZU GENETICKÝCH ZMĚN U NEUROBLASTOMU

UTILIZATION OF MLPA TO DETECTION OF GENETIC CHANGES IN NEUROBLASTOMA

VÍCHA A., ECKSCHLAGER T.

KLINIKA DĚTSKÉ HEMATOLOGIE A ONKOLOGIE 2. LF UK A FAKULTNÍ NEMOCNICE V MOTOLE

Souhrn

Neuroblastom je nádorem dětského věku, odvozeným z buněk neurální lišty. Jedná se o nádor velmi variabilního klinického i biologického chování. Průkaz některých genetických změn určuje prognózu onemocnění. U nádorů vysokého rizika nalézáme DNA diploidii a strukturální změny zahrnující také amplifikaci MYCN onkogenu. Naopak nádory nízkého rizika jsou DNA triploidní a prokazujeme u nich početní změny celých chromozómů. V současnosti je k průkazu těchto genetických změn používáno několik postupů zahrnujících klasické cytogenetické vyšetření, komparativní genomovou hybridizaci (CGH), fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) a array CGH. Nově zaváděnou technikou je multiplexová, na ligaci závislá, amplifikační metoda (MLPA). Technika je založena na principu polymerázové řetězové reakce (PCR) ligovaných sond, které jsou hybridizovány k cílovým DNA sekvencím. MLPA je vysoce citlivá, přesná, spolehlivá a levná technika. Evropská skupina biologie neuroblastomu (ENAQUA) zařadila Neuroblastoma MLPA kit jako jeden ze standardních vyšetřovacích postupů pro průkaz genetických změn u neuroblastomu. Na našem pracovišti jsme prokázali vysokou shodu výsledků vyšetření metodami FISH, CGH a MLPA.

Klíčová slova: neuroblastom, chromosomální změny, FISH, genetické metody.

Summary

Neuroblastoma (NB) is a childhood cancer derived from neural crest cells, with a highly variable clinical course and biologic behavior. Several genomic imbalances correlate to prognosis in NB, with structural rearrangements, including MYCN amplification, in a near-diploid setting typically signifying high-risk tumours and numerical changes in a near-triploid setting signifying low-risk tumours. At present, many different techniques are used for detection of these copy number changes including standard chromosome karyotyping, comparative genomic hybridization (CGH), fluorescent in situ hybridization (FISH) and array CGH. Now, a new methodology called multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) has been developed. This new approach is based on polymerase chain reaction (PCR) amplification of ligated probes hybridized to target DNA sequences. MLPA is a highly sensitive, a rapid, accurate, reliable, and cost-effective. ENAQUA use neuroblastoma MLPA kit as a standard for detection genetic changes in neuroblastoma. We found high level concordance in FISH, CGH and MLPA investigations.

Key words: neuroblastoma, chromosome aberrations, FISH, genetic techniques.

Úvod

Neuroblastom

Neuroblastom je maligní embryonální nádor dětského věku odvozený z nezralých a nediferencovaných buněk neurální lišty osídlujících především paravertebrální sympatická ganglia nebo dřeň nadledviny. Příčina jeho vzniku není jednoznačně prokázána.

Je druhým nejčastějším solidním nádorem dětského věku (po nádorech CNS) s incidencí, která se, vzhledem k ostatním dětským nádorům, nezvyšuje a posledních 40 let se udává v rozmezí 7-10%. V zemích Evropy a severní Ameriky je nádor ročně diagnostikován u 8-9 dětí na 1 milión dětí mladších patnácti let. V poměru 1,2:1 je častější u chlapců než u dívek. Průměrný věk v době stanovení diagnózy se pohybuje kolem dvou let (36% pacientů je mladších 1 roku, 79% mladších 4 let a 97% pacientů onemocní do 10. roku života). Některé studie prokazují bifázickou distribuci v závislosti na věku

s prvním vrcholem do 1 roku a druhým vrcholem mezi 2.-4. rokem života. Věk je i významným prognostickým faktorem [1].

Většina, asi 70% primárních nádorů, vzniká v retroperitoneu, z nich polovina vychází z dřeně nadledviny a polovina z paraganglií a viscerálních sympatických ganglií břišní nebo pánevní oblasti. Zbývajících 25% vyrůstá z ganglií krční a hrudní oblasti. Není vzácné zasažení páteřního kanálu prorůstáním paravertebrálního nádoru skrz foramina intervertebralia (nádor tvaru přesýpacích hodin). Pánevní neuroblastomy nejsou časté (5%).

Neuroblastom je charakterizován značnou biologickou variabilitou. Od schopnosti samovolné regrese, přes spontánní nebo indukovanou diferenciaci v semimaligní ganglioneuroblastom nebo dokonce benigní ganglioneurom, až po mimořádně agresivní průběh s neovlivnitelnou progresí a letálním koncem. V typické maligní formě roste většinou rychle a má velkou tendenci me-

tastazovat - především do kostí, kostní dřeně, mízních uzlin a u nejmenších dětí (novorozenců a kojenců) do kůže a jater. V době stanovení diagnózy mají dvě třetiny pacientů detekovatelné metastázy (mnohdy jsou prvním příznakem nádoru) a více než polovina z nich má nepříznivou prognózu [2, 3].

Pacienti s nejpříznivější formou neuroblastomu jsou pouze sledováni v pravidelných intervalech po předchozí biopsii nádoru (část těchto nádorů samovolně regreduje nebo vyzraje v benigní formy) nebo léčeni pouze chirurgicky - radikálním odstraněním nádoru (bez adjuvantní chemoterapie) a mají nejlepší léčebné výsledky. U pacientů s neuroblastomem nejvyššího rizika je indikována nejintenzivnější chemoterapie, chirurgická léčba, megachemoterapie s autologní transplantací hematopoetických progenitorových buněk, radioterapie a bioterapie, přesto 60-70% pacientů umírá.

Proto jsou nezbytné další kroky k nalezení efektivnější léčby a zlepšení přežití pacientů s agresivní formou neuroblastomu. K tomu je potřeba přesného vyhodnocení rizika a stanovení prognostického stagingu. Také pochopení genetických změn a změněných molekulárních cest podporujících onkogenezi neuroblastomu je nezbytné k vytvoření nových účinnějších a méně toxických léčebných postupů. K průkazu takových změn využíváme řadu molekulárně biologických metod. [4]

Metody používané k průkazu genetických změn u neuroblastomu

Neuroblastom je jedním z prvních nádorů, kde byla prokázána amplifikace proto-onkogenu a její průkaz byl využit ve stratifikaci léčby [5, 6].

Cytogenetické nálezy získané u buněčných linií odvozených od agresivních neuroblastomů ukázaly přítomnost double minute chromatinových tělísek nebo homologně se barvící oblasti. Molekulární analýza odhalila, že se jedná o vysokou amplifikaci nového proto-onkogenu, který má vysoký stupeň homologie s dříve popsáním myc genem. Proto byl tento gen nazván N-myc [6, 7]. Významným nálezem bylo, že u neuroblastomových buněk, které mají amplifikaci N-myc onkogenu, často nalézáme také delecii 1p nebo nebalancovanou translokaci, která rovněž vede ke ztrátě oblasti 1p [8, 9]. Další vklad klasického cytogenetického vyšetření byl omezený, protože bylo obtížné získat kvalitní metafáze, a to především u nádorů, které neamplifikovaly N-myc onkogen. Nádory bez amplifikace N-myc reprezentují dvě třetiny všech neuroblastomů. Výhodou klasické cytogenetiky je možnost prokázat translokace, včetně translokací balancovaných. Přes všechna omezení je cytogenetické vyšetření v současné době velice využíváno, nejčastěji ve spojení s dalšími molekulárně biologickými postupy.

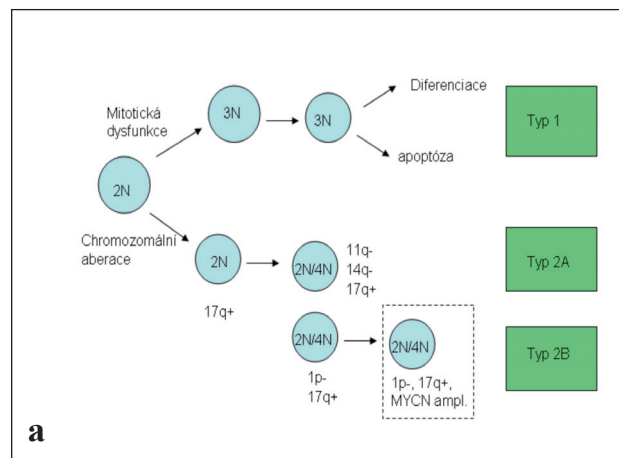
S rozvojem 24-colour M-FISH a SKY technik se toto vyšetření ještě zpřesnilo. Tato vyšetření prokázala gain 17q v četných buněčných liniích a ve vzorcích neuroblastomů vysokého rizika, často jako součást nebalancovaných translokací. Nejčastějšími partnery 17q byly oblasti 1p a 11q [10].

Zavedení fluorescenční in situ hybridizace (FISH) vedlo k přesnějšímu vyšetření většího množství neuroblastomů

a k novým poznatkům o genetických změnách u tohoto onemocnění, protože k této technice dostačují interfazická jádra a není tedy závislá na získání kvalitních mitóz. Užitečnost FISH je nejlépe možno dokumentovat na průkazu zmnožení celého chromozómu 17 nebo 17q, které jsou nejčastější genetickou změnou u neuroblastomu [11, 12]. FISH vyšetření je podle současných doporučení Evropské biologické skupiny neuroblastomu (ENAUQA) nezbytné pro průkaz amplifikace N-myc onkogenu, protože jako jediné z používaných technik umožňuje přesné posouzení počtu kopií sledovaného znaku v každém jádře. Při takovémto postupu jsme schopni zachytit amplifikaci N-myc onkogenu v ojediněle amplifikujících buňkách, ať už heterogenního nebo fokálního charakteru. Ty mohou tvořit jen velmi malou populaci mezi nádorovými buňkami. Stejně tak je FISH využívána v případech kdy nádorová populace tvoří méně jak 50% všech buněk nádoru.

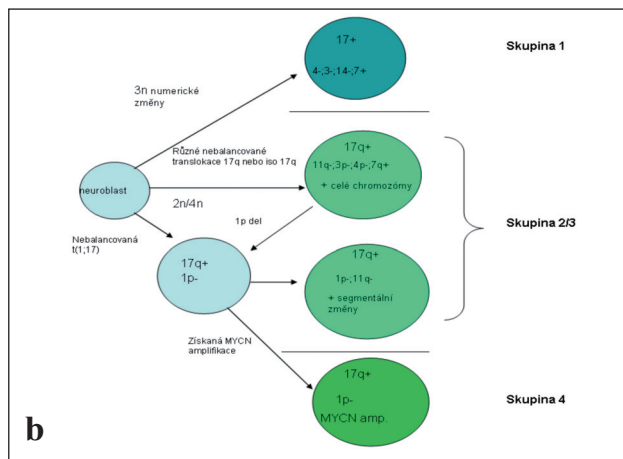
Komparativní genomová hybridizace (CGH) přinesla řadu nových poznatků u neuroblastomu. CGH umožnila rychle vyšetřit celý genom i tam, kde bylo neúspěšné cytogenetické vyšetření pro nesnadnost získat kvalitní mitózy. Výhodou je možnost využít k vyšetření zmražený nebo do parafinu zalitý materiál. Další analýza DNA získané z tkání neuroblastomů vedla k objevení významných genetických změn, které se u něho objevují častěji. Prokázaly se ztráty v oblastech, 3p, 11q, 14q případně 4p a zmnožení 17q [13-16].

Vyšetřením velkého množství nádorů byla získána data, na jejichž základě bylo možno rozdělit neuroblastomy do tří biologických podskupin. Příznivé, do které řadíme aneuploidní (nejčastěji triploidní) neuroblastomy, typické jsou změny celých chromozómů (ztráta chromozómu 3,4,9,11,14 a získ chromozómů 6,7,17,18) (podskupina 1). Další dvě skupiny jsou nepříznivé s delecí 11q a bez amplifikace N-myc onkogenu (podskupina 2A) nebo s amplifikací N-myc a delecí 1p36 (podskupina 2B). Zmnožení 17q je nejčastější změnou u podskupin 2A a 2B. Tato klasifikace byla ustanovena Broderem (obrázek č. 1a) [2]. Podobnou klasifikaci vytvořila Łastowska (obrázek č. 1b) [17].



Obrázek č. 1.: Rozdělení prognostických skupin neuroblastomu na základě prokázaných genetických změn Broder (2003)1a. Łastowska (2001) 1b.

přehled



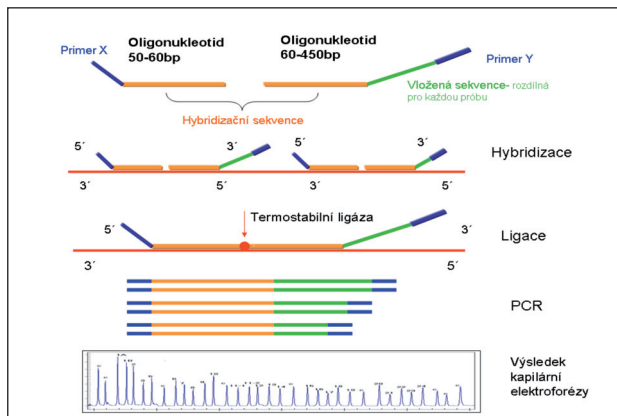
Ačkoli je CGH velice dobrá technika umožňující průkaz řady změn má také několik omezení. Jedná se o metodu, která je velice náročná časově, protože vyžaduje delší hybridizaci a následné karyotypické zpracování a vyhodnocení. Rozlišovací schopnost techniky je přibližně 10Mb pro rozlišení změny jedné kopie. CGH také neumožňuje průkaz balancovaných změn. [11, 18, 19].

Další technikou, která je v současnosti používána je array CGH (aCGH), jež mapuje genom pomocí hybridizace nádorové a kontrolní DNA k jednotlivým známým hybridizačním cílům, které tvoří krátké úseky DNA (reportér) přichycené ke skličku (podle typu reportérů rozdělujeme metody na BAC a oligonukleotidové). Tento postup odstranil karyotypování, zvýšil rozlišovací schopnosti této techniky a umožnil její všestrannější využití. Rozlišení u aCGH je dáno velikostí a počtem reportérů, které jsou použity při konstrukci metody. Celogenomové BAC metody mají rozlišení 1 Mb, ale i 100Kb. Můžeme však vybrat pouze námi sledovaný úsek (např. oblast 17q) a zde je možno dosáhnout podstatně vyššího rozlišení. Takto je například možné zkoumat místo zlomu u jednotlivých translokací, nebo koamplifikace jednotlivých genů. Podobně lze také využít oligonukleotidové metody, kde se množství reportérů pohybuje od 40 do 500 tisíc v jedné reakci, tak se dosáhne vyšší hustoty reportérů, mírnou nevýhodou je vyšší šum než u BAC metod. Metoda aCGH je rychlá a může poměrně detailně prokázat amplifikace, gain nebo delecce v celém genomu nebo podrobněji v jeho části. Širšímu využití této metody v klinické praxi brání především její finanční náročnost [20, 21].

V současné době je nově zaváděným postupem MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), která využívá multiplexové PCR reakce k vyšetření až 45 specifických sekvencí, jež jsou amplifikovány současně v jedné reakci s použitím stejného páru primerů. Její výhodou je, že vyžaduje pouze malé množství DNA (asi 20-500 ng ideálně pak 50-200 ng). Technika je založena na principu PCR. Specifita je zajištěna dvěma sondami, které hybridizují na DNA těsně vedle sebe a na jejich konci je vždy stejný pár primerů, které nejsou homologní s lidskou DNA. Následuje ligace sondy a multiplex-PCR. Velikost kompletní sondy určuje velikost PCR produktu. (obrázek č. 2)

Produkty amplifikace jsou detekovány prostřednictvím kapilární elektroforézy. Velikost fragmentů je 130-490bp. Porovnáním množství produktů zkoumaných a kontrol-

ních genů získáme informaci o počtu kopií sledovaného znaku. Tato analýza je provedena pomocí softwarového zpracování.



Obrázek č. 2.: Schématické znázornění MLPA techniky

MLPA nevyžaduje zkušenost s mikroskopováním, tak jako FISH, ani znalost karyotypování, které je nezbytné u CGH. MLPA je multigenomickou technikou, a proto je nutný výběr zkoumaných znaků.

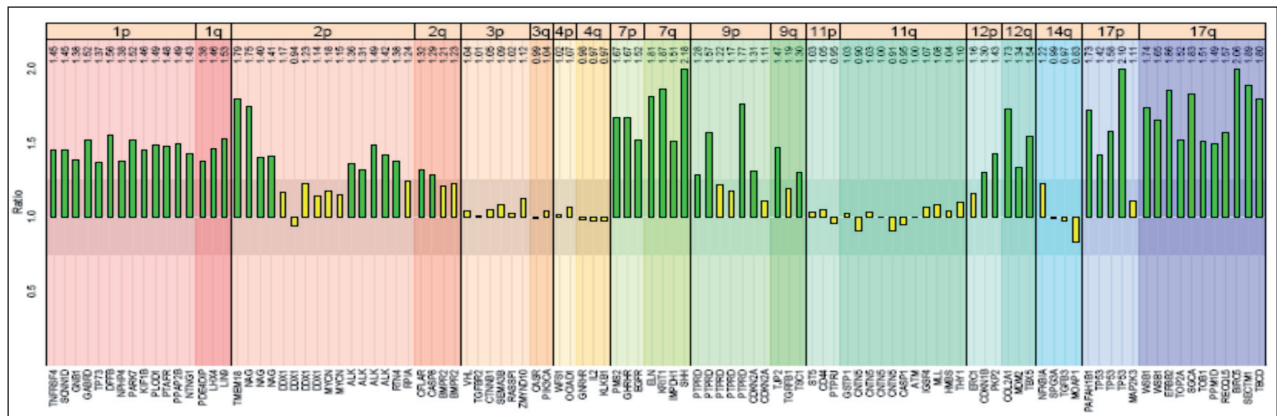
Pomocí této techniky lze prokázat nejenom delecce nebo amplifikace, ale také známé bodové mutace a metylace genů [22, 23]. Metoda však stejně jako CGH neumožňuje průkaz balancovaných změn. Rovněž je na jejím základě obtížné rozlišení delecce a imbalance.

U neuroblastomu používáme 3x 45 genů a jsme tak schopni obsáhnout oblast několika chromozómů. Toto vyšetření je možné uskutečnit během 2 dnů a jeho finanční náročnost je pouze 1500,-Kč. Je proto velice vhodné pro zařazení do rutinního provozu. Současný kit umožňuje vyšetření nejčastěji změněných oblastí u neuroblastomů, které mají, nebo mohou mít, prognostický význam (1p;1q;2p;2q3p;3q;4p;7p;7q;11p;11q;14p;14q;17p;17q). Vyšetření umožní zařadit pacienty do jednotlivých genetických typů na nízké (průkaz změn celých chromozómů), střední (přítomnost segmentárních změn např. gain 17q, del 11q) a vysoké riziko (amplifikace N-myc onkogenu a další přídavné změny), tak, jak bylo popsáno výše. (obrázek č. 3)

Závěr a diskuse

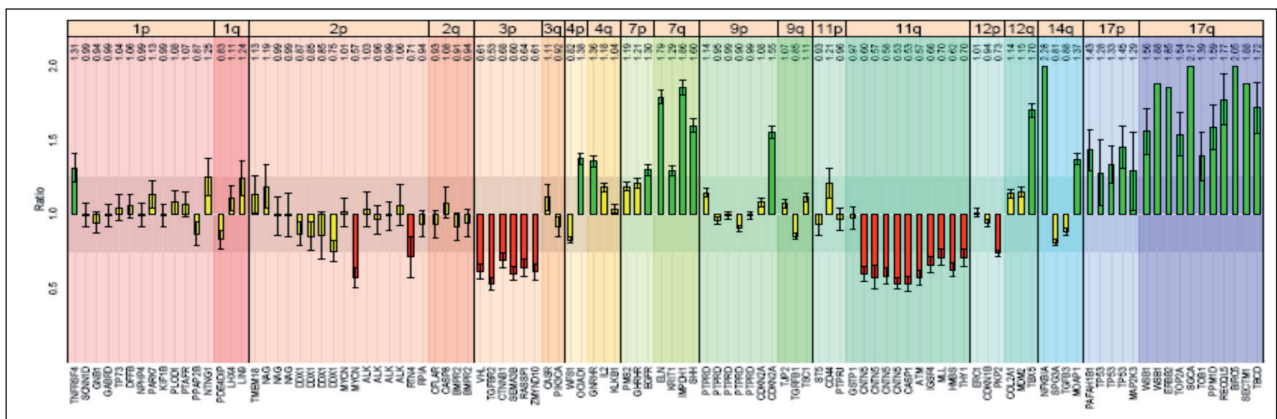
Práce využívající MLPA, FISH, CGH případně aCGH prokázaly dobrou shodu výsledků při jejich současném použití [24-26]. Všechny výše popsané metody lze proto s úspěchem využít pro průkaz genetických změn u neuroblastomu. Především proto, že převážná většina genetických změn (včetně změn určujících prognózu onemocnění) je nebalancovaných, a to včetně nalézáných translokací. V současné době neexistuje jedna technika, která by spojovala všechny výhody. Můžeme porovnat tyto metody z hlediska pracnosti, potřebného času, množství vyšetřených znaků a ceny vyšetření. Při porovnání náročnosti na zpracování, MLPA a aCGH je méně pracná než FISH a CGH. Podobně je tomu u časové náročnosti, kde nejdelší čas je nutný k CGH vyšetření, oproti tomu FISH, MLPA a aCGH je možno vyhodnotit za 2-3 dny. CGH a aCGH umožňují vyšetření celého genomu, naproti tomu MLPA pouze části chromozómů a FISH technika vyšetří 2-4 zna-

přehled

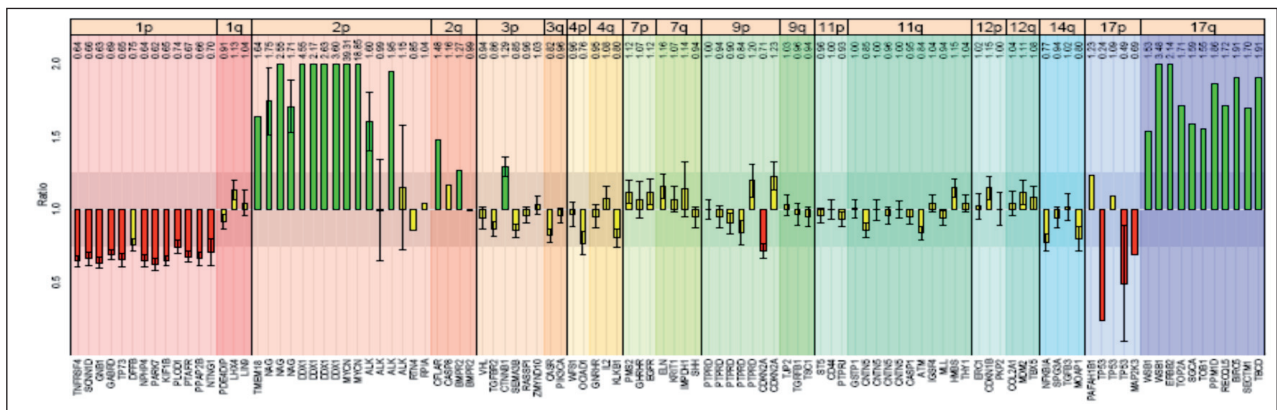


Obrázek č. 3: Vyšetření MLPA našich pacientů s neuroblastomem. Rozdělení do prognostických skupin podle Brodera (2003).

3a) Prognostická skupina 1. Jsou přítomny pouze změny celých chromozómů. Zmnožení chromozómů 1; 2; 9; 12; 17.



3b) Prognostická skupina 2A. Prokázali jsme segmentální změny bez amplifikace N-myc onkogenu, ale s delecí 11q. Delece 3p a 11q; zmnožení 7q, 17 a 17q.



3c) Prognostická skupina 2B, kde jsme našli segmentální změny a amplifikaci N-myc onkogenu. Delece 1p36; 17p, amplifikace N-myc onkogenu a zmnožení 17q.

technika	časová náročnost	směsná	množství znaků	cena
FISH	2 dny	ne	1-3 oblasti	nízká
CGH	4-5 dní	ano	pangenomická	střední
aCGH	2-3 dny	ano	pangenomická	vysoká
MLPA	2 dny	ano	multigenomická	nízká

Tabulka č. 1: Charakteristika metod používaných k průkazu genetických změn u neuroblastomu.

ky (tabulka č. 1). Problémem MLPA a všech směsných metod (tedy s výjimkou FISH) je množství nádorových buněk ve vzorku, kde hladinou spolehlivosti je 55-60% nádorových buněk. Je rovněž obtížnější vyhodnotit aneuploidní, především pak triploidní, nádory (např. obtížné rozlišení delecí a imbalance). Pomocí CGH, aCGH a MLPA jsme schopni prokazovat pouze nebalancované změny v genomu, neprokážeme tak balancované translokace. FISH techniku využíváme také tam, kde není možná jednoznačná interpretace jiných metod (MLPA, CGH), nebo nám malý počet nádorových buněk v nádoru neumožní použití směsných technik.

Evropská biologická skupina neuroblastomu (ENAUQA), jejímiž jsme členy, se podílela na vývoji a stále spolupracuje na zdokonalení MLPA kitu, který bude používán jako standart této skupiny. Tato standardizace umožní jednotné vyšetření stovek nádorů ve většině zemí Evropy. Jejich statistické vyhodnocení může přinést jednoznačné posouzení významu jednotlivých biologických znaků u neuroblastomu.

Naše první zkušenosti s touto technikou u 10 neuroblastomů jsou velmi povzbudivé a shoda mezi CGH a MLPA výsledky je okolo 90-95%. Výsledky vyšetření nejdůležitějších znaků (del 1p36, amplifikace N-myc onkogenu a gain 17q) pomocí FISH, CGH a MLPA byly ve všech případech shodné.

Projekt byl podpořen VZ FNM 00064203

Literatura:

1. Breslow N, McCann B, Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. *Cancer Res*, 1971; 31(12): 2098-103.
2. Brodeur GM, Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*, 2003; 3(3): 203-16.
3. Weinstein JL, Katzenstein HM, Cohn SL, Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist*, 2003; 8(3): 278-92.
4. Vicha A, Eckschlager T, Metody molekulárně cytogenetického vyšetření v klinické onkologii Praktický lékař, 2005; 85(7): 387-390.
5. Schwab M, Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol*, 1999; 9(4): 319-25.
6. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al., Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*, 1983; 305(5931): 245-8.
7. Alitalo K, Schwab M, Lin CC, et al., Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983; 80(6): 1707-11.
8. Brodeur GM, Sekhon G, Goldstein MN, Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer*, 1977; 40(5): 2256-63.
9. Maris JM, Weiss MJ, Guo C, et al., Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol*, 2000; 18(9): 1888-99.
10. Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Combaret V, et al., Combined 24-color karyotyping and comparative genomic hybridization analysis indicates predominant rearrangements of early replicating chromosome regions in neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003; 141(1): 32-42.
11. Plantaz D, Vandesompele J, Van Roy N, et al., Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer*, 2001; 91(5): 680-6.
12. Van Roy N, Laureys G, Cheng NC, et al., 1;17 translocations and other chromosome 17 rearrangements in human primary neuroblastoma tumors and cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, 1994; 10(2): 103-14.
13. Guo C, White PS, Hogarty MD, et al., Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol*, 2000; 35(6): 544-6.
14. Lastowska M, Viprey V, Santibanez-Koref M, et al., Identification of candidate genes involved in neuroblastoma progression by combining genomic and expression microarrays with survival data. *Oncogene*, 2007; 26(53): 7432-44.
15. Theobald M, Christiansen H, Schmidt A, et al., Sublocalization of putative tumor suppressor gene loci on chromosome arm 14q in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999; 26(1): 40-6.
16. Vicha A, Eckschlager T, Molekulární biologie neuroblastomu. *Klinická onkologie*, 2005; 18(5): 159-165.
17. Lastowska M, Cullinane C, Variend S, et al., Comprehensive genetic and histopathologic study reveals three types of neuroblastoma tumors. *J Clin Oncol*, 2001; 19(12): 3080-90.
18. Schleiermacher G, Michon J, Huon I, et al., Chromosomal CGH identifies patients with a higher risk of relapse in neuroblastoma without MYCN amplification. *Br J Cancer*, 2007; 97(2): 238-46.
19. Bednarek J, Vicha A, Jarosova M, et al., Characterization of drug-resistant neuroblastoma cell lines by comparative genomic hybridization. *Neoplasma*, 2005; 52(5): 415-9.
20. Johnson NA, Hamoudi RA, Ichimura K, et al., Application of array CGH on archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues including small numbers of microdissected cells. *Lab Invest*, 2006; 86(9): 968-78.
21. Michels E, Vandesompele J, Hoebeek J, et al., Genome wide measurement of DNA copy number changes in neuroblastoma: dissecting amplicons and mapping losses, gains and breakpoints. *Cytogenet Genome Res*, 2006; 115(3-4): 273-82.
22. Kurawski G, Suchy J, Lener M, et al., Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum including large rearrangements in HNPCC families from Poland (update study). *Clin Genet*, 2006; 69(1): 40-7.
23. Procter M, Chou LS, Tang W, et al., Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem*, 2006; 52(7): 1276-83.
24. Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, et al., Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. *Am J Hum Genet*, 2008; 82(3): 712-22.
25. Mensink HW, Kilic E, Vaarwater J, et al., Molecular cytogenetic analysis of archival uveal melanoma with known clinical outcome. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008; 181(2): 108-11.
26. Moerland E, van Hezik RL, van der Aa TC, et al., Detection of HER2 amplification in breast carcinomas: comparison of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) combined with automated spot counting. *Cell Oncol*, 2006; 28(4): 151-9.

Korespondenční adresa:
Vicha Aleš
Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a Fakultní nemocnice v Motole
V úvalu 84 Praha 5 Motol
e-mail: ales.vicha@lfmotol.cuni.cz
tel.: 604838959

Došlo / Submitted: 24. 4. 2008
Přijato / Accepted: 4. 7. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.