



BIOMEDICÍNSKÉ
CENTRUM

PÁTÁ VÝROČNÍ KONFERENCE BIOMEDICÍNSKÉHO CENTRA

6. ÚNORA 2020



Pátá výroční konference Biomedicínského centra



6. února 2020



LÉKAŘSKÁ FAKULTA
V PLZNI
Univerzita Karlova

U příležitosti Páté výroční konference Biomedicínského centra 6. února 2020 pro vlastní potřebu vydává Biomedicínské centrum Lékařské fakulty UK v Plzni. Projekt Biomedicínské centrum Lékařské fakulty v Plzni je spolufinancován z Národního programu udržitelnosti I č. LO1503 MŠMT. Jedná se o udržitelnost projektu OP VaVpl, PO 2 „Regionální VaV centra“, reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0076. Autoři fotografií: Libor Kočí, Kamil C. Suchánek. Biomedicínské centrum, alej Svobody 1655/76, 323 00 Plzeň; web: www.biomedic-plzen.cz; e-mail: info@biomedic-plzen.cz.

OBSAH

Seznam laboratoří Biomedicínského centra	5
Program páté výroční konference 6. 2. 2020	7
Úvod	9
Experimentální laboratoř intenzivní medicíny: Kapsaicin – nový vazopresor?	11
Laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii: Možnosti genové terapie v prevenci šíření antibiotické rezistence a léčbě infekčních nemocí	12
Laboratoř transplantace ledvin a náhrady funkce ledvin: Vztahy mezi CMV a BKV po transplantaci ledviny	13
Laboratoř experimentální kardiologie: Terapie mezenchymálními kmenovými buňkami v klinicky relevantním modelu sepse	14
Proteomická laboratoř: Proteiny adsorbované k polysulfonové hemodialyzační membráně během citrátové a heparinové antikoagulace	15
Laboratoř klinického výzkumu cévních a srdečních onemocnění: Liddleův syndrom – detekce nové mutace	16
Mitochondriální laboratoř: Vliv pohybové aktivity na mitochondriální funkce tkání a orgánů potkanů F-344 v pokročilém věku	17
Laboratoř laserové mikrodisekce: Analýza LCM vzorků pomocí kapilárního WB	19
Biofyzikální laboratoř: Rekapitulace činnosti biofyzikální laboratoře za r. 2019	20
Laboratoř neurodegenerativních poruch: Hipokampální mitochondriální dysfunkce a abnormální chování myšího modelu spinocerebelární ataxie 1	24
Laboratoř experimentální neurofyzologie: Poruchy zpracování neurální informace během spánku u modelů alzheimerovy choroby a generalizovaného zánětu	25
Laboratoř nádorové biologie a imunoterapie: Biologie nádorů v imunoterapii	27
Laboratoř farmakogenomiky: Využití NGS pro farmakogenomiku solidních nádorů	28
Laboratoř nádorové léčby a regenerace tkáně: Cesta k novým játrům	30
Laboratoř buněčné regenerativní medicíny: Od pokročilých náhrad kostí až na měsíc	31
Laboratoř studia interakcí buněk s materiálem: Hodnocení resorbovatelných kolagen- hydroxyapatitových nanovrstev s řízenou elucí antibiotik: porovnání kinetiky uvolňování, antimikrobiální aktivity a cytokompatibiliti	32
Laboratoř reprodukční medicíny: Vyléčíme choroby stáří už ve vajíčku?	34
Laboratoř kvantitativní histologie: Angiogeneze, hypoxie a remodelace stěny aneuryzmatu břišní aorty a další kvantitativní histologické studie v roce 2019	35
Laboratoř preklinických studií: Metoda dlouhodobé katetrizace jugulární žíly u prasete	36



SEZNAM LABORATOŘÍ BIOMEDICÍNSKÉHO CENTRA

Výzkumný program 1

Vedoucí

prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D.

1. **Experimentální laboratoř intenzivní medicíny** – prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D. 11
2. **Laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii** – doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D. 12
3. **Laboratoř transplantace ledvin a náhrady funkce ledvin** – doc. MUDr. Tomáš Reischig, Ph.D. 13
4. **Laboratoř experimentální kardiologie** – prof. MUDr. Milan Štengl, Ph.D. 14
5. **Proteomická laboratoř** – MUDr. Jan Mareš, Ph.D. 15
6. **Laboratoř klinického výzkumu cévních a srdečních onemocnění** – prof. MUDr. Jan Filipovský, CSc., Ph.D. 16
7. **Mitochondriální laboratoř** – doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D. 18
8. **Laboratoř laserové mikrodisekce** – doc. MUDr. Magdalena Chottová Dvořáková, Ph.D. 19
9. **Biofyzikální laboratoř** – MUDr. et MUDr. Jiří Beneš, Ph.D. 20
10. **Laboratoř všeobecné biochemie a hematologie** – prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.

Výzkumný program 2

Vedoucí

prof. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D.

11. **Laboratoř neurodegenerativních poruch** – doc. MUDr. Jan Cendelín, Ph.D. 24
12. **Laboratoř experimentální neurofyzologie** – MUDr. Karel Ježek, Ph.D. 26
13. **Laboratoř nádorové biologie a imunoterapie** – Mgr. Monika Holubová, Ph.D. 27
14. **Laboratoř farmakogenomiky** – doc. RNDr. Pavel Souček, CSc. 28
15. **Laboratoř nádorové léčby a regenerace tkáně** – doc. MUDr. Václav Liška, Ph.D. 30
16. **Laboratoř buněčné regenerativní medicíny** – Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D. 31
17. **Laboratoř studia interakcí buněk s materiálem** – doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D. 33
18. **Laboratoř reprodukční medicíny** – Ing. Jan Nevoral, Ph.D. 34
19. **Laboratoř kvantitativní histologie** – prof. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D. 35
20. **Laboratoř preklinických studií** – Ing. Pavel Klein, Ph.D. 36



PROGRAM PÁTÉ VÝROČNÍ KONFERENCE 6. 2. 2020

8:30–9:30 Zahájení konference			lab.	s.
8:30	Jindřich Fínek	Úvodní řeč		
8:40	Milan Štengl	Úspěchy Biomedicínského centra		
8:50	Jaroslav Hrabák	Biomedicínské centrum v číslech – výsledky a výzvy		
9:00	Khaled Ismail	UK to UK		
9:15	přestávka			
1. odborný blok (9:30–11:15) – Martin Matějovič, Milan Štengl				
9:30	Miriama Štiavnická	Vyléčíme choroby stáří už ve vajíčku?	18	34
9:45	Jaroslav Hrabák	Možnosti genové terapie v prevenci šíření antibiotické rezistence a léčbě infekčních nemocí	02	12
10:00	Martin Matějovič	Kapsaicin – nový vazopresor?	01	11
10:15	Milan Štengl	Terapie mezenchymálními kmenovými buňkami v klinicky relevantním modelu sepse	04	14
10:30	Jan Mareš	Proteiny adsorbované k polysulfonové hemodialyzační membráně během citrátové a heparinové antikoagulace	05	15
10:45	přestávka			
2. odborný blok (11:15–13:30) – Karel Ježek, Karel Blahna				
11:15	Václav Liška	Nová laboratoř translační genomiky nádorových onemocnění		
11:30	Václav Liška	Cesta k novým játrům	15	30
11:40	Filip Tichánek	Hipokampální mitochondriální dysfunkce a abnormální chování myšího modelu spinocerebelární ataxie 1	11	24
11:55	Karel Blahna	Poruchy zpracování neurální informace během spánku u modelů Alzheimerovy choroby a generalizovaného zánětu	12	25
12:10	Pavel Klein	Metoda dlouhodobé katetrizace jugulární žíly u prasete	20	36
12:25	Lucie Vištejnová	Od pokročilých náhrad kostí až na měsíc	16	31
12:40	přestávka na oběd			
3. odborný blok (13:30–15:15) – Tomáš Reischig, Pavel Souček				
13:30	Pavla Sauerová	Hodnocení resorbovatelných kolagen-hydroxyapatitových nanovrstev s řízenou elucí antibiotik: porovnání kinetiky uvolňování, antimikrobiální aktivity a cytokompatibility	17	32
13:45	Tomáš Reischig	Vztahy mezi CMV a BKV po transplantaci ledviny	03	13
14:00	Tereza Blassová	Angiogeneze, hypoxie a remodelace stěny aneurysmatu břišní aorty a další kvantitativní histologické studie v roce 2019	19	35
14:15	Pavel Souček	Využití NGS pro farmakogenomiku solidních nádorů	14	28
14:30	Monika Holubová	Biologie nádorů v imunoterapii	13	27
14:45	přestávka			
4. odborný blok (15:15–16:00) – Magdalena Chottová Dvořáková, Lukáš Bolek				
15:15	Shashank Pandey	Analýza LCM vzorků pomocí kapilárního WB	08	19
15:30	Štěpán Mareš	Liddleův syndrom – detekce nové mutace	06	16
15:45	Jiří Beneš	Rekapitulace činnosti Biofyzikální laboratoře	09	20



ÚVOD

Vážené kolegyně,
vážení kolegové,

opět se setkáváme na tradiční konferenci Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni. V loňském roce jsme poprvé uskutečnili konferenci ve zkouškovém období tak, aby se jí mohlo zúčastnit co nejvíce kolegů i studentů. Věříme, že i v letošním roce se tento model osvědčí.

Jak se ukázalo v minulých ročnících, je každoročně pořádaná konference Biomedicínského centra to nejlepší platformou, kde dochází k vzájemnému propojování výzkumu jednotlivých laboratoří. Jak víte, podařilo se nám v předchozích letech získat několik významných projektů, jako na příklad projekt FIND nebo AMTMI. Stejně jako končící Národní program udržitelnosti povedou tyto projekty zcela jistě ke zvyšování excelence našeho centra a jeho pevné ukotvení v oblasti výzkumu infekčních nemocí, experimentální chirurgii a neurovědách. Významným úspěchem bylo získání projektu ERA Chairs programu Horizont 2020 Evropské komise. Na pozici podporovanou tímto projektem se podařilo získat excelentního pracovníka v oblasti nádorové epidemiologie – prof. Kariho Hemminkiho, který se již do činnosti Biomedicínského centra zapojil.

Jak vidíte z programu konference a přiložených abstraktů, každý z týmů již prezentuje své nejlepší výsledky dosažené za předchozí období. Je potěšující, že řada z těchto výsledků již byla uplatněna v prestižních časopisech, případně vyústila v podané patentové přihlášky.

Všem účastníkům letošní konference Biomedicínského centra si dovoluujeme popřát inspirativní zážitky nejen během přednášek, ale také při kuloárních diskusích nad výsledky společného výzkumu.

prof. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.
vědecký ředitel

doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.
manažer



KAPSAICIN – NOVÝ VAZOPRESOR?

Jan Horák^{1,2}, Lukáš Nalos^{1,4}, Jan Beneš^{1,3}, Michala Peltanová^{1,3}, Václav Tégl^{1,3}, Milan Štengl^{1,4}, Martin Matějovič^{1,2}

¹Experimentální laboratoř intenzivní medicíny, Biomedicínské Centrum, LF UK v Plzni;
²I. interní klinika LF a FN Plzeň; ³KARIM LF a FN Plzeň; ⁴Ústav fyziologie LF UK v Plzni.

Vazoplegie je fenoménem doprovázejícím septický šok. Snížená rezistence cévní stěny spolu se zvýšením srdečního výdeje představuje klasickou sepsí indukovanou změnu krevního oběhu, která dílem přispívá k rozvoji a progresi multiorgánové dysfunkce v sepsi a významné mortalitě kriticky nemocných. Navzdory tendencím k „dekatecholaminizaci“ jednotek intenzivní péče, představuje kontinuálně podávaný noradrenalin první linii vazopresorické podpory. Eskalací dávky noradrenalinu při progredujícím šoku dochází k postupné ztrátě účinnosti tohoto katecholaminu a šok se stává refrakterním. Relativně úzké spektrum látek (agonisté vazopressinových receptorů – argipressin, terlipressin, agonista AT receptoru – angiotenzin II) je pak k dispozici v rámci léčby refrakterního šoku. Kapsaicin, alkaloid zodpovědný za pálivou chuť některých druhů paprik, a jeho syntetický analog nonivamid, představují látky s potenciálním vazopresorickým účinkem, jenž byl v minulosti demonstrován na myším modelu.

Efekt kontinuální aplikace kapsaicinu a nonivamidu byl evaluován na 24 anestetizovaných zvířatech rozdělených do 6 skupin zahrnujících kontrolní zvířata a zvířata s indukovanou progresivní peritoneální sepsí. Anestezovaná zvířata byla extenzivně hemodynamicky monitorována a dále v pravidelných šestihodinových intervalech probíhal odběr materiálu pro laboratorní analýzu.

Předběžná analýza základních hemodynamických parametrů v rámci pilotních experimentů přinesla pozitivní signál ve smyslu ovlivnění sepsí-indukovaných změn hemodynamiky při kontinuální aplikaci uvedených látek.

Povzbudivé výsledky naznačují existenci alternativních molekulárních mechanismů kontroly cévního tonu za stavů významné systémové inflamace a mohou být impulsem k vývoji nových non-katecholaminergních léčiv.

MOŽNOSTI GENOVÉ TERAPIE V PREVENCI ŠÍŘENÍ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE A LÉČBĚ INFEKČNÍCH NEMOCÍ

Hrabák J., Švec M.

Laboratoř antibiotické rezistence a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii,
Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta UK v Plzni, Ústav mikrobiologie, Lékařská
fakulta UK a Fakultní nemocnice v Plzni

Přijetí exogenní genetické informace buňkou je jedním ze základních kroků biotechnologie a genového inženýrství. Molekula nukleové kyseliny je do eukaryotické nebo prokaryotické buňky vnesena procesem zvaným transfekce (eukaryotické buňky), resp. horizontálním přenosem genetické informace (prokaryotické buňky). V případě prokaryotických buněk horizontální přenos genetické informace zahrnuje vnesení nukleové kyseliny metodou transformace, transdukce a konjugace. Především konjugace je významná pro šíření genů antibiotické rezistence v přirozených podmínkách. Genetická informace je do eukaryotických buněk a v některých případech i do prokaryot v podmínkách in vivo cíleně vnášena virem nebo nevírovými přenašeči. V případě virových vektorů se obvykle jedná o defektní partikule, neschopné samostatné replikace a tím i nekontrolovatelné replikace vnášené genetické informace. U eukaryot jsou obvykle využívány retroviry, adenoviry a herpes simplex viry. U prokaryot se jedná o bakteriofágy. Dalšími metodami jsou postupy fyzikální a chemické. Jako příklad fyzikálních metod lze jmenovat injektáž nukleové kyseliny pomocí jehly, balistickou metodu, která využívá k vnesení nukleové kyseliny obvykle zlatých nanočástic, sonoporaci, vnesení nukleových kyselin pomocí ultrazvuku, elektroporaci, fotoporaci prostřednictvím laseru, magnetickou, nebo hydroporaci. K efektivnímu průniku do buněk je dále využíváno spojení nukleové kyseliny a chemického nosiče (molekula/polymer), který umožní efektivní prostup negativně nabitě nukleové kyseliny přes cytoplasmatickou membránu. Mezi chemické nosiče patří anorganické částice (křemík, zlato, měď, stříbro, železo apod.), biologicky odbouratelné částice (kationtové lipidy, peptidové vektory) a polymery (polyetylenimin, polymetakrylát apod.). V naší laboratoři se poslední dva roky věnujeme vývoji nereplikativních genetických elementů, které by bylo možné využít především pro transformaci prokaryotických buněk a transfekci buněk eukaryotických. Cílem bylo vyvinout komplex nukleové kyseliny s transportní molekulou, který by bylo možné použít pro odstranění plazmidů nesoucích geny rezistence z bakteriální buňky (čeleď *Enterobacterales*). Dále jsme chtěli ověřit, zda lze zkonstruovat komplex, který by byl schopen usmrtit bakterii vnesením genu pro malý toxin. Podařilo se vyvinout strukturu, která splňuje podmínky stability vůči nukleázám a efektivně prostupuje přes buněčnou stěnu. V budoucnu se chceme dále věnovat na příklad ovlivnění virulence mikrobu a tím i jinému přístupu k léčbě bakteriálních infekcí.

VZTAHY MEZI CMV A BKV PO TRANSPLANTACI LEDVINY

Reischig^{1,2}, Kačer M^{1,2}, Hes O^{2,3}, Machová J^{1,2}, Němcová J², Lysák D^{2,4}, Jindra P^{2,4}, Pivořáčková K³, Bouda M^{1,2}

¹I. interní klinika, Lékařská fakulta UK v Plzni, Fakultní nemocnice Plzeň; ²Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta UK v Plzni; ³Šiklův ústav patologie, Lékařská fakulta UK v Plzni, Fakultní nemocnice Plzeň; ⁴Hematologicko-onkologické oddělení, Fakultní nemocnice Plzeň

Infekce polyomavirem BK je u pacientů po transplantaci ledviny příčinou polyomavirové nefropatie (PVAN), která vede k destrukci renálního parenchymu, inflamaci s následnou fibrózou a předčasnému selhání štěpu. Role cytomegalovirové (CMV) infekce a její prevence na výskyt BKV virémie a PVAN není dosud prozkoumána. V prospektivní studii jsme analyzovali 207 pacientů po transplantaci ledviny, kteří byli zahrnuti do dvou navazujících randomizovaných studií, které porovnávaly různé způsoby prevence CMV. U všech nemocných byla rutině monitorována CMV a BKV virémie pomocí PCR. Pacienti s funkčním štěpem podstoupili protokolární biopsii štěpu ve 3 letech k zhodnocení výskytu středně těžké a těžké intersticiální fibrózy s atrofií tubulů (IFTA). V rámci prevence CMV dostávalo 59 pacientů profylaxi valganciclovirem a 100 pacientů profylaxi valacyclovirem, 48 pacientů bylo vedeno pomocí preemptivní léčby. Incidence BKV virémie a PVAN ve 3 letech byla 28 % a 5 %. Tranzientní (<3 měsíce) BKV virémii mělo 70 % pacientů, zatímco perzistentní (≥3 měsíce) 30 %. Vysoká virová nálož (≥10,000 c/mL) byla detekována u 18 %, nízká nálož (<10,000 c/mL) u 61 %; u 21 % nebyla virová nálož stanovena. CMV DNAémie vznikla u 55 % a CMV nemoc u 6 % pacientů. Riziko vzniku BKV virémie (42 % vs. 23 % vs. 21 %, $P=0,006$) i PVAN (12 % vs. 2 % vs. 2 %, $P=0,011$) bylo signifikantně vyšší u pacientů léčených profylaxí valganciclovirem v porovnání s valacyclovirem nebo preemptivní léčbou. Multivariační analýza (Cox proportional hazard regression) potvrdila profylaxi valganciclovirem jako nezávislý prediktor vzniku BKV virémie ($HR=2,38$, $P=0,002$) a PVAN ($HR=4,73$, $P=0,026$). Naopak riziko vzniku BKV virémie po předchozí CMV DNAémii bylo sníženo ($HR=0,50$, $P=0,018$). Výskyt středně těžké nebo těžké IFTA byl výrazně zvýšen u pacientů s vysokou BKV virovou náloží (71 %; OR, 12,1; 95 % CI, 1,62–90,0; $P=0,015$) nebo perzistentní BKV virémií (67 %; OR, 6,33; 95 % CI, 1,19–33,7; $P=0,031$) s korespondujícím nárůstem histologického skóre intersticiální fibrózy + tubulární atrofie. Pouze pacienti s tranzientní BKV virémií s nízkou virovou náloží měli podobný výskyt a progresi IFTA jako skupina bez BKV virémie. V horizontu 5ti let bylo zhoršené přežívání štěpů prokázáno pouze u skupiny nemocných s PVAN. V souhrnu, naše data ukazují, že profylaxe valganciclovirem v rámci prevence CMV infekce může být spojena se zvýšeným rizikem vzniku BKV virémie a PVAN. CMV DNAémie nevede k nárůstu následné BKV virémie. Pouze tranzientní BKV virémie s nízkou virovou náloží je bezpečná z pohledu progresie fibrózy štěpu. Naopak perzistující BKV virémie nebo BKV virémie s vysokou virovou náloží je spojena s excesivním rizikem progresie fibrózy štěpu do pokročilých forem.

TERAPIE MEZENCHYMÁLNÍMI KMENOVÝMI BUŇKAMI V KLINICKY RELEVANTNÍM MODELU SEPSE

Jan Horák, Lukáš Nalos, Vendula Martínková, Václav Tégl, Lucie Vištejnová, Jitka Kuncová, Michaela Kohoutová, Dagmar Jarkovská, Jan Beneš, Milan Štengl, Martin Matějovič

Laboratoř experimentální kardiologie, Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta UK
v Plzni

Významný terapeutický potenciál mezenchymálních kmenových buněk (MSC) při sepsi byl opakovaně demonstrován ve studiích s experimentálními modely hlodavců. Tyto povzbudivé výsledky nebyly nicméně nikdy ověřeny na velkém zvířecím modelu s vyšší klinickou relevancí. V této studii jsme proto prozkoumali bezpečnost a účinnost léčby MSC odvozenými z kostní dřeně v klinicky relevantním modelu sepse navozené progresivní peritonitidou u prasete.

32 anestetizovaných, mechanicky ventilovaných prasat bylo náhodně rozděleno do 4 skupin po 8 zvířatech: 1) kontrolní skupina, 2) kontrolní skupina s aplikací MSC, 3) septická skupina a 4) septická skupina s aplikací MSC. Peritoneální sepse byla vyvolána inokulací kultivované autologní stolice. MSC (1×10^6 /kg) byly aplikovány nitrožilně 6 h po vyvolání sepse.

Parametry systémové, regionální a mikrovaskulární hemodynamiky, funkce různých orgánů, mitochondriální funkce, systémové imunitně-zánětlivé odpovědi a oxidativního stresu byly změřeny bezprostředně před a 12, 18 a 24 h po vyvolání peritonitidy. Podání MSC kontrolním zvířatům nevyvolalo žádné měřitelné akutní účinky. Podání MSC septickým zvířatům nedokázalo omezit sepsí navozené hemodynamické změny ani postupný nárůst skóre orgánového selhání (SOFA). Podání MSC nezabránilo rozvoji septické buněčné myokardiální deprese ani mitochondriální dysfunkce. MSC rovněž nedokázaly modulovat dysregulovanou imunitně-zánětlivou odpověď.

Intravenózní aplikace MSC odvozených z kostní dřeně zdravým zvířatům byla dobře tolerována. Nicméně, v klinicky relevantním modelu sepse na velkém zvířeti, podání MSC nedokázalo zvrátit ani omezit žádnou ze septických poruch na různých úrovních biologické složitosti (od organel po celý organismus).

PROTEINY ADSORBOVANÉ K POLYSULFONOVÉ HEMODIALYZAČNÍ MEMBRÁNĚ BĚHEM CITRÁTOVÉ A HEPARINOVÉ ANTIKOAGULACE

Mareš J, Tůma Z, Moravec J, Richtrová P, Matejovič M

I. interní klinika, Lékařská fakulta UK v Plzni

Cílem studie bylo pomocí proteomické analýzy biofilmu srovnat na molekulové úrovni účinky (resp. interakci mezi krví a dialyzační membránou) za podmínek regionální citrátové a systémové heparinové antikoagulace.

Deset pacientů podstupujících pravidelnou hemodialýzu bylo vyšetřeno ve zkříženém designu za podmínek dvou různých antikoagulačních režimů, tj. citrátové a heparinové antikoagulace a v režimu bez antikoagulace (kontrolní soubor). Na konci standardní hemodialyzační procedury (4 hodiny, polysulfonová dialyzační membrána) byly dialyzátory propláchnuty a povrchový biofilm byl uvolněn pomocí kyseliny octové. Proteinové složení výplachu bylo analyzováno za použití dvourozměrné gelové elektroforézy, rozložení proteinových frakcí bylo porovnáno mezi jednotlivými antikoagulačními režimy. Proteiny, v jejichž zastoupení byly zjištěny významné rozdíly byly identifikovány hmotnostní spektrometrií.

Citrátová antikoagulace byla provázena významně menší adsorpcí proteinů k dialyzační membráně v porovnání s heparinovou antikoagulací (2,2 [1,1–2,9] mg vs. 6,5 [2,9–11,6] mg, $P = 0,009$). Mezi proteiny, jejichž zastoupení se nejvíce lišilo, převládaly fragmenty α řetězce fibrinu s molekulovou hmotností menší než 40 kDa. U těchto fragmentů pak analýza aminokyselinové sekvence prokázala absenci zesíťování (cross-links). Naproti tomu heparinová antikoagulace zabránila adsorpci a štěpení několika proteinů s afinitou k heparinu, zejména faktoru komplementu FHR3, transportních proteinů pro růstový faktor IGFBP 2, 4 a 5, nebo chemerinu.

V porovnání s heparinem vede citrátová antikoagulace k menší adsorpci proteinů k dialyzační membráně a brání zesíťování fibrinového koagula. Selektivní adsorpční vlastnosti dialyzační membrány jsou významně ovlivněny režimem antikoagulace.

LIDDLEŮV SYNDROM – DETEKCE NOVÉ MUTACE

MUDr. Štěpán Mareš, Prof. MUDr. Jan Filipovský, CSc., doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.,
doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

II. Interní klinika, Lékařská fakulta UK v Plzni

Liddleův syndrom je dědičná forma arteriální hypertenze. Jedná se o vzácné onemocnění, nicméně prevalence bude patrně výrazně podhodnocena vzhledem k tomu, že pouze zlomek suspektních jedinců podstoupí genetické vyšetření a jsou vedeni pouze jako hypertenici rezistentní na terapii. Liddleův syndrom je způsoben mutací v genu pro epiteliální sodíkový kanál. Dochází k jeho zvýšené funkci, což vede k nadměrnému vstřebávání Na^+ zpět do krve, následné volumexpanzi a arteriální hypertenzi. Dalšími projevy bývají hypokalémie a nízká hladina aldosteronu. Tyto znaky však nejsou vždy vyjádřeny a navíc bývají ovlivněny léčbou, což dále ztěžuje diagnostiku. Protože nástup hypertenze je již v časném věku, dochází během života pacienta k brzkému orgánovému poškození a je tedy nutné začít co nejdříve s účinnou antihypertenzní léčbou. Tou je inhibitor epiteliálního sodíkového kanálu – amilorid. U většiny pacientů stačí ke kontrole vysokého krevního tlaku pouze monoterapie tímto lékem. Vyšetřili jsme suspektní rodinu ve třech generacích celkově o 13 probandech. U 7 jsme identifikovali dosud nepopsanou mutaci v genu *SCNN1B* způsobující vznik stop kodonu (Tyr604*). U 3 nejmladších asymptomatických členů rodiny potvrzení diagnózy Liddleova syndromu umožňuje zařazení do dispenzární péče a předejití následkům postupně se rozvíjející hypertenze.



VLIV POHYBOVÉ AKTIVITY NA MITOCHONDRIÁLNÍ FUNKCE TKÁNÍ A ORGÁNŮ POTKANŮ F-344 V POKROČILÉM VĚKU

Jan Jedlička^{1,2}, Jana Tůmová², Jitka Švíglerová^{1,3}, Dagmar Jarkovská^{1,3}, Annu Kala⁴, Karel Ježek^{4,5}, Milan Štengl^{1,3}, Jitka Kuncová^{1,2}

Lékařská fakulta UK v Plzni: ¹Ústav fyziologie; ²Mitochondriální laboratoř, Biomedicínské centrum; ³Laboratoř experimentální kardiologie, Biomedicínské centrum; ⁴Laboratoř experimentální neurofyziologie, Biomedicínské centrum; ⁵Ústav patologické fyziologie

Vliv fyzické zdatnosti na odolnost vůči zátěžovým situacím je diskutovaným tématem ve fyziologii i klinických disciplínách. Ve vyšším věku, kdy nemocnost populace prudce stoupá, může být zahájení pravidelného cvičení obtížné z důvodů omezené pohyblivosti, přidružených chorob i nejasného benefitu. S celkovou fyzickou zdatností úzce souvisí schopnost mitochondrií produkovat biologicky dostupnou energii ve formě ATP. Mnoha studiemi již bylo potvrzeno, že pravidelným cvičením kapacita mitochondriálního respiračního systému v kosterním svalu stoupá, méně je známo o vlivu pravidelného cvičení na mitochondriální funkce parenchymatózních orgánů, zejména ve vyšším věku.

Cílem naší práce bylo zjistit vliv pravidelného cvičení na mitochondriální respiraci různých tkání a orgánů potkana kmene F-344 v pokročilém věku 24 měsíců. Po týdenní adaptaci na běhací pás byli samci i samice podrobeni zátěžovému testu, kde byla zjišťována maximální rychlost, ve které zvíře vydrží 3 minuty. Po rozdělení pokusných zvířat do 4 skupin po 10 jedincích (samci a samice bez dodatekové fyzické námahy – MS a FS, samci a samice v tréninku – MT a FT) byli MT a FT potkani podrobeni chronické zátěži odpovídající 60 % maximální rychlosti, která trvala 4 týdny, vždy 5 dní v týdnu po 25 minutách. U skupin MT a FT byl opět proveden zátěžový test, v dalším dnu byla zvířatům v anestezii zaznamenána křivka EKG a následně byla šetrně usmrcena. Svalovina levé a pravé komory byla použita pro elektrofyziologická měření a analýzu mitochondriální respirace, která byla provedena také v hipokampu, mozečku, kosterním svalu, kůře ledvin, játrech a izolovaných trombocytech. Spotřeba kyslíku byla stanovena pomocí standardizovaných titračních protokolů na oxygrafech Oroboros O2k (Oroboros, Rakousko) tak, aby odpovídaly metabolické aktivitě dané tkáně v klasických respiračních stavech tj. LEAK (stav nutný k udržení membránového potenciálu), OXPHOS (kapacita oxidativní fosforylace při aktivaci komplexů I a II u vzorků z hipokampu a mozečku, případně flavoproteinu přenášejícího elektrony z metabolismu mastných kyselin a komplexů I a II u vzorků z kosterního a srdečního svalu, jater a ledvin), ETSC (kapacita elektrontransportního systému) a ROX (reziduální spotřeba kyslíku). Na izolované trombocyty byl aplikován titrační protokol pro intaktní buňky, tj. měření bazální respirace, stavu LEAK po aplikaci oligomycinu, ETSC po injekci rozpřahovače FCCP do komor oxygrafu a ROX po přidání antimycinu A.

Pravidelná fyzická zátěž neměla statisticky významný vliv na zdatnost experimentálních zvířat, u samic neovlivnila žádný z měřených respiračních parametrů v žádném orgánu, ani v trombocytech, kromě tzv. respirační rezervy destiček, tj. rozdílu ETSC a bazální respirace, která u samic po tréninku signifikantně vzrostla. U samců došlo do-

konce ke statisticky významnému poklesu mitochondriální spotřeby kyslíku v obou srdečních komorách a v játrech, v intaktních trombocytech signifikantně vzrostly bazální respirace a stav LEAK, takže spotřeba kyslíku odpovídající produkci ATP se významně nezměnila. Trombocytární respirační parametry nekorelovaly s mitochondriální spotřebou kyslíku v analyzovaných tkáních.

Naše studie ukázala, že ve vysokém věku nemusí mít pravidelná fyzická zátěž blahodárný vliv na mitochondriální kondici přičně pruhované svaloviny, mozkové tkáně a vnitřních orgánů. Pro stanovení typu a velikosti zátěže, která by případně měla v pokročilém věku pozitivní vliv na bioenergetiku tkání, je zapotřebí provést další experimenty, které by případnou intenzitu „cvičení“ lépe přizpůsobily individuálním podmínkám stárnoucího organismu. Nízká korelace mezi mitochondriální aktivitou trombocytů a zkoumaných tkání nesvědčí pro možnost využití trombocytů k odhadu bioenergetické situace vnitřních orgánů.

Práce byla podpořena Programem rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy (PROGRES – projekt Q39), projektem Specifického vysokoškolského výzkumu Univerzity Karlovy č. 260394, projektem CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787, Centrum výzkumu infekčních onemocnění, uděleného MŠMT ČR, financovaného z EFRR, Národním programem udržitelnosti I č. LO1503 poskytovaným Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy.



ANALÝZA LCM VZORKŮ POMOCÍ KAPILÁRNÍHO WB

Pandey S.^{1,2}, Tůma Z.¹, Šmrhová T.², Pešta M.³, Chottová Dvořáková M.^{1,2}

Lékařská fakulta UK v Plzni: ¹Biomedicínské Centrum; ²Ústav fyziologie; ³Ústav biologie.

Mikrodisekce za pomoci laseru (LCM) v kombinaci s genomickou, transkriptomickou nebo proteomickou analýzou je výkonným nástrojem studia buněčných subpopulací nebo jednotlivých buněk heterogenních tkání. Mohou tak být zjištěny informace makrodisekcí nedosažitelné. Metodika použitá při vlastním zpracování izolovaných vzorků je rozhodující pro získání kvalitních informací. Hlavními překážkami je především malé množství vzorku a víceetapové zpracování, ale také riziko vzniku chyby v každém kroku. Hlavním cílem této studie je integrovat proteomickou analýzu - automatizovaný kapilární western blotový přístroj (capWB) s LCM pro získání hlubších, senzitivnějších a reprodukovatelnějších informací o prostorově definovaných regionech. Integrace LCM-capWB tedy nejen poskytne jedinečnou platformu pro analýzu proteomických informací o konkrétním typu buněk, ale navíc může pomoci pochopit patofyziologické procesy probíhající v různých buňkách v souvislosti s různými patologickými stavy, protože umožňuje analýzu dysregulace proteinů.

Při realizaci tohoto projektu jsme postupovali v následujících krocích: a) Standardizace capWB pomocí LCM vzorků různých velikostí. b) Odhad limitu kvantifikace (LOQ) pro vzorky LCM na capWB. c) Optimalizace capWB s použitím protilátky anti β -aktinu a vzorku LCM o velikosti 0,5 mm². d) Multiplexování na LCM vzorku s použitím anti β -aktinu v kombinaci s dalšími protilátkami.

Zjistili jsme, že optimalizovaná metoda pro stanovení bílkoviny β -aktinu prostřednictvím capWB s různou velikostí vzorků LCM, a to konkrétně 0,5 mm², 0,25 mm² a 0,125 mm², vykazovala linearitu s koeficientem variability (CV), který byl 17,7 %, 20 % a 29 %, resp.

Pro stanovení LOQ byly analyzovány LCM vzorky získané z tkáňového řezu ledviny laboratorního potkana tloušťky 10 μ m o ploše 0,5 mm², 0,25 mm², 0,125 mm² a 0,062 mm². Při následné analýze jsme použili jednak protilátku proti β -aktinu (vysoce zastoupený protein) a dále protilátku proti proteinům asociovaným s mikrotubuly 1A/1B proteinu 3A lehkého řetězce (LC3AB; nízko zastoupený protein). Minimální velikost LCM vzorku potřebná pro analýzu za pomoci capWB je 0,125 mm², avšak nejnižší CV bylo získáno pro vzorek o velikosti 0,5 mm². Následně jsme porovnali výsledky z capWB a tradičního WB a také jsme za pomoci protilátek proti β -aktinu, PCK-2, VDAC2, GABT či koktejlu subcelulárních organel zkoumali a poté potvrdili možnost analýzy proteinů o různé molekulové hmotnosti v jedné kapiláře capWB.

Námi vypracovaná metodika integrace LCM a capWB je oproti konvenčnímu WB méně pracná, rychlejší, robustnější, vysoce reprodukovatelná a citlivá. Navíc umožňuje stanovit více než jeden protein v jedné kapiláře, což dále zvyšuje efektivitu, ale i využitelnost capWB. Námi popsaná metodologie byla použita pro tkáňové řezy ledvin, ale stejný postup může být použit pro řadu dalších typů tkání. Podařilo se vytvořit metodiku, která umožňuje efektivně analyzovat, prostřednictvím capWB, vzorky získané za pomoci LCM.

REKAPITULACE ČINNOSTI BIOFYZIKÁLNÍ LABORATOŘE ZA R. 2019

Bolek L^{1,2}, Dejmek J^{1,2}, Kuncová J², Růžicka J^{1,2}, Beneš J^{1,2}

¹Biofyzikální laboratoř, Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta UK v Plzni; ²Ústav biofyziky, Lékařská fakulta UK v Plzni

Sekce – Mimetelní okruhy

Vývoj konstrukcí mimetelních okruhů a jejich použití v experimentech probíhaly v úzké spolupráci s týmem Laboratoře nádorové léčby a experimentální medicíny doc. Lišky

V roce 2019 proběhlo 8 pilotních experimentů v rámci hodnocení metody způsobu snížení srážlivosti krve v okruhu přístroje pro náhradu funkce ledvin. Experimenty nadále probíhaly s již plně standardizovaným operačním setem, operačním postupem, anestezií a zpracováním biochemických a hematologických vzorků. Dvě třetiny získaných dat z analýz odebraných vzorků byly prvotně zpracovány a výsledky konzultovány s doc. Kuncovou a doc. Benešem. Z výsledků diskuze pak vyšel plán dalšího zpracování dat v r. 2020.

V rámci spolupráce s týmem doc. Lišky jsme upravili, doplnili a úspěšně odzkoušeli novou variantu okruhu pro podporu krevního oběhu při provádění transplantace jater. V r. 2019 jsme ji použili při každé proběhlé transplantaci, kterých bylo dvacet.

V r. 2019 jsme též provedli úpravu a doplnění speciálního setu pro decelularizaci jater opět pro tým doc. Lišky. Obdobně jako výše jsme se pokaždé zúčastnili probíhajících decelularizací s tím, že jsme celý systém obsluhovali.

Všechny sety (desítky) jsme pro potřebu experimentů vyráběli sami a zajišťovali také veškerou logistiku s tím spojenou. Zároveň jsme k experimentům přivedli dva nové studenty fakulty. Též jsme prováděli zaškolování členů chirurgického týmu pro práci se sety na operačním sále.

Pro zjednodušení řízení setů a sběru dat z nich jsme započali s vývojem univerzální biokonzole s řadou programovatelných řídicích a měřicích funkcí.

Sekce – Mikrohyperbarie

Tkáňová laboratoř na ústavu Biofyziky byla oproti plánu (z důvodu zpoždění a komplikací s VŘ) dokončena až v listopadu 2019. Z tohoto důvodu nebylo možné provést původně plánované experimenty uvedené v cílech výzkumu pro r. 2019. Po zprovoznění laboratoře koncem roku proběhli úspěšné pilotní pokusy a přípravou lidských svalových buněk kosterního svalstva pro testování metabolických intervencí na jejich respiraci.

Sekce – Hyperbarie

V roce 2019 byla doplněna zvířata (3 jedinci) v pokusu ve schváleném výzkumu vliv HBO na hojení rány u ZDF potkana. Stávající počet nyní umožňuje statistické hodnocení. Data jsou doplňována na histologii, zbývá doplnit imunochemii ze zamražené

plazmy. Po publikaci neplánujeme v této větví výzkumu prozatím pokračovat, z důvodu dalších aktivit.

Hyperbarická komora byla v r. 2019 technicky doplněna o systém sledování koncentrace oxidu uhelnatého. Tuto adaptaci budeme v r. 2020 testovat a zprovozňovat s pilotními zvířaty tak, aby bylo možné domluvit a začít s experimenty ve spolupráci s neurofyziology BC (vliv otravy CO na činnost VNC a studované procesy paměti.).

Další aktivity

- Podána 3 oznámení objevu a vynálezu, vedením LF všechna schválena k postoupení k ochraně cestou užitého vzoru, národního patentu a mezinárodní patentové přihlášky PCT.
- Ing. Jiří Dejmeck zpracoval za tým projektovou žádost do výzvy GAMA TAČR s názvem: „Modular Scaffold System“ a předložil na UK k hodnocení.
- MUDr. Lukáš Bolek se stal odborným hodnotitelem TAČR.
- Aktivní účast na konferencích XLII Dny lékařské biofyziky, Sborník abstrakt, Kolín, 29.5. – 31.5.2019 a XXIII. Kongres České společnosti hyperbarické a letecké medicíny – celkem 4 příspěvky.

Studie byla financována z Národního programu udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy. Podpořeno Programem rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy (Progres Q39). Podpořeno projektem Centrum klinické a experimentální jaterní chirurgie UNCE/MED/006. Podpořeno projektem Centrem výzkumu infekčních onemocnění CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787.







HIPOKAMPÁLNÍ MITOCHONDRIÁLNÍ DYSFUNKCE A ABNORMÁLNÍ CHOVÁNÍ MYŠÍHO MODELU SPINOCEREBELÁRNÍ ATAXIE 1

Filip Tichánek^{1,2}, Martina Šalomová^{1,2}, Jan Jedlička^{3,4}, Jitka Kuncová^{3,4}, Pavel Pitule⁵,
Tereza Macanová⁶, Zuzana Petránková¹, Zdeněk Tůma⁷, Jan Cendelín^{1,2}

Lékařská fakulta UK v Plzni: ¹Ústav patologické fyziologie; ²Laboratoř neurodegenerativních poruch, Biomedicínské centrum; ³Ústav fyziologie;
⁴Mitochondriální laboratoř, Biomedicínské centrum; ⁵Laboratoř nádorové biologie, Biomedicínské centrum; ⁶Ústav biologie; ⁷Proteomická laboratoř, Biomedicínské centrum.

Spinocerebelární ataxie typu 1 (SCA1) je dosud neléčitelné neurodegenerativní onemocnění způsobené mutací genu kódujícího protein Ataxin-1. Přestože je mutovaný gen exprimován v mozku difúzně, onemocnění je spojené zejména s degenerací mozečku a souvisejícím narušením hybnosti. Mnoho pacientů ale trpí i různými psychiatrickými obtížemi, zejména depresemi, apatií a narušením paměti. Dosud ale není jasné, do jaké míry jsou tyto psychiatrické potíže způsobeny přímo neuropatologií mozečku či jiných oblastí CNS, a do jaké míry jsou spíše psychologickou reakcí na krutou diagnózu a progresivně se zhoršující hybnost.

V prezentované studii jsme se zaměřili na chování myšího transgenního (*knock-in*) modelu lidské SCA1. Zjistili jsme, že SCA1 myši vykazují řadu dosud nepopsaných abnormalit v chování, které jsou analogické psychiatrickým obtížím lidských pacientů. Výrazné bylo zejména „úzkostné“ a „depresivní“ chování, zhoršená schopnost inhibovat úlekovou reakci na předvídatelný stimulus a narušená kognitivní flexibilita. Tyto abnormality se překvapivě vynořily v mladším věku než narušení pohyblivosti. SCA1 myši měly navíc snížený objem hipokampu, struktury mozku klíčové pro emoce, paměť a kognitivní flexibilitu. Hipokampální atrofie předcházela mozečkové degeneraci a byla spojená s menším počtem neuronů, sníženou neuroplasticitou, poklesem hladiny trofického faktoru BDNF a dramaticky poškozenou neurogenézí, tj. schopností hipokampu produkovat nové neurony. Hipokampální atrofie navíc přímo odrážela individuální míru některých abnormalit v chování, zejména „depresivního“ chování a kognitivní flexibility. Mitochondriální respirometrie navíc ukázala výraznou mitochondriální dysfunkci v hipokampu SCA1 myší, ale překvapivě ne v jejich mozečku.

Ve světle těchto poznatků se SCA1 jeví jako velmi komplexní neurodegenerativní onemocnění zahrnující i komponentu ne-motorických postižení, která jsou zcela nezávislá na mozečkové degeneraci a ztrátě pohyblivosti. Naše výsledky zároveň naznačují, že by stimulace mitochondriálních funkcí a/nebo zvyšování hladin trofických faktorů v hipokampu mohly představovat novou nadějnou cestu ve výzkumu terapie některých funkčních postiženích u SCA1.

Práce byla podpořena projektem grantem GAUK č. 652217, NPU I č. LO1503 MŠMT, PROGRES – projekt Q39, projektem SVV č. 260 394 a projektem CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787, Centrum výzkumu infekčních onemocnění, uděleného MŠMT, financovaného z EFRR.

PORUCHY ZPRACOVÁNÍ NEURÁLNÍ INFORMACE BĚHEM SPÁNKU U MODELŮ ALZHEIMEROVY CHOROBY A GENERALIZOVANÉHO ZÁNĚTU

Karel Blahna, Karel Ježek

Laboratoř experimentální neurofyzologie, Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta UK v Plzni.

Jedním z cílů pracoviště je hlubší pochopení mechanismů spánku u zdravého nebo funkčně poškozeného mozku. Soustředujeme se na studium spánkové dynamiky, jež má kauzální vztah k vyšším kognitivním funkcím, zejména k procesům uchování a opětovnému vybavení epizodické paměti. Naše pozornost směřuje zejména k popisu narušené spánkové dynamiky u vybraných patofyziologických stavů, jako je Alzheimerova choroba, schizofrenie a sepsy.

Pro efektivní fungování mozku, ale i imunitního systému nebo metabolismu, je zcela zásadní udržování správné choreografie spánku. Ta je obvykle strukturována pomocí metodám elektroencefalografie a elektromyografie na alternující fáze hlubokého spánku NREM (Non- Rapid Eye Movement) s typickým výskytem pomalých vln a REM (Rapid Eye Movement), jež se svým charakterem podobá stavu bdělosti a je doprovázen relaxací kosterního svalstva a pohybem očních bulbů.

Nově naučená informace je ve spánku aktivně zpracovávána coby součást procesu konsolidace, a to odlišným způsobem v NREM a REM fázi. V současné době lze přímo kvantifikovat tzv. spánkové biomarkery konsolidace paměťové stopy rozpoznatelné z typického charakteru populačního chování velké skupiny neuronů. Tyto krátkodobé epizody synchronie, nazývané jako Sharp Wave Ripples (SWR) byly nejprve objeveny v hipokampu během NREM fáze spánku, ale později byly popsány i za klidového stavu v průběhu bdění. Neuronovou aktivitu během SWR lze detekovat, dekodovat a následně lze studovat její informační obsah.

V posledních dvou letech se intenzivně věnujeme studiu struktury spánku a dynamiky konsolidace paměťové stopy v hipokampu u transgenního potkaního modelu Alzheimerovy choroby TgF344 AD. Z našich měření je zřejmá narušená struktura spánku u starých zvířat (12–18 měsíců) bez ohledu na to, zda je přítomna mutace nesoucí pozitivitu genu zvyšujícího produkci amyloidu beta či nikoliv. Kvantitativní EEG měření vlastností SWR rovněž neukázalo významné rozdíly mezi experimentálními TgF344 AD + a kontrolními TgF344 AD - skupinami zvířat. Hlavním předmětem našeho zájmu však bylo studovat populační neuronovou dynamiku, jež by poodhalila schopnost vybraných mozkových struktur plasticky kódovat nové informační vstupy v porovnání se starými. Naše dosavadní analýzy ukazují na stejnou úroveň reaktivace kódující novou a dlouhodobou paměť u starých TgF344 AD +/- zvířat v porovnání s mladšími jedinci (6 -9 měsíců) TgF344 AD +/- , kde podle očekávání sledujeme výraznou převahu reaktivity pro recentní paměť oproti paměti dlouhodobé.

Podobná úroveň kódování informací rozdílného stáří v hipokampové neuronové síti u starých TgF344 AD +/- zvířat nás přivedla k myšlence vzájemně porovnat vzorce neuronové aktivity napříč několika spánkovými epizodami. Výsledky těchto analýz

překvapivě ukázaly u starých TgF344 AD + zvířat na poměrně vysokou homogenitu neuronové populační aktivity zaznamenané z několika nezávislých spánkových epizod, jež obvykle následovaly po odlišných behaviorálních úlohách. Ostatní skupiny, tzn. TgF344 AD - stará zvířata nebo TgF344 AD+/- mladá zvířata naopak vykazovala výraznější heterogenitu mezi jednotlivými spánky. Tento výsledek poukazuje na výrazně rigidní stav neuronové sítě starých TgF344 AD + zvířat, jež zřejmě plasticky neodpovídá na měnící se informační vstupy, ale spíše vykazuje stereotypní vzorce aktivity.

V projektu dedikovaném struktuře spánku u lipopolysacharidového modelu generalizovaného zánětu u laboratorního potkana v celkové anestezii jsme zjistili, že po indukci zánětu se výrazně mění stabilita jednotlivých REM a NREM period. Zatímco za normálních okolností jsou jednotlivá stadia obvykle stabilní po dobu až několika desítek minut, při generalizovaném zánětu délka period klesá na úroveň sekund či max. minut. Vnitřní kinetika obou stavů pak ukazuje další odlišnosti od fyziologických hodnot. Tyto výsledky směřují k pochopení mechanismů vedoucích k významnému kognitivního deficitu u množství pacientů přeživších generalizovaný zánět např. v souvislosti se sepsí. V dalším horizontu budeme usilovat o zavedení modelu sepse s přežitím a o navržení intervenčních metod normalizujících spánkovou dynamiku s perspektivou zlepšení kognitivní prognózy lidských pacientů.



BIOLOGIE NÁDORŮ V IMUNOTERAPII

Holubová M.¹, Ostašov P.¹, Pitule P.¹, Machová I.¹, Čedíková M.^{1,2}, Klieber R.^{1,3},
Macečková D.^{1,3}, Navvabi N.^{1,2}, Jindra P.⁴ a Lysák D.⁴

Lékařská fakulta UK v Plzni: ¹Biomedicinské centrum; ²Ústav fyziologie; ³Ústav histologie a embryologie. ⁴Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň.

Imunoterapie představuje rozvíjející se obor v onkologické problematice a stává se součástí běžně zavedených terapeutických modalit. Vedle protilátkové terapie se v současné době začíná používat také buněčná imunoterapie pomocí imunokompetentních buněk. Ty se dají využít jednak na podporu protinádorové odpovědi (např. iNKT) anebo se využívá jejich přímá schopnost zabíjet nádorové buňky (př. NK buňky).

Nádorové buňky si vyvinuly mnohé mechanismy úniku imunitnímu dozoru a proto je pro optimální fungování buněčné imunoterapie nejprve potřeba senzibilizovat nádorové buňky. Toho se dá dosáhnout běžně dostupnými prostředky, jako je např. chemoterapie, která dokáže navodit up-regulaci stres-asociovaných molekul, což jsou ligandy pro aktivační receptory NK buněk či cytotoxických T-lymfocytů (Tc) (především NKG2D receptor se schopností silné stimulace protinádorové imunitní reakce). Do této skupiny patří proteiny MICA, MICB, které se váží na NKG2D receptor, který má schopnost výrazné aktivace NK či Tc buněk. Tento postup je využíván například při imunoterapii akutní myeloidní leukemii pomocí NK buněk, kde aplikace chemoterapie podporuje cytotoxický potenciál NK buněk. Pozitivní signalizace AML buněk pro aktivaci NK buněk je také způsobena dalším stres-asociovaným proteinem zvaným kalretikulin, jehož vysoká exprese zvyšuje přirozenou protinádorovou imunitu a zlepšuje vyhlídky pacientů s AML. Příčiny rozdílné expresní hladiny kalretikulinu u AML buněk prozatím nejsou známy. Jednou z teorií je vliv alternativního sestřihu, který stojí za vznikem různých proteinových izoform, které nemusí být na povrchu buněk expri-mované/detekovatelné. Alternativní sestřih má také mnohdy za následek rezistenci buněk na chemoterapii či únik imunitnímu dozoru.

Buněčná imunoterapie má v onkologické problematice neodmyslitelný význam, nicméně stále nejsou vyřešeny všechna její úskalí. Jedním z hlavních problémů je včasná aplikace buněk. U mnohých pacientů je nádorová masa detekována až v pokročilejším stádiu, kde má již imunoterapie značnou početní nevýhodu, a zároveň je již v nádorovém ložisku vytvořeno silně imunosupresivní prostředí obsahující jak protizánětlivé buňky a cytokiny, tak nádor asociované buňky se schopností modulovat imunitní systém, jako např. mesenchymální kmenové buňky. Časnému zachytu, a tedy efektivnějšímu využití buněčné imunoterapie, by v budoucnu mohly pomoci nové diagnostické metody, jako jsou biopsie využívající tekutou složku krve (plasma, sérum) ke zjištění přítomnosti a kinetiky nádor-asociovaných molekul. Tyto metody umožní sledovat chování nádoru v průběhu terapie a zároveň včasné zachytit případný relaps onemocnění.

Studium nádorových buněk, a to z hlediska jejich příčiny vzniku či chování, hledání mechanismů umožňujících zvýšení účinnosti imunoterapeutického zásahu a zlepšení detekčních metod se schopností včasného odhalení nádorového bujení, může významně ovlivnit prognózu onkologických pacientů a zvýšit relapse-free přežívání.

VYUŽITÍ NGS PRO FARMAKOGENOMIKU SOLIDNÍCH NÁDORŮ

Viktor Hlaváč^{1,2}, Radka Václavíková^{1,2}, Petr Holý^{1,2}, Karolína Šeborová^{1,2}, Lenka Červenková^{3,4}, Václav Liška^{3,5}, Lukáš Rob⁶, Jiří Bouda⁷, Beatrice Mohelníková-Duchoňová^{2,8}, Vessela N. Kristensen⁹, Pavel Souček^{1,2}

¹Laboratoř Farmakogenomiky, Biomedicinské Centrum, LF UK v Plzni; ²Oddělení Toxikogenomiky, Státní zdravotní ústav, Praha; ³Laboratoř nádorové léčby a regenerace tkáně, Biomedicinské Centrum, LF UK v Plzni; ⁴Ústav patologie, 3. LF UK, Praha; ⁵Chirurgická klinika, LF UK v Plzni a FN Plzeň; ⁶Gynekologicko-porodnická klinika, 3 LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha; ⁷Gynekologicko-porodnická klinika LF UK v Plzni a FN Plzeň; ⁸Onkologická klinika a Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP, Olomouc; ⁹Institute for Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Oslo, Norway

Farmakogenomika solidních nádorů je nosné téma, kterým se naše laboratoř zabývá delší dobu. Jedním z moderních přístupů ke studiu tohoto problému je sekvenování nové generace (NGS z angl. „next-generation sequencing“). NGS umožňuje jak studium genomické informace (DNA sekvenování), tak studium transkriptomu (RNA sekvenování). Nedávno jsme publikovali práci o úloze zárodečných variant v prognóze a predikci výsledku léčby pacientek sledovaných pomocí NGS panelu vybraných genů u karcinomu prsu. V současné době se zaměřujeme i na studium významu somatických variant u solidních nádorů pankreatu, kolorekta, prsu a ovarií pomocí cíleného sekvenování panelů kandidátních genů a celoxomového sekvenování (WES). Příprava sekvenačních knihoven je prováděna metodou cíleného obohacení úseků DNA pomocí kitů SeqCap (Roche Nimblegen) nebo SureSelect (Agilent). Výsledné knihovny jsou podrobeny zaváděcím běhům na nízkokapacitním přístroji MiSeq a po vyhodnocení, případné úpravě protokolů, odeslány ke komerční sekvenaci na vysokokapacitních přístrojích HiSeq, NextSeq nebo NovaSeq (Illumina), na základě velikosti cíleného úseku, počtu vzorků a ekonomického hlediska.

Do konce roku 2019 jsme provedli panelové NGS na DNA z 18 archivních nádorových vzorků od pacientů s duktálním adenokarcinomem pankreatu a 32 párových vzorků zárodečné (krev) i somatické (čerstvě zmražené nádory) DNA od pacientek s karcinomem prsu. U pacientů s karcinomem pankreatu jsme sledovali panel 238 genů, které souvisejí s rozvojem onemocnění obecně a specificky s mechanismem opravy DNA. Prioritizace variant byla provedena metodou predikce driver genů pomocí programu Mutsig a vizualizace variant pomocí nástroje Maftools v R. Celkové pokrytí ve vzorcích nádorů bylo 363 ± 112 a průměrný počet nalezených somatických variant na vzorek byl 832 ± 429 . Počet patogenních variant (počet somatických mutací bez synonymních záměn) se mezi vzorky značně lišil (50–550). Nejvíce variant bylo nalezeno v genech pro titin (TTN), mucin 16 (MUC16) a spektrin (SYNE1).

U vzorků karcinomu prsu byl sledován panel 113 genů souvisejících se signálními drahami oxysterolů. Průměrné pokrytí ve vzorcích nádorů bylo 597 ± 83 a u vzorků krve 177 ± 22 . Průměrný počet nalezených somatických variant na vzorek byl 6 ± 7 . Počet patogenních variant byl v rozmezí 1–18, přičemž nejvíce byly mutované geny

ABCA4 (ATP Binding Cassette Subfamily A Member 4), NCOA3 (Nuclear Receptor Coactivator 3) a AHRR (Aryl-Hydrocarbon Receptor Repressor).

Úkolem další studie je porovnání změn exomu (DNA) a transkriptomu včetně nekódujících RNA ve vzorcích nádorů od 60 pacientek s ovariálním karcinomem. Patientky byly vybrány dle odpovědi na adjuvantní onkologickou léčbu (dobrá versus špatná, cca podobné počty v obou skupinách). Celoxomová studie je ve stádiu vyhodnocení. V rámci transkriptomické studie jsme zavedli metodiku přípravy knihoven z celkové RNA pomocí odstranění (deplece) ribosomální RNA. Následně byl vyhodnocen profil mRNA a dlouhých nekódujících RNA (lncRNA) v pilotním setu pacientek s ovariálním karcinomem s rozdílnou odpovědí na léčbu a identifikovány kandidátní biomarkery, např. LINC-AKAP7-1, LINC-HTR7-10 a LINC-TSKU-1.

Závěrem je možno konstatovat, že se nám podařilo zavést řadu z dostupných NGS metodik a identifikovat somatické varianty, v některých případech dosud nepopsané, ve většině sledovaných genů. Úspěšně jsme provedli sekvenaci vzorků z archivních bločků nádorů slinivky, kolorekta a vzdálených metastáz a zavedli metodiku WES z nádorových tkání ovariálního karcinomu. Vytvořili jsme bioinformatický postup na detekci lncRNA pomocí celotranskriptomového sekvenování a našli jsme rozdíly mezi deregulovanými lncRNA pacientek dobře a špatně odpovídajících na léčbu ovariálního karcinomu. Tyto lncRNA mohou, v případě ověření v nezávislých studiích, sloužit jako nové biomarkery resistance a odpovědi na léčbu. V dalším období budou provedeny validační studie využívající větší počty zařazených pacientů a bude sledován mechanismus účinku kandidátních biomarkerů, jak z oblasti somatických variant a genů, tak lncRNA.

Práce na zavádění NGS v laboratoři je podpořena projekty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR č. NPUI LO1503, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 a INTER-COST LC190015, Grantové agentury Karlovy Univerzity č. UNCE/MED/006, 698119 a 1776218, Grantové agentury ČR č. 19-10543S a Agentury zdravotnického výzkumu MZ ČR č. 17-28470A, NV19-03-00097 a NV19-08-00113.

CESTA K NOVÝM JÁTRŮM

Václav Liška^{1,2}, Vladimíra Moulisová¹, Richard Pálek^{1,2}, Jáchym Rosendorf^{1,2}, Lenka Červenková^{1,3}, Petr Hošek¹, Lukáš Bolek⁴, Jiří Dejmek⁴, Miroslav Jiřík^{1,5}, Alena Jonášová⁵, Patrik Mik^{1,6}, Claudia Schindler⁷, Maria Stefania Massaro¹, Vladislava Mlejnková Dvořáková¹, Kristýna Bajcurová^{1,8}, Lada Eberlová^{1,6}, Lenka Haidingerová⁹, Ondřej Vyčítal^{1,2}, Jan Brůha^{1,2}, Ondřej Brzoň¹, Jana Slobodová¹, Lukáš Bednář¹, Jan Ševčík¹, Mojmír Bohanes¹, David László¹, Alexej Razumnyj¹, Robert Polák², Václav Tégl^{1,9}, Marek Brousil¹, Tomáš Kříž¹, Martin Dolanský¹, Richard Feurich¹, Radim Dvořák¹, Pavel Pícha¹, Petr Balta^{1,8}, Filip Bošek^{1,8}, Eva Korčáková^{1,8}, Hynek Mírka^{1,8}, Zbyněk Tonar^{1,10}, Jan Vimmr⁵, Uta Dahmen⁷, Vladislav Třeška²

¹Biomedicínské centrum, LF UK v Plzni; ²Chirurgická klinika, Fakultní nemocnice Plzeň, LF UK v Plzni; ³Ústav patologie, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova; ⁴Ústav biofyziky, LF UK v Plzni; ⁵Fakulta aplikovaných věd, Západočeská univerzita v Plzni; ⁶Ústav anatomie, LF UK v Plzni; ⁷Univerzitní klinika v Jeně, Univerzita Fridricha Schillera, Jena, Německo; ⁸Klinika zobrazovacích metod, LF UK v Plzni; ⁹Klinika anesteziologie a resuscitace, LF UK v Plzni; ¹⁰Ústav histologie a embryologie, LF UK v Plzni

Repopulace decelularizované tkáně buňkami je velmi nadějným směrem, který by mohl vyřešit nedostatek orgánů pro transplantace včetně jater. Decelularizovaný jaterní skelet slouží jako ideální 3D prostředí pro recelularizaci, neboť je v něm zachována tkáňově specifická mikroarchitektura proteinů extracelulární matrix (ECM) s pozičními informacemi jak pro osídlení novými buňkami, tak pro jejich migraci, růst a diferenciaci. Při použití autologních progenitorových buněk by navíc nově konstruovaný štěp měl postrádat imunogenicitu v hostitelském organismu, bylo by tedy možné se téměř kompletně vyhnout imunosupresi, která je v současnosti nutnou součástí terapie po transplantaci. Výzkum naší laboratoře ubírající se tímto směrem se zaměřuje na dva různé, ale navzájem se doplňující aspekty. Prvním je základní výzkum decelularizace a recelularizace prasečího jaterního skeletu *in vitro*, druhým je klinické praxi bližší zvládnutí kompletní transplantace jater na modelu velkého zvířete, které bude v budoucnu nezbytné pro transplantaci *in vitro* připraveného graftu. Na poli decelularizace jsme vyvinuli rychlou a šetrnou metodu decelularizace prasečích jater. Získaný skelet jsme testovali na adhezi a proliferaci potkaních endotelových buněk a buněk hepatocelulárního karcinomu ve statickém režimu. Zároveň jsme vyvinuli první prototyp bioreaktoru na perfúzní kultivaci buněk ve skeletu.

V rámci etablování modelu transplantace jater na praseti domácím již bylo odepřováno 15 příjemců jaterního štěpu. Ortotopická transplantace je u prasete domácího technicky náročný výkon z důvodu kongesce krve ve splachniku v průběhu anhepatální fáze. Tuto fázi pomáhá překlenout extrakorporální porto – jugulární shunt poháněný centrifugální pumpou se vřazeným tepelným výměníkem. Transplantovaná zvířata jsou po tři týdny monitorována a úspěšnost transplantace je hodnocena pomocí pravidelných CT vyšetření a analýze biochemických markerů jaterních funkcí.

Podpořeno UNCE/MED/006 – Centrum klinické a experimentální jaterní chirurgie, CZ. 02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007280 – Aplikace moderních technologií v medicíně a průmyslu, LO1503 – NPU I – BIOMEDIC, Progres Q39 – Náhrada, podpora a regenerace životně důležitých tkání a orgánů.

OD POKROČILÝCH NÁHRAD KOSTÍ AŽ NA MĚSÍC

Lucie Vištejnová^{1,2}, Pavel Klein¹, Tomáš Suchý^{1,4}, Lucy Vojtová³, Rastislav Ballay⁵, Martin Bartoš^{6,7}, Tereza Blassová^{1,2}, Yaroslav Kolinko^{1,2}

¹Biomedicínské centrum, LF UK v Plzni; ²Ústav histologie a embryologie, LF UK v Plzni; ³CEITEC – Brno, Vysoké učení technické, Brno; ⁴Ústav struktury a mechaniky hornin, AV ČR, Praha; ⁵Fakultní nemocnice v Motole, Praha; ⁶Všeobecná fakultní nemocnice v Praze; ⁷Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta v Praze, Univerzita Karlova.

V současné ortopedii není stále optimálně vyřešen problém opakovaných infekcí kostí spojených s implantací endoprotéz a jiných kostních náhrad. Uvádí se, že přibližně 2–5 % ortopedických operací ze zatížení rizikem bakteriální kontaminace a rozvoje infekce kosti (osteomyelitidy). Re-implantace nové náhrady představuje nejen komplikaci pro zdraví pacienta, ale přináší zvýšené ekonomické nároky na celkovou léčbu^[1]. Dnes, v době pokročilých materiálů a technologií umožňující jejich přípravu a pečlivou charakterizaci, se jako řešení nabízí modifikace povrchů kostních náhrad materiály, které budou jednak osteoinduktivní, tedy budou podporovat tvorbu nové kosti a přispívat k zabudování do kosti stávající, tak antimikrobiální, tedy budou fungovat jako prevence vzniku a rozvoje osteomyelitidy. Jak napovídá pohled zpět do roku 1987, „the race for the surface“ mezi kostními buňkami a bakteriemi dávno začal, a stále neskonal^[2].

Již čtvrtým rokem máme možnost spolupracovat na vývoji materiálů pro kostní náhrady, které mají splňovat právě dvě výše uvedené podmínky, tedy být osteoinduktivní a antimikrobiální zároveň. Jedná se především o dva typy materiálů, o nanovláknna na bázi kolagenu nanosená na titanový základ a obohacená o hydroxyapatit a vankomycin^[3], a o dvousložkový kalcium fosfátový cement kombinovaný s termoresponsivním kopolymerem a obohacený o vankomycin^[4]. Biokompatibilita a funkce obou materiálů je nejprve testována na modelu potkana kmene Wistar s nebo bez indukované infekce kosti, a poté na modelu miniprasete, kdy je provedena implantace testovaných materiálů do femurů potkana (dle typu pokusu do meduly či laterálního epykondylu) či do tibie miniprasete, a po 3, 6 a 12 týdnech a po 6 měsících (v případě miniprasete) je analyzován stav regenerované kosti metodami histologie a μ CT.

Dosavadní výsledky ukazují schopnost materiálů integrovat se do hmoty kosti a nepůsobovat lokální záněty. Materiály jsou kostí odbourávány a je podpořena tvorba kosti nové. V případě kolagenových nanovláken obohacených o hydroxyapatit a vankomycin nedocházelo k rozvoji zánětu v infikovaných kostech, což vedlo k lepší kvalitě novotvořené kostní hmoty. V případě dvousložkového kalcium fosfátového cementu jsou testy a analýzy v procesu a není možné zatím dělat závěry o jeho funkci.

Zdánlivě vedlejší produkt několika let strávených v oblasti vývoje kostních náhrad byla možnost toto téma do určité míry popularizovat. V Technickém muzeu v Brně jsme realizovali výstavu s názvem Až na kost – výstava o stavbě, funkci a náhradách kostí, která proběhla v období 4. 6. – 29. 9. 2019. S odstupem času a i přes poměrně strastiplnou cestu přípravy výstavy, ji hodnotím jako nejlepší výsledek uplynulého období.

Testy materiálů pro kostní náhrady jsou podpořeny projekty: Projekt číslo NV18-05-00379 udělený Agenturou pro zdravotnický výzkum a Ministerstvem zdravotnictví České republiky a projekt číslo TA04010330 udělený Technologickou agenturou České republiky.

Reference:

- [1] Chouirfa H. et al. 2019 Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta Biomater.* 83, 37–54.
- [2] Gristina AG. 1987 Biomaterial-Centered Infection: Microbial Adhesion Versus Tissue Integration. *Science.* 237, 1588–1595.
- [3] Suchý T. et al. 2019 Evaluation of collagen/hydroxyapatite electrospun layers loaded with vancomycin, gentamicin and their combination: Comparison of release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility. *Eur J Pharm Biopharm.* 140, 50–59.
- [4] Vojtová L. et al. 2019 The Effect of the Thermosensitive Biodegradable PLGA–PEG–PLGA Copolymer on the Rheological, Structural and Mechanical Properties of Thixotropic Self-Hardening Tricalcium Phosphate Cement. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 391.

HODNOCENÍ RESORBOVATELNÝCH KOLAGEN-HYDROXYAPATITOVÝCH NANOVRSTEV S ŘÍZENOU ELUCÍ ANTIBIOTIK: POROVNÁNÍ KINETIKY UVOLŇOVÁNÍ, ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY A CYTOKOMPATIBILITY

Tomáš Suchý^{a,b,d}, Monika Šupová^{a,d}, Pavla Sauerová^{c,d}, Marie Hubálek Kalbáčová^{c,d}, Eva Klapková^a, Marek Pokorný^f, Lukáš Horný^{b,d}, Jan Závora^g, Rastislav Ballay^h, František Denk^a, Martin Sojka^{d,i}, Lucie Višteinová^d

^aOddělení kompozitních a uhlíkových materiálů, Ústav struktury a mechanismu hornin, AV ČR; ^bFakulta strojního inženýrství, ČVUT, Praha; ^cÚstav patologické fyziologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova; ^dBiomedicínské centrum, Lékařská fakulta UK v Plzni; ^eOddělení lékařské chemie a klinické biochemie, 2. lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Motol; ^fContipro a.s., oddělení výzkumu a vývoje; ^gKlinická mikrobiologie a ATB centrum, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice v Motole; ^h1. ortopedická klinika, 1. lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice v Motole; ⁱInstitute mikrobiologie, Lékařská fakulta, Slovenská lékařská univerzita, Bratislava, Slovensko.

Cílem této studie bylo vyvinout biodegradabilní nanostrukturovanou vrstvu založenou na kolagenu (COL), hydroxyapatitových nanočásticích (HA), vankomycin hydrochloridu (V), gentamicin sulfátu (G) či jejich kombinaci (VG) pro léčbu infekcí vzniklých při výměně kloubních náhrad, zabránění septického uvolnění kostního implantátu vyvolaného osteomyelitidou či pro samotnou prevenci vzniku infekce kosti v některých indikovaných případech. Připravené nanovrstvy imitují svým složením extracelulární kostní matrix obsahující různé množství HA (0,5 a 15 % hmotnostních), který má napomoci integraci implantátu do kosti. U různě připravených vrstev byla testována kinetika uvolňování antibiotik *in vitro*, jejich antimikrobiální aktivita proti MRSA (na methicilin

rezistentní *Staphylococcus aureus*) a gentamicin-rezistentním izolátům *Staphylococcus epidermidis* a *Enterococcus faecalis*, a také jejich cytokompatibilita na úrovni *in vitro* (s ohledem na jejich uplatnění v kostní chirurgii byly pro všechny cytotoxické analýzy vybrány buňky lidských osteoblastů SAOS-2). Z výsledků vyplynulo, že vrstvy COL/HA jsou schopné uvolňovat vysoké koncentrace vankomycinu a gentamicinu po dobu 21 dnů a účinně fungovat proti testovaným klinicky relevantním bakteriálním izolátům. Dále bylo zjištěno, že zatímco přítomnost HA ve vrstvách kolagenu neovlivňuje kinetiku uvolňování vankomycinu z vrstev impregnovaných samotným vankomycinem nebo jeho kombinací s gentamicinem, přítomnost HA zpomaluje uvolňování gentamicinu z COL/HA vrstev impregnovaných buď samotným gentamicinem a jeho kombinacemi s vankomycinem. Kombinace obou antibiotik měla pozitivní účinek na prodloužení přeměny vankomycinu na jeho degradační produkty. Všechny testované vrstvy vykazovaly potenciální antibakteriální aktivitu s ohledem na testované izoláty stafylokoků i na enterokoky. V přítomnosti vankomycinu byl navíc stanoven účinek jak proti gentamicin-rezistentnímu *Staphylococcus epidermidis*, tak proti *Enterococcus faecalis*. Na základě těchto výsledků se tedy kombinace vankomycinu a gentamicinu ukázala jako možný účinnější nástroj proti MRSA, než by tomu bylo v případě samotného vankomycinu. Podle výsledků z cytotoxických analýz byly výluhy všech typů nanovrstev pro SAOS-2 buňky netoxické. Přímá interakce jednotlivých typů nanovrstev s buňkami však rozdíly v cytotoxicitě ukázala. Zatímco kombinace vankomycinu a gentamicinu ve vrstvách COL/HA vykazovala dostatečnou cytokompatibilitu s osteoblasty nezávislou na obsahu HA. Samotný vankomycin vykazoval cytokompatibilitu s osteoblasty pouze až v přítomnosti vyšších koncentrací HA ve vrstvách COL / HA. Samotný gentamicin byl pro tyto buňky významně cytotoxický nezávisle na obsahu HA. Z analýzy dále vyplynulo, že použitá vyšší koncentrace HA ve vrstvě podporuje buněčnou adhezi a nepřímo tak zvyšuje odolnost buněk vůči stresovému podnětu (antibiotiku).

In vitro analýzy nanovrstev s řízenou elucí antibiotik tedy ukázaly, že vrstvy COL/HA s 15% HA impregnované samotným vankomycinem nebo kombinací vankomycinu a gentamicinu nabízejí slibný léčebný přístup – mají potenciál zabránit infekci spojené s výměnou kostních náhrad a zároveň jsou kompatibilní s lidskými buňkami za podmínek *in vitro*.

VYLÉČÍME CHOROBY STÁŘÍ UŽ VE VAJÍČKU?

Miriama Štiavnická¹, Jan Nevoral^{1,2}, Hedvika Římnáčová¹, Ladan Monsef¹, Tereza Fenclová¹, Jiřina Havránková^{1,2}, Marouane Chemek¹, Lukáš Gold^{1,3}, Václav Růčka¹, Olga García-Álvarez⁴, Milena Králíčková^{1,2,5}

¹Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta UK v Plzni; ²Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta UK v Plzni; ³IVF Centrum Prof. Zech, Plzeň; ⁴Health and Biotechnology (SaBio) Group IREC, (CSIC-UCLM-JCCM), Albacete, Španělsko; ⁵Gynekologicko-porodnická klinika, Fakultní nemocnice Plzeň a Lékařská fakulta UK v Plzni

Mitochondriální choroby patří mezi dědičná onemocnění, která jsou způsobená mutací v jaderné DNA, ovlivňující funkčnost mitochondrií, nebo přímo v mitochondriální (mt) DNA. Vedle vzácných syndromů patří k mitochondriálním onemocněním také Parkinsonova či Alzheimerova choroba. Mnohdy je však klinický obraz a průběh onemocnění značně nespecifický a choroba je označena za idiopatickou. Nicméně, správná diagnostika a následná léčba, resp. prevence, se zdají být jediným správným přístupem.

Jednou z častých příčin mitochondriálních onemocnění je heteroplazmie, tedy výskyt více než jedné populace mtDNA v buňce a/nebo organismu. Tento jev je poměrně běžný a jeho fenotypový projev závisí na charakteru mutace mtDNA a poměru mutované a zdravé populace mitochondrií. Vezmeme-li v úvahu fenomén maternální dědičnosti mitochondrií, lze předpokládat, že odpovědi týkající se zděděné heteroplazmie najdeme právě ve zralém oocytu – vajíčku. Na cestě od vajíčka k novému jedinci totiž zaznamenáváme dva klíčové momenty, které se podílejí na výskytu a závažnosti heteroplazmie: prvním je tzv. efekt „hrdla láhve“, kdy dochází k selekci mitochondrií a oocytů během zrání, např. prostřednictvím atrezie heteroplazmických oocytů; druhým momentem je autofágie otcovských mitochondrií (mitofágie) spermie po oplození. Jelikož se oba procesy odehrávají v prostředí vajíčka, zapojení molekulárních mechanismů oocytu v selekci zdravých mitochondrií budoucího jedince je zřejmé. Z těchto důvodů jedním z hlavních cílů Laboratoře bude experimentálně prokázat úlohu klíčových post-translačních modifikací kandidátních proteinů v biogenezi mitochondrií oocytu během oogeneze a spermie po oplození. Výzkum v této oblasti přispěje nejenom k léčbě neplodnosti, ale také kriticky zhodnotí některé aspekty a postupy asistované reprodukce.

ANGIOGENEZE, HYPOXIE A REMODELACE STĚNY ANEURYZMATU BŘÍŠNÍ AORTY A DALŠÍ KVANTITATIVNÍ HISTOLOGICKÉ STUDIE V ROCE 2019

Tereza Blassová, Yaroslav Kolinko, Anna Malečková, Martina Grajciarová, Patrik Mik, Markéta Šlajerová, Lucie Maršalová, Jiřina Havránková, Zbyněk Tonar

Laboratoř kvantitativní histologie, Biomedicínské centrum, Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta v plzni, Univerzita Karlova

V roce 2019 byli pracovníci laboratoře (Blassová, Tonar) korespondujícími autory dvou výsledkových článků zveřejněných v časopisech s IF:

1. Ve studii porovnávající histopatologii stěny výdutě břišní aorty u pacientů podstupujících operaci s normální stěnou aorty jsme kvantitativně analyzovali objemové podíly a distribuci 13 složek (aktin, desmin, elastin, kolagen I a III, CD31-pozitivní endotel vasa vasorum, osteoprotegerin, CD3-pozitivní T-lymfocyty, CD20-pozitivní B-lymfocyty, MAC387-pozitivní makrofágy, myeloperoxidáza-pozitivní neutrofily, hypoxia-inducible faktor 1 alfa, pentraxin 3). Kromě již dříve známých poznatků (degradace elastinu) jsme zjistili upregulaci zánětlivého mediátoru pentraxinu 3 a významnou tkáňovou hypoxii, která postihuje stěnu aneuryzmatu i přes zvýšenou angiogenezi vasa vasorum. (Plos One, IF=2,776, Q2).

2. Ve studii mapující segmentální variabilitu krkavic prasete jakožto významného modelu využívaného k testování malopřůměrových cévních protéz vyvíjených pro kardio-vaskulární chirurgii jsme popsali mikroskopickou distribuci elastinu, kolagenu a aktinu podél celého průběhu tepny (8–13 cm). Rovněž jsme zjistily omezení tohoto modelu porovnáním se vzorky lidských koronárních tepen z jednoho z arteriálních štěpů první volby pro koronární revaskularizaci (ITA). (Annals of Anatomy, IF=2,241, Q2).

Dále jsme přispěli histologickými částmi studií do projektů vedených našimi výzkumnými partnery. V impaktovaných časopisech byly publikovány studie na téma prodloužení exspirace lidských alograftů plicnice a aorty pro transplantační účely (Blassová, Cell and Tissue Banking, Q3), morfologie mozečkových štěpů u myších modelů neurodegenerace mozečku (Kolinko, Cerebellum, Q2), remodelace alogenních žilních štěpů pro rekonstrukci portální žíly u prasete po pankreatikoduodenektomii (Mik, Tonar, Anticancer Research, Q4), osidlování biodegradabilních tkáňových nosičů kmenovými buňkami, (Blassová, Tonar, Molecular Biology Reports, Q3), testování nových krytů kožních ran (Blassová, Tonar, Regenerative Medicine, Q2). V časopisech bez IF pak vyšly práce o poškození vlasů při onkologické léčbě (Malečková) a o vzniku a vývoji tukových kapének (Malečková, Tonar).

Úspěchem mezinárodního formátu jsou úspěšně ukončené tři projekty zahraničního smluvního výzkumu s firmou SRC Biosciences (Tampa, FL, USA), která probíhá dle nej přísnějších současných kritérií pro kvantitativní mikroskopii včetně online protokolování všech měření a analýzy variability dat. Těchto velmi organizačně, metodicky i termínově náročných úkolů se ujal Dr. Kolinko, který rovněž vybudoval potřebnou přístrojovou a softwarovou infrastrukturu, nyní využívanou i spolupracovníky dalších laboratoří BC.

Základním pilířem laboratoře je spolehlivé zpracovávání tkáňových vzorků (Šlajerová, Maršálová) a zabezpečení projektů, z nichž je velká část provozu laboratoře hrazena (Havránková). Podařilo se zapojit nový přístroj Leica Bond RX (pro imunohistochemii). Ve výbrusové laboratoři pro tvrdé tkáně přibyla optimalizovaná metoda zalití vzorků do polymeru Technovit 2000LC a využití Technotray UV, což vedlo ke zkrácení celkové doby potřebné na zpracování výbrusu oproti původní metodě (methylmetakrylát) až o dvě třetiny. Rovněž se podařilo optimalizovat proces mražení tkáně před použitím kryostatu a následnou fixaci vzorků na sklíčku před imunohistochemickým barvením.

Děkujeme touto cestou všem spolupracovníkům z dalších laboratoří a pracovišť BC a celé naší fakulty za jejich profesionalitu, odbornost, konstruktivní společné úsilí, pochopení a lidskou vstřícnost. Tato vzácná kombinace pomáhá řešit téměř všechny odborné problémy i provozní potíže (či jim dokonce předcházet) a činí spolupráci udržitelnou.

METODA DLOUHODOBÉ KATETRIZACE JUGULÁRNÍ ŽÍLY U PRASETE

Pavel Klein¹, Lukáš Nalos^{1,2}, Jiří Dejmek³ a Martin Soukup⁴

¹Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta UK v Plzni; ²Ústav fyziologie, Lékařská fakulta UK v Plzni; ³Ústav biofyziky, Lékařská fakulta UK v Plzni; ⁴Otorhinolaryngologická klinika, FN Plzeň

Prase je jedním z nejčennějších *in vivo* modelů v biomedicínském výzkumu, nicméně jeho nevýhodou je nedostatek dobře přístupných žil pro venepunkci. Vhodným řešením je katetrizace, nicméně většina známých metod je vhodná spíše pro krátkodobější použití. Cílem této metodické studie bylo ověření vylepšené metody dlouhodobé katetrizace v. jugularis u prasat. Zvířatům byl standardně Seldingerovou technikou zaveden do v. jugularis 420 mm dlouhý 16G PUR katétr tak, aby dosáhl v. cava cranialis. Zbýlá část, která nebyla zavedena do žíly, byla pomocí trokaru podkožím protažena do okcipitální krajiny, osazená jednoduchou robustní koncovkou ze zkrácené injekční jehly 16G a suturou fixována ke kůži zvířete. V tomto místě byla koncovka přístupná pro experimentátora a zároveň dobře chráněna před poškozením zvířetem. Katétry byly proplachovány fyziologickým roztokem a zamykány 4% citrátem při častých odběrech nebo 30% citrátem při vstupech v intervalech 24 h a více. Jedenkrát týdně byly katétry uzamykány 4% roztokem citrátu s obsahem taurolidinu za účelem prevence infekce a formace bakteriálního biofilmu. Metoda byla celkem ověřena na 14 přeštických prasatech. Katétry byly plně funkční po dobu až 11 týdnů a žádný z katétrů nebyl vyřazen z funkce v důsledku infekce či trombu. S využitím této metody katetrizace lze realizovat dlouhodobé studie s možností komfortních a bezstresových odběrů krve.









