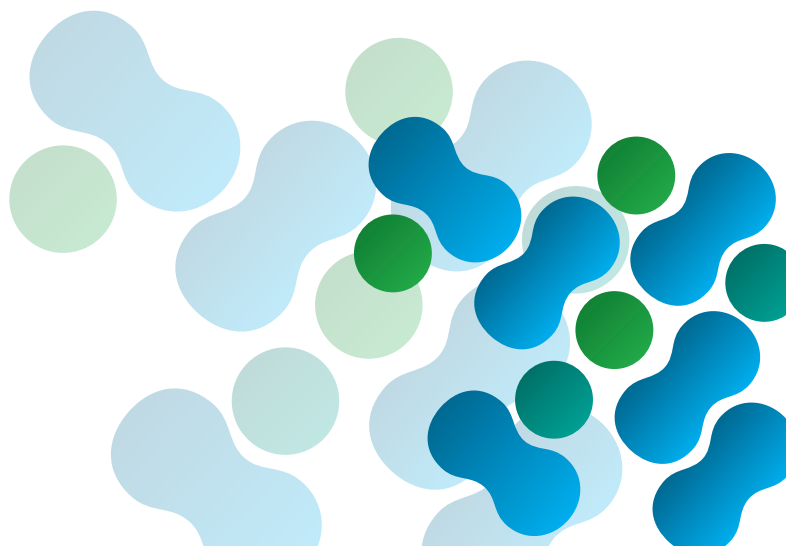




BIOMEDICÍNSKÉ  
CENTRUM

PRVNÍ  
VÝROČNÍ KONFERENCE  
BIOMEDICÍNSKÉHO CENTRA

11. ČERVNA 2015





## První výroční konference Biomedicínského centra



11. června 2015



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj  
pro inovace



## Obsah

Úvod . . . . .	7
Program konference . . . . .	8
Ochrana duševního vlastnictví na LF UK v Plzni. . . . .	10
Matrix Gla protein jako prediktor mortality a potenciálně modifikovatelný rizikový faktor kardiovaskulárních chorob. . . . .	11
Cell interactions with biomaterials . . . . .	13
Náhrada a podpora orgánů . . . . .	14
Laboratoř experimentální kardiologie . . . . .	15
Antibiotic resistance in current medicine . . . . .	16
Farmakoterapeutický potenciál seskviterpenových laktonů. . . . .	18
Farmakogenomika nádorových onemocnění. . . . .	20
Výzkumná témata v Laboratoři nádorové biologie. . . . .	22
Cirkulující volná nádorová DNA – nový biomarker v onkologii. . . . .	24
Výzkumné zaměření proteomické laboratoře Biomedicínského centra . . . . .	25
Úloha mitochondrií ve zdraví a nemoci . . . . .	27
Kvantitativní histologie . . . . .	29
Genetické a epigenetické charakteristiky DNA reparace ve vztahu k riziku a prognóze CRC . . . . .	30
Recentní výzkum v oblasti transplantace a náhrady funkce ledvin . . . . .	33
Modelování mikro- a makro-cirkulace jaterního parenchymu jako nástroj jeho virtuální resekce. . . . .	34
Prasečí model hojení excizní rány experimentálně infikované vícedruhovým bakteriálním biofilmem. . . . .	37
Výzkumné zaměření Laboratoře buněčné regenerativní medicíny. . . . .	38
Laserová mikrodisekce a její využití při studiu genové exprese . . . . .	39
Léčivé přípravky moderní terapie v hemato-onkologii. . . . .	40
Folikulární tekutina – její význam pro kvalitu oocytů a její přínos pro predikci úspěšnosti léčby neplodnosti . . . . .	41
Paměť a její neuronální mechanismy ve zdraví a nemoci . . . . .	42
Funkční projevy cerebelárních degenerací a jejich neurotransplantační terapie u myších modelů hereditárních ataxií . . . . .	43
Biofyzikální laboratoř. . . . .	45



## Úvod

Vážené kolegyně,

vážení kolegové,

setkáváme se na první konferenci Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni. Cílem tohoto setkání je vzájemné představení a poznání jednotlivých výzkumných týmů, jejich výzkumného směřování i metodologického zázemí.

Jak víte, výzkumné spektrum Biomedicínského centra je rozděleno do 2 výzkumných programů, které se v jednotlivých tématech a disciplínách prolínají a doplňují. Výzkumný program 1 „Náhrada a podpora funkce životně důležitých orgánů“ se obecně zaměřuje na výzkum mechanismů poškození životně důležitých orgánů a na základě nových poznatků o etiopatogenezi těchto poškození na vývoj nových a zdokonalení stávajících preventivních, diagnostických a terapeutických opatření. Konkrétněji se zaměřuje zejména na náhradu funkce ledvin nejrůznějšími metodami, dále na problematiku infekčního orgánového poškození (např. sepse a multiorgánová dysfunkce, bakteriální rezistence k antibiotikům) či úlohu kardiovaskulárního systému v etiopatogenezi onemocnění. Výzkumný program 2 „Regenerace a reparace životně důležitých orgánů“ realizuje poměrně široce pojatý výzkum vlastností kmenových buněk včetně nádorových a jejich potenciálního využití pro tkáňovou terapii, regeneraci a reparaci tkání, embryogenezi a „in vitro“ fertilizaci i personalizovanou léčbu onkologických onemocnění. Ve všech případech se jedná o závažné medicínské problémy s významnou morbiditou a mortalitou v industrializovaných společnostech.

Věříme, že konference a další podobná setkání nám umožní co nejučinněji propojit jednotlivé skupiny, rozvinout vzájemnou spolupráci a na základě synergického efektu maximálně zvýšit produktivitu našeho centra.

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

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

# Program konference

## Zahájení konference

9<sup>00</sup>

spectabilis prof. MUDr. Boris Kreuzberg, CSc., doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.

## Dopolední blok I

9<sup>15</sup>–11<sup>00</sup>

předsedající: doc. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D., doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.

1. Management – doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.: Koncepce rozvoje Biomedicínského centra (10 minut)
2. Právní oddělení – Mgr. Adam Šoukal: Ochrana duševního vlastnictví na LF UK v Plzni (20 minut)
3. Laboratoř klinického výzkumu cévních a srdečních onemocnění (VP1) – doc. MUDr. Otto Mayer, CSc: Matrix Gla protein jako prediktor mortality a potenciálně modifikovatelný rizikový faktor kardiovaskulárních chorob (15 minut)
4. Laboratoř studia interakcí buněk s materiálem (VP2) – doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D.: Cell interactions with biomaterials (15 minut)
5. Experimentální laboratoř intenzivní medicíny (VP1) – MUDr. Jiří Chvojka, Ph.D.: Náhrada a podpora orgánů (15 minut)
6. Laboratoř experimentální kardiologie (VP1) – doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.: Laboratoř experimentální kardiologie (15 minut)
7. Laboratoř antibiotické rezistence a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii (VP1) – Costas C. Papagiannitsis, Jaroslav Hrabák: Antibiotic resistance in current medicine (15 minut)

## Přestávka

11<sup>00</sup>–11<sup>15</sup>

## Dopolední blok II

11<sup>15</sup>–13<sup>00</sup>

předsedající: doc. MUDr. Tomáš Reischig, Ph.D., doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.

8. Ústav farmakologie a toxikologie (VP1) – doc. RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.: Farmakoterapeutický potenciál seskviterpenových laktonů (15 minut)
9. Laboratoř farmakogenomiky (VP2) – doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.: Farmakogenomika nádorových onemocnění (15 minut)
10. Laboratoř nádorové biologie (VP2) – Mgr. Pavel Pitule, Ph.D.: Výzkumná témata v Laboratoři nádorové biologie (15 minut)
11. Laboratoř nádorové biologie (VP2) – Ing. et Ing. Jiří Polívka: Cirkulující volná nádorová DNA – nový biomarker v onkologii (15 minut)
12. Proteomická laboratoř (VP1) – MUDr. Jan Mareš, Ph.D.: Výzkumné zaměření proteomické laboratoře Biomedicínského centra (15 minut)



13. Mitochondriální laboratoř (VP1) – doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.: Úloha mitochondrií ve zdraví a nemoci (15 minut)
14. Laboratoř kvantitativní histologie (VP2) – doc. MUDr. Zbyněk Tonar, Ph.D.: Laboratoř kvantitativní histologie (15 minut)

Oběd

13<sup>00</sup>–14<sup>00</sup>

Odpolední blok I

14<sup>00</sup>–15<sup>30</sup>

předsedající: prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D., doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.

15. Laboratoř nádorové biologie (VP2) – MUDr. Pavel Vodička, CSc.: Genetické a epigenetické charakteristiky DNA reparace ve vztahu k riziku a prognóze CRC (15 minut)
16. Laboratoř transplantace ledvin a náhrady funkce ledvin (VP1) – doc. MUDr. Tomáš Reischig, Ph.D.: Recentní výzkum v oblasti transplantace a náhrady funkce ledvin (15 minut)
17. Laboratoř nádorové léčby a regenerace tkáně (VP2) – MUDr. Václav Liška: Modelování mikro- a makro-cirkulace jaterního parenchymu jako nástroj jeho virtuální resekcce (15 minut)
18. Laboratoř preklinických studií (zvěřinec) – Ing. Pavel Klein, Ph.D.: Prasečí model hojení excizní rány experimentálně infikované vícedruhovým bakteriálním biofilmem (15 minut)
19. Laboratoř buněčné regenerativní medicíny (VP2) – Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D.: Výzkumné zaměření Laboratoře buněčné regenerativní medicíny (15 minut)
20. Laboratoř buněčné regenerativní medicíny (VP2) – doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D.: Léčivé přípravky moderní terapie v hemato-onkologii (15 minut)

Přestávka

15<sup>30</sup>–15<sup>45</sup>

Odpolední blok II

15<sup>45</sup>–17<sup>10</sup>

předsedající: doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D., MUDr. Karel Ježek, Ph.D.

21. Laboratoř laserové mikrodisekce (VP1) – doc. MUDr. Magdalena Chottová Dvořáková: Laserová mikrodisekce a její využití při studiu genové exprese (15 minut)
22. Laboratoř buněčné regenerativní medicíny (VP2) – doc. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D.: Folikulární tekutina – její význam pro kvalitu oocytů a její přínos pro predikci úspěšnosti léčby neplodnosti (15 minut)
23. Laboratoř experimentální neurofyziologie (VP2) – MUDr. Karel Ježek, Ph.D.: Paměť a její neuronální mechanismy ve zdraví a nemoci (15 minut)
24. Laboratoř neurodegenerativních poruch (VP2) – MUDr. Jan Cendelín, Ph.D.: Funkční projevy cerebelárních degenerací a jejich neurotransplantační terapie u myších modelů hereditárních ataxií (15 minut)
25. Laboratoř biofyziky (VP1) – MUDr. Jiří Beneš: Laboratoř biofyziky (15 minut)

Závěr konference

17<sup>15</sup>

# Ochrana duševního vlastnictví na LF UK v Plzni

**Mgr. Adam Šoukal**

Právní oddělení Lékařské fakulty

Přednáška bude pojednávat o systému ochrany duševního vlastnictví na LF UK v Plzni v návaznosti na komercializaci výsledků výzkumu a vývoje. Účastníci se mimo jiné seznámí jakým způsobem postupovat v případě, kdy v rámci svých pracovních povinností přijdou s inovativní myšlenkou či vynálezem. Přednášející je provede základními právními předpisy ČR, které se dané problematice týkají a s ním spojené směrnice UK, které pro dané situace platí. V krátkosti také představí varianty ochrany, které lze zvolit a na koho se obrátit v případě, že si nejsou akademičtí a vědečtí pracovníci jisti, zdali je jejich nápad nutné chránit. Dále bude pojednáno o motivaci, která bude porovnávána např. se smluvním výzkumem či publikační činností navázanou na RIV. Přednášející následně vysvětlí základní parametry finálního prodeje duševního vlastnictví. Popíše rozdíl mezi prodejem patentu a udělením licence ve srovnání s obchodním tajemstvím či prodejem SW.

Druhá část přednášky bude věnována případovým studiím, které jsou spojeny s pre-seed projekty UK. Účastníci budou seznámeni o kladech i záporech komercializace, zkušenostech s jednáním s aplikační sférou a dalším potřebném know-how pro budoucí projekty, výzkumné spolupráce a běžný přenos poznatků a technologií v akademické sféře.

# Matrix Gla protein jako prediktor mortality a potenciálně modifikovatelný rizikový faktor kardiovaskulárních chorob

doc. MUDr. Otto Mayer, CSc.

Laboratoř klinického výzkumu cévních a srdečních onemocnění (VP1)

Východisko: Matrix Gla-protein (MGP) představuje přirozený inhibitor tkáňové kalcifikace přičemž vitamin K je esenciálním kofaktorem jeho syntézy. MGP se vyskytuje v řadě isoformem, což je dáno odlišným stupněm karboxylace a fosforylace během jeho biosyntézy a tyto isoformy mohou mít zcela odlišné biologické chování z hlediska vlastního antikalcemického působení. Cirkulující desfosfo-dekarboxylovaná isoforma MGP (dp-ucMGP) je biologicky již zcela inaktivní a odráží především nízkou dostupnost vitamínu K vedoucí k málo efektivní syntéze naopak aktivních (tj s antikalcemickým potenciálem) isoformem MGP. Prokázáno bylo, že hodnoty dp-ucMGP úzce korelují s rozsahem kalcifikací koronárních arterií.

Metodika a výsledky: V naší studii jsme si položily otázku, zdali zvýšené hodnoty dp-ucMGP predikují mortalitu u pacientů se stabilizovanou vaskulární chorobou. V prospektivní studii bylo sledováno celkem 799 pacientů (prům. věk 65,1 ± SD 9,3) po infarktu myokardu, koronární revaskularizaci či první ischemické cévní mozkové příhodě (spojené české soubory EUROASPIRE III a EUROASPIRE-stroke survey) přičemž stanovena byla pětiletá, celková i kardiovaskulární mortalita. Během střední doby sledování 2050 dní (5,6 let) 159 pacientů zemřelo. Po komplexní adjustaci pomocí Coxova modelu, pacienti v nejvyšším kvartilu dp-ucMGP ( $\geq 977$  pmol/L) vykazovali signifikantně nezávisle zvýšené riziko celkové i kardiovaskulární pětileté mortality [HRR 1,89 (95 % CI: 1,32–2,72) a 1,88 (95 % CI: 1,22–2,90)].

V další subanalýze téhož souboru jsme se pokusili stanovit, nakolik dochází k interakci zvýšeného dp-ucMGP a konvenčních prediktorů kardiovaskulárního rizika. Obecně, prediktivní hodnota zvýšeného dp-ucMGP byla nejvyšší u pacientů, kteří by na základě konvenčního modelování byli určeni jako spíše nízkorizikovní (tj. spíše pacienti s ICHS, než s mozkovou mrtvicí, spíše mladší pacienti a spíše nekuřáci, nediabetici, atd). Jedinou výjimkou představovala hodnota BNP ( $> 100$  ng/L) jako ukazatele funkce levé komory srdeční, která byla jinak zdaleka nejsilnější prediktor celkové mortality [HRR 3,64 (95 % CI: 2,37–5,60)]. Kombinace obou těchto faktorů (tj zvýšeného BNP i dp-ucMGP) současně byla spojena s takřka 6násobně vyšším relativním rizikem celkové mortality [HRR 5,87 (95 % CI: 3,80–9,07)], přičemž pokud byli posuzováni pouze pacienti s BNP  $> 100$ , spolupřítomnost dp-ucMGP  $\geq 977$  pmol/L zvyšovala relativní riziko celkové mortality více než 2 × [HRR 2,26 (95 % CI: 1,39–3,67)].

Na jiném souboru, tentokrát 1087 osob (prům. věk 54,8 ± SD 13,0) jakožto reprezentativním vzorku obecné populace (plzeňská část studie postMONICA) jsme se pokoušeli stanovit vztah mezi hodnotami dp-ucMGP a zvýšenou rychlostí aortofemorální pulsově vlny (aPWV), jako ukazatele cévní tuhosti a projevu předpokládaného (doposud prakticky nestudovaného) působení porušené funkce MGP v jiné než koronární cévní lokalizaci. Zjistili jsme, že hodnoty aPWV se významně zvyšovaly podle kvartilů dp-ucMGP a tento vztah zůstával významný i po komplexní adjustaci na ostatní možné spolupodílející se faktory. V kategorizovaném uspořádání, osoby v nejvyšším kvartilu dp-ucMGP ( $\geq 671$  pmol/L) vykazovaly nezávisle takřka dvojnásobné relativní riziko zvýšené tuhosti centrálních tepen (definované jako aPWV  $\geq 9$  m/sec) [OR 1,73 (95 % CI: 1,17–2,5)].

Souhrn: Cirkulující koncentrace dp-ucMGP představuje významný prediktor celkové i kardiovaskulární mortality u stabilisovaných pacientů v sekundární prevenci aterosklerotických chorob. Jeho vztah k cévní tuhosti zase naznačuje, že těžiště fyziologického působení MGP se neomezuje převážně na koronární řečiště, jak bylo doposud předpokládáno. Potenciální klinický význam těchto zjištění vyplývá zejména z faktu, že biologická aktivita MGP je terapeuticky manipulovatelná pomocí substituce velmi nízkou dávkou vitamínu K2 (menachinonu, MK7) s očekávatelným benefitem na úrovni kalcifikace cévní stěny a myokardu.

## Cell interactions with biomaterials

**doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová,  
Ph.D., Mgr. Lucie Ostrovská, Mgr. Pavla Sauerová**

Laboratoř studia interakcí buněk s materiálem (VP2)

The research of the group is mainly focused on interactions between human cells (osteoblastic cell line and mesenchymal stem cells) and surfaces or nanoparticles made from different artificial biocompatible materials with controlled properties.

Materials studied by our research group are of different chemistry – titanium (nanostructured and ultra fine titanium), biodegradable nanocomposites (based on aliphatic polyester nanofibers with collagen, calcium phosphate nanoparticles and sodium hyaluronan), silicon (silicon nanoparticles doped with boron and phosphorus), carbon (nanocrystalline diamond (particles) and graphene) and hyaluronic acid (hydrogels, complexes with surfactants)). Used materials are tested as solid surfaces for interaction with adhesion cells (implantology, sensing, etc.) and as nanoparticles for sensing, imaging and drug delivery.

The research group is currently composed of the PI and two PhD students and intensively collaborates with other members of BC and researchers at 1st Faculty of Medicine in Prague, thus the team producing results is bigger.

The members of the group regularly present their results at conferences (national and international) and in peer reviewed journals.

The research group collaborates with many Czech institutions (other faculties of Charles University, institutions of Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno University of Technology, Czech Technical University in Prague, etc.) as well as with international partners (research groups in Germany, U.S.A., Japan and Slovakia).

# Náhrada a podpora orgánů

MUDr. Jiří Chvojka, Ph.D.

Experimentální laboratoř intenzivní medicíny (VP1)

Syndrom multiorgánové dysfunkce (multiple organ dysfunction syndrom, MODS) je jedním z nejčastějších důvodů úmrtí pacientů na jednotkách intenzivní péče. Nejčastější příčinou MODS je těžká sepse a septický šok, jejichž mortalita a morbidita je neúměrně vysoká. Základní výzkum na klinicky relevantních experimentálních modelech je pilířem poznání nejen patofyziologických procesů, které v rozvoji sepse a MODS hrají roli, ale zároveň umožňuje zkoumat možnosti náhrady a podpory selhávajících orgánů. Takto získané poznatky pak mohou v budoucnu příznivě přispět k snížení incidence MODS u populace kriticky nemocných. Tým experimentální laboratoře intenzivní medicíny pracuje na etablovaném kvalitním modelu zvířecí sepse a s využitím moderních technologií se dlouhodobě zabývá touto problematikou. Přednáška stručně seznamuje s dosavadními výsledky a s novými perspektivami v dané výzkumné oblasti. Zároveň krátce představuje jednotlivé členy výzkumného týmu.

# Laboratoř experimentální kardiologie

**doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.**

## Laboratoř experimentální kardiologie (VP1)

Poškození, změněná funkce či změna nároků na funkci různých orgánů vede zpravidla k odpovídajícím změnám krevního oběhu a zejména jeho centrálního orgánu, srdce. Srdce se změněným podmínkám a nárokům přizpůsobuje intenzivní přestavbou, kterou označujeme jako remodelace srdce. Remodelace je zpravidla komplexní, dochází ke strukturálním (hypertrofie, fibróza) i funkčním změnám (elektrofyzilogické, kontraktilní změny). Remodelace má zprvu kompenzatorní charakter a přispívá k optimalizaci čerpací funkce srdce za daných podmínek, postupně se však může stát detrimetální (např. zvýšené riziko život ohrožujících srdečních arytmií, vývoj srdečního selhání).

Skupina experimentální kardiologie se dlouhodobě zabývá funkčními změnami a remodelací myokardu při závažných onemocněních (seps, renální selhání, diabetes, hypertrofie myokardu, hypercholesterolémie...) s využitím širokého spektra experimentálních zvířecích modelů (potkan se streptozotocinovým diabetem, chronickým renálním selháním v důsledku 5/6 nefrektomie, sympatektomií, objemovým přetížením, králík s hypercholesterolémií a Carlssonův model arytmiie, prase s hyperdynamickým septickým šokem). Metodologické postupy sahají od in vivo experimentů (měření a analýza EKG, analýza variability intervalů) k celé řadě metodik in vitro na izolovaném srdci (Langendorffův preparát), multicelulárních preparátech (měření membránového napětí a kontrakce v papilárním svalu a trabekule) i izolovaných buňkách – kardiomyocytech (měření membránových iontových proudů technikou patch-clamp, měření vápníkových přechodů a kontrakce v izolovaných kardiomyocytech).

Recentní výsledky skupiny (vesměs publikované v impaktovaných časopisech) zahrnují analýzu změn vápníkového proudu a repolarizace srdečního akčního napětí při sepsi, analýzu srdeční autonomní inervace, změn kontraktility a elektrofyziologie srdce včetně pravolevých rozdílů při renálním selhání, analýzu variability srdeční frekvence při sepsi, kontraktilní a elektrofyziologickou remodelaci srdce při chronickém objemovém přetížení, účinek cholesterolu na náchylnost k arytmiím a další. V letošním roce skupina získala 2 grantové projekty (agentury GAČR a AZV).

## Antibiotic resistance in current medicine

Dr. Costas C. Papagiannitsis, Ph.D., doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

### Laboratoř antibiotické rezistence a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii (VP1)

Antibiotic resistance is an emerging problem worldwide. Spread of multiresistant, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) and *Pseudomonas* spp. has been documented in many countries across the world. These bacteria are usually resistant to almost all effective antibiotics (as beta-lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, etc.), limiting the therapeutic options to a few choices (as colistin and/or combination therapy) with unpredictable results.

Until 2010, the Czech Republic reported low occurrence of carbapenem-resistant bacteria, with only sporadic cases of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (VIM-1, KPC-2), *Serratia marcescens* (VIM-1) and *P. aeruginosa* (VIM-2, IMP-7). However, the incidence of those bacteria has recently increased. In 2011, two outbreaks of KPC-3-producing and VIM-producing *K. pneumoniae* occurred in two Prague's hospitals. Additionally, in 2013, the first Enterobacteriaceae producing OXA-48-type carbapenemases were detected in hospitals throughout the country. Of note was the description of a VIM-1-producing *Lecrercia adecarboxylata* that was isolated from the hands of the medical staff in a Prague's hospital with no previous report of detection of CPE. Such a finding indicates the spreading potential of carbapenemase genes via routes that remain largely unknown.

Besides medical settings, carbapenemase-producing bacteria have been detected, also, in environmental samples including samples from sewage water, and veterinary and wildlife origin. In 2012, a VIM-1-producing *E. coli* was isolated on a pig farm. While in 2013, a NDM-1-producing *Salmonella* *Corvalis* was isolated from a wild bird in Germany. Furthermore, studies from Czech Republic have shown that wild birds, especially those associated with water, are important reservoirs of clinically relevant bacteria such as Enterobacteriaceae being resistant to fluoroquinolones and cephalosporins.

Notwithstanding the alarming epidemic situation in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, data from Israel have shown that nosocomial infections, caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, can be controlled by strict epidemiological intervention. For such a successful intervention, there is an urgent need for diagnostic laboratories to introduce rapid and sensitive methodologies for the detection of carbapenemase producers. Recently, new highly sensitive and rapid methods for the direct detection of carbapenemase activity were developed (MALDI-TOF MS meroopenem hydrolysis assay, and Carba NP test).

In 2011, our research group published the first method for the detection of carbapenemase-producing bacteria in routine diagnostic laboratories, by the use of MALDI-TOF MS. This method was based on the visualization of meropenem and its degradation products. The described procedure performed well with most types of carbapenemase producing bacteria. However, false-negative results can appear for isolates producing OXA-48-type carbapenemases. Recently, our research group showed that addition of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  to the reaction buffer of MALDI-TOF MS assay can increase the reliability of OXA-48-type producers' detection. The modified version of MALDI-TOF MS assay correctly detected 98 %



of carbapenemase producers demonstrating this method as a reliable tool for detection of carbapenemase activity in routine, as well as reference laboratories.

Applications of MALDI-TOF MS have been increasingly used in the laboratories due to their time- and cost-effectiveness. In 2014, our research group described the development of a new assay for the identification of beta-lactamases in clinical enterobacterial isolates by MALDI-TOF MS. As the first group of enzymes for the design and evaluation of the method, we used CMY-2-like beta-lactamases of the *Citrobacter freundii* origin. The new method is based on the extraction of periplasmic proteins and the detection of CMY-2-like beta-lactamases by MALDI-TOF MS according to their molecular weight (a ca 39,850-m/z peak) (Czech National Patent Nr. 304833). The latter method was also able to detect peaks with an increased m/z of approximately 383, representing the acyl-enzyme complex (complex of CMY-2 beta-lactamase with the meropenem molecule). Those results indicated the ability of the described method to explore the behavior of beta-lactamases into the bacterium cell.

In general, the research activities of our group, 'Laboratory of Antibiotic Resistance and Applications of Mass Spectrometry in Microbiology', are mainly focused on mechanisms of resistance to antibiotics, especially to expanded-spectrum cephalosporins and carbapenems, in Gram-negative bacteria (Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp.). The research projects aim to execute molecular epidemiology of factors affecting dissemination of multi-drug resistance among nosocomial pathogens. The second main objective of the research projects is intending in the development of new techniques for the detection and study of resistance mechanisms using MALDI-TOF mass spectrometry and Raman spectroscopy.

# Farmakoterapeutický potenciál seskviterpenových laktonů

doc. RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.

Ústav farmakologie a toxikologie

Ústav farmakologie a toxikologie Lékařské fakulty UK v Plzni se dlouhodobě zabývá studiem vlivu látek znečišťujících životní prostředí (zejména těžkých kovů), léčiv a xenobiotik na funkceschopnost orgánů metabolismu a eliminace (játra, ledviny). Náš experimentální program je zaměřen na studium oxidativního stresu jako jednoho z významných faktorů orgánové toxicity. Pracovníci ústavu hledají látky, které by bránily oxidativnímu poškození parenchymatosených orgánů. V této souvislosti studujeme látky přírodního původu (resveratrol, quercetin, curcumin, seskviterpenové laktony aj.) Farmakologický a toxikologický výzkum u nás a v mnoha dalších laboratořích umožnil poznat biologické účinky výše jmenovaných látek a vysvětlit molekulární podstatu jejich působení. V současnosti probíhají četné klinické studie týkající se zejména jejich antioxidačního potenciálu, protizánětlivých, protinádorových a antimikrobiálních účinků (viz např. PubMed/Clinical Trials). Intoxikace a oxidativní stres a změny v imunitním systému jsou na našem pracovišti studovány na orgánové a buněčné úrovni. Máme vypracovány in vivo modely akutní a chronické toxicity a na in vitro úrovni jsme schopni interpretovat cytotoxické a imunomodulační účinky látek. Modely hodláme do budoucna rozšířit.

Je třeba připomenout, že asi 70 % léčiv užívaných v klinické praxi má svůj původ v látce izolované z přírodních zdrojů (zejména z rostlin). Farmakologický výzkum přírodních látek prožívá v posledních letech obrození. Důvodů je více. Jedním z nich jsou pokročilé metody chemické identifikace a separace látek. Dále je to obrovská chemická diverzita látek, která je přírodou poskytována a zatím ne zcela využita.

Seskviterpenové laktony (SL) jsou podskupinou terpenových látek. Jde o sekundární metabolity vytvářené především v čeledi Asteraceae, a dále Umbelliferae a Magnoliaceae. Seskviterpenové laktony jsou tvořeny 3 izoprenovými jednotkami, charakteristikou celého 15-C skeletu je laktonový kruh. Strukturně-aktivitní analýza předurčuje tyto látky jako vhodné kandidáty pro léčbu malignit a pro prevenci/léčbu zánětů. Zajímavou molekulou mezi mnoha seskviterpenovými molekulami se jeví thapsigargin. Tento SL guaianolidového typu je znám jako inhibitor  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasy sarko-endoplazmatického retikula (SERCA). Do nedávna byl takto využíván pouze experimentálně pro zvýšení koncentrace volných iontů vápníku v buňce. V současné době je thapsigargin jako prodrug v II. fázi klinického zkoušení pro léčbu nádoru prostaty a pokročilého hepatocelulárního karcinomu. Mechanismem účinku je trvalé zvýšení koncentrace kalciových iontů a de facto navození apoptózy. Naše nedávné studie ukázaly, že thapsigargin má ještě další farmakologický účinek. Tím je exprese inducibilní synthasy oxidu dusnatého a sekrece cytokinů IL-2 a IFN-gama v makrofázích. Spolupráce s chemiky na ÚOCHB AV ČR a VŠCHT nás dovedla ke studiu trilobolidu. Jde chemicky o látku strukturně velmi blízkou thapsigarginu. Jediným publikovaným účinkem byla rovněž inhibice SERCA. Jak jsme s kolegy z ÚEM AV ČR před několika lety zjistili, imunostimulační účinky trilobolidu jsou ještě významnější (Czech patent). V rámci současného projektu GAČR 303/14-04329S nyní ověřujeme strukturně aktivitní vztahy trilobolidu a jeho derivátů, které indukují v imunitních buňkách sekreci Th1 cytokinů. Zároveň chceme objasnit vztah mezi intracelulární koncentrací vápenatých iontů a imunomodulačními efekty inhibitorů  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasy (SERCA). Vztah mezi biologickými účinky a intracelulární lokalizací tri-

lobolidových molekul sledujeme na kulturách makrofágů a několika typech nádorových linií pomocí originálně připravených (na VŠCHT) trilobolidových konjugátů. Časo-prostorová, molekulární a farmakologická in vitro analýza testovaných SL v kombinaci s matematickým modelováním umožní navrhnout a syntetizovat cílené analogy trilobolidu pro individuální buněčné typy. Některé dílčí výsledky jsme již publikovali. Stihli jsme připravit 2 typy konjugátů s trilobolidem. Zjistili jsme, že připravené fluorescenční konjugáty trilobolidu a konjugáty trilobolidu s porfyrinem pronikají do buněk a mají cytotoxické a imunobiologické účinky podobné trilobolidu. Intenzita účinku je ve vztahu ke struktuře konjugátu a závisí rovněž na typu sledovaných buněčných linií. Výsledky mohou být podkladem pro vývoj směrovaných léčiv zejména pro protinádorovou a imunomodulační terapii.

Práce je podporována z prostředků GAČR 303/14-04329S.

# Farmakogenomika nádorových onemocnění

doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

Laboratoř farmakogenomiky (VP2)

Pavel Souček<sup>1,2</sup>, Veronika Brynychová<sup>1,2</sup>, Radka Václavíková<sup>1</sup>, Viktor Hlaváč<sup>1,2</sup>, Marie Ehrlichová<sup>1,2</sup>, Simona Šušová<sup>1,2</sup>, Tereza Kunická<sup>1,2</sup>, Kateřina Elsnerová<sup>1,2</sup>, Beatrice Mohelníková-Duchoňová<sup>1,3</sup>, Václav Liška<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Oddělení toxikogenomiky, Státní zdravotní ústav, Praha; <sup>2</sup>Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Plzeň; <sup>3</sup>Onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc; <sup>4</sup>Chirurgická klinika Fakultní nemocnice, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Plzeň

Obecně vzato existují tři cesty jak snižovat incidenci a mortalitu nádorových onemocnění: 1) identifikovat rizikové faktory jak v genetické výbavě populace, tak oblasti expozice vnějším vlivům pracovního i životního prostředí a tyto znalosti využívat v prevenci, 2) neustále zlepšovat diagnostické a skríninkové programy za účelem odhalení nemoci v časných stádiích, nejlépe ve stavu prekanceróz, 3) zkoumat zákonitosti účinků léčby a pokoušet se je využít ku prospěchu pacientů. Laboratoř farmakogenomiky se zabývá zejména hledáním vhodných prognostických a prediktivních biomarkerů pro hodnocení přežívání a odpovědi nádorových pacientů na terapii.

Naše pracovní hypotéza vychází z předpokladu, že existují genetické, epigenetické a fenotypické markery, které korelují s výsledkem chemoterapie nádorových onemocnění. Existence těchto markerů byla naznačena řadou studií za pomoci modelových buněčných linií, transgenních zvířecích modelů a studií na tkáňových vzorcích pacientů. V předchozích projektech jsme identifikovali genetické markery, které významně korelují s prognózou i s výsledkem chemoterapie pacientů s karcinomy prsu, kolorekta, ovaria a slinivky břišní. V prezentaci budou uvedeny typické příklady studií, s jejichž pomocí budou demonstrovány skupiny studovaných genů, design studií i jejich výsledky a další směřování našeho výzkumu.

Jedním z témat našeho výzkumu je studium genetické variability v oblasti funkční domény NBD1 (nucleotide binding domain 1) kandidátního genu z předchozích studií – efluxního transportéru ABCC1 u 540 pacientek s karcinomem prsu (C50, OMIM: 114480). Variabilita, vyjádřená sadou jednonukleotidových polymorfismů pokrývajících kompletní haplotyp NBD1 s přílehlými oblastmi korelovala s molekulárním i klinickým fenotypem karcinomu prsu. Nalezli jsme vztah mezi některými polymorfismy a expresní hladinou ABCC1 v nádorové tkáni i vztahy polymorfismů k přežití pacientek. Naše studie (Kunická et al. Plos ONE 2014) tak poprvé ukázala, že genetická variabilita ve funkční doméně NBD1 transportéru ABCC1, který in vitro přenáší cytostatika (anthracykliny, taxany, apod.), významně ovlivňuje hladinu transkriptu v cílové tkáni i výsledek terapie karcinomu prsu. Naše pozorování činí z tohoto transportéru atraktivní kandidátní molekulu (biomarker) pro farmakogenomiku a eventuálně i cíl pro vývoj léčby určené ke zlepšení odpovědi pacientů na terapii.

V dalším projektu se soustředíme na validaci námi dříve pozorovaných a publikovaných poznatků o vlivu expresního profilu genů ABC (ATP Binding Cassette) transportérů na výsledky chemoterapie a přežívání pacientů s kolorektálním karcinomem (C18-21, OMIM: 114500).

Na pilotním souboru 52 pacientů v různých stádiích onemocnění jsme našli řadu kandidátů (Hlavatá et al. *Mutagenesis* 2012;27:187-96), které jsme dále sledovali na validačním souboru 70 pacientů ve stádiu II. Řadu markerů se nám podařilo validovat a nejzajímavější výsledek ukázal, že hladina ABCD4 transportéru souvisí s bezpříznakovým přežíváním pacientů. Pacienti s vysokými hladinami ABCD4 v nádorech přežívali delší dobu bez progresu než pacienti s nízkou expresí ABCD4. V součinnosti s klinickým pracovištěm nyní provádíme ověření hladin kandidátních proteinů pomocí imunohistochemie na skupině zhruba 150 pacientů.

Karcinom pankreatu (C25, OMIM: 260350) patří k nádorovým onemocněním s velmi špatnou prognózou a to zejména díky pozdní diagnostice. Chemoterapie karcinomu pankreatu je, na rozdíl od řady solidních nádorů, velmi málo účinná a ani moderní klinické studie, včetně cílených molekul, neprokázaly zásadní zlepšení přežívání pacientů. Řada studií naznačila, že expresní profil transportérů, které přenášejí léčiva, může být jednou z hlavních příčin nízké odpovědi pacientů na systémovou léčbu. V naší, zatím nekomplexnější, studii jsme stanovili expresní profil všech lidských ABC a vybraných lékových SLC (Solute Carrier) transportérů v pilotním souboru nádorových a párových nenádorových tkání u pacientů s radikálně operovaným karcinomem pankreatu (n=32). V nádorech většiny pacientů jsme, ve srovnání s párovou nenádorovou tkání, našli významně zvýšenou expresi ABC transportérů exportujících cytostatika z buněk do mezibuněčného prostoru a současně sníženou expresi SLC transportérů importujících léčiva dovnitř (Mohelníková-Duchoňová et al. *Pancreas* 2013 a *Cancer Chemother Pharmacol* 2013). Tyto výsledky podporují současnou představu o tom, že exprese transportérů přenášejících léčiva může významně modifikovat prognózu pacientů s karcinomem pankreatu. Analýze biologického mechanismu zjištěných vztahů nyní věnujeme mimořádnou pozornost.

Ve vlastním výzkumu využíváme genomické, epigenomické, proteomické a metabolomické přístupy k hodnocení biomarkerů v tkáňových preparátech pacientů dodaných klinickými pracovišti. Hlavní využití prediktivních biomarkerů vidíme v oblasti stratifikace pacientů do jednotlivých léčebných režimů. Nalezení a validace prognostických biomarkerů rovněž může přispět k vývoji terapeutik pro cílenou léčbu.

Výzkum farmakogenomiky je podporován granty GAČR P301/12/1734, IGA 14329-3, AZV 15-25618A, GAUK 1200314 a projektem CZ.1.05/2.1.00/03.0076 Evropského fondu pro regionální rozvoj.

# Výzkumná témata v Laboratoři nádorové biologie

Mgr. Pavel Pitule, Ph.D.

## Laboratoř nádorové biologie (VP2)

Mgr. Pavel Ostašov, Ph.D., Dipl.-Biol. Jana-Aletta Thiele, Eva Kralovcová, Ing. Petr Hošek, Ing. et Ing. Jiří Polívka, RNDr. Martin Pešta, Ph.D., Dr. James Hicks, MUDr. Pavel Vodička, CSc., MUDr. Ludmila Vodičková, CSc., Jan Vojtíšek, Ondřej Šorejs, Pavel Vintrých

Cílem Laboratoře nádorové biologie je přispět k poznání vzniku a vývoje maligních onemocnění, včetně způsobu jejich diseminace a tvorby sekundárních ložisek ve vzdálených orgánech. Hlavní pozornost je věnována kolorektálnímu karcinomu a glioblastomu, v dílčích projektech se věnujeme i dalším typům nádorových onemocnění. Zásadní pro naše témata je spolupráce s chirurgy, onkology a patology z Fakultní nemocnice v Plzni a s kolegy z dalších skupin v rámci Biomedicínského centra, především s pracovníky Laboratoře nádorové léčby a regenerace tkání, Laboratoře farmakogenomiky a Laboratoře kvantitativní histologie.

Současné projekty se snaží pokrýt celý proces rozvoje nádorového onemocnění od genetických a epigenetických změn při vzniku primárního nádoru až po diseminaci nádorových buněk krevním oběhem do ostatních tkání. Součástí výzkumu je také snaha o identifikaci klíčových genů a genomových oblastí pro vývoj a šíření nádoru a jejich využití pro diagnostiku a prognózu u onkologických pacientů. Z tohoto důvodu výzkum probíhá přednostně na vzorcích získaných od pacientů, nicméně pro bližší porozumění daným procesům a ověření získaných poznatků jsou doplňkově využívány i vhodné buněčné linie a zvířecí modely. Mezi současnými projekty lze zmínit například identifikaci úlohy rodiny tetraspaninových proteinů či vybraných dlouhých nekódujících ribonukleových kyselin (lncRNA) v kolorektálním karcinomu a jejich využití jako prediktivních a prognostických znaků. Tetraspaniny jsou geny kódující transmembránové proteiny s významnou úlohou při tvorbě exosomů, čímž regulují mezibuněčnou komunikaci, která je podstatná i pro rozvoj nádorového onemocnění. Někteří zástupci již mají popsané pro i proti nádorové efekty u různých typů epitelálních malignit. Cílem projektu je zmapovat expresní změnu mezi zdravou a nádorovou tkání pacientů s kolorektálním karcinomem u kompletní tetraspaninové rodiny, tedy u 33 genů, a spojit nalezené diference s rozvojem onemocnění a jeho odpovědí na podanou léčbu. Podobné cíle má i druhá studie, zaměřená na lncRNA. Zástupci této relativně nově popsané skupiny transkriptů hrají významnou roli v regulaci buněčných dějů, včetně ovlivňování tvorby proteinů pomocí regulace jejich transkripce a translace. Do studie byly zařazeny lncRNA u kterých lze na základě existující literatury nebo předpovězených funkcí předpokládat schopnost ovlivnit vývoj kolorektálního karcinomu.

Projektem, kterému je nyní věnována největší část úsilí, je detekce a charakterizace cirkulujících nádorových buněk (CTC) v krvi pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. Analýza CTC je považována za jednu z cest fluidní biopsie, která umožní z klasického krevního odběru pomocí specifické selekce nádorových buněk uvolněných do cévního řečiště získat mnoho informací o povaze nádoru, riziku vzniku sekundárních ložisek i odpovědi na podanou léčbu, to vše opakovatelně a bez rizik spojených s klasickou biopsií. Experimentálně a částečně i v klinické praxi již existují postupy pro detekci CTC, založené na počátečním obohacení vzorku o buňky epitelálního původu a odstranění lymfocytární populace. Námí testovaný postup HD-CTC, na kterém spolupracujeme s laboratoří Dr. Kuhna z USC

LA, pracuje s kompletní populací jaderných krevních buněk, čímž se vyhýbáme ztrátě potenciálních nádorových buněk, které prošly epitel-mesenchymální tranzicí a tím pádem ztratily epiteliální znaky používané běžně pro selekci cílové buněčné populace. V rámci této metody jsou potenciální CTC vyhledány na základě jejich specifických znaků detekovaných mikroskopicky s pomocí fluorescenčně značených protilátek, což umožňuje vzít do hodnocení i faktory jako je tvar buněk a jejich jader, distribuce fluorescenčního signálu v rámci buňky nebo vznik buněčných agregátů. Metoda dále umožňuje jednotlivé zvolené buňky izolovat a podrobit dalším analýzám, například celogenomovému sekvenování. V současné době probíhá sběr a příprava vzorků a zavádění jednotlivých metodických postupů. Zároveň s CTC budou izolovány a analyzovány i volně cirkulující nukleové kyseliny jako další součást fluidní biopsie. Cílem projektu je přinést metodiku schopnou průběžně sledovat účinnost léčby u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem a umožnit rychlou reakci na případný rozvoj rezistence a progresi nádorového onemocnění.

V rámci Biomedicínského centra jsou pro projekty Laboratoře nádorové biologie vytvořeny optimální podmínky z pohledu přístrojového vybavení – real-time PCR systémy, motorizovaný fluorescenční mikroskop, sekvenátor nové generace, automatická pipetovací stanice, skener mikročipů a další. O zkušenosti s jejich používáním se rádi podělíme a jsme nakloněni spolupráci nad zajímavými tématy.

# Cirkulující volná nádorová DNA – nový biomarker v onkologii

Ing. et Ing. Jiří Polívka

Laboratoř nádorové biologie (VP2)

Jiří Polívka jr.<sup>1,2,3</sup>, Filip Janků<sup>4</sup>, Martin Pešta<sup>5</sup>, Jan Doležal<sup>6</sup>, Milena Králíčková<sup>1,2</sup>, Jiří Polívka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav histologie a embryologie; <sup>2</sup>Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze; <sup>3</sup>Neurologická klinika, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze a Fakultní nemocnice Plzeň; <sup>4</sup>Department of Investigational Cancer Therapeutics, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, USA; <sup>5</sup>Ústav biologie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze; <sup>6</sup>Chirurgická klinika, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze a Fakultní nemocnice Plzeň

Přes obrovské pokroky v moderní onkologii jsou pokročilá stadia nádorových onemocnění stále velmi obtížně léčitelná. V současné éře personalizované medicíny závisí výběr léčby na detailní analýze nádorového genomu a identifikaci ovlivnitelných mutací v nádorové tkáni konkrétního nemocného. Podstatnou limitací je však získání tkáně z heterogenních oblastí nádoru. Odstraněný nádor případně biopsie z nádoru byly po dlouhou dobu jedinou možností verifikace typu nádoru a zjištění léčbou ovlivnitelných molekulárně-genetických mutací. Avšak při rozvíjející se heterogenitě nádoru zejména v jeho pokročilých stádiích by pro detekci takových mutací byly nutné opakované biopsie z primárního nádoru a z jeho metastáz, což je v praxi nemožné. Proto je velké úsilí věnováno minimálně invazivním postupům umožňujícím detekci ovlivnitelných onkogenních mutací. Jedním z nich je analýza volné nádorové DNA cirkulující v tělesných tekutinách – krvi, moči a u nádorů postihujících nervový systém případně v mozkomíšním moku. Takové metody se nazývají také fluidní biopsie, respektive „liquid biopsy“. Fluidní biopsie přináší unikátní možnost monitorovat nádorovou chorobu a její průběh v čase u individuálního nemocného. V blízké budoucnosti se fluidní biopsie pravděpodobně stane významnou součástí péče o nemocné s onkologickým onemocněním, například v časně detekci nemoci, sledování vývoje choroby v čase, predikci účinnosti cílené léčby, hodnocení její účinnosti i detekci vznikající rezistence.

Podporováno projektem Ministerstva zdravotnictví České republiky pro konceptuální rozvoj výzkumné organizace 00669806 – Fakultní nemocnice Plzeň a projektem ED2.1.00/03.0076 Evropského fondu pro regionální rozvoj.



## Výzkumné zaměření proteomické laboratoře Biomedicínského centra

Ing. Jiří Moravec, Ph.D., Ing. Zdeněk Tůma, MUDr. Jan Mareš, Ph.D.

### Proteomická laboratoř (VP1)

Proteomická laboratoř poskytuje zázemí proteomické technologie ostatním týmům BC, resp. jeho smluvním partnerům, ale také organizuje vlastní metodické, experimentální i klinické studie.

Schiffovo barvení (periodic acid –Schiff's staining-PAS) je metoda umožňující detekci glykoproteinů na elektroforetických gelech, membránách ale také v histologických vzorcích. Informace o tom zda daný protein je nebo není glykoprotein je užitečná jak kvůli volbě vhodného postupu pro další analýzu vzorku, tak při screeningovém provedení může přímo dokazovat existenci onemocnění. Samotné barvení je založeno na selektivní oxidaci cukerné části glykoproteinů kyselinou jodistou na dialdehydy, které reakcí s červeným barvivem fuchsinem vytvářejí na gelech růžové až fialové bandy nebo spoty. Původní Schiffovo barvení glykoproteinů na gelech je časově značně náročné a trvá několik hodin. Barvení histologických preparátů Schiffovým činidlem se již řadu let urychluje mikrovlnným ohřevem, tento postup ale nebyl dosud aplikován na elektroforetické gely. Tato metodická práce popisuje využití ohřevu v mikrovlnné troubě k rychlé detekci glykoproteinů na elektroforetických gelech s využitím standardního Schiffova činidla. Zjednodušený protokol se skládá z pěti kroků, které mohou být dokončeny za dobu kratší než 10 minut. Zrychlené barvení má mez citlivosti dvakrát vyšší než standardní protokol PAS (odpovídají 100 ng HRP). Po excisi a následující digesci trypsinem jsou takto vizualizované glykoproteiny identifikovatelné pomocí hmotnostní spektrometrie.

Mitochondrie jsou důležitými dodavateli energie pro procesy aktivního transportu látek v ledvinách. Změny mitochondriálního metabolismu ledvin jsou pozorovány při chorobách (např. sepsy, akutní selhání ledvin, diabetes) nebo při působení xenobiotik. Proteomika dokáže poskytnout informaci metabolismu mitochondrií při patologických stavech. Výchozím bodem pro zkoumání proteomu mitochondrií v patologických situacích je analýza mitochondriálního proteomu ve fyziologické situaci. Pro analýzu byly mitochondrie izolovány z kůry a dřeně ledviny prasete pomocí diferenciální centrifugace. Proteiny mitochondrií byly separovány dvojnásobnou gelovou elektroforézou. Proteiny, jejichž kvantita vykazovala nejméně dvojnásobný rozdíl mezi mitochondriemi kůry a dřeně, byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Enzymy beta oxidace, metabolismu aminokyselin a glukoneogeneze byly hojněji zastoupeny v mitochondriích kůry ledvin. To odpovídá většímu využití beta oxidace jako zdroje energie v kůře ledvin bohaté na kyslík. Metabolismus aminokyselin je v ledvinách soustředěn v proximálním tubulu, kde dochází k jejich reabsorpci z glomerulárního filtrátu. V mitochondriích dřeně ledviny byly nalezeny hojnější proteiny zapojené v respiračním systému, enzymy citrátového cyklu a mitochondriální poriny. Zvýšená exprese těchto proteinů byla dříve doložena u tkání a buněk reagujících na hypoxii. Výsledky odpovídají rozložení segmentů nefronu v ledvině a odrážejí dostupnost kyslíku ve tkáni ledviny. Procesy náročné na přísun kyslíku jsou soustředěny v kůře ledviny, zatímco mitochondrie dřeně jsou přizpůsobeny k udržení metabolismu v prostředí s omezenou dostupností kyslíku.

Postupy využívající různé formy mimotělního oběhu jsou čím dál tím častější v mnoha oborech moderní medicíny – od klasické hemodialýzy, přes kontinuální očišťovací metody až po membránovou oxygenaci při kardiochirurgických výkonech. Společným jmenovatelem všech těchto metod je kontakt krve s umělým materiálem a tedy nevyhnutelně také odpověď humorálních i buněčných mechanismů. Chemické vlastnosti cizorodého materiálu, kontaktní plocha, délka i opakování expozice a stav pacienta jsou hlavní faktory ovlivňující tuto reakci.

Cílem prezentované studie bylo porovnat složení proteinového biofilmu vznikajícího na povrchu hemodialyzační membrány tří moderních, biokompatibilních dialyzátorů a jeho potenciální vztah ke změnám propustnosti membrány. Během procedury byly měřeny koncentrace vybraných proteinů (molekulová hmotnost 11, 17, 21 a 27 kDa) v krvi a dialyzátu, po jejím ukončení byl proteinový biofilm vypláchnut z dialyzátoru a analyzován technikou gelové proteomiky.

Při dialýze došlo k významnému poklesu permeability všech tří dialyzátorů, a to zejména pro větší proteiny. Snížení propustnosti nebylo v přímém vztahu k celkovému množství proteinu v biofilmu. Rozdíly ve složení biofilmu mezi dialyzátory byly prokázány u 48 z 231 detekovaných frakcí. Největší rozdíl byl pozorován v případě těchto proteinů: complement factor H-related protein 3 (FHR3), insulin-like growth factor binding protein 4 (IBP4) a několika fragmentů fibrinu (FIBG, FIBB). Tyto proteiny mají vztah nejen ke koagulaci (a tedy vlastní propustnosti), ale také k aktivaci zánětu, resp. jejich deplece v důsledku procedury může mít další, nečekané dopady na pacienty.

# Úloha mitochondrií ve zdraví a nemoci

doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.

Mitochondriální laboratoř (VP1)

Ústav fyziologie, Ústav biofyziky, Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, alej Svobody 76, 323 00 Plzeň

Mitochondrie jsou membránové organely, které mají v eukaryotických buňkách mnoho funkcí. Podílejí se na procesech umožňujících obnovu a přežití buňky, ale i na dějích, které vedou k její smrti. Kromě procesu oxidační fosforylace, ve kterém je na systému proteinových komplexů ukotvených do vnitřní mitochondriální membrány získávána energie ve formě ATP, probíhá v mitochondriích celá řada metabolických dějů poskytujících elektrony respiračnímu systému nebo substráty dalších dílčích metabolických drah (Krebsův cyklus, beta-oxidace mastných kyselin, metabolismus pyruvátu, část syntézy močoviny, hemu aj.). Mitochondrie jsou také významným zdrojem kyslíkových radikálů, podílejí se na apoptóze, produkci tepla, kontrole nitrobuňčných zásob vápníku a proteosyntéze.

Poruchy funkce mitochondrií hrají rozhodující roli v patofyziologii onemocnění, která jsou primárně spjata s dědičnou nebo nově vzniklou mutací mitochondriální nebo jaderné DNA, jež vede ke změnám funkce proteinů či RNA s přímým dopadem na metabolismus mitochondrií. Primární mitochondriální onemocnění (mitopatie) postihují často komplexy respiračního systému a projevují se zejména poruchami tkání a orgánů, které mají vysokou spotřebu energie (srdce, kosterní svaly, mozek).

Sekundární mitochondriální poruchy vznikají narušením jedné nebo více mitochondriálních funkcí jiným patologickým procesem, což může vést k dalšímu zhoršení základního onemocnění. Za prokázány se má podíl mitochondriální dysfunkce na rozvoji některých neurodegenerativních poruch (Parkinsonovy nemoci, Alzheimerovy choroby). Změny v mitochondriálním metabolismu byly také zjištěny u řady dalších patologických stavů rozmanité etiologie: diabetu mellitu, srdečního selhání, chronického selhání ledvin, sepse, obezity a mnohých jiných. V mnoha případech však není jasné, zda popsání změny mitochondriálních funkcí hrají roli v dalším rozvoji základního onemocnění nebo se jedná o adaptaci, která napomáhá rozvoj choroby alespoň částečně zpomalit.

Naše laboratoř se zabývá hodnocením respirační aktivity mitochondrií v izolovaném stavu nebo in situ, tj. v chemicky nebo mechanicky permeabilizované tkáni a v izolovaných buňkách. Laboratoř je vybavena třemi oxygrafy OROBOROS, které umožňují simultánní analýzu až 6 vzorků tkáně vysoce citlivou polarografickou metodou, která je založena na měření koncentrace kyslíku v uzavřeném objemu komůrky za konstantní teploty pomocí modifikované Clarkovy elektrody, na jejíž zlaté katodě dochází k redukci kyslíku na vodu a na anodě k oxidaci stříbra. Vzniklý elektrický proud je přímo úměrný parciálnímu tlaku kyslíku v komůrce oxygrafu, který pokles koncentrace kyslíku v komůrce převádí záporně vzatou derivací vzniklé křivky na spotřebu kyslíku v  $\text{pmol}/(\text{s}\cdot\text{ml})$ . Metoda je unikátní svou citlivostí a reprodukovatelností. Přídavné moduly umožňují simultánní analýzu produkce kyslíkových radikálů a ATP a měření mitochondriálního membránového potenciálu.

Analýza spotřeby kyslíku jednotlivými komplexy respiračního systému může být podle potřeby doplněna stanovením exprese mitochondriálních proteinů metodou western blot a spektrofotometrickým stanovením aktivity některých mitochondriálních enzymů.

Mitochondriální laboratoř dosud řešila několik projektů samostatně nebo ve spolupráci s jinými pracovišti. Prvním úkolem bylo standardizovat metodiku permeabilizace vzorků tkáně kůry a dřene ledvin prasete a potkana a stanovit dobu, po jakou lze vzorky bez poškození mitochondriální funkce skladovat. Byly zjištěny výrazné rozdíly mezi respiračními parametry kůry a dřene u obou živočišných druhů i rozdílná odolnost tkání vůči chladové ischemii.

Měřili jsme také respirační aktivitu mitochondrií kůry a dřene ledvin potkana po 5/6 nefrektomii – zjistili jsme signifikantní pokles spotřeby kyslíku, výraznější ve dřeni ledvin. Hypertrofie pahýlu ledviny nebyla spojena s odpovídajícím nárůstem v respirační aktivitě mitochondrií nebo jejich počtu.

Ve spolupráci s Ústavem histologie a embryologie LF UK v Plzni jsme stanovili respirační aktivitu mitochondrií v lidských spermích, standardizovali metodiku měření a stanovili vliv propolisu na pohyblivost spermií a jejich spotřebu kyslíku. Zjistili jsme také, že u asteno-zoospermie je mitochondriální respirace výrazně snižena.

Ve spolupráci s Ústavem biologie LF UK v Plzni pracujeme na charakterizaci mitochondriální spotřeby kyslíku různých typů nádorových buněk a hledáme vztahy k metastatickému potenciálu a lokální invazivitě nádorů, od kterých jsou zkoumané linie odvozené. Výsledky podporují hypotézu schopnosti metabolické adaptace nádorových buněk a potvrzují značnou kapacitu mitochondriálního respiračního systému i v buňkách odvozených od invazivních tumorů.

Dalším řešeným projektem (ve spolupráci s I. IK FN Plzeň) bylo stanovení respirační aktivity a kapacity mitochondriálního elektrontransportního systému v kůře a dřeni ledvin prasete s experimentálně navozenou sepsí. U lehčí formy sepse, která nebyla doprovázena výraznou dysfunkcí ledvin, došlo v průběhu onemocnění ke zvýšení některých respiračních parametrů, kterému většinou předcházela zvýšená perfuze ledvin.

Na práci laboratoře se významně podílejí pregraduální i postgraduální studenti. V posledních 2 letech zkoumali vliv propofolu a thiopentalu na mitochondriální respiraci vzorků ledvin, srdce a jater a studovali vliv osmotického stresu na spotřebu kyslíku permeabilizovanou kůrou a dřeni ledvin, v nejbližší době se budou věnovat vlivu hyperbarie na produkci peroxidu vodíku a ATP v buňkách. Podílejí se také na standardizaci protokolů vhodných pro hodnocení respirační aktivity adipocytů, kardiomyocytů a trombocytů.

# Kvantitativní histologie

**doc. MUDr. Zbyněk Tonar, Ph.D.,  
Mgr. Bc. Tereze Kubíková, Bc. Markéta Šlajerová**

## Laboratoř kvantitativní histologie (VP2)

Pracovníci laboratoře vyhodnocují mikroskopickou stavbu tkáňových a orgánových bločků měkkých i tvrdých tkání. K tomu využívají systematické a nestranné vzorkování při odběru orgánů a bločků, výběru histologických řezů a mikroskopických zorných polí. Složení vzorků je vizualizováno širokou škálou přehledných barvicích metod a imunohistochemie. Z mikroskopických metod je nejvíce využíváno vyšetření ve světlém poli a polarizační mikroskopie, méně často fluorescenční mikroskopie a Nomarského diferenciální interferenční kontrast. Pomocí stereologických metod pro počítání mikroskopických objektů, měření délek, ploch, objemů, hodnocení hustoty mikrocév, plošných a objemových podílů vícefázových struktur, tortuozity vláknitých struktur a shlukování objektů je složení vzorků popsáno pomocí spojených kvantitativních proměnných.

V rámci vlastní činnosti se pracovníci laboratoře zabývají hodnocením složení cévní stěny, zánětlivé infiltrace, hojení tkání při implantaci biomateriálů a analýzou mikrocév.

V rámci smluvního výzkumu nabízí laboratoř výzkumným týmům kompletní histologickou analýzu experimentů u běžných laboratorních zvířat (potkan, myš, králík, prase, ovce) počínaje rešerší zadaného problému, návrhem designu experimentu s ohledem na jeho pozdější vyhodnotitelnost, přes formulaci testovatelných hypotéz použitelných pro zodpovězení biologické otázky, provedení pilotní studie a návrh optimální strategie vzorkování vyšetřovaných orgánů pro histologickou analýzu při maximální efektivitě výroby preparátů a současně únosnou mírou vzorkovací chyby, až po vlastní analýzu včetně fotodokumentace a základního statistického vyhodnocení morfometrických dat. K dosud realizovaným úkolům patří hodnocení snášenlivosti biomateriálů, posouzení tkáňové reakce orgánů příjemce u zvířecích modelů zkoumajících podporu hojení experimentálních defektů tvrdých i měkkých tkání in vivo, kvantifikace zánětlivé odpovědi, formování řečiště mikrocév a zrání kolagenu typu I v jizvě experimentálních defektů, posouzení rovnoměrnosti distribuce novotvořené kosti v hojících se experimentálních defektech. Další otázkou z oblasti humánní medicíny bylo vyhodnocení zánětlivého osídlení koronárních cév u explantátů lidských srdcí odebraných v rámci transplantačního programu.

Laboratoř spolupracuje s ostatními laboratořemi Biomedicínského centra a pracovišti LF UK v Plzni, zejména s Šiklovým ústavem patologie, s Chirurgickou klinikou a Klinikou zobrazovacích metod LF UK a FN v Plzni. Vypracovala metodiku morfometrie jaterního parenchymu pro hodnocení experimentů s regenerací jater či metodu kvantifikace mikrocév v centrálním nervovém systému. Pracovníci centra se v současnosti podílejí na plnění úkolů tří grantů a na projektu Prvok P36. Laboratoř využívá zázemí a podpory Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni. Metodikou a pracovními standardy odpovídají metody i výsledky laboratoře současným mezinárodně uznávaným požadavkům na publikovatelnost histologických analýz.

# Genetické a epigenetické charakteristiky DNA reparace ve vztahu k riziku a prognóze CRC

**MUDr. Pavel Vodička, CSc.**

Laboratoř nádorové biologie (VP2)

Vodička P., Vymetálková V., Slyšková J., Svoboda M., Jirásková K., Kroupa M., Vodenková S., Bártů L., Čumová A., Rejhová A., Bendová P., Naccarati A., Vodičková L

Nádory tlustého střeva a konečníku (CRC) vznikají v důsledku souhry četných genových variant s faktory životního prostředí. Některé teorie podtrhují význam somatických mutací, jiné spíše změny v zevním prostředí i mikroprostředí, ale ani jedna z nich plně nepostihuje všechny zvláštnosti a heterogenitu nádorů.

Oprava DNA je komplexní biologický proces, kontrolující genomovou instabilitu, ve kterém je arbitrárně rozlišeno několik drah: oprava jednotlivých metylovaných guaninů (MGMT), excizní (bazí a nukleotidů) dráhy BER a NER, oprava chybně spárovaných nukleotidů (MMR), homologní (HR) a nehomologní oprava (NHEJ), a oprava dvojřetězcových zlomů (DSB repair). V naší laboratoři studujeme především excizní dráhy, MMR a nově i DSB.

Dráha BER a NER opravy zajišťují genomovou integritu buněk; zamezují akumulaci mutací v rizikových genech a poškození replikační vidličky s následným replikačním stresem, genomovou a chromozomální nestabilitou (CIN). Zatímco genomová instabilita obecně představuje akumulaci mutací, CIN je komplexnějším procesem, zahrnujícím epigenetické změny nebo somatické mutace v supresorových genech (APC, TP53, SMAD nebo MUTYH) a onkogenech (KRAS, PIK3CA) spolu s poruchami HR. Fenotyp mikrosatelitní instability, charakterizovaný defekty v MMR genech a mutacemi v BRAF onkogenu, je klinickým odrazem instability genomové.

V naší komplexní studii, jsme sledovali dynamiku NER v souvislosti s léčbou CRC, neboť DNA oprava může představovat významný mechanismus rezistence vůči cytostatikům. Původně jsme do prospektivní studie zahrnuli 100 incidentních CRC pacientů, u nichž jsme odebírali krev ve třech 6 měsíčních intervalech (první odběr při stanovení diagnózy) a naměřené parametry porovnávali s hodnotami u 46 zdravých osob. DNA oprava byla charakterizována mRNA transkripcí 40 genů DNA opravy, kapacitou NER a hladinou poškození DNA. Geny NER a BER vykazují významné snížení exprese u pacientů v době diagnózy v porovnání s kontrolními osobami ( $P=0.020$ ), rovněž klesala NER aktivita ( $P=0.031$ ), zatímco poškození DNA významně vzrůstalo ( $P=0.013$ ). Při druhém odběru (po ukončení léčby) aktivita NER vzrostla ( $P=0.002$ ) nezávisle na změnách v genové expresi. V době třetího odběru se aktivita NER i hladiny genových expresí významně odlišovaly od parametrů naměřených v době diagnózy před rokem a dosáhly hladin srovnatelných s kontrolní populací. Je velmi zajímavé, že se DNA oprava po nádorové resekci a systémové léčbě postupně restituovala. Genová exprese MUTYH vzrůstala u pacientů s adjuvantní léčbou, ale byla potlačena u pacientů neléčených. Z genů NER (XPB) a BER (POLB) mRNA si udržovala konstantní expresi po dobu sledování u léčených pacientů, zatímco u neléčených byl pozorován vzestup v období odběrů.

Naše výsledky ukazují na zásadní podíl DNA opravy v etiologii CRC a molekulární profil DNA opravy v krevních buňkách může sloužit k rozlišení mezi aktivním onemocněním a zotavováním po léčbě. Podrobný rozbor výsledků ukazuje, že všem třem odběrům se podrobili pouze pacienti dobře odpovídající na léčbu, připravujeme pokračování studie na větším souboru pacientů s cílem zmapovat i osoby s nižší odezvou na terapii.

Zabýváme se rovněž epigenetickým umlčováním genů DNA reparace u pacientů s CRC, neboť aberantní DNA metylace hrají významnou roli v nádorové iniciaci. Výsledky promotrových metylací v CpG ostrůvcích u genů DNA opravy MUTYH, hOGG1 a XPC, stanovené metodou Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM) u 53 CRC pacientů, naznačují absenci aberantních metylací. V roce 2014 byla dokončena metylační array u pilotní skupiny 12 CRC pacientů (bioptické vzorky nádorů a nenádorové sliznice). Nalezli jsme významné změny v metylaci u šesti z analyzovaných 85 genů DNA reparačních drah: dva geny (NEIL1, NEIL3) hrají roli v bázeové excizní reparaci, dva (GTF2H5, CCNH) v nukleotidové excizní reparaci a dva (DCLRE1C and NHEJ1) v cestě DSB reparace (nehomologní spojování konců DNA řetězce-NHEJ).

Prakticky chybějící hypermetylace v DNA reparačních genech naznačují, že tato regulační epigenetická dráha jen málo ovlivňuje tento poměrně konzervovaný biologický systém.

MikroRNA, často deregulovány v nádorech, mají vysokou biologickou stabilitu a jsou proto slibnými kandidáty pro možné využití v diagnostice a predikci léčebné odpovědi nádorových onemocnění. MiRNA mohou ovlivňovat buněčnou odpověď na poškození DNA. V našich studiích se zaměřujeme na souhru NRF1/NFKB dráhy, drah DNA opravy a specifických miRNA v souvislosti se specifickým poškozením DNA u buněčných linií.

Naše nedávné studie na SNPs ve vazebných místech miRNA genů opravy DNA odhalili vliv některých genů DNA opravy a genů regulujících buněčný cyklus na riziko vzniku rakoviny, celkové přežití a účinnost terapie u pacientů s CRC. Varianty spjaté s rizikem CRC a/nebo celkovým přežíváním jsou rovněž funkčně testovány. Zvláště nás zajímala léčba založená na 5-fluorouracilu (5-FU), působící jednak mechanismem inhibice thymidylát syntázy, jednak inkorporací 5-FU do molekuly DNA s cytotoxickými důsledky. Ježto takto vzniklé poškození DNA je rozpoznáváno BER s participací řady genů, které mohou být post-transkripčně regulovány miRNA, studovali jsme polymorfismy ve vazebných místech miRNA v 3'UTR oblasti BER genů v souvislosti s rizikem, progresí a prognózou CRC. Nalezli jsme vztah mezi variantami v genech SMUG1 (glykosyláza odstraňující misinkorporovaný uracil v DNA) a NEIL2 (oprava oxidovaných pyrimidinů) a celkovým přežíváním u CRC pacientů. Přežívání se pak výrazně prodlužuje u pacientů s TT genotypem v SMUG1 rs2233921 genu, kteří byli současně léčeni 5-FU (Kaplan-Meyer  $p=5.6 \times 10^{-5}$ ). Vzhledem k frekvenci využití 5-FU u nádorových pacientů je tento výsledek velmi významný.

Byly zkompletovány výsledky vazebných míst v miRNA v 3'UTR oblasti genů DNA opravy (NER, BER, DSB) v souvislosti s léčbou založenou na 5-FU. Výsledky jsou v současné době ve stádiu statistického zpracování a verifikace funkční relevance SNPs v uvedených oblastech. Soustředili jsme se rovněž na úlohu interindividuální variability v kritických genech ovlivňujících odpověď na léčbu 5-FU, celkové přežívání a eventuální toxicitu u 218 CRC pacientů s výhradně adjuvantní 5-FU terapií. Zvolili jsme strategii eQTL variant, které ovlivňují expresi celé řady genů ("master regulators"). Varianta rs4846126 je spjata se sníženým jak s celkovým, tak i bezpříznakovým přežíváním. Uvedená varianta dle dostupných databází reguluje expresi 273 genů, z nichž řada souvisí s CRC a odpovědí na 5-FU léčbu.

Vzhledem k řadě nalezených rizikových a prognostických faktorů, které reflektují nádorovou heterogenicitu, další cílené studie budou nevyhnutelné.

Poděkování: CZ.1.05/2.1.00/03.0076 Evropský fond pro regionální rozvoj, GAČR: P304/12/1585, 15-14789S a 15-08239S, IGA MZČR: NT 13424, NT 14329, 14056, AZV MZČR: 15-27580A a 15-26535A, AMVIS MŠMT: LH13061 a COST.cz MŠMT: LD14050.



# Recentní výzkum v oblasti transplantace a náhrady funkce ledvin

doc. MUDr. Tomáš Reischig, Ph.D.

## Laboratoř transplantace ledvin a náhrady funkce ledvin (VP1)

Reischig T, Kačer M, Eiselt J, Kielberger L, Richtrová P

Hlavní směry výzkumu v oblasti transplantologie zahrnují detailní rozpoznání vlivu cytomegalovirové a dalších virových infekcí na poškození štěpu na úrovni klinické, histologické a imunologické včetně změn reaktivity lymfocytů na dárcovsky specifickou stimulaci. V klinických studiích jsou testovány různé způsoby prevence cytomegalovirové infekce s přesahem na dlouhodobé dopady užití prevence na poškození štěpu a na určení imunologických dopadů. Recentní randomizované studie naší skupiny prokázaly z dlouhodobého pohledu výhody preemptivní léčby cytomegalovirové infekce v porovnání s univerzální profylaxí. Další práce jako první v klinické praxi podpořila imunosupresivní vlastnosti valgancicloviru, který je užíván v protivirové léčbě.

V oblasti biokompatibility dialyzační léčby a uremické toxicity je cílem výzkumu rozpoznání vlivu dialyzační léčby a přídatné léčby (např. léčby anémie nebo poruch kalciofosfátového metabolismu) na vnímavost pacienta k infekčním komplikacím. U chronicky dialyzovaných jsou testovány způsoby regionální antikoagulace s cílem snížit aktivaci hemostázy a inflamaci během dialýzy. V poslední době byly publikovány výsledky prokazující prognostický význam asymetrického dimethylargininu v progresi chronického onemocnění ledvin. V další práci bylo ukázáno, že užití nového dialyzačního roztoku obsahujícího kyselinu citronovou nedosahuje uspokojivých výsledků v regionální antikoagulaci při dialýze.

# Modelování mikro- a makro-cirkulace jaterního parenchymu jako nástroj jeho virtuální resekce

MUDr. Václav Liška, Ph.D.

Laboratoř nádorové léčby a regenerace tkáně (VP2)

MUDr. Václav Liška, Ph.D.<sup>1,2</sup>, MUDr. Hynek Mírka, Ph.D.<sup>2,3</sup>, doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.<sup>4,2</sup>, MUDr. Lada Eberlová, Ph.D.<sup>5,2</sup>, Ing. Miroslava Svobodová, Ph.D.<sup>1,2</sup>, prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.<sup>1</sup>, MUDr. Jan Brůha<sup>1,2</sup>, MUDr. Ondřej Vyčítal<sup>1,2</sup>, MUDr. Jaroslav Ludvík<sup>3</sup>, Martin Skála<sup>1,2</sup>, Richard Pálek<sup>1,2</sup>, Kristýna Bajcurová<sup>3</sup>, prof. Ing. Josef Rosenberg, DrSc.<sup>6,7</sup>, prof. Ing. Jiří Křen, CSc.<sup>6,7</sup>, prof. Dr. Ing. Eduard Rohan, DSc.<sup>6,7</sup>, doc. Dr. Ing. Jana Klečková<sup>7,8</sup>, doc. Ing. Jan Vimmr, Ph.D.<sup>6,7</sup>, doc. Ing. Miloš Železný, Ph.D.<sup>7,9</sup>, Ing. Vladimír Lukeš, Ph.D.<sup>6,7</sup>, Ing. Alena Jonášová, Ph.D.<sup>6,7</sup>, Ing. Miroslav Jiřík<sup>7,9</sup>, Ing. Tomáš Ryba<sup>7,9</sup>, Ing. Petr Včelák<sup>7,8</sup>, Ing. Michal Kratochvíl<sup>7,8</sup>, Ing. Jana Turjanicová<sup>6</sup>, Jaroslava Brašnová<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Chirurgická klinika, Fakultní nemocnice Plzeň a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni;

<sup>2</sup>Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni; <sup>3</sup>Klinika zobrazovacích metod, Fakultní nemocnice Plzeň a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni; <sup>4</sup>Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni; <sup>5</sup>Ústav anatomie, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni; <sup>6</sup>Katedra mechaniky, Fakulta aplikovaných věd, Západočeská univerzita v Plzni; <sup>7</sup>Nové technologie pro informační společnost, Evropské centrum excelence, Fakulta aplikovaných věd, Západočeská univerzity v Plzni; <sup>8</sup>Katedra informatiky a výpočetní techniky, Fakulta aplikovaných věd, Západočeská univerzita v Plzni; <sup>9</sup>Katedra kybernetiky, Fakulta aplikovaných věd, Západočeská univerzita v Plzni.

Interdisciplinární výzkum využívající poznatků z technických a medicínských vědních disciplín – informatika, kybernetika, mechanika, matematika, anatomie, histologie, radiologie a chirurgie – může v úzké synergii s klinickou praxí výrazně zefektivnit indikaci většího počtu pacientů s maligními procesy v játrech k resekčnímu zákroku. To je také dlouhodobý cíl spolupráce mezi ústavem Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni profilujících se ve výzkumných programech přidruženého Biomedicínského centra, klinik Fakultní nemocnice Plzeň s výzkumnými pracovišti Západočeské univerzity v Plzni profilujících se ve výzkumných programech Evropského centra excelence Nové technologie pro informační společnost. Záměrem mezioborové a meziuniverzitní spolupráce je vývoj softwaru LISA (Liver Surgery Analyser), který by měl být využitý jak v klinické praxi, tak v experimentální chirurgii. Klinicky testovaný software LISA nabídne v předoperační fázi radiologům a chirurgům tzv. virtuální resekci jater pro usnadnění rozhodnutí o možném typu a provedení kurativní léčby. V experimentální chirurgii zefektivní především zpracování obrazových dat během histologického vyšetření vzorku tkáně – morfologie mikrovaskularity, klasifikace mikrostruktury jaterního parenchymu včetně maligních útvarů.

Během několika let interdisciplinárního výzkumu řady evropských výzkumných center se díky prostorové segmentaci a následné rekonstrukci jater a příslušného cévního řečiště ukázalo, že segmentace jater podle tzv. Coinaudových segmentů není dostatečná v předoperačním plánování resekčního zákroku. Naším cílem je podílet se na výzkumu, který povede k nalezení optimální resekční linie respektující rozdíly v segmentaci jater u každého pacienta podle anatomie cévního zásobení jater. Náš výzkum se opírá o informace nejen z makro- ale i z mikro-úrovně cévního stromu. Přestože se objevuje celá řada volně do-

stupných nebo komerčních softwarů, které nabízí segmentaci obrazových dat z počítačové tomografie (CT) a magnetické rezonance (MRI), došli jsme k závěru, že v případě našeho mezioborového výzkumu se pokusíme o realizaci vlastního segmentačního modulu. Výhodou našeho rozhodnutí je možné využití softwaru jak pro klinické tak experimentální účely.

Největší pozornost v současném klinickém využití vyvíjených submodulů softwaru LISA byla věnovaná segmentaci jater z DICOM dat z CT abdominální oblasti pacientů. Na souboru 30 plně anonymizovaných DICOM dat byla testovaná metoda Graph-cut nabízející jako jedna z mnoha segmentačních metod tzv. interaktivní segmentaci. Interaktivní segmentace byla vyžádána experty z Kliniky zobrazovacích metod FN. Interaktivní segmentace na rozdíl od automatické segmentace se při segmentaci jater zdá výhodnější. K tomuto faktu se přiklánějí mimo jiné i výsledky soutěže SLIVER07 ([www.sliver07.org](http://www.sliver07.org)), kde přední místa zaujímají softwary nabízející právě interaktivní segmentaci. Použití automatické segmentace při segmentaci jater z abdominální oblasti je omezené variabilitou anatomie jater mezi pacienty a také densitou míry absorpce a rozptylu záření konkrétních voxelů pořízeného obrazu jater a okolních naléhajících orgánů (srdce, slinivka břišní, ledviny, atd.) ve venózní fázi pořízených CT dat.

Vedle klinického testování prošli některé submoduly softwaru LISA srovnáním s výsledky z histologického měření. Především vyvíjený histologický analyzátor, který nabízí urychlení a usnadnění prostorového zpracování mikro-CT dat korozivních preparátů. Při vývoji tohoto submodulu se přihlíží ke kvantitativnímu popisu mikrostruktury korozivních preparátů prasat. Vedle manuálního vyhodnocení vzorku, histologický analyzátor nabízí automatické vyhodnocení a tím podstatně zkracuje čas zpracování z několika let na minuty. Nabízí vyhodnocení délkové a objemové hustoty cév, objemový podíl cév, povrchovou hustotu cév, měření křivosti (tortuozity) úseků cév mezi bifurkacemi a stanovení výskytu počtu bifurkací ve vzorku. Histologický analyzátor je důležitým mezikrokem od pracovního pořízení korozivního preparátu jater k matematickému a počítačovému modelování perfuze jater s uvažováním mikrostruktury cévního řečiště. Segmentace cév z mikro-CT dat vzorku korozivního preparátu je provedena metodou narůstání oblastí patřící do skupiny metod označených „region growing“. Dále probíhá skeletonizace cév (pro zjednodušení modelu) – reprezentace cév jejich střednicí, která převede prostorový model na zjednodušený jednodimenzionální model. Stejně jako v případě ostatních submodulů softwaru LISA i zde probíhají morfologické operace pro odstranění šumu pořízeného obrazového signálu – vyhlazení. Dalším plánovaným krokem je využití stereologického přístupu k možnému morfologickému určení prostorové propustnosti tj. poréznosti jaterního parenchymu a doplnění chybějící informace pro matematické a počítačové modelování perfuze jaterním parenchymem s cílem optimalizovat návrh virtuální resekční linie pro konkrétního pacienta.

V Plzeňském kraji byla navázaná úspěšná spolupráce mezi fakultami dvou regionálních univerzit, která je především orientovaná na klinickou i experimentální chirurgii jater. Během několika let došlo k výraznému pokročení v počítačovém a matematickém modelování s cílem zefektivnit předoperační fázi resekce jater. Některé dílčí kroky jsou stále jen součástí vědeckého výzkumu, což je dáno komplikovaností jaterního cévního systému a také řadou nejasností fyziologické i patologické funkce jater. Přesto se podařilo přistoupit i ke klinickému testování, které nabízí důležitou zpětnou vazbu správné volby technického postupu při aplikaci v medicíně.

Všechny kroky mezioborového výzkumu se vzájemně prolínají. Dílčí výstupy a úspěchy v řešení otázek vyplývajících z častých diskusí nad komplikovanou úlohou nás neustále

stimulují k objevování nových horizontů s nadějí na úspěšné řešení stanoveného cíle, tj. nabídnout většímu počtu pacientů resekční zákrok a tím reálně prodloužit délku jeho života.

Související publikace:

[<sup>1</sup>] A. Králíčková, L. Eberlová, K. Kalusová, T. Gregor, P. Kochová, V. Liška, M. Králíčková, Z. Tonar (2014) Quantification of liver microcirculation using X-ray microtomography of vascular corrosion casts, *Key Engineering Materials Vols. 592-593* (2014) pp 505-508 ©Trans Tech Publications, Switzerland doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.592-593.505

[<sup>2</sup>] V. Lukeš, M. Jiřík, A. Jonášová, E. Rohan, O. Bublík, R. Cimrman (2014) Numerical simulation of liver perfusion: from CT scans to FE model. arXiv preprint arXiv 1412.6412.

[<sup>3</sup>] M. Jiřík, M. Svobodová, V. Lukeš, H. Mírka, P. Hošek, V. Třeška, V. Liška (2015) Liver Surgery Analyzer (LISA) – software tailored for individual diagnostic approach, *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery*, podaný k recenznímu řízení.

[<sup>4</sup>] Paoluzzi A, DiCarlo A, Furiani F, Jirik M (2015) CAD models from medical images using LAR. *Computer Aided Design*, podaný k recenznímu řízení.

Podané mezinárodní projekty – mezinárodní spolupráce:

[<sup>A</sup>] Prometheus (2012), 7.rámcový program, prof.Ebroul Izquierdo, Queen Mary University of London, Londýn, Velká Británie

[<sup>B</sup>] Diadem (2014), PHC10 – Horizont 2020, prof.Ebroul Izquierdo, Queen Mary University of London, Londýn, Velká Británie

[<sup>C</sup>] TreatMore (2014), Teaming – Horizont 2020, MUDr. Václav Liška, Ph.D., Fakultní nemocnice Plzeň a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni

[<sup>D</sup>] Liver A.I.D. (2015), Twinning – Horizont 2020, MUDr. Václav Liška, Ph.D., Fakultní nemocnice Plzeň a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni

# Prasečí model hojení excizní rány experimentálně infikované vícedruhovým bakteriálním biofilmem

**Ing. Pavel Klein, Ph.D.**

Laboratoř preklinických studií (zvěřinec)

Cílem studie bylo vyvinout klinicky relevantní model hojení chronické infikované rány u prasete. Model byl ověřen na 10 miniprasatech, kterým bylo na každé straně, v dorsolaterální krajině vytvořeno 5 plnoprofilových excizií 25 × 25 mm. Rány 6 pokusných prasat byly experimentálně infikovány cca 500 mg in vitro předkultivovaného biofilmu typu Lubbock sestávajícího ze 4 izolátů bakterií získaných z lidských chronických ran: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus subtilis*. Rány byly po dobu 24 dnů 2× týdně převazovány a monitorovány. Biopsie pro histologické a mikrobiologické analýzy a genovou expresi byly odebírány ve dnech 3, 7, 10, 14 a 24. Bakteriální biofilm se v ránách udržel po 2 týdny, přičemž jeho přítomnost signifikantně narušila proces hojení. Plocha rány (jako % zhojené plochy z původní plochy ve dnu 0) byla u kontrolních a infikovaných zvířat 45 vs. 21, 66 vs. 37 a 90 vs. 57 ve dnech 7, 10 a 14. Histologické vyšetření i analýza exprese genů v biopsiích infikovaných ran potvrdily prodloužení zánětové fáze, zpomalený nástup granulace a produkce i maturace extracelulární matrix. Vzhledem k podobnému mechanismu hojení ran u člověka a prasete je možno takto koncipovaný model využít jak při preklinickém testování krytů ran, tak i pro studium patogeneze infikované rány.

# Výzkumné zaměření Laboratoře buněčné regenerativní medicíny

Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D.

## Laboratoř buněčné regenerativní medicíny (VP2)

Vištejnová L., Zímová I., Miklíková M., Holubová M., Lysák D., Králíčková M.

Výzkum v Laboratoři buněčné regenerativní medicíny je zaměřen do čtyř oblastí – a) studium mechanismů působení mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v regeneraci tkáně obecně; b) studium využití MSC v regeneraci jater; c) studium účinků MSC na reparaci funkce poškozených kardiomyocytů; a d) studium role dermálních fibroblastů v procesu hojení rány.

Konkrétně nás zajímá, jak jsou MSC stimulovány k zahájení reparačního procesu, jak jsou nasměrovány do místa poškození, a jak probíhá proces samotné regenerace, tj. zda se uplatňuje diferenciace MSC do specifického buněčného typu, nebo zda MSC regulují proces regenerace produkcí růstových faktorů, cytokinů a dalších aktivních molekul. V regeneraci jaterního parenchymu zkoumáme, zda MSC mohou podporovat obnovu funkce jater poničených biliární obstrukcí. U poškozených kardiomyocytů nás zajímá, zda ko-kultivace s MSC, popřípadě působky produkované MSC, vedou ke zlepšení jejich fyziologických projevů. A v případě dermálních fibroblastů studujeme jejich schopnost zapojit se do regulace procesu hojení rány a zajímá nás, zda mohou dermální fibroblasty přispívat k persistenci chronického zánětu v ráně.

K výzkumu využíváme běžně zavedené metodiky buněčné izolace a kultivace včetně možnosti modelování hypoxického prostředí rány. Diferenciaci buněk, jejich expresní změny a funkční projevy můžeme studovat metodami molekulární biologie včetně kvantitativní real-time PCR, microarray technologie, průtokové cytometrie, western blotu či imunoprecipitačních technik (ELISA, Luminex). Změny v genetickém profilu můžeme detekovat pomocí sekvenace nové generace a důležité povrchové i intracelulární markery sledujeme s využitím světelné, fluorescenční a konfokální mikroskopie.

Prvním cílem našeho výzkumu je poznání, zda MSC, současný fenomén regenerativní medicíny, mohou skutečně pomáhat v obnově funkcí poškozených tkání, a pokud ano, jaké mechanismy jsou zapojeny. V případě, že by výsledky zdárně vedly k pozitivnímu efektu, dalo by se o MSC uvažovat jako o vhodném a snadno dostupném terapeutickém postupu. Druhým cílem našeho výzkumu je popsat nové role dermálních fibroblastů v procesu vzniku a persistence chronické rány, neboť je fibroblastům přiřazována nejen proteosyntetická funkce, ale za stresových podmínek jsou rovněž producenty regulační zánětlivých molekul. Porozumění tomuto chování fibroblastů umožní zahrnout je to strategií vývoje nových terapií chronických ran.

# Laserová mikrodisekce a její využití při studiu genové exprese

doc. MUDr. Magdalena Chottová Dvořáková, Ph.D.

Laboratoř laserové mikrodisekce (VP1)

M. Chottová Dvořáková<sup>1,2</sup>, E. Mistrová<sup>1,2</sup>, Jana Slavíková<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav fyziologie; <sup>2</sup>Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, Plzeň

Mikrodisekce za pomoci laseru byla vyvinuta v polovině devadesátých let minulého století skupinou amerických vědců v čele s dr. Emmert-Buckem<sup>1</sup>. Přibližně ve stejné době bylo podobné zařízení vyvíjeno i v Evropě, a to malou německou firmou na mikroskopu značky Zeiss. V současnosti působí na trhu několik firem dodávajících tato zařízení. Přístroje od jednotlivých dodavatelů se od sebe odlišují technologií vlastní disekce vzorku i jeho následného transportu do sběrací zkumavky. V biomedicínském centru se nachází zařízení od firmy Olympus.

Význam mikrodisekce pro výzkum je značný, protože umožňuje zkoumat konkrétní buňku, a to nejen její morfologii, ale využít při jejím studiu i molekulárně biologické metody, např. reverzní transkripci následovanou polymerázovou řetězovou reakcí sledovanou v reálném čase (RT-qPCR) díky níž lze stanovit úroveň exprese konkrétních genů. Kromě mRNA však můžeme z takto získaných vzorků analyzovat i DNA či proteiny. Dokonce je možné z vybrané buňky získat pouze její část, buněčnou organelu či chromozom. Buňky či jejich části můžeme pomocí laserové mikrodisekce získávat jak z tkáňových řezů, tak i z buněčných kultur.

Před vyvinutím této metody se analýzy prováděly výhradně z homogenátů tkáně, zatímco dnes je možné zacílit pozornost na konkrétní populaci buněk. Cílové buňky lze určit dle jejich morfologických znaků na řezech barvených hematoxylin-eozinovým barvením nebo je můžeme určit pomocí imunofluorescenčního značení. Jedním z klasických příkladů praktického využití laserové mikrodisekce je vyříznutí a následná analýza nádorových buněk. Kromě toho tato zařízení umožňují manipulaci s živými buňkami z buněčných kultur. Díky tomu je možné získat homogenní kulturu z kultury původně obsahující buňky více typů.

Při studiu srdce lze laserovou mikrodisekcí využít například na stanovení exprese genů pro různé mediátory či receptory v jednotlivých buněčných populacích.

Cílená analýza konkrétních buněk vybraných z tkáňového řezu například na základě morfologických odlišností umožňuje lepší pochopení dějů probíhajících v těchto buňkách, což může následně umožnit vývoj cílené terapie. Využití této metody je široké, od základního výzkumu až po analýzu patologických buněk.

1 Emmert-Buck MR; Bonner RF; Smith PD; Chuaqui RF; Zhuang Z; Goldstein SR, et al. Laser capture microdissection. Science. 1996;274(5289):998-1001.

# Léčivé přípravky moderní terapie v hemato-onkologii

doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D.

Laboratoř buněčné regenerativní medicíny (VP2)

Alogenní transplantace hemopoetických buněk je pro řadu pacientů s hemato-onkologickými onemocněními jedinou kurativní modalitou. Přes nespornou efektivitu tohoto léčebného postupu se u části nemocných mohou v potransplantačním období rozvinout závažné komplikace zahrnující zejména reakci štěpu proti hostiteli (GVHD) nebo relaps nádorového onemocnění. Cílem výzkumu v oblasti buněčné terapie, který se realizuje na Hematologicko-onkologickém oddělení, je vývoj a následná aplikace léčivých přípravků moderní terapie, které by měly pomáhat zvládnout komplikace po alogenní transplantaci, zlepšit kvalitu života a přežití transplantovaných nemocných.

Aplikace mesenchymálních stromálních buněk (MSC) a využití jejich imunomodulačních vlastností (potlačení aktivity a proliferace lymfocytů) je jednou z moderních experimentálních metod léčby resistantních forem GVHD. V současnosti probíhá na Hemato-onkologickém oddělení klinické hodnocení, v rámci kterého je pacientům s GVHD aplikován léčivý přípravek obsahující MSC. Tyto buňky jsou získány od zdravých dárců kostní dřeně a následně namnoženy v in vitro podmínkách. Po aplikaci MSC se sleduje klinická odpověď ve smyslu zmírnění závažnosti GVHD a snížení dávky imunosuprese a analyzují se také změny laboratorních imunologických parametrů.

NK buňky jsou součástí nespecifické imunitní odpovědi a jsou jednou z hlavních složek protinádorové imunity. Přípravovaná klinická studie se zabývá využitím jejich možného protileukemického efektu. Vývoj léčivého přípravku využívajícího NK buňky může být příslibem pro budoucí léčebnou strategii u pacientů s relabujícím onemocněním. Buňky budou izolovány od pacientů zhruba 1–2 měsíce po transplantaci a následně in vitro expandovány a aktivovány. Kryokonzerované NK buňky budou aplikovány v případě relapsu onemocnění nebo v rámci jeho prevence. Cílem bude navození resp. udržení dlouhodobé remise onemocnění, nejčastěji akutní leukémie. Po dokončení optimalizace výrobního protokolu se bude připravovat klinické hodnocení pro tuto terapii.

Mezi nejnovější terapeutické postupy moderní imunoterapie patří léčba hemato-onkologických onemocnění pomocí T-lymfocytů exprimujících chimerický antigenní receptor (CAR). Tento postup je založen na izolaci T-lymfocytů a následné in vitro transfekci, která vnese do genomu T-lymfocytů sekvenci DNA kódující upravený povrchový receptor specificky reagující v našem případě s CD19+ buňkami. Po několika týdenní expanzi in vitro se takto upravené buňky vrátí zpět do organismu pacienta, kde mají specificky zabít buňky exprimující CD19 antigen. Tento postup by měl být využitelný k léčbě relabujících a resistantních forem B-lymfoidních neoplazií (chronická lymfocytární leukémie, akutní lymfoblastická leukémie). V současné době probíhají preklinické testy a optimalizace protokolu přípravy CAR T-lymfocytů.

Léčivé přípravky moderní terapie se mohou v budoucnu stát standardní součástí léčebných strategií hematologických malignit. Jejich aplikace povede ke zvýšení efektivity terapie, k její větší individualizaci a také zvýší šance na úspěšné vyléčení nádorového onemocnění krvetvorby.



# Folikulární tekutina – její význam pro kvalitu oocytů a její přínos pro predikci úspěšnosti léčby neplodnosti

doc. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D.

Laboratoř buněčné regenerativní medicíny (VP2)

Králíčková M.<sup>1,2,3</sup>, Zech N. H.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta v Plzni Univerzity Karlovy v Praze; <sup>2</sup>Bio-medicínské centrum, LF UK a FN v Plzni; <sup>3</sup>Gynekologicko-porodnická klinika, LF UK a FN v Plzni; <sup>4</sup>Institut reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Centra – Prof. Zech, Plzeň

Neplodnost, která v současné době postihuje 10–15 % párů v reprodukčním věku se bohužel stává společenským problémem. Léčba neplodnosti, ani přes rychlý rozvoj metod asistované reprodukce, nedosahuje uspokojivých výsledků – při prvním kole in vitro fertilizace se úspěšnost, tedy tzv. pregnancy rate, pohybuje maximálně okolo 40 %. Studium gamet, průběhu a mechanismů fertilizace, rýhování a implantace tak stojí ve středu zájmů reprodukčních biologů.

Folikulární tekutina (FT) představuje mikroprostředí, které zásadním způsobem ovlivňuje vývoj oocytu. Na jejím vzniku se podílí transport prvků krevní plasmy přes folikulární bariéru a sekreční aktivita thény a buněk granulózy. Biochemické složení FT hraje zásadní roli pro kvalitu oocytu a pro jeho schopnost fertilizace. FT obsahuje řadu hormonů, interleukinů, růstových faktorů a dalších působků.

Prezentovány budou výsledky analýz vybraných hormonů, cytokinů a parametrů oxidačního stresu u 164 žen v reprodukčním věku – u 103 žen s poruchou plodnosti a u kontrolní skupiny zdravých a plodných 61 dárek oocytů. Mezi skupinou neplodných a kontrolních žen byly nalezeny ve folikulárních tekutinách statisticky signifikantní rozdíly v hladinách prolaktinu, tyroxinu, homocysteinu a také celkové antioxidační kapacity (TAC). Tyto byly korelovány s řadou klinických charakteristik a také s vývojem oocytů a dosažením těhotenství díky léčbě. Z výsledků vyplývá, že oxidační stres a hormonální složení FT ovlivňuje kvalitu oocytu. TAC lze pokládat za biomarker nejen pro kvalitu oocytů, ale také pro časný embryonální vývoj, neboť koreluje s fragmentací uvnitř blastomer při vývoji embrya a také se schopností embrya pokračovat ve vývoji až do stádia blastocysty. Biochemické pochody v peri-fertilizačním období mají vliv na další vývoj až do dokončení případné implantace embrya.

# Paměť a její neuronální mechanismy ve zdraví a nemoci

MUDr. Karel Ježek, Ph.D.

Laboratoř experimentální neurofyzologie (VP2)

Cílem pracoviště je pochopení procesů zpracování neuronální informace v mozkových strukturách souvisejících s paměťovými a kognitivními funkcemi. Tato témata jsou řešena na úrovni jednotlivých neuronů a jejich sítí, případně pak celých systémů mozku.

Hlavním projektem pro příštích několik let je studium mechanismů aktivace již uložených vzpomínek v paměťových centrech mozku. Nedávno jsme identifikovali časovou mikrokinetiku aktivace paměťového stavu, objevem kvantového charakteru vyhodnocování vzorce prostorové paměti. Tento proces je časově diskretizován theta oscilací (8–11 Hz), globálním rytmem, který synchronizuje aktivitu mezi vzdálenými oblastmi mozku. Kinetiku aktivace paměti jsme dosud popsali pouze v neuronové síti hipokampu, jež vyhodnocuje přicházející informace ze senzorů a přiřazuje jí nejbližší uložený paměťový vzorec. Hypotetizujeme, že tato změna paměťového stavu se následně musí kaskádovitě šířit skrze paměťový okruh směrem k efektorovým oblastem mozku. Mechanismus její propagace je však zcela neznámý. Navazující projekty tedy směřují k popisu principu šíření aktivace paměťového stavu napříč zřetěženými mozkovými oblastmi a k identifikaci regulační role mozkových oscilací theta a gamma spektra.

Paralelně začínáme studovat mechanismus postižení paměťových funkcí na buněčné a populační úrovni u Alzheimerovy choroby (AD). Přestože tomuto onemocnění je celosvětově věnováno značné výzkumné úsilí, funkční poruchy na úrovni neuronů a jejich populací jsou prostudovány minimálně. Projekt probíhá na zcela novém potkaním modelu TgF344 AD, který je založen na lidských transgenech pro Amyloid precursor protein a Presenilin 1, spojených s časným rozvojem AD. Po nezbytném rozšíření a zestárnutí zvířecí kolonie budeme zkoumat především počáteční stadia onemocnění jak funkčně, tak neuroanatomicky (ve spolupráci s kolegy z Kavli Institute for Systems Neuroscience v Trondheimu, Norsko). Testujeme hypotézu, že během časných fází rozvoje Alzheimerovy choroby dochází k paměťovým defektům vlivem poruch v synchronizaci aktivity (a tedy ve vzájemné komunikaci) mezi jednotlivými částmi paměťového systému mozku.

Základní metodou našeho výzkumu je registrace aktivity jednotlivých neuronů zanořenými mikroelektrodami při řešení paměťových úloh a následná matematická analýza získaného neuronálního kódu. V budoucnu se chceme věnovat novým metodám registrace jednotkové aktivity pomocí implantovaných mikroskopů, umožňujících současné sledování o řád vyššího počtu neuronů.

# Funkční projevy cerebelárních degenerací a jejich neurotransplantační terapie u myších modelů hereditárních ataxií

MUDr. Jan Cendelín, Ph.D.

Laboratoř neurodegenerativních poruch (VP2)

Jan Cendelín, Jan Tůma, Pavel Ostašov, Yaroslav Kolinko, František Vožeh

Hereditární mozečkové ataxie představují heterogenní skupinu neurodegenerativních onemocnění s různou dědičností a rozmanitou patogenezi. Jedná se o onemocnění výrazně zasahující do kvality života pacienta, pro něž dosud neexistuje účinná kauzální terapie. Rozmanitost cerebelárních degenerací se odráží i ve spektru myších modelů, které jsou nástrojem výzkumu onemocnění samotných, jejich terapie a také role mozečku nejen v motorických funkcích, ale i v kognitivních a afektivních procesech a v kontrole chování. Experimentální terapie hereditárních mozečkových ataxií se kromě symptomatické léčby zaměřuje na snahu zastavit progresi nemoci cíleným ovlivněním klíčových kroků patogenetického procesu nebo na náhradu zaniklých neuronů neurotransplantací.

Nejčastěji užívanými modely dědičných degenerativních postižení mozečku jsou mutantní myši Lurcher a Purkinje cell degeneration (pcd). Myši Lurcher jsou heterozygoti pro mutaci  $Grid2^{lc}$  v genu kódujícím delta2 glutamátový receptor. Primárním důsledkem mutace je rychlá a prakticky kompletní degenerace Purkyňových buněk mozečku. Druhotně pak ubývá granulárních buněk a neuronů dolní olivy. Myši pcd jsou homozygoti pro mutaci  $Agtpb1$  v genu kódujícím protein CCP1. Trpí rovněž ztrátou Purkyňových buněk, redukcí dolní olivy a pomalou degenerací Purkyňových buněk. Navíc u nich dochází k degeneraci čichového bulbu, thalamu a k pomalu progredující retinální degeneraci.

Srovnání chování obou typů mutantů ukázalo rozdíly ve vzorci explorační aktivity a výraznější tendenci k tzv. depressive-like behavior u myší pcd. U obou typů mutantů byl zjevný deficit navigace v Morrisově vodním bludišti, avšak výkon myší pcd byl výrazně horší. Zatímco myši pcd selhávaly i v testu s viditelným cílem, u mutantů Lurcher se zdá být visuomotorická integrace částečně zachovaná. U mutantů Lurcher jsou projevy onemocnění ovlivněny i genetickým pozadím daným základním kmenem laboratorní myši. Přestože funkční změny dané mutací jsou velmi výrazné, je výsledný fenotyp součtem vlivu mutace a kmenově specifických vlastností. Ve výsledném chování jedinců postižených poruchou mozečku se patrně promítá deficit kognitivních, motorických, afektivních i senzorických funkcí, které se navíc vzájemně ovlivňují, a specifický podíl jednotlivých složek poruchy není dosud zcela jasný.

Mezi mutanty Lurcher a pcd byly pozorovány i rozdíly ve vývoji transplantované embryonální mozečkové tkáně. U myší pcd docházelo k prorůstání axonů z transplantátu do hlubokých mozečkových jader příjemce a ke kolonizaci molekulární vrstvy transplantovanými Purkyňovými buňkami podobně jako u zdravých myší. U mutantů Lurcher však transplantát obvykle zůstával ostře ohraničený. Transplantace embryonální tkáně mozečku dospělým myším Lurcher vedla pouze k mírnému zlepšení parametrů chůze. Zlepšení v klasických testech motoriky popisované u myší pcd jsme u myší Lurcher nepozorovali. Přežívání různých typů transplantátu je však u myší Lurcher velmi dobré i po několika měsících od operace. Embryonální tkáň mozečku ve formě solidního transplantátu i buněčné suspenze je

zdrojem četných Purkyňových buněk. Naproti tomu embryonální neurální kmenové buňky nejevily tendenci k diferenciaci v Purkyňovy buňky.

Dva různé typy mozečkových mutantů s velmi podobnou cerebelární degenerací se liší jak v dílčích aspektech funkčních projevů onemocnění, tak ve vývoji transplantátu aplikovaného do oblasti degenerací postiženého mozečku. Lze tedy předpokládat existenci faktorů specifických pro jednotlivá, byť velmi podobná onemocnění, které mohou modifikovat projevy poškození mozečku i úspěšnost terapie a jejichž znalost by mohla napomoci k vývoji cílenější terapie a predikci její účinnosti u jednotlivých forem cerebelárních degenerací.

# Biofyzikální laboratoř

MUDr. Jiří Beneš

## Laboratoř biofyziky (VP1)

Pracoviště sdružuje dvě základní linie své aktivity.

Jednou touto linií je, obecně řečeno, „chlazení kapalin“, odvíjející se již od účasti pracoviště v rámci výzkumného záměru MSM0021620819 „Náhrada a podpora funkce některých životně důležitých orgánů“ (do r. 2011) a později v rámci PRVOUK P36 LF v Plzni, kdy vznikla potřeba vývoje specifického chladicího přístroje.

V posledním období je možno zmínit následující:

Aktivity spojené s vývojem, průmyslovou výrobou a ochranou duševního vlastnictví tepelného výměníku a prodejem licence na využívání jeho patentu.

Na podporu řešení problematiky chlazení jsme získali dotaci 6 mil. Kč v rámci individuální aktivity „Tepelný výměník s laminarizérem“ projektu UK v OP VaVPI „Podpora pre-seed aktivit UK mimo Prahu (CZ.1.05/3.1.00/13.0284)“. Projekt běží od 1.11.2012 a končí v červnu 2015, proto jeho výsledky dedikujeme také do BC. V rámci projektu byl vyvinut výrobní prototyp a ověřena malosériová výroba výměníku (cca 600ks) ve výrobním podniku, kde jsme pracovali od února 2013 do března 2014.

Ve spolupráci s CPPT UK a projektovým týmem pre-seed jsme výměník prezentovali na vlastním výstavním stánku na výstavě MEDTEC ve Stuttgartu. Získali jsme 15 kontaktů na zájemce a s jedním (RAUMEDIC) naše fakulta prostřednictvím CPPT UK vstoupila do následného jednání na RUK a v centrále RAUMEDIC v Německu. Další postup komercializace je v režii CPPT UK, které nyní zvažuje prodej práv na patent start up firmě.

Z hlediska ochrany duševního vlastnictví ve vztahu k tomuto patentu byla rozšířena oblast ochrany o území EA podáním přihlášky P10766431EA, která je již publikována pod číslem 201490325 A1 (30.6.2014).

Další podstatnou aktivitou je pokračující vývoj jádra chladicího přístroje COOLER2 (2. varianta). Na podporu tohoto vývoje jsme zpracovali žádost o dotační titul z PP1 – GAMA (TAČR). Předmětem řešení je prototyp cirkulačního temperačního přístroje a prototyp konstrukčního prvku „temperační jádro“.

Ze všech projektů na UK, předložených v rámci prvního kola projektu GAMA, jsme dosáhli nejlepšího bodového hodnocení a získali dotaci 840 tis. Kč. Délka trvání dotace je 1 rok a dotace je, kromě mezd, určena především na služby spojené s komercializací. Té bude předcházet podání přihlášky patentu a UV. (Podání obou žádostí na ÚPV aktuálně řeší CPPT UK).

Druhá linie, opět obecně řečeno, je hyperbarická medicína. V oblasti hyperbarie a hyperbarické oxygenoterapie má náš ústav již dlouholetou tradici.

V současné době disponujeme tzv. velkou (cca 0,6 m<sup>3</sup>) experimentální hyperbarickou komorou, která byla do BC přestěhována začátkem letošního roku z původní laboratoře v Procháskově ústavu. Stěhování nebylo jednoduché, předcházela mu kompletní demontáž a nyní zpětná montáž všech ovládacích prvků a dalších technologií. Zajišťujeme sami, proto-

že komora není komerčně vyrobené zařízení a na zprovoznění zařízení nelze najmout žádnou firmu. Následně musí být znovu provedeny všechny revizní zkoušky, jak to charakter zařízení dle předpisů vyžaduje.

V této oblasti se rozbíhá nová aktivita. V rámci projektu preseed na LF UP byla vyvinuta s naší účastí nová koncepce experimentálního tlakového zařízení, mikrohyperbarická komůrka. Byly postaveny dva funkční vzorky těchto komor. Jejich účelem bude využití pro buněčné a fyzikální experimenty různých charakterů.

V odborné literatuře není díky unikátnosti technologie dostatek podkladů pro plné pochopení biologických dějů, které v buněčných strukturách při odlišných fyzikálních podmínkách probíhají. Cílem aktuálně prováděných experimentů je získání dostatku zkušeností, které umožní tento typ zařízení plnohodnotně využít pro zamýšlenou oblast výzkumu.

Komůrky máme nyní zapůjčené, začali jsme provádět první předběžné experimenty zaměřené na objasnění fyzikálně-chemických změn složení kultivačních roztoků (DMEM, HAM's F-12) a pufrů (PBS, HEPES, TBS) v důsledku jejich vystavení odlišným fyzikálním podmínkám hyperbarického prostředí. Jedná se především o změny pH, pO<sub>2</sub> a degradaci některých dalších složek, jejichž stabilita je v průběhu kultivace požadována.

Druhá část experimentů je zaměřena na testování parametrů a vlastností měřicích systémů vhodných pro sledování měřených veličin v náročném prostředí hyperbarické komory.

Třetí část plánovaných experimentů je zaměřena na zjišťování možností ovlivňování vlastností vybraných buněčných typů v průběhu kultivace při vystavení hyperbarickému tlaku.

Domníváme se, že tento typ zařízení může najít širší okruh využití při pokusech na tkáňových či buněčných strukturách. Velká komora pak bude určena především na pokusy na zvířeti.





EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj  
pro inovace

