



BIOMEDICÍNSKÉ  
CENTRUM

DRUHÁ  
VÝROČNÍ KONFERENCE  
BIOMEDICÍNSKÉHO CENTRA

16. LISTOPADU 2016





## Druhá výroční konference Biomedicínského centra



16. listopadu 2016



## Obsah

|  |    |
|--|----|
| Úvod . . . . .   | 7  |
| Seznam laboratoří Biomedicínského centra . . . . .   | 9  |
| Program konference . . . . .   | 10 |
| Právní oddělení . . . . .  | 12 |
| Experimentální laboratoř intenzivní medicíny . . . . .   | 13 |
| Laboratoř transplantace ledvin a náhrady funkce ledvin . . . . .                                   | 15 |
| Laboratoř experimentální kardiologie . . . . .   | 16 |
| Mitochondriální laboratoř . . . . .  | 17 |
| Laboratoř nádorové biologie . . . . .  | 18 |
| Laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie<br>v mikrobiologii . . . . . | 20 |
| Laboratoř neurodegenerativních poruch . . . . .  | 22 |
| Laboratoř experimentální neurofyziologie . . . . .   | 24 |
| Laboratoř buněčné regenerativní medicíny . . . . .   | 26 |
| Laboratoř studia interakcí buněk s materiálem . . . . .  | 28 |
| Laboratoř kvantitativní histologie . . . . .   | 29 |
| Laboratoř farmakogenomiky . . . . .  | 31 |
| Laboratoř nádorové léčby a regenerace tkáně . . . . .  | 33 |
| Laboratoř preklinických studií . . . . .   | 34 |
| Laboratoř laserové mikrodisekce . . . . .  | 35 |
| Laboratoř reprodukční medicíny . . . . .   | 37 |
| Biofyzikální laboratoř . . . . .   | 38 |
| Proteomická laboratoř . . . . .  | 40 |



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



Doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D., manažer centra.

## Úvod

Vážené kolegyně,  
vážení kolegové,

rok 2015 znamenal pro fungování Biomedicínského centra podstatnou změnu. K 30. červnu byl ukončen projekt „Biomedicínské centrum Lékařské fakulty v Plzni“ spolufinancovaný z Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace (OP VaVpl). Ten do té doby pokrýval většinu nákladů souvisejících s výzkumem, veškeré mzdové náklady pracovníků Biomedicínského centra, ale také režijní výdaje spojené s provozem. Velkým úspěchem bylo získání projektu LO1503 „BIOMEDIC“ – Národního programu udržitelnosti v plně požadované výši, který pokrývá 50 % veškerých nákladů centra na dobu 5 let. Ve veřejné soutěži Národního programu udržitelnosti bylo hodnoceno 11 projektů (z toho 1 nesplnil formální požadavky a nepostoupil do fáze věcného hodnocení, maximální dotace udělena 2 projektům, u 6 projektů byla dotace krácena a 2 projektům nebyla udělena). V roce 2015 získali pracovníci Biomedicínského centra grantové prostředky ve výši 11 479 959 Kč od tuzemských grantových agentur (Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví, Agentura zdravotnického výzkumu, Grantová agentura České republiky a další). Ze smluvního výzkumu bylo získáno celkem 5 408 078 Kč. V letošním roce činí rozpočet centra 62 331 000 Kč. Polovinu z těchto prostředků tvoří grantové projekty, peníze institucionálního výzkumu a smluvní výzkum s komerční sférou. I zde se daří tyto prostředky naplňovat.

Dalším úspěchem bylo i získání projektu „Biomedicínské centrum – přístrojové vybavení 2015“, který umožnil pořídit přístrojové vybavení v hodnotě 19 miliónů korun (85 % z dotace financováno EU prostřednictvím Evropského fondu pro regionální rozvoj (ERDF), 15 % financováno státním rozpočtem ČR), které významně rozšiřuje potenciál centra v oblastech experimentální neurofyzologie, mitochondriální fyziologie, experimentální kardiologie, analýzy buněk a částic, mikrobiologie, biochemické analýzy, experimentální chirurgie, analýzy genetických dat, kvantitativní histologie a laserové mikrodisekce.

Kvalitu vědecko-výzkumné práce nejlépe dokládá publikační činnost. Celková publikační produkce centra za r. 2015 činila 121 publikací (z toho 72 impaktovaných) a byla podána 1 národní patentová přihláška. Smluvní výzkum vykazoval v r. 2015 silně rostoucí tendenci (pro srovnání: v r. 2014 činil 1 747 tis. Kč, v roce 2015 5 408 tis. Kč). V současné době je v systému OBD uvedeno 61 prací v časopisech s IF (18 článků v časopisech bez IF), které jsou dedikovány Národnímu programu udržitelnosti LO1503.

Závěrem lze shrnout, že rok 2015 a první polovina roku 2016 bylo obdobím úspěšného přechodu Biomedicínského centra z realizační fáze do fáze běžného provozu. Díky široké mezioborové spolupráci v tradičních oblastech, ve kterých fakulta dlouhodobě dosahuje excelence, i rozvoji nových témat a technologií se Biomedicínskému centru již daří významně přispívat vědecko-výzkumnému výkonu fakulty a všechny výkonové parametry centra vykazují vzestupnou tendenci.

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

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



Hosté první výroční konference Biomedicínského centra 11. 6. 2015 – prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., ředitel BIOCEV, prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D., děkan Lékařské fakulty Univerzity Palackého Olomouc a Ing. Libor Kraus (vlevo v pozadí).



Účastníci první výroční konference Biomedicínského centra 11. 6. 2015.



# Seznam laboratoří Biomedicínského centra

## Výzkumný program 1

**Vedoucí:** prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D.

1. **Experimentální laboratoř intenzivní medicíny** – prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D.
2. **Laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii** – Dr. Constantinos Papagiannitsis, Ph.D.
3. **Laboratoř transplantace ledvin a náhrady funkce ledvin** – doc. MUDr. Tomáš Reischig, Ph.D.
4. **Laboratoř experimentální kardiologie** – doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.
5. **Proteomická laboratoř** – MUDr. Jan Mareš, Ph.D.
6. **Laboratoř klinického výzkumu cévních a srdečních onemocnění** – prof. MUDr. Jan Filipovský, CSc., Ph.D.
7. **Mitochondriální laboratoř** – doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.
8. **Laboratoř laserové mikrodisekce** – doc. MUDr. Magdalena Chottová Dvořáková, Ph.D.
9. **Biofyzikální laboratoř** – MUDr. et MUDr. Jiří Beneš, Ph.D.

## Výzkumný program 2

**Vedoucí:** prof. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D.

10. **Laboratoř neurodegenerativních poruch** – doc. MUDr. Jan Cendelín, Ph.D.
11. **Laboratoř experimentální neurofyzologie** – MUDr. Karel Ježek, Ph.D.
12. **Laboratoř nádorové biologie** – Mgr. Pavel Pitule, Ph.D.
13. **Laboratoř farmakogenomiky** – doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.
14. **Laboratoř nádorové léčby a regenerace tkáně** – MUDr. Václav Liška, Ph.D.
15. **Laboratoř buněčné regenerativní medicíny** – Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D.
16. **Laboratoř studia interakcí buněk s materiálem** – doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D.
17. **Laboratoř reprodukční medicíny** – Ing. Jan Nevoral, Ph.D.
18. **Laboratoř kvantitativní histologie** – doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.

## Servisní laboratoře

19. **Laboratoř všeobecné biochemie a hematologie** – prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.
20. **Laboratoř preklinických studií** – Ing. Pavel Klein, Ph.D.

# Program konference

## Zahájení konference

9<sup>00</sup>

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

## I. blok

9<sup>15</sup>–11<sup>00</sup>

**předsedající:** prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D., doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.

1. Management – doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.: Biomedicínské centrum v číslech za rok 2015
2. Právní oddělení – Mgr. Adam Šoukal
3. Experimentální laboratoř intenzivní medicíny (VP1) – prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D.
4. Laboratoř experimentální kardiologie (VP1) – doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.
5. Mitochondriální laboratoř (VP1) – doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.
6. Laboratoř nádorové biologie (VP2) – Mgr. Pavel Pitule, Ph.D.
7. Laboratoř antibiotické rezistence a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii (VP1) – Dr. Constantinos Papagiannitsis, Ph.D.

## Přestávka

11<sup>00</sup>–11<sup>15</sup>

## II. blok

11<sup>15</sup>–13<sup>00</sup>

**předsedající:** Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D., MUDr. Václav Liška, Ph.D.

8. Laboratoř neurodegenerativních poruch (VP2) – MUDr. Jan Cendelín, Ph.D.
9. Laboratoř experimentální neurofyzologie (VP2) – MUDr. Karel Ježek, Ph.D.
10. Laboratoř buněčné regenerativní medicíny (VP2) – Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D.
11. Laboratoř studia interakcí buněk s materiálem (VP2) – doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D.
12. Laboratoř kvantitativní histologie (VP2) – doc. MUDr. Zbyněk Tonar, Ph.D.
13. Laboratoř farmakogenomiky (VP2) – doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.
14. Laboratoř nádorové léčby a regenerace tkáně (VP2) – MUDr. Václav Liška, Ph.D.

## Přestávka

13<sup>00</sup>–14<sup>00</sup>

## III. blok

14<sup>00</sup>–14<sup>45</sup>

**předsedající:** Ing. Pavel Klein, Ph.D., doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

15. Laboratoř preklinických studií (zvěřinec) – Ing. Pavel Klein, Ph.D.
16. Laboratoř laserové mikrodisekce (VP1) – doc. MUDr. Magdalena Chottová Dvořáková, Ph.D.
17. Laboratoř reprodukční medicíny (VP2) – Ing. Jan Nevorál, Ph.D.

## Závěr konference

14<sup>45</sup>



Prof. MUDr. Boris Kreuzberg, CSc., děkan lékařské fakulty UK v Plzni, a MUDr. Václav Šimánek, Ph.D., ředitel Fakultní nemocnice v Plzni.



Doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D., prof. MUDr. Boris Kreuzberg, CSc., prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D., a doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.

## Právní oddělení

Adam Šoukal

Lékařská fakulta UK v Plzni

Přednáška bude pojednávat o transferu technologií a znalostí v rámci Biomedicínského centra a celé Lékařské fakulty UK v Plzni. Účastníci se mimo jiné seznámí s aktuálním přehledem vynálezecké činnosti na fakultě v návaznosti na komercializační aktivity, které v letošním roce proběhly a probíhají.

V krátkosti budou představeny vizitky jednotlivých laboratoří Biomedicínského centra, které fakulta poskytla do celouniverzitního katalogu služeb, který lze nalézt na webových stránkách Centra pro přenos poznatků a technologií (CPPT UK) – <http://www.cuni.cz/UK-6899.html>

Na praktických příkladech přednášející vysvětlí, jak postupovat v neobvyklých případech. Konkrétně probere situace, kdy vynálezecká činnost probíhá v kooperaci několika institucí. Dále představí vhodné způsoby využití vynálezu, pokud se instituce rozhodne pro spolupráci s aplikační sférou. V neposlední řadě poskytne přednášející ucelený přehled finančních nároků na jednotlivé varianty nakládání s výsledky výzkumu

a vývoje v návaznosti na praktické zkušenosti z minulých let i s ohledem na budoucí možný vývoj financování výzkumných organizací v tomto odvětví.



Mgr. Adam Šoukal, vedoucí právního oddělení LF UK v Plzni.

# Experimentální laboratoř intenzivní medicíny

**Martin Matějovič**

Biomedicínské centrum; I. interní klinika

Tým laboratoře pracoval v průběhu roku 2016 na několika paralelních projektech:

**A)** Experimentální výzkum mechanismů a léčby akutního poškození a selhání orgánů v sepsi:

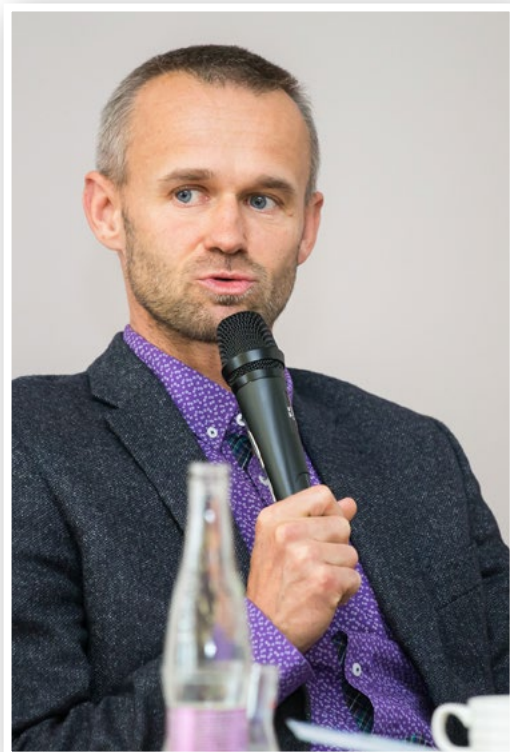
1. Publikovali jsme celosvětově první exploratorní data popisující u velkého zvířecího modelu vývoj tkáňového proteomu ledvin v průběhu progresivní sepse (Shock 2016). Výsledky ukazují na dynamické a často tranzitorní změny renálního proteomu, jehož hlavní charakteristikou je fenotyp buněčného distresu.
2. Publikovali jsme jako první data poskytující fyziologický profil mitochondriálního proteomu kůry a dřene ledvin selete (Clin Exp Nephrol 2016) a souhrnný metodický článek k tématu (Biomed Pap 2016). Výsledky představují výchozí referenci pro studium mitochondriální dysfunkce ledvin za patologických stavů s využitím velkého savčího biomodelu.
3. V recenzním řízení je publikace, která popisuje rozdíly v tkáňovém transkriptomu u ledvin bez rozvoje a s rozvojem selhání jejich funkce v průběhu sepse (BMC Nephrol). Výsledky studie jsou významné v genezi nových hypotéz
4. Ve spolupráci s mitochondriální laboratoří byly dokončeny analýzy vlivu různé tíže sepse na mitochondriální funkce ledvin, manuskript je v přípravě.
5. Ve spolupráci s laboratoří experimentální kardiologie byla publikována experimentální studie o variabilitě srdeční frekvence (Crit Care 2016).
6. V průběhu celého roku probíhá úspěšně řešení grantového projektu AZV, zkoumajícího terapeutický přínos mezenchymálních kmenových buněk. K dispozici jsou pilotní data.

**B)** Projekty mezinárodní spolupráce:

1. V Journal of the American Society of Nephrology (IF 9.3, nejvyšší ranking v kategorii nefrologie) jsme publikovali jako součást mezinárodního panelu expertů sérii článků, které jsou kritickou analýzou současného výzkumu akutního poškození ledvin s návrhem relevantních léčebných cílů pro další výzkum.
2. Pracoviště je národním koordinátorem a členem steering committee multicentrické studie STOP-AKI.
3. Ve spolupráci s univerzitním pracovištěm v německém Ulmu jsme publikovali výsledky studie hodnotící přínos hyperoxie a hypotermie jako součást resuscitačního protokolu hemoragického šoku (Crit Care Med 2016).
4. Výsledkem mezinárodní spolupráce je publikace shrnující současné koncepty tekutinové resuscitace kriticky nemocných (Biomed Res Int. 2016).
5. Účast na dvou mezinárodních projektech k tématu tekutinové resuscitace s publikačním výstupem (Globe-ICU – J Crit Care 2016 a Fenice study – Intensive Care Med 2016).

C) Klinický výzkum a edukační aktivity:

1. Publikace české multicentrické prospektivní studie prvně popisující výsledky a kvalitu léčby sepse v ČR (projekt EPOSS, Vnitr Lek 2016).
2. Publikace souhrnného článku, který je kritickou analýzou nové definice sepse (Vnitr Lek 2016).
3. Publikace studie srovnávající přesnost dvou POCT analyzátorů koncentrace hemoglobinu v podmínkách urgentního příjmu (J Clin Monit Comput).
4. Probíhá příprava manuskriptu analyzujícího změny humánních trombocytů a jejich vztah k různým fenotypům sepse.



Prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D., vedoucí experimentální laboratoře intenzivní medicíny.

# Laboratoř transplantace ledvin a náhrady funkce ledvin

Tomáš Reischig

Biomedicínské centrum, I. interní klinika

Our transplantation research is focused on the impact of viral infections on post-transplantation outcomes and the development of optimal preventive strategies against viral infections. Asymptomatic cytomegalovirus (CMV) infection is associated with graft dysfunction and failure. However, no study assessed CMV viral load in terms of the risk for graft failure. We present a long-term study of kidney transplant recipients in which we assessed the impact of CMV DNAemia on the overall graft survival and the incidence of moderate-to-severe interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) in protocol biopsy at 36 months. CMV DNAemia was stratified by viral load in whole blood. A total of 180 patients transplanted from October 2003 through January 2011 were included and followed for 4 years; 87 (48%) patients received 3-month prophylaxis with valganciclovir and 45 (25%) with valganciclovir; 48 (27%) were managed by preemptive therapy. Within 12 months of transplantation, CMV DNAemia developed in 102 (57%) patients with 26 (14%) having a viral load of  $\geq 2000$  copies/ml. Multivariate Cox analysis identified CMV DNAemia as an independent risk factor for graft loss (hazard ratio 3.42,  $P=0.020$ ); however, after stratification by viral load, only CMV DNAemia  $\geq 2000$  copies/ml (hazard ratio 7.62,  $P<0.001$ ) remained significant. Both early-onset ( $<3$  months,  $P=0.048$ ) and late-onset ( $>3$  months,  $P<0.001$ ) CMV DNAemia  $\geq 2000$  copies/ml were risk factors for graft loss. The incidence of moderate-to-severe IF/TA was not significantly influenced by CMV DNAemia.

In conclusion, kidney transplant recipients having CMV DNAemia with a higher viral load irrespective of the time to onset are at increased risk for graft loss.

While currently available preventive strategies do not enable to completely avoid CMV DNAemia we believe our study findings of relatively safe low grade CMV DNAemia may trigger new research on CMV prevention.



Doc. MUDr. Tomáš Reischig, Ph.D., vedoucí laboratoře transplantace ledvin a náhrady funkce ledvin.

# Laboratoř experimentální kardiologie

Milan Štengl

Biomedicínské centrum; Ústav fyziologie

Laboratoř se zaměřuje na studium kardiovaskulárních funkcí ve zdraví i nemoci. V klinicky relevantním modelu sepse u prasete byl nalezen výrazný pokles variability srdeční frekvence během rozvoje septického šoku. Tento pokles nastal v průběhu několika hodin po vyvolání peritonitidy a značně předcházel rozvoji dalších klinicky zjevných projevů sepse, hemodynamických i biochemických. Frekvenční analýza ukázala, že k dominantnímu poklesu dochází ve vysokofrekvenční komponentě signálu, který odpovídá převážně parasympatické srdeční modulaci. Pokles variability srdeční frekvence při sepsi by mohl sloužit jako citlivý a časný indikátor rozvíjející se sepse a přispět k rozšíření terapeutického okna pro časné intervence. Časný pokles variability srdeční frekvence byl následně nalezen i ve skupině prasat s mírnou sepsí bez orgánového selhání, čímž byla potvrzena značná citlivost tohoto parametru k systémové infekci.

U potkanů s objemovým přetížením v důsledku aortokavální píštěle byla nalezena významná hypertrofie srdce, výrazněji vyjádřená v pravé komoře. Hypertrofie byla doprovázena funkční remodelací elektrických vlastností (prodloužení trvání akčního napětí) i vápníkového hospodářství (vyšší klidová hladina intracelulárního vápníku a nižší relativní amplituda vápníkového přechodu). Terapeutické ovlivnění trandolaprillem (inhibitor ACE) a sildenafilem (inhibitor PDE5) snižovalo úmrtnost a potlačilo elektrickou remodelaci, na srdeční hypertrofii ani vápníkové hospodářství však vliv nemělo. Tyto výsledky naznačují arytmogenní mechanismus smrti u významného podílu zvířat ve sledovaném období.



Doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D., vedoucí laboratoře experimentální kardiologie.



## Mitochondriální laboratoř

**Martina Grundmanová<sup>1,2</sup>, Dagmar Jarkovská<sup>1,2</sup>, Annabell Süß<sup>1</sup>, David Meireles<sup>1</sup>, Zdeněk Tůma<sup>2</sup>, Michaela Marková<sup>1</sup>, Zdeněk Grundman<sup>1</sup>, Ahmed El-Kadi<sup>1</sup>, Miroslava Čedíková<sup>1,2</sup>, Milan Štengl<sup>1,2</sup>, Jitka Kuncová<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Ústav fyziologie; <sup>2</sup>Biomedicínské centrum; <sup>3</sup>Ústav biofyziky

Propofol (2,6-diisopropylfenol) je krátkodobě působící hypnotikum podávané nitrožilně k vyvolání a udržování celkové anestezie a sedaci. Ke stejným účelům je používán také ve veterinární a experimentální medicíně. Aplikace propofolu může být doprovázena nežádoucími vedlejšími účinky, k nimž patří zejména pokles arteriálního krevního tlaku a srdečního výdeje díky snížení srdeční frekvence i systolického objemu. Účelem této studie bylo posoudit účinky propofolu na mitochondriální respiraci a kontraktilní a elektrofyzilogické parametry myokardu levé i pravé komory potkana (LK, PK).

Mitochondriální spotřeba kyslíku byla měřena na mechanicky permeabilizovaných vzorcích svaloviny z proximální oblasti přední stěny obou komor metodou vysoce účinné respirometrie. Respirační aktivita mitochondrií in situ byla stanovena ve stavech LEAK (stav nutný k udržení membránového potenciálu), OXPHOS (kapacita oxidativní fosforylace) a ROX (reziduální spotřeba kyslíku). Z obou komor byl vystřižen papilární sval (resp. trabekula), na němž byly snímány izometrické kontrakce a membránové napětí. Vliv propofolu na uvedené parametry byl stanoven v koncentracích 0,025–0,5  $\mu\text{mol/ml}$ .

Všechny sledované respirační parametry byly u kontrolních vzorků vyšší v levé komoře ve srovnání s pravou. Propofol snižoval aktivitu komplexu I (OXPHOS I) v závislosti na koncentraci, absolutní hodnoty ostatních měřených parametrů významně neovlivňoval. Propofol také snižoval poměr LEAK/OXPHOS, který je indikátorem rozpražení mitochondriální oxidace a fosforylace a svědčí o nižší účinnosti mitochondriálního metabolismu. Vlivem propofolu (při koncentraci 0,1  $\mu\text{mol/ml}$  a vyšší) došlo k významnému poklesu síly kontrakce, který byl výraznější v LK. V trvání akčního potenciálu se neprojevila žádná změna ani při jedné z použitých koncentrací propofolu.

Výsledky studie ukazují, že propofol přímo ovlivňuje mitochondriální respiraci kardiomyocytů srdečních komor, a to v koncentracích, které jsou blízké jeho tkáňovým a plazmatickým hladinám při celkové anestezii. Při provádění experimentů na zvířatech anestezovaných propofolem je třeba při zkoumání mitochondriálního metabolismu tento účinek zohlednit a odlišit od případných změn způsobených uměle navozenými patologickými stavy.

Podpora: NPU I – LO1503, PRVOUK P36, SVV 260281/2016 a GAČR 15-15716S.

## Laboratoř nádorové biologie

**Pavel Pitule, Pavel Ostašov, Martin Pešta, Jiří Polívka, Pavel Vodička,  
Ludmila Vodičková, Jana Aletta Thiele, Petr Hošek**

Biomedicínské centrum

### Nové přístupy k prognóze a predikci nádorových onemocnění

Laboratoř nádorové biologie se zabývá analýzou znaků a procesů spojených se vznikem a rozvojem nádorových onemocnění s cílem umožnit personalizaci onkologické léčby. Podstatnou součástí personalizace je včasná diagnostika samotného onemocnění, odhad jeho reakce na podanou léčbu i sledování změn nádorové tkáně v průběhu terapie. Pro identifikaci optimálních znaků využíváme analýzu periferní krve, studium nádorových vzorků i práci s buněčnými liniemi.

V periferní krvi detekujeme přítomnost a vlastnosti cirkulujících nádorových buněk (CTC) i volných cirkulujících nukleových kyselin (cfDNA). Naše studie ohledně CTC je zaměřena na pacienty s metastatickým karcinomem tlustého střeva a konečníku, kteří podstupují chirurgickou a následně onkologickou léčbu. U pacientů s tímto typem nádoru nejsou CTC natolik úspěšným prognostickým faktorem jako například u nádoru prsu či prostaty, jedním z důvodů ale může být neúplný výběr CTC při využití standardních metod. Aktuálním výsledkem naší studie je katalog typů CTC u kolorektálního karcinomu a výběr doplňujícího znaku pro specifikaci CTC pocházejících z gastrointestinálního traktu (exprese proteinu CDX2), přičemž další set znaků je testován. Analýza cfDNA je nejdále u pacientů s lokalizovaným a lokálně pokročilým melanomem. V rámci časových odběrů je hodnocena přítomnost mutace genu BRAF na pozici V600, která má vztah k následné léčbě. Cílem je určení vzájemné konkordance mutačního profilu nalezeného ve vzorku nádoru a cfDNA z krevní cirkulace a detekce minimální reziduální choroby po chirurgickém zásahu s kurativním záměrem na základě dynamiky poklesu cfDNA v předoperačním a pooperačních krevních vzorcích. Nový výskyt mutantní podoby cfDNA v cirkulaci po stadiu remise může být následně časným příznakem relapsu onemocnění.

Nádorovou tkáň využíváme v projektech věnujících se detekci změněné exprese různých typů nukleových kyselin. U kolorektálního karcinomu testujeme vztah 20 dlouhých nekódujících RNA s klinickými parametry s cílem využít jejich hladiny k prognóze nádorové agresivity. U pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem testujeme další typ RNA účastnících se regulace genové exprese, v tomto případě mikroRNA ovlivňující geny, jejichž produkty se podílejí na efektivitě léčby a mohli by tak přinést informace o úspěšnosti indikované terapie. V případě klasických mRNA jde pak například o detekci cytokeratinu 19 v lymfatických uzlinách nemocných s primárními či sekundárními nádory plic novou metodikou zvanou RT-LAMP. Zde test v případě pozitivního výsledku ukazuje na přítomnost nádorových buněk v uzlině. Cílem je porovnání senzitivity detekce mikrometastáz v hilových a mediastinálních lymfatických uzlinách primárních a sekundárních nádorů plic pomocí imunohistochemického vyšetření a metody RT-LAMP.

Za projekty pracující s buněčnými liniemi bychom zmínili začínající práci zaměřenou na možnost zvýšení efektu chemoterapie pomocí reaktivace proteinu p53 na mode-

lu buněčných linií nemalobuněčného plicního karcinomu. Modulací aktivity proteinu p53, klíčové molekuly zprostředkovávající efekt řady onkologických léčiv, by mělo být možné zvrátit proces přežívání nádorových buněk směrem k aktivaci jejich apoptózy.

Zmíněné projekty by nebylo možné řešit bez vynikající spolupráce s klinickými pracovníky i s dalšími laboratoři nejen v rámci Biomedicínského centra.



Ing. et Ing. Jiří Polívka.

# Laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii

Constantinos Papagiannitsis

Biomedicínské centrum; Ústav mikrobiologie

Our group is mainly focused on molecular epidemiology of factors affecting dissemination of resistance mechanisms to carbapenems, in Gram-negative bacteria (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*). Also, we are interested in the development of new techniques for the detection of resistance mechanisms using MALDI-TOF mass spectrometry. During the last year, four projects focused on the two latter tasks, were studied.

*Pseudomonas aeruginosa* is a leading cause of nosocomial infections, in Czech hospitals, but also worldwide. Carbapenemase-producing isolates of *P. aeruginosa* are resistant to virtually all  $\beta$ -lactams, and are difficult to treat. Therefore, in this study, we aimed to molecularly characterize carbapenemase-producing *P. aeruginosa* isolates collected from Czech hospitals, during 2015. Preliminary results showed that the majority of the isolates produced the IMP-7 metallo- $\beta$ -lactamase. MLST identified that ST357 was the most prevalent suggesting the spread of one major clone, producing IMP-7 metallo- $\beta$ -lactamase, in Czech hospitals. In discordance, the study of the population structure of non-carbapenemase-producing *P. aeruginosa* observed a huge variety of STs. Finally, Illumina sequencing showed that ST357 *P. aeruginosa* harbored the class 1 integron In-p110, containing *bla*<sub>IMP-7</sub>, integrated into their chromosomes.

The occurrence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) was rare between 2009 and 2013. However, an increase in the occurrence of CPE was observed, during 2014 and 2015, mainly due to the spread of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae*. Thus, the aim of this project was to characterize the OXA-48-like producers detected in Czech hospitals, from 2014 till 2015. Totally, twenty *Klebsiella pneumoniae*, three *Escherichia coli* and one *Enterobacter cloacae* producing OXA-48-like carbapenemases were isolated from 20 patients. Four of the patients were colonized/infected by two or three different OXA-48-like producers. *K. pneumoniae* isolates were classified into nine STs, with ST101 being the predominant (n=8). *E. coli* were of different STs, while *E. cloacae* isolate belonged to ST109. Twenty-four isolates carried *bla*<sub>OXA-48+</sub>, whilst two isolates carried *bla*<sub>OXA-181</sub> or *bla*<sub>OXA-232</sub>. Almost all isolates (n=22) carried *bla*<sub>OXA-48</sub>-positive plasmids of similar size (~60 kb), except the two isolates producing OXA-181 or OXA-232. In a ST45 *K. pneumoniae* and a ST38 *E. coli*, S1 profiling plus hybridization indicated a chromosomal location of the *bla*<sub>OXA-48</sub>. Sequencing showed that the majority of *bla*<sub>OXA-48</sub>-carrying plasmids exhibited high identity with pOXA-48-like plasmid, pE71T. Additionally, two novel pE71T derivatives were observed. The *bla*<sub>OXA-181</sub>-carrying plasmid was identical to the IncX3 plasmid pOXA181\_EC14828, while the *bla*<sub>OXA-232</sub>-carrying plasmid was a ColE2-type plasmid, being a novel derivative of pOXA-232. Finally, sequencing data showed that ST45 *K. pneumoniae* and ST38 *E. coli* harbored the IS1R-based composite transposon, Tn6237, containing *bla*<sub>OXA-48</sub>, integrated into their chromosomes. These findings

underlined that horizontal transfer of pOXA-48-like plasmids has played a major role in the dissemination of *bla*<sub>OXA-48</sub> in the Czech Republic.

In the third project, the performance of MALDI Colonyst (BioVendor Instruments, Brno, Czech Republic), a new machine for automatic deposition of microbes on MALDI target plate, was evaluated. In the first stage, the machine was tested against a group of 50 gram-negative, 67 gram-positive and 18 anaerobic bacteria, and 38 yeasts. The performance was compared with that of three methods (direct spotting, semi-extraction and wet deposition) for manual deposition of microbes on MALDI target. Results showed that automatic deposition exhibited the best average identification score (2.193) with the error rate (no spectra acquisition – error rate) of 16% of colonies. In the second stage of the validation procedure, 483 routine samples were processed using MALDI Colonyst. For gram-positive bacteria and anaerobes, significantly higher identification scores were obtained for MALDI Colonyst than the routine manual procedure. These results demonstrated that automatic wet deposition can significantly improve identification of microbes. In addition, automatic deposition, by the use of MALDI Colonyst, can decrease the consumables cost (tips).

Data from previous studies have shown that nosocomial infections, caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, can be controlled by strict epidemiological intervention. Thus, the fourth research task of our group was to develop and evaluate a kit for detection of carbapenemase-producing organisms. HRC (High Resolution Carbapenemase) assay is designed to work both in mass spectrometers and spectrophotometers. The HRC assay was tested against a group of 124 *Enterobacteriaceae*. Almost, all carbapenemase producers were correctly detected both in mass spectrometer and spectrophotometer. Additionally, false-positive results were not observed among non-carbapenemase producers. These results demonstrated that this assay is a reliable tool for detection of carbapenemase activity in routine laboratories.

In conclusion, the prevalence of carbapenemase-producing bacteria has significantly increased the last two years, in the Czech Republic. However, the improvement of

diagnosis (especially of carbapenemase activity) may decrease the prevalence of those organisms.



Dr. Constantinos Papagiannitsis, Ph.D., vedoucí laboratoře antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii.

# Laboratoř neurodegenerativních poruch

Jan Cendelín, Jan Tůma, František Vožeh

Biomedicínské centrum; Ústav patologické fyziologie

## Experimentální neurotransplantační terapie u modelů cerebelární degenerace

Mozeček je nezbytný pro koordinaci pohybů, udržování vzpřímeného stoje a pro motorické učení. Je zapojen také do kognitivních a afektivních funkcí a kontroly chování. Hereditární cerebelární degenerace vedou postupně k těžkému postižení nejen motoriky pacienta, ale také ke změnám psychickým. V současnosti není dostupná skutečně účinná kauzální léčba degenerativních onemocnění mozečku. Určitou naději představují neurotransplantace. I ty jsou však zatím ve stádiu experimentálního výzkumu, jehož nástrojem jsou mutantní myši modely cerebelárních degenerací. Přes velké množství studií provedených v posledních téměř 30 letech stále nelze jednoznačně říci, jaké faktory podmiňují vývoj transplantátu a jeho účinky na narušené funkce mozečku. Zdá se, že u modelů mnoha nemocí mohou transplantace různých typů buněk zpomalit rozvoj patologických změn a funkčního deficitu. Léčbu je však nutné zahájit včas. Sporný zůstává především přínos transplantační terapie již rozvinutého poškození mozečku, který by vyžadoval substituci zaniklých neuronů transplantovanými buňkami a jejich integraci do nervových okruhů. Cílem naší práce bylo zkoumat možnosti neurotransplantační terapie u myši Lurcher a Purkinje cell degeneration (pcd) postižených úplnou ztrátou Purkyňových buněk a výraznou degenerací dalších typů neuronů mozečku.

Transplantát získaný z mozečku myších embryí jsme aplikovali do mozečku dospělých myši Lurcher a pcd s plně vyvinutou degenerací mozečku a zdravým kontrolním zvířatům. Vývoj transplantátu jsme hodnotili histologicky. U myši Lurcher jsme testovali motorické funkce vyšetřením chůze a na rotarodu.

Transplantát přežíval u většiny operovaných zvířat i po 6 měsících po transplantaci a jeho stav se prakticky nelišil od transplantátu nalezeného u myši vyšetřených v kratším intervalu po operaci. U myši Lurcher však nejevil známky integrace do tkáně hostitele. Naproti tomu u zdravých myši a u myši pcd byla patrná jistá tendence k osidlování kůry mozečku hostitele transplantovanými Purkyňovými buňkami a k růstu nervových vláken z transplantátu do okolí. Transplantace buněčné suspenze přesto vedla u myši Lurcher k mírnému zlepšení parametrů chůze ve srovnání s neléčenými kontrolami.

Vzhledem k absenci integrace transplantátu do mozečku myši Lurcher lze předpokládat, že funkční přínos transplantátu byl zprostředkován spíše jeho trofickým působením a podporou plasticity, než náhradou zaniklých neuronů. Specifické působení transplantátu lze očekávat spíše u myši pcd, u nichž je detailní posouzení funkčního efektu úkolem dalších studií. Odlišný vývoj transplantátu u myši Lurcher nejen ve srovnání se zdravými zvířaty, ale i s mutanty pcd znamená, že přes obdobný průběh degenerace je působení hostitelské tkáně na transplantované buňky jiné. Nalezení faktorů, které ovlivňují funkční integraci transplantátu, by umožnilo předpovědět, která z mnoha degenerativních onemocnění mozečku by mohla být potenciálně léčitelná neurotransplantací a u kterých je naopak významný účinek méně pravděpodobný.

Kromě toho by tyto faktory mohly být cílem intervence k podpoře integrace transplátátu.

Podpořeno Národním programem udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 a Výzkumným projektem Univerzity Karlovy č. P36. Na studii se podíleli Dr. Z. Purkartová, Dr. V. Babuška a Dr. Z. Houdek.



Doc. MUDr. Jan Cendelín, Ph.D., vedoucí laboratoře neurodegenerativních poruch.

# Laboratoř experimentální neurofyziologie

Štěpán Kápl, Stephanie Peña, František Zitrický, Karel Ježek

## Biomedicínské centrum

Projektové portfolio laboratoře se rozvětvilo do dvou, vzájemně provázaných linií.

1) V projektu „neurofyziologie paměťového systému mozku“ hledáme nové fyziologické koreláty procesu vybavení paměti a způsoby dekodování neurální aktivity. Registrací aktivity jednotlivých neuronů tvořících paměťové stopy a vizuální manipulací okolního prostředí získáváme data obsahující přechod mezi dvěma paměťovými stavy, který následně analyzujeme. Podařilo se nám objevit nový fenomén hyperaktivity populace buněk paměťové stopy, během jejího vybavování. Jde patrně o mechanismus, kterým paměťový systém usnadňuje změnu svých stavů, t.j. překonává stabilitu dosud aktivního paměťového vzorce, který má být nahrazen stavem novým. Ve spolupráci s kolegy z Ecole Normale Supérieure a CNRS jsme vyvinuli nový typ dekodování neurální aktivity, založený na použití grafických modelů, dosud využívaných především v teoretické fyzice.

2) Druhá linie naší činnosti je projekcí fyziologických poznatků do relevantní medicínské problematiky.

2.1) Patofyziologické mechanismy rozvoje Alzheimerovy nemoci jsou, přes mimořádnou pozornost, jež je této chorobě věnována, stále převážně neznámé. Dosavadní výzkum ukázal na několik charakteristických znaků – strukturálních abnormalit mozkové tkáně, které pravděpodobně k jejímu klinickému obrazu vedou, především formování  $\beta$ -amyloidových plaků, neurofibrilárních klubek a masivní úbytek neuron mozkové kůry. Zcela neznámé ale jsou mechanismy, kterými tyto abnormality postihují funkčnost zasažených oblastí mozku. Především se jedná o časná stadia choroby, u kterých se klinicky měřitelný paměťový defekt teprve rozvíjí a u kterých lze usuzovat, že průběh choroby bude v budoucnu možno účinně terapeuticky ovlivnit. Cíl tohoto projektu je výzkum neurálních procesů, u kterých se AD manifestuje na samém počátku. Na novém transgenním potkanním kmenu Tg F344 AD, který nese dva lidské geny - pro amyloid-prekursor protein (APP) a Presenilin (PS1 či PS2) jsme v první fázi hledali věkovou hladinu s prvními známkami rozvoje paměťového deficit. Použitím kognitivního testu selektivně citlivého k hipokampovému poškození jsme identifikovali časný nástup klinických znaků. V současnosti u těchto jedinců implantujeme mikroelektrodotové soustavy k registraci neuronální aktivity pro posouzení vybraných funkčních parametrů. Analýzou buněčné a rytmické populační aktivity chceme testovat naši základní hypotézu insuficience komunikace mezi jednotlivými částmi paměťového systému jako prvního stadia rozvoje selhání kognitivních funkcí.

2.2) Schizofrenie, především pak její manická komponenta je postižením, jehož patofyziologický mechanismus je zcela neznámý. V našich experimentech dokážeme iniciovat přechodové stavy neuronové sítě, které tak mohou sloužit jako metoda pro vyvolání nestability systému. Tato původní metoda může poskytnout cenná data pro dosud nezmapovanou oblast dějů, provázející nestabilitu neurálních atraktorů, jež jsou v teoretických studiích s manickými projevy spojovány. Náš první experiment s farmakologickým modelem schizofrenie ukázal



zvýšenou nestabilitu mozkových reprezentací a předběžně svoji validitu potvrdil. V budoucnu laboratoř bude rozvíjet nové přístupy ke studiu fyziologie mozku a patofyziologie jeho chorob, zejména optické buněčné zobrazovací metody.



MUDr. Karel Ježek, Ph.D., vedoucí laboratoře experimentální neurofyziologie.

## Laboratoř buněčné regenerativní medicíny

**Lucie Vištejnová, Anna Zavadřáková, Azalia Mariel Carranza Trejo, Iveta Zímová a Martina Dolejšová**

Biomedicínské centrum

Náš příspěvek Vám přiblíží dva hlavní výzkumné směry, kterými se naše Laboratoř buněčné regenerativní medicíny vydává. Prvním směrem je výzkum dermálních fibroblastů v procesu hojení chronické rány. Již dlouho se ví, že hlavní rolí fibroblastů v hojení rány je syntéza a remodelace nové extracelulární hmoty zastoupené především kolageny a glykosaminoglykany. Avšak, za stresových podmínek, mezi které spadá zánětlivé prostředí chronické rány, existuje předpoklad k aktivnímu chování fibroblastů ve smyslu zvýšené produkce prozánětlivých molekul (cytokiny a chemokiny) a tedy k podpoře zánětlivé fáze hojení. Naším prvním cílem je tento předpoklad ověřit v in vitro prostředí a popsat, jak se fibroblasty chovají za modelových podmínek chronické rány (bakteriální kontaminace, oxidativní stres, nedostatek živin). Zaměřujeme se na jejich proliferační a migrační schopnosti a na míru produkce prozánětlivých molekul (interleukin 6, interleukin 8). Tyto parametry sledujeme jak ve 2D, tak ve 3D prostředí, neboť řada recentních publikací potvrzuje, že buněčné vnímání mechanických vlastností kultivačního povrchu hraje důležitou roli v relevantnosti in vitro a in vivo podmínek.

Druhým směrem je výzkum hepatocytů za podmínek nealkoholové steatózy a steatohepatitidy (NASH). NASH je charakterizována hromaděním triglyceridů v hepatocytech, zvýšenou oxidací volných mastných kyselin, zvýšenou produkcí volných kyslíkových radikálů, zánětem, resp. zvýšenými hladinami prozánětlivých cytokinů, sníženou funkcí mitochondrií a endoplasmatického retikula. NASH se často vyskytuje u pacientů s diabetem 2. typu, inzulínovou resistencí a či metabolickým syndromem. V závažných případech může NASH vést k jaterní fibróze, cirhóze či hepatocelulárnímu karcinomu. Přesto, že je známa řada klinických, patologických a histologických projevů NASH, nejsou do dnešní doby přesně popsány intracelulární mechanismy vedoucí k NASH a případnému jaternímu selhání. Naším druhým výzkumným cílem je vyvinout klinicky odpovídající in vitro model hepatocytů za podmínek NASH a popsat signální dráhy odpovědné za persistenci tohoto onemocnění. Opět využíváme kultivace buněk ve 2D a 3D prostředí, kdy zejména u primárních hepatocytů izolovaných z jater, je kontakt s extracelulárními proteiny (nejčastěji kolagenem) klíčový pro jejich udržení v in vitro kultuře.

V příspěvku Vám přiblížím naše metody, jak s dermálními fibroblasty a hepatocyty pracujeme v in vitro podmínkách, jak modelujeme 3D kultivační prostředí, jak funkce buněk charakterizujeme a s jakými problémy se v našich experimentech potýkáme.



Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D., vedoucí laboratoře buněčné regenerativní medicíny.

## Laboratoř studia interakcí buněk s materiálem

**Marie Hubálek Kalbáčová**

Biomedicínské centrum

Laboratoř se v uplynulém roce zabývala interakcí buněk s různými materiály ať již v planární podobě nebo v podobě nanočástic. Ve spolupráci s ústavu Akademie Věd i firmami se podařilo dokončit a úspěšně opublikovat studie srovnávající vliv různě smáčivých vrstev grafenu a nanokrystalického diamantu na kostní buňky, vliv ultrajemného titanu na kostní a kmenové buňky a růst buněk na biodegradabilních nosičích, které měnily své vlastnosti v závislosti na použitém síťovadle. Ve spolupráci s pracovišti chemiků a fyziků z Čech i zahraničí jsme popsali pozitivní vliv kyseliny hyaluuronové v komplexu se surfaktanty na různé typy lidských buněk a také jsme popsali chování křemíkových nanočástic v buňkách. Dosažené výsledky jsme prezentovali na tuzemských i zahraničních sympoziích a vybrané výsledky jsou již v tisku a jiné v recenzním řízení. V následujících měsících budeme v rozpracovaných projektech pokračovat a současně začínáme i nové spolupráce např. s chemiky z VŠCHT a Maďarské Akademie Věd.



Doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D., vedoucí laboratoře studia interakcí buněk s materiálem.

## Laboratoř kvantitativní histologie

Zbyněk Tonar, Tereza Kubíková, Yaroslav Kolinko, Markéta Šlajerová

Biomedicínské centrum; Ústav histologie a embryologie

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 světovém poli a polarizační mikroskopie, v případě potřeby pak 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 živě experimentálních defektech, kvantifikace oseointegrace kostních implantátů pro stomatochirurgii a ortopedii, či 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 odebranych v rámci transplantačního programu a testování použitelnosti a aterosklerotického poškození u ramus descendens a. circumflexae femoris lateralis jakožto alternativního štěpu druhé volby pro revaskularizaci myokardu.

Kromě vlastního výzkumného programu spolupracujeme s ostatními laboratořemi Biomedicínského centra a pracovišti LF UK v Plzni. Vypracovali jsme metodiku morfometrie jaterního parenchymu pro hodnocení experimentů s regenerací jater, podíleli jsme se na vývoji a testování software pro automatizované hodnocení korozivních preparátů cévního řečiště pomocí mikro-CT, rozpracovali jsme metodu kvantifikace mikrocév v centrálním nervovém systému. Pracovníci centra se v současnosti podílejí na plnění úkolů dvou grantů a na projektu Prvouk P36. Laboratoř využívá zázemí a podpory Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni. Metodikou a pracovními

standards odpovídají metody i výsledky laboratoře současným mezinárodně uznávaným požadavkům na publikovatelnost histologických analýz. K výsledkům práce laboratoře za období 2014–2016 patří mimo jiné 12 článků v časopisech s faktorem impaktu, přičemž u 5 z nich jsou pracovníci laboratoře korespondujícími autory; dále pak 4 články v ostatních recenzovaných časopisech, 1 kapitola v knize, 1 patent a 9 výzkumných zpráv smluvního výzkumu.



Doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D., vedoucí laboratoře kvantitativní histologie, a MUDr. Jan Mareš, Ph.D., vedoucí proteomické laboratoře.

# Laboratoř farmakogenomiky

Pavel Souček

Biomedicínské centrum

Dlouhodobým cílem naší laboratoře je nalezení vhodných prognostických a prediktivních biomarkerů pro hodnocení přežívání a odpovědi nádorových pacientů na terapii. Tyto biomarkery hledáme především v drahách metabolismu, transportu a cílů cytostatik. Ve vlastním výzkumu využíváme genomické, epigenomické, proteomické a metabolomické přístupy k hodnocení biomarkerů v biologických vzorcích pacientů i ke studiu interakcí mezi cytostatiky a nádorovými buňkami pomocí in vitro a in vivo modelů. Hlavní využití prediktivních biomarkerů vidíme v oblasti lepší stratifikace pacientů do jednotlivých léčebných režimů. Nalezení a validace prognostických biomarkerů rovněž může přispět k vývoji terapeutik pro cílenou léčbu.

V průběhu minulého roku jsme pokračovali ve 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 (OMIM: 114500). Na základě nalezených vztahů transkripčních hladin transportérů ABCC10 a ABCC11 v nádorových tkáních s klinickými daty pacientů (Hlavata et al., *Mutagenesis* 2012;27:187-96) jsme se zaměřili na ověření proteinových hladin a klinického významu těchto dvou transportérů na větším souboru pacientů. Poprvé se podařilo ukázat vztah nízkých hladin proteinové exprese transportéru ABCC10 s kratším celkovým přežíváním pacientů a nízké proteinové exprese transportéru ABCC11 s vyšším rizikem návratu onemocnění (Krizkova et al., *Cancer Chemoth. Pharm.* 2016;78:595-603). Tyto výsledky jsou významným impulsem pro další studium klinického významu těchto dvou transportérů u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Dále jsme u pacientů s kolorektálním karcinomem studovali deregulaci dráhy 5-fluorouracilu v nádorových i kontrolních tkáních (Kunicka et al., *BMC Cancer* 2016;16:795) ve spolupráci se skupinou Dr. Lišky (LF, Plzeň) a Dr. Vodičky (ÚEM, Praha). U pacientů s kolorektálním karcinomem nepředléčených chemoterapií jsme odhalili, že exprese aktivačních genů dráhy 5-fluorouracilu byla v nádorech zvýšená a inaktivačních genů snižena ve srovnání s kontrolními mukózami tzn., že tito pacienti mají příznivý expresní profil pro léčbu 5-fluorouracilem. Navíc snížená methylace genu UPB1 silně korelovala s kratším přežíváním pacientů po terapii 5-fluorouracilem. Tento poznatek může mít velký význam pro predikci optimálního léčebného režimu u pacientů se stádiem onemocnění II a III.

Ve spolupráci s pracovníky Gynekologicko-porodnické kliniky FNP, jsme publikovali studii zaměřenou na význam membránových transportérů včetně SLC (solute carrier) transportérů u pacientek s nádory ovaria (OMIM: 167000) (Elsnerova et al., *Oncol. Rep.* 2016;35:2159-2170). Podařilo se nám identifikovat řadu genů z oblasti transportu cytostatik (ABCA2/10, ABCG2, SLC16A14) jako potenciální nové biomarkery odhadu prognózy pacientek s ovariálním karcinomem. V Plzeňském lékařském sborníku jsme publikovali review a pilotní studii věnující se markerům progresu a vzniku metastáz u ovariálního karcinomu na základě genového expresního profilu (Václaviko-

vá et al., Plzeň. Lék. Sborn. 2015:39-55). V navazujících studiích se v současné době věnujeme ověření těchto výsledků a funkčním studiím na in vitro modelech.

V minulém roce jsme rovněž zahájili dva projekty zaměřené na studium karcinomu prsu (OMIM: 114480). První z projektů se zabývá variabilitou genů souvisejících s účinkem protinádorové terapie (včetně genů kódujících ABC a SLC transportéry) u pacientek s karcinomem prsu. V rámci tohoto projektu jsme zavedli metodu NGS (Next Generation Sequencing) sekvenace panelu obsahujícího 510 genů pomocí platformy MiSeq (Illumina) na pilotním souboru 30 pacientek. Dále jsme u pacientek s karcinomem prsu započali studii expresního profilu miRNA (micro RNA, krátké nekódující RNA) v tkáňových vzorcích karcinomu prsu pomocí miRNA MicroArrays (Agilent). Projekt je zaměřena na studium vlivu exprese miRNA na progresi a přežívání pacientek s lumenálním typem karcinomu prsu (pozitivní exprese estrogenového receptoru v nádorech) léčebných chemoterapií. Obě studie budou pokračovat v dalším roce (rozšíření souborů a hodnocení dat s klinickými daty pacientek).

Výzkum farmakogenomiky je podporován granty GAČR P301/12/1734, AZV 15-25618A, 15-25884A a GAUK 1200314.



Část týmu doc. Součka – Mgr. Kateřina Elsnerová, Mgr. Tereza Kunická a Mgr. Veronika Brynychová



## Laboratoř nádorové léčby a regenerace tkáně

Liška V., Třeška V., Pálek R., Rosendorf J., Mírka H., Vimmr J., Jonášová A., Haidingerová L., Brzoň O., Bajcurová K.

Biomedicínské centrum

### Rekonstrukce portálního řečiště v rámci chirurgického řešení pokročilého karcinomu pankreatu – experiment na velkém zvířeti

**Úvod:** Resektabilita maligních nádorů pankreatu je v dnešní době limitována infiltrací cévních struktur. Takto postižená portální žíla nebo horní mesenterická žíla je v některých případech resekovatelná. Pro její rekonstrukci může být použito velké množství různých autologních žilních štěpů. Jejich získání může být svízelné. Alternativou může být použití allogenního štěpu dolní duté žíly nebo portální žíly,

**Cíle:** Cílem naší studie je ověřit, zda jsou signifikantní rozdíly mezi allogenními štěpy portální žíly a dolní duté žíly, které by mohly ovlivnit chování portálního systému po použití těchto štěpů.

**Metodika:** U 16 prasat jsme provedli hemipankreatoduodenektomii s resekcí a následnou rekonstrukcí portální žíly. U 8 prasat byl k rekonstrukci použit štěp portální žíly, u zbylých 8 prasat štěp dolní duté žíly. Pooperační sledování trvalo 4 týdny, kdy byly prováděny ultrasonografické kontroly včetně dopplerovského měření průtoků štěpy. Dále jsme stanovovali klasické biochemické parametry jaterních funkcí.

**Výsledky:** Dle biochemického a ultrasonografického vyšetřování nebyly ani jaterní funkce ani chování portálního řečiště ovlivněny typem použitého štěpu.

**Závěr:** Oba typy štěpů jsme vyhodnotili jako srovnatelné a užití štěpu dolní duté žíly pro rekonstrukci portálního řečiště je adekvátní alternativou portálního štěpu.



MUDr. Václav Liška, Ph.D., vedoucí laboratoře nádorové léčby a regenerace tkáně.

## Laboratoř preklinických studií

**Pavel Klein**

Biomedicínské centrum

V současné době je v Centrálním uživatelském zařízení aktivně řešeno celkem 26 projektů pokusů na zvířatech jak pro potřeby základního a aplikovaného výzkumu, tak i výuky. Řešiteli projektů jsou vědečtí pracovníci Biomedicínského centra, pedagogičtí pracovníci LFP i klinici z FN Plzeň. Tým CUZ zajišťuje technickou podporu a odborné poradenství při realizaci všech experimentů; v řadě případů se i přímo personálně podílí na jejich řešení. Pokud jde o využití jednotlivých in vivo modelů, nejvíce projektů bylo v roce 2016 řešeno na potkanech, následují myši, prasata a králíci. Od ledna 2016 je k dispozici vlastní chovné jádro potkana ZDF, který je cenným biomedicínským modelem diabetu 2. typu. První výzkumný projekt s využitím tohoto modelu byl zahájen v květnu 2016 a další jsou připravovány.



Ing. Pavel Klein, Ph.D., vedoucí laboratoře preklinických studií – zvěřince.

# Laboratoř laserové mikrodisekce

Magdalena Chottová Dvořáková

Biomedicínské centrum; Ústav fyziologie

## Využití laserové mikrodisekce při studiu lokalizace NK1 receptoru v srdci laboratorního potkana

Substance P (SP) patří do skupiny tachykininů a v myokardu je uvolňována ze senzorických nervových vláken typu C. Tato vlákna vytvářejí pleteně v okolí srdečních gangliových buněk, v blízkosti SA a AV uzlů a rovněž kolem cév koronární cirkulace. Na cílové tkáni působí tachykininy prostřednictvím NK receptorů. Dosud byly popsány tři typy těchto receptorů NK1, NK2 a NK3, přičemž SP vykazuje nejvyšší afinitu k NK1 receptoru. Třebaže byla v srdci potkana prokázána přítomnost vazebných míst pro SP a to zejména v okolí koronárních arterií a srdečních chlopní, podrobné informace o lokalizaci a typu těchto receptorů dosud nejsou dostupné.

Cílem naší studie bylo v první řadě prokázat přítomnost specifické mRNA a proteinu NK1 receptoru v srdci pomocí metod kvantitativní RT-PCR a Western blotu, a dále stanovit tkáňovou distribuci NK1 v srdci intaktního laboratorního potkana prostřednictvím nepřímé imunohistochemie a laserové mikrodisekce. Následně jsme zjišťovali, zda a do jaké míry je exprese genu pro NK1 receptor v srdci potkana ovlivněna chronickým diabetem

Výsledky RT-qPCR provedené u vzorků RNA vyzolované z homogenátů tkání jednotlivých srdečních oddílů prokázaly přítomnost mRNA pro NK1 receptor. Velmi vysoké hodnoty C<sub>q</sub> však naznačují, že exprese tohoto receptoru je v srdci nízká. V srdci kontrolních potkanů jsme zjistili, že exprese genu pro NK1 receptor je nejvyšší v levé síni, přičemž rozdíl proti zbývajícím srdečním oddílům je přibližně stonásobný. Western blot prokázal přítomnost NK1 receptoru v jednotlivých srdečních oddílech laboratorního potkana, přičemž tloušťka bandy vykazujícího imunoreakci se specifickou protilátkou naznačuje, že v síních je obsah NK1 receptoru významně vyšší než v komorách. Za pomoci imunofluorescence jsme zaznamenali specifickou imunoreakci na povrchu některých intrakardiálních neuronů, dále v nervových vláknech a v malých buňkách, které však nevykazovaly reakci s protilátkou proti RECA1, markeru endotelových buněk. Z toho je zřejmé, že se nejedná o endotelové buňky. Za účelem přesnějšího určení typu těchto buněk jsme provedli laserovou mikrodisekci buněk hladké cévní svaloviny koronárních cév, kardiomyocytů a intrakardiálních neuronů. Přítomnost mRNA pro NK1 receptor jsme zaznamenali pouze v jednom vzorku neuronů ze tří, vzorky kardiomyocytů i buněk hladké svaloviny byly negativní.

Úroveň exprese NK1 receptoru v srdci lze celkově označit za velmi nízkou. V porovnání s expresí CRLR, což je specifický receptor pro CGRP, peptid uvolňovaný spolu se SP ze senzorických nervových zakončení, se jedná o hodnoty více než stonásobně nižší. Důvodem absence signálu u dvou vzorků srdečních ganglií z laserové mikrodisekce může být relativně vyšší zastoupení neuronů neobsahujících daný receptor, čímž se mohlo dostat celkové množství mRNA pro NK1 receptor v těchto vzorcích pod detekční limit použité metody. Mediátorová RNA pro NK1 receptor, jež jsme prokázali v komorách, by mohla pocházet z buněk vykazujících imunoreakci s protilátkou

proti NK1 receptoru, jejichž typ se nám nepodařilo přesně určit, ale předpokládáme, že se jedná o fibroblasty. Prostřednictvím laserové mikrodisekce jsme prokázali, že kardiomyocyty ani buňky hladké cévní svaloviny koronárních cév neexprimují detekovatelné množství mRNA pro NK1 receptor. Rovněž nepřímá imunofluorescence neprokázala přítomnost specifické reakce těchto buněk s protilátkou proti NK1 receptoru. Výše popsané skutečnosti tedy naznačují absenci NK1 receptoru v těchto typech buněk. Kromě toho jsme prostřednictvím nepřímé imunofluorescence prokázali absenci imunoreakce s protilátkou proti NK1 receptoru v endotelových buňkách. Tento výsledek jsme nemohli potvrdit laserovou mikrodisekcí, protože touto metodou nelze z tkáňového řezu získat endotelové buňky v množství dostatečném pro RT-qPCR analýzu.

Naše výsledky tedy naznačují, že NK1 receptor je v srdci laboratorního potkana lokalizován v buněčných tělech některých intrakardiálních neuronů. Kromě toho se pravděpodobně nachází i v buňkách jiného typu, přičemž úroveň exprese stanoveného receptoru je v nervových buňkách srdce násobně nižší než v neuronech.



Doc. MUDr. Magdalena Chottová Dvořáková, Ph.D., vedoucí laboratoře laserové mikrodisekce.

## Laboratoř reprodukční medicíny

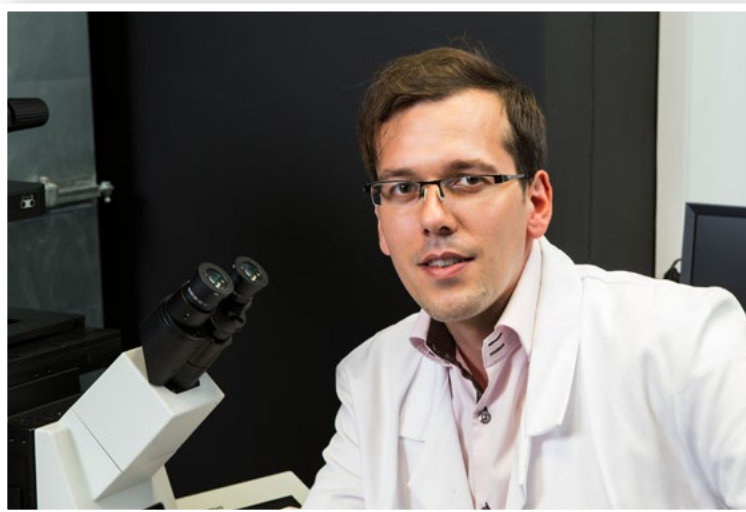
Jan Nevoral, Olga García-Álvarez, Miriam Štiavnická, Milena Králíčková

Biomedicínské centrum; Ústav histologie a embryologie

Laboratoř reprodukční medicíny je zaměřena na studium tvorby spermií, zrání oocytů, mechanismů epigenetické regulace oplození a časného pre-implantačního vývoje embrya v *in vitro* podmínkách. V Laboratoři je používána myš (*Mus musculus*) jako modelový organizmus, který umožňuje aplikaci dosažených výsledků v dalším výzkumu humánní reprodukce. Myší model je také využíván pro klinické a *in vivo* studie zaměřené na hodnocení environmentálních polutantů. Mimoto, v laboratoři dochází také k analýzám lidského materiálu, jako jsou pohlavní buňky a tělní tekutiny reprodukčního systému.

Laboratoř řeší následující vědecká témata: 1) epigenetické regulace oplození a časného embryonálního vývoje, 2) zapojení gasotransmiteru sulfanu v epigenetických regulacích, 3) vlivy negativně postihující kvalitu spermií a jejich oplození schopnost, 4) hodnocení vlivu endokrinních disruptorů na reprodukční systém.

Pro studium je v laboratoři využíváno těchto metod: *in vitro* zrání myších oocytů, oplození oocytů a kultivace embryí, analýza spermií pomocí průtokové cytometrie, imunocytochemická analýza gamet a embryí, biochemické analýzy biologického materiálu. Laboratoř reprodukční medicíny spolupracuje s dalšími laboratořemi Biomedicínského centra stejně jako s ostatními pracovišti v České republice (Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i., Praha; Česká zemědělská univerzita v Praze; Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Liběchov; Fakultní nemocnice v Brně) i zahraničí (SaBio IREC, Spain; University of Missouri, USA; Université Lille1, Sciences et Technologies, Francie; Chonbuk National University, Jižní Korea; Slovak University of Agriculture, Slovensko).



Ing. Jan Nevoral, Ph.D., vedoucí laboratoře reprodukční medicíny.

# Biofyzikální laboratoř

Jiří Beneš, Lukáš Bolek, Jiří Růžička, Jiří Dejmek

Biomedicínské centrum; Ústav biofyziky

Biofyzikální laboratoř je zaměřena převážně na aplikovaný výzkum. Část aktivit je zaměřena na oblast spojenou s temperací krve v mimotělních obězích a s tím spojený vývoj vhodných, na trhu nedostupných nástrojů a zařízení, jejich využití v preklinickém výzkumu metody způsobu snížení srážlivosti krve v okruhu přístroje pro náhradu funkce ledvin a zařízení k provádění tohoto způsobu. V současné době finišují přípravné práce na zahájení preklinických experimentů na zvířecích modelech k ověření vhodnost těchto našich nástrojů (předně tepelný výměník s laminarizérem) ve spolupráci s Kardiochirurgickým oddělením FN Plzeň a Laboratoří nádorové léčby a regenerace tkáně LFP UK. Výstupem bude znalost hemolyzačních vlastností odstředivých čerpadel pro čerpání krve, našich tepelných výměníků, k tomuto účelu vyvinutému mimotělnímu operačnímu setu a ověření samotné metody.

Mezi nejdůležitější výstupy patří získání českých a zahraničních patentů na metodu, nástroje a zařízení. Tepelný výměník s laminarizérem podle naší konstrukce získal český patent a v EU, US, EA byla potvrzena jeho priorita. Administrativní úkony k definitivnímu potvrzení a publikování patentu probíhají v těchto dnech. Temperační jádro se zvýšenou účinností získalo užitečný vzor, patentové řízení probíhá. Tým Biofyzikální laboratoře získal dva granty TAČR GAMA na vývoj Cirkulačního temperačního přístroje se zvýšenou účinností, který je komplementární k tepelnému výměníku s laminarizérem.

Dalším zaměřením je oblast hyperbarické oxygenoterapie, ve které jsou výzkumné aktivity zaměřeny na studium vlivu odlišných fyzikálních podmínek na růst a funkci buněčných linií a využití metody pro klinické účely. Dále jsou v těchto podmínkách testovány a vyvíjeny senzory se specifickými pracovními parametry. K dispozici máme pro tyto experimenty prototyp temperované hyperbarické komory s objemem 15 l.

V letošním roce byla dokončena (dovybavena) experimentální laboratoř v prostorách Ústavu biofyziky, ve které je nyní možné provádět precizní přípravu buněčného materiálu pro výzkum vlivu těchto odlišných fyzikálních podmínek. V prostorách BC byla zprovozněna laboratoř s malou hyperbarickou komorou (objem 0,6 m<sup>3</sup>) určená k studiu vlivu odlišných fyzikálních podmínek na živé organismy a v současné době probíhají přípravy na spuštění pilotních experimentů.

Výsledky výzkumných prací byly prezentovány na mezinárodních konferencích. V oblasti buněčné hyperbarie došlo k naplánování výzkumných aktivit na rok 2017 s několika týmy z ČR a zahraničí.

Výstupy chráněné duševním vlastnictvím (tepelný výměník s laminarizérem) jsou v současné době předmětem vyjednávání s cílem jejich prodeje či licencování (CPPT).



MUDr. et MUDr. Jiří Beneš, Ph.D., vedoucí biofyzikální laboratoře.

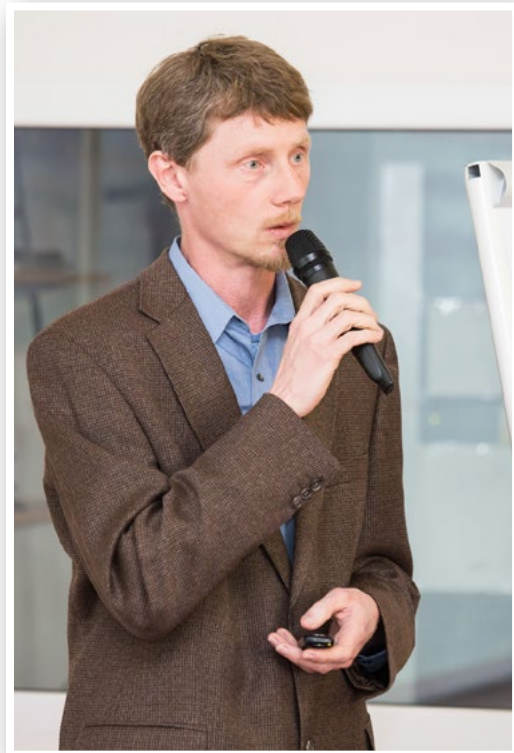
# Proteomická laboratoř

Jan Mareš

Biomedicínské centrum; I. interní klinika

Byla dokončena a v časopise s faktorem impaktu (Clinical and Experimental Nephrology) uplatněna práce s názvem „Mitochondrial proteomes of porcine kidney cortex and medulla: foundation for translational proteomics“. Hlavním výstupem této práce bylo srovnání mitochondriálního proteomu ledvinné kůry a dřene u prasete domácího. Výsledky podporují výchozí předpoklad odlišné metabolické adaptace mitochondrií kůry a dřene, pravděpodobně v závislosti na různé dostupnosti kyslíku v těchto kompartmentech.

Byl dokončen vývoj a validace nového postupu barvení glykoproteinů pomocí Schiffova činidla (MAPAS), práce s názvem „A simple, time-saving, microwave assisted periodic acid - Schiff staining for glycoproteins“ nyní prochází recenzním řízením. Nejdůležitějším výsledkem je snížení pracnosti klasického barvení a především zkrácení prováděcího protokolu ze 6 hodin na méně než 10 minut při zvýšení citlivosti metody a zachování možnosti identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie



MUDr. Jan Mareš, Ph.D., vedoucí proteomické laboratoře.

Byla dokončena analýza proteinového biofilmu z povrchu dialyzační membrány tří kliniky používaných dialyzátorů téže kategorie (moderní syntetická a vysoce propustná membrána na bázi polysulfonu) v rámci klinického testování zadaného a financovaného komerční společností B-Braun Avitum. Složení biofilmu poskytuje informace o reakci vnitřního prostředí pacientů na kontakt s cizorodým materiálem (biokompatibilita), ale také o selektivním odstraňování plazmatických proteinů v důsledku adsorbce.

Během celého roku probíhá zařazování pacientů do studie, jejímž cílem je charakterizovat na základě proteinového složení biofilmu z povrchu membrány mimotělního oxygenátoru (ECMO) interakci vnitřního prostředí pacienta s tímto zařízením (jako parametr biokompatibility). Zařazování jsou pacienti podstupující založení



aortokoronárního bypassu v mimotělním oběhu za definovaných podmínek zajišťujících homogenitu souboru. Cílem je prozkoumat odpověď organismu na cizí materiál za specifických podmínek (především silně hyperoxické prostředí).

U příležitosti Druhé výroční konference Biomedicínského centra 16. listopadu 2016 pro vlastní potřebu vydává Biomedicínské centrum Lékařské fakulty UK v Plzni. Projekt Biomedicínské centrum Lékařské fakulty v Plzni je spolufinancován z Národního programu udržitelnosti I č. LO1503 MŠMT. Jedná se o udržitelnost projektu OP VaVpl, PO 2 „Regionální VaV centra“, reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0076. Autoři fotografií: Jiří Miklo (úvodní), Libor Kočí (ostatní). Biomedicínské centrum, alej Svobody 1655/76, 323 00 Plzeň; web: [www.biomedic-plzen.cz](http://www.biomedic-plzen.cz); e-mail: [info@biomedic-plzen.cz](mailto:info@biomedic-plzen.cz).



