



BIOMEDICÍNSKÉ  
CENTRUM

TŘETÍ  
VÝROČNÍ KONFERENCE  
BIOMEDICÍNSKÉHO CENTRA

23. LISTOPADU 2017



## Třetí výroční konference Biomedicínského centra



23. listopadu 2017

U příležitosti Třetí výroční konference Biomedicínského centra 23. listopadu 2017 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 – ze dne 16. 11. 2017). 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).

# OBSAH

Seznam laboratoří Biomedicínského centra . . . . .	5
Program třetí výroční konference . . . . .	6
Úvod . . . . .	9
Standardní komercializační plán s ohledem na duševní vlastnictví Biomedicínského centra a související projekty . . . . .	10
Akutní poškození ledvin v sepsi: od hemodynamiky k molekulárním mechanismům . . . . .	11
Kompletní molekulárně-genetická charakteristika izolátů čeledi <i>Enterobacteriaceae</i> produkujících karbapenemázy typu OXA-48 izolovaných v nemocnicích České Republiky, s přímým průkazem horizontálního přenosu rezistence ke karbapenemům . . . . .	12
Význam virové nálože a doby vzniku cytomegalovirové replikace na dlouhodobé přežívání štěpu po transplantaci ledviny. . . . .	13
Buněčné mechanismy myokardiální deprese v prasečím modelu septického šoku. . . . .	14
Jednoduché, časově nenáročné barvení glykoproteinů na 1D elektroforetických gelech pomocí mikrovlnného ohřevu . . . . .	15
Multicentrická studie krevního tlaku měřeného v separované místnosti ve srovnání s klasickými metodami měření. . . . .	16
Dichloracetát zvyšuje mitochondriální respiraci levokomorového myokardu potkana po periodě anoxie . . . . .	17
Vliv aplikace TAA na expresi klasických neuromediátorů v srdci potkanů obou pohlaví . . . . .	19
Důležité výsledky dosažené Biofyzikální laboratoří za období leden 2016 – srpen 2017 . . . . .	20
Abnormální stresová reaktivita není hlavní příčinou poruchy prostorového učení u myši Lurcher. . . . .	22
Změna paměťových stavů v neuronových sítích mozku. . . . .	23
Charakteristika cirkulujících nádorových buněk u pacientů se IV. stádiem kolorektálního karcinomu . . . . .	25
Expression profile of oxysterol pathway genes and circulating levels of oxysterols in breast carcinomas . . . . .	27
Experimentální regenerace jater . . . . .	29
2D a 3D in vitro model dermálních fibroblastů v podmínkách chronické rány. . . . .	31
Rozdílná adheze, migrace a proliferace osteoblastů na chemicky strukturovaných vrstvách nanokrystalického diamantu hodnocená pomocí mikroskopie živých buněk . . . . .	33
Studium epigenetických regulací jako nástroj pro hodnocení endokrinních disruptorů v reprodukci . . . . .	34
Laboratoř kvantitativní histologie a její nejvýznačnější studie v období 2016–2017 . . . . .	35
Přehled činnosti zvěřince . . . . .	36

# SEZNAM LABORATOŘÍ BIOMEDICÍNSKÉHO CENTRA

## Výzkumný program 1

### Vedoucí

prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D.

1. **Experimentální laboratoř intenzivní medicíny** – prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D. (11)
2. **Laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii** – Dr. Constantinos Papagiannitsis, Ph.D. (12)
3. **Laboratoř transplantace ledvin a náhrady funkce ledvin** – doc. MUDr. Tomáš Reischig, Ph.D. (13)
4. **Laboratoř experimentální kardiologie** – doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D. (14)
5. **Proteomická laboratoř** – MUDr. Jan Mareš, Ph.D. (15)
6. **Laboratoř klinického výzkumu cévních a srdečních onemocnění** – prof. MUDr. Jan Filipovský, CSc., Ph.D. (16)
7. **Mitochondriální laboratoř** – doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D. (17)
8. **Laboratoř laserové mikrodisekce** – doc. MUDr. Magdalena Chottová Dvořáková, Ph.D. (19)
9. **Biofyzikální laboratoř** – MUDr. et MUDr. Jiří Beneš, Ph.D. (20)
10. **Laboratoř všeobecné biochemie a hematologie** – prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.

## Výzkumný program 2

### Vedoucí

prof. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D.

11. **Laboratoř neurodegenerativních poruch** – doc. MUDr. Jan Cendelín, Ph.D. (22)
12. **Laboratoř experimentální neurofyzologie** – MUDr. Karel Ježek, Ph.D. (23)
13. **Laboratoř nádorové biologie** – Mgr. Pavel Pitule, Ph.D. (25)
14. **Laboratoř farmakogenomiky** – doc. RNDr. Pavel Souček, CSc. (27)
15. **Laboratoř nádorové léčby a regenerace tkáně** – doc. MUDr. Václav Liška, Ph.D. (29)
16. **Laboratoř buněčné regenerativní medicíny** – Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D. (31)
17. **Laboratoř studia interakcí buněk s materiálem** – doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D. (33)
18. **Laboratoř reprodukční medicíny** – Ing. Jan Nevorál, Ph.D. (34)
19. **Laboratoř kvantitativní histologie** – doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D. (35)
20. **Laboratoř preklinických studií** – Ing. Pavel Klein, Ph.D. (36)

# PROGRAM TŘETÍ VÝROČNÍ KONFERENCE

8:30–9:15 Zahájení konference			s.
8:30	spectabilis prof. MUDr. Boris Kreuzberg, CSc.	Úvodní řeč	
		Předání Zlaté pamětní medaile ČLS JEP prof. MUDr. Mojmíru Petráňovi, CSs.	
8:40	doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D. – vědecký ředitel	Úspěchy Biomedicínského centra v letech 2016/2017	9
8:50	doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D. – manažer	Biomedicínské centrum v číslech – výsledky a výzvy	9
9:00	Mgr. Adam Šoukal	Ochrana duševního vlastnictví Biomedicínského centra a související projekty	10
9:15	přestávka		
9:30–11:00 I. odborný blok – prof. Matějovič, doc. Hrabák			
9:30	Ing. Dagmar Jarkovská	Buněčné mechanismy myokardiální deprese v prasečím modelu septického šoku	14
9:45	prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D.	Akutní poškození ledvin v sepsi: od hemodynamiky k molekulárním mechanismům	11
10:00	MUDr. Anna Skálová	Kompletní molekulárně-genetická charakteristika izolátů čeledi <i>Enterobacteriaceae</i> produkujících karbapenemázy typu OXA-48 izolovaných v nemocnicích České Republiky, s přímým průkazem horizontálního přenosu rezistence ke karbapenemům	12
10:15	doc. MUDr. Tomáš Reischig, Ph.D.	Význam virové nálože a doby vzniku cytomegalovirové replikace na dlouhodobé přežívání štěpu po transplantaci ledviny	13
10:30	Mgr. Michaela Marková	Dichloracetát zvyšuje mitochondriální respiraci levokomorového myokardu potkana po periodě anoxie.	17
10:45	prostor k diskuzi		
11:00	přestávka		
11:15–13:00 II. odborný blok – prof. Filipovský, Dr. Ježek			
11:15	Ing. Pavel Klein, Ph.D.	Přehled činnosti zvěřince	36
11:30	Ing. Jiří Moravec, Ph.D.	Jednoduché, časově nenáročné barvení glykoproteinů na 1D elektroforetických gelech pomocí mikrovlnného ohřevu.	15
11:45	doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.	Laboratoř kvantitativní histologie a její nejvýznačnější studie v období 2016–2017	35
12:00	doc. MUDr. Magdalena Chottová Dvořáková, Ph.D.	Vliv aplikace TAA na expresi klasických neuromediátorů v srdci potkanů obou pohlaví	19
12:15	MUDr. Lukáš Bolek, Ph.D.	Důležité výsledky dosažené Biofyzikální laboratoří za období 2016–2017	20
12:30	prof. MUDr. Jan Filipovský, CSc.	Multicentrická studie krevního tlaku měřeného v separované místnosti ve srovnání s klasickými metodami měření	16
12:45	prostor k diskuzi		

13:00	přestávka		
14:00–15:30 III. odborný blok – prof. Králíčková, doc. Liška			
14:00	RNDr. Dana Jelínková, Ph.D.	Abnormální stresová reaktivita není hlavní příčinou poruchy prostorového učení u myši Lurcher	22
14:15	MUDr. Karel Ježek, Ph.D.	Změna paměťových stavů v neuronových sítích mozku	23
14:30	Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D.	2D a 3D <i>in vitro</i> model dermálních fibroblastů v podmínkách chronické rány	31
14:45	doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D.	Rozdílná adheze, migrace a proliferace osteoblastů na chemicky strukturovaných vrstvách nanokrystalického diamantu hodnocená pomocí mikroskopie živých buněk	33
15:00	Ing. Jan Nevorál, Ph.D.	Studium epigenetických regulací jako nástroj pro hodnocení endokrinních disruptorů v reprodukci	34
15:15	prostor k diskuzi		
15:30	přestávka		
15:45–16:45 IV. odborný blok – doc. Štengl, doc. Kuncová			
15:45	doc. MUDr. Václav Liška, Ph.D.	Experimentální regenerace jater	29
16:00	doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.	Expression profile of oxysterol pathway genes and circulating levels of oxysterols in breast carcinomas	27
16:15	Mgr. Pavel Pitule, Ph.D.	Charakteristika cirkulujících nádorových buněk u pacientů se IV. stádiem kolorektálního karcinomu	25
16:30	prostor k diskuzi		



Prof. MUDr. Boris Kreuzberg, CSc., děkan Lékařské fakulty v Plzni.



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



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



# ÚVOD

Vážené kolegyně,  
vážení kolegové,

opět po roce se setkáváme na konferenci Biomedicínského centra. Letos se koná její třetí ročník, proto lze již mluvit o tradici. V předchozích letech bylo naším cílem se lépe poznat, zjistit, čím se který tým zabývá a vzájemně provázat naše výzkumné aktivity. Věříme, že toto se nám podařilo, jak ostatně vyplývá i z koncepce projektů, které byly v minulém roce zpracovány a podány. Abychom tedy neopakovali příspěvky z minulých let, rozhodli jsme se pojmout zaměření konference odlišně. A to tak, aby každý tým prezentoval svůj nejlepší výsledek, kterého za poslední období dosáhl.

A jsme přesvědčeni, že bude z čeho vybírat. V roce 2016 pracovníci Biomedicínského centra publikovali 118 prací v impaktovaných časopisech, z toho byla jedna třetina (35 publikací) zveřejněna v časopisech v prvním kvartilu daného oboru. Kromě toho bylo dalších 53 publikací uveřejněno v recenzovaných neimpaktovaných časopisech. V roce 2017 bylo do OBD dosud zařazeno 88 publikací, z toho 59 v impaktovaných časopisech. Pokud tyto publikace seřadíme podle výše faktoru impaktu, zjistíme, že na prvních místech jsou velmi prestižní časopisy (např. Annual Review of Pathology – IF 26,853, Lancet Infectious Diseases – IF 21,372, Intensive Care Medicine – IF 10,125).

Daří se také získávat granty z národních grantových agentur (AZV, GA ČR, TA ČR). V roce 2017 bylo zahájeno i řešení dvou projektů programu HORIZON 2020, na kterých pracovníci centra participují jako spoluřešitelé. Rovněž byly získány dva projekty, které jsou zaměřeny na akreditaci nových Ph.D. programů z výzvy OP VVV – Výzkumné infrastruktury pro vzdělávací účely. Bude se jednat o obory Experimentální chirurgie, Lékařská mikrobiologie a Biologie. V rámci projektů budou zakoupeny i zcela unikátní přístroje, které nemají v českých podmínkách dosud žádnou konkurenci. Další velký projekt z výzvy OP VVV – Excelentní výzkum, nazvaný FIND (Fighting Infectious Diseases) postoupil do druhého kola hodnocení na velmi dobré pozici (dělené 9. a 10. místo ze 118). Tento projekt by měl dále rozvíjet zaměření centra na problematiku infekčních nemocí a více propojit výzkumné zaměření obou výzkumných programů.

Věříme, že i tato konference přispěje k prohloubení další mezioborové spolupráce jednotlivých laboratoří a rozvoji konkurenceschopných vědeckých témat. Přejeme všem účastníkům, aby v přednáškách našli inspiraci a v kuloárech zažili příjemné tvůrčí prostředí.

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

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

# STANDARDNÍ KOMERCIALIZAČNÍ PLÁN S OHLEDEM NA DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ BIOMEDICÍNSKÉHO CENTRA A SOUVISEJÍCÍ PROJEKTY

Mgr. Adam Šoukal

V krátkosti se účastníci dozvědí něco o komercializačním plánu a důvodech proč vůbec chránit duševní vlastnictví, které bylo vytvořeno na půdě Biomedicínského centra. Účastníci se mimo jiné seznámí s aktuálním přehledem vynálezecké činnosti Biomedicínského centra v návaznosti na komercializační aktivity, které v letošním roce proběhly a probíhají.

Nastavit procesy spojené s komercializačními aktivitami není jednoduché a je potřeba vždy dobře rozlišit, zdali se jedná o výstupy projektu nebo zabezpečení velmi cenného nemotného majetku. Obě varianty jsou součástí života Biomedicínského centra, ale k oběma způsobům ochrany se musí přistupovat s náležitou opatrností a rozumným plánem do budoucna. Proč takové věci má smysl rozlišovat, se také účastníci mimo jiné dozvědí v rámci dané přednášky.

Univerzita Karlova získala financování pro projekt Univerzitní inovační síť. Cílem projektu je dále rozvíjet univerzitní inovační síť prostřednictvím tzv. skautů (pro přírodní a lékařské obory), resp. koordinátorů přenosu poznatků (pro humanitní obory). Univerzitní inovační síť (UIS) vznikla v roce 2014 v rámci projektu KREDO a dále ji v roce 2015 financovalo CPPT UK. Rozvoj UIS má probíhat ve dvou základních směrech. První z nich je vzdělávání pracovníků CPPT UK, skautů a koordinátorů přenosu poznatků a druhým pilířem je propagace principů přenosu poznatků a technologií mezi VaV pracovníky Univerzity Karlovy, aktivní vyhledávání a navazování kontaktů s aplikační sférou a procesní nastavení transferu znalostí a technologií v rámci UK.

# AKUTNÍ POŠKOZENÍ LEDVIN V SEPSI: OD HEMODYNAMIKY K MOLEKULÁRNÍM MECHANIZMŮM

M. Matějovič, J. Chvojka, L. Valešová, J. Beneš, J. Horák, V. Martínková

Experimentální laboratoř intenzivní medicíny, Biomedicínské centrum LF UK v Plzni

Akutní poškození ledvin (AKI, acute kidney injury) je společně s kardiovaskulárním systémem nejčastější orgánovou dysfunkcí u kriticky nemocných s významným vlivem na krátkodobou i dlouhodobou mortalitu. Hlavním příčinou AKI je seps. Pokrokům v léčbě AKI způsobeného sepsí (S-AKI, sepsis-induced AKI) však brání nedostatečná znalost jeho patogeneze. Detailní molekulární analýzy ledvinné tkáně jsou u kriticky nemocných nedostupné – neexistují technologie, které by bez nutnosti odběru vzorku ledviny umožnily vhléd do hemodynamických, celulárních a subcelulárních mechanismů a provádění rizikových sériových biopsií je z etických důvodů neproveditelné. Vědecké poznatky jsou tak převážně odvozené z malých zvířecích modelů, jejichž translační spolehlivost je značně limitována. Cílem práce experimentální laboratoře intenzivní medicíny bylo vyvinout velký zvířecí model sepse (prase domácí, seps indukovaná peritonitidou), u kterého bude docházet k rozvoji S-AKI se stejnou četností jako u septických pacientů (40–50 %). Tímto způsobem modelování jsme získali jedinečný experimentální vzorek, který umožňuje na úrovni hemodynamické, mikrovaskulární a molekulární zkoumat klíčové patogenetické rozdíly mezi zvířaty, která S-AKI vyvinou a těmi, jejichž renální funkce zůstane v průběhu sepse intaktní. Naše studie předkládá první dynamickou analýzu proteomu ledvin v klinicky relevantním velkém zvířecím modelu sepse. Časná (do 12 h od indukce sepse) exprese široké skupiny endogenních alarminů (DAMPS) a jejich tubulárních receptorů, včetně markerů stresu endoplazmatického retikula, předcházející změnám renální hemodynamiky, signalizuje význam primárně intrarenálních mechanismů iniciace a propagace tkáňového poškození. Časový vývoj proteomických a hemodynamických změn tedy ukazuje na sekundární úlohu zvýšené intrarenální cévní rezistence v rozvoji S-AKI, poznatek dosud v literatuře velmi kontroverzní a diskutovaný. Snížení funkce klíčových tubulárních transportérů je dobře kompatibilní s teorií metabolického reprogramování renálních tubulů v době inzultu. Výsledky analýzy genové exprese ukázaly, že rozvoj S-AKI je spojen se zvýšenou expresí genů ovlivňujících závažnou signalizaci (výsledky jsou v souladu s proteomickými daty), intrarenální vazoregulaci a apoptózu a naopak se sníženou expresí genů pro mitochondriální metabolismus a biogenezi. V ledvinách s rozvojem S-AKI jsme poprvé na velkém zvířecím modelu demonstrovali sníženou expresi PGC-1 alfa, hlavního faktoru mitochondriální biogeneze a metabolismu. Je možné, že protrahovaná suprese PGC-1 alfa může hrát významnou úlohu v přechodu z adaptivních změn energetického metabolismu tubulárních buněk do buněčného poškození. Pozorované změny genové exprese byly spojeny s významnou systémovou inflamací a odlišným renálním hemodynamickým fenotypem oproti septickým zvířatům bez AKI, nezávisle na charakteru systémové hemodynamiky. Tyto poznatky lze označit za světově zcela původní. Identifikované proteiny, geny a s nimi související biologické dráhy, na něž jsme poukázali, jsou podnětem k dalšímu mechanistickému výzkumu a mohou být východiskem k hledání perspektivních molekulárních léčebných cílů. Zasazením našich výsledků do kontextu současných vědeckých poznatků si také dovoluujeme formulovat koncepční návrh patogeneze akutního selhání ledvin v sepsi.

# KOMPLETNÍ MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÁ CHARAKTERISTIKA IZOLÁTŮ ČELEDI *ENTEROBACTERIACEAE* PRODUKUJÍCÍCH KARBAPENEMÁZY TYPU OXA-48 IZOLOVANÝCH V NEMOCNICÍCH ČESKÉ REPUBLIKY, S PŘÍMÝM PRŮKAZEM HORIZONTÁLNÍHO PŘENOSU REZISTENCE KE KARBAPENEMŮM

Skálová A.<sup>1,2</sup>, Chudějová K.<sup>1,2</sup>, Rotová V.<sup>1,2</sup>, Medvecký M.<sup>3</sup>, Študentová V.<sup>1,2</sup>,  
Chudáčková E.<sup>1,2</sup>, Lavička P.<sup>2</sup>, Bergerová T.<sup>1,2</sup>, Jakubů V.<sup>4</sup>, Žemličková H.<sup>4</sup>,  
Papagiannitsis C.<sup>1,2</sup>, Hrabák J.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Biomedicínské centrum Lékařské fakulty v Plzni, Univerzita Karlova; <sup>2</sup>Ústav mikrobiologie LF UK a FN v Plzni; <sup>3</sup>Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; <sup>4</sup>Národní referenční laboratoř pro antibiotika, SZÚ

V současné době jsme svědky alarmujícího vzestupu bakteriální rezistence ke karbapenémům, patřících mezi tzv. rezervní antibiotika. Jedním z epidemiologicky nejzávažnějších mechanismů vzniku této rezistence je produkce enzymů schopných degradace molekuly karbapenemu. Šíření karbapenemáz typu OXA-48 přispělo v posledních 3 letech k rapidnímu zvýšení výskytu karbapenemáza-pozitivních kmenů v nemocničních zařízeních na území ČR, který byl doposud sporadický. Na tomto faktu se významnou mírou podílí obtížné rozpoznání tohoto mechanismu rezistence a schopnost explozivního šíření cestou horizontálního přenosu.

Cílem studie bylo provedení kompletní molekulárně-genetické analýzy veškerých referovaných izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* produkujících karbapenemázy typu OXA-48, detekovaných v nemocnicích na území ČR do konce roku 2015. Bylo analyzováno celkem 26 izolátů, získaných od 20 pacientů hospitalizovaných v 7 českých nemocnicích. Prostřednictvím sekvenování nové generace byly identifikovány 3 typy plazmidů spojené s šířením genů blaOXA-48-like na území České republiky. Klíčovou roli v diseminaci celosvětového rozměru pak představuje pOXA-48-like plazmid a plazmidy z něj odvozené, které byly detekovány i u většiny českých izolátů. Analýza dat odhalila dosud nepublikované molekulárně-genetické aspekty u 2 podtypů odvozených od pOXA-48-like plazmidu.

Důsledná detekce, monitorace a potažmo zabránění šíření kmenů produkujících karbapenemázy je pro zachování terapeutických možností bakteriálních infekcí zcela zásadní. Význam těchto opatření vzrůstá v souvislosti s repatriací pacientů ze zemí, kde je výskyt rezistence tohoto typu vysoký.

# VÝZNAM VIROVÉ NÁLOŽE A DOBY VZNIKU CYTOMEGALOVIROVÉ REPLIKACE NA DLOUHODOBÉ PŘEŽÍVÁNÍ ŠTĚPU PO TRANSPLANTACI LEDVINY

Reischig T.<sup>1,2</sup>, Kačer M.<sup>1,2</sup>, Hrubá P.<sup>2,3</sup>, Jindra P.<sup>2,4</sup>, Hes O.<sup>2,5</sup>, Lysák D.<sup>2,3</sup>, Bouda M.<sup>1,2</sup>,  
Viklický O.<sup>2,3,6</sup>

<sup>1</sup>Interní klinika Lékařské fakulty UK v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň; <sup>2</sup>Biomedicínské centrum Lékařské fakulty UK v Plzni; <sup>3</sup>Transplanační laboratoř, Institut Klinické a Experimentální Medicíny, Praha; <sup>4</sup>Department of Hemato-oncology, Charles University Medical School and Teaching Hospital, Pilsen, Czech Republic; <sup>5</sup>Department of Pathology, Charles University Medical School and Teaching Hospital, Pilsen, Czech Republic; <sup>6</sup>Department of Nephrology, Institute for Clinical and Experimental Medicine; Prague; Czech Republic

**Východisko:** Asymptomatická cytomegalovirová (CMV) infekce je spojena s dysfunkcí a selháním štěpu. Žádná studie však dosud nezkoumala vliv CMV virové nálože na riziko selhání štěpu.

**Metodika:** V prospektivní kohortě pacientů po transplantaci ledviny jsme hodnotili vliv CMV DNAemie na celkové přežití štěpu a na výskyt středně těžké až těžké intersticiální fibrózy a atrofie tubulů (IF/TA) v protokolární biopsii ve 36. měsíci. CMV DNAemie byla rozdělena podle výše virové nálože.

**Výsledky:** Celkem 180 pacientů transplantovaných od října 2003 do ledna 2011 bylo zahrnuto do studie a sledováno po dobu 4 let; 87 (48 %) pacientů bylo léčeno tříměsíční profylaxí valacyclovirem a 45 (25 %) valganciclovirem; 48 (27 %) bylo vedeno pomocí preemptivní léčby. V průběhu 12 měsíců po transplantaci vznikla CMV DNAemie u 102 (57 %) pacientů, z nichž 36 (20 %) mělo virovou nálož  $\geq 2000$  kopií/ml. Multivariační Coxova analýza identifikovala CMV DNAemii jako nezávislý rizikový faktor pro selhání štěpu (HR = 3,42, P = 0,020); nicméně po stratifikaci na hodnotu virové nálože zůstala významná pouze CMV DNAemie  $\geq 2000$  kopií/ml (HR = 7,62, P < 0,001). Jak časná (<3 měsíce, P = 0,048) tak pozdní (>3 měsíce, P < 0,001) CMV DNAemie  $\geq 2000$  kopií/ml byly rizikovými faktory selhání štěpu. Výskyt středně těžké až těžké IF/TA nebyl CMV DNAemii významně ovlivněn.

**Závěry:** Pacienti po transplantaci ledviny s CMV DNAemii s vyšší virovou náloží bez ohledu na dobu vzniku jsou ve zvýšeném riziku ztráty štěpu.

# BUNĚČNÉ MECHANISMY MYOKARDIÁLNÍ DEPRESE V PRASEČÍM MODELU SEPTICKÉHO ŠOKU

Jarkovská D., Marková M., Horák J., Nalos L., Beneš J., Al-Obeidallah M., Tůma Z., Švíglerová J., Kuncová J., Matějovič M., Štengl M.

Laboratoř experimentální kardiologie ve spolupráci s Experimentální laboratoří intenzivní medicíny a Mitochondriální laboratoří Biomedicínského centra LF UK v Plzni

Komplexní patogeneze sepse zahrnuje myokardiální depresi, jejíž mechanismy zůstávají nejasné. V této studii jsme se zaměřili na buněčné mechanismy myokardiální deprese v klinicky relevantním modelu sepse a septického šoku u velkého zvířete. Sepse byla navozena fekální peritonitidou u 8 mechanicky ventilovaných a instrumentovaných prasat obou pohlaví v celkové anestézii, která byla následně sledována po 24 hodin.

U 8 kontrolních zvířat proběhl analogický experiment, ale bez vyvolání sepse. *In vitro* analýza srdečních funkcí zahrnovala měření akčního napětí a kontrakce pravokomorových trabekul, měření sarkomerické kontrakce, vápníkových přechodů a vápníkového proudu na izolovaných srdečních myocytech a analýzu mitochondriální respirace ultrasenzitivní oxygrafií.

Zvýšené hodnoty SOFA skóre a sérového laktátu potvrdily rozvoj sepse/septického šoku, který byl doprovázen obrazem hyperdynamické cirkulace s vysokou srdeční frekvencí, zvýšeným srdečním výdejem, periferní vazodilatací a sníženým systolickým objemem. V septických trabekulách bylo zkráceno trvání akčního napětí a snížena síla kontrakce. V septických srdečních myocytech došlo k útlumu sarkomerické kontrakce, vápníkových přechodů i vápníkového proudu L typu. Podobná relaxační trajektorie fázového diagramu závislosti sarkomerické délky na intracelulárním vápníku svědčila pro nezměněnou vápníkovou citlivost myofilament. Mitochondriální respirace byla inhibována na úrovni komplexu II a IV.

Poškozené vápníkové hospodářství se sníženými vápníkovými přechody a potlačeným vápníkovým proudem společně s inhibicí mitochondriální respirace pravděpodobně představují dominantní buněčné mechanismy myokardiální deprese u septického šoku.

# JEDNODUCHÉ, ČASOVĚ NENÁROČNÉ BARVENÍ GLYKOPROTEINŮ NA 1D ELEKTROFORETICKÝCH GELECH POMOCÍ MIKROVLNNÉHO OHŘEVU

Moravec J., Mareš J.

Proteomická laboratoř Biomedicínského centra LF UK v Plzni

Práce vychází z dlouhodobě zavedeného barvení glykoproteinů na elektroforetických gelech Schiffovým činidlem (adukt triarylmethanového barviva pararosanilinu a oxidu siřičitého). Cukerná část glykoproteinů (glykan) je před barvením oxidována kyselinou jodistou, která selektivně oxiduje vicinální diolové struktury na odpovídající dialdehyd a ten následně reaguje s Schiffovým činidlem za vzniku červenofialového produktu, kterým je označeno umístění glykoproteinu na gelu. Toto barvení trvá podle standardního protokolu zhruba šest hodin a s provedením elektroforézy zabere celý pracovní den. V nedávné minulosti byly publikovány práce zabývající se zrychlením barvení elektroforetických gelů ohřevem v mikrovlnné troubě. Tímto způsobem byly optimalizovány protokoly barvení Coomassie Blue, stříbrem i fluorescentním barvivem SYPRO Ruby. Optimalizací a urychlením mikrovlnným ohřevem jednotlivých kroků protokolu standardního barvení glykoproteinů jsme celý postup zkrátili z 6 hodin na méně než 10 minut s použitím standardních chemikálií. Zároveň jsme ukázali, že takto zrychlené barvení glykoproteinů je přinejmenším stejně citlivé jako běžný přístup. Všechny glykoproteiny barvené MAPAS postupem byly úspěšně identifikovány za použití MALDI TOF/TOF hmotnostní spektrometrie. Zkrácení doby zbarvení gelu a zjednodušení barvicího protokolu významně zvyšuje množství vzorků, ve kterých je na elektroforetických gelech možno detekovat glykoproteiny.



Ing. Pavel Klein, Ph.D., Ing. Jiří Moravec, Ph.D., doc. MUDr. Jan Cendelín, Ph.D., Mgr. Yaroslav Kolínko, Ph.D. a další účastníci Druhé výroční konference Biomedicínského centra 16. listopadu 2016.

# MULTICENTRICKÁ STUDIE KREVNIHO TLAKU MĚŘENÉHO V SEPAROVANÉ MÍSTNOSTI VE SROVNÁNÍ S KLASICKÝMI METODAMI MĚŘENÍ

Filipovský J., Mlíková Seidlerová J., Mateřánková M., Mayer Jr. O.

Laboratoř klinického výzkumu cévních a srdečních onemocnění, Biomedicínské centrum LF UK v Plzni, II. interní klinika LF UK a FN Plzeň

**Cíle:** Krevní tlak měřený automatickou metodou (AutoTK) ve zdravotnickém zařízení bez přítomnosti personálu může eliminovat efekt bílého pláště. Studovali jsme jeho vztahy ke krevnímu tlaku (TK) měřenému běžným způsobem lékařem (auskultačně – AusTK – i oscilometricky – OscTK) a ke 24-hodinovému ambulantnímu monitorování TK (AMTK).

**Metodika:** Do studie, která probíhala ve čtyřech akademických centrech (Plzeň, Hradec Králové, 2 × Brno), byli zařazeni stabilní dlouhodobě sledovaní nemocní s esenciální hypertenzí. AutoTK byl měřen 6 × přístrojem BPTru; po automatickém měření v oddělené místnosti následovalo měření TK v ordinaci, a to 3 × auskultačně (povinné měření) a následně 3 × oscilometricky (nepovinné měření, prováděné u všech jedinců ve dvou centrech). AMTK bylo provedeno do jednoho týdne od klinické návštěvy.

**Výsledky:** Byla zpracována data 172 jedinců ve věku  $63.7 \pm 12.4$  let s AusTK  $127.6 \pm 12.1 / 77.6 \pm 10.0$  mm Hg. AutoTK byl o  $8.5 \pm 9.0 / 3.0 \pm 6.1$  mm Hg nižší než AusTK ( $p < 0.0001$ ); tento rozdíl byl relativně homogenní ve všech centrech. Rozdíl se zvyšoval s úrovní AusTK ( $p = 0,030$  v mnohočetné regresi) a nezávisel na žádném z dalších sledovaných faktorů (věk, laboratorní parametry, druh léčby, doba od užití medikace). Individuální rozdíl mezi AusTK a AutoTK, testovaný pomocí Bland-Altmanových grafů, byl velmi variabilní a pohyboval se od +40 do -12 mm Hg pro systolický TK a od +21 do -15 mm Hg pro diastolický TK. OscTK se lišil od AutoTK obdobně jako AusTK: rozdíl činil  $8.6 \pm 8.6 / 1.9 \pm 5.7$  mm Hg. 24 hodinový průměr AMTK byl o  $4.2 \pm 12.1 / 3.5 \pm 7.8$  mm Hg nižší než AusTK a o  $4.3 \pm 11.0 / 0.5 \pm 6.9$  mm Hg vyšší než AutoTK ( $p < 0.0001$  pro všechny rozdíly); korelační koeficienty 24 hodinového průměrného TK s AusTK a s AutoTK se nelišily ( $p$  pro rozdíl  $\geq 0.13$ ).

**Závěry:** AutoTK poskytuje významně nižší hodnoty jak systolického, tak diastolického TK než AusTK, OscTK i než 24-hodinový průměr AMTK; vztahy AusTK a OscTK k AutoTK se mezi sebou nijak neliší. Nepotvrdili jsme výsledky dřívějších studií navrhujících, že AutoTK má těsnější asociaci k AMTK nežli běžně měřený TK v ordinaci. Význam konkrétního typu měření pro klinickou praxi je dán tím, zda predikuje prognózu nemocného více než zavedená měření a zda existují terapeutické studie. Taková data zatím nejsou dostatečná, a proto automatické měření TK v separované místnosti zůstává pouze doplňkovou metodou.



# DICHLORACETÁT ZVYŠUJE MITOCHONDRIÁLNÍ RESPIRACI LEVOKOMOROVÉHO MYOKARDU POTKANA PO PERIODĚ ANOXIE

Marková M., Kancirova I., Tůma Z., Ferko M., Kuncová J.

Ústav fyziologie LF UK v Plzni, Mitochondriální laboratoř, Proteomická laboratoř,  
Biomedicínské centrum LF UK v Plzni, Česká republika; Ústav pre výskum srdca SAV,  
Bratislava, Slovenská republika

Preconditioning, tj. zvýšení odolnosti myokardu vůči ischemicko-reperfučnímu poškození lze indukovat pomocí relativně jednoduchých experimentálních postupů nebo metabolických intervencí. Ischemický preconditioning je založen na navození opakované krátkodobé koronární okluze před následnou prodlouženou ischemií myokardu, metabolický preconditioning je možné vyvolat hyperglykemií po aplikaci streptozotocinu (STZ) dospělým potkanům. Oba způsoby lze v klinické praxi těžko uplatnit, proto je ve výzkumu věnována velká pozornost jejich případným alternativám, které by měly stejnou účinnost, ale lepší praktickou proveditelnost. Jednou z mnoha možností je cílený zásah do metabolismu myokardu na úrovni pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDH), jehož inhibice specifickou kinázou (PDK) byla u mnohých onemocnění srdce prokázána. PDH je multienzymový komplex mitochondriální matrix, který přeměňuje pyruvát na acetylkoenzym A (acetyl-CoA) a směruje tak uhlíkové atomy získané metabolismem glukózy k oxidaci v mitochondriích. Dodávka acetyl-CoA aktivací PDH současně tlumí jeho zisk z mastných kyselin.

Účelem naší studie bylo stanovit charakter respirace mitochondrií levokomorového myokardu potkana kmene Wistar po aplikaci inhibitoru PDK dichloracetátu (DCA).

Použili jsme celkem 22 potkanů, z nichž 11 byl aplikován v předstihu 8 dnů STZ. V den vlastního experimentu byl potkanům aplikován DCA (1,5 mmol/kg, i.p. – DCA-K a DCA-STZ) nebo fyziologický roztok (K-K a K-STZ). Mitochondriální spotřeba kyslíku byla měřena pomocí vysoce účinné respirometrie (oxygraf Oroboros, Rakousko) na hrubě homogenizovaných vzorcích levé komory standardními titračními protokoly, jejichž analýzou byly stanoveny standardní respirační stavy LEAK (spotřeba kyslíku nutná k udržení membránového potenciálu), OXPHOS (kapacita oxidační fosforylace při aktivaci komplexů I, I po aplikaci pyruvátu, I+II, II), ROX (reziduální spotřeba kyslíku) a CIV (aktivita komplexu IV při stimulaci umělým substrátem). Spotřeba kyslíku byla korigována na ROX a vztažena na mg hmotnosti. U části vzorků byla v průběhu měření snížena koncentrace kyslíku v komůrkách na 0 nmol/l na 20 min. Aktivita citrát syntázy, která slouží jako ukazatel počtu mitochondrií, byla stanovena spektrofotometrickou metodou.

Potkani po aplikaci STZ měli mitochondriální respiraci signifikantně vyšší než kontroly. DCA signifikantně zvýšil nejen všechny stavy OXPHOS vztažené ke komplexu I, ale také OXPHOS I+II, OXPHOS II a CIV u kontrolních potkanů. U hyperglykemických STZ potkanů byl jeho účinek také signifikantní, ale relativně nižší než u kontrol a respirační parametry mezi DCA-K a DCA-STZ potkany se významně nelišily. Krátkodobá anoxie (20 min) vedla ke snížení respiračních paramet-

rů kontrolních i STZ vzorků srdeční tkáně, ale v myokardu potkanů po aplikaci DCA *in vivo* došlo ještě k dalšímu nárůstu OXPHOS I+II, OXPHOS II a CIV. Výsledky studie naznačují, že inhibice PDK *in vivo* vede ke značnému zlepšení mitochondriální respirace myokardu levé komory potkana. Potvrzují také hypotézu, že DCA může zvyšovat odolnost mitochondriální respirace po vystavení periodě anoxie.

Podpořeno programem PROGRES Karlovy univerzity (projekt Q39), Národním programem udržitelnosti LO1503, grantem GAČR 15-15716S a projektem specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260394/2017.



Doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D., vedoucí mitochondriální laboratoře Biomedicínského centra.

# VLIV APLIKACE TAA NA EXPRESI KLASICKÝCH NEUROMEDIÁTORŮ V SRDCI POTKANŮ OBOU POHLAVÍ

Chottová Dvořáková M.<sup>1,2</sup>, Jarkovská D.<sup>1,2</sup>, Mistrová E.<sup>1,2</sup>, Kotyzová D.<sup>3</sup>, Krížková V.<sup>4</sup>, Slavíková J.<sup>1</sup>, Bludovská M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Biomedicínské centrum, <sup>2</sup>Ústav fyziologie, <sup>3</sup>Ústav farmakologie a toxikologie, <sup>4</sup>Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova

Thioacetamid (TAA) je látka s hepatotoxickým účinkem, která je používána k indukci jaterního selhání u drobných laboratorních zvířat. Chronická aplikace TAA vyvolá u laboratorního potkana jaterní fibrózu s histologickým obrazem srovnatelným s jaterní fibrózou u člověka. Jaterní cirhóza je mimo jiné spojena poškozením srdeční inervace, humorální a nervovou dysregulací a elektrofyziologickými abnormalitami, což v důsledku vede ke vzniku poruch kardiovaskulárních funkcí.

Cílem naší studie bylo (1) vytvořit optimální model chronického jaterního selhání u laboratorního potkana, (2) zjistit případné rozdíly v reakci potkana na aplikaci TAA způsobené rozdílným pohlavím, (3) stanovit vliv jaterního selhání na expresi enzymů zodpovědných za syntézu klasických mediátorů autonomního nervového systému v srdci laboratorního potkana.

Dospělým potkanům kmene Wistar obou pohlaví byl intraperitoneálně aplikován TAA po dobu 12 týdnů. Za dalších 8 týdnů byli usmrceni a potřebné vzorky krve a tkání byly odebrány. Z nich byla následně zjištěna úroveň peroxidace v srdci a játrech. Dále byla vyhodnocena funkce jater prostřednictvím stanovení hladiny jaterních enzymů v séru. Reakce jaterní tkáně na TAA aplikaci byla dále hodnocena pomocí histologického vyšetření. Relativní exprese tyrosinhydroxylázy (TH), dopamin- $\beta$ -hydroxylázy (DBH) a cholinacetyltransferázy (ChAT) byla stanovena v levých srdečních síních kontrolních potkanů a potkanů po TAA aplikaci.

Histologické vyšetření prokázalo přítomnost fibrotických změn v jaterní tkáni jedinců obou pohlaví. Samci vykazovali vyšší stupeň náchylnosti k oxidativnímu stresu vyvolanému chronickou aplikací TAA než samice. Podávaná dávka byla dostatečná k vzestupu úrovně peroxidace lipidů u samců, ale u samic tento efekt pozorován nebyl. Expze mRNA pro DBH a CHAT byla po aplikaci TAA snížena u samic, avšak u samců se TAA skupina od kontrolní významně nelišila. Expze TH nebyla experimentálními podmínkami ovlivněna ani u jednoho pohlaví.

Dosavadní výsledky ukazují, že reakce tkání laboratorního potkana na oxidativní stres vyvolaný aplikací TAA je významně ovlivněn pohlavím. Rovněž expze enzymů zodpovědných za tvorbu neuromediátorů jsou v srdečních síních ovlivněny aplikací TAA rozdílně u samců a samic. Závěrem lze konstatovat, že vliv pohlaví by měl být brán v potaz při studiích na potkanech, kde je použita aplikace TAA.

# DŮLEŽITÉ VÝSLEDKY DOSAŽENÉ BIOFYZIKÁLNÍ LABORATOŘÍ ZA OBDOBÍ LEDEN 2016 – SRPEN 2017

Bolek L., Dejmek J., Růžička J., Beneš J.

Biofyzikální laboratoř Biomedicínského centra Lékařské fakulty UK v Plzni

Oblasti zaměření Biofyzikální laboratoře:

1. Vývoj specifických metod, technologií, přístrojů a prostředků využívajících fyzikální a biofyzikální principy.
2. Výzkum hyperbarického prostředí v souvislosti s ovlivňováním vlivu tohoto prostředí na kultivační média, buňky a buněčné systémy

Dosažené výsledky:

## **1. Výzkum metody způsobu snížení srážlivosti krve v okruhu přístroje pro náhradu funkce ledvin**

V r. 2016 byl zkonstruován univerzální experimentální set pro funkční testování výměníků určených pro ověření metody snížení srážlivosti krve. Na přelomu r. 2016/17 byla s pozitivním výsledkem ověřována hydrodynamická funkčnost setu s vodní náplní v okruhu odstředivého čerpadla BIO CONSOLE 550 – unikátní čerpadlo používané při kardiokirurgických operacích v extrakorporálním oběhu. Laskavostí KCH bylo čerpadlo pro experimenty slíbeno k zapůjčení. Nicméně se nám podařilo toto čerpadlo jako použité a nefunkční získat za několik desítek tisíc Kč z USA a následně zrekonstruovat a uvést do plné funkce, čímž jsme nejen ušetřili přes 1 mil. Kč, ale hlavně získali možnost čerpadlo trvale využívat při přípravě a realizaci experimentů.

Zároveň byly dlouhodobě plánovány experimenty na zvířeti, sestavován tým, který se bude experimentů účastnit a detailně rozpracován a diskutován plán biochemických a hematologických vyšetření. Za velký úspěch považujeme zahájení pilotních experimentů na prasatech v červenci 2017 s tím, že od té doby proběhly zatím tři plánované piloty. V současné době (srpen 2017) probíhá analýza získaných technických, fyzikálních, biochemických a hematologických výsledků. Předběžné vyhodnocení výsledků zatím potvrzují správnost technického řešení experimentu a předpoklad minimálního vlivu použitého čerpadla a konstrukce výměníků na vlastnosti krve.

Na základě podrobné analýzy výsledků dosavadních experimentů pak plánujeme do konce r. 2017 provést dle finančních a časových možností ještě další pilotní experiment(y), kde se bude ověřovat vliv opakovaného zchlazení krve nejméně o 18 °C a následného ohřátí zpět na teplotu 38 °C v extrakorporálním oběhu dle našeho návrhu a to při snížené dávce heparinu. Poděkování za konzultace a cenné rady patří prof. Matějovičovi a za vynikající spolupráci při experimentech týmu doc. Lišky z BC, MUDr. Škorpilovi a Mgr. Stazskovi z KCH, doc. Kuncové a MUDr. Nalosoovi z Ústavu fyziologie a prof. Rackovi, MUDr. Šigutové a Mgr. Florové z ÚKBH.

## 2. Projekt: Cirkulační temperační přístroj se zvýšenou účinností (COOLER 2)

Dalším úspěchem bylo v r. 2016 získání grantu na konstrukci přístroje, který vyvíjíme pro efektivní využití tepelných výměníků zmiňovaných v předchozím bodu. Projekt je financován z TAČR – GAMA (TG20160302 „Podpora procesu komercializace výsledků výzkumu a vývoje na Univerzitě Karlově v Praze“). Začátek projektu září 2016, konec projektu prosinec 2017.

Aktuálně jsou dokončovány jednotlivé elektronické měřicí a řídicí moduly přístroje a hlavně dokončujeme úpravy temperačního jádra přístroje naší konstrukce, které povedou ke zvýšení výkonu celého přístroje. Zároveň připravujeme podklady pro ochranu duševního vlastnictví, tj. pro podání žádosti o zapsání užitého vzoru a uznání patentu na naši novou konstrukci.

## 3. Studium vlivu zvýšeného parciálního tlaku kyslíku na mitochondriální respiraci lidských buněk HFL1

Na konci r. 2016 byla dokončena experimentální buněčná laboratoř v prostorách Ústavu biofyziky, ve které je nyní možné provádět precizní přípravu buněčného materiálu. Laboratoř disponuje unikátní mikrohyperbarickou komůrkou, která výzkum vlivu těchto odlišných fyzikálních podmínek umožňuje.

V roce 2017 se podařilo odstranit problémy s kontaminací buněčných kultur. V současné době jsou protokoly kultivace a ovlivňování zoptimalizovány a probíhá sběr dat z experimentů. Výsledky budou publikovány v roce 2018.

## Ovlivnění diabetického defektu u potkana hyperbarickou oxygenoterapií

Výsledkem pracoviště experimentální hyperbarické komory je uskutečnění pilotních experimentů se zdravými potkany. Pět potkanů podstoupilo 20 expozií, při tlaku izokompresní fáze 0,25 MPa, 90 min. Pozorování ani klinické vyšetření u potkanů neprokázalo žádné odchylky od normálu a tak byla potvrzena použitelnost stávající adaptace zařízení. Dalším výsledkem je vypracování Projektu pokusu a Netechnického shrnutí pokusu – studie vlivu hyperbarického kyslíku na hojení ran, specifiky na animální model diabetického defektu.

## 5. Dosažení patentů

- US patent číslo: US 9,500,415 B2: „Heat exchanger with laminarizer“ publikovaný dne 22. 11. 2016. Původci: Bolek *et al.*
- EU patent číslo: EP 2 678 628 B1: „Heat exchanger with laminarizer“ publikovaný dne 1. 2. 2017. Původci: Bolek *et al.* EP 2 678 628 je validován v Německu, Francii a Británii. Platnost patentů je od 20. 7. 2017.
- Národní (CZ) patent ÚPV číslo: 306496: „Termoelektrický tepelný výměník s integrovaným rezervoárem“ publikovaný dne 15. 2. 2017. Původci: Bolek *et al.*
- Národní (CZ) patent ÚPV číslo: 306496 „Diagnostický systém pro zjišťování a sledování bioimpedance hrudníku a stanovení emergentních stavů hrudníku“ publikovaný dne 21. 6. 2017. Původci: Růžička *et al.*

Studie byla financována z NPU I č. LO1503 poskytovaného MŠMT. Podpořeno Programem Progres Q39 UK. Podpořeno projektem TAČR – GAMA TG20160302 „Podpora procesu komercializace výsledků výzkumu a vývoje na Univerzitě Karlově v Praze“.

# ABNORMÁLNÍ STRESOVÁ REAKTIVITA NENÍ HLAVNÍ PŘÍČINOU PORUCHY PROSTOROVÉHO UČENÍ U MYŠÍ LURCHER

Tůma J.<sup>1,2</sup>, Kolinko Y.<sup>3,4</sup>, Jelínková D.<sup>1,2</sup>, Hilber P.<sup>5</sup>, Cendelín J.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologické fyziologie, LF UK v Plzni, <sup>2</sup>Laboratoř neurodegenerativních poruch, Biomedicínské centrum, LF UK v Plzni, <sup>3</sup>Laboratoř kvantitativní histologie, Biomedicínské centrum, LF UK v Plzni, <sup>4</sup>Ústav histologie a embryologie, LF UK v Plzni, <sup>5</sup>Laboratory of Psychology and Neurosciences of Cognition and Affectivity. EA 4700, University of Rouen Normandy, France

Lidé i laboratorní zvířata s poškozením mozečku trpí kromě mozečkové ataxie též poruchami kognitivních schopností, emocí a chování, které připomínají některé projevy poruch autistického spektra. Mutantní myši s degenerací mozečku selhávají v testech prostorového učení a zároveň vykazují abnormální chování v anxiogenních situacích. Cílem studie bylo zkoumat vztah změn stresové reakce souvisejících s poškozením mozečku a výkonu v testu prostorového učení a paměti. Dospělé mutantní myši Lurcher s geneticky podmíněným degenerativním onemocněním mozečku byly vystaveny vodnímu prostředí bez možnosti aktivního úniku a poté podrobeny testu v Morrisově vodním bludišti, v němž mají možnost úniku pomocí skrytého ostrůvku. Jako ukazatel intenzity stresu jsme měřili kortikosteron, hlavní myší glukokortikoid, v moči pokusných myší. Dále jsme hodnotili objem jednotlivých částí nadledvin. Přes výrazný deficit prostorové navigace si myši Lurcher částečně udržely schopnost učení. Měly však výraznější vzestup kortikosteronu po expozici vodnímu prostředí než zdravé myši typu wild. V průběhu testu prostorového učení nedocházelo ani u myší Lurcher, ani u myší wild k poklesu intenzity odpovědi, ačkoliv bylo u obou typů myší patrné zlepšování výkonu v bludišti. *Zona fasciculata* a *zona reticularis* kůry nadledvin, které produkují glukokortikoidy, i dřeň nadledvin měly větší objem u myší Lurcher, což odráží jejich vyšší reaktivitu na stresor. Vodní prostředí bylo pro oba typy myší natolik silným stresem, že během experimentu nedošlo k habituaci. Ani stoupající schopnost uniknout z vodního prostředí, a tím působení stresoru aktivně kontrolovat, neomezila intenzitu stresové reakce. Přetrvávající stresová reakce přitom nebránila procesu učení. Zdá se tedy, že nadměrná stresová reakce není hlavním faktorem, který by vysvětlil poruchu prostorového učení u mozečkových mutantů Lurcher.

Práce byla podpořena Národním programem udržitelnosti I (NPU I) číslo LO1503, grantem MOBILITY 7AMB15FR024 poskytnutým Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy české republiky, Výzkumným programem Univerzity Karlovy P36 a Hubert Curien Partnership Barrande Project, Campus France.

# ZMĚNA PAMĚŤOVÝCH STAVŮ V NEURONOVÝCH SÍTÍCH MOZKU

Ježek K., Zitrický F.

Laboratoř experimentální neurofyzologie Biomedicínského centra Lékařské fakulty  
v Plzni, Univerzita Karlova

Fyziologickou podstatou paměťové stopy je síť posílených synaptických spojení mezi skupinou neuronů reprezentujících uložený stimulus. K vybavení paměti pak dojde, když se na vstupních vláknech objeví informace specificky aktivující alespoň kritické množství neuronů zmíněné skupiny.

Přes svoji přímočarost, má tento koncept aktivace paměťové stopy své nejasnosti.

Především, vybavení paměti je téměř okamžitý, jen několik stovek milisekund trvající proces, který přitom představuje globální změnu stavu aktivity v síti. Jde o nahrazení aktivity jedné populace neuronů populací jinou. Každý aktivní stav ale podléhá stabilizačním mechanizmům zabraňujícím jeho spontánnímu oslabení, jež jsou zajištěné vnitřní architekturou propojení sítě a její plasticitou. Zprostředkují tak nezbytnou stabilitu interpretace okolního světa v reálném tj. informačně velmi variabilním prostředí. Aby se nově aktivovaný engram v neuronové síti za těchto podmínek prosadil, musí zmíněné stabilizační mechanizmy překonat.

Doposud nebylo zřejmé jakým způsobem se toto děje.

Změnu paměťového stavu studujeme prostřednictvím registrace aktivity jednotlivých neuronů hipokampu – mozkové struktury, která zodpovídá za prostorovou orientaci a paměť napříč všemi savci. Poskytuje tak unikátní model výzkumu paměti na úrovni jednotlivých buněk a jejich sítí. V našem protokolu můžeme skokovitě měnit identitu okolního prostředí, která způsobí časově přesně kontrolovatelnou změnu vstupní informace neuronové sítě. Ta je spolehlivě následována i aktivací příslušného engramu. Již dříve jsme popsali kinetiku změny paměťových stavů, která nastává během prvních stovek milisekund po přepnutí identity prostředí (Ježek *et al.*, 2011), nedávno jsme s kolegy vyvinuli nový dekodér paměťových stavů (Posani *et al.*, 2017) a popsali možný stabilizační model atraktorů v hipokampu (Mark *et al.*, 2017).

Nyní se nám patrně podařilo identifikovat mechanismus, který okamžité vybavení paměti v neuronové síti umožní: nastupující paměťová stopa tak okamžitě po vnější stimulaci začne dominovat aktivitě neuronové sítě, a během několika sekund se příslušný paměťový stav plně stabilizuje.

Po změně vstupní kontextuální informace jsme nejprve zaznamenali dočasný výrazný nárůst aktivity, trvající cca 5 sekund. Prokázali jsme, že nejde o pouze zvýšený počet výbojů buněk, u nichž je v daný moment aktivita očekávána, ale o skokovitý (na cca 170 %) nárůst samotného počtu aktivních neuronů. Dále, tento nárůst se netýká populací buněk obou paměťových stop, které mezi sebou v tuto chvíli kompetují (v síti dochází po několika sekund ke kompetitivnímu, opakovanému překmitávání mezi oběma stavy). Překvapením bylo, že selektivně je posílena pouze nově se aktivující paměťová stopa. Když jsme ‚novou‘ populaci neuronů blíže charakterizovali, ukázalo

se, že jde o neurony, které ve stejné paměťové stopě kódují spíše místa vzdálená od koordináty, na které se potkan momentálně nachází. Dochází proto sice k přechodnému zhoršení přesnosti kódování poziční informace, celý jev ale přináší daleko masivnější expresi aktivovaného engramu. Fenomén jsme nazvali pracovně ‚overexpression of reactivated memory trace‘. Dalším rozbořením dat jsme charakterizovali ve vysokém časovém rozlišení identitu jednotlivých paměťových kvant (dříve jsme popsali kvantum paměťového stavu jako periodu lokální 6–11 Hz eeg oscilace v hipokampovém neuronovém okruhu). Vypracovali jsme citlivější algoritmus pro kategorizaci paměťových stavů a zjistili, že sledovaný dynamický časový úsek, při němž k aktivaci paměti dochází, obsahuje velké množství ‚mixovaných stavů‘, představujících kombinaci obou paměťových stop. Když jsme analyzovali jaký vliv má přítomnost přeexprimované paměťové stopy na vývoj kompetice mezi stopami uvnitř mixovaných stavů, našli jsme, že aktivita buněk příslušejících novému paměťovému stavu je posunuta směrem k pozdější fázi mixovaného úseku. To znamená, že popsaná ‚přeexprese‘ způsobuje častější zakončení kompetice mezi paměťovými stavy dominancí nově aktivovaného engramu nad původním stavem. Tyto nálezy tak tvoří ucelený obraz mechanismu, zajišťujícího okamžitou aktivaci paměťové stopy ve vysoce kompetitivním systému hipokampové neuronové sítě její facilitovanou expresí.

Podpořeno programem PROGRES Karlovy univerzity (projekt Q39), Národním programem udržitelnosti LO1503, grantem GAČR 15-20008S a projektem specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260394/2017.



MUDr. Karel Ježek, Ph.D., vedoucí laboratoře experimentální neurofyziologie a další účastníci konference (A. Skálová, V. Rotová, C. Papagiannitsis – tým antibiotické rezistence; V. Hlaváč, V. Brynychová a K. Elsnerová – tým farmakogenomiky).



# CHARAKTERISTIKA CIRKULUJÍCÍCH NÁDOROVÝCH BUNĚK U PACIENTŮ SE IV. STÁDIEM KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Pitule P., Ostašov P., Thiele J.-A., Hicks J., Kralovcová E., Hošek P., Pešta M., Vodičková L., Vodička P., Polívka J., Skála M., Šorejs O., Fiala O., Brůha J., Vyčítal O., Králíčková M., Liška V.

Biomedicínské centrum Lékařské fakulty v Plzni, Univerzita Karlova

**Úvod:** Kolorektální karcinom patří mezi nejčastější solidní nádorová onemocnění, a i přes značné pokroky v jeho léčbě stále existuje významný prostor pro její zkvalitnění. Kromě včasné detekce nádorového onemocnění je pro úspěšnost léčby zásadní zastavení invaze nádoru do dalších orgánů, nejčastěji do jaterního parenchymu. V procesu tvorby sekundárních ložisek hrají zásadní roli buňky unikající z nádorové masy. Některé z nich je možné zachytit v periferní krvi jako takzvané cirkulující nádorové buňky (CTC) a využít je pro analýzu průběhu a rozvoje onemocnění.

**Metody:** Do studie bylo zařazeno 40 pacientů s kolorektálním karcinomem, z nichž 23 podstoupilo resekci primárního nádoru a 17 resekci jaterních metastáz. Odběry periferní krve do speciálních DNA-BCT® zkumavek proběhly před operací, po operaci, týden od data operace a před zahájením onkologické léčby. K detekci cirkulujících nádorových buněk byla použita High Definition Single Cell Analysis metoda. Ve stručnosti – kompletní frakce jaderných buněk krve imobilizovaných na speciálních podložních sklech byla označena protilátkami proti CD45, pan-cytokeratinu a CDX2 v kombinaci s jaderným barvivem DAPI. Skla byla následně naskenována a detekované CD45 negativní buňky kategorizovány do 5 skupin CTC dle jejich fenotypu (HD-CTC, Low-CK, Small-CK, cfDNA-CTC a CTM). Vybrané buňky byly mikromanipulací odebrány ze skla pro účely genomické analýzy.

**Výsledek:** Ze studovaného souboru bylo 32 pacientů (80 %) pozitivních na HD-CTC cirkulující nádorové buňky alespoň v jednom odběru (> 1 HD-CTC na 1 milion detekovaných buněk). Množství cirkulujících nádorových buněk výrazně pokleslo po odstranění primárního nádoru, ale nezměnilo se ve většině případů odstranění metastatického ložiska ( $p = 0,0348$ ).

U 52,9 % předoperačních odběrů byly objeveny cirkulující buněčné shluky (CTM), které mají např. u nádoru prsu vyšší prognostickou hodnotu v porovnání se samostatnými cirkulujícími buňkami. CTM byly zachyceny převážně u pacientů s přítomným primárním ložiskem a jejich změna kopírovala výsledek u HD-CTC.

Zbýlé 3 skupiny cirkulujících nádorových buněk nevykázaly signifikantní změnu v četnosti v souvislosti s provedením chirurgického zákroku.

Genomický profil byl stanoven u >400 jednotlivých buněk a výsledky jsou aktuálně analyzovány.

**Závěry:** Na souboru 40 pacientů bylo ukázáno, že primární nádor tlustého střeva má dominantní podíl na uvolňování cirkulujících nádorových buněk do cévního řečiště a

jeho odstranění výrazně snižuje množství epiteliálních buněk v cirkulaci. Na druhou stranu množství CTC se zdá být nezávislé na přítomnosti jaterní metastázy. Přítomnost cirkulujících nádorových buněk u pacientů po radikální resekci tudíž poukazuje na existenci a důležitost mikrometastatických ložisek.

Zároveň jsme ukázali, že na rozdíl od karcinomu prsu nebo prostaty je u kolorektálního karcinomu populace CTC výrazně heterogenní bez zjevné klonality. Toto zjištění ukazuje na vysokou úroveň intratumorální heterogenity kolorektálního karcinomu.

**Podpora:** Studie je podpořena z Národního programu udržitelnosti (NPU I) číslo LO1503 poskytovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy a Programem rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy (Progres Q39).



Ing. Petr Hošek, Ph.D., Pavla Kolíková a Eva Kralovcová – laboratoř nádorové biologie; v pozadí Ing. Zdeněk Tůma z proteomické laboratoře.

# EXPRESSION PROFILE OF OXYSTEROL PATHWAY GENES AND CIRCULATING LEVELS OF OXYSTEROLS IN BREAST CARCINOMAS

Souček P.<sup>1,2</sup>, Kloudová A.<sup>2</sup>, Brynychová V.<sup>1,2</sup>, Václavíková R.<sup>1,2</sup>, Vrána D.<sup>3</sup>, Hlaváč V.<sup>1,2</sup>, Gatěk J.<sup>4</sup>, Mrhalová M.<sup>5</sup>, Kodet R.<sup>5</sup>, Ueng Y.-F.<sup>6</sup>, Wei S.<sup>7</sup>, Koževnikovová R.<sup>8</sup>, Guengerich F. P.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Biomedical Centre, Medical School Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic;

<sup>2</sup>Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic;

<sup>3</sup>Department of Oncology, Palacky University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic; <sup>4</sup>Department of Surgery, Hospital Atlas, Zlin, Czech Republic; <sup>5</sup>Department of Pathology & Molecular Medicine, Second Faculty of Medicine, Charles University & Motol University Hospital, Prague, Czech Republic; <sup>6</sup>National Research Institute of Chinese Medicine, Ministry of Health and Welfare, Taipei, Taiwan; <sup>7</sup>Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee, United States; <sup>8</sup>Department of Oncosurgery, MEDICON, Prague, Czech Republic

The prognosis of estrogen receptor expressing (ER+) breast carcinoma patients depends on several factors, including menopausal status, lymph node metastasis, overexpression of human epidermal growth factor receptor, and the proliferation marker Ki67 in tumor cells. Previous studies have suggested that some oxygenated forms of cholesterol (oxysterols), bind to antiestrogen binding sites or deregulate cholesterol homeostasis (reviewed in Kloudová et al. Trends Endocrinol Metab 2017). Thus, the present study investigated whether gene expression levels of key modulators of the oxysterol signaling pathway modify the prognosis of ER+ breast carcinoma patients via interaction with endocrine therapy. Furthermore, we explored the question of feasibility of detection of selected oxysterols (7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, 25-hydroxycholesterol, and 27-hydroxycholesterol) in plasma of breast cancer patients. We also asked whether tumor removal causes detectable perturbations in levels of oxysterols that could then be used, e.g., for estimation of the disease risk or monitoring of its recurrence.

The expression levels of 74 oxysterol pathway genes were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction in a test set composed of ER+ tumors, E-negative tumors (ER-), and non-tumor tissues. The expression levels of 24 genes were found to be specifically dysregulated in ER+ tumors compared to ER- tumors. These 24 genes were assessed in additional ER+ tumors from breast carcinoma patients (N=164) to evaluate their potential clinical significance. The expression levels of ABCA9, ABCA10, CH25H, and ESR2 genes were found to be strongly associated with disease stage; however, none of the gene expression levels were associated with disease-free survival in patients treated with endocrine therapy.

Blood samples were collected from 24 patients one day before surgical tumor removal (first sampling) and then from the same patient in the period 12–24 months after surgery (second sampling). After direct extraction of oxysterols from plasma samples spiked with deuterated standards, the level of four oxysterols specified above has been evaluated by APCI LC/MS/MS analysis. The mean levels of oxysterols we analy-

zed were comparable to other published data in humans. The 27-hydroxycholesterol level was significantly lower and the 7-ketocholesterol level was higher in the second sampling compared to the first sampling ( $p=0.034$  and  $0.013$ , respectively). Separate analyses without outliers have shown that samples from the second sampling contained significantly higher 7-ketocholesterol levels compared to the corresponding first samplings ( $p=0.002$ ). Bearing in mind the potential influence of personal and lifestyle characteristics as age, menopausal status, body mass index, smoking status, or history of steroid homeostasis-related conditions on circulating levels of oxysterols, we addressed the role of these factors in stratified analyses. However, we have not observed consistent trend towards modulation of 7-ketocholesterol levels by lifestyle confounders.

Taken together, the expression of a number of oxysterol pathway genes is significantly modulated by ER expression and associated with the clinical stage of patients. However, the expression of oxysterol pathway genes was not found to modify the prognosis of ER+ breast carcinoma patients treated with endocrine therapy (Kloudová *et al.* Clin Endocrinol 2017). Moreover, our pilot study showed that the assessment of 7-ketocholesterol,  $7\alpha$ -hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, and 27-hydroxycholesterol in plasma samples of breast cancer patients is feasible using LC/MS/MS. Most importantly, our data suggest for the first time that 7-ketocholesterol levels rise after tumor removal. Further studies are necessary to assess the reproducibility of this observation and the mechanism behind this phenomenon before clinical utilization can be considered (Souček *et al.* Clin Chem Lab Med 2017).

Pharmacogenomics studies are supported by projects GAČR P303/12/G163, 13-25222J, AZV 15-25618A, 15-25884A, 16-28375A, 17-28231A, 17-28470, and by the National Sustainability Program I (NPU I) Nr. LO1503 provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic.



RNDr. Filip Tichánek z laboratoře neurodegenerativních poruch a Mgr. Štěpán Kápl z laboratoře experimentální neurofyziologie.

# EXPERIMENTÁLNÍ REGENERACE JATER

Liška V.<sup>1</sup>, Třeška V.<sup>2</sup>, Pálek R.<sup>1</sup>, Rosendorf J.<sup>1</sup>, Tégl V.<sup>5</sup>, Mlejnková V.<sup>4</sup>, Beneš J.<sup>5</sup>, Haidingerová L.<sup>4</sup>, Mírka H.<sup>3</sup>, Bajcurová K.<sup>3</sup>, Tonar Z.<sup>6</sup>, Králíčková A.<sup>6</sup>, Mik P.<sup>7</sup>, Eberlová L.<sup>7</sup>, Jiřík M.<sup>4</sup>, Hošek P.<sup>4</sup>, Holubec L.<sup>4</sup>, Fiala O.<sup>8</sup>, Brůha J.<sup>1</sup>, Vyčítal O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chirurgická klinika a Biomedicínské centrum LF UK v Plzni; <sup>2</sup>Chirurgická klinika LF UK v Plzni; <sup>3</sup>Klinika zobrazovacích metod a Biomedicínské centrum LF UK v Plzni; <sup>4</sup>Biomedicínské centrum LF UK v Plzni; <sup>5</sup>Klinika anestezie, resuscitace a intenzivní medicíny a Biomedicínské centrum LF UK v Plzni; <sup>6</sup>Ústav histologie a embryologie a Biomedicínské centrum LF UK v Plzni; <sup>7</sup>Ústav anatomie a Biomedicínské centrum LF UK v Plzni; <sup>8</sup>Klinika onkologie a radioterapie a Biomedicínské centrum LF UK v Plzni

**Úvod:** Embolizace nebo ligace větve portální žíly (PVE/PVL) je nedílnou součástí etapových výkonů v případě nízkého objemu zbytkového jaterního parenchymu (FLRV). Provedení PVE iniciuje kompenzatorní hypertrofii neokludovaného jaterního parenchymu. Tato hypertrofie je stimulována zvýšeným průtokem portální krve neokludovanou větví portální žíly. V případě provedení PVE je dosaženo adekvátního nárůstu FLRV a tím resekovatelnosti pouze u 63–96 % pacientů. Cílem této práce je souhrnně demonstrovat možnosti ovlivnění regenerace jaterního parenchymu po provedení PVE/PVL v experimentu pomocí cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-6) protilátkou proti TGF- $\beta$ 1 (MAB TGF- $\beta$ 1) a mezenchymálními kmenovými buňkami (MSC).

**Metodika:** Experimentální model PVE/PVL byl zvolen tak, aby byl maximálně kompatibilní pro případné využití v humánní medicíně. Do jednotlivých studií bylo zařazeno 9 (kontrolní skupina), 9 (TNF- $\alpha$  skupina), 8 (IL-6 skupina), 6 (MSC skupina) a 7 prasat domácích (MAB TGF- $\beta$ 1 skupina). V celkové anestézii byla provedena laparotomie s PVL pravých jaterních laloků. V jednotlivých experimentálních skupinách bylo aplikováno následující množství látek do neokludovaného kmene portální žíly ihned po provedení PVL: fyziologický roztok (kontrolní skupina) rekombinantní prasečí TNF- $\alpha$  (5  $\mu$ g/kg) a rekombinantní prasečí IL-6 (0,5  $\mu$ g/kg), MSC (8,75, 14,0, 17,0, 17,5, 43,0 a 61,0  $\times$  10<sup>6</sup> MSC). V případě podání MAB TGF- $\beta$ 1 byla vlastní aplikace účinné látky provedena 24 hodin po provedení PVL (40  $\mu$ g/kg). V pooperačním období byly opakovaně analyzovány biochemické parametry a prováděno ultrasonografické sledování FLRV. Experimenty byly ukončeny 14. pooperačním dnem usmrcením zvířat v celkové anestézii. Histologicky byly vyšetřeny vzorky jaterní tkáně z atrofické i hypertrofické části.

**Výsledky:** Opakovaná ultrasonografická měření efektu podání MSC, rpTNF- $\alpha$ , rplL-6 a MAB TGF- $\beta$ 1 porovnaná s podáním fyziologického roztoku prokázala význam jejich podání k akceleraci růstu FLRV. V případě podání MSC bylo maximum růstu se statistickou signifikancí pozorováno mezi 3. a 7. pooperačním dnem, v případě TNF- $\alpha$  7., MAB TGF- $\beta$ 1 mezi 3. a 7. a IL-6 7. pooperačním dnem. Sérové hladiny AST a ALT narostly po provedení PVL a aplikaci MSC, zatímco ostatní biochemické parametry zůstaly bez statisticky signifikantního rozdílu. V případě porovnání vývoje sérových biochemických parametrů po aplikaci TNF- $\alpha$ , MAB TGF- $\beta$ 1 nebo IL-6 porovnané s kontrolní skupinou nebyly prokázány žádné statisticky signifikantní rozdíly.

V případě MSC skupiny jsme identifikovali jednotlivé MSC. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v počtu dvoujaderných hepatocytů, a to při jejich zvýšené koncentraci v IL-6 skupině.

**Závěr:** Aplikace IL-6, TNF- $\alpha$ , MAB TGF- $\beta$ 1 a MSC se jeví jako vhodné stimulační agens k dosažení rychlejšího růstu FLRV. Přesto zůstává mnoho kontroverzních otázek ve vztahu k mechanismu jejich působení.

Tato studie byla podpořena programem rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy (Progres Q39) a Národním program udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaným Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy. Dále z prostředků Univerzity Karlovy v rámci specifického výzkumu SVV 2017 č. 260392, Investičního programu 2016–18 a GAUK č. 1206417.



Doc. MUDr. Václav Liška, Ph.D., vedoucí laboratoře nádorové léčby a regenerace tkáně, doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D., vedoucí laboratoře kvantitativní histologie a další účastníci konference.

# 2D A 3D IN VITRO MODEL DERMÁLNÍCH FIBROBLASTŮ V PODMÍNKÁCH CHRONICKÉ RÁNY

Stunová A.<sup>1</sup>, Hošek P.<sup>1</sup>, Klein P.<sup>1</sup>, Moravec J.<sup>1</sup>, Hrabák J.<sup>1</sup>, Suchý T.<sup>2,3</sup>, Šupová M.<sup>2</sup>,  
Žaloudková M.<sup>2</sup>, Sedláček R.<sup>3</sup>, Horný L.<sup>3</sup>, Vištejnová L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova; <sup>2</sup>Ústav struktury a mechaniky hornin, Akademie věd České republiky; <sup>3</sup>Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Fakulta strojní, ČVUT v Praze

**Úvod:** Dermální fibroblasty (DF) byly po dlouhou dobu považovány za pasivní buňky kožní dermis, kdy jejich funkce spočívala v produkci a remodelaci extracelulární hmoty, především kolagenu, v proliferační fázi hojení rány<sup>1</sup>. Recentní studie však ukazují DF jako aktivní producenty řady molekul (cytokiny, růstové faktory, hormony) umožňující účast v regulačních procesech zánětové fáze hojení, v re-epitelizaci porušené kožní tkáně či v angiogenezi. Tyto regulace jsou založeny na interakcích DF s ostatními buňkami – imunitními buňkami, keratinocyty a endotelovými buňkami<sup>2</sup>. Přesné regulační dráhy, zejména v podmínkách chronické nehojící se rány, však nejsou zcela popsány. Rovněž chybí relevantní 2D a 3D *in vitro* model DF v prostředí chronické rány, který by umožňoval jak definici těchto regulačních drah, tak relevantní *in vitro* testování nových léčebných postupů.

**Cíl:** Cílem práce je vyvinout a funkčně ověřit 2D a 3D *in vitro* modely DF v prostředí chronické rány. Tyto modely poskytnou nástroj pro výzkum přesných mechanismů ovlivňujících chování DF za stresových podmínek chronické rány a budou sloužit jako *in vitro* modely pro identifikaci nových terapeutických látek použitelných při léčbě chronických ran.

**Metody:** Primární lidské DF jsou kultivovány po dobu 6–28 dní (dle typu analýzy) na polystyrenových površích (2D) nebo v hydrogelech na bázi kolagenu typu I izolovaného z potkaních šlach (3D). Podmínky simulující prostředí chronické rány – bakteriální infekce, volné kyslíkové radikály (ROS) a nízký obsah živin – jsou zajištěny přidáním bakteriálního lipopolysacharidu do kultivačního média či přidáním inaktivovaných bakteriálních lyzátů typických patogenů ran (*S. aureus*; *P. aeruginosa*), přidáním induktoru ROS (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH) a snížením množství séra. Vlivy těchto stresorů na morfologii, metabolickou aktivitu, proliferaci, migraci, kontraktilitu a produkci dalších ROS a prozánětlivých interleukinů IL6 a IL8 DF jsou sledovány pomocí mikroskopie v procházejícím světle, fluorescenční a konfokální mikroskopie, pomocí měření buněčné viability (mitochondriální aktivita), proliferace (počítání jader), scratch testem, selektivní detekcí ROS a metodou ELISA. Schopnost remodelace kolagenového hydrogelu DF je sledována mechanickými tlakovými zkouškami, Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopii a elektronovou mikroskopii.

**Výsledky:** Viabilita, proliferace a migrace DF v podmínkách chronické rány simulované přidáním bakteriálního lipopolysacharidu a nízkým množstvím živin byly jak ve 2D tak ve 3D modelu sníženy oproti zdravým kultivačním podmínkám. Samostatně aplikované lyzáty patogenů ran vykazovaly stejný snižující efekt na viabilitu a proliferaci DF jako lipopolysacharid, avšak směs lyzátů tyto účinky neměla. Schopnost DF kon-

trahovat kolagenový hydrogel byla pozorována už po 3 dnech kultivace a v podmínkách chronické rány byla tato kontraktilita snížena. DF v přítomnosti ROS produkovaly další ROS a vykazovaly sníženou metabolickou aktivitu. Rovněž byla pozorována zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů IL6 a IL8 DF v chronických podmínkách oproti zdravým podmínkám.

**Závěr:** Na základě dosavadních výsledků se podařilo zavést metodu přípravy 3D *in vitro* modelu DF v kolagenovém hydrogelu. Byly ověřeny metody měření buněčné viability a proliferace ve 2D podmínkách. Metoda sledování proliferace ve 3D podmínkách založená na kvantitativní stereologii je v procesu evaluace. Stresové faktory chronické rány, bakteriální infekce, ROS a nedostatek živin, narušovaly funkce DF uplatňované v hojení rány, tj. proliferaci a migraci, a podporovaly jejich prozánětlivé chování formou zvýšené produkce IL6 a IL8. Zajímavé je pozorování vymizení negativního efektu u směsi patogenů rány *S. aureus* a *P. aeruginosa* na viabilitu a proliferaci DF v porovnání s negativním efektem samotných kmenů. Na vysvětlení tohoto pozorování se pracuje.

**Reference:** <sup>1</sup>Singer AJ, Clark RAF. Mechanisms of disease – Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*, 1999; 341(10): 738-746. <sup>2</sup>Martin, P. & R. Nunan (2015) Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*, 173, 370-378.

**Poděkování:** Tato práce je realizována na základě podpory grantů NPU LO1503 poskytnuté MŠMT, SVV 2017 260329 poskytnuté Univerzitou Karlovou, GAUK 128417 poskytnuté Univerzitou Karlovou a PROGRES Q39 poskytnuté Univerzitou Karlovou.



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



# ROZDÍLNÁ ADHEZE, MIGRACE A PROLIFERACE OSTEOBLASTŮ NA CHEMICKY STRUKTUROVANÝCH VRSTVÁCH NANOKRYSTALICKÉHO DIAMANTU HODNOCENÁ POMOCÍ MIKROSKOPIE ŽIVÝCH BUNĚK

Brož A.<sup>1,2</sup>, Ukraintsev E.<sup>3</sup>, Kromka A.<sup>3</sup>, Rezek B.<sup>3,4</sup>, Hubálek Kalbáčová M.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Ústav dědičných metabolických poruch, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, <sup>2</sup>Fyziologický ústav, Akademie Věd ČR, v. v. i., <sup>3</sup>Fyzikální ústav, Akademie Věd ČR, v. v. i., <sup>4</sup>Fakulta elektrotechnická, ČVUT, <sup>5</sup>Biomedicínské Centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Karlova Univerzita

Velkou výzvou v implantologii, tkáňovém inženýrství a také v přípravě biosenzorů je možnost ovlivnění buněčné odpovědi pomocí modulace povrchu biokompatibilních materiálů. Tenké vrstvy z nanokrystallického diamantu (NCD) se na tomto poli ukazují být slibnými díky jejich výjimečným fyzikálním a chemickým vlastnostem a díky různým způsobům jejich strukturní nebo chemické modifikace. Počáteční rozložení buněk, rychlost adheze, rychlost a vzdálenost buněčného pohybu stejně jako proliferace jsou ovlivněny terminací nanokrystallického povrchu. V této studii byly buňky monitorovány v reálném čase pomocí mikroskopie živých buněk s cílem prozkoumat výše zmíněné procesy, které se odehrávají na oxidovaném a vodíkováném NCD ve snaze objasnit dříve pozorovanou buněčnou preferenci k oxidovanému mikro-strukturovanému NCD povrchu. Buňky adherují pomaleji a pohybují se více na vodíkováném než na oxidovaném NCD povrchu. Buňky nasévané v přítomnosti fetálního telecího séra v médiu se před vlastní adhezí nejprve po povrchu volně pohybují. V nepřítomnosti fetálního telecího séra buňky na povrch adherují bezprostředně po nasetí, ale stále vykazují rozdíly v pohybu a proliferaci na oblastech vodíkem nebo kyslíkem terminovaných. Vliv těchto efektů na vytvoření buněčných vzorů na mikrostrukturovaném NCD se ve studii podrobně diskutuje.

# STUDIUM EPIGENETICKÝCH REGULACÍ JAKO NÁSTROJ PRO HODNOCENÍ ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ V REPRODUKCI

Nevoral J., García-Álvarez O., Štiavnická M., Římnáčová O., Králíčková M.

Laboratoř Reprodukční Medicíny Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni,  
Univerzita Karlova

Laboratoř reprodukční medicíny je zaměřena na epigenetické mechanismy regulace oogeneze a spermatogeneze, následované časným embryonálním vývojem. V Laboratoři je používána myš (*Mus musculus*) jako modelový organizmus, ve spolupráci s partnerskými pracovišti (University of Missouri, USA; Lille1 Université, Francie; Chonbuk National University, South Korea; VÚŽV Praha) dále model oocyty a embrya prasete a žáby *Xenopus laevis*. Tyto experimentální modely a jejich studium jsou využívány pro testování biologického efektu endokrinních disruptorů na reprodukci člověka. Mimoto, v laboratoři dochází také k analýzám lidského materiálu, jako jsou spermie a tělní tekutiny reprodukčního systému.

Laboratoř se v současné době zabývá studiem endokrinního disruptoru bisphenolu S (BPS), který postupně nahrazuje BPA, jehož škodlivost již byla prokázána. Jen málo je však známo o BPS, který se stává být všudypřítomný. Studium BPS je založeno na kombinaci tří modelů: i) *in vitro* ovlivnění prasečích oocytů, ii) *in vivo* expozice myší, iii) analýza lidské folikulární tekutiny a seminální plazmy. Na základě měření hladiny BPS v tělních tekutinách byly v experimentech použity velmi nízké koncentrace BPS. Ukázalo se, že *in vivo* expozice myší významně mění epigenetický kód oocytů a embryí myší. Negativní efekt BPS byl potvrzen v *in vitro* podmínkách na prasečím oocyty, kdy došlo k výraznému poškození dělicího vřeténka nezbytného pro úspěšné oplodnění a embryonální vývoj.

Shrnuto, lidská populace je exponována BPS, který představuje nebezpečí pro reprodukční zdraví.

Výsledků je dosaženo ve spolupráci s partnerskými pracovišti, stejně jako s laboratořemi Biomedicínského centra (Proteomická laboratoř, Laboratoř kvantitativní histologie). Výsledky jsou již zčásti publikovány (Scientific Reports, IF 4.259), odeslány do redakce (Environmental Health Perspectives, IF 9.780) nebo připravovány do podoby manuskriptu.

# LABORATOŘ KVANTITATIVNÍ HISTOLOGIE A JEJÍ NEJVÝZNAČNĚJŠÍ STUDIE V OBDOBÍ 2016–2017

Tonar Z., Kubíková T., Kolinko Y., Šlajerová M., Králíčková A.

Laboratoř kvantitativní histologie Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni, Univerzita Karlova

Při analýze mikroskopické stavby měkkých i tvrdých tkání se v popisných studiích i při hodnocení experimentů aktivně podílíme na návrhu a testování standardizovaných a opakovatelných postupů v optické mikroskopii tak, abychom byli schopni popsat zastoupení buněčné složky i mezibuněčné hmoty pomocí spojených kvantitativních proměnných. Zaměřujeme se přitom zejména na složení cévní stěny, mikroskopické prokrvení orgánů, hojení tkání při implantaci biomateriálů včetně oseointegrace. K našim výsledkům patří i optimalizace vzorkovacích schémat pro zmapování histologických nálezů v makroskopickém měřítku jednotlivých orgánů prasete, což je znalost sice nezbytná pro návrh i vyhodnocení experimentů prováděných u tohoto významného a člověku blízkého modelu, ale současně jen velmi málo probádaná. Kromě vlastního výzkumného programu spolupracujeme s ostatními laboratoři Biomedicínského centra a pracovišti LF UK v Plzni, přičemž využíváme zázemí a podpory Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni.

V období 2016–2017 byli pracovníci laboratoře korespondujícími autory tří studií zveřejněných v časopisech z prvního kvartilu (Q1) v kategoriích dle Journal Citation Reports (Journal of Anatomy, Frontiers in Neuroanatomy, Annals of Anatomy): (i) V první studii jsme zmapovali rozložení objemu hepatocytů a počtu jejich jader v játrech zdravého prasete v různých jaterních lalocích a v oblastech s různou polohou v portálním řečišti. Výsledky umožňují vypočítat množství histologických bločků vzorkujících játra prasete při experimentech s poškozením či regenerací jaterního parenchymu. (ii) Ve druhé studii jsme společně s Laboratoří neurodegenerativních poruch zjistili rozložení trojrozměrné hustoty mikrocév v kůře, jádrech a bílé hmotě mozečku a středního mozku myši. Přispěli jsme tak jednak k pochopení mikrovaskulárních důsledků neurodegenerace, jednak k objasnění rozdílů v úspěšnosti přežívání mozečkových neurotransplantátů u zvířat zdravých a zvířat s neurodegenerací. (iii) Třetí studie, provedená ve spolupráci s Oddělením transplantací a tkáňové banky FN Motol, objasnila podíl elastinu, kolagenu, hladkosvalového aktinu, glykosaminoglykanů a mikrokalcifikací na změnách mechanických vlastností (modul pružnosti a mez pevnosti) alograftů kořene aorty a plicní tepny a jejich chlopní. Studie umožňuje objektivizovat dosud neznámou dobu použitelnosti štěpů v závislosti na době kryoprezervace v tkáňové bance.

I nadále je naším cílem rozvíjet a testovat v oblasti kvantitativní histologie takové metodické postupy, které odpovídají současným mezinárodně uznávaným požadavkům na publikovatelnost histologických analýz a které umožňují šetrné a optimální využití biologického materiálu v experimentální medicíně.

## PŘEHLED ČINNOSTI ZVĚŘINCE

Klein P.

Laboratoř preklinických studií Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni,  
Univerzita Karlova

V Centrálním uživatelském zařízení bylo v roce 2017 aktivně řešeno celkem 29 projektů pokusů na zvířatech (myších, potkanech, králíciích a prasatech). Tým CUZ zajišťuje technickou podporu a odborné poradenství při realizaci všech experimentů; u 9 projektů se i přímo personálně podílí na jejich řešení. V roce 2017 byly týmem CUZ a spolupracovníky z LFP realizovány i 2 smluvní experimenty, jeden s českým partnerem (potkani) a druhý s partnerem z Austrálie (prasata). Tým CUZ se ve spolupráci s kolegy z LFP a FN věnuje i vlastnímu výzkumu, který je orientován na řešení praktických problémů práce se zvířaty. Výsledkem za rok 2017 je zavedení nového bezpečného způsobu anestézie potkanů pro náročné a déletrvajících chirurgické výkony či metody katetrizace prasat robustním katétrek umožňujícím dlouhodobý venózní přístup.



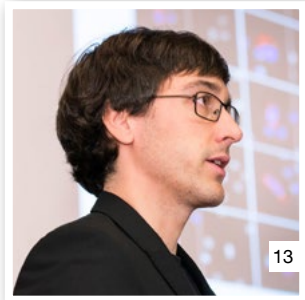
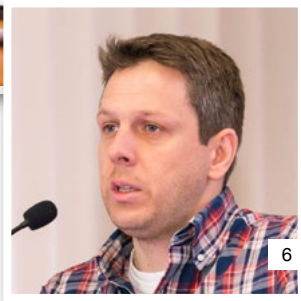
Ing. Pavel Klein, Ph.D., vedoucí laboratoře preklinických studií (zvěřince) a Ing. Jiří Moravec, Ph.D. z proteomické laboratoře.



Ing. František Barták, Ing. Dagmar Jarkovská z laboratoře experimentální kardiologie a MUDr. Miroslava Čedíková, Ph.D. z mitochondriální laboratoře.



Doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D., vedoucí laboratoře studia interakcí buněk s materiálem a Mgr. Pavla Sauerová z téže laboratoře.





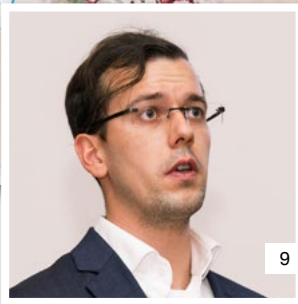
3



4



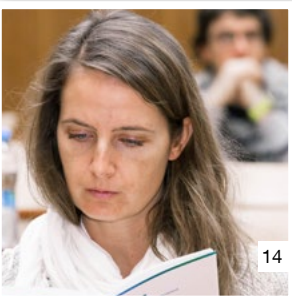
8



9



10



14



15



16

- 1 Ing. Veronika Rotová, Dr. Constantinos Papagiannitsis, Ph.D., vedoucí laboratoře antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii; v pozadí Mgr. Kateřina Elsnerová z laboratoře farmakogenomiky.
- 2 MDDr. Miroslava Chalupová, Dana Králová, DiS. a Mgr. Kateřina Chudějová – laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii.
- 3 Ze zasedání dozorčího výboru Biomedicínského centra 16. 11. 2016: doc. Ing. Stanislav Kmoch, CSc. (1. LF), Ing. Marie Klečková (tajemnice LFP) a prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc. (BIOCEV).
- 4 Ze zasedání dozorčího výboru Biomedicínského centra 16. 11. 2016: MUDr. Václav Šimánek, Ph.D. (ředitel FN Plzeň), doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D. (manažer BC), prof. Ing. Josef Rosenberg, DrSc. (ZČU) a prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D. (vedoucí VP1).
- 5 Prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D., vedoucí výzkumného programu 1 a experimentální laboratoře intenzivní medicíny; primář 1. interní kliniky LF UK v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň.
- 6 Dr. Constantinos Papagiannitsis, Ph.D., vedoucí laboratoře antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii.
- 7 Doc. MUDr. Jan Cendelín, Ph.D., vedoucí laboratoře neurodegenerativních poruch.
- 8 Doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D., vedoucí laboratoře kvantitativní histologie.
- 9 Ing. Jan Nevorál, Ph.D., vedoucí laboratoře reprodukční medicíny.
- 10 Mgr. Veronika Brynychová, laboratoř farmakogenomiky.
- 11 MUDr. Karel Ježek, Ph.D., vedoucí laboratoře experimentální neurofyziologie.
- 12 Doc. MUDr. Jan Beneš, Ph.D., experimentální laboratoř intenzivní medicíny.
- 13 Mgr. Pavel Pitule, Ph.D., vedoucí laboratoře nádorové biologie.
- 14 RNDr. Monika Dolejská, Ph.D., laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii.
- 15 Mgr. Lucie Vrabcová, laboratoř studia interakcí buněk s materiálem.
- 16 Doc. MUDr. Magdalena Chottová Dvořáková, Ph.D., vedoucí laboratoře laserové mikrodisekce.



