



UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Husova 654/3, 301 00 Plzeň
IČ: 00216208

Smlouva o poskytování služeb č. 2019-01-22/1

(dále jen „smlouva“)

uzavřená ve smyslu § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanský zákoník, v platném znění,
(dále jen „ObčZ“)

I.

Smluvní strany

1.1 Objednatel:

Název subjektu: **Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni**
Sídlo: Husova 654/3, 301 00 Plzeň
Zastoupena: prof. MUDr. Jindřichem Fínkem, Ph.D., děkanem fakulty
IČ: 00216208
Datová schránka: piyj9b4
(dále jen „objednatel“) na straně jedné

a

1.2 Poskytovatel:

Název subjektu: **Polypress s.r.o.**
Sídlo: Truhlářská 486/15, 360 17 Karlovy Vary
Zastoupený: Richardem Šmídem, jednatelem
IČ: 26351731
Datová schránka: 7f8t2gw
(dále jen „poskytovatel“) na straně druhé

(společně dále jen „smluvní strany“)

uzavírají na základě výsledku veřejné zakázky s názvem „Tiskařské služby 01-2019“ v rámci dynamického nákupního systému s názvem „DNS pro tiskařské služby 2017 až 2018“ zadávané jako veřejná zakázka v režimu zákona č. 134/2016 Sb., o zadávání veřejných zakázek, v platném znění (dále jen „ZZVZ“), smlouvu následujícího znění:



II.

Předmět a účel smlouvy

- 2.1 Předmětem této smlouvy je tisk sborníků na Čtvrtou výroční konferenci Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni a dodání poštovních obálek s potiskem (logo a adresa objednatele v levém horním rohu).
- 2.2 Tato smlouva je sjednána na základě úplného konsensu v souladu s příslušnými ustanoveními obecně závazných právních předpisů, a to zejména ObčZ. Právní vztahy smluvních stran touto smlouvou výslovně neupravené se řídí ustanoveními ObčZ upravujícími příslušný, nebo obsahově nejbližší typ závazku z právního jednání.
- 2.3 Předmětem této smlouvy je dvoustranný právní vztah mezi poskytovatelem a objednatelem, jehož obsahem jsou práva a povinnosti smluvních stran související s poskytnutím služeb při tisku sborníků na Čtvrtou výroční konferenci Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni a dodání poštovních obálek s potiskem.
- 2.4 Účelem této smlouvy je právní úprava předmětu této smlouvy v souladu s vůlí smluvních stran a příslušnými obecně závaznými právními předpisy tak, aby každá smluvní strana nadále jednala ve všech záležitostech souvisejících s předmětem smlouvy při nejvyšší míře právní jistoty.

III.

Předmět plnění

- 3.1 Poskytovatel se za podmínek dále v této smlouvě uvedených zavazuje pro objednatele vytisknout sborník na Čtvrtou výroční konferenci Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni, a to v počtu 100 ks, a dodat poštovní obálky s potiskem (2 druhy), a to v celkovém počtu 400 ks.
- 3.2 Specifikace jednoho výtisku sborníku:

Formát:	A5 na výšku
Vazba:	na dvě sponky (V)
Rozsah:	40 stran (vnitřek) + 4 strany (obálka)
Barevnost obálka:	barevná CMYK (4+0)
Barevnost vnitřek:	barevná CMYK (4+4)
Papír:	vnitřek 80 g/m ² ofset, obálka 160 až 180 g/m ²
- 3.3 Specifikace jedné obálky (obálka A):

Formát:	Obálka DL (220 x 110 mm), samolepící, bílá, bez okénka
Potisk:	jednobarevný (černý), umístěný v levém horním rohu (pozice odesílatele)
Počet:	200 ks
- 3.4 Specifikace jedné obálky (obálka B) - viz bod 3.3 této smlouvy.



- 3.5 Obsahová náplň je jednoznačně dána podklady ve formátu PDF, které jsou nedílnou přílohou této smlouvy jako Příloha č. 1 (Tisková data - sborník) a Příloha č. 2 (Tisková data - obálky).
výše uvedené dále jen „**předmět plnění**“.

IV.

Doba a místo plnění

- 4.1 Poskytovatel se zavazuje, že zboží dodá objednateli do 10 kalendářních dnů ode dne účinnosti této smlouvy, nebo do 5. 2. 2019, a to podle toho, který termín nastane dříve. V případě prodlení s termínem dodání předmětu plnění dle tohoto článku smlouvy se poskytovatel zavazuje uhradit objednateli smluvní pokutu ve výši 0,5 % z ceny za poskytnuté plnění bez DPH. Celková výše smluvní pokuty není omezena.
- 4.2 O předání a převzetí předmětu plnění bude mezi poskytovatelem a objednatelem sepsán předávací protokol (případně bude předání a převzetí stvrzeno jiným prokazatelným způsobem) podepsaný oprávněnými zástupci obou smluvních stran. Předmět plnění se považuje za převzatý a předaný okamžikem podpisu předávacího protokolu ve smyslu věty předchozí.
- 4.3 Místem plnění je Lékařská fakulta v Plzni na adrese Husova 654/3, Plzeň.
- 4.4 Objednatel není povinen převzít předmět plnění s právními nebo faktickými vadami, a dále pokud nebude dodán v dohodnutém množství.

V.

Cena za poskytnutí předmětu plnění a platební podmínky

- 5.1 Cena za poskytnutí předmětu plnění byla smluvními stranami stanovena na **4 200,00 Kč bez DPH**, sazba DPH 21 %, částka DPH 882,00 Kč, cena včetně DPH 5 082,00 Kč.
- 5.2 Celková cena za poskytnutí předmětu plnění je splatná na základě faktury vystavené po splnění smluvních podmínek formou bankovního převodu na účet poskytovatele uvedený v bodě 1.2. Faktura musí splňovat náležitosti daňového dokladu dle platného zákona o DPH, v platném znění. Minimální splatnost faktury je 14 dnů ode dne jejího prokazatelného předání objednateli.
- 5.3 Důvodem pro případnou změnu sjednané ceny je pouze změna sazby DPH, přičemž cena bez DPH je neměnná.
- 5.4 Platba se považuje za uskutečňovanou dnem, kdy je připsány ve prospěch bankovního účtu poskytovatele.
- 5.5 Objednatel se zavazuje zaplatit smluvní pokutu za prodlení s placením faktur po termínu splatnosti ve výši 0,5 % z dlužné částky za každý den prodlení. Zaplacením smluvní pokuty není dotčeno právo poskytovatele na náhradu škody.



VI.

Práva a povinnosti smluvních stran

- 6.1 Poskytovatel prohlašuje, že je schopen jednat se znalostí a pečlivostí, kterou řádné plnění této smlouvy vyžaduje. Poskytovatel odpovídá za použití náležitě kvalifikovaného personálu, přičemž tímto výslovně ujišťuje objednatele, že plnění předmětu smlouvy bude poskytovat prostřednictvím pracovníků, kteří mají odborné zkušenosti s realizací předmětu plnění, jež je předmětem této smlouvy.
- 6.2 Poskytovatel se zavazuje poskytnout objednateli v odpovídajícím čase konkrétní a jasné pokyny pro provádění potřebné součinnosti, bude-li toto řádné plnění smlouvy vyžadovat.
- 6.3 Poskytovatel bere na vědomí, že je osobou povinnou spolupůsobit při výkonu finanční kontroly dle § 2 písm. e) zákona č. 320/2001 Sb., o finanční kontrole ve veřejné správě, v platném znění. Dále se poskytovatel zavazuje poskytnout kontrolním orgánům součinnost při podání informací a předání dokladů týkajících se jeho činnosti v rámci této smlouvy.
- 6.4 Poruší-li smluvní strana povinnost z této smlouvy či může-li a má-li o takovém porušení vědět, oznámí to bez zbytečného odkladu druhé smluvní straně, které z toho může vzniknout újma, a upozorní ji na možné následky; v takovém případě nemá poškozená smluvní strana právo na náhradu té újmy, které mohla po oznámení zabránit.

VII.

Odpovědné osoby

- 7.1 Za objednatele je v souvislosti s plněním této smlouvy oprávněn jednat:
Ing. Barbora Černíková, e-mail Barbora.Cernikova@lfp.cuni.cz, telefon 377 593 446
- 7.2 Za poskytovatele je v souvislosti s plněním této smlouvy oprávněn jednat:
Petra Szebenyiová, e-mail: petra.szebenyiova@polypress.cz, telefon 350 995 099

VIII.

Odstoupení a vady

- 8.1 V rámci závazků plynoucích z této smlouvy odpovídá poskytovatel objednateli za formální a věcnou správnost poskytnutého předmětu plnění.
- 8.2 Odstoupit od této smlouvy může objednatel, kromě zákonných důvodů, v případě, že:
 - a) poskytovatel nedodrží sjednané termíny poskytnutí služeb;
 - b) poskytovatel nekoná i přes písemnou výzvu ze strany objednatele dle ustanovení 6.1 této smlouvy; v písemné výzvě ve věci odstoupení od smlouvy ze strany objednatele musí objednatel výslovně uvést, v čem spatřuje nedostatky, jakým způsobem mají být odstraněny, musí poskytovateli poskytnout přiměřenou lhůtu k jejich odstranění a musí poskytovatele výslovně upozornit na možnost odstoupení.



- 8.3 Odstoupením od smlouvy zanikají všechna práva a povinnosti smluvních stran. Odstoupení od smlouvy se však nedotýká nároku na náhrady škody vzniklé porušením smlouvy ani nároku na smluvní pokuty dle této smlouvy.

IX.

Ostatní ujednání

- 9.1 Tato smlouva nabývá platnosti a účinnosti dnem podpisu oběma smluvními stranami. V případě, že cena za poskytnutí předmětu plnění je vyšší než 50 000,00 Kč bez DPH, nastává účinnost této smlouvy až jejím uveřejněním v registru smluv podle zákona č. 340/2015 Sb., v platném znění, přičemž poskytovatel s tímto uveřejněním tímto výslovně souhlasí.
- Zaslání smlouvy do registru smluv zajistí objednatel neprodleně po podpisu smlouvy. Objednatel se současně zavazuje informovat druhou smluvní stranu o provedení registrace tak, že zašle druhé smluvní straně kopii potvrzení správce registru smluv o uveřejnění smlouvy bez zbytečného odkladu poté, kdy sama potvrzení obdrží, popřípadě již v průvodním formuláři vyplní příslušnou kolonku s ID datové schránky druhé smluvní strany; v takovém případě potvrzení od správce registru smluv o provedení registrace smlouvy obdrží obě smluvní strany zároveň.
- 9.2 Změnit nebo doplnit tuto smlouvu mohou smluvní strany pouze formou písemných dodatků, které budou vzestupně číslovány, výslovně prohlášeny za dodatek této smlouvy a podepsány oprávněnými zástupci smluvních stran; smluvní strany tímto ve smyslu § 564 ObčZ výslovně vyloučí možnost změny smlouvy v jiné formě.
- 9.3 Pokud se jakékoliv ustanovení této smlouvy později ukáže nebo bude určeno jako neplatné, neúčinné, zdánlivé nebo nevynutitelné, pak taková neplatnost, neúčinnost, zdánlivost nebo nevynutitelnost nezpůsobuje neplatnost, neúčinnost, zdánlivost nebo nevynutitelnost smlouvy jako celku. V takovém případě se smluvní strany zavazují bez zbytečného prodlení dodatečně takové vadné ustanovení vyjasnit ve smyslu ustanovení § 553 odst. 2 ObčZ nebo jej nahradit po vzájemné dohodě novým ustanovením, jež nejbližší, v rozsahu povoleném ObčZ či jinými právními předpisy, odpovídá úmyslu smluvních stran v době uzavření této smlouvy.
- 9.4 Tato smlouva je vyhotovena ve třech stejnopisech, z nichž objednatel obdrží 2 vyhotovení a poskytovatel obdrží jedno vyhotovení.

X.

Závěrečná ustanovení a podpisy smluvních stran

- 10.1 Tato smlouva nahrazuje všechny předchozí dohody, ujednání, sliby anebo prohlášení, které by s ní byly v rozporu.
- 10.2 Smluvní strany prohlašují, že tato smlouva je výsledkem úplného, souhlasného projevu vážné vůle smluvních stran o celém jejím obsahu, že ji uzavřely bez принucení a že jim nejsou známy žádné okolnosti, které by měly vliv na její platnost, respektive účinnost. Dále potvrzují, že si tuto smlouvu před jejím podpisem řádně přečetly, jejímu obsahu porozuměly, a na důkaz shody o její formě i obsahu připojují své podpisy.



UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Husova 654/3, 301 00 Plzeň
IČ: 00216208

Přílohy:

1. Tisková data - sborník
2. Tisková data - obálky

Objednatel:

Poskytovatel:

.....
prof. MUDr. Jindřich Fínek, Ph.D.

děkan

prof. MUDr.
Jindřich
Fínek Ph.D.

Digitálně podepsal prof. MUDr.
Jindřich Fínek Ph.D.
DN: cn=prof. MUDr. Jindřich Fínek
Ph.D., givenName=Jindřich, sn=Fínek,
c=CZ, o=Univerzita Karlova,
ou=Lékařská fakulta v Plzni,
serialNumber=ICA - 10449666
Datum: 2019.01.22 14:09:04 +01'00'

.....
Richard Šmíd

jednatel

Richard Šmíd Digitálně podepsal Richard Šmíd
Datum: 2019.01.22 13:09:55 +01'00'



ČTVRTÁ
VÝROČNÍ KONFERENCE
BIOMEDICÍNSKÉHO CENTRA

7. ÚNORA 2019



Čtvrtá výroční konference Biomedicínského centra



7. února 2019

U příležitosti Čtvrté výroční konference Biomedicínského centra 7. února 2019 pro vlastní potřebu vydává Biomedicínské centrum Lékařské fakulty UK v Plzni. Projekt Biomedicínské centrum Lékařské fakulty v Plzni je spolufinancován z Národního programu udržitelnosti I č. LO1503 MŠMT. Jedná se o udržitelnost projektu OP VaVpl, PO 2 „Regionální VaV centra“, reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0076. Autoři fotografií: Libor Kočí, Pert Hošek, Jiří Miklo. Biomedicínské centrum, alej Svobody 1655/76, 323 00 Plzeň; web: www.biomedic-plzen.cz; e-mail: info@biomedic-plzen.cz.

OBSAH

Seznam laboratoří Biomedicínského centra	5
Program čtvrté výroční konference	6
Úvod	9
Mezenchymální kmenové buňky u zvířecího modelu progresivní peritoneální sepse	11
Antibiotická rezistence a koncept jednoho zdraví	13
Na čem závisí produkce protilátek po vakcinaci proti chřipce u dialyzovaných a zdravých osob?	14
Vagová stimulace zmírňuje multiorgánovou dysfunkci u progresivní prasečí sepse.	15
Srovnávací studie účinnosti a biokompatibility tří typů polysulfonové hemodialyzační membrány	16
Měření krevního tlaku u pacientů v kardiogenním šoku – vliv noradrenalinu	18
Dysfunkce renálních mitochondrií v sepsi	19
Vývoj metodiky propojuje laserovou mikrodisekci a proteomiku	21
Hyperbarická oxygenoterapie v léčbě defektu u diabetického potkana.	22
Behaviorální odlišnosti myší PWD/Ph poddruhu <i>Mus musculus musculus</i> a myší klasického inbredního kmene laboratorních myší C57BL/6J	24
Zobrazování aktivity populace jednotlivých neuronů u volně pohyblivých zvířat	25
Využití prediktivních markerů a imunoterapie pro efektivní nádorovou léčbu	27
Expres, genetické profily a sekvenční metody využitelné pro sledování klinického významu molekulárních faktorů solidních nádorů	29
Fortifikace anastomóz na zažívacím traktu nanomateriály.	30
Hodnocení kvality perfuzně decelularizovaných jater prasete domácího	31
Simulace zánětlivého prostředí chronických ran <i>in vitro</i>	33
Charakterizace chování ultramalých nanočástic v biologickém prostředí.	34
Epigenetická regulace gameto – a embryogeneze: nástroj pro hodnocení endokrinních disruptorů	35
Laboratoř kvantitativní histologie a její nejvýznamnější výsledky v roce 2018	36
Přehled činnosti v Centrálním uživatelském zařízení.	38



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. [12](#)
2. **Laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii** – Dr. Constantinos Papagiannitsis, Ph.D. [13](#)
3. **Laboratoř transplantace ledvin a náhrady funkce ledvin** – doc. MUDr. Tomáš Reischig, Ph.D. [14](#)
4. **Laboratoř experimentální kardiologie** – doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D. [15](#)
5. **Proteomická laboratoř** – MUDr. Jan Mareš, Ph.D. [17](#)
6. **Laboratoř klinického výzkumu cévních a srdečních onemocnění** – prof. MUDr. Jan Filipovský, CSc., Ph.D. [18](#)
7. **Mitochondriální laboratoř** – doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D. [20](#)
8. **Laboratoř laserové mikrodisekce** – doc. MUDr. Magdalena Chottová Dvořáková, Ph.D. [21](#)
9. **Biofyzikální laboratoř** – MUDr. et MUDr. Jiří Beneš, Ph.D. [23](#)
10. **Laboratoř všeobecné biochemie a hematologie** – prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.

Výzkumný program 2

Vedoucí

prof. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D.

11. **Laboratoř neurodegenerativních poruch** – doc. MUDr. Jan Cendelín, Ph.D. [24](#)
12. **Laboratoř experimentální neurofyzologie** – MUDr. Karel Ježek, Ph.D. [26](#)
13. **Laboratoř nádorové biologie** – Mgr. Pavel Pitule, Ph.D. [28](#)
14. **Laboratoř farmakogenomiky** – doc. RNDr. Pavel Souček, CSc. [29](#)
15. **Laboratoř nádorové léčby a regenerace tkáně** – doc. MUDr. Václav Liška, Ph.D. [32](#)
16. **Laboratoř buněčné regenerativní medicíny** – Ing. Lucie Vištejnová, Ph.D. [33](#)
17. **Laboratoř studia interakcí buněk s materiálem** – doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D. [34](#)
18. **Laboratoř reprodukční medicíny** – Ing. Jan Nevoral, Ph.D. [35](#)
19. **Laboratoř kvantitativní histologie** – doc. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D. [37](#)
20. **Laboratoř preklinických studií** – Ing. Pavel Klein, Ph.D. [38](#)

PROGRAM ČTVRTÉ VÝROČNÍ KONFERENCE

8:30–9:25 Zahájení konference			s.
8:30	Jindřich Fínek	Úvodní řeč	
8:40	Milan Štengl	Úspěchy Biomedicínského centra v letech 2017–2018	
8:55	Jaroslav Hrabák	Biomedicínské centrum v číslech – výsledky a výzvy	
9:10	Milena Králíčková	Informace o některých highlightech současnosti na UK (evropská univerzitní aliance 4EU ...)	
9:25	přestávka		
9:35–11:10 I. odborný blok – Jan Cendelín, Václav Liška			
9:35	Jáchym Rosendorf	Fortifikace anastomóz na zažívacím traktu nanomateriály	30
9:45	Richard Pálek	Hodnocení kvality perfuzně decelularizovaných jater prasete domácího	31
9:55	Radka Václavíková	Expres, genetické profily a sekvenační metody využitelné pro sledování klinického významu molekulárních faktorů solidních nádorů	29
10:10	Monika Holubová	Využití prediktivních markerů a imunoterapie pro efektivní nádorovou léčbu	27
10:25	Jan Cendelín	Behaviorální odlišnosti myši PWD/Ph poddruhu Mus musculus musculus a myši klasického inbredního kmene laboratorních myši C57BL/6J	24
10:40	Karel Ježek	Zobrazování aktivity populace jednotlivých neuronů u volně pohyblivých zvířat	25
10:55	prostor k diskuzi		
11:10	přestávka		
11:30–12:55 II. odborný blok – Marie Hubálek Kalbáčová, Jan Nevorál			
11:30	Anna Zavadáková	Simulace zánětlivého prostředí chronických ran <i>in vitro</i>	33
11:45	Tereza Bělinová	Charakterizace chování ultramalých nanočástic v biologickém prostředí	34
12:00	Jan Nevorál	Epigenetická regulace gameto – a embryogeneze: nástroj pro hodnocení endokrinních disruptorů	35
12:15	Zbyněk Tonar	Laboratoř kvantitativní histologie a její nejvýznačnější výsledky v roce 2018	36
12:30	Pavel Klein	Přehled činnosti v Centrálním uživatelském zařízení	38
12:40	prostor k diskuzi		
12:55	přestávka		
13:45–15:00 III. odborný blok – Magdalena Chotová Dvořáková, Jan Mareš			
13:45	Jan Mareš	Srovnávací studie účinnosti a biokompatibility tří typů polysulfonové hemodialyzační membrány	16
14:00	Jitka Mlíková Seidlerová	Měření krevního tlaku u pacientů v kardiogenním šoku – vliv noradrenalinu	18
14:15	Shashank Pandey	Vývoj metodiky propojují laserovou mikrodisekci a proteomiku	21
14:30	Jiří Beneš	Hyperbarická oxygenoterapie v léčbě defektu u diabetického potkana	22
14:45	prostor k diskuzi		

15:00	přestávka		
15:15–16:30 IV. odborný blok – Monika Dolejská, Tomáš Reischig			
15:45	Jan Horák	Mezenchymální kmenové buňky u zvířecího modelu progresivní peritoneální sepse	11
16:00	Milan Štengl	Vagová stimulace zmírňuje multiorgánovou dysfunkci u progresivní prasečí sepse	15
16:00	Monika Dolejská	Antibiotická rezistence a koncept jednoho zdraví	13
16:15	Jaromír Eiselt	Na čem závisí produkce protilátek po vakcinaci proti chřipce u dialyzovaných a zdravých osob?	14
16:30	prostor k diskuzi		



ÚVOD

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

oproti předchozím konferencím dochází k jedné viditelné změně a to je její termín. Původně jsme sice plánovali uskutečnit již čtvrtou konferenci opět na podzim. Vzhledem k prostorovým a časovým možnostem jsme se ale rozhodli pro týden ve zkouškovém období. Věříme, že právě ve zkouškovém období si všichni najdeme dostatek času na účast na této naší společné akci. Na poslední konferenci jsme zvolili cestu prezentace nejlepšího výsledku za danou laboratoř. Nyní jsme to nechali na každém vedoucím, ale podle došlých abstraktů je zřejmé, že se každý chce pochlubit nějakým svým unikátním výsledkem. A je dobře, že u většiny týmů přibývají výsledky, které mohou obstát v mezinárodní konkurenci.

Jedinou nevýhodou přesunu konference do zimního zkouškového období je skutečnost, že v době přípravy tohoto sborníku nejsou ještě k dispozici kompletní data o publikačních výstupech a získaných grantových prostředcích za rok 2018. Ta máme tedy k dispozici za rok 2017. Určitě lze ale konstatovat, že v minulém roce opět došlo ke kvalitativnímu růstu, ať již v podobě publikací, či získaných prostředků na výzkum. V roce 2017 se podařilo získat z grantů AZV a GA ČR finanční prostředky ve výši lehce překračující 14 milionů Kč, z Grantové agentury Univerzity Karlovy 1,3 milionu Kč, na smluvním výzkumu se jednalo o 4,2 milionu Kč. Tyto prostředky, kombinované s prostředky z PROGRESu, nám umožnily bez problémů kofinancovat Národní program udržitelnosti. Je potěšující, že jsme zaznamenali i podporu z mezinárodních projektů H2020. Velmi pozitivní je i fakt, že jsme byli úspěšní při podávání projektů z výzvy OP VVV, a to projektů zaměřených na akreditaci doktorských studijních programů (Lékařská mikrobiologie, Lékařská biologie a Experimentální chirurgie) a projektu výzvy Excelentí výzkum – Fighting Infectious Diseases (FIND). Z těchto prostředků již byly zakoupeny některé unikátní přístroje, jako na příklad celogenomový sekvenátor dlouhých readů Sequel od firmy Pacific Biosciences, který máme jako první v České republice. Z projektu FIND se již podařilo získat nový MALDI-TOF hmotnostní spektrometr, který mimo jiné umožňuje přímou proteomickou charakterizaci tkání na tenkých histologických řezech.

Z hlediska publikační aktivity lze vyzdvihnout, že 40 % prací publikovaných v roce 2017 bylo uplatněno v časopisech prvního kvartilu. V některých případech se jednalo o velmi kvalitní časopisy, např. Annual Review of Pathology (IF 26,853), Lancet Infectious Diseases (IF 21,372), nebo Intensive Care Medicine (IF 10,125).

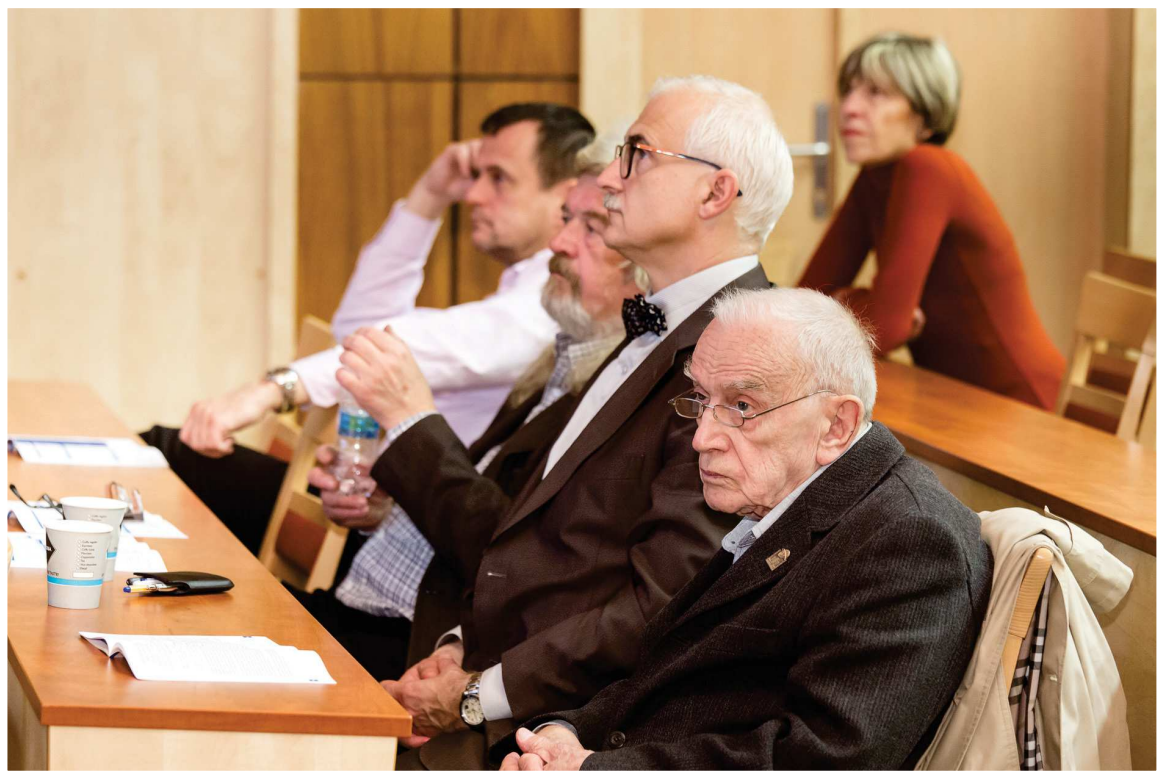
Jak se ukázalo v minulých letech, je výroční konference našeho centra tou nejlepší platformou, jak si vzájemně vyměňovat zkušenosti, dozvídat se o možnostech jednotlivých laboratoří a navazovat vzájemnou spolupráci. Z našich samostatných týmů se tak stává organický celek sice různých výzkumných témat, ale s jedním společným cílem – posunutím lidského poznání zase o něco dopředu. Přejeme všem účastníkům konference, aby si každý našel téma, které ho zaujme, ať již při oficiálním jednání nebo v kuloárech.

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

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



23. 11. 2017. Předání zlaté medaile prof. MUDr. Mojmiru Petráňovi za celoživotní přínos pro vědu v oblasti fyziky a biofyziky s celosvětovým dopadem, a to k výročí jeho nadcházejících 95. narozenin.



MEZENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY U ZVÍŘECÍHO MODELU PROGRESIVNÍ PERITONEÁLNÍ SEPSE

Horák J., Nalos L., Martínková V., Beneš J., Štengl M., Matějovič M.

Experimentální laboratoř intenzivní medicíny, Biomedicínské Centrum; I. interní klinika; Ústav fyziologie; Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny – LFP UK; III. chirurgická klinika, FN Motol

Úvod. Buněčná terapie využívající mezenchymální kmenové buňky (MSCs) reprezentuje potenciálně přínosnou léčebnou strategii sepse. Přes povzbudivé výsledky získané z malých zvířecích modelů sepse, dosud neexistují žádná data s vyšší klinickou relevancí a vyšším translačním potenciálem směrem do humánní medicíny.

Experimentální cíle. Zhodnotit bezpečnost a efektivitu intravenózní aplikace MSCs u klinicky relevantního velkého zvířecího modelu progresivní peritoneální sepse.

Metodika. Třicet dva prasat bylo anestezováno, uměle ventilováno a v průběhu operačního výkonu byly zavedeny cévní katetry a ultrazvukové sondy. Každé ze zvířat bylo náhodně přiřazeno do jedné ze čtyř skupin: 1) kontrolní skupina zvířat (CONTROL, n=8); 2) kontrolní skupina s aplikací MSCs (MSC-CONTROL, n=8); 3) skupina septických zvířat (SEPSIS, n=8); 4) intervenovaná skupina septických zvířat (MSC-SEPSIS, n=8). MSCs získané z kostní dřeně zdravého zvířete byly in vitro pomnoženy a následně intravenózně aplikovány u septických skupin s odstupem 6 hodin od indukce sterkorální peritonitidy. Před indukcí a poté v šestihodinových intervalech byly měřeny parametry systémové, regionální (renální) a mikrovaskulární (mikrocirkulace střevní sliznice) hemodynamiky; dále byla analyzován transport a utilizace kyslíku (DO_2/VO_2), evaDluovány funkce orgánů (plíce, ledviny, játra a srdce), dále byl sledována energetický metabolismus (acidobazická rovnováha, dynamika laktátu), systémová inflamace (cytokiny), úroveň oxidativního stresu (isoprostany) a byl odebrán vzorek orgánů ke tkáňové imunohistochemické analýze.

Výsledky. Aplikace MSCs zdravým zvířatům nevedla k ovlivnění hemodynamických parametrů, orgánových funkcí ani dynamiky cytokinů. Intervence u septické skupiny pak nevedla k ovlivnění sepsí indukované hyperdynamické cirkulace a nezabránila rozvoji vazopresor-dependentní hypotenze. Současně pak nevedla k ovlivnění septické mikrocirkulace, buněčné energetiky a rozvoje multiorgánové dysfunkce. Sepse byla spojena s progresivním nárůstem hladin prozánětlivých cytokinů a úrovně oxidativního stresu u septických zvířat, avšak bez signifikantního rozdílu mezi oběma skupinami ve sledovaných parametrech.

Závěry. Tato studie je první, která hodnotí bezpečnost a efektivitu aplikace MSCs u klinicky relevantního modelu progresivní sepse vyvolané difúzní peritonitidou. Aplikace MSCs zdravým zvířatům byla dobře tolerována a zvířata nejevila známky akutní hemodynamické či orgánové toxicity. Nicméně, v přímém rozporu s předchozími experimenty s malým zvířecím modelem sepse, MSCs selhaly v ovlivnění se sepsí spojených změn na vícero úrovních. S ohledem na získaná data bude nezbytné, aby rozhodnutí o přesunu výzkumu z experimentálního preklinického prostředí do oblasti

klinických studií, předcházela další evaluace bezpečnosti a efektivity aplikace MSCs modelu s adekvátním translačním potenciálem.

Poděkování. Tato studie byla podpořena z Výzkumného fondu Univerzity Karlovy (Progres Q39), a z AZV grantu (projekt 15-32801A) a z projektu No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 “Fighting Infectious Diseases”, oceněným MEYS CR, financovaným z EFRR.



ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE A KONCEPT JEDNOHO ZDRAVÍ

Doc. RNDr. Monika Dolejská, Ph.D., Dr. Costas C. Papagiannitsis, Ph.D.,
doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

Laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii,
Biomedicínské centrum; Ústav mikrobiologie – LFP UK

Rostoucí incidence bakterií rezistentních k lékům poslední volby představuje jeden z nejdůležitějších problémů současné medicíny, komplikuje úspěšnou léčbu infekcí, zvyšuje nemocnost pacientů a má značné ekonomické dopady. Antibiotická rezistence je vysoce komplexní globální problém, který se netýká pouze pacientů v nemocnicích a komunitě, ale postihuje také zemědělství, proto je třeba ho řešit s využitím konceptu jednoho zdraví zahrnující zdraví člověka, zvířata a prostředí. Práce v naší laboratoři jsou zaměřeny především na studium epidemiologie a molekulárního základu rizikových mechanismů rezistence k beta-laktamovým antibiotikům u klinicky významných bakterií (skupina *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.) z různých zdrojů. Recentní práce využívající komparativní genomiky, které budou v blíže přednášce představeny, dokládají šíření epidemických klonů bakterií a jejich genetické informace ve formě rezistentních plazmidů mezi člověkem a volně žijícími zvířaty především cestou odpadních vod z nemocnic a městských aglomerací.

Escherichia coli ST131 je globálně rozšířeným epidemickým klonem, který je virulentní a vysoce rezistentní k různým skupinám antibiotik. Byla provedena genomická analýza souboru 169 multirezistentních izolátů



E. coli ST131 pocházející z hospitalizovaných pacientů, případů komunitně získaných močových infekcí, z odpadních vod z měst a nemocnic a z volně žijících zvířat. Výsledky ukázaly na šíření dvou rizikových linií této bakterie, charakteristické svým profilem genů rezistence, virulentních faktorů a plazmidů, mezi člověkem a prostředím a dále upozornily na význam odpadních vod v přenosu rezistence do volné přírody. Byla stanovena kompletní nukleotidová sekvence plazmidů nesoucích geny pro rezistenci k rezervním antibiotikům – karbapenemům a kolistinu, které byly izolovány z bakterií původem z volně žijících ptáků, potravin a humánních vzorků. Sekvenční analýzy plazmidů ukázaly nejen na jejich vysokou plasticitu, mozaikový charakter multirezistentní oblasti a rychlou evoluci, ale také sdílení genů rezistence a mobilních genetických elementů mezi bakteriemi ze zvířat, člověka a prostředí.

NA ČEM ZÁVISÍ PRODUKCE PROTILÁTEK PO VAKCINACI PROTI CHŘIPCE U DIALYZOVANÝCH A ZDRAVÝCH OSOB?

Eiselt J.^{1,4}, Kielberger L.^{1,4}, Rajdl D.², Racek J.^{2,4}, Pazdiora P.³

¹I. interní klinika; ²Ústav klinické biochemie a hematologie; ³Ústav epidemiologie; ⁴Biomedicínské centrum – LFP UK

Úvod. Imunitní odpověď na chřipkovou vakcínu může být ovlivněna mnoha faktory, např. demografií, komorbiditami, parametry zánětu nebo metabolismu železa. Metodika: Sledovali jsme vakcínou indukovanou produkci hemaglutinačně-inhibičních protilátek (HI) u 133 hemodialyzovaných pacientů (HD) a 40 kontrol. K identifikaci proměnných asociovaných s imunitní odpovědí byla provedena uni – a multivariační regresní analýza, ve které byla sérokonverze HI titrů použita jako závislá proměnná, zatímco demografické faktory, komorbidity, předchozí vakcinace, výchozí titry HI protilátek, parametry inflamace a metabolismu železa sloužily jako nezávisle proměnné.

Výsledky. Sérokonverze byla méně častá u HD osob než u kontrol [43 % versus 73 % (kmen H1N1; $p < 0,05$); 43 % versus 53 % (H3N2; $P = NS$); 36 % versus 62 % (B; $p < 0,05$)]. Pro HD osoby i pro kontroly platilo, že prediktorem horší imunitní responze byly pre-vakcinační séroprotektivní titry HI, vakcinace v předchozí sezóně a vyšší věk. V obou populacích nebyl prokázán vztah mezi sérokonverzí a parametry zánětu či metabolismu železa. Toto platilo i pro subanalýzu osob bez prevakcinační séroprotektce.

Závěr. Produkce protilátek indukovaná chřipkovou vakcínou byla nižší u HD osob než u kontrol a v obou skupinách byla nezávislá na parametrech inflamace a metabolismu železa. Kromě hemodialyzační léčby byly s nižší sérokonverzí asociovány prevakcinační seroprotektce, předchozí vakcinace a vyšší věk.



VAGOVÁ STIMULACE ZMÍRŇUJE MULTIORGÁNOVOU DYSFUNKCI U PROGRESIVNÍ PRASEČÍ SEPSE

Kohoutová M., Horák J., Jarkovská D., Martínková V., Tégl V., Nalos L., Vištejnová L., Beneš J., Švíglerová J., Kuncová J., Matějovič M., Štengl M.

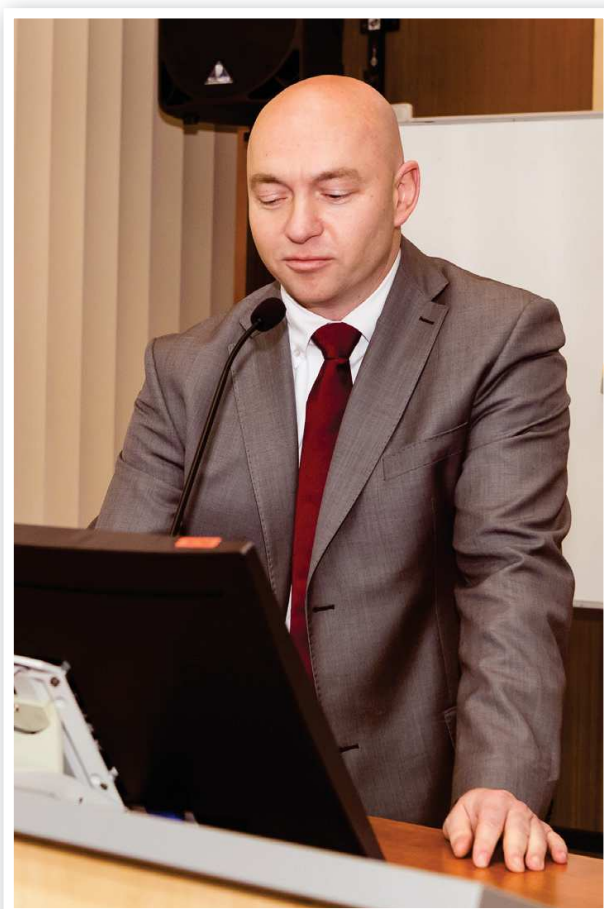
Laboratoř experimentální kardiologie, Biomedicínské centrum, LFP UK

Cholinergní protizánětlivá cesta umožňuje centrálnímu nervovému systému prostřednictvím bloudivého nervu ovlivňovat průběh zánětlivé imunitní odpovědi. Prozkoumali jsme potenciálně prospěšné účinky elektrické stimulace bloudivého nervu na průběh sepse v klinicky relevantním prasečím modelu.

25 prasat bylo rozděleno do 3 skupin: 1) skupina sepse (8 prasat), 2) skupina sepse a vagové stimulace (9 prasat), 3) kontrolní skupina bez sepse (8 prasat). Sepse byla vyvolána aplikací autologní stolice do dutiny břišní prasat v celkové anestézii, s mechanickou ventilací a rozsáhlou instrumentací a monitorací životních funkcí. Elektrická stimulace bloudivého nervu byla zahájena 6 hodin po vyvolání peritonitidy a udržována po celý další průběh experimentu. Během *in vivo* části experimentu byly měřeny hemodynamické a biochemické parametry, elektrokardiogram, hladiny cytokinů a počty krevních buněk. Následná *in vitro* analýza zahrnovala kontraktilitu a vápníkové hospodářství srdečních myocytů i analýzu mitochondriální funkce ultrasenzitivní oxygrafii.

Vagová stimulace částečně nebo úplně zabránila rozvoji hyperlaktémie, hyperdynamické cirkulace, buněčné myokardiální deprese, posunu sympatovagální rovnováhy i mitochondriální dysfunkce. Došlo k poklesu počtu aktivovaných monocytů. Vagová stimulace vedla k poklesu SOFA skóre a vazopresorické podpory.

V klinicky relevantním modelu progresivní sepse na velkém zvířeti byla vagová stimulace spojena s řadou prospěšných účinků, které vedly k významnému zmírnění multiorgánové dysfunkce a snížení vazopresorické podpory i objemové resuscitace. Výsledky svědčí pro významný terapeutický potenciál této intervence.



SROVNÁVACÍ STUDIE ÚČINNOSTI A BIODOPATIBILITY TŘÍ TYPŮ POLYSULFONOVÉ HEMODIALYZAČNÍ MEMBRÁNY

Mareš J., Richtrová P., Tůma Z., Moravec J.

I. interní klinika FN Plzeň, Biomedicínské centrum, LFP UK

Východisko. Navzdory významnému pokroku posledních dekád zůstává mortalita pacientů podstupujících hemodialyzační léčbu velmi vysoká. Velké úsilí je proto věnováno vývoji dalších inovací, mezi nimiž hraje ústřední roli technologie výroby a složení membrán slibujících účinnější a lépe snášenou náhradu funkce ledvin. Nakolik jsou tyto ambice skutečně naplňovány bylo testováno v klinické studii srovnávající účinnost a biokompatibilitu tří moderních, komerčně dostupných, vysokopropustných dialyzačních membrán na bázi polysulfonu.

Metodika. Studie byla navržena jako prospektivní, zkřížená a otevřená. Zařazeno bylo 12 pacientů podstupujících pravidelnou hemodialýzu, k testování byly použity dialyzátory Xevonta® Hi23 (B-Braun, 2,3 m²), CorDiax FX100® (Fresenius, 2,2 m²) a Polyflux® 210H (Gambro, 2,1 m²) v komerčně dostupných variantách. Všechny ostatní parametry dialyzační procedury, včetně dávky nízkomolekulárního heparinu zůstaly během studie beze změny. Účinnost dialyzátorů při odstraňování látek o nízké molekulové hmotnosti byla posuzována na základě indexů KtV a URR, zatímco účinnost při odstraňování molekul o střední hmotnosti na základě clearance vybraných markerů (β 2-mikroglobulin, 11 kDa; myoglobin, 17 kDa; retinol-binding protein, 21 kDa; a α 1-mikroglobulin, 26 kDa). Pro posouzení biokompatibility byly během procedury sledovány hladiny parametrů zánětu (CRP, C5a, IL6 a TNF), po ukončení dialýzy byl proveden výplach hemodialyzátoru 40% kyselinou octovou, která denaturuje a uvolňuje biofilm z vazby na povrch dialyzační membrány. Získaná směs proteinů byla analyzována proteomickou metodikou (LC-ESI MS/MS).

Výsledky. Jak URR (74,1 % \pm 1,10, 72,0 % \pm 1,18, 72,2 % \pm 0,98, p = 0,006), tak KtV (1,56 \pm 0,055, 1,46 \pm 0,053, 1,48 \pm 0,048, p < 0,001) byly významně vyšší u dialyzátorů Xevonta než u dialyzátorů CorDiax a Polyflux. Tyto rozdíly však odráží spíše plochu dialyzační membrány než vlastnosti materiálu. V případě anorganického fosfátu se URR mezi jednotlivými dialyzátory nelišil. Pokles hladiny β 2-mikroglobulinu během dialýzy byl významně vyšší u dialyzátorů Xevonta a CorDiax než u dialyzátoru Polyflux (19,1 \pm 1,32 mg/l, 20,4 \pm 1,82 mg/l, 16,8 \pm 1,50 mg/l; p < 0,001) a pokles hladiny myoglobinu byl vyšší u dialyzátoru CorDiax oproti dialyzátorům Xevonta a Polyflux (51,1 \pm 7,25 μ g/l, 70,9 \pm 12,02 μ g/l, 42,7 \pm 6,36 μ g/l; p = 0,0015). U látek s vyšší molekulovou hmotností nebyl již prokazatelný žádný rozdíl. Během dialyzační procedury byl patrný mírný, ale statisticky významný nárůst CRP (vzestup po čtyřech hodinách: 0,6 \pm 0,27 mg/l, 0,2 \pm 0,26 mg/l, 1,3 \pm 0,55 mg/l; p = 0,035) a faktoru C5a (poměr hladiny v 15. minutě a výchozí hladiny: 2,1 \pm 0,59, 2,1 \pm 0,64, 1,9 \pm 0,23; p < 0,001). Tyto trendy se však mezi dialyzátory významně nelišily (p=0,09 a p=0,4 pro CRP a C5a). Vývoj hladin TNF a IL6 neukazoval žádnou zánětlivou odpověď. V biofilmu bylo identifikováno 714 bílkovinných frakcí, z toho 324 bylo přítomno ve více než 90 % jednotlivých dialýz. V univariační analýze byl prokázán statisticky významný rozdíl ve

267 srovnání (z celkového počtu $324 \times 3 = 972$ srovnání). Multivariační analýza (Principal component analysis) adsorpčních vlastností zkoumaných membrán ukazuje odlišné chování zejména dialyzátoru Polyflux. Tato membrána např. adsorbuje Insulin-like growth factor binding protein 4 25× méně než dialyzátor Xevonta a 17× méně než dialyzátor CorDiax.

Závěr. Moderní vysokopropustné dialyzátory na bázi polysulfonu dosahují srovnatelné účinnosti při odstraňování látek o malé molekulové hmotnosti, rozdíly jsou dány spíše plochou membrány než jejím složením. Určité rozdíly (statisticky významné, zřejmě však nikoli klinicky relevantní) jsou patrné při odstraňování látek o střední molekulové hmotnosti. Tyto rozdíly se navíc ztrácejí po 15 minutách dialýzy, nejspíše v souvislosti se vznikem proteinového biofilmu. Složení tohoto biofilmu naopak vykazuje výrazné odlišnosti mezi jednotlivými membránami. Rozdílnou adsorpci přitom vykazují i látky s vysokou biologickou aktivitou.



MĚŘENÍ KREVNÍHO TLAKU U PACIENTŮ V KARDIOGENNÍM ŠOKU – VLIV NORADRENALINU

Jitka Mlíková Seidlerová, Pavlína Tůmová, Richard Rokyta, Milan Hromádka

II. interní klinika, Kardiologická klinika

Úvod. Předtím, než je zavedena intra-arteriální kanyla k invazivnímu měření krevního tlaku, (TK) je klinické rozhodování založeno na neinvazivním měření TK. Zda je neinvazivní měření TK srovnatelné s invazivním a které faktory tuto shodu ovlivňují, je zatím málo známo. V této práci proto tento problém zkoumáme se zaměřením na vliv noradrenalinu u nemocných v kardiogenním šoku.

Metodika. Srovnávali jsme TK měřený invazivně (Combitrans monitoring set arterial) a neinvazivně (duální tonometr Nissei-DM 3000) u 85 nemocných hospitalizovaných na Koronární jednotce pro kardiogenní šok. Porovnávali jsme vstupní TK (hned po kanylaci radiální tepny) a TK v prvních 72 hodinách pobytu na Koronární jednotce. Invazivní TK byl považován za referenční metodu.

Výsledky. Vstupní střední arteriální tlak (MAP) a systolický tlak (STK) byl v dobré shodě s oscilometricky měřenými hodnotami, průměrný rozdíl $-0,4 \pm 8,8$ a $+6,1 \pm 14,4$ mm Hg s korelačními koeficienty 0,76 a 0,74. Dávka noradrenalinu a invazivní hodnoty TK byly významnými determinantami invazivního/neinvazivního rozdílu TK (regresní koeficient pro dávku noradrenalinu: pro MAP $\beta = -6,82 \pm 3,20$; $P = 0,035$; pro STK $\beta = -13,48 \pm 4,95$; $P = 0,0076$). Průměrný rozdíl mezi invazivním a oscilometrickým MAP a STK nabýval hodnoty od $-2,3$ do $+1,1$ a od $+7,3$ do $8,4$ mm Hg u pacientů neléčených noradrenalinem až po pacienty léčených až dávkou noradrenalinu $< 0,6 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$. Nicméně, velmi vysoké dávky noradrenalinu ($> 0,6 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) byly spojené s výrazným poklesem rozdílu invazivního/oscilometrického MAP a STK ($-9,5 \pm 3,3$ a $-8,5 \pm 5,2$ mm Hg). Pokud jsme analyzovaly všech 967 sad měření TK (během prvních 72 hodin pobytu na Koronární jednotce), zjistili jsme, že průměrný rozdíl mezi invazivním a oscilometrickým TK byl relativně stabilní ve všech kategoriích TK, s výjimkou měření provedených na léčbě velmi vysokými dávkami noradrenalinu. Podobné výsledky jsme zjistily při porovnání invazivního a auskultačního TK.

Závěr. Oscilometrické měření TK se zdá dostačující náhradou pro monitoraci TK v prvních hodinách zdravotnické péče u nemocných v kardiogenním šoku. Nicméně, použití velmi vysokých dávek noradrenalinu je spojeno s významným nadhodnocením neinvazivně měřených hodnot TK.



DYSFUNKCE RENÁLNÍCH MITOCHONDRIÍ V SEPSI

Jitka Kuncová, Michaela Marková, Jiří Chvojka, Lenka Valešová, Jan Beneš, Zdeněk Tůma, Martina Grundmanová, Martin Matějovič

Ústav fyziologie, Biomedicínské centrum, I. interní klinika, Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, LFP UK

Sepse je život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená deregulovanou odpovědí hostitelského organismu na přítomnost infekce. V současné době představuje závažný medicínský i ekonomický problém pro svou vysokou mortalitu a obrovské finanční náklady spojené s její léčbou a minimalizací dlouhodobých následků. Podle nové definice je významným příznakem sepse selhání některých životně důležitých orgánů. Zejména porucha funkce ledvin je častou komplikací sepse zhoršující její prognózu. Ačkoliv se v patofyziologii akutního poškození ledvin pravděpodobně uplatňuje selhání mitochondriální bioenergetiky, experimentální data svědčící pro narušenou mitochondriální respiraci ledvinného parenchymu nejsou jednotná. Mezi příčiny této variability patří především experimentální živočišný druh, způsob indukce sepse nebo použitý protokol měření mitochondriální respirace zohledňující různé přenašeče elektronů. V naší studii jsme použili prasečí model celkového zánětlivého onemocnění, které bylo indukováno inokulací stolice ve dvou různých dávkách, tekutinovou resuscitací a podáváním vasopresorů dle potřeby. V jedné skupině byla zvířata léčena podáváním antibiotik (skupina MS – 16 zvířat), ve druhé nikoliv (SS – 13 prasat). V experimentech bylo použito celkem 29 anestetizovaných selat obou pohlaví. Po instrumentaci a periodě zotavení byly změřeny základní parametry systémové a renální hemodynamiky, biochemické zánětlivé a renální ukazatele (střední arteriální tlak, srdeční výdej, renální průtok krve, cévní odpor, renální žilní tlak, perfuze renální mikrocirkulace, parciální tlak kyslíku v intersticiu kůry ledvin, koncentrace TNF-alfa, IL-6 a kreatininu v plazmě aj.) a byl odebrán první bioptický vzorek z kůry ledvin. Po inokulaci stolice byly výše uvedené parametry kontinuálně monitorovány a další biopsie byly odebrány po 24 hodinách a 40-44 hodinách těsně před ukončením experimentu. V biopsiích byla po adekvátní permeabilizaci tkáně měřena mitochondriální spotřeba kyslíku pomocí vysoce účinné respirometrie (oxygraf Oroboros O2k, Rakousko) a pomocí titračního protokolu byly stanoveny stavy LEAK (mitochondriální spotřeba kyslíku nutná pro kompenzaci úniku protonů přes vnitřní mitochondriální membránu), OXPHOS I, I+II (spotřeba kyslíku při oxidační fosforylaci a aktivaci příslušných respiračních komplexů), ETS I+II, II (spotřeba kyslíku při kolapsu mitochondriálního membránového potenciálu a maximálním přenosu elektronů respiračními komplexy) a ROX (reziduální spotřeba kyslíku, na niž byly ostatní stavy normalizovány). Na základě renálních parametrů (zvýšení koncentrace kreatininu v séru) byla zvířata dále rozdělena na skupiny s akutním poškozením ledvin nebo bez něj (MS-AKI, MS-non AKI, SS-AKI, SS-non AKI)

Ve skupině MS došlo ke zhoršení renálních funkcí jen u 3 zvířat, zatímco ve skupině SS 9 ze 13 pokusných prasat mělo příznaky akutního selhání ledvin. Srdeční výdej vzrostl signifikantně u všech skupin, nejvýrazněji u skupiny SS-AKI. Systolický objem zůstal zachován jen u skupiny MS-non AKI, u ostatních signifikantně poklesl. Renální cévní rezistence statisticky významně vzrostla jen u skupiny SS-AKI. Parciální tlak kyslíku v kůře ledvin, renální mikrocirkulace, dodávka ani extrakce kyslíku se signifi-

kantně nezměnily u žádné experimentální skupiny. Respirometrie permeabilizovaných biopsií odhalila přechodné zvýšení stavů OXPHOS I, I+II a ETS II u skupiny MS-non AKI, zatímco u zvířat ze skupiny MS-AKI k podobnému zvýšení nedošlo. Ve skupině SS-AKI došlo ke kontinuálnímu poklesu mitochondriální respirace ve stavech OXPHOS i ETS a relativnímu zvýšení stavu LEAK, což pravděpodobně snížilo kapacitu mitochondrií produkovat ATP.



MS vede patrně ke stimulaci funkce mitochondrií, které jsou schopny poskytovat energii v souladu se zvýšenými potřebami tkáně v době metabolické zátěže. Zvyšuje se zejména aktivita komplexu II a efektivita využití kyslíku se zlepšuje. SS způsobuje zhoršenou funkci mitochondrií, zejména komplexu I, díky absolutně i relativně rostoucímu stavu LEAK progresivně klesá možnost efektivního využití kyslíku.

Podpora: NPU I – Nr. LO1503, Progres Q39, SVV 260394/2017, FIND.



VÝVOJ METODIKY PROPOJUJÍ LASEROVOU MIKRODISEKCI A PROTEOMIKU

Pandey S.¹, Tůma Z.¹, Chottová Dvořáková M.^{1,2}

¹Biomedicínské centrum, ²Ústav fyziologie, LFP UK

Mezi různými „-omik“ technikami má proteomika schopnost objevit velmi specifické strukturální a funkční rozdíly na úrovni buněk. Zejména hmotnostní spektrometrie ukázala velký potenciál jako nástroj pro zvýšení množství informací získaných z tkáňových řezů, které jsou rutinně připraveny pro histologickou analýzu. Analýza tkáňových extraktů umožňuje identifikaci velkého počtu bílkovin, ale zároveň však dochází ke ztrátě informace vztahující se k prostorové lokalizaci stanovených bílkovin v tkáni. Tento nedostatek by bylo možné alespoň částečně odstranit tím, že by se z histologického řezu vyzolovaly konkrétní struktury či jednotlivé buňky a ty se následně využily k proteomické analýze. Zmíněnou izolaci konkrétních částí tkáňového řezu lze velmi přesně udělat pomocí laserové mikrodisekce.

Dosud se vzorky získané pomocí laserové mikrodisekce používaly především pro analýzu genové exprese, proto není k dispozici žádná dostatečně standardizovaná metodika pro proteomickou analýzu těchto vzorků. Analýza proteinů z buněk izolovaných laserovou mikrodisekcí je relativně náročná z důvodu velmi malého množství vzorku a dlouhého času zpracování. Naším cílem je vytvořit komplexní a co nejjednodušší a nejkratší protokol, který by umožňoval analyzovat většinu vzorků získaných prostřednictvím laserové mikrodisekce pomocí metody nazvané kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) a získat validní výsledky.

Pokusy byly rozděleny do třech kroků:

1. Optimalizace procesu získání vzorku – příprava tkáňového řezu, stanovení minimální velikosti získaného vzorku.
2. Optimalizace procesu enzymového štěpení.
3. Optimalizace extrakčního protokolu.

Pro vyhodnocení účinnosti metodiky použité pro získání vzorku z tkáňového řezu jsme rozštěpili vzorky různorodé složitosti, jmenovitě kromě vzorku ze srdce laboratorního potkana získaného laserovou mikrodisekcí také vzorek obsahující pouze jeden protein (bovinní sérový albumin), vzorek obsahující směs 13 proteinů (proteinový marker), a nakonec komplexní vzorek (extrakt ze srdce laboratorního potkana) a analyzovali je pomocí SDS-PAGE a následně hmotnostní spektrometrickou analýzou. Ověřili jsme si, že náš postup enzymového štěpení vzorků je správný, stejně tak jako postup při izolaci vzorku. Kombinace laserové mikrodisekce s LC-MS má potenciál vytvořit jedinečnou platformu pro studium málo a středně zastoupených proteinů v konkrétních buňkách či oblastech tkáně.

Tato práce byla financována z Národního programu udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy a z Programu rozvoje vědních oborů Karlovy Univerzity (Progres Q39).

HYPERBARICKÁ OXYGENOTERAPIE V LÉČBĚ DEFEKTU U DIABETICKÉHO POTKANA

J. Růžička, L. Vištejnová, P. Klein, M. Grajciarová, Z. Tonar, J. Dejmek, L. Bolek, J. Beneš

Biobedicínské centrum, LFP UK

Úvod. Patofyziologický vliv hyperbarické oxygenoterapie (HBO) na defekty studují animální studie, které shodně reportují dosud nedostatečně prozkoumaný vliv HBO na hojení. Téměř všechny studie přitom využívají animální model – streptozocinem indukovaný diabetes u potkana, použití jiných modelů je ojedinělé.

Materiál a metody. Pro vývoj modelu diabetické rány byl použit „Zucker Diabetic Fat“ potkan (ZDF potkan) s vrozenou mutací leptinového receptoru. U zvířat se rozvíjí obezita, inzulinová rezistence a hyperglykémie. ZDF potkani byli krmeni vysokoenergetickou dietou Purina 5008 (Purina, ČR). Po 8 týdnech byl u ZDF (fa/fa) samců vyvinutý diabetes mellitus typu II., ověřený hodnotami glykémie vyšší než 15 mmol/l.

Prezentujeme výsledky pilotní studie, dosud zhodnocených 7 potkanů v HBO a 5 potkanů v kontrolní skupině (2 potkani uhynuli těsně po operaci).

Po navození celkové anestezie potkana následovalo vytvoření dvou čtvercových plnoprofilových ran $1,5 \times 1,5$ cm v dorsální krajině potkanů. Rány byly fotodokumentovány (den 0), překryty neadherujícím krytím Cosmopor E (Hartman, ČR). 4. den po indukci ran byla započata HBO v režimu 90 min izokompresní fáze 0,25 MPa, 5 × týdně. Tento protokol je v relaci s používáním HBO v klinické praxi. Potkani byli standardně ustájeni, 2× týdně byly rány převazovány a fotodokumentovány, až do úplného spontánního zhojení defektu. 11. den (po 5 expozicích HBO) a 18. den od indukce rány byla vždy jedna rána ukončena pro účely odběru vzorků kůže pro histologickou analýzu. 18. den byl také experiment s potkanem ukončen a byly odebrány vzorky krve pro biochemický rozbor. V pilotní studii prezentujeme vliv HBO na hojení na základě makroskopického hodnocení snímků ran pomocí softwaru ImageJ (NIH), následovaný statistickým zhodnocením rozdílů mezi léčenou (HBOT, n=7) a kontrolní skupinou (CTRL, n=5).

Dále prezentujeme histologickou analýzu, kvantifikující množství kolagenu typu I a III pomocí barvení Picrosirius red s následným stanovením množství kolagenu jako objemové frakce v polarizovaném osvětlení preparátu.

Výsledky. Plocha ran léčené i kontrolní skupiny se ve sledovaném čase 0 dní – 18 dní zmenšovala stejnou rychlostí (HBOT 9 % za den; CTRL 10 % za den; nesignifikanční rozdíl v prvních 4 dnech hojení; HBOT 6 % za den; CTRL 6 % za den; v posledních 4 dnech hojení). Při závěrečném hodnocení 18. den pokusu bylo zcela zhojeno 3 ze 7 potkanů v HBO skupině, vs. jeden z 5 potkanů v kontrolní skupině.

Histologická analýza prokázala zvýšené množství kolagenu I v HBO vs. CTRL skupině ($1,75 \pm 0,85$ vs. $1,18 \pm 0,38$), stejně tak i množství kolagenu III v HBO vs. CTRL skupině ($1,29 \pm 0,93$ vs. $0,62 \pm 0,45$).

Závěr. Statistickým hodnocením makroskopického hodnocení uzavírání ran nebyl prokázán vliv HBO terapie na hojení chronické rány diabetického potkana. Histologická analýza naopak vliv prokázala. Tento rozpor je vysvětlitelný malým počtem respondentů ve statistickém hodnocení a nevhodnou volbou velikosti defektu. Ve snaze provádět průběžnou analýzu hojení byly iniciovány dva menší defekty, jejich doba zhojení byla rychlejší nežli reportovaná doba hojení ostatních studií. Defekty se hojily značnou měrou kontrací, epitelizace byla minimální, resp. prokazatelná zejm. histologicky. V dalším výzkumu budeme upravovat velikost defektu tak, aby byla doba hojení delší a epitelizace se projevila.

Tento projekt byl podpořen z Národního programu udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaného MŠMT ČR a projektem PROGRES Q39 Karlovy Univerzity.



BEHAVIORÁLNÍ ODLIŠNOSTI MYŠÍ PWD/PH PODDRUHU MUS MUSCULUS MUSCULUS A MYŠÍ KLASICKÉHO INBREDNÍHO KMENE LABORATORNÍCH MYŠÍ C57BL/6J

Jan Tůma^{1,2}, Věra Markvartová¹, Vladana Fotopulosová³, František Vožeh^{1,2}, Jiří Forejt³, Jan Cendelín^{1,2}

¹Ústav patologické fyziologie; ²Laboratoř neurodegenerativních poruch, Biomedicínské centrum – LFP UK; ³Ústav molekulární genetiky – BIOCEV, AV ČR

Laboratorní myši jsou důležitým nástrojem výzkumu neurologických onemocnění. Používání inbredních kmenů však často vede k nálezům platným pouze pro úzkou geneticky definovanou populaci, jejichž generalizace a přenos do humánní medicíny mohou být problematické. Cílem této studie bylo zkoumat vliv genetického původu pokusných myší na chování v anxiogenních situacích, vývoj naučené bezmocnosti, úlekovou reakci, motorické schopnosti, prostorové učení a stresovou reaktivitu u myšičího kmene PWD/Ph odvozeného od poddruhu *Mus musculus musculus* a u běžných laboratorních myšičí kmene C57BL/6J. Myši PWD/Ph byly méně aktivní v otevřeném poli, vyhýbaly se více otevřeným ramenům vyvýšeného křížového bludiště, vykazovaly menší míru prepulsní inhibice, menší úroveň projevů naučené bezmocnosti v testu nuceného plavání, lepší výkon v testu na rotarodu a mírně horší výkon v testu v Morrisově vodním bludišti. Myši PWD/Ph měly rovněž zvýšené hladiny kortikosteronu jak za bazálních podmínek, tak po aplikaci mírného stresoru v podobě handlingu. Předpokládáme, že myši PWD/Ph mají odlišnou míru stresové reakce na podněty z okolí, které může ovlivňovat jejich chování v řadě testů, včetně kognitivních a motorických testů, které nejsou zaměřené na stresové chování. Tyto nálezy ukazují význam genetického pozadí pokusných myšičí a dokládají komplexnost potenciálních faktorů, které ovlivňují výkon myšičí v experimentálních testech nervových funkcí.



ZOBRAZOVÁNÍ AKTIVITY POPULACE JEDNOTLIVÝCH NEURONŮ U VOLNĚ POHYBLIVÝCH ZVÍŘAT

Karel Ježek, Michael Mareš

Laboratoř experimentální neurofyzologie, Biomedicínské centrum, LFP UK

Výzkum mechanismů funkcí mozku na buněčné úrovni vyžaduje současnou registraci aktivity co největšího množství neuronů. Akční potenciály se tradičně zaznamenávají pomocí mikroelektrod, zavedených do buněk přímo, či umístěných v jejich těsné blízkosti. Tyto klasické elektrofyziologické metody jsou schopny zaznamenat aktivitu maximálně několika desítek buněk najednou. Protože na zpracování informace v každé z neuronových sítí se podílí mnoho desítek – až stovek tisíc neuronů, jejichž způsob kódování je vzhledem k jejich typologické různorodosti často odlišný, je nezbytné registrovat a analyzovat aktivitu celých populací individuálně rozlišených jednotek.

Recentní možnosti molekulární genetiky rozvinuly metody umožňující vpravit do genomu experimentálního subjektu genetický materiál z jiného organismu a modifikovat tak jeho fyziologické vlastnosti. Hlavním přínosem posledních let je možnost genovou transfekci provést pouze ve vybraném typu buněk, zatímco ostatní typy jsou jí nezasázeny. Vektorem takového vnesení genu je virový konstrukt, nesoucí vkládaný genetický materiál, jehož afinita ke zvolenému typu buňky je definována specifickým promotorem. V nervové tkáni, jejíž složení je vysoce komplexní, lze tímto způsobem exprimovat zvolený gen pouze ve vybraném typu neuronů.

Pro vizualizaci aktivity neuronů *in vivo* byl vyvinut kombinovaný genetický konstrukt z modifikovaného genu mořské medúzy (*Aequorea victoria*) kódujícího zeleně fluoreskující protein (GFP) a z genu pro signální protein reagující na vstup kalciových iontů do buňky (CaMP). Tento materiál je nesen Adeno-asociovaným virem (AAV), jehož afinita byla upravena tak, aby transfekce proběhla pouze v pyramidových buňkách. Zmíněná modifikace tedy způsobí, že při vstupu kalciových iontů do neuronu, jenž je nepřímým indikátorem jeho aktivity, začne buňka v odpovědi na příchozí modré světlo zeleně fluoreskovat. Tento signál lze zachytit fluorescenčním mikroskopem a zpracovat metodami analýzy obrazu. V zorném poli pak může být potenciálně do 1 000 identifikovatelných neuronů, což je v porovnání i s metodami mnohakanálové elektrofyziologie řádový skok. U studia kognitivních funkcí je však nutné, aby se subjekt mohl při registraci volně pohybovat a řešit paměťové úlohy. Metodou volby proto i v posledních letech byla vždy elektrofyziologie, jelikož funkční zobrazování na úrovni buněk pro přílišnou velikost mikroskopů dosud nepřípadalo v úvahu.

Vzhledem ke značným pokrokům na poli miniaturizace fotografických senzorů v posledních letech, lze nově fluorescenční mikroskop (o váze ca. 2 gramů) fixovat přímo na hlavu experimentálního potkana či myši, aniž by je to omezovalo ve volném pohybu. Je zde tedy dostupná metoda současné registrace stovek neuronů pomocí kalciového zobrazování na volně pohyblivých subjektech. V posledním roce jsme se věnovali zavedení techniky kalciového zobrazování na našem pracovišti na myším a potkaním modelu.

Zvolili jsme AAV, serotyp 1, s CA++ citlivým a zeleně fluoreskujícím konstruktem GCaMP šesté generace s rychou kinetikou (GCaMP6f). Bylo provedeno několik titračních experimentů ověřujících optimální koncentraci viru, dávku a místo aplikace. Virus byl injikován do oblastí CA1 a CA3 dorzálního hipokampu myši kmene B16. Po čtyřech až šesti týdnech nezbytných pro expresi proteinu jsme přistoupili k implantaci endoskopu, který byl umístěn 200 mikrometrů nad místo injekce a na povrchu lebky fixován pomocí silikonu, akrylátu a dvou kotevních šroubů. Během dalších několika dnů byla posuzována úroveň fluorescenčního signálu a v posledním zákroku byla okolo endoskopu připevněna základna pro mikroskop.

Pilotní experimenty probíhaly v několika arénách, během nichž se subjekt volně pohyboval v otevřeném poli za současné registrace fluorescenční aktivity v zorném poli endoskopu. Analýza sekvencí jednotlivých expozičních identifikovala ca 200 bodových zdrojů fluorescence, potenciálně odpovídající individuálním pyramidovým neuronům.

Tato technologie představuje výrazný skok v neurofyzilogické metodice s přesahem do i do jiných oborů. Její využití v laboratoři směřuje k mnohem detailnějšímu pochopení charakteru paměťových stop a jejich dynamice v neuronových sítích hipokampu a v přilehlých strukturách.



VYUŽITÍ PREDIKTIVNÍCH MARKERŮ A IMUNOTERAPIE PRO EFEKTIVNÍ NÁDOROVOU LÉČBU

Monika Holubová, Pavel Pitule

Laboratoř nádorové biologie, Biomedicínské centrum, LFP UK

Nádorové onemocnění je často popisováno jako populace buněk s nekontrolovaným růstem. Buňky však potřebují k maligní transformaci mnoho dalších mechanismů, aby došlo k tvorbě nádoru a rozvoji onemocnění. Nádorové buňky si například vyvíjejí mechanismy, díky kterým unikají imunitnímu dozoru nebo mechanismy resistance na chemoterapii. Tyto rezistentní buňky jsou pak obvykle mnohem agresivnějšího imunofenotypu a je mnohem náročnější je léčit běžně dostupnými terapeutickými protokoly. Existuje řada prediktivních markerů progresivního onemocnění jako např. přítomnost nádorových kmenových buněk, zastoupení imunitních buněk v nádorové mase (např. snížené zastoupení cytotoxických T-lymfocytů, NK buněk, iNKT anebo zvýšené zastoupení inhibičních buněk jako jsou Treg), přítomnost/nepřítomnost regulačních molekul jako microRNA, dlouhé nekódující RNA či specifické mutace. Všechny tyto markery slouží ke stagingu nemoci, ale jejich terapeutický potenciál je v současnosti stále nevyužitý.

Imunoterapie přináší nové možnosti léčby onkologických pacientů. První a již standardně používanou imunoterapií je využití monoklonálních protilátek a jejich schopnosti 1) blokovat mechanismy zásadní pro vývoj nádoru jako je angiogeneze (blokace VEGF – Bevacizumab), 2) blokovat pro-růstové signály (blokace EGFR – Cetuximab) anebo 3) aktivovat komponenty imunitního systému (komplement či NK buňky) – anti CD20 Rituximab. Efektivita protilátek může být zvýšena v kombinaci protilátek a ex vivo aktivovaných imunokompetentních buněk jako např. NK buněk. I v tomto případě však dokážou nádorové buňky odolat imunitní odpovědi a to jak přímou blokací efektorových buněk (např. PD-1 aktivace) či snížením exprese popř. uvolněním (maskováním) aktivačních molekul (např. NKG2D ligandy).

Ze všech těchto důvodů je pro nastavení účinné terapie nutné porozumět mechanismům růstu nádorových buněk a jejich interakci s okolními buňkami včetně imunitních buněk. Pochopení těchto mechanismů může přispět k vývoji nových terapeutických možností či k predikci odpovědi nádorového onemocnění na léčbu s použitím prediktivních/prognostických markerů a ve finále k výběru optimální specifické terapie pro pacienta.

Změna ve vedení Laboratoře nádorové biologie umožní zavedení nových metod a námětů, které mohou být uplatněny nejen u solidních nádorů, ale otevře se tak i nové pole zabývající se hematologickými malignitami, stejně jako sledování funkce imunitního systému za fyziologických a patologických podmínek. Laboratoř se bude zabývat jak sledováním imunogenní buněčné smrti, roli různých imunitních buněk v nádorové tkáni, detekci nových prognostických a hlavně prediktivních markerů nádorové léčby, interakcí nádorových buněk a nádorového stroma stejně jako detekcí vzácných populací jako jsou leukemické kmenové buňky či cirkulující nádorové buňky v případě solidních nádorů.



EXPRESE, GENETICKÉ PROFILY A SEKVENAČNÍ METODY VYUŽITELNÉ PRO SLEDOVÁNÍ KLINICKÉHO VÝZNAMU MOLEKULÁRNÍCH FAKTORŮ SOLIDNÍCH NÁDORŮ

Václavíková Radka^{1,2}, Šeborová Karolína^{1,2}, Kristensen Vessela³, Hlaváč Viktor^{1,2}, Pavel Dvořák^{1,4}, Ehrlichová Marie^{1,2}, Rob Lukáš⁵, Hruza Martin⁵, Černaj Petr⁶, Bartáková Alena⁶, Bouda Jiří⁶, Vodička Pavel⁷, Vodičková Ludmila⁷ a Souček Pavel^{1,2}

¹Laboratoř farmakogenomiky, Biomedicínské Centrum LFP UK; ²Odd. Toxikogenomiky, Státní zdravotní ústav, Praha; ³Institute for Clinical Medicine and Department of Clinical Molecular Biology and Laboratory Science (EpiGen), Akershus University Hospital, University of Oslo, Norway; ⁴Ústav Biologie LFP UK; ⁵Gynekologicko-porodnická klinika, 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha; ⁶Gynekologicko-porodnická klinika LFP UK a FN Plzeň; ⁷Ústav Experimentální medicíny AV ČR, Praha

Jednou z oblastí výzkumu, na který se zaměřuje Laboratoř farmakogenomiky Biomedicínského Centra, je identifikace a validace nových genetických faktorů souvisejících s prognózou, progresí nádorů, predikcí úspěšnosti terapie a přežíváním pacientů se solidními nádory. Nové genetické determinanty jsou hledány pomocí analýzy expresních profilů a charakterizovány stanovením jejich genetické variability a regulačních mechanismů ovlivňujících jejich expresi. Na základě těchto studií jsme identifikovali celou řadu potenciálně využitelných genetických markerů např. ze skupiny membránových ABC a SLC transportérů, dále cytochromů P450, aldoketoreduktas či genů signálních drah a DNA reparačního systému ovlivňujících transport, metabolismus, účinnost a případný rozvoj rezistence vůči protinádorovým léčivům.

Využití moderních technologií tzv. sekvenování nové generace nám ovšem v současnosti umožňuje sledovat velmi komplexně a detailně vzájemné vztahy a souvislosti mezi celkovým transkriptomem, nekódujícími RNA, genetickou variabilitou a regulačními procesy, které genovou expresi ovlivňují. V naší nejnovější studii jsme u 105 pacientek s karcinomem prsu pomocí cíleného exomového sekvenování sledovali genetickou variabilitu 509 genů souvisejících s účinností protinádorových léčiv a rozvojem rezistence u tohoto typu nádoru. Na základě bioinformatické analýzy se nám podařilo identifikovat kazetu 55 genetických variant potenciálně souvisejících s prognózou, odpovědí a přežitím pacientek s karcinomem prsu. Tyto varianty byly následně přímým sekvenováním validovány v setu celkem 805 pacientek s karcinomem prsu a na základě validační studie byly vyselektovány nejvýznamnější genetické varianty ovlivňující léčebnou odpověď a přežívání pacientek s karcinomem prsu. S obdobnými studiemi cíleného DNA sekvenování budeme pokračovat rovněž u dalších typů solidních nádorů např. ovaria či kolorekta. Na pilotních vzorkách karcinomu prsu jsme se zabývali rovněž sekvenací RNA a to jak kódující, tak i nekódujících RNA zejména miRNA a tzv. dlouhých nekódujících RNA (long noncoding RNA; lncRNA). Metodu RNA sekvenování lze využít nejen ke stanovení expresních hladin transkriptomu, ale i k identifikaci nových transkriptů a jejich variant včetně sledování vzájemných vztahů mezi mRNA-lncRNA-miRNA a jejich významu v prognóze a predikci léčebné odpovědi u nádorových onemocnění.

FORTIFIKACE ANASTOMÓZ NA ZAŽÍVACÍM TRAKTU NANOMATERIÁLY

Rosendorf J.^{1,2}, Horáková J.³, Klíčová M.³, Pálek R.^{1,2}, Červenková L.², Kural T.^{4,5}, Hošek P.², Kříž T.², Tégl V.^{2,6}, Bednář L.², Dolanský M.², Moulisová V.², Tonar Z.^{2,5}, Třeška V.¹, Lukáš D.³, Liška V.^{1,2}

¹Chirurgická klinika LFP UK; ²Biomedicínské centrum LFP UK; ³Katedra netkaných textilií a nanovlákněných materiálů, Textilní fakulta, Technická Univerzita v Liberci; ⁴Klinik für Chirurgie, Universitaetsklinikum Regensburg, Německo; ⁵Ústav histologie a embryologie LFP UK; ⁶Klinika anestezie a intenzivní medicíny LFP UK

Úvod. Jednou z hlavních komplikací současné kolorektální chirurgie je anastomotický leak. V mírných případech je postup konzervativní, v závažnějších případech je nutné reoperovat. Tato komplikace tak zvyšuje morbiditu a mortalitu pacientů, prodlužuje délku hospitalizace a zvyšuje i náklady na léčbu. Neméně významnou komplikací jsou poruchy pasáže zažívacím traktem, které se mohou po operaci vyskytnout u pacientů prakticky kdykoliv. Vznikají na podkladě stenózy střeva v místě anastomózy nebo na základě vzniku peritoneálních adhezí. Tyto komplikace doposud nebyly úspěšně eliminovány.

Dle provedených studií nanomateriály se svou strukturou blízkou extracelulární matrix podporují hojení. Vliv těchto materiálů na hojení střevních anastomóz a na vznik peritoneálních adhezí dosud nebyl ověřen. Jedná se o netkané textilie vytvořené elektrostatickým zvlákněním polymerních roztoků.

Cíle. Naším cílem bylo ověřit vliv nanomateriálů na vznik adhezí v dutině břišní a na hojení střevních anastomóz.

Metodika. Vývoj a výrobu nanomateriálů zajistil tým Textilní fakulty Univerzity v Liberci. V našem experimentu byla použita prasata domácí ve 2 experimentálních skupinách a jedné skupině kontrolní po osmi zvířatech. Zvířatům byly zkonstruovány 3 anastomózy na tenké kličce. Anastomóza byla v první experimentální skupině překryta proužkem nanomateriálu z polykaprolaktonu (PCL), ve skupině druhé proužkem nanomateriálu z kopolymeru polylaktidu a polykaprolaktonu (PLCL) a ve skupině kontrolní byly anastomózy ponechány nekryté. Zvířata byla následně 3 týdny sledována a realimentována dle fixního schématu. Sledovali jsme klinický stav zvířat a biochemické parametry. Následně byla zvířata usmrcena a proběhl odběr vzorků. Hodnoceny byly změny v břišní dutině, přítomnost nanomateriálu na anastomóze, změny průměru trávicí trubice, známky netěsnosti anastomóz. Vyhodnotili jsme množství adhezí při jednotlivých anastomózách, k čemuž jsme vytvořili nový skórovací systém. Histologicky jsme hodnotili morfologické změny. V imunohistochemických barveních jsme sledovali stereologicky infiltraci zánětlivými buněčnými elementy, podíl kolagenu a množství endoteliálních buněk. Výsledky byly následně statisticky zhodnoceny.

Výsledky. Použité nanomateriály mají přijatelnou formu pro snadnou aplikaci. Všechna zvířata přežila průběh experimentu. Nanomateriál nevyvolal u žádné skupiny reakce, které by měly negativní vliv na zdraví zvířete. U žádného zvířete nedošlo ke klinické manifestaci anastomotického leaku ani střevní obstrukci. Všechna zvířata ze skupiny

PCL tolerovala perorální příjem po celý čas experimentu. U jedno zvířete ze skupiny PLCL a z kontrolní skupiny byla obnova pasáže pomalejší. Materiál byl v experimentálních skupinách po 3 týdenním sledování přítomen ve všech případech zřetelně v místě aplikace. Určité množství novotvořených adhezí bylo přítomno u všech zvířat. U žádného zvířete jsme však nenalezli těžké adheze obliterující větší část dutiny břišní. Nejméně adhezí jsme našli v kontrolní skupině, variabilita v rámci skupiny byla však u všech skupin vysoká, tudíž rozdíl v množství adhezí mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný. Statisticky významný nebyl ani rozdíl mezi skupinami v podílu zánětlivé infiltrace, množství kolagenu ani endotelií.

Závěr. Podařilo se etablovat model fortifikované střevní anastomózy na praseti. S úspěchem jsme vytvořili a aplikovali nový skórovací systém hodnocení adhezí v místě anastomózy na zažívacím traktu. Zaznamenali jsme minimum komplikací. Manipulace s materiálem je snadná a materiál sám se jeví jako bezpečný. Výsledná jizva je ve všech sledovaných parametrech v experimentálních skupinách bez rozdílu od fyziologicky zhojené. Použitelnost v humánní medicíně však vyžaduje úpravu materiálu zejména stran rychlosti biodegradability.

Podpora. Práce byla podpořena Programem rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy (Progres Q39), Národním programem udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaným Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy a Centrem excelence UK/MED/006 „Centrum experimentální a klinické jaterní chirurgie“.



HODNOCENÍ KVALITY PERFUZNĚ DECELULARIZOVANÝCH JATER PRASETE DOMÁCIHO

Pálek R.^{1,2}, Moulisová V.², Bolek L.^{2,3}, Rosendorf J.^{1,2}, Dejmek J.^{2,3}, Červenková L.², Dolanský M.², Dahmen U.⁴, Třeška V.¹, Liška V.^{1,2}

¹Chirurgická klinika LFP UK, ²Biomedicínské centrum LFP UK, ³Ústav biofyziky LFP UK, ⁴Klinik für Allgemein-, Viszeral – und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Jena, Německo

Východisko. Transplantace jater je v současnosti jedinou kurativní léčbou pacientů s terminálním selháním jater. Přetrvává však výrazný nedostatek alotransplantátů. Nabízí se potenciální možnost xenotransplantace jater z prasete domácího, která však

v současné době není proveditelná pro špatnou imunokompatibilitu. Tkáňové inženýrství nabízí řešení v podobě přípravy orgánu z buněk samotného příjemce za použití decelularizovaných zvířecích jater.

Decelularizace je proces, kdy jsou z orgánu, nejčastěji pomocí detergentu, odstraněny celulární složky a samotná extracelulární matrix (jaterní skelet) zůstává zachována s potenciálem nového osídlení buňkami jiného jedince.

Cíle. Cílem této studie bylo provést decelularizaci jater prasete domácího a získat kvalitní skelet z extracelulární matrix s co nejmenším poškozením vhodný k dalšímu zkoumání a případnému osídlení endoteliálními buňkami či hepatocyty jiného jedince.

Metodika. Pracovali jsme celkem s 10 játry prasete domácího plemene přeštické černostrakaté prase (7× játra zmražená, 3× játra čerstvá). Byly použity 2 odlišné metodiky perfuzní decelularizace (s recirkulací a bez recirkulace perfuzních roztoků). Játra prasete domácího byla vypreparována a in situ propláchnuta cestou *vena portae* a *arteria hepatica* heparinizovaným fyziologickým roztokem (5 l). Následně byla játra zamrazena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo ihned decelularizována. Po rozmražení jater, či přímo po jejich odběru byla játra napojena na perfuzní oběh a decelularizována za využití detergentů Triton X-100 (1 %) a SDS (1 %). Perfuze probíhala cestou *vena portae* a *arteria hepatica* s odtokem cestou suprahepatální vena cava inferior s pravidelnými změnami na opačný směr perfuze dle stanoveného protokolu. Na závěr decelularizace byl orgán opět perfundován fyziologickým roztokem. Celkový objem roztoků potřebných k decelularizaci se významně lišil dle použité metodiky. Po ukončení decelularizace byly odebrány vzorky získaného skeletu a uloženy v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (s nebo bez kryoprezervačního roztoku) a ve $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ v roztoku PBS. Úspěšnost decelularizačního procesu a kvalita získaného scaffoldu byla hodnocena pomocí histologického vyšetření (barvení hematoxylinem eosinem, anilínovou modří, zeleným trichromem) a skenovací elektronové mikroskopie (SEM). V průběhu perfuze byly odebírány vzorky efluentu, jejichž další rozbor by měl umožnit studovat dynamiku decelularizačního procesu.

Výsledek. Dle makroskopického a histologického hodnocení se nám podařilo úspěšně decelularizovat celkem 10 jater prasete domácího. Veškeré buněčné složky byly odstraněny a extracelulární matrix dle provedeného hodnocení zachována. Zachovalá extracelulární matrix kopírovala tvar nejen jednotlivých jaterních lalůček, ale i samotných sinusoid. Metodika bez recirkulace perfuzních roztoků se jevila dle makroskopického hodnocení jako šetrnější se zachováním detailnější struktury jednotlivých vláken extracelulární matrix v obraze SEM, zvláště u jater, která nebyla kryoprezervována, přestože histologické výsledky byly srovnatelné.

Závěr. Ověřili jsme efekt dvou odlišných metodik decelularizace jater prasete domácího. Obě metodiky byly úspěšné co se týká odstranění veškerých celulárních složek a zachování extracelulární matrix jater. Optimalizace protokolu decelularizace vyžaduje další zkoumání získaného skeletu a odebraných vzorků efluentu k její další optimalizaci.

Podpora. Práce byla podpořena programem Centrum excellence UK/MED/006 „Centrum experimentální a klinické jaterní chirurgie“, Národním programem udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaným Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy a programem rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy (Progres Q39).

SIMULACE ZÁNĚTLIVÉHO PROSTŘEDÍ CHRONICKÝCH RAN *IN VITRO*

Zavadřáková A., Vištejnová L., Sojka M., Hošek P., Hrabák J.

Biomedicínské centrum, LFP UK

Přítomnost rezistentních bakterií je jednou z příčin vzniku kožních chronických ran. Rozpustné faktory produkované bakteriemi do rány jako jsou proteázy, exotoxiny, glykolipidy a pigmenty, mohou podporovat zánět a zpomalovat proces hojení. Mezi zasažené procesy patří i činnost dermálních fibroblastů, buněk odpovědných za obnovu poškozené dermis. Bakteriální rozpustné faktory mohou ovlivňovat proliferaci a migraci dermálních fibroblastů či produkci extracelulárních proteinů a signálních molekul těmito buňkami.

Dostupné *in vitro* modely dermálních fibroblastů v infekčním či zánětlivém prostředí využívají přidavek bakteriálního lipopolysacharidu (LPS) nebo pro-zánětlivých cytokinů a chemokinů, například IL6, TNF α nebo IL8, do kultivačního média buněk. Tyto modely jsou však stále ještě vzdálené od komplikované situace ve skutečné ráně. Jiné možnosti modelace zahrnují přítomnost bakterií v planktonu nebo ve formě bakteriálního biofilmu, nebo jsou využívány exsudáty reálných ran pacientů jako zdroje signálních molekul a bakteriálních rozpustných faktorů.

Cílem studie je pomocí planktonických bakterií simulovat zánětlivé a infekční prostředí chronické rány a sledovat odpověď dermálních fibroblastů na tyto podmínky. Inokula kmenů typických pro chronickou ránu *S. aureus* a *P. aeruginosa* byla přidávána do kultivačních médií dermálních fibroblastů a byl sledován jejich vliv na metabolickou aktivitu, proliferaci, migraci a produkci mezibuněčné hmoty dermálními fibroblasty. Zároveň byla provedena fenotypizace použitých bakteriálních kmenů pro účely popisu jejich možného patogenního účinku.

Rozdíly v účinku bakterií na metabolickou aktivitu a proliferaci dermálních fibroblastů byly pozorovány u obou studovaných bakteriálních druhů. Významný vliv na účinek bakterií měl postup přípravy bakteriálního inokula, koncentrace inokula v kultivačním médiu a také samotný použitý kmen v závislosti na jeho fenotypu.



CHARAKTERIZACE CHOVÁNÍ ULTRAMALÝCH NANOČÁSTIC V BIOLOGICKÉM PROSTŘEDÍ

Iva Machová, Tereza Bělinová, Marie Hubálek Kalbáčová

Laboratoř studia interakcí buněk s materiálem, Biomedicínské centrum, LFP UK

Nanočástice (NČ) z různých materiálů jsou slibnou technologií pro moderní medicínu a v současnosti jsou testovány v souvislosti s jejich využitím jako nosiče léčiv či genů, nebo pro zobrazovací metody. Stěžejními vlastnostmi NČ pro jejich aplikaci je velikost, tvar, povrchová úprava a náboj, které výrazně ovlivňují chování NČ v biologickém prostředí. Jelikož pro případné využití jakýchkoli NČ in vivo je stěžejní jejich efektivní odstranění z těla, soustředíme se především na studium NČ o velmi malých velikostech (do 5 nm), které mohou být odstraněny z těla renálním systémem.¹ Studujeme tedy prozatím jejich chování v krevním séru či v interakci s lidskými buňkami in vitro. Krevní sérum představuje velmi heterogenní prostředí obsahující proteiny, aminokyseliny, lipidy a další metabolity, které se spontánně mohou vázat na povrch NČ. Především proteiny absorbované na povrch NČ mění jak velikost, tak vlastnosti NČ, které mohou mít negativní vliv a vést např. k zánětu či aktivaci komplementu.^{2,3} Pro objasnění chování ultra malých NČ v biologickém prostředí jsme testovali dva typy NČ z odlišných materiálů s různou povrchovou úpravou. Stanovili jsme cytotoxický efekt NČ na buněčné linii lidských osteoblastů a monocytů a identifikovali jsme proteiny absorbované na povrchu NČ. Navíc, s ohledem na potenciální biomedicínskou aplikaci, jsme sledovali produkci cytokinů monocyty po stimulaci těchto buněk našimi NČ.

- (1) Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2007;25(10):1165-70.
- (2) Chatterjee, S.; Mukherjee, T. K. Spectroscopic Investigation of Interaction between Bovine Serum Albumin and Amine-Functionalized Silicon Quantum Dots. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, 16 (18), 8400–8408.
- (3) Nierenberg, D.; Khaled, A. R.; Flores, O. Formation of a Protein Corona Influences the Biological Identity of Nanomaterials. *Reports Pract. Oncol. Radiother.* 2018, 1–9.



EPIGENETICKÁ REGULACE GAMETO – A EMBRYOGENEZE: NÁSTROJ PRO HODNOCENÍ ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ

Jan Nevoral, Miriam Štiavnická, Hedvika Řimnáčová, Tereza Fenclová, Lukáš Gold,
Václav Růčka & Milena Králíčková

Biomedicínské centrum, Ústav histologie a embryologie – LFP UK

Laboratoř reprodukční medicíny je zaměřena na a) základní studium gametogeneze a časného embryonálního vývoje, kdy jsou poznatky tohoto studia využity pro b) hodnocení endokrinních disruptorů. Přesněji, proběhlé experimenty byly zaměřeny na hodnocení epigenetického kódu v gametách a časných embryí myší po expozici endokrinním disruptorem bisfenolem S (BPS). Bylo zjištěno, že velmi nízké koncentrace BPS postihují epigenetický kód oocytů a embryí na úrovni metylace DNA a histonů (Nevoral et al., 2018a). Obdobná zjištění, na základě sledování molekulárních mechanismů změn kvality oocytů a spermií jsou připravována k publikaci. Současné experimenty jsou zaměřeny na transplacentární a translaktační expozici bisfenoly (BPS, BPA, BPF), kde lze očekávat negativní endokrinně disruptorový efekt ve velmi časném stádiu ontogeneze jedince. Experimentální data budou doplněna biomonitoringem bisfenolů v lidské folikulární tekutině a mateřském mléku. Protože je pro pokročilé hodnocení endokrinních disruptorů zapotřebí rozsáhlého studia biologie gameto – a embryogeneze, probíhá na pracovišti soustavně studium mechanismů epigenetických regulací: gasotransmiteru sulfanu (Nevoral et al., 2018b) a NAD⁺-dependentní histon deacetylázy SIRT1 (Nevoral et al., under review). Další studium bude zaměřeno na schopnost sulfanu modulovat epigenetický kód gamet a embryí prostřednictvím aktivace SIRT1. Pro tento účel bude použito transgenních kmenů myší na genetickém základě C57BL6J: PhAM, SIRT1loxP/loxP a Cre:Zp3. Poznatky o buněčné signalizaci budou použity pro výběr kandidátních markerů kvality gamet a embryí exponovaných endokrinními disruptory a dalšími stresory. Také nadále probíhá v Laboratoři řešení vědeckých projektů: AZV a HBM4EU. Experimenty jsou designovány a realizovány ve spolupráci s tuzemskými a zahraničními partnery: IVF Zenter prof. Zech, Plzeň, Výzkumný ústav živočišné výroby v Praze (prof. J. Petr), University of Castilla – La Mancha (Dr. Olga García-Álvarez), University of Missouri, MO, USA (prof. P. Šutovsky), Lille1 Université, Francie (prof. J. F. Bodart) a Chonbuk National University, Jižní Korea (Dr. Y. J. Yi). Programu mobility, v rámci řešení projektu FIND, se v roce 2018 a 2019 účastní Dr. Marouane Chemek (Tunisko). Vedle stálých členů laboratoře, včetně doktorandů, se na experimentální práci významně podílí také pre-graduální studenti z LFP (2× studenti SVOČ) i z jiných fakult a univerzit (1× bakalářská práce, 1× diplomové práce + 1× obhájená diplomová práce na PŘF UK).



LABORATOŘ KVANTITATIVNÍ HISTOLOGIE A JEJÍ NEJVÝZNAČNĚJŠÍ VÝSLEDKY V ROCE 2018

Zbyněk Tonar, Tereza Kubíková, Yaroslav Kolinko, Markéta Šlajerová, Anna Malečková, Jiřina Havránková

Laboratoř kvantitativní histologie, Biomedicínské centrum LFP UK

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 spojitých kvantitativních proměnných. V roce 2018 byli pracovníci laboratoře iniciátory a korespondujícími autory čtyř prací zveřejněných v časopisech s IF: (i) První z nich vyvíjela a testovala generování fantomových dat pro kalibraci morfometrických metod využívajících mikro-CT (společně s Laboratoří nádorové léčby a regenerace tkáně, *Microscopy Research and Technique*; Q3 dle JCR, IF = 1,087). (ii) Druhá práce zjistila, do jaké míry jsou srovnatelné výsledky kostní morfometrie založené na třech hlavních metodách k tomu používaných, tj. výbrusech, odvápněných řezech a mikro-CT (*Annals of Anatomy*, Q2; IF = 1,852). (iii) Třetí výsledková práce zmapovala distribuci vaziva v játrech prasete (společně s Laboratoří nádorové léčby a regenerace tkáně, *Journal of Comparative Pathology*, Q2; IF = 1,364). (iv) Čtvrtá práce formou přehledu zmapovala současné znalosti o morfologii a funkci pericytů v mozku, včetně jejich role v patogenezi neurodegenerativních onemocnění a tumorigeneze (*Journal of Chemical Neuroanatomy*, Q3; IF = 2,162).

V dalších pracích jsme se podíleli na hodnocení in vivo experimentů prováděných ve spolupráci s dalšími laboratořemi BC či s mimofakultními výukumnými partnery, např: (i) biokompatibilita textilních sítěk užívaných k prevenci hernie v jizvě (FN Motol, Int J



Nanomedicine Q2; IF = 3,086), (ii) objem štěpu transplantovaných embryonálních nervových buněk (Laboratoř neurodegenerativních poruch, The Cerebellum, Q2; IF = 3,234), (iii) morfometrie ovariálních folikulů po ovlivnění bisfenolem S (Laboratoř reprodukční medicíny; Reproduction, Q1; IF = 4,37). (iv) Ve spolupráci s Fakultou aplikovaných věd ZČU jsme dále zmapovali histologické složení a mechanické vlastnosti perinea u žen v postmenopauze (Menopause; Q2, IF = 2,673). (v) Pátá práce formou editorialem mapovala histopatologické markery různých fenotypů cévní hladké svaloviny u onemocnění aorty (Anatolian Journal of Cardiology, Q4; IF = 1,271). (vi) Ve spolupráci s Laboratořmi nádorové léčby a regenerace tkáně jsme vyhodnotili histologické změny u experimentálně vyvolaného sinusoidálního obstrukčního syndromu u prasete (Rozhledy v chirurgii).



V oblasti smluvního výzkumu jsme vypracovali pět výzkumných zpráv zaměřených na hojení kosti a chrupavky, břišní stěny a na testování léků vyvíjených k ovlivnění Alzheimerovy choroby. Implementovali jsme novou stereologickou pracovní stanici (Stereologer, SRC Biosciences, Tampa, FL, USA), která splňuje nejpřísnější současná kritéria pro kvantitativní mikroskopii.

Personální složení laboratoře je stabilní a umožňuje pokrýt poměrně širokou oblast histologie při zachování současných standardů v jednotlivých podoblastech. Práce pokračují díky spoluúčasti pracovníků laboratoře ve dvou projektech AZV, díky podpoře projektů Progres Q39, FIND, projektu Centra klinické a experimentální chirurgie UNCE a dalších. Všem našim kolegyním a kolegům na BC děkujeme za inspirativní spolupráci, přejeme do dalšího období kromě vědeckých úspěchů vše dobré i v osobním životě a gratulujeme Dr. Kubíkové k narození dcery Barborky (leden 2018)!

PŘEHLED ČINNOSTI V CENTRÁLNÍM UŽIVATELSKÉM ZAŘÍZENÍ

Pavel Klein

Biomedicínské centrum LFP UK

V Centrálním uživatelském zařízení bylo v roce 2018 aktivně řešeno celkem 32 projektů pokusů na zvířatech (myších, potkanech, králících a prasatech). Tým CUZ zajišťuje technickou podporu a odborné poradenství při realizaci všech experimentů; u 14 projektů se i přímo personálně podílí na jejich řešení. V roce 2018 bylo týmem CUZ a spolupracovníky z LFP realizováno 6 smluvních experimentů, z nichž 4 byly zaměřené na hojení ran. 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 jako je například vývoj modelů hojení chronických ran, embryotransfer u myší či anestézie myší a potkanů pro náročné a déletrvající chirurgické výkony. Od roku 2018 se podílíme i na řešení 2 projektů AZV: u jednoho jako členové výzkumného týmu a u jednoho jako spoluřešitel za LFP. U 3 dalších grantových projektů figuruje CUZ jako klíčový smluvní partner pro realizaci *in vivo* části projektu.









UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Husova 3, 301 00 Pízeň

DĚKAN



UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Husova 3, 301 00 Pízeň

TAJEMNICE