

congress
prague

97. fyziologické dny

8.–9. února 2022

Programový sborník
s abstrakty

Fyziologický ústav
1. lékařské fakulty

Albertov 5, Praha 2

Pořadatel:

Fyziologický ústav 1. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy

www.fyziologickedny.cz



PARTNEŘI A VYSTAVOVATELÉ

MEDIÁLNÍ PARTNER:



VYSTAVOVATELÉ:

AnimaLab s.r.o.

KRD - obchodní společnost s.r.o.

OLYMPUS CZECH GROUP, S.R.O., ČLEN KONCERNU

SCHOELLER INSTRUMENTS, s.r.o.

TRIGON PLUS s.r.o.

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

jménem pořadatele 97.Fyziologických dnů, kterým je Česká fyziologická společnost a Fyziologický ústav 1.lékařské fakulty UK si Vás dovoluji co nejsrdečněji pozvat do Prahy na tradiční setkání slovenských a českých fyziologů. Doufám, že po roční „covidové“ přestávce (v historii Fyziologických dnů zcela ojedinělé) si najdete čas i chuť se opět společně setkat a prožít v nově zrekonstruovaném Fyziologickém ústavu naší fakulty odborně přínosné a společensky příjemné chvíle.

Otomar Kittnar

ZÁKLADNÍ INFORMACE

POŘADATEL:

Fyziologický ústav 1. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy

ORGANIZAČNÍ VÝBOR:

prof. MUDr. Otomar Kittnar CSc.
prof. MUDr. Romana Šlamberová Ph.D.
doc. MUDr. Jakub Otáhal Ph.D.
doc. MUDr. Vladimír Riljak Ph.D.

VÝBOR FYZIOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI:

Předseda: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.
Místopředseda: prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Vědecký sekretář: prof. PharmDr. Alena Sumová, DSc.
Pokladník: doc. MUDr. Vladimír Riljak, Ph.D.

Členové:

prof. MUDr. Marie Nováková, Ph.D.
doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.
prof. MUDr. Romana Šlamberová, Ph.D.
prof. MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D.
prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc.

ORGANIZÁTOR:

Congress Prague, s.r.o.
www.congressprague.cz

ODBORNÝ PROGRAM

ÚTERÝ 8. ÚNORA

08:00	Registrace účastníků, občerstvení	
09:30	Slavnostní zahájení kongresu	45 min.
10:15	Purkyňova přednáška	45 min.
11:00	Pedagogická přednáška	30 min.
11:30	Focení	15 min.
11:45	Plenární schůze ČFS a SFS	30 min.
12:15	Oběd	

ODBORNÝ PROGRAM - HLAVNÍ POSLUCHÁRNA

13:30	Kardiovaskulární systém I Předsedající: Kamil Javorka, Otomar Kittnar	90 min.
	EKG parametre v celkovej anestéze u potkana Pavol Švorc	
	Změny EKG parametrů po absolvování terapie tmou Jan Strakoš	
	Kde se vzala terapie tmou? Vojtěch Jarkuliš	
	Dynamika změn srdeční variability po dlouhodobé expozici tmou (Chamber-REST) Pavol Švorc	
	Aktivácia PPARγ a Nrf2 popri antioxidantov, NOS, RXR u hypertenzie Ima Dovinová	
	Kardiovaskulárne zmeny počas fototerapie novorodencov Kamil Javorka	
15:00	Coffee break	30 min.
15:30	Kardiovaskulární systém II Předsedající: Marie Nováková, Jana Radošinská	75 min.
	Modulácia angiotenzínovej signalizácie u spontánne hypertenzných potkanov a jej dôsledky na oxidačný stav a vlastnosti erytrocytov. Jana Radošinská	
	Vlastnosti erytrocytov v monokrotalínovom modeli pľúcnej artériovej hypertenzie	

Intermitentný hypoxický preconditioning zlepšuje srdcovú kontraktilitu v antracyklínovej kardiomyopatii u potkanov

Peter Galis

Markery remodelácie srdca v animálnom modeli diabetes mellitus

Marta Kollárová

Vliv hormonální antikoncepcie na kardiovaskulární systém

Ondřej Pírek

ODBORNÝ PROGRAM - PARALELNÍ SÁL

13:30

Neurofyziologie I

90 min.

Předsedající: Jakub Otáhal, Jan Bakoš

Ovlivnění vzniku a vývoje experimentálního edému mozku

Methylprednisolonem

Petr Kozler

Dopad pandémie COVID-19 na duševné zdravie rodín s deťmi s poruchou autistického spektra alebo neurotypickými deťmi

Katarína Polónyiová

Zmeny synaptických proteínov v transgénnom modeli autizmu

Jan Bakoš

Optimalizace protokolu pro stanovení poškození hematoencefalické bariery u pacientů po ischemické cévní mozkové příhodě pomocí MRI

David Kala

Hodnocení buněčného energetického metabolismu mozkové kůry pomocí mikroskopického zobrazení doby dohasínání fluorescence NADH in vivo

Jakub Otáhal

Gastrointestinálna dysfunkcia a nutričná selektivita a ich korelácie s behaviorálnymi charakteristikami u detí a adolescentov s poruchami autistického spektra

Katarína Babinská

15:00

Coffee break

30 min.

15:30

Neurofyziologie II

75 min.

Předsedající: Romana Šlamberová, Peter Celec

**Depozice fluorescentních indikátorů v mozkové vaskulatuře:
in vivo studie dvoufotonové fluorescenční mikroskopie u myši**

Jan Svoboda

Intranasal oxytocin in a genetic animal model of autism

Jakub Szabó

Vplyv tDCS mozočka na sémantickú pamäť

Dominika Besterciová

**Poruchy spánku a hladiny 6-sulfatoxymelatonínu ako možné
prediktory adaptívneho, maladaptívneho správania a závažnosti
jadrových príznakov u detí s poruchami autistického spektra**

Kristína Bartakovičová

Změny ve statické perimetrii během procedury chamber rest

Alena Závadová

17:00 Konec vědeckého programu

18:00 Společenský večer

STŘEDA 9. ÚNORA

ODBORNÝ PROGRAM - HLAVNÍ POSLUCHÁRNA

09:00	Diskuse k Posterům	60 min.
10:00	Varia I Předsedající: Dalibor Kodrik, Andrea Štofková Obranné reakce hmyzího těla proti včelímu jedu a úloha adipokinetického hormonu v nich Jan Černý Extracelulární DNA v patogenéze reumatoidnej artritidy Kristína Macáková Porovnání citlivosti hepatomových linií HepG2 a HepaRG vůči lipotoxickému působení mastných kyselin Tumisang Maseko LAMP ako potenciálna diagnostická metóda infekčných chorôb Nadja Ivašková Extracelulární DNA v exozómech izolovaných z plazmy zdravých jedinců Kristína Lichá	75 min.
11:15	Coffee break	30 min.
11:45	Metabolismus I Předsedající: Andrea Čalkovská, Jitka Kuncová	75 min.

**Terapia ARDS modifikovaným prasacím surfaktantom
po aspirácii kyseliny HCl a následnom ventilátorom
indukovanom poškodení pľúc**

Pavol Mikolka

Pľúcny surfaktant v ére COVID-19

Andrea Čalkovská

**Mitochondriální dysfunkce kůry a dřeně ledvin subtotálně
nefrektomovaných potkanů**

Jitka Kuncová

**Účinek telmisartanu na nutričně navozenou nealkoholovou
steatohepatitidu u myší**

Otto Kučera

**Extracelulárna DNA v animálnych modeloch akútneho
zlyhania pečene**

Barbora Gromová

13:00

Oběd

60 min.

14:00

Neurofyziologie III

75 min.

Předsedající: Daniela Ostatníková, Jaromír Mysliveček

**Vplyv ovariektómie na správanie myší s mutáciou v shank3
géne - animálneho modelu autizmu**

Veronika Borbélyová

**Vývoj in vitro metod pro personalisovanou diagnostiku
epileptogenních mutací**

Šárka Danačíková

**Mechanismus vzniku kraniocerebrálního poranění
u chodců při srážce s tramvají**

Dita Hylmarová

**Změny pohybové aktivity u M4 myších knockoutů
po ovariektomii**

Kateřina Janišová

**Změny biologických rytmů muskarinových receptorů
m4 a m1 z hlediska řízení lokomoce**

Jaromír Mysliveček

15:15

Coffee break

30 min.

15:45

Varia II

75 min.

Předsedající: Richard Rokyta, Pavol Švorc

Neinvazívna in vivo detekcia zápalu čreva a ex vivo detekcia krvi v stolici myší pomocou luminolu ako diagnostického nástroja zápalových črevných ochorení

Paulína Belvončíková

Vplyv elektromagnetického poľa a miR-34a-5p na migráciu a génovú expresiu na bunkovú líniu kolorektálneho karcinómu DLD1

Soňa Jendrisková

Fyzická aktivita a energetický výdej českých těhotných a kojících žen

Miroslav Kovařík

Myoglobinémie a ngal u maratonských běžců po ultravytrvalostním výkonu

Jaroslav Novák

17:00

Slavnostní ukončení kongresu

Laboratorní přístroje a vybavení

Příprava, ochrana, kultivace, analýza a skladování vzorků
 Centrifugace, laminární a ochranné boxy, hypoxické a anaerovnní boxy, ohřev a kultivace,
 mrazicí a chladicí zařízení, readers a bioimaging, koncentrátoři a lyofilázátory, myčky,
 sterilizace, dekontaminace, autoklávy, spotřební materiál



BAKER



ThermoFisher
SCIENTIFIC



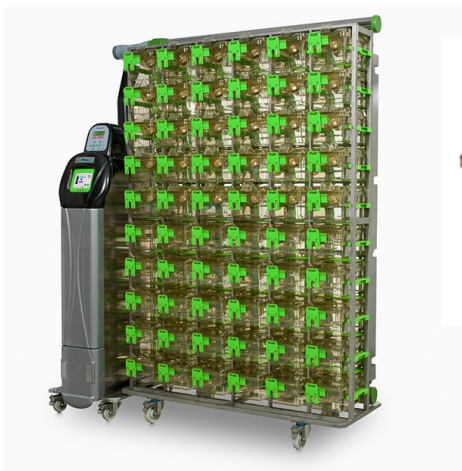
TECNIPLAST
Innovation through passion

Přístroje a vybavení pro laboratorní chovy

Bariérové technologie, IVC a konvenční chovy, analýza, mytí a dekontaminace, logistika,
 IVC technologie, izolátory, technologie pro chov ryb a obojživelníků, technologie
 simulace prostředí, analýza a digitální technologie chovů, metabolické a konvenční
 nádoby, přestýlací a laminární boxy, prokládací boxy, technologie pro welfare, myčky,
 dekontaminační komory, vzduchové sprchy



BAKER



TECNIPLAST
Innovation through passion

www.trigonplus.cz

prodej
aplikační podpora

autorizovaný
servis

validace
prevence

akreditovaná
kalibrační a zkušební
laboratoř

POSTEROVÁ SEKCE

1. Vplyv inhibítorov fosfodiesteráz na zápal a pľúcne funkcie pri experimentálnom poškodení pľúc

Petra Košťtová

2. Porovnanie zápalových a včasných fibrotických zmien v dvoch rôznych animálnych modeloch pľúcnej silikózy

Jana Adamčáková

3. Analýza t1 relaxačného času jako nástroj pro detekci myokardiální fibrózy u potkana

Marie Nováková

4. The role of oxidative stress in the healing of pressure ulcers

Marie Nováková

5. Efektivita fekálnej mikrobiálnej transplantácie (FMT) črevnej mikrobioty človeka myšiam

Aleksandra Tomova

6. Sledovanie ukazovateľov syndrómu bakteriálneho prerastania v tenkom čreve v súbore detí s poruchou autistického spektra

Dagmar Nemcsicsová

7. Vliv přírodní minerální vody Vincentka na zánětlivé onemocnění žaludku a duodena u laboratorního potkana

Ksenia Budinskaya

8. Expozícia svetlu počas noci narúša cirkadiánne regulovanú mobilitu leukocytov počas fyziologických podmienok aj zápalu u potkana

Viera Jerigová

9. Tlmené svetlo počas noci ovplyvňuje 24 - hodinový profil expresie vybraných proteínov v aorte potkana

Hana Šutovská

10. Ovlivní dlouhodobá absence světla kvalitativní a kvantitativní aspekty spánku u člověka? (Hypotéza)

Jana Cieslarová

11. Stimulácia pulzným svetlom aktivuje neurotrofické a neuroprotektívne funkcie müllerových buniek

Miloslav Zloh

12. Nervová aktivita tyčinek reguluje vstup imunitních buněk do sítnice prostřednictvím dopaminergní modulace hematoretinální bariéry

Andrea Štofková

13. Asociácia koncentrácie vitamínu D s mierou závažnosti príznakov porúch autistického spektra

Gabriela Repiská

14. Akútny účinok psychosociálneho stresu na úroveň salivárnych markerov oxidačného stresu u detí

Ivan Belica

15. Vplyv oxytocínu na endoplazmatické retikulum neuronálnych buniek

Tomáš Havránek

16. Vývinový vplyv oxytocínu na inhibičné neuróny bulbus olfactorius

Denisa Mihajl

17. Vplyv genetickej variability mozgového neurotrofického faktora na pamäť a učenie u človeka

Rastislav Rovný

18. Does paternal methamphetamine exposure affect locomotor activity of offspring?

Lýdia Mihalčíková

19. Early methamphetamine exposure along with altered environment affects neurotransmitters and oxidative stress levels in brain of laboratory rat

Barbora Čechová

20. Vliv stárnutí na mitochondriální respiraci různých orgánů potkana

Jan Jedlička

21. Testování potenciálních léčiv na celotělovém modelu anestezovaného morčete

Anna Bartáková

22. Regulace buněčné motility semaforiny a možnosti jejího farmakologického ovlivnění

Michaela Kripnerová

23. Neurobiológia nádorov v animálnych modeloch

Miroslav Tibenský

24. Optimization of different separation techniques from spiked blood for future sepsis diagnostics with 3rd generation sequencing

Michal Tamáš

25. Integrácia výučby klinického myslenia a rozhodovania do predmetu Fyziológia

Silvie Hnilicová

SBORNÍK ABSTRAKT

EKG PARAMETRE V CELKOVEJ ANESTÉZE U POTKANA

Švorc P

Ústav fyziológie, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, Slovenská republika

Ve špecifických in vivo kardiovaskulárnych, alebo toxikologických štúdiách sa sledujú zmeny v selektovaných elektrokardiografických (EKG) parametroch na posúdenie vzniku a vývoja porúch srdcového rytmu a to po rôznych zásahoch. Keďže každý EKG parameter má svoj diagnostický význam, zamerali sme sa na bežne hodnotené EKG parametre, ako je srdcová frekvencia, trvanie PR intervalu, trvanie vlny P, amplitúda vlny P, trvanie komplexu QRS, trvanie intervalu QT a QTc, amplitúda vlny R a amplitúda vlny T pri rôznych typoch celkovej anestézy na potkanoch. Štúdie, v ktorých sa robili kardiovaskulárne alebo toxikologické in vivo experimenty na potkanoch, boli získané z vyhľadávania prác publikovaných najmä v rokoch 2000 až 2021 v databáze Web of Science. Celkovo sa pri vyhľadávaní získalo 123 článkov. Parametre EKG, ktoré boli uvedené ako východiskové (baseline), alebo kontrolné hodnoty, sa zosumarizovali a vypočítala sa priemerná hodnota s príslušným rozsahom. V diskusnej časti mnohých in vivo štúdií sa výsledky porovnávajú už s predtým publikovanými zisteniami. Baseline, alebo kontrolné hodnoty EKG parametrov, ktoré sa spomínajú v samotných prácach, sú často udávané bez zohľadnenia typu anestézy použitej v experimentoch. Pri akútnych in vivo experimentoch sa taktiež často vôbec neberie do úvahy čas dňa, kedy sa experimenty vykonávajú, alebo adaptácia zvierat na cyklus svetla a tmy a pohlavie. Ak sa však EKG parametre považujú za dôležité indikátory arytmiogenézy a východzie hodnoty sú a priori rozdielne, tak to môže naznačovať rozdiel v elektrickej stabilite myokardu. Ak vezmeme do úvahy len najdôležitejšie prognostické parametre pre posúdenie tendencie k rozvoju porúch srdcového rytmu (HR, PR [PQ] a QT interval), môžeme konštatovať, že u samcov sú tieto parametre ovplyvnené celkovou anestézou. Ak prijmeme údaje uvádzané v telemetrických štúdiách ako referenčné hodnoty – napriek problematickej povahe tohto postupu – HR by bola mimo rozsahu pre ketamínovú/xylazínovú anestéziu (bradykardický účinok) a pre izoflurán a hraničná pre pentobarbitalovú anestéziu (tachykardický účinok). Interval PQ sa javí ako stabilný pri uvedených typoch anestézie s výnimkou ketamínovej/xylazínovej anestézie. Najväčšia variabilita bola zistená pri uretánovej anestézii. Ak akceptujeme hodnoty QT intervalu z telemetrických štúdií ako požadované referenčné hodnoty, potom trvanie QT intervalu (predĺženie) je mimo rozsahu pre anestézu pentobarbitalom, ketamínom/xylazínom, s najväčšou variabilitou pri anestéze izofluránom. Táto analýza naznačuje, že ketamínová/xylazínová anestéza nie je vhodným typom celkovej anestézie v in vivo experimentoch na potkanoch, keď sa hodnotia elektrokardiologické parametre. Preto, pri interpretácii výsledkov a v diskusiách o mechanizmoch, ktoré zakladajú daný typ arytmie, je dôležité byť opatrný, nakoľko už počiatočné parametre EKG môžu byť do určitej miery ovplyvnené celkovou anestézou, ako aj pohlavím a dennou dobou, kedy sa robili experimenty

ZMĚNY EKG PARAMETRŮ PO ABSOLVOVÁNÍ TERAPIE TMOU

Strakoš J, Jarkuliš V, Michalčák T, Skopelidou V, Zavadová A, Diomin E, Švorc P, Jr, Škrda D, Cieslarová J, Malůš M

Lékařská fakulta Ostravské univerzity, Ostrava, Česká republika

Úvod: Tato studie si kladla za cíl vyhodnotit efekt terapie tmou na EKG parametry vybraných probandů. Terapie tmou je považována za léčebnou metodu, jež je založena na pobytu v úplné tmě. Jejím účelem je zlepšit zdraví lidí žijících v neustálém stresu a z psychologického hlediska se rovněž jedná o metodu sebepoznání, kdy je jedinec mnohem intenzivněji konfrontován se svými vlastními myšlenkami. Kromě toho by tato metoda také mohla ovlivňovat celou řadu fyziologických funkcí, včetně elektrofyziologie myokardu.

Metodika: Do této prospektivní studie bylo zahrnuto 32 studentů ve věkovém rozmezí 19 až 26 let, umístěných na 96 hodin do speciální místnosti se 100 % absencí světla. Místo pobytu splňovalo podmínky pro pohodlí probandů a bylo umístěno na tichém místě. Pobyt v tmavé komoře vždy absolvovala pouze 1 osoba. Účastníci během pobytu dostávali jídlo a pití dle potřeby a nepoužívali žádné zařízení, které by vydávalo světlo anebo ukazovalo aktuální čas. Jednotlivá měření probíhala den před nástupem na pobyt, v den ukončení pobytu cca 30 minut po výstupu ze tmy a následně čtvrtý a sedmý den po pobytu. Mezi námi sledované parametry pak patřily intervaly PQ, QT a QTc (odečítané z II. končetinového svodu 12svodového EKG) spolu s tepovou frekvencí.

Výsledky: Důsledkem pobytu probanda v tmavé komoře je snižování tepové frekvence. QT interval byl signifikantně delší v den výstupu, ačkoli ke změnám QTc intervalů nedošlo.

Závěr: 96 hodin terapie tmou mělo vliv na tepovou frekvenci ve smyslu jejího snížení.

Tento efekt je žádoucí, jelikož vysoká tepová frekvence je rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění. Prodloužení QT intervalu je markerem pro vznik a vývoj možných komorových arytmií, nedošlo však k prodloužení QTc intervalu, což znamená, že terapie tmou nezvyšuje možnou predispozici pro vznik a vývoj komorových arytmií.

KDE SE VZALA TERAPIE TMOU?

Jarkuliš V, Michalčák T, Škrda D, Švorc P Jr.

Ústav fyziologie a patofyziologie, LF Ostravské univerzity, Ostrava

Terapie tmou (v originále „dunkeltherapie“) představuje jednu z technik omezené zevní stimulace, která skýtá slibný potenciál svého léčebného či terapeutického uplatnění. I přesto v našich podmínkách zatím nepronikla do hlubšího povědomí širší veřejnosti, stejně jako se jí prozatím nedostalo uznání ve vědeckých kruzích. Terapii tmou lze charakterizovat jako

preventivní a zároveň i léčebnou techniku založenou na pobytu v absolutní tmě, umožňující zlepšení lidského zdraví, zejména ve smyslu mírnění dopadů vystavení neustálému stresu. Metoda spočívá v cíleném pobytu v prostředí snížené vnější stimulace (tj. tma, ticho, samota), tzv. chamber REST (Restricted Environmental Stimulation). Výzkum této léčebné metody nasvědčuje tomu, že terapie tmou může mít příznivý dopad na symptomy a kvalitu života osob trpících autismem, může rovněž přispívat k redukci stresu u lidí s manickými stavy, Alzheimerovou chorobou či fobiemi a relapsy u těchto postižení. V souvislosti s poruchami emocí může terapie tmou zmírňovat deprese a stabilizovat nálady u bipolární poruchy, umožňující na psychiatrické úrovni snížení dávek antipsychotik. Rovněž se zkoumá uplatnění terapie tmou pro léčbu akutních manických stavů. Léčebný potenciál terapie tmou se může projevovat zejména v kombinaci s dalšími procedurami. Existují například důkazy o úspěšném použití terapie tmou jako pomocné techniky při odvykání závislostem, zejména kouření. Jako doplněk ke konvenčním metodám medicíny se tato technika využívá také při léčení chronopatologických poruch spočívajících ve snížené produkci či dysregulaci melatoninu (tj. insomnie, migrény, chronická únava). V současné době nejsou k dispozici studie popisující změny ve fyziologii kardiovaskulárního a autonomního nervového systému. Sdělení navazuje na témata mých kolegů z LF Ostravské univerzity.

DYNAMIKA ZMĚN SRDEČNÍ VARIABILITY PO DLOUHODOBÉ EXPOZICI TMOU (CHAMBER-REST)

Švorc P Jr¹, Strakoš J¹, Jarkuliš V¹, Michalčák T¹, Zavadová A¹, Škrda D¹, Cieslarová J², Malůš M², Diomin E¹, Skopelidou V¹

¹Ústav fyziologie a patofyziologie, Lékařská fakulta, Ostravská Univerzita, Ostrava, Česká republika

²Ústav psychologie, Filozofická fakulta, Ostravská Univerzita, Ostrava, Česká republika

Úvod: Terapie tmou je terapeutická, relaxační a meditační technika, jejíž hlavní podstatou je sensorická deprivace. Jiným označením je REST, neboli Restricted Environmental Stimulation, přičemž se v naší studii jednalo o metodu Chamber-REST, kdy sensorická deprivace není absolutní a člověk má zachované hmatové, chuťové, kinestatické a sluchové vjemy.

V průběhu řešení se projekt zaměřoval na sledování změn kardiovaskulárního, endokrinního, sensorického (zrak) a v našem případě autonomního nervového systému. Vliv sensorické deprivace na ANS, který představuje dynamický řídicí systém, který citlivě reaguje jak na vnitřní, tak i zevní podněty, byl sledován pomocí analýzy HRV (Heart Rate Variability). Jedná se o neinvazivní metodu, umožňující kvantifikovat autonomní regulace na kardiovaskulární systém a rovněž posoudit podíl obou jeho hlavních složek – sympatiku a parasympatiku. Cílem bylo sledování a evaluace změn srdeční variability, která odráží funkci ANS, po dlouhodobé expozici tmou pomocí metody Chamber-REST.

Metodika: Studie se zúčastnilo celkově 32 studentů ve věku od 19 do 26 let, kteří byli ubytovaní po dobu 96 hodin ve speciálně přizpůsobené místnosti, která splňovala podmínky. Samotná měření se prováděla pomocí přístroje DiANS PF8 před nástupem na pobyt (celkově 3 měření, jejichž výsledek byl zprůměrován), v den ukončení pobytu cca 30 minut po výstupu ze tmy a následně čtvrtý a sedmý den po pobytu. Pro měření se použil orto-klino-statický test a byly hodnoceny parametry power LF, power HF a LF/HF.

Výsledky: Power HF vykazoval signifikantní změnu mezi prvním a druhým měřením v horizontální poloze ($p \leq 0,05$), která měla přetrvávající déle trvající trend i během třetího a čtvrtého měření. Poměr mezi LF/HF poukazoval na modulační vliv jak sympatiku, tak i parasympatiku během ortostatického testu taktéž bez signifikance.

Závěr: Z výsledků studie je patrné, že se zvýšila především aktivita HF divize ANS, z čehož se dá usoudit, že procedura Chamber-REST s největší pravděpodobností měla pozitivní vliv na regulaci aktivity parasympatiku u sledovaných probandů.

Prezentující bude dvojice spoluautorů Skopelidou V. a Diomin E.

AKTIVÁCIA PPAR γ A NRF2 POPRI ANTIOXIDANTOV, NOS, RXR U HYPERTENZIE

Dovinová I¹, Kluknavský M¹, Macejová D², Brtko J², Bališ P¹, Barančík M¹

¹Centrum Experimentálnej Medicíny, SAV, Bratislava, Slovensko, ²Biomedicínske Centrum, SAV, Bratislava, Slovensko

Peroxizómovým proliferátorom aktivovaný receptor gama (PPAR γ) je jadrový receptor, ktorý sa podieľa na bunkovej signalizácii a slúži ako potenciálny cieľ pri liečbe metabolického syndrómu, kardiovaskulárnych chorôb a hypertenzie [1,2]. Aktivácia PPAR γ agonistami, ako je pioglitazón (PIO), je spojená s aktiváciou faktora 2 súvisiaceho s erytroidným jadrovým faktorom 2 (Nrf2), ktorý sa významne podieľa na regulácií génovej expresie antioxidantných a detoxikačných enzýmov v oxidačnom strese [3-5]. V našich experimentálnych štúdiách sme skúmali vplyv podávania PIO na vývoj hypertenzie, tvorbu superoxidu a génovú expresiu antioxidantných a detoxikačných enzýmov v obličkách mladých (5 -týždňových) a dospelých (12 -týždňových) samcov hranične hypertenzných (BHR) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR). Vývoj krvného tlaku bol detegovaný pletyzmografickou metódou.

Genomické účinky PIO boli stanovené qPCR metódou a sledovali sa zmeny expresie PPAR γ , Nrf2, superoxid dimutázy 1,2 a 3 (SOD1, SOD2, SOD3), endotelovej NO syntázy (eNOS), hemoxygenázy 1 (HO-1) a NAD(P)H chinón dehydrogenázy 1 (NQO-1). Aktivita NOS bola stanovená konverziou rádioaktívneho [3H]-L-arginínu na rádioaktívny [3H]-L-citrulín.

Aktivita SOD bola stanovená kolorimetrickou reakciou za pomoci UV-VIS spektrofotometrie. Tvorba superoxidu bola stanovená chemiluminiscenčnou reakciou s lucigenínom. Terapia prostredníctvom PPAR gama agonistu PIO (10 mg/kg/deň, po dobu 2 týždňov)

aktivovala Nrf2, zlepšila a znížila krvný tlak-syndróm hypertenzie zlepšuje zmeny v oxidačnom strese. Oddelenie NOS bolo vylepšené činnosťami NO-syntázy produkovanej terapeutickú modifikačnej biologickej dostupnosti produkcie NO, aktivity SOD a RXR v PPAR gama. Pri obličkovej signalizácii sme zistili väzby medzi PPAR gama a Nrf2 a antioxidačné reakcie SOD. PPAR gama, Nrf2 a SOD, NOS v BHR a SHR a aktivované detoxikačné výsledky RXR NQO1, HO-1, ktoré zlepšili mladý hypertenzívny BHR. V endoteli a v pravej srdcovej komore sa znížila produkcia superoxidu. Hlavné účinky na krvný tlak a NO-syntázy boli pozorované u vekovo závislého hypertenzného BHR s použitím PIO agonistu.

[1]. Kvandová M. et al. *Physiol Res* 2016, 65, Suppl. 3: S343-S363. [2]. Wu KL. Et al., *Hypertension* 2014, 64 (4), 815–824 [3]. Tain YL et al. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (1), 20. [4]. Barančík M. et al. *Physiol. Res.* 2016, 65, Suppl 1, S1–10. [5]. Dovinova I et al. *Physiol Res* 2020, 69, Suppl 4: S541-S553.

KARDIOVASKULÁRNE ZMENY POČAS FOTOTERAPIE NOVORODENCOV

Javorka K¹, Javorka M¹, Uhríková Z², Nandrážiová L², Czippelová B³, Maťašová K², Zibolen M².
¹Ústav fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Martin, Slovensko; ²Neonatologická klinika, JLF UK a Univerzitná nemocnica, Martin, Slovensko; ³BioMed JLF UK, Martin, Slovensko

Úvod: Fototerapia – liečba hyperbilirubinémie aplikáciou svetla určitej vlnovej dĺžky – patrí medzi najčastejšie terapeutické intervencie na novorodeneckých oddeleniach. Cieľom práce bolo zistiť zmeny kardiorespiračných parametrov vyvolané fototerapiou.

Metodika: Vyšetrených bolo celkovo 53 novorodencov s hyperbilirubinémiou s indikáciou fototerapie a 40 kontrolných detí s fyziologickými hodnotami bilirubinémie Charakteristiky novorodencov sa s výnimkou hladín bilirubínu od seba neodlišovali. Systémový tlak krvi (TK) a frekvenciu srdca (FS) sme registrovali ultrazvukovým tonometrom a elektromanometrom, resp. monitorom Carescape V100 Dinamap. Variabilita frekvencia srdca (VFS) bola registrovaná systémom VarCor PF6 a PF7 Neonat (DIMEA Olomouc) a hodnotená metódami časovej a frekvenčnej analýzy, resp. symbolickej dynamiky (hodnotenie indexu komplexity – NCI a normovaného indexu nepredpovedateľnosti – NUPI). Merala sa frekvencia dýchania, saturácia krvi kyslíkom (SpO₂), rektálna a kožná teplota. Pred a po ukončení fototerapie bola určená bilirubinémia, hodnoty PaO₂, PaCO₂ a acidobázickej rovnováhy.

Výsledky: TK (systolický, diastolický a stredný) počas fototerapie signifikantne klesal už počas 1. hodiny. Pretrvávajúci pokles TK bol potvrdený i 1 hodinu po prerušení fototerapie. Zvyšovanie frekvencie srdca boli zrkadlovým obrazom zmien TK. Počas fototerapie bol pokles celkovej VFS v dôsledku zníženia spektrálnych výkonov v nízkofrekvenčnom i vysokofrekvenčnom pásme. Metóda symbolickej dynamiky ukázala, že počas fototerapie je pri chronotropnej regulácii srdca posun sympatiko-vagovej

rovnováhy smerom k dominancii sympatika. Frekvencia dýchania bola počas fototerapie zvýšená, saturácia krvi kyslíkom, ako aj PaO₂, PaCO₂ a parametre acidobázickej rovnováhy sa nemenili. Počas fototerapie bolo štatisticky významné zvýšenie kožnej, ako aj rektálnej teploty. U detí kontrolnej skupiny nedochádzalo počas sledovania základných parametrov k ich významným zmenám.

Záver: Počas fototerapie novorodencov dochádza k zmenám kardiovaskulárnych parametrov, vrátane VFS poukazujúce na diskretný pokles aktivity parasympatika a/alebo vzostup aktivity sympatika. Frekvencia dýchania, ako aj kožná a rektálna teplota sú zvýšené pri nezmenenej saturácii krvi kyslíkom a acidobázickej rovnováhe. Predpokladáme, že tieto adaptačné zmeny sú dôkazom fungujúcej regulácie KVS novorodencov, môžu mať priaznivý efekt pri znižovaní hyperbilirubinémie fototerapiou (vazodilatácia kožného riečiska) a pomáhajú udržiavať homeostázu.

Bukovinská Z, et al. *Pediatrics*, (Bratisl.) 2012, 7(1): 23-27; 2. Javorka K, Zavorská L. *Česko-Slovenská Pediat.* 45 (4): 230-232, 1990; 3. Nandrážiová L, et al.: *Česko-Slovenská Pediat.* 74 (8): 449–457, 2019; 4. Uhríková Z, et al.: *Early Hum Dev*, 91:351-356, 2015.

MODULÁCIA ANGIOTENZÍNOVEJ SIGNALIZÁCIE U SPONTÁNNYCH HYPERTENZNÝCH POTKANOV A JEJ DÔSLEDKY NA OXIDAČNÝ STAV A VLASTNOSTI ERYTROCÝTOV

Jasenovec T¹, Radosinska D², Kollarova M¹, Balis P³, Bernatova I³, Zorad S⁴, Vrbjar N³, Cacanyiova S³, Radosinska J^{1,3}

¹Fyziologický ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, ²Imunologický ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, ³Centrum experimentálnej medicíny SAV, Bratislava, ⁴Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

Cieľ: Rôzne patológie (vrátane COVID-19) sú spojené s abnormalitami vlastností erytrocytov. Hypertenzia predstavuje nepriaznivý stav pre kvalitu erytrocytov a je najčastejším rizikovým faktorom u pacientov s COVID-19. Znížená dostupnosť angiotenzín konvertujúceho enzýmu 2 (ACE2), ktorá je typická pre týchto pacientov, môže ďalej zhoršovať kardiovaskulárne zdravie jedinca; jej dôsledky na vlastnosti erytrocytov však zatiaľ nie sú známe. Cieľom práce bolo preskúmať účinok inhibície ACE2 ako aj potenciálny priaznivý účinok ACE inhibítora zofenoprilu na oxidačný stav a erytrocyty u spontánne hypertenzných potkanov (SHR). Aktivita SOD bola stanovená kolorimetrickou reakciou za pomoci UV-VIS spektrofotometrie. Tvorba superoxidu bola stanovená chemiluminiscenčnou reakciou s lucigenínom. Terapiu prostredníctvom PPAR gama agonistu PIO (10 mg/kg/deň, po dobu 2 týždňov) Metódy: Inhibícia ACE2 bola indukovaná podávaním MLN-4760 v dávke 1 mg/kg/deň počas 2 týždňov. Podávanie zofenoprilu (10 mg/kg/deň) začalo po 4 dňoch ACE2 inhibície. Experimentálne zvieratá boli rozdelené do 4 skupín: kontrolné SHR, kontrolné SHR liečené zofenoprilom,

SHR s inhibíciou ACE2, SHR s inhibíciou ACE2 a liečené zofenoprilom. Markery oxidačného stresu (pomer GSH/GSSG), antioxidačného stavu (FRAP a TAC), karbonylového stresu (AGEs a fruktózamín), oxidácie proteínov (AOPP) a peroxidácie lipidov (TBARS) boli stanovené v krvnej plazme a v hemolyzáte erytrocytov použitím spektrofotometrie a spektrofluorometrie. Z parametrov erytrocytov sme sa zamerali na ich morfológiu, deformabilitu, osmotickú rezistenciu, produkciu oxidu dusnatého a enzýmovú kinetiku Na,K-ATPázy.

Výsledky a diskusia: Inhibícia ACE2 viedla k zhoršeniu morfológie a osmotickej rezistencie erytrocytov. Pomer GSH/GSSG sa v plazme zvýšil, čo môže predstavovať systémovú adaptačnú odpoveď na ACE2 inhibíciu u SHR. V hemolyzáte erytrocytov bol však tento pomer nižší a parameter FRAP vyšší, čo poukazuje na zhoršenie oxidačnej rovnováhy v intracelulárnom kompartmente. Podávanie zofenoprilu malo za následok neočakávané zvýšenie plazmatických hladín angiotenzínu II u kontrolných SHR ako aj u SHR s inhibíciou ACE2, ale viedlo k normalizácii osmotickej rezistencie u SHR s inhibíciou ACE2. Zofenopril zvýšil enzýmovú aktivitu Na,K-ATPázy v erytrocytových membránach u kontrolných SHR, nie však po inhibícii ACE2. Rozdielny účinok zofenoprilu u kontrolných a ACE2 inhibovaných SHR bol pozorovaný aj pri hematokrite a deformabilite erytrocytov. Z toho vyplýva, že liečba hypertenzie nemusí byť postačujúca v podmienkach inhibície ACE2.

VLASTNOSTI ERYTROCYTOV V MONOKROTALÍNOVOM MODELI PĽÚCNEJ ARTÉRIOVEJ HYPERTENZIE

Jasenovec T, Radosinska D, Balis P, Trubacova S, Paulis L, Vrbjar N, Kollarova M, Radosinska J
Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovensko

Úvod: Pľúcna artériová hypertenzia (PAH) je závažné ochorenie so zlou prognózou. Monokrotalín (MCT) predstavuje toxický alkaloid, ktorého jednorazové podanie spôsobuje u experimentálnych zvierat rozvinutie PAH. MCT je po podaní metabolizovaný v pečeni a erytrocytmi transportovaný do pľúc. V prostredí pľúcnych prekapilárnych arteriol a kapilár, kde sa MCT vplyvom zvýšenej saturácie krvi kyslíkom uvoľňuje z erytrocytov, nastáva poškodenie endotelových buniek, čo vedie k zvýšeniu vaskulárnej rezistencie, remodelácii ciev, zvýšeniu pulmonálneho tlaku a následne k zlyhaniu pravej komory srdca. Bosentan je antagonistom endotelínového receptora používaným pri liečbe PAH. Endotelín je silný vazokonstriktor a mitogén hladkého svalstva a jeho receptory majú dôležitú úlohu v patogenéze PAH. U pacientov s PAH dochádza k zhoršeniu viacerých parametrov erytrocytov ako napríklad ich deformability, agregability, či distribučnej šírky (RDW). Zmeny týchto, ale aj iných parametrov erytrocytov (produkcia oxidu dusnatého (NO), funkcia Na,K-ATPázy) však zatiaľ neboli popísané v MCT modeli PAH. Preto sme sa v našej štúdii zamerali na charakterizáciu parametrov erytrocytov v MCT modeli PAH

ako aj na možný vplyv liečby bosentanom.

Metódy: Pokus sme uskutočnili na 10 týždňových Wistar potkanoch (n = 30), ktoré sme rozdelili do troch skupín: 1. kontrolná skupina; 2. skupina so subkutánne podaným MCT (60 mg/kg); 3. skupina s podaným MCT a liečbou bosentanom (300mg/kg/deň).

Po 4 týždňoch sme potkany usmrtili a odobrali krv na analýzu. Deformabilitu erytrocytov sme stanovili filtračnou metódou, produkciu NO pomocou fluorescenčnej sondy DAF-2 DA, funkciu NA, K-ATPázy sme hodnotili pomocou kinetických meraní. Parametre oxidačného stavu v plazme a osmotickú rezistenciu erytrocytov sme merali spektrometricky/spektrofluorometricky.

Výsledky: Podanie MCT viedlo u experimentálnych zvierat k zníženiu hematokritu (p = 0,02). Deformabilita erytrocytov sa po liečbe bosentanom u potkanov vystavených MCT zvýšila (p = 0,024). Podávanie MCT viedlo k zvýšeniu počtu aktívnych molekúl Na,K-ATPázy v membránach erytrocytov, avšak k zhoršeniu väzobných vlastností Na,K-ATPázy pre Na⁺. V porovnaní s MCT skupinou, liečba bosentanom signifikantne znížila hladinu pokročilých produktov oxidácie bielkovín - AOPP (p = 0,025) a fruktozamínu (p < 0,0001) a vplyvom liečby nastalo zvýšenie pomeru redukovaného a oxidovaného glutatiónu - GSH/GSSG (p = 0,037). Nepozorovali sme zmeny medzi skupinami v nasledujúcich parametroch: AGEs (pokročilé produkty glykácie), TBARS (markery peroxidácie lipidov), FRAP (schopnosť plazmy redukovať železité anióny), TAC (celková antioxidačná kapacita plazmy), počet erytrocytov, RDW-SD, MCV (priemerný objem erytrocytu), osmotická rezistencia erytrocytov a produkcia NO erytrocytmi.

Záver: Naše výsledky ukazujú, že v rámci pozorovaných erytrocytových parametrov má podanie MCT priamy vplyv iba funkciu Na,K-ATPázy. Podanie MCT zhoršilo väzobnú vlastnosť Na,K-ATPázy pre Na⁺, čo pravdepodobne viedlo ku kompenzačnému zvýšeniu počtu aktívnych molekúl tohto enzýmu. Liečba bosentanom viedla k zlepšeniu deformability erytrocytov u zvierat, ktorým bol podaný MCT. Tento efekt je s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobený antioxidačným účinkom bosentanu. Štyri týždne po podaní MCT sa väčšina skúmaných vlastností erytrocytov významne nezhoršila, čo sa nezhoduje s nálezmi u pacientov s PAH.

INTERMITENTNÝ HYPOXICKÝ PRECONDITIONING ZLEPŠUJE SRDCOVÚ KONTRAKTILITU V ANTRACYKLÍNOVEJ KARDIOMYOPATII U POTKANOV

Galis, P¹, Bartošová, L¹, Szobi, A¹, Farkašová, V², Kováčová, D³, Duriš-Adameová A¹, Rajtík, T¹

¹Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

²Ústav pre výskum srdca SAV, Bratislava

³Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta UK, Bratislava

Úvod: Intermitentný hypoxický preconditioning (IHP) je dobre popísaná kardioprotektívna procedúra v modeloch I/R poškodenia. Je schopná zmierňovať znaky narušenej kontraktility rôznymi komplexnými mechanizmami, ako sú nadexpresia HIF-1- α alebo

TRPV-mediovaná vazodilatácia a normalizácia aktivity Ca²⁺-dependentnej ATPázy sarko/endoplazmatického retikula 2a (SERCA2a) vedúca k zlepšeniu kontraktility. V modeloch srdcového zlyhávania je význam IHP doposiaľ nejasný, avšak antracyklínová kardiomyopatia je známa downreguláciou Ca²⁺ a preto vplyv IHP na Ca²⁺ homeostázu prostredníctvom TRPV-SERCA2a osi môže byť potenciálnym terapeutickým cieľom v tejto patológii.

Metódy: V našom experimente sme použili dospelé samce potkanov Wistar. Antracyklínová kardiomyopatia (skupina DOX) bola vyvolaná i.p. podávaním 4 mg/kg doxorubicínu počas 4 týždňov (kumulatívne 16 mg/kg). Kontrolnej skupine (C) bolo i.p. podávané vehikulum (roztok NaCl). Liečená skupina bola počas 2 týždňov pred podávaním doxorubicínu vystavená intermitentnej hypoxii (skupina IHP). Na sledovanie srdcových parametrov sa použila echokardiografia. Na konci experimentu boli zvieratá usmrtené v celkovej anestézii. Na vypreparovaných srdciach bola vykonaná imunoblotová analýza vybraných proteínov. Výsledky: IHP dokázal úspešne napraviť znížený srdcový výdaj spôsobený DOX. Potkany v DOX skupine mali zníženú expresiu TRPV iónových kanálov a zníženú aktiváciu CaMKII stanovenú ako expresia jej fosforylovanej pThr286 formy, teda náznak k poklesu intracelulárneho Ca²⁺. IHP na tieto expresie nemal žiaden vplyv. IHP napriek tomu zvyšoval expresiu dôležitej Ca²⁺ regulujúcej ATP-ázy SERCA2a, ku ktorej došlo aj bez vplyvu na expresiu HIF-1- α .

Záver: Význam HIF-1- α a TRPV kanálov v kardioprotekcii mediovanej IHP sme v tomto experimente na úrovni ich expresí nepozorovali. Uvažujeme, že zlepšenie srdcového výdaja v modeli DOX kardiomyopatie prostredníctvom IHP mohlo byť spôsobené zvýšením expresie SERCA2a. Tieto výsledky prinášajú možný význam IHP v antracyklínovej kardiomyopatii, ale potenciálne aj v iných modeloch srdcového zlyhávania.

Kľúčové slová: antracyklínová kardiomyopatia, hypoxia, preconditioning, kardioprotekcia

Podakovanie: VEGA 1/0775/21, APVV-15-607, FaF UK/13/2021

MARKERY REMODELÁCIE SRDCA V ANIMÁLNOH MODELH DIABETES MELLITUS

Kollárová M¹, Chomová M², Tóthová L³, Radošinská J^{1,4}

¹ Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovensko

² Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovensko

³ Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovensko

⁴ Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovensko

Cieľ: Kardio-vaskulárne komplikácie sú u pacientov s diabetes mellitus (DM) najčastejšou príčinou ich morbidity a mortality. V patogenéze DM sa zúčastňujú aj matrixové

metaloproteinázy (MMP), ktoré predstavujú rodinu multifunkčných proteolytických enzýmov. MMP sú skúmané ako možné prediktory vývoja kardio-vaskulárnych ochorení, najmä remodelácie srdca po infarkte myokardu a pri srdcovom zlyhávaní. V našej štúdii sme sa zamerali na MMP-2 a MMP-9, ktoré patria do skupiny želatináz, keďže zatiaľ nie je známe, ako sa menia ich aktivity v závislosti od štádia DM. Pri zvýšenom oxidačnom strese sa MMP dokážu aktivovať priamo, preto sme sledovali aj vybrané parametre oxidačného stresu a antioxidačnej kapacity.

Metódy: Pracovali sme s plazmou a homogenátmi pravej a ľavej srdcovej komory 38-týždňových potkanov. Zvieratá boli rozdelené do 4 skupín: Zucker Diabetic Fatty s hyperglykémiou (DIA), Zucker Diabetic Fatty bez hyperglykémie (FAT), Zucker Lean (chudá kontrola) a Wistar (absolútna kontrola). Aktivitu MMP-2 a MMP-9 sme stanovili elektroforetickou metódou želatínovej zymografie. Parametre oxidačného stresu a antioxidačného stavu sme stanovili spektrofotometrickými a fluorescenčnými metódami. **Výsledky:** U Zucker Lean bola v plazme aktivita MMP-2 vyššia ($p=0,0193$) a aktivita MMP-9 nižšia ($p<0,0001$) v porovnaní s DIA. Zucker Lean mali tiež vyššiu aktivitu MMP-2 ($p<0,0001$) v porovnaní s FAT. Porovnaním DIA s FAT sme zistili signifikantne nižšie aktivity MMP-2 ($p=0,0062$) aj MMP-9 ($p<0,0001$) v skupine FAT. Aktivita MMP-2 v ľavej srdcovej komore bola vyššia u DIA ($p=0,019$) aj u FAT ($p=0,008$) v porovnaní s Zucker Lean. Skupina Zucker Lean mala vyššie aktivity MMP-2 v srdci v porovnaní s absolútnou kontrolou Wistar ($p=0,035$). Aktivita MMP-2 v pravej komore bola vyššia u Zucker Lean v porovnaní s Wistar ($p=0,049$). Aktivita MMP-9 nebola v srdcových komorách detegovateľná. AOPP, fruktozamín a TBARs vykazovali v skupinách FAT a DIA signifikantne vyššie hodnoty v porovnaní s kontrolnými skupinami. TBARs boli signifikantne vyššie v skupine FAT v porovnaní s DIA a fruktozamín naopak, signifikantne nižší v skupine FAT v porovnaní s DIA. Produkty oxidačného poškodenia vykazovali zvýšené koncentrácie v skupine FAT aj DIA.

Záver: Naša práca monitoruje rozdielnu aktiváciu MMP-2 a MMP-9 v animálnom modeli DM v závislosti od klinickej závažnosti. Obézne potkany s genetickou záťažou DM, u ktorých sa ešte nerozvinula hyperglykémia, majú nižšiu plazmatickú aktivitu MMP-2 a MMP-9 v porovnaní s hyperglykemickými. Zistili sme, že u Zucker Lean je aktivácia MMP-2 v ľavej komore vyššia v porovnaní s Wistar. Zvýšená aktivita srdcovej MMP-2 poukazuje na remodeláciu ľavej komory u obéznych aj hyperglykemických zvierat. Získané poznatky by mohli pomôcť k poznaniu úlohy MMP ako v patogenéze, tak aj v rozvoji komplikácií DM typu 2.

Tento výskum bol čiastočne podporený z grantov VEGA 1/0314/19 a UK/78/2021.

VLIV HORMONÁLNÍ ANTIKONCEPCE NA KARDIOVASKULÁRNÍ SYSTÉM

Pírek O, Budinskaya K, Nováková Z

Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika

Úvod: Perorální antikoncepci pravidelně užívá přes 150 milionů žen, což ji řadí mezi nejpoužívanější antikoncepční prostředky na světě. Přestože současná generace těchto léků obsahuje pouze minimální dávky hormonů, jejich užívání má negativní vliv na kardiovaskulární systém – je rizikovým faktorem pro vznik hypertenze, může vést ke vzniku žilních trombóz a zároveň zvyšuje tuhost tepen.

„Zlatým standardem“ pro určení tepenné tuhosti je měření rychlosti pulzové vlny pomocí aplanační tonometrie, v současnosti lze ke stanovení tepenné tuhosti využít také přístroj VaSera. Cílem této studie bylo odhalit změny parametrů kardiovaskulárního systému, ke kterým by mohlo dojít u žen užívajících perorální antikoncepci.

Metody: Studie se zúčastnilo 24 žen, které byly rozděleny do dvou skupin – do skupiny žen užívajících antikoncepci A (14 žen; věk: $20,6 \pm 1,3$ let; BMI: $20,16 \pm 1,46$ kg/m²) a do kontrolní skupiny N (10 žen; $21,4 \pm 1,5$ let; $22,08 \pm 3,05$ kg/m²). V rámci obou skupin byly ženy rozděleny dle fáze menstruačního cyklu v době měření. Všechny ženy v antikoncepční skupině užívaly monofázickou kombinovanou hormonální antikoncepci. K určení parametrů kardiovaskulárního systému byly použity přístroje SphygmoCor (AtCor Medical, Austrálie) a VaSera (Fukuda Denshi, Japonsko). Systolický (SBP) a diastolický tlak krve (DBP) byl každé z účastnic změřen pomocí přístroje VaSera. Dále byl pomocí přístroje VaSera změřen Ankle brachial index (ABI) a Cardio-ankle vascular index (CAVI) na obou polovinách těla. Přístroj SphygmoCor byl využit k určení karotido-radiální rychlosti pulzové vlny (crPWV), augmentačního tlaku (AP), augmentačního indexu (AI) a subendocardial viability indexu (SVI) vždy na dominantní polovině těla. Ke statistické analýze dat byl využit software Statistica 13.5.

Výsledky: Všechny sledované parametry se u obou skupin respondentek nacházely ve fyziologickém rozmezí. Statisticky významný rozdíl mezi antikoncepční a kontrolní skupinou jsme zjistili u následujících parametrů: DBP ($74,7 \pm 5,1$ mmHg vs. $62,8 \pm 8,1$ mmHg; $p < 0,01$), SVI ($159,0 \pm 13,1$ % vs. $179,0 \pm 13,8$ %; $p < 0,01$), crPWV ($7,1 \pm 0,8$ m/s vs. $6,5 \pm 0,7$ m/s; $p < 0,05$). Rozdíly ostatních měřených parametrů (CAVI, ABI, SBP, AP, AI) mezi skupinami nebyly statisticky významné.

Závěr: Navzdory řádově nižší koncentraci estrogenů v současné perorální antikoncepci (oproti dřívějším generacím) se ukazuje její možné negativní působení na kardiovaskulární systém. Parametry ovlivněné převážně stavem periferních tepen (crPWV, DBP) jsou u antikoncepční skupiny v porovnání s kontrolní skupinou významně zvýšeny, což svědčí pro jejich zvýšenou tuhost. Naše výsledky tak ukazují, že užívání perorální antikoncepce má vliv převážně na funkci periferní části kardiovaskulárního systému. Zároveň jsme našli u antikoncepční skupiny i významně snížený parametr SVI, který popisuje kvalitu zásobení myokardu kyslíkem, což svědčí o ovlivnění také centrální části kardiovaskulárního systému.

Poděkování: Tato studie vznikla v rámci projektu Specifického výzkumu Masarykovy Univerzity “Od buňky k medicíně“ MUNI/A/1133/2021 a v rámci programu P-Pool.

OVLIVNĚNÍ VZNIKU A VÝVOJE EXPERIMENTÁLNÍHO EDÉMU MOZKU METHYLPREDNISOLONEM

Kozler P, Marešová D, Pokorný J
Fyziologický ústav 1. LF UK, Praha, Česká republika

Cíl: Edém mozku není onemocnění, ale závažný klinický symptom. Působí zvětšení objemu mozku a nezřídka fatální intrakraniální hypertenzi. Současná klasifikace edému mozku rozlišuje dva druhy – cytotoxický a vazogenní a tři typy – jeden celulární (cytotoxický) a dva extracelulární (iontový a vazogenní). Preklinický výzkumu má najít metodu, která by zabránila vzniku nebo rozvoji edému mozku v jeho počátku. Za tímto účelem dlouhodobě testujeme účinek methylprednisolonu (MP) v experimentálních modelech edému mozku na laboratorních potkanech. Cílem sdělení je prezentace současné klasifikace edému mozku a výsledků našeho preklinického výzkumu s použitím kontinuálního monitorování intrakraniálního tlaku (ICP) a zobrazení edému mozku magnetickou rezonancí (MRI).

Metody: K neuroprotekcí je využita především antioxidační schopnost MP, která zasahuje do patogenního procesu v nervových buňkách na různých úrovních, od lipidových membrán po řadu buněčných systémů. Pro svou vysokou molekulovou hmotnost ($MW > 50$ kDa), neproniká MP za fyziologickým podmínek intaktní hematoencefalickou bariérou (HEB), proto aplikujeme MP při otevřené HEB (po indukci edému). Načasování aplikace je určeno farmakokinetikou MP – poločas vyloučení 1,8 až 5,2 hodiny. Účinná dávka MP je podle rešerše dosud publikovaných výsledků 30–105 mg/kg.

K indukci experimentálního extracelulárního edému mozku užíváme metodu osmotického otevření HEB (20 % manitol = 200 g ad 1000 ml aqua pro injectione, 1098 mosml/l, dávka 5 ml/kg, rychlost 0,12 ml/sec, aplikace selektivně do vnitřní karotické tepny na krku), pro navození experimentálního celulárního edému mozku užíváme metodu intoxikace vodou – WI (destilovaná voda – DV, celková dávka = 20% hmotnosti zvířete + 0.032 mg / kg desmopressinu – blokuje vylučování vody ledvinami a navozuje diluční hyponatremii, aplikace intraperitoneálně – i.p. ve třech dílčích dávkách/24 hodin). Kontinuální monitorování ICP (soubor 40 potkanů po osmi v každé skupině) po dobu jedné hodiny s použitím fiberoptického systému s mikrosnímačem zavedeným subdurálně frontálně u spontánně dýchajících potkanů v inhalační anestezii. Počítačový software systému stanovil průměrné hodnoty ICP ve skupině zdravých potkanů, u potkanů s indukovaným edémem intoxikací vodou a u dalších skupin s rozdílným způsobem podání MP. V MRI studii byly stanoveny průměrné hodnoty ADC (apparent diffusion coefficient) v mozkové kůře a hippokampu (soubor 32 potkanů po osmi v každé skupině). Měření proběhlo u skupiny kontrolní a dále 24 hodin po dokončení intoxikace vodou u skupiny s indukovaným edémem a u dalších skupin s rozdílným způsobem podání MP.

Výsledky: Průměrné hodnoty ICP (mmHg \pm SEM) u osmi potkanů v jednotlivých skupinách: kontrolní skupina 4.62 \pm 1.24, skupina s indukovaným edémem 14.25 \pm 2.12 - signifikantně vyšší ICP ($p < 0.1$), značící poruchu tlakově objemové homeostázy, MP v dávce 100mg/kg byl aplikován frakcionovaně spolu s aplikací DV (5.52 \pm 1.32) nebo jednorázově po dokončení intoxikace vodou (6.23 \pm 0.73) - obě hodnoty jsou signifikantně nižší, než hodnota ICP u skupiny s edémem ($p < 0.1$) značící obnovu tlakově objemové homeostázy. Průměrné hodnoty ADC (10-6 mm²/s \pm SEM) u osmi potkanů v jednotlivých skupinách: kontrolní skupina 754 \pm 46, skupina s indukovaným edémem 793 \pm 44 - signifikantně vyšší ADC ($p < 0.05$) značící extracelulární edém, skupina s MP v dávce 100 mg/kg aplikovaným i.p. 759 \pm 50 - signifikantně nižší ($p < 0.05$) značící menší edém, skupina s MP v dávce 50 mg/kg aplikovaným do vnitřní karotické tepny 730 \pm 48 - signifikantně nižší ($p < 0.05$) značící menší edém. Závěry: V experimentálních modelech byla schopnost MP ovlivňovat procesy lipidových membrán a řady buněčných systémů využita. Dokumentovaný neuroprotektivní efekt MP je o to významnější, že byl dosažen v čistě experimentálních modelech celulárního a extracelulárního edému indukovaného intoxikací vodou, respektive osmotickým otevřením HEB bez spoluúčasti jiného patologického stavu, například experimentálního modelu ischemie či úrazu.

DOPAD PANDÉMIE COVID-19 NA DUŠEVNÉ ZDRAVIE RODÍN S DEŤMI S PORUCHOU AUTISTICKÉHO SPEKTRA ALEBO NEUROTYPICKÝMI DEŤMI

Polónyiová, K, Belica, I, Celušáková, H, Janšáková, K, Kopčíková M, Rašková R, Szapuová Ž, Ostatníková D

Akademické centrum výskumu autizmu, Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovenská republika a Výskumný ústav detskej psychológie a patopsychológie, Bratislava, Slovenská republika

Cieľom nášho výskumu je dlhodobu sledovať dopad pandémie COVID-19 na duševné zdravie slovenských rodín s deťmi s poruchou autistického spektra (PAS) a rodín s neurotypickými deťmi. Zamerali sme sa predovšetkým na prevalenciu depresie, úzkosti a stresu u rodičov a maladaptívneho správania a spánkových problémov ich detí. Zber dát prebiehal formou online dotazníka a našu výskumnú vzorku tvorilo 332 rodičov, z ktorých 155 má dieťa s PAS, 179 rodičov bolo oslovených počas prvej vlny a 153 počas druhej vlny pandémie COVID-19. Už počas prvej vlny sme zistili zvýšenú úzkosť u rodičov detí s PAS. Počas druhej vlny stúpla miera prežívanej úzkosti, depresie a stresu u rodičov z oboch skupín, avšak významne viac u rodičov detí s PAS. Taktiež medzi prvou a druhou vlnou významne stúplo internalizované maladaptívne správanie detí s PAS. Prejav depresie, úzkosti a stresu rodičov pozitívne korelovali s maladaptívnym správaním autistických ako aj neurotypických detí, čo naznačuje potrebu terapeutických intervencií pre celé rodiny. Prezentované budú tiež predbežné

výsledky získané počas aktuálne prebiehajúcej 3. vlny.

Práca bola podporená grantmi APVV 15-0045, APVV 15-0085, APVV-20-0070, APVV 20-0139.

ZMENY SYNAPTICKÝCH PROTEÍNOV V TRANSGÉNNOM MODELÍ AUTIZMU

Bakoš ^{J^{1,2}}, Bukatová ^{S¹}, Reichová ^{A¹}, Melíšková ^{V^{1,2}}, Mihalj ^{D¹}, Mravec ^{B^{1,2}}, Ostatníková ^{D²}, Bačová ^{Z¹},

¹Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum, SAV, Bratislava, Slovensko

²Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko

Zmeny rovnováhy excitačnej a inhibičnej neurotransmisie predovšetkým v skorých štádiách vývinu mozgu sú považované za súčasť patofyziológie autizmu. V posledných rokoch viaceré štúdie preukázali, že synaptické abnormality pozorované v experimentálnych modeloch autizmu, súvisia s deficitmi v hladinách a interakcii cytoskeletových a skafoldových proteínov. V našich predchádzajúcich aj súčasných štúdiách sa snažíme s použitím transgénnych „SH3 and multiple Ankyrin repeat domains 3“ (Shank3) deficientných myší, ktoré vykazujú behaviorálnu symptomatológiu porúch autistického spektra, o poskytnutie celkového obrazu o vývinových mechanizmoch zmien excitačnej a inhibičnej neurotransmisie. Preukázali sme výrazné regionálne rozdiely v mozgových oblastiach v expresii excitačných glutamátergických markerov a postsynaptických skafoldových proteínov u mláďat aj dospelých Shank3 deficientných myší. Pozorovali sme zníženie expresie inhibičných GABAergických markerov a podjednotiek GABA receptorov v mozgu Shank3 deficientných myší. Ďalšie analýzy poukazujú na nižšie hladiny GABAergických markerov v dopamínergických oblastiach mozgu dospelých transgénnych myší. Potvrdili sme, že deficit v Shank3 je sprevádzaný abnormalitami v počte a dĺžke neuritov hipokampálnych neurónov. Tranzientný silencing expresie Shank3 génu viedol k zníženiu hladín niektorých adhézných synaptických proteínov (neurexínov, neuroligínov). Tieto výsledky naznačujú, že abnormality v Shank3 vedú k nerovnováhe štruktúrnych proteínov podieľajúcich sa na tvorbe excitačných aj inhibičných synapsií. Patofyziologické zmeny inhibičnej neurotransmisie v dopamínergických oblastiach mozgu je potrebné brať do úvahy pri vysvetľovaní etiológie porúch autistického spektra. Práca bola podporená grantami APVV-15-0205, APVV-20-0114, VEGA 2/0155/20, VEGA 2/0148/21

OPTIMALIZACE PROTOKOLU PRO STANOVENÍ POŠKOZENÍ HEMATOENCEFALICKÉ BARIERY U PACIENTŮ PO ISCHEMICKÉ CÉVNÍ MOZKOVÉ PŘÍHODĚ POMOCÍ MRI

*Kala D, Svoboda J, Prysiazniuk Y, Šulc V, Olšerová A, Šanda J, Tomek A, Kynčl M, Otáhal J
Fyziologický ústav AVČR, Praha, Česká republika Fakulta elektrotechniky ČVUT v Praze,
Praha, Česká republika Fakultní nemocnice v Motole, Praha, Česká republika*

Úvod: Cévní mozková příhoda (CMP) je třetí nejčastější příčinou smrti a významným socioekonomickým břemenem celosvětově. Poškození hematoencefalické bariéry (HEB) je častý patofyziologický jev související s CMP a ačkoliv je intenzivně studován u lidí i pomocí zvířecích modelů, časový profil především v delších časových bodech je nejasný. Integritu HEB lze určit pomocí magnetické resonance (MRI), kdy je pacient snímán před a po, popřípadě v průběhu, intravenózního podání kontrastní látky. Kontrastní látka zůstává v případě zdravé HEB zcela uvnitř cévního řečiště. Naopak při poškození HEB proniká kontrastní látka do mozku, kdy míra tohoto pronikání odpovídá míře poškození HEB. Pro měření integrity HEB pomocí MRI se využívá celá řada metod. Běžné před-po kontrastní metody a analýza pomocí farmakokinetického modelování zachycují rychlý přechod kontrastní látky přes HEB. Nejnovější studie však ukazují opožděné pronikání kontrastní látky, které tyto metody rutině nezachytí. Z toho důvodu byly navrženy novější metody pokrývající delší časové okno od podání kontrastní látky. Tyto metody však vyžadují delší čas měření a v kombinaci s již zavedenými metodami se celkový čas strávený v magnetické rezonanci stává příliš dlouhý a je pacienty obvykle obtížně snášen. Cílem této práce bylo implementovat dostupné metody do běžné klinické praxe ve fakultní nemocnici v Motole, porovnat jejich výsledky a přínosnost pro pacienty po CMP a následně vybrat optimální kombinaci metod pro dosažení co nejvyšší klinické informace o stavu HEB za cenu únosného času měření.

Metody: Pro účely objasnění vlivu poškození HEB po CMP jsme vytvořili speciální MRI protokol obsahující citlivé strukturální, difúzní a kontrastní sekvence. K určení integrity HEB byly použity MRI sekvence s podáním kontrastní látky. Kromě sekvencí detekujících rychlou dynamiku přestupu kontrastní látky přes HEB za pomoci farmakokinetického modelování a běžných kontrastních sekvencí založených na diferencii před a po-kontrastních snímků byly zařazeny nové sekvence monitorující déle trvající přestup přes HEB. Navrženým protokolem bylo vyšetřeno pět pacientů po CMP. Každý z nich podstoupil měření ve třech časových bodech (16-48 hod, 6-8 den a 12-15 den po výskytu CMP).

Výsledky: U pěti pacientů po CMP bylo naměřeno spektrum různých MRI protokolů určených pro stanovení poškození HEB a to ve třech časových bodech, během nichž byl zachycený vývoj sledovaného poškození. V rámci tohoto datasetu byly zdokumentovány rozdíly mezi použitými metodami a byl navržen optimální protokol. Poděkování: Práce byla financována z projektů Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky NU21-08-00228 and NU21-02-00289. Další podpora byla v rámci projektu LM2018129 Czech-Biolmaging.

Speciální poděkování patří laborantům Veronice Borovcové a Janu Brhelovi za skvělou technickou podporu.

HODNOCENÍ BUNĚČNÉHO ENERGETICKÉHO METABOLIZMU MOZKOVÉ KŮRY POMOCÍ MIKROSKOPICKÉHO ZOBRAZENÍ DOBY DOHASÍNÁNÍ FLUORESCENCE NADH IN VIVO

*Otáhal J, Svoboda J, Kala D, Danačíková Š, Vondrášek D, Hadraba D
Fyziologický ústav AVČR, Vídeňská 1083, 142 20, Praha 4*

Mozková kůra vyžaduje pro svoji správnou funkci kontinuální přísun krve, která přináší dostatečné množství energetických substrátů a kyslík. Substráty jsou transportovány přes hematoencefalickou bariéru do gliových a nervových buněk, kde probíhá jejich další zpracování. Podle teorie glukozo-laktátového člunku (shuttle) gliové buňky preferují cytoplazmatickou glykolytickou cestu, zatímco neurony mitochondriální aerobní fosforylaci. V průběhu rozvoje řady neurologických onemocnění dochází k postupné alteraci energetického metabolismu, které se projevují změnou poměru glykolýzy a fosforylace. Redukovaný kofaktor NAD(P)H se v buňce vyskytuje buď ve volném stavu (free NAD(P)H) anebo je vázaný na buněčné bílkoviny (bound NAD(P)H). Právě poměr vázaného a volného NAD(P)H umožňuje zhodnotit energetický metabolismus. Vzhledem k tomu, že NADH a NADPH ve volné i vázané formě vykazuje stejné fluorescenční emisní spektrum, je značně obtížné běžnou intenzitní fluorescencí tyto stavy molekul odlišit. Interakce NAD(P)H s bílkovinami však vede k ovlivnění elektronů dvojných vazeb a změní se dohasínání fluorescence po pulsním osvětlení molekuly. Cílem práce bylo zavést in vivo metodu mikroskopického zobrazení doby dohasínání fluorescence (FLIM) NADH v mozkové kůře u anestetizovaných myší. Dvoufotonový mikroskop Bruker Ultima s 80MHz laserem Chameleon Discovery TPC (Coherent), detektorem H10770PB-40 (Hamamatsu) a modulem FLIM SPC-150 TCSPC Becker&Hickl byl odladěn pomocí série experimentů se standardy NADH. Dále byl využit kumarin, který vykazuje na koncentraci nezávislou mono-exponenciální charakteristiku dohasínání fluorescence a lze jej proto využít pro kalibraci systému. Samotné in vivo experimenty byly provedeny na anestetizovaných myších C57/Bl6 s chronickým kraniálním oknem implantovaným nad senzomotorickou kůrou. Naměřená data byla hodnocena v programu FLIMfit 5.1.1. pomocí bi-exponenciálního fitu a zároveň pomocí fázorového grafu. Výsledky ukazují, že tato metoda je vhodná pro hodnocení energetického metabolismu mozkové kůry až do hloubky 500 μ m od povrchu mozku.

Poděkování: Práce byla podpořena projekty GAČR 22-28265S a 21-17564S, GAUK 343421, a dále infrastrukturou LM2018129 Czech-BioImaging.

GASTROINTESTINÁLNA DYSFUNKCIA A NUTRIČNÁ SELEKTIVITA A ICH KORELÁCIE S BEHAVIORÁLNYMI CHARAKTERISTIKAMI U DETÍ A ADOLESCENTOV S PORUCHAMI AUTISTICKÉHO SPEKTRA

Babinská K, Celušáková H, Belica I, Szapuová Ž, Waczulíková I, Nemcsicsová D, Tomova A, Ostatníková D

Univerzita Komenského, Lekárska fakulta, Fyziologický ústav, Bratislava, Slovenská republika

Poruchy autistického spektra (PAS) sú skupinou neurovývinových porúch, ktorých jadrové príznaky zahŕňajú poruchu sociálnej interakcie a komunikácie spolu s repetitívnym a stereotypným správaním a záujmami. U väčšiny jedincov s PAS sa prejavujú i symptómy ďalších pridružených porúch zdravia. Medzi najčastejšie patrí gastrointestinálna dysfunkcia a nutričné problémy, najmä selektivita a konzumácie obmedzeného repertoáru potravín. Predpokladá sa, že narušená signalizácia z tráviaceho systému prostredníctvom osi črevo – mozog sa podieľa na vzniku behaviorálnych prejavov PAS. Nutričná selektivita má súvis s úzko vymedzenými, repetitívnymi záujmami, charakteristickými pre PAS, vplyv majú aj kognitívne deficity.

V štúdií sme zisťovali prevalenciu GI dysfunkcie a nutričných problémov, ich korelácie so závažnosťou príznakov PAS, ako aj diétnymi intervenciami a podávaním doplnkov výživy. Súbor zahŕňal 247 detí a adolescentov s PAS a 267 kontrol vo veku 2–18 rokov. Jedinci boli zaradení do súboru s PAS na základe diagnostických nástrojov ADOS-2 a ADI-R, ktoré reprezentujú aj behaviorálne charakteristiky probandov. Údaje o GI funkciách a výžive v posledných 3 mesiacoch sa získavali anamnesticky.

V súbore sme zistili vysokú prevalenciu GI symptómov, ktoré boli signifikantne častejšie u detí a dospelých s PAS (88,9 %) než u neurotypických kontrol (79 %). Významne častejší výskyt bol u dievčat ako u chlapcov. Zistila sa vysoká miera potravinovej selektivity pri PAS (69,1 % vs 37,1 %). V súbore s PAS sme zistili signifikantné korelácie medzi závažnosťou PAS vo všetkých troch hlavných doménach (porucha sociálnej interakcie, narušená komunikácia, repetitívne správanie) a frekvenciou GI a nutričných problémov-u jedincov, ktorí vykazovali vyššiu mieru príznakov PAS, bol zistený aj častejší výskyt GI dysfunkcie i nutričnej selektivity. Multivariačná analýza preukázala, že aj pri zohľadnení veku a pohlavia, prítomnosť GI dysfunkcie, ako aj nutričných špecifik je signifikantne asociovaná s PAS. Výsledky modelovania naznačujú, že najmä u dievčat prítomnosť GI dysfunkcie zvyšuje pravdepodobnosť, že ide o jedinca s PAS. V súbore jedincov s PAS sme zistili 4- násobne častejšie dodržiavanie diétneho režimu než u kontrol, väčšinou založeného na obmedzovaní lepku a mlieka, a to aj u detí vykazujúcich nutričnú selektivitu. Výživové doplnky užívalo 66,7 % jedincov, najmä vitamíny/minerály, probiotiká a omega-3 mastné kyseliny. Podávanie diét a doplnkov výživy u jedincov s PAS vychádza z vedecky nedostatočne potvrdenej hypotézy predpokladajúcej, že diétna modifikácia navodí metabolické zmeny vedúce k zmierneniu jadrových prejavov PAS, ako aj GI a nutričných problémov.

Záverom konštatujeme, že v súbore detí a adolescentov s PAS sme preukázali

vysoký výskyt gastrointestinálnej dysfunkcie, problémov súvisiacich s príjmom potravy, ako aj diétnych obmedzení bez lekárskeho odporúčania, čo môže mať negatívny dopad na ich výživový a zdravotný stav. V rámci komplexnej a multiprofesijnej starostlivosti o osoby s PAS je potrebné venovať uvedeným poruchám pozornosť, cielene ich vyhľadávať a riešiť. Výsledky naznačujú, že prítomnosť GI dysfunkcie, najmä u dievčat môže byť doplňujúcim markerom podporujúcim diagnózu PAS, ako aj možné súvislosti medzi mechanizmami vzniku GI a nutričných porúch a jadrových prejavov PAS.

Podporené grantmi APVV-20-139, APVV-20-0070, APVV-15-0085

DEPOZICE FLUORESCENTNÍCH INDIKÁTORŮ V MOZKOVÉ VASKULATUŘE: IN VIVO STUDIE DVOUFOTONOVÉ FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE U MYŠI

Svoboda J^{1,3}, Kala D^{1,4}, Vondrášek D², Hadraba D², Danačíková Š¹, Varha I⁴, Yeva Prysiazhniuk¹, Otáhal J¹

¹Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, ²Biomatematický ústav Akademie věd České republiky, ³Fakulta tělesné výchovy a sportu Univerzity Karlovy, Česká republika,

⁴České vysoké učení technické v Praze

Nedávné studie ukázaly, že po sériovém podání kontrastních látek na bázi gadolinia pro vyšetření magnetickou rezonancí dochází k jeho usazování v různých částech mozku. Ačkoli nebyly hlášeny žádné klinické koreláty těchto depozit, rozvinula se intenzivní diskuse, do jaké míry by to mohlo být škodlivé. Navíc pitevní histopatologická analýza odhalila ukládání gadolinia ve stěnách mozkových cév, zatímco v extracelulární tkáni mozku pozorováno nebylo. Provedli jsme tedy in vivo studii k popisu dynamiky fluorescence komplexu Evansova modř – albumin uvnitř lumen a stěny mozkových cév. Samci kmene C56BL/6 (n=4) s chirurgicky připraveným kraniálním oknem (4 až 6 týdnů po zákroku) v oblasti primární sensorické kůry, podstoupili aplikaci (i.p.) indikátoru Evansova modř (4 ug/g tělesné hmotnosti, 0,5% roztok). Následoval nekontinuální monitoring po dobu 14 dnů. Pro získání dynamiky fluorescenčního signálu v čase byly záznamy pořízeny akutně 1, 2, 3, 6, 8 a 14 dní po aplikaci indikátoru. Anestetizovaná zvířata byla umístěna do dvou-fotonového mikroskopu (Ultima IntraVital, Bruker) a ve stejných oblastech zájmu byla provedena zobrazovací sekvence sestávající z akvizice z-stacků (v rozsahu 0 – 200µm) s vysokým rozlišením. Získaná data byla prostorově koregistrována, následně analyzována v Matlabu a ručně zpracována v softwaru ImageJ. Pozorovali jsme vyšší intenzitu signálu v cévní stěně ve srovnání s lumen. Tento fenomén byl přítomen po celou dobu pozorování. Naše data naznačují, že fenomén je omezen zejména na větší tepny a arterioly, jako jsou například terminální větve arteria cerebri media. Nenašli jsme významný rozdíl v chování mezi stěnami kapilár nebo žil. Naše data ukazují, že jediná aplikace fluorescenčního indikátoru vázajícího albumin vede k jeho přítomnosti v cévní stěně, jak je detekováno zvýšeným fluorescenčním signálem až 2 týdny po aplikaci.

Práce byla podpořena projekty GAČR 22-28265S a 21-17564S, GAUK 343421, a dále infrastrukturou LM2018129 Czech-Biolmaging.

INTRANASAL OXYTOCIN IN A GENETIC ANIMAL MODEL OF AUTISM

*Szabó J, Mlynár M, Fejes A, Borbélyová V, Renczés E, Ostatníková D, Celec P
Institute of Molecular Biomedicine, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava,
Slovakia*

introduction: Autism spectrum disorder (ASD) is a group of neurodevelopmental disorders mainly characterized by deficient sociability and repetitive behaviors. Behavioral interventions have very limited effectivity. Pharmacotherapy, on the other hand, is only focused on the secondary symptomatology, while an effective treatment for the core symptoms is still lacking. Oxytocin (OXT) is a neuropeptide known for its prosocial impact, making it a candidate drug for ASD treatment. Its neurobehavioral effects have been widely researched but the outcomes reported by clinical studies are ambiguous. The present study aimed to investigate the effect of one month long intranasal OXT treatment on the ASD-like phenotype in Shank3-deficient mice as a widely used animal model of ASD.

material and methods: Fifty-four Shank3-deficient and wild-type mice of both sexes were intranasally administered OXT (0.8IU/kg) or saline daily for a period of one month. The effect of treatment on the ASD-like phenotype was examined in reciprocal interaction test and open field test using EthoVisionXT software (Noldus, Wageningen, the Netherlands). Animals were tested after 2 weeks and 4 weeks of treatment and 4 weeks following the treatment termination.

results: Shank3-deficient mice treated with OXT spent twice as much time interacting with the social partner after 2 weeks of daily OXT treatment ($p < 0.001$) in comparison with their saline-treated controls. After 4 weeks of administration, the explorative behavior of OXT-treated Shank3-deficient mice was reduced by 50% in comparison to controls ($p < 0.001$). No treatment effect was observed in repetitive behavior of animals. The OXT-effect of increased sociability and decreased exploration lasted even 4 weeks following the treatment termination. However, while the social disinterest of control groups was steadily decreasing across the measurements, OXT-treated mice did not exhibit this reduction ($p < 0.001$), indicating a form of social ambivalence.

conclusion: Our results support the therapeutic potential of intranasal OXT in alleviating the social shortfalls in a genetic mouse model of ASD. Whether and how the outcomes of animal experiments can be translated to humans requires clinical research. Further experimental studies are also needed to elucidate the benefits and risks of the long-term OXT treatment. The project was supported by research grants VEGA [1/0635/20], KEGA [045UK-4/2020], APVV-20-0185 and APVV-20-0070.

VPLYV TDCS MOZOČKA NA SÉMANTICKÚ PAMÄŤ

Besterciová D, Rovný R, Marko M, Riečanský I

Centrum experimentálnej medicíny SAV, Bratislava, Slovenská republika

V súčasnosti pribúda čoraz viac dôkazov o úlohe mozog nielen v modulácii motorických ale aj kognitívnych a afektívnych funkcií. Na štúdium mozogových funkcií u ľudí sa v súčasnosti čoraz častejšie využívajú metódy neinvazívnej stimulácie, a to najmä transkraniálna stimulácia jednosmerným prúdom (tDCS). Princípom tejto metódy je modulácia neurálnej aktivity pomocou slabého elektrického prúdu pretekajúcim medzi dvomi povrchovými stimulačnými elektródami, anódou a katódou. S využitím tDCS už bolo preukázané mozogové zapojenie do viacerých nemotorických procesov, spojených najmä s pamäťou a jazykovými funkciami. Spôsob, akým sa mozog zúčastňuje na koordinácii nemotorických procesov, však stále nie je objasnený. Cieľom našej práce bolo preskúmať úlohu mozog v sémantickej pamäti pomocou anodálnej a katodálnej tDCS. Štúdie sa zúčastnilo 140 dospelých zdravých probandov, ktorí boli náhodne rozdelení do troch skupín (anodálna tDCS, katodálna tDCS, sham tDCS). Všetkým probandom boli administrované dve behaviorálne úlohy zamerané na rozdielne aspekty sémantickej pamäti. Prvou bol test slovných asociácií, v ktorej boli participanti inštruovaní generovať slovné asociácie a disociácie podľa vopred daných podmienok. Druhou behaviorálnou úlohou bol test sémantickej predikcie, v rámci ktorého participanti dokončovali vety. Prezentované vety boli rozdelené do dvoch skupín podľa miery prediktability ich kontextu (vysoko predikovatelné a nepredikovatelné vety). Úlohy boli vykonávané pred a okamžite po tDCS. Samotná stimulácia trvala 20 minút, intenzita elektrického prúdu bola 2 mA. Anodálna tDCS pozitívne ovplyvnila kontinuálnu generáciu slovných asociácií, zatiaľ čo ostatné parametre lexikálno-sémantického spracovania informácií ostali nezmenené. Katodálna tDCS nemala vplyv na žiaden sledovaný parameter. Naše výsledky naznačujú, že mozogové funkcie môžu byť úspešne modulované pomocou tDCS a že mozog môže byť zapojený do niektorých aspektov sémantickej pamäti. Práca bola podporená projektami VEGA 2/0059/20 and APVV-19-0570.

PORUCHY SPÁNKU A HLADINY 6-SULFATOXYMELATONÍNU AKO MOŽNÉ PREDIKTORY ADAPTÍVNEHO, MALADAPTÍVNEHO SPRÁVANIA A ZÁVAŽNOSTI JADROVÝCH PRÍZNAKOV U DETÍ S PORUCHAMI AUTISTICKÉHO SPEKTRA

Bartakovičová K, Keményová P, Belica I, Janík Szapuová Ž, Rašková B, Stebelová K, Waczulíková I, Ostatníková D, Babinská K

Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika

Poruchy autistického spektra (PAS) patria medzi neurovývinové ochorenia charakterizované deficitmi v oblasti komunikácie, sociálnej interakcie a repetitívnym správaním. U detí s PAS

sú poruchy spánku veľmi často sa vyskytujúcou komorbiditou s prevalenciou 50-80 %. Melatonín je hormón, ktorého hlavnou úlohou je regulácia spánkového cyklu. V našej predchádzajúcej štúdii sme u jedincov s PAS preukázali vyššiu prevalenciu spánkových porúch a nižšie hladiny 6-sulfatoxymelatonínu (aMT6s), hlavného odpadového produktu melatonínu, vo vzorke ranného moču v porovnaní so zdravou populáciou. Adaptívne správanie je definované ako miera samostatnosti jedinca pri plnení každodenných aktivít potrebných pre bežný život. Deti s PAS sa vyznačujú významne horším adaptívnym správaním, ako aj častejším výskytom tzv. maladaptívneho správania (napr. agresia, úzkosť, depresia). Cieľom našej štúdie bolo analyzovať v súbore detí s PAS či poruchy spánku a koncentrácia 6-sulfatoxymelatonínu vo vzorkách ranného moču môžu slúžiť ako prediktory adaptívneho správania a závažnosti jadrových príznakov porúch autistického spektra. Výskumný súbor predstavovalo 56 detí s PAS (50 chlapcov a 6 dievčat), diagnóza PAS bola stanovená štandardnými metódami ADOS-2 a ADI-R. Priemerný vek bol 5,3 roka s vekovým rozpätím 2,8-13,3 roka. Adaptívne správanie sme hodnotili pomocou Vinelandskej škály adaptívneho správania. Hladiny sulfatoxymelatonínu v moči boli stanovené ELISA metódou, spánkové parametre sme hodnotili dotazníkom CSHQ. Za signifikantné považujeme zistenia, že poruchy spánku negatívne korelovali s celkovým skóre a socializačnou škálou adaptívneho správania a boli spojené s vyššou prevalenciou maladaptívneho správania, t.j. väčšia závažnosť spánkovej dysfunkcie predikovala výraznejšie narušenie adaptívneho správania. Naše výsledky tiež naznačujú, že znížené vylučovanie melatonínu počas noci sa spája so závažnejším narušením sociálneho afektu, ako aj vyššou celkovou mierou príznakov PAS podľa ADOS-2, a tým podporujú hypotézu o možnej úlohe melatonínu v patomechanizmoch PAS. Práca bola podporená grantmi APVV-20-139, APVV-20-0070, APVV-15-0085

ZMĚNY VE STATICKÉ PERIMETRII BĚHEM PROCEDURY CHAMBER REST

Závadová A¹, Strakoš J¹, Jarkuliš V¹, Škrda D¹, Cieslarová J², Malůš M², Diomin E¹, Skopelidou V¹, Švorc P Jr¹, Michalčák T¹

¹Ústav fyziologie a patofyziologie, Lékařská fakulta, Ostravská Univerzita, Ostrava, Česká republika ²Ústav psychologie, Filozofická fakulta, Ostravská Univerzita, Ostrava, Česká republika

Úvod: Cílem bylo pozorovat změny citlivosti sítnice na osvit v návaznosti na pobyt ve speciálně upravené tmavé komoře na podkladě sensorické deprivace („metoda CHAMBER REST“). Výsledky této experimentální léčebné metody, která je založena na pobytu v úplné tmě za účelem zlepšení zdraví lidí pod neustálým stresem a vlivem vnějšího prostředí, napovídají, že by mohla také příznivě ovlivňovat stav citlivosti sítnice a její regeneraci. Metodika: Hodnocení probíhalo u 26 studentů ve věku od 19 do 26 let, umístěných na 96 hodin do speciální místnosti s maximální tmou. Místnost splňovala podmínky pro pohodlný pobyt a byla umístěna na tichém místě. Účastník během pobytu nepoužíval žádné zařízení, které by vydávalo světlo. Pro měření byla využita metoda statické perimetrie a vyhodnocení probíhalo v programu macula threshold. Probandi podstoupili měření celkově 4x, zvláště pro levé a pravé oko. První měření bylo provedeno den před zahájením terapie, další zpravidla do 30 minut po skončení pobytu ve tmě, následovaném dvěma měřeními 4. a 7. den po výstupu

z temné komory. Pro vyhodnocení dopadu pobytu v tmavé komoře na zorné pole a citlivost sítnice byl použit parametr MD („Mean Defect“), který charakterizuje střední ztrátu citlivosti v zorném poli, a tedy vypovídá i o celkovém poškození zorného pole.

Výsledky: Ve studii pro zpracování výsledků se porovnaly primárně výsledky parametru MD, a to z měření den před nástupem do tmy a 7. den po pobytu. V experimentální skupině došlo u 71 % studentů ke zlepšení u obou očí, u 21 % studentů ke zlepšení pouze u jednoho oka a u zbylých 7 % studentů nedošlo k žádnému zlepšení citlivosti sítnice. Po celkovém statistickém vyhodnocení celé experimentální skupiny po prvním a posledním měření se objevila vyšší míra signifikantnosti ($p \geq 0,0167$).

Závěr: Z těchto výsledků můžeme usuzovat, že 96hodinový pobyt ve tmě po 7 dnech od výstupu zlepšuje stav citlivosti sítnice lidského oka u mladých a zdravých jedinců. Zároveň je však nutné ověřit toto tvrzení na větším souboru lidí.

OBRANNÉ REAKCE HMYZÍHO TĚLA PROTI VČELÍMU JEDU A ÚLOHA ADIPOKINETICKÉHO HORMONU V NICH

Černý J¹, Bodláková K¹, Štěrbová H¹, Guráš R², Zítka O², Kodrík D¹

¹Entomologický ústav, BC a Přírodovědecká fakulta, JU, České Budějovice, Česká republika

²Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, MU a CEITEC, Vysoké učení technické, Brno, Česká republika

Včely si svůj žihadlový aparát a včelí jed původně vyvinuly jako velmi sofistikovanou mechanickou a chemickou zbraň proti jedincům svého vlastního druhu nebo proti jiným predátorským hmyzím druhům. Účinnost těchto zbraní proti ptákům a savcům se na evoluční scéně objevila mnohem později, a jak je známo, díky svému nespecifickému mechanismu je velmi vysoká. Je zajímavé, že o biologických a biochemických obranných reakcích vůči včelímu jedu v hmyzím těle je známo relativně málo. Proto jsme v této studii sledovali fyziologické reakce v těle modelového hmyzu švába amerického, *Periplaneta americana* po aplikaci včelího jedu. Injekce jedu do těla švába vyvolala silnou stresovou reakci ($LD_{50} = 1.063 \mu\text{l}$ jedu) spojenou s významným navýšením hladiny stresového adipokinetického hormonu (AKH) v centrální nervové soustavě (CNS) i v hemolymfě. Jed vyvolal také rozsáhlou destrukci ultrastruktury svalových buněk, obzvláště pak myofibril a sarkomer, přičemž současná aplikace jedu a švábiho AKH (=Peram-CAH-II) tomuto destruktivnímu účinku z větší části zabránila. Jed v těle švába dále moduloval hladinu glycidů, lipidů a proteinů v hemolymfě, a také aktivitu trávicích amyláz, lipáz a proteáz ve středním střevě. Také hladina vitellogeninů v hemolymfě samic švába se významně snížila po ošetření jedem. Je zajímavé, že hladina dopaminu a glutathionu (GSH a GSSG) vzrostla v CNS po aplikaci jedu jenom mírně, avšak hladinu dopaminu se významně navýšila po aplikaci AKH i současně aplikaci jedu a AKH, zatímco hladina GSH a GSSG se významně zvýšila jen po současně aplikaci obou agens. Výsledky prokazují celkovou reakci švábiho těla na ošetření včelím jedem a alespoň částečnou úlohu AKH v těchto reakcích.

EXTRACELULÁRNA DNA V PATOGENÉZE REUMATOIDNEJ ARTRITÍDY

Macáková K¹, Illésová J¹, Mlynáriková V², Lesayová A¹, Konečná B¹, Borbélyová V¹, Tekel'ová M¹, Šteňová E³, Celec P^{1,4,5}, Vlková B¹

¹Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, 81108 Bratislava, Slovenská republika, ²Národný ústav reumatických chorôb, 92101 Piešťany, Slovenská republika, ³Interná klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univ

Úvod: Reumatoidná artritída (RA) je chronická zápalová choroba, ktorá postihuje až 1% populácie, avšak jej etiopatogenéza stále nie je objasnená. Liečba, hoci je najúčinnějšía akú pacienti s RA v histórii mali, nemôže byť kauzálna. Navyše, existuje nezanedbateľná skupina pacientov, ktorá na aktuálnu protizápalovú liečbu neodpovedá optimálne. Pacienti s RA majú v plazme vysokú koncentráciu extracelulárnej DNA (ecDNA). Môže ísť o dôsledok zápalového procesu a teda zaujímavý biomarker, ale ecDNA môže byť aj súčasťou patogenézy a teda možným terapeutickým cieľom. Cieľom našej štúdie bolo popísať dynamiku ecDNA u pacientov s RA pred a počas liečby biologickými antireumatikami (bDMARDs) RA a otestovať vplyv exogénnej DNázy v animálnom modeli RA.

Metódy: Pacientom (n=40) s potvrdenou RA bola odobratá krv pred začatím liečby s bDMARDs, ako aj po 3 a 12 mesiacoch liečby. V plazme bola analyzovaná ecDNA a jej subcelulárny pôvod pomocou fluorometrických metód a real time PCR. Dynamika ecDNA bola analyzovaná vo vzťahu k DAS28 a C-reaktívnemu proteínu. V animálnom experimente bol využitý model RA indukovaný pomocou protilátok voči kolagénu typu II. Časť myší dostávala každých 12 hodín deoxyribonukleázu (10 mg/kg) po dobu 8 dní. Ako výstupné parametre boli sledované artritické skóre a opuch labiek pomocou pletyzmometra.

Výsledky: Liečba bDMARDs zlepšila výrazne klinický stav u väčšiny pacientov (92,5%). DAS28 a CRP poklesli v priemere o 54% a 43% už po 3 mesiacoch liečby. Plazmatická ecDNA klesla významne (o 60%) len u pacientov, ktorí odpovedali na liečbu bDMARDs dobre podľa klinických kritérií. U pacientov s miernou až slabou odpoveďou na liečbu pokles ecDNA pozorovaný nebol. Hoci v animálnom modeli aplikácia exogénnej deoxyribonukleázy zvýšila plazmatickú deoxyribonukleázovú aktivitu o 83%, neboli zistené žiadne rozdiely v sledovaných parametroch medzi liečenou a neliečenou artritickou skupinou.

Záver: Na základe výsledkov štúdie môžeme predpokladať, že ecDNA by mohla byť dobrým prognostickým markerom úspešnosti liečby, avšak pre klinickú aplikáciu treba skúmať skorú dynamiku zmien ecDNA po nasadení bDMARDs. Animálny experiment nepreukázal, že by ecDNA bola vhodným cieľom pre nové terapeutické prístupy. Avšak to môže súvisieť s rozdielmi medzi klinickou RA a jej použitým animálnym modelom. Pre lepšie pochopenie úlohy ecDNA v RA je potrebná analýza jej pôvodu, mechanizmov vzniku ecDNA pri RA a ich cielenej inhibície.

Tento projekt bol podporený výskumným grantom APVV-18-0366.

POROVNÁNÍ CITLIVOSTI HEPATOMOVÝCH LINIÍ HEPG2 A HEPARG VŮČI LIPOTOXICKÉMU PŮSOBENÍ MASTNÝCH KYSELIN

Maseko TE, Elkalaf M, Melek J, Peterová E, Červinková Z, Kučera O
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, ČR

Úvod: Nealkoholové tukové onemocnění jater (NAFLD) je nejčastější chronické onemocnění jater v západních zemích a jeho prevalence dále stoupá. Patogeneze tohoto onemocnění je dávana do souvislosti s inzulinovou rezistencí a metabolickým syndromem, nicméně není zcela objasněna. Pro studium NAFLD existuje řada in vivo modelů, ale je jen velmi limitovaný počet vhodných modelů v podmínkách in vitro.

Cíl: Hlavním cílem této práce bylo porovnat citlivost 2 buněčných hepatomových linií vůči lipotoxickému působení dvou volných mastných kyselin (FFAs) v různých koncentracích a poměrech. Dalším cílem bylo vybrat vhodnější buněčnou linii a optimální poměr a koncentraci FFAs pro indukci steatózy jako model NAFLD in vitro.

Metodika: Buňky HepG2 a HepaRG linií byly kultivovány dle doporučených protokolů k dosažení požadované density, ev. diferenciaci. Poté byly buňky vystaveny 24h působení oleátu (OA) a palmitátu (PA) v různých koncentracích (0–2 mmol/l) a různých poměrech (3/0; 2/1; 1/1; 1/2 a 0/3). Steatóza byla ověřena mikroskopicky a stanovením obsahu triacylglycerolů (TAG) v buňkách (Triglyceride Colorimetric Assay). Lipotoxický účinek byl hodnocen pomocí aktivit buněčných dehydrogenáz (WST-1), laktátdehydrogenázy (LDH) a kaspázy-3 a tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS, DCFDA). Mitochondriální membránový potenciál (MMP) byl vizualizován pomocí fluorescenční mikroskopie (fluorescenční sonda JC-1). Respirace mitochondrií byla hodnocena pomocí měření konzumpce kyslíku (OCR, Agilent Seahorse XFe96 analyzer).

Výsledky: Oleát i palmitát vykazují na dávce závislou toxicitu u obou buněčných linií. Lipotoxicita PA je signifikantně vyšší než OA, což potvrzuje pokles viability již po expozici 1 mM PA ($p < 0,001$), vyšší aktivita kaspázy-3, LDH leakage a rovněž vyšší pokles MMP u HepG2 i HepaRG buněk. Zajímavým nálezem je nižší toxicita kombinace obou mastných kyselin ve stejné celkové koncentraci než toxicita samotného PA či OA u HepG2 buněk. Překvapivým nálezem je vyšší produkce ROS u HepG2 vystavených vyšším koncentracím OA než po expozici PA. HepG2 buňky po expozici FFAs akumulují efektivněji TAG než HepaRG buňky. Dalším zajímavým nálezem je rozdílná toxicita OA a PA u HepG2 buněk kultivovaných v absenci či přítomnosti kolagenu. Zatímco kultivace HepG2 buněk na kolagenu snižuje toxicitu 2 mM OA ($p < 0,001$), toxicita PA je naopak v přítomnosti kolagenu vyšší ($p < 0,001$), což dokazují výsledky aktivity kaspázy-3 a LDH leakage. Tento efekt nebyl pozorován u HepaRG buněk. Závěry: Kombinace FFAs vykazuje nižší toxický účinek na HepG2 i HepaRG buňky, než samotný PA či OA, přičemž lipotoxicita PA je výrazně vyšší než OA. Zajímavým nálezem je zvýšení toxicity PA a snížení toxicity OA při kultivaci buněk HepG2 linie v přítomnosti kolagenu.

Podpořeno grantem GAUK (336221) a programem Univerzity Karlovy Cooperatio.

LAMP AKO POTENCIÁLNA DIAGNOSTICKÁ METÓDA INFEKČNÝCH CHORÔB

Ivašková N, Tóthová Ľ

Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovenská republika

Úvod: V diagnostike infekčných chorôb je jednou z hlavných metód polymerázová reťazová reakcia (PCR). Jej použitie vyžaduje nevyhnutné kroky ako izolácia nukleových kyselín a následná amplifikácia špecifického génu. PCR metóda s vysokou senzitivitou deteguje prítomnosť DNA, avšak prináša so sebou aj negatíva ako drahé laboratórne vybavenie a časovú náročnosť. Tieto obmedzenia viedli k vývoju novej metódy, ktorá prepája rýchlosť, jednoduchosť a vysokú špecifickosť. Slučkami sprostredkovaná izotermická amplifikácia (LAMP), resp. jej obmena s pridaním reverznej transkriptázy (RT-LAMP), obsahuje 4 alebo 6 primerov viažucich sa na 6 alebo 8 oblastí cieľového génu. Amplifikácia za konštantnej teploty redukuje náročnosť vybavenia na termostat s nastaviteľnou teplotou. Metóda má široký potenciál v testovaní v mieste starostlivosti a v rozvojových krajinách. V našom výskume sa zameriavame na využitie LAMP metódy v detekcii vírusových patogénov, špeciálne pri chorobe COVID-19 ako aj detekciou bakteriálnych patogénov spôsobujúcich infekcie močových ciest (IMC). Dôležitou súčasťou predkladanej práce je optimalizácia metódy s dôrazom na zvýšenie senzitivity a špecificity.

Metódy: COVID-19: V experimente sa testovala detekcia SARS-CoV-2 pomocou zmesi primerov v slinách zdravých dobrovoľníkov. Vzorky dobrovoľníkov (n=5) boli teplotne spracované po dobu 5 minút na 95°C a zmiešané v pomere 9:1 so supernatantom bunkovej kultúry SARS-CoV-2. Reakčná zmes v celkovom objeme 20 µl obsahovala 10 µl WarmStart® Colorimetric LAMP 2x Master Mix with UDG (New England Biolabs, Massachusetts), 2 µl zmesi primerov, 5 µl vody a 3 µl templátu. Reakčnú zmes sme inkubovali po dobu 40 minút pri 65 °C. Overenie pozitívneho výsledku prebiehalo vizuálne vyhodnotením farebnej zmeny reakcie (pozitívny-žltá farba, negatívny-ružová farba) a prostredníctvom gélovej elektroforézy sme potvrdili prítomnosť amplikónov. Následne sme skúmali vplyv aditív: 1xPBS; 0,5 mol Tris; 1xTris – EDTA; 1% TWEEN20; 1% Triton; DNA/RNA Shield; GuHCl; BST 3.0; reverzná transkriptáza. IMC bakteriálny panel: Podľa dostupnej literatúry sme zvolili 11 zmesí primerov detegujúcich gény často vyskytujúcich sa patogénov spôsobujúcich IMC. Zloženie reakčnej zmesi bolo rovnaké ako pri COVID-19. Ako templát boli použité vzorky DNA izolované z bakteriálnych kultúr (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* a *Staphylococcus aureus*).

Výsledky: Pôvodným protokolom sme boli schopní detegovať vírus SARS-CoV-2 vo vzorke slín, ak bolo prítomných aspoň 125 kópií vírusu v reakčnej zmesi. Použitie PBS na rozriedenie slín v pomere 1:1 zvýšilo citlivosť testu a vírus sme boli schopní detegovať, ak sa vo vzorke nachádzalo aspoň 30 kópií vírusu. Pridanie TWEEN20 a reverznej transkriptázy ďalej zvýšilo senzitivitu, kedy sme boli schopní detegovať vírus už pri prítomnosti 15 kópií vírusu vo vzorke. Naopak, pridanie Tris a DNA/RNA Shieldu do reakčnej zmesi nezvýšilo senzitivitu. Pri bakteriálnych patogénoch sme po použití 11 špecifických primerov vedeli identifikovať

príslušné bakteriálne kmene, ak bolo v reakčnej zmesi prítomných aspoň 10 pg príslušnej bakteriálnej DNA. Avšak, vo výsledku bola prítomná aj cross-reaktivita.

Záver: Metóda LAMP má mnoho výhod, vrátane nízkych nákladov, rýchlosti, jednoduchosti a zníženia nákladov na vybavenie. V prezentovanom výskume sme dokázali, že detekcia SARS-CoV-2 pomocou LAMP metódy je možná. Výsledky potvrdzujú, že pridanie aditív k pôvodným reakčným zmesiam LAMP môže viesť k zvýšeniu senzitivity. Pre využitie metódy LAMP v diagnostike bakteriálnych patogénov je potrebné overiť získané výsledky aj na klinických vzorkách IMC, resp. na vzorkách moču získaných z experimentálneho modelu IMC.

Projekt bol podporený grantami APVV-18-0287 a APVV-20-0472.

EXTRACELULÁRNA DNA V EXOZÓMOCH IZOLOVANÝCH Z PLAZMY ZDRAVÝCH JEDINCOV

Lichá K¹, Konečná B¹, Pastorek M¹, Repiská G², Celec P^{1,3,4}

¹Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko ²Ústav fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko ³Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko ⁴Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Extracelulárna DNA (ecDNA) je DNA nachádzajúca sa v mimobunkovom priestore. Je prítomná v mnohých telesných tekutinách, ako napríklad v krvi, v krvnej plazme alebo v moči. EcDNA môže slúžiť ako diagnostický biomarker rôznych chorôb, avšak na druhej strane môže tiež podnecovať vznik zápalu v tele, ak je prítomná v patologických koncentráciách. Z tohto dôvodu organizmus reguluje jej koncentrácie v krvi prostredníctvom deoxyribonukleáz, ktoré za fyziologických okolností ecDNA degradujú. V cirkulácii existuje viacero foriem ecDNA. Môže byť voľná alebo viazaná v nukleozómoch alebo virtozómoch. Predpokladá sa, že jednou z jej foriem môžu byť exozómy. Exozómy sú extracelulárne vezikuly uvoľňované fyziologicky takmer všetkými bunkami v tele a nachádzajú sa vo všetkých telesných tekutinách. Majú lipidovú dvojvrstvu, ktorá pomáha chrániť ecDNA pred degradáciou deoxyribonukleázami. Tým by mohli prispievať k zvýšeným koncentráciám ecDNA v cirkulácii. Cieľom tejto štúdie bolo potvrdiť prítomnosť ecDNA v exozómoch izolovaných z čerstvej ľudskej plazmy zdravých jedincov, zistenie lokalizácie a subcelulárneho pôvodu ecDNA asociovanej s exozómami, ako aj odhad približnej koncentrácie DNA v jednom exozóme. Vo vyizolovaných vzorkách bol prostredníctvom transmisnej elektrónovej mikroskopie potvrdený typický tvar exozómov. Metódou analýzy nanočastíc bola nameraná najvyššia koncentrácia častíc vo veľkosti 123 nm. Prítomnosť exozomálnych markerov CD9 a TSG101 bola potvrdená western blotom. Zistili sme, že 60–75 % DNA je prilepená na povrchu exozómov, ale časť DNA je lokalizovaná vo vnútri exozómov, kde je chránená pred degradáciou deoxyribonukleázami. Zároveň bola potvrdená prítomnosť jadrovej aj mitochondriálnej DNA v exozómoch. Exozómy izolované z plazmy zdravých ľudí obsahujú za

fyziológických podmienok jadrovú aj mitochondriálnu ecDNA. Väčšina DNA asociovanej s exozómami je nalepená na povrchu, ale časť DNA je vo vnútri exozómov chránená lipidovou membránou pred degradáciou deoxyribonukleázami. Exozómy sa môžu vďaka ochrane ecDNA pred pôsobením deoxyribonukleáz podieľať na jej zvýšených koncentráciách v organizme. Zvýšené koncentrácie ecDNA majú následne potenciál viesť k rozvoju chorôb, ako napríklad autoimunitných.

Táto práca bola podporená grantom Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky (VEGA 1/0674/21).

TERAPIA ARDS MODIFIKOVANÝM PRASACÍM SURFAKTANTOM PO ASPIRÁCII KYSELINY HCL A NÁSLEDNOM VENTILÁTOROM INDUKOVANOM POŠKODENÍ PĽÚC

Mikolka P, Košútová P, Kolomazník M, Mokrý D, Čalkovská A

Ústav fyziológie a Martinské centrum pre biomedicínu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Komenského Univerzita v Bratislave, Martin, Slovensko

Úvod: Syndróm akútnej respiračnej tiesne (Acute Respiratory Distress Syndrome-ARDS) je závažný, život ohrozujúci stav, ktorý je charakterizovaný poškodením alveolárneho epitelu, difúznym zápalom a inaktiváciou endogénneho surfaktantu. Multifaktoriálna etiológia ARDS sťažuje diagnostiku a samotnú liečbu ochorenia, ktorá sa primárne zameriava na zlepšenie oxygenácie. Avšak v závažných prípadoch nevyhnutná umelá pľúcna ventilácia môže prispieť k zvýšeniu zápalovej aktivity a spôsobiť ďalšie ventilátorom indukované poškodenie pľúc (Ventilator-induced lung injury-VILI). Suplementácia exogénnym surfaktantom a tým zníženie povrchového napätia v pľúcach môže zmierniť vplyv VILI a poškodenie pľúc. Cieľom štúdie je overiť terapeutický potenciál surfaktantu živočíšneho pôvodu, poractant alfa, na pľúcne funkcie a zápal na klinicky relevantnom modeli ARDS indukovanom aspiráciou kyseliny HCl a VILI.

Metodika: Intratracheálnym (i.t.) podaním kyseliny HCl (3 mL/kg, pH 1.25) v kombinácii s ventilátorom indukovaným poškodením pľúc (VT 20 ml/kg) sme dospelým Novozélandským bielym králikom indukovali závažný ARDS (definovaný ako pokles pomeru parciálneho tlaku kyslíka v arteriálnej krvi k celkovej ventilačnej frakcii kyslíka – P /F <10 kPa). Následne bol podaný bolus exogénneho surfaktantu poractant alfa (Curosurf) i.t. (2.5 mL/kg, 200 mg PL/kg), alebo vzduch i.t. u modelových neliečených zvierat, alebo fyziologický roztok i.t. v rovnakom objeme (3 mL/kg) namiesto HCl u kontrol (každá skupina n=8). Krvné plyny a ventilačné parametre boli sledované ďalšie 4 hodiny po podaní terapie. Post mortem sa stanovil pľúcny edém, krvný obraz a hladiny cytokínov v plazme. Výsledky: Poractant alfa zlepšil pomer P/F, oxygenačný index, alveolárno-arteriálny gradient počas celého experimentu, znížil hladiny cytokínov v plazme a tvorbu pľúcneho edému v porovnaní s neliečeným ARDS modelom. Pozorovali sme významne zhoršenie všetkých sledovaných parametrov u ARDS modelu s dvojitým inzultom v porovnaní s fyziologickou skupinou.

Záver: Terapia modifikovaným prasacím surfaktantom zlepšuje pľúcne funkcie, zmierňuje zápal a znižuje pľúcny edém na experimentálnom modeli ARDS, ktorý zachytáva multifaktoriálnu etiológiu ochorenia.

PLŪČNY SURFAKTANT V ÉRE COVID-19

Čalkovská A

Ústav fyziológie, Jesseniova Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Martin, Slovensko

Pľúcny surfaktant má významnú úlohu v obrane hostiteľa proti respiračným patogénom vrátane nového koronavírusu. Podľa najnovšej hypotézy surfaktant poškodzuje obal SARS-CoV-2 a umožňuje uvoľnenie jeho obsahu do prostredia. V dolnej časti dýchacieho systému vírus využíva pre vstup do bunky bielkovinový receptor ACE2 (angiotenzín-konvertujúci enzým 2) v spojení so serínovou proteázou TMPRSS2, exprimovaný predovšetkým alveolárnymi bunkami typu II (ATII). ATII bunky ako hlavný zdroj surfaktantu sú tak jedným typom cieľových buniek pre SARS-CoV-2. Ich infekcia a následné poškodenie môže mať vážne dôsledky, vyplývajúce o.i. z redukcie množstva surfaktantu, alebo jeho inaktivácie. Poškodenie vedie k narušeniu alveolárno-kapilárnej bariéry, pľúcnemu edému, zápalu, poruche výmeny plynov, zhoršeniu mechaniky pľúc a zníženej oxygenácii. Príznaky pripomínajú syndróm akútnej respiračnej tiesne (ARDS) inej etiológie. ATII bunky infikované vírusom strácajú schopnosť obnovy a zúčastňujú sa na fibroproliferácii. Významná je sekrécia rastových faktorov a prozápalových molekúl, čo vyústí do pľúcnej fibrózy ako súčasť intersticiálneho pľúcneho ochorenia.

Poznatky o tom, že poškodenie epitelových buniek ATII a zníženie množstva alebo poškodenie funkcie surfaktantu sú kľúčovými prvkami v patogenéze respiračnej formy COVID-19, tvoria racionálny základ pre použitie exogénneho surfaktantu u pacientov s ARDS indukovaným novým koronavírusom. Podanie surfaktantu chráni pľúca pred poškodením, a to aj vďaka jeho protizápalovým vlastnostiam. Konečný efekt liečby surfaktantom u pacientov s COVID-19 závisí od niekoľkých premenných vrátane spôsobu a načasovania podania, dávkovania a typu preparátu, ako aj mechanickej ventilácie.

Pľúcny surfaktant, ktorý je pri infekcii SARS-CoV-2 na jednej strane cieľom, na druhej strane sa stáva efektívnym prostriedkom v boji s touto infekciou.

Práca je súčasťou projektov VEGA 1/0055/19, VEGA 1/0004/21 and APVV-17-0250.

MITOCHONDRIÁLNÍ DYSFUNKCE KŮRY A DŘENĚ LEDVIN SUBTOTÁLNĚ NEFREKTOMOVANÝCH POTKANŮ

*Jedlička J, Tůma Z, Grundmanová M, Švíglerová J, Rajdl D, Štengl M, Kuncová J
Ústav fyziologie a Biomedicínské centrum LF UK v Plzni, Česká republika*

Úvod: Ačkoliv je mitochondriální dysfunkce často zmiňována jako klíčový faktor progresu chronického onemocnění ledvin, analýzou mitochondriální respirace kůry a zejména dřeně ledvin se dosud zabýval jen malý počet experimentálních studií. Cílem naší práce bylo posoudit vliv chronického renálního onemocnění na mitochondriální spotřebu kyslíku v kůře a dřeni ledvin za 10 týdnů po navození chronické ledvinné nedostatečnosti subtotální nefrektomií (SNX) ve srovnání s kontrolními zvířaty stejného věku.

Metody: Dospělí samci potkana byli podrobena 5/6 nefrektomii provedené ve dvou dobách. Kontrolní zvířata (SHAM) prošla obdobnými zákroky kromě redukce ledvinné tkáně. V průběhu následujících 10 týdnů byly sledovány hladiny kreatininu, močoviny a minerálů v séru a měřen systolický a diastolický krevní tlak pletysmograficky. Na konci experimentu byla stanovena clearance kreatininu a po anestezii a šetrném usmrcení byly zváženy srdce a ledviny. Mitochondriální spotřeba kyslíku byla stanovena pomocí vysoce účinné respirometrie (oxygraf Oroboros O2k, Rakousko) na mechanicky permeabilizovaných vzorcích kůry a dřeně ledvin. Po aplikaci substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů respiračního systému byly určeny stavy LEAK (spotřeba kyslíku nutná k udržení membránového potenciálu), OXPHOS (kapacita oxidační fosforylace při aktivaci komplexů I, I+II, II), ETSC (kapacita elektrontransportního systému po rozpřažení oxidace a fosforylace), ROX (reziduální spotřeba kyslíku) a CIV (aktivita komplexu IV při stimulaci umělým substrátem). Spotřeba kyslíku byla korigována na ROX a vztažena na mg hmotnosti. Aktivita citrát syntázy (CS), která slouží jako ukazatel množství mitochondrií, byla stanovena spektrofotometrickou metodou.

Výsledky: U SNX potkanů došlo k signifikantnímu zvýšení koncentrace kreatininu a močoviny v séru, systolického i diastolického krevního tlaku a hmotnosti srdce. Změny mitochondriální spotřeby kyslíku byly výraznější ve dřeni, kde došlo k signifikantnímu poklesu téměř všech sledovaných respiračních parametrů s výjimkou stavu LEAK, a to při normalizaci spotřeby kyslíku na mg vlhké tkáně i jednotku aktivity CS. V kůře ledvin SNX potkanů byla respirace vyjádřená na mg vlhké tkáně také snížena, ale při přepočtu na jednotku aktivity CS se rozdíly mezi skupinami SNX a SHAM značně zmenšily. Kromě toho došlo v kůře SNX potkanů k signifikantnímu snížení poměru ETSC/OXPHOS a v kůře i dřeni ke zvýšení poměru LEAK/ETSC.

Závěr: Z výsledků vyplývá, že chronické renální selhání u potkana pravděpodobně způsobuje nejen mitochondriální respirační dysfunkci (zejména ve dřeni), ale také adaptační změny spočívající ve využití funkční rezervy elektrontransportního systému směřující k alespoň částečné kompenzaci spotřeby kyslíku při probíhající fosforylaci (snížení poměru ETSC/OXPHOS u SNX).

Podpora: PROGRES (projekt Q39), NPU LO1503, projekt FIND a SVV 260538/2020.

ÚČINEK TELMISARTANU NA NUTRIČNĚ NAVOZENOU NEALKOHOLOVOU STEATOHEPATITIDU U MYŠÍ

*Kučera O, Staňková P, Peterová E, Melek J, Maseko T, Podhola M, Červinková Z
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, ČR*

Úvod: Nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD) je chronické metabolické onemocnění jater a je považováno za jaterní projev metabolického syndromu. Nealkoholová steatohepatitida (NASH) je klinicky závažná forma NAFLD, u které je významně vyšší riziko vzniku komplikací než u prosté jaterní steatózy. Protože dosud neexistuje specifická léčba tohoto onemocnění, je věnováno velké úsilí hledání nových terapeutických přístupů. Jedním z těchto přístupů je i blokáda receptorů pro angiotensin II (AT1).

Cíle: Cílem naší práce bylo zjistit, jaký vliv vykazuje telmisartan (antagonista AT1 receptorů) na NASH nutričně navozený u myší. Zaměřili jsme se zejména na změny v mitochondriální respiraci jater.

Metodika: Samci myší C57Bl/6J byli krmeni ad libitum po dobu 30 týdnů standardní dietou (PicoLab RD 20) a vodou (kontrolní skupina), nebo dietou západního stylu (AIN-76A) a glukózo-fruktózovým sirupem (WD skupina) k navození NASH. Poté pokračovalo dalších 6 týdnů krmení výše uvedenými dietami s tím, že části myší byl podán telmisartan (p. o. gaváž, 5 mg/kg tělesné hmotnosti / d). Po ukončení experimentu byly stanoveny aktivity transamináz v plazmě (ALT, AST), exprese vybraných proteinů a mRNA a připraveny z jater histologické preparáty (hematoxylin-eosin, Sirius red). Mitochondriální respirace jaterních homogenátů byla hodnocena pomocí vysokoúčinné respirometrie (OROBOROS Oxygraph 2k).

Výsledky: Přítomnost NASH u myší byla potvrzena histopatologickými nálezy (steatóza, lobulární zánět, fibróza, NAS skóre), zvýšeným obsahem TAG v játrech i zvýšenými plazmatickými aktivitami ALT a AST. U WD skupiny byla rovněž v jaterních homogenátech snížena celková respirační kapacita (OXPHOS kapacita i ETS kapacita) a respirace aktivovaná sukcinátem. Podávání telmisartanu u myší krmených WD dietou vedlo ke snížení absolutní i relativní hmotnosti jater ($p < 0,001$), hmotnosti viscerálního tuku ($p < 0,001$) a obsahu cholesterolu v játrech ($p < 0,001$). Telmisartan rovněž u této skupiny zvířat signifikantně snížil plazmatické aktivity ALT a AST ($p < 0,001$), stupeň steatózy a NAS skóre ($p < 0,05$) a také zvýšil sníženou celkovou respiraci (stavy OXPHOS a ETS) a respiraci aktivovanou sukcinátem ($p < 0,05$).

Závěr: V našem nutričním modelu u myší je telmisartan schopen zastavit a zvrátit progresi NASH.

Podpořeno programem Univerzity Karlovy Cooperatio.

EXTRACELULÁRNA DNA V ANIMÁLNYCH MODELOCH AKÚTNEHO ZLYHANIA PEČENE

Gromová B¹, Vašeková M¹, Celec P^{1,2,3}, Gardlík R^{1,2}

¹Ústav Molekulárnej Biomedicíny, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko ²Ústav Patologickej Fyziológie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko ³Katedra Molekulárnej Biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského

Úvod: Pri akútnom zlyhaní pečene dochádza k zvýšeniu extracelulárnej DNA (ecDNA), jadrového i mitochondriálneho pôvodu. Či už ide o DNA z odumierajúcich hepatocytov alebo z neutrofilmi produkovaných extracelulárnych pascí (NETs), vysoká ecDNA môže indukovať sterilný zápal a prispieť k progresii poškodenia pečene. Cieľom tejto práce bolo popísať dynamiku ecDNA a možný efekt jej odstránenia aplikáciou deoxyribonukleázy v animálnych modeloch akútneho zlyhania pečene. Využitím myší s deficitom PAD4 (peptidyl arginín deimináza 4 ako regulátor tvorby NETs) a CRAMP (katelicidín ako kľúčový komponent NETs) sme chceli overiť význam NETs pri akútnom zlyhaní pečene.

Materiál a metódy: Zlyhanie pečene bolo indukované dospelým C57BL/6J myšiam pomocou intraperitoneálnej aplikácií acetaminofénu (APAP, 300mg/kg) alebo tioacetamidu (TAA, 200mg/kg). Koncentrácia celkovej ecDNA v plazme sa stanovovala fluorometricky a jej subcelulárny pôvod pomocou real time PCR po 12, 24 a 48 hodinách. Experiment s podaním APAP bola aplikovaná aj Model indukovaný podaním APAP bol realizovaný aj na myšiach s deficitom PAD4, resp. CRAMP a bolo pri ňom testovaný aj účinok podávania DNázy I (10mg/kg). DNázová aktivita sa merala gélovou radiálnou difúziou.

Výsledky: Koncentrácia plazmatickej ecDNA v oboch modeloch akútneho zlyhania pečene bola najvyššia 24 hodín po indukcii. V prípade APAP to bolo 9x viac a v prípade TAA induktora až 17x viac v porovnaní s kontrolou. Endogénna DNázová aktivita bola najvyššia po 12 hodinách od indukcie v oboch modeloch. Systémové podanie exogénnej DNázy I viedlo k zníženiu jadrovej a mitochondriálnej, ale nie celkovej ecDNA (18x a 10x) v plazme. Deficit PAD4, ani CRAMP zásadne neovplyvnil koncentrácie ecDNA.

Záver: Experimentálne modely akútneho zlyhania pečene vedú k rýchlemu zvýšeniu plazmatickej ecDNA. Aplikácia DNázy síce zníži koncentráciu jej subcelulárnych frakcií, ale neodstráni ju úplne, čo možno vysvetliť vyššou fragmentáciou. To zároveň môže byť príčinou chýbajúceho účinku na priebeh zlyhania. NETs zrejme nie sú hlavným zdrojom ecDNA pri poškodení pečene. Ďalší výskum by sa mal zamerať na farmakologické možnosti ovplyvnenia tvorby a rozpoznávania ecDNA, ale aj na odlišnosti experimentálnych modelov od patogenézy zlyhania pečene v klinickej medicíne.

Táto práca bola podporená grantom Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR VEGA 1/0649/21 a grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-17-0505.

VPLYV OVARIEKTÓMIE NA SPRÁVANIE MYŠÍ S MUTÁCIOU V SHANK3 GÉNE - ANIMÁLNEHO MODELU AUTIZMU

Borbélyová V¹, Renczés E¹, Görčiová D², Feješ A², Ostatníková D³, Celec P^{1,4,5}

¹Ústav Molekulárnej Biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko

²Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko

³Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko

⁴Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko

⁵Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko

Úvod: Vyššia prevalencia autizmu u chlapcov zatiaľ nie je objasnená. Výskum sa zameriava na význam testosterónu v rôznych štádiách vývinu mozgu. Ale je možné, že kľúčové budú protektívne účinky ženských pohlavných hormónov. Na testovanie tejto hypotézy sme využili genetický model autizmu. Cieľom nášho experimentu bolo popísať vplyv ovariektómie (OVX) na správanie dospelých samičiek myši s mutáciou v SHANK3 géne.

Metodika: Dospelé zvieratá boli rozdelené podľa genotypu (WT a KO) a randomizované do skupín s OVX a SHAM operáciou. S odstupom 1 mesiaca boli následne myši testované na sociabilitu (trojkomorový sociálny test), repetitívne (test zahrabávania guľčiek), lokomotorickú aktivitu (test otvoreného poľa), úzkosť (test otvoreného poľa, vyvýšené bludisko v tvare plus, test preferencie svetla a tmy), a depresívne správanie (test núteného plávania).

Výsledky: KO myši prejavili nižšiu sociálnu preferenciu (o 17%) v porovnaní s WT myšami, ktorú OVX normalizovala (o 7%, $p < 0,05$). KO myši neprejavili vyššiu mieru repetitívneho správania, avšak v porovnaní s WT myšami boli viac úzkostné (o 50%, $p < 0,05$). OVX úzkosť u KO zvierat výrazne redukovala (o 53%, $p < 0,01$). OVX ale zároveň mierne zvyšovala depresii podobné správanie (o 39%, $p < 0,05$). Ostatné sledované behaviorálne charakteristiky sa medzi skupinami neodlišovali.

Záver: SHANK3 KO myši vykazujú niektoré autistické črty a sú viac úzkostné. Keďže OVX tieto črty upravila, estradiol prípadne iné ovariálne hormóny nepôsobia z tohto hľadiska protektívne a nie sú zodpovedné za pohlavné rozdiely v autizme. Naše výsledky možno interpretovať len v rámci použitého genetického modelu autizmu. Ďalší výskum by mal byť zameraný na analýzu vplyvu modulácie estrogénovej signalizácie na autizmu podobné správanie, ideálne u predpubertálnych zvierat.

Projekt bol podporený grantom VEGA [1/0635/20], KEGA [045UK-4/2020], APVV-20-0185 and APVV-20-0070.

VÝVOJ IN VITRO METOD PRO PERSONALISOVANOU DIAGNOSTIKU EPILEPTOGENNÍCH MUTACÍ

Danačíková Š, Kořínek V, Otáhal J

Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha, Česká republika; Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., Praha, Česká republika

Epilepsie je nejčastější chronické neurologické onemocnění, které postihuje přibližně 1–2 % světové populace. Onemocnění se vyznačuje opakovanými spontánními záchvaty, způsobeny nadměrnou a synchronní aktivitou neuronů v mozku. Existuje řada příčin vzniku epilepsie, mezi které se řadí genetické faktory, porodní komplikace, poranění mozku, infekční choroby, či mozkové nádory. Vzhledem k multifaktoriální podstatě onemocnění je současná farmakologická léčba symptomatická a je zaměřená na potlačení záchvatů, avšak přibližně u 30 % pacientů není účinná. V současnosti je stále častěji využíván personalizovaný přístup pro diagnostiku a léčbu epilepsie s cílem identifikovat potenciálně patologické mutace v genech souvisejících s epilepsií. Ve spolupráci s Fakultní nemocnicí v Motole jsme vybrali potenciálně patologické mutace ve vybraných genech (např. PIK3CA, DCX) u pacientů s epilepsií. Pro testování efektu konkrétní mutace in vitro využíváme metodu reprogramování periferních krevních mononukleárních buněk na indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs). U získaných buněk je nejprve nutné charakterizovat jejich pluripotentní stav. iPSCs je možné diferencovat směrem k neurální linii. Pomocí CRISPR/Cas9 systému je možné do kontrolní linie iPSCs zavést potenciálně patologickou mutaci a následně diferencovat směrem k neurální linii. Dále budeme sledovat vliv mutace na změnu morfologie neurálních buněk, genové exprese nebo metabolických vlastností. Z dlouhodobého hlediska má tento přístup potenciál přispět k přesnější diagnostice epilepsie a výběru vhodné farmakologické léčby pro konkrétního pacienta

MECHANIZMUS VZNIKU KRANIOCEREBRÁLNÍHO PORANĚNÍ U CHODCŮ PŘI SRÁŽCE S TRAMVAJÍ

Hylmarová D, Kubový P, Otáhal J, Jelen K

Fakulta tělesné výchovy a sportu Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika

Kraniocerebrální traumata v současnosti představují významnou příčinu invalidity, snížení kvality života a značnou socioekonomickou zátěž. Kolejová vozidla se využívají v městské hromadné dopravě v hojné míře. V rozmezí let 2007-2020 bylo na základě informací Policie ČR evidováno 76 nehod, kdy následkem střetu tramvaje s chodcem došlo k usmrcení, a při dalších 245 vznikla těžká zranění. Tyto alarmující údaje upozorňují na nutnost dalšího

vývoje inovativních technických řešení pro minimalizaci negativních dopadů těchto srážek. Cílem studie bylo analyzovat vzájemné silové působení tramvaje a chodce, včetně účinků na tělo sledované osoby. Precizní analýza srážky ve vztahu ke vzniku kraniocerebrálního poranění umožní vylepšit a validovat virtuální model chodce, který bude využit v rámci konstrukčního procesu k tvarovým úpravám čela tramvaje a minimalizaci rizika vzniku závažných poranění. Data pro vytváření modelu jsme získali na základě analýzy 33 crash-testů probíhajících na zkušebním úseku depa Dopravního podniku hlavního města Prahy. Byla použita figurína představující typického představitele mužské populace (Jasti Hybrid III). Věrohodnost reprezentace biomechanických vlastností segmentů a jejich kloubních spojení je u ní považována za vysokou, stejně tak možnosti jejího přístrojového vybavení. Figurína je osazena akcelerometry a goniometry. K záznamu dat byly dále využity dvě rychlokamery, systém pro záznam a analýzu pohybu MoCap-Qualisys a dvě tenzometrické desky Kistler pod chodidly figuríny. Byla provedena série měření, kdy při rychlostech v rozmezí 5-20 km/h došlo k přímým čelním a bočním střetům figuríny s tramvají.

Průběh srážky můžeme na základě analýzy rozdělit na tyto tři časové úseky: fáze primárního nárazu, fáze odraženého pádu a fáze dopadu. Jako velmi důležitý se ukazuje vliv tření mezi podložkou a botami figuríny. Významné následky mívá dopad figuríny na zem, který je důsledkem akcelerovaného pádu. Z dosavadních experimentů se ukazuje, že velikost a míra poranění je ovlivňována zejména tvarem čelní části vozu, který určuje kinetiku figuríny při primárním nárazu a poté průběh kinematiky sražené figuríny a důsledky sekundárního nárazu. Nejkritičtější částí těla z hlediska závažnosti a četnosti zranění je hlava. K impaktu dochází během primárního nárazu a poté i při kontaktu se zemí při dopadu, popřípadě nárazem na jinou překážku. Jako zásadní se ukazuje kombinace poměrně velké výsledné setrvačnosti hlavy a mechanických predispozic lebky, krční páteře a měkkých tkání krku. Klíčovým parametrem pro odhad míry poranění je průběh zrychlení hlavy. Ve většině případů dochází během střetu ke kombinaci lineárního a angulárního zrychlení. Své maximální hodnoty dosahuje zrychlení hlavy zpravidla až ve fázi dopadu (sekundární náraz). Vznikají závažná kraniocerebrální poranění, kdy zejména v důsledku krvácení může v omezeném prostoru lebeční dutiny rychle docházet ke zvýšení nitrolebního tlaku a ke kompresi mozku. Získaná data umožní zefektivnit proces simulace srážek chodce s kolejovými vozidly, a tak navrhnout optimální tvar čela vozidel, aby se minimalizovalo riziko vzniku závažných poranění mozku.

Tato práce je podporována grantovým projektem „Analýza nehodových dějů chodec tramvaj – validace simulačních modelů“ Op VVV s registračním číslem CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008 401.

ZMĚNY POHYBOVÉ AKTIVITY U M4 MYŠÍCH KNOCKOUTŮ PO OVARIIEKTOMII

Janišová K, Křížová M, Mysliveček J
Fyziologický ústav 1. LF UK, Praha, Česká republika

M4 muskarinové acetylcholinové receptory v buněčných membránách neuronů mají důležitou roli v regulaci pohybové aktivity. U M4 myších knockoutů (M4KO) byly v jejich aktivní části dne popsány změny biorytmu v mnoha parametrech. Tyto změny jsou závislé na pohlaví, nastávají pouze u samic. V naší práci jsme se zaměřili na sledování těchto změn u M4KO myší a myší kmene WT (C57Bl/6NTac) u samičího pohlaví po ovariektomii. Srovnávali jsme je s kontrolními skupinami M4KO a WT bez ovariektomie.

Myším byly voperovány do břišní dutiny telemetrické sondy E-Mitter 4000 sledující pohybovou aktivitu a zároveň byla dvěma sledovaným skupinám-M4KO a WT odebrána ovaria. Následně byl telemetrickým systémem se softwarem Vital-View prováděn v minutových intervalech sběr dat po dobu 14 dní a získaná data byla vyhodnocena pomocí programu Chronos-Fit. U samic M4KO po ovariektomii bylo prokázáno snížení pohybové aktivity během jejich aktivní fáze dne, poklesl mesor biologického rytmu, zatímco u samic WT rozdíl v mesoru prokázán nebyl.

Z výsledků experimentu vyplývá, že samičí pohlavní hormony se spolupodílejí na regulaci pohybové aktivity M4 muskarinovými receptory.

ZMĚNY BIOLOGICKÝCH RYTMŮ MUSKARINOVÝCH RECEPTORŮ M4 A M1 Z HLEDISKA ŘÍZENÍ LOKOMOCE

Mysliveček J, Janišová K, Křížová M
Fyziologický ústav 1. LF UK, Praha, Česká republika

V naší nedávné práci [1] jsme identifikovali struktury CNS zodpovědné za řízení biologických rytmů lokomoce M4 a M1 muskarinovými receptory (MR). Nyní jsme sledovali biologické rytmy MR (autoradiograficky) ve strukturách, které jsme dříve identifikovali jako klíčové pro MR řízené biologické rytmy lokomoce (striatum, thalamus a mezigenikulátový lalůček [lgL]) společně s dalšími strukturami, které by potenciálně k těmto změnám mohly přispívat (motorický kortex, zadní hypothalamická oblast [PHA], subparaventrikulární zóna [SPVZ] a suprachiasmatické jádro [SCN]), jednak u kontrolních zvířat (WT), jednak u zvířat, jimž chybí M4 MR (M4 KO). U M4 KO došlo k fázovému posunu biologického rytmu (fázové zdržení) v lgL, SPVZ a PHA. V SCN došlo ke zvýšení počtu ultradiánních period, což ve výsledku vedlo ke zvýšení mesoru biologického rytmu ve striatu a motorickém kortexu. V thalamu se hodnoty nelišily. U M1 MR došlo pouze k fázovému předstihu ve striatu.

Předpokládáme, že tyto změny vedou k námi pozorovanému navýšení lokomoce v aktivní fázi u zvířat, jimž chybí M4 MR.

1. Riljak, V.; Janisova, K.; Myslivecek, J. Lack of M4 muscarinic receptors in the striatum, thalamus and intergeniculate leaflet alters the biological rhythm of locomotor activity in mice. *Brain Struct Funct* 2020, 225, 1615–1629, doi:10.1007/s00429-020-02082-x.

NEINVAZÍVNA IN VIVO DETEKCIA ZÁPALU ČREVA A EX VIVO DETEKCIA KRVI V STOLICI MYŠÍ POMOCOU LUMINOLU AKO DIAGNOSTICKÉHO NÁSTROJA ZÁPALOVÝCH ČREVNÝCH OCHORENÍ

Belvončíková P¹, Konečná B¹, Gromová B¹, Gardlík R¹

¹Ústav Molekulárnej Biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko

Črevné zápalové ochorenia (IBD) označujú chronické nešpecifické zápaly tráviaceho traktu, ktorých prevalencia v populácii neustále narastá. Etiopatogenéza IBD nie je v súčasnosti dostatočne objasnená a diagnostikovaní pacienti sú liečení zväčša protizápalovou liečbou. Animálne modely tvoria dôležitú súčasť výskumu IBD u ľudí s cieľom objasniť imunopatogenézu a zefektívniť diagnostiku IBD. Môžeme u nich sledovať napr. pokles telesnej hmotnosti a markery zápalu v sére, ktoré sú nepriamymi ukazovateľmi zápalu. Histologicky je možné priamo zobraziť patologické procesy, no nevýhodou je relatívna invazívnosť a obmedzené množstvo odberov materiálu. Preto je v súčasnej dobe kladený dôraz na in vivo zobrazovacie techniky, ktoré by umožnili priamu diagnostiku a dlhodobé sledovanie progresie IBD. Príkladom je endoskopia, ktorá však predstavuje riziko infekcie a krvácania. Menej invazívne ultrazvuk a μ CT sú doplnkové zobrazovacie metódy nedostatočné na diagnostiku experimentálnej kolitídy. Potenciálne zaujímavou metódou je zobrazovanie zápalu in vivo prostredníctvom emisie chemiluminiscencie špecifickou reakciou chemickej látky luminol a voľných radikálov prítomných v čreve počas zápalu. Preto bolo cieľom projektu pomocou in vivo chemiluminiscenčnej techniky sledovať zápal čreva a jeho progresiu v akútnom a chronickom animálnom modeli kolitídy. Výsledky štúdie boli doplnené o chemiluminiscenčnú ex vivo detekciu krvi v stolici, ako jedného zo znakov kolitídy. V tomto experimente bola modelovým myšiam z kmeňa C57BL/6J (n=20) chemicky indukovaná kolitída roztokom dextranu sulfátu sodného (DSS) podávaným v pitnej vode. Počas doby trvania experimentu boli sledované markery kolitídy ako pokles hmotnosti, konzistencia stolice (skóre 0-3) a prítomnosť krvi v stolici. V akútnom modeli bol podávaný 2% a 4% DSS po dobu 7 dní nepretržite. V chronickom modeli bol podávaný 2% DSS a voda (wash-out) v 7-dňových cykloch po dobu 6 týždňov.

Vznik zápalu v priebehu času a prítomnosť krvi v stolici ex vivo boli sledované prostredníctvom emisie chemiluminiscencie reakciou s látkou luminol pomocou prístroja IVIS® SpectrumCT In Vivo Imaging System.

V akútnom animálnom modeli kolitídy sa nepodarilo chemiluminiscenčne preukázať prítomnosť zápalu v čreve 2% a 4% DSS skupín myší v porovnaní so zdravou kontrolnou skupinou myší. Napriek tomu bola u 2% skupiny myší chemiluminiscenčne detegovaná prítomnosť krvi v stolici od 5. dňa podávania DSS, a 4% DSS skupiny od 3. dňa podávania DSS. Vizuálne bola krv v stolici pozorovaná u 50% myší 2% DSS skupiny na 6. deň, u 4% DSS skupiny na 5. deň experimentu. V 4% DSS skupine bol pozorovaný výraznejší pokles hmotnosti ($18\pm 6\%$) v porovnaní s 2% DSS skupinou ($10\pm 7\%$) vzhľadom na počiatočnú hmotnosť. V chronickom modeli kolitídy bol pozorovaný postupný nárast chemiluminiscencie 2% DSS myší v priebehu času so signifikantným zvýšením počas 5. týždňa. U 2% DSS skupiny myší bola chemiluminiscenčne detegovaná prítomnosť krvi v stolici, ktorej výskyt zodpovedal obdobiam relapsu. U 2% DSS skupiny bol pozorovaný rastúci pokles hmotnosti na konci 1. ($5\pm 3\%$), 3. ($5\pm 6\%$) a 5. ($8\pm 5\%$) DSS týždňa.

Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že zápal v čreve je možné detegovať chemiluminiscenčne neinvazívnou in vivo metódou iba pri chronickej kolitíde a to najmä počas aktívnej fázy choroby. Zaužívané sledovanie telesnej hmotnosti a konzistencie stolice neodhaľuje zápal hneď na jeho počiatku. Detekcia krvi v stolici luminolom je citlivejšia, dokáže odhaliť prítomnosť zápalu v čreve pred jej viditeľným výskytom v stolici a nástupom prvých klinických príznakov. Táto metóda teda predstavuje potenciálny nástroj na dlhodobé a opakované sledovanie aktivity relapsujúco remitujúcich IBD bez potreby invazívneho zákroku a to nie len v predklinickom výskume, ale aj v klinike. Predmetom nášho súčasného výskumu však naďalej ostáva neinvazívne odhalenie prebiehajúcej patológie tráviaceho traktu pred nástupom znakov a príznakov choroby a to najmä v prípade akútnej formy, respektíve remisie chronickej formy IBD.

Finančné prostriedky na realizáciu tohto projektu boli čerpané z grantov VEGA 1/0674/21 a VEGA 1/0649/21.

VPLYV ELEKTROMAGNETICKÉHO POĽA A MIR-34A-5P NA MIGRÁCIU A GÉNOVÚ EXPRESIU NA BUNKOVÚ LÍNIU KOLOREKTÁLNEHO KARCINÓMU DLD1

Jendrisková S, Herichová I

Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko

Úvod: Funkcia endogénnych miRNA spočíva v RNA interferencii s cieľovými mRNA, ku ktorým sú komplementárne. Výsledkom tejto interferencie je znížená expresia cieľových génov.

Hladiny miRNA môžu byť ovplyvnené rôznymi patologickými ochoreniami, medzi ktoré patrí aj kolorektálny karcinóm. Hladina miR-34a-5p je v tkanivách kolorektálneho karcinómu deregulovaná a pozitívne koreluje s prežívaním pacientov. Časť účinkov miR-34a-5p môže byť sprostredkovaná cez reguláciu cirkadiálneho bunkového oscilátora, ktorý popisuje transkripčno-translačná slučka. Transkripčné faktory BMAL1 a CLOCK sa viažu ako heterodimér na E-box v promótorovej oblasti *per* a *cry* génov, čím spúšťajú ich transkripciu. Následne sa komplex proteínov PER/CRY presúva do jadra, kde inhibuje heterodimér CLOCK/BMAL1, a tým inhibuje svoju vlastnú expresiu. V literatúre je popísaných niekoľko regulátorov molekulárnej transkripčno-translačnej slučky. Príkladom je aj cirkadiálne regulovaný proteín SIRT1 s kapacitou prispievať k degradácii komplexu CLOCK/BMAL1 a proteínu PER2. Podľa *in silico* analýzy má miR-34a-5p väzobné miesto na mRNA hodinového génu *per2* a génu *sirt1*. Génová expresia môže byť ovplyvnená nielen endogénne, prostredníctvom miRNA, ale aj environmentálnymi faktormi – ako je elektromagnetické pole (EMP), ktoré Medzinárodná agentúra pre výskum rakoviny (IARC) v roku 2011 klasifikovala ako potenciálne karcinogénne pre ľudí. Expresia hodinového génu *per2* je v tkanivách KRK signifikantne znížená v porovnaní so zdravým príslušným tkanivom. Hodinový gén *per2* býva skloňovaný aj v kontexte jeho možného tumorsupresorového účinku.

Metodika: V *in vitro* pokusoch bola použitá bunková línia DLD1 odvodená od buniek kolorektálneho karcinómu. Kultivácia buniek prebiehala pri štandardných podmienkach, a to v médiu RPMI 1640 s fetálnym hovädzím sérom a antibiotikami (penicilín a streptomycín, ampicilín) pri 37°C a 5% CO₂. Vysiate DLD1 bunky boli rozdelené podľa faktora elektromagnetického poľa na kontrolnú a experimentálnu skupinu. V experimentálnej skupine boli bunky vystavené pôsobeniu 2.4 GHz s intenzitou 70 mW/m² kontrolná skupina nebola vystavená pôsobeniu EMP. Obe skupiny boli transfekované mimic alebo inhibítormi miR-34a-5p, respektíve ich príslušnou negatívnou kontrolou. Následne bola analyzovaná migrácia buniek pomocou wound healing. Po vyzolovaní mRNA a miRNA a následnej syntéze komplementárnej cDNA bola pomocou real time PCR odmeraná expresia génov *per2* a *sirt1*. **Výsledky:** Transfekované oligá v kontrolnej skupine nemali signifikantný vplyv na expresiu *per2* a *sirt1* (ANOVA, $p > 0,05$). Na druhej strane, transfekcia olig v experimentálnej skupine (EMP) preukázala signifikantné rozdiely v expresii *per2* medzi skupinami transfekovaných olig. Bunky transfekované mimic miR-34a-5p vykazovali signifikantne nižšiu expresiu *per2* v porovnaní s negatívnou kontrolou mimic (ANOVA, $p < 0,05$). Preukázali sme trend k zníženým hodnotám *per2* u buniek transfekovaných mimic miR-34a-5p v EMP skupine v porovnaní s kontrolnou skupinou (t test, $p = 0,055$). Transfekcia mimic miR-34a-5p v experimentálnej skupine (EMP) preukázala trend k zníženej v expresii *sirt1* (ANOVA, $p = 0,091$). Transfekcia olig nemala významný vplyv na migráciu DLD1 buniek v kontrolnej skupine. Transfekcia mimic pre-miR-34a-5p v skupine s faktorom EMP viedla k trendu zníženej migrácie DLD1 buniek v porovnaní s kontrolnou skupinou (t test, $p = 0,065$).

Záver: Faktor EMP v súčinnosti s mimic miR-34a-5p majú kapacitu ovplyvňovať fyziologické parametre ako je génová expresia a migrácia buniek. Signifikantne znížená hladina *per2* po transfekcii mimic miR-34a-5p s faktorom EMP poukazuje na fakt, že koincidencia

faktorov môže sumovať efekt jednotlivých faktorov. V konečnom dôsledku, táto sumácia môže byť jedným z faktorov ovplyvňujúcich vznik resp. progresiu nádorových ochorení, vrátane kolorektálneho karcinómu.

Podporené grantami APVV-16-0209, APVV-20-0241 a VEGA 1/0679/19.

FYZICKÁ AKTIVITA A ENERGETICKÝ VÝDEJ ČESKÝCH TĚHOTNÝCH A KOJÍCÍCH ŽEN

Kovařík M^{1,2}, Kacerovský M², Hronek M^{1,2}

¹Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, ČR; ²Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, ČR

Úvod: Není známo mnoho informací o fyzické aktivitě a celkovém energetickém výdeji v období gravidity a laktace. Cílem této studie tedy bylo sledovat změny spektra fyzických aktivit, celkového energetického výdeje (TEE) a klidového energetického výdeje (REE) v různých fázích gravidity a laktace v populaci českých žen.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 79 zdravých gravidních žen, které byly vyšetřeny v různých fázích gravidity (2., 3. a pozdní 3. trimestr) a laktace (1, 3, 6 a 9 měsíců post partum). V každém ze sledovaných období byl stanoven REE metodou indirektní kalorimetrie a TEE výpočtem s využitím týdenního dotazníku záznamu fyzické aktivity. Z dotazníku byl vyhodnocen také čas strávený jednotlivými aktivitami.

Výsledky: Hodnota REE vzrůstala se zvyšujícím se gestačním věkem a po porodu klesla na pregravidní úroveň. S gestačním věkem rostla i hodnota TEE, ale po porodu zůstala na úrovni konce gravidity. V období laktace trávily ženy kromě kojení a péče o dítě více času také chůzí v porovnání s obdobím gravidity, naopak významně méně času věnovaly např. zaměstnání, spánku, odpočinku, sledování televize, čtení nebo dopravě.

Závěr: Tato studie popsala změny energetického výdeje českých žen v období gravidity a laktace, což by mohlo sloužit k nastavení doporučení ohledně příjmu energie v těchto obdobích. Dokumentovala také změny spektra každodenních činností v souvislosti s laktací a péčí o potomka.

Práce byla podpořena MH CZ–DRO (UHHK, 00179906) a PROGRES Q42.

MYOGLOBINÉMIE A NGAL U MARATONSKÝCH BĚŽCŮ PO ULTRAVYTRVALOSTRNÍM VÝKONU

Novák J¹, Topolčan O², Racek J³, Štork M⁴

¹Ústav sportovní medicíny a aktivního zdraví LF UK v Plzni, Česká republika

²Oddělení imunochemické diagnostiky Fakultní nemocnice v Plzni, Česká republika

³Oddělení klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice v Plzni, Česká republika

⁴Katedra elektroniky a informačních technologií FEL ZČU v Plzni

Úvod: Během intenzivního cvičení vytrvalostního charakteru dochází k redistribuci krve v krevním oběhu. Efektivní průtok plazmy ledvinami se během zátěže snižuje. Při namáhavé tělesné aktivitě a za nepříznivých klimatických podmínek může průtok krve ledvinami klesnout až na 25 % klidové hodnoty. Sportovní výkony tohoto druhu mohou vést k závažnému až nevratnému poškození ledvinných funkcí.

Metodika: Skupinu dobrovolníků v této studii tvořili ultramaratonští běžci (n=28), kteří dokončili závody na třech ultramaratonských tratích: v běhu na 100 km, v běhu na 12 h a v běhu na 24h. Jednalo se vesměs o trénované vytrvalce, ovšem se značně rozdílnou běžeckou výkonností. Dosažené časy v běhu na 100 km se pohybovaly mezi 8:43 až 13:11 h, vzdálenost uběhnutá za 24 h mezi 124 a 181 km. Před startem a po ukončení závodu byly odebrány vzorky krve z kubitální žíly. V této studii jsou uvedeny výsledky myoglobinu a lipokalinu asociovaného s neutrofilní gelatinázou (NGAL).

Výsledky: Po výkonu v ultramaratonském závodě měli všichni účastníci významně zvýšené hladiny myoglobinu (82,3 až 3072,3 µg/l, P < 0,001) a NGAL (124,5 až 266,7 ng/ml, P < 0,001). Mezi běžci byly výrazné individuální rozdíly nejen v počátečních „klidových“ hodnotách, ale především v hodnotách po závodech. Nebyla však pozorována žádná korelace mezi délkou trvání výkonu (v běhu na 100 km) resp. v bězích na 12 h či 24 h a závažností uvedených změn.

Diskuse a závěry: (1) Poškození svalů během ultravytrvalostního běhu může vést k rhabdomyolýze a myoglobinurii a je příležitostně spojeno s akutním selháním ledvin. Když se k zátěži myoglobinem přidá dehydratace, hypovolémie a další faktory, může ledvina reagovat zastavením vylučovacích a metabolických funkcí. (2) Pozátěžové zvýšení sérového kreatininu a NGAL splnilo u některých ze sledovaných ultravytrvalostních běžců kritéria akutního poškození ledvin. (3) Většina případů rhabdomyolýzy však nevyžaduje hospitalizaci a jedinci se zotaví do jednoho týdne. U některých jedinců však může mít rhabdomyolýza závažné následky.

Odkazy: Schiff HB et al. (1978). QJM. Int. J. Med 47(4): 463-472. Milne CJ (1988) Sports Med. 6 (2): 93-106. Lippi G. et al. (2012) CCLM 50 (9): 1585-1589

POSTEROVÁ SEKCE

VPLYV INHIBÍTOROV FOSFODIESTERÁZ NA ZÁPÁL A PĹÚCNE FUNKCIE PRI EXPERIMENTÁLNO M POŠKODENÍ PĹÚC

*Košútová, P, Mikolka, P, Čalkovská, A, Mokr D
Martinsk centrum pre biomedicínu (BioMed) a Ústav fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta,
Univerzita Komenského, Martin, Slovenská republika*

Úvod: Syndróm akútnej respiračnej tiesne (ARDS) je charakterizovaný zápalom v dsledku poškodenia alveolokapilrnej membrány, nadmernej migrácie zápalových buniek a uvoľňovania prozápalových mediátorov. Cyklick AMP je kľčov intracelulárny druh posol, ktor m pri vyšších hladinách protizápalových účinků. Jeho koncentraca závisí od aktivity enzýmov fosfodiesterázy (PDE). Cieľom štúdie je porovnať efekt PDE inhibítorov na experimentálny model poškodenia pľúc.

Metodika: Model ARDS bol u dospelých králikov vyvolan opakovanm lavžovanm pľúc fyziologickm roztokom (30 ml/kg, 9±3krt), pokiaľ hodnota PaO₂ <26,7 kPa pri FiO₂ 1.0. Zvieratá boli rozdelen do 5 skupín: zdrav kontroly bez ARDS (Kontrola), nelieen skupina s ARDS (ARDS), zvieratá s ARDS a lieen PDE inhibítormi (1mg/kg i.v.): neselektívny inhibítor aminofylín (AMINO), PDE3 inhibítor olprinone (OLP), PDE5 inhibítor sildenafil (SILD). Zvieratá boli ventilovan 4 hodiny a pravidelne sme zaznamenávali ventilan tlaky, krvn plyny, celkov a diferenciálny počet buniek v bronchoalveolárnej lavžnej tekutine (BALF). Tvorba pľúcneho edému bola vyjadren ako pomer suchej a vlhkej hmotnosti pľúc. Stanovili sme hladinu zápalových markerov (IL-1 , -8, -6). Výsledky boli štatisticky vyhodnoten one-way ANOVA testom.

Výsledky: Liečba PDE inhibítormi znížila celkov počet buniek v BALF. Zlepšenie pľcnch funkcií bolo pozorovan vo všetkch liečených skupinách počas experimentu. Tvorba pľúcneho edému sa znížila ve skupinách AMINO a OLP. PDE inhibítory znížili hladinu zápalových markerov.

Záver: Terapia rôznymi PDE inhibítormi pozitívne ovplyvnila pľúcne funkcie a výmenu plynov a zmiernila zápal.

Práca bola podporen grantom VEGA . 1/0004/21, APVV-17-0250.

POROVNANIE ZÁPALOVÝCH A VČASNÝCH FIBROTICKÝCH ZMIEN V DVOCH RÔZNYCH ANIMÁLNYCH MODELOCH PLÚCNEJ SILIKÓZY

Adamčáková J¹, Báľentová S², Adamkov M², Barošová R¹, Hanusrichterová J¹, Mikolka P^{1,3}, Pršo K⁴, Kalenská D⁵, Mokr D¹

¹Ústav fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Martin, Slovensko

²Ústav histológie a embryológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Martin, Slovensko

³Martinsk centrum pre biomedicínu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Martin, Slovensko

⁴Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Martin, Slovensko

⁵Ústav anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Martin, Slovensko

Úvod: Silikza je neinfekn ochorenie plc patriace medzi pneumokonizy, ktoré je spsoben vdychovaním čiastočiek prachu obsahujúcich oxid kremit (siliku). Pre toto ochorenie je charakteristick poiatocn progresívny zápal plc a nsledn fibróza tkaniva. Môže sa prejaviť niekoľko tždnov až rokov po vystaven oxidu kremitmu a bežne sa vyskytuje v povolaniach, ako je baníctvo, výroba skla a in. Nakoľko sa v literatúre vyskytujú rôzne modely silikózy s rznou metodikou ich prípravy, cieľom našej štúdie bolo porovnať niektor zpalov a vasn fibrotick zmeny v 2 animálnych modeloch silikózy.

Metodika: V štúdii sme použili 64 dospelých potkanov, samcov kmeňu Wistar, ktoré boli rozdelen do 8 skupín. V štúdii sme porovnali 2 modely silikózy, v ktorých bola jednorazovo orotrachelne podvan silika vo forme suspenzie. V modeli .1 (n=32) sme podávali siliku s rozličnou veľkstou častíc v dávke 50 mg siliky/ml/kg hmotnosti zvieraa. V modeli . 2 (n=32) bola pouit jednotn veľkst častíc siliky (1,5 μ m) v dávke 50 mg siliky v 1 ml fyziologického roztoku/zviera. Kontrolným skupinám bol podvan steriln fyziologick roztok v rovnakom objeme ako v príslušnej modelovej skupine. Na zhodnotenie dynamiky zápalových a skorých fibrotických zmien sme zvieraa usmrtili po 14 resp. 28 dnoch od podania siliky/fyziologického roztoku. Na konci experimentu sme odobrali vzorku krvi, v ktorej sme stanovili celkov a dferencilny počet leukocytov. Plcne tkanivo sme použili na histologick analýzu prtomen emfyzému, atelektázy a prtomen zápalových buniek v interstíciu (tzv. lung injury score) a pomocou farbenia Sirius red sme stanovili prtomen kolagénu v stene bronchiolov a ciev. V homogente plúcneho tkaniva sme stanovili koncentracie niektorých markerov zápalu pomocou ELISA metódy. Výsledky: ELISA analýza plúcneho tkaniva ukázala v modeli . 2 signifikantn zvrsenie koncentracie interleukínu-6 a trend ku zvrseniu chemoknu CXCL1 po 14 dnoch od podania siliky a signifikantn zvrsenie koncentracie tumor nekrotizujúceho faktora-alfa a trend ku zvrseniu interferónu-gama po 28 dnoch od podania siliky v porovnaní s príslušnou kontrolnou skupinou. V modeli . 2 sme po 14 dnoch od podania siliky zaznamenali aj signifikantn zvrsenie počtu neutrofilov v krvi. Histologick analýzy ukázali, že model . 2 vykazoval markantnejšie zmeny v histopatologických zmenách tkaniva a aj v kolagénovej prestavbe väziva bronchiolov a ciev.

Záver: Na základe porovnania dvoch rôznych animálnych modelov silikózy sme dospeli k názoru, že model č. 2 je výraznejší a stabilnejší, a teda aj vhodnejší pre ďalšie pokračovanie našich experimentov.

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0131/22 a APVV-15-0075.

ANALÝZA T1 RELAXAČNÍHO ČASU JAKO NÁSTROJ PRO DETEKCI MYOKARDIÁLNI FIBRÓZY U POTKANA

Stračina T¹, Vitouš J², Hendrych M³, Nádeníček J¹, Panovský R⁴, Babula P^{1,4}, Jiřík R², Nováková M^{1,4}

¹Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, ²Ústav přístrojové techniky, AV ČR, Brno, ³Ústav patologie, Fakultní nemocnice u sv. Anny a LF MU, Brno,

⁴Mezinárodní centrum klinického výzkumu, Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno

Rozvoj myokardiální fibrózy představuje důležitý krok v remodelaci srdce. Může vést až k srdečnímu selhání a následné smrti. Patogeneze myokardiální fibrózy stejně jako možnosti léčby jsou intenzivně zkoumány v rámci preklinického i klinického výzkumu. Na základě současných znalostí se zdá, že časná detekce počátečních stádií fibrózy představuje klíčový krok v léčbě tohoto závažného stavu. Jednou z dnes již standardních metod pro detekci a kvantifikaci myokardiální fibrózy je magnetická rezonance srdce (cMRI). Tato práce představuje pilotní experiment, který měl za cíl validaci metod cMRI pro kvantifikaci myokardiální fibrózy na celotělovém modelu laboratorního potkana. Bylo použito celkem 8 samců potkana kmene Sprague-Dawley ve věku 6 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin: jedinci s myokardiální fibrózou (FIB) a jedinci kontrolní (CON). Pro navození myokardiální fibrózy byla u skupiny FIB provedena unilaterální nefrektomie. Dále byl u této skupiny podáván deoxykortikosteron acetát (20 mg/týden, s.c.). Tato zvířata měla navíc přístup pouze k pitné vodě s přísadkou solí NaCl (0,9 %) a KCl (0,3 %). Kontrolní skupina zvířat podstoupila sham operaci, bylo podáváno vehikulum (arašídový olej; 0,2 ml/týden, s.c.) a zvířata pila vodu bez přísadky solí. Všechna zvířata byla skenována pomocí 9,4 T nukleární magnetické rezonance (Bruker Biospin MRI, Ettlingen, Německo) vždy den před operací a poté 14. a 28. den po operaci. Byly použity standardní metody anatomického zobrazování (pro kvantifikaci end-systolického a end-diastolického objemu levé komory, ejekční frakce levé komory a objemu myokardu), a dále byly použity nové metody cMRI vyvinuté pro kvantifikaci pre- a post-contrastního času relaxace T1 a frakčního extracelulárního objemu. Po posledním cMRI měření byla zvířata usmrcena a byly odebrány vzorky myokardiální tkáně pro histologické zhodnocení přítomnosti fibrózy v myokardu komor. Validované metody cMRI budou dále sloužit pro kvantifikaci myokardiální fibrózy u laboratorních potkanů v navazujících experimentech.

Podpořeno granty MUNI/11/SUP/09/2022 (InGA LF MU), MUNI/A/1246/2020, LM2018129 a LQ1605 (MŠMT ČR), CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_046/0016045 (ERDF).

THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN THE HEALING OF PRESSURE ULCERS

Babula P¹, Hokyňková A², Šín P², Nováková M¹

¹Department of Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

²Department of Burns and Plastic Surgery, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Pressure ulcers are chronic wounds that represent a potential lifelong complication. They can interfere with the patient's physical, psychological, and social well-being and affect significantly quality of patient's life. In some cases, even life-threatening complications occur (infection - sepsis, depletion of proteins, etc.).

Optimal surgical treatment can lead to healing up of pressure ulcer. Operative debridement of pressure ulcers is safe, despite the medical co-morbidities in patients with severe pressure ulcers. Several techniques and approaches, such as chemical debridement or maggot therapy have been introduced. Out of them, sharp surgical debridement and hydro-debridement are much effective than other types.

Sharp surgical necrectomy is considered as a „gold“ standard in debridement of deep ulcers. Next to it, the VersajetTM hydrosurgery system has become popular during the last decade as a tool for tangential excision in surgery. It has several advantages. The small size of the cutting nozzle and the ability of easier manoeuvre the water dissector into small spaces makes it a potentially useful tool for debridement of areas difficult to treat - face, neck, lips, fingers, interdigital spaces, convex and concave areas. With the Versajet System, tissue excision is precise; moreover, it helps to avoid the damage of viable tissue and its vascular supply. Hydrosurgical debridement is therefore safe and effective, reducing the number of bandages and length of healing.

Reactive oxygen species are closely connected with nitric oxide and other reactive nitrogen species, mainly nitric oxide. Nitric oxide itself is implicated in cellular and molecular events of aspects of wound healing that is vasodilation, angiogenesis, inflammation, tissue fibrosis, or immune responses. The results of studies overall suggest that nitric oxide synthesis is essential to the uncomplicated cutaneous wound healing.

This work compares two debridement techniques (sharp/surgical and hydrosurgery) regarding both macroscopic and microscopic evaluation - objective analysis of healing process and microscopically focusing on oxidative stress parameters in systemic (plasma and urine) and local (wound site) samples. Changes of these parameters in patients suffering with pressure ulcer(s) were studied.

The results of this pilot study indicate that wound healing is closely connected with amounts of reactive oxygen and nitrogen species as well as total antioxidant capacity in corresponding tissue. In addition, these changes are in a close relation with changes in ROS and RNS detected in samples of blood plasma, which may indicate predictive value of their levels in wound healing and possible therapeutic strategy in the patients suffering from pressure ulcers.

Supported by NU21-09-00541 and MUNI/A/1133/2021.

EFEKTIVITA FEKÁLNEJ MIKROBIÁLNEJ TRANSPLANTÁCIE (FMT) ČREVNEJ MIKROBIOTY ČLOVEKA MYŠIAM

Tomova A¹, Borbélyová V², Renczés E², Repiská G¹, Šoltys K³, Šoltýsová M¹, Ostatníková D¹
¹Fyziologický ústav, LF UK v Bratislave, Slovensko, ²Ústav molekulárnej biomedicíny, LF UK v Bratislave, Slovensko, ³Katedra mikrobiológie a virológie PriF UK v Bratislave, Slovensko

Poruchy autistického spektra (PAS) sú v súčasnosti predmetom celosvetového lekárskeho a sociálneho záujmu kvôli ich zvyšujúcej sa incidencii. PAS sú heterogénnou skupinou porúch s multifaktorálnym charakterom. Rozhodujúcu úlohu v rozvoji ochorenia zohráva interakcia genetických a environmentálnych faktorov. Pokrok posledných rokov vo výskume osi črevo - mozog naznačuje, že črevná mikrobiota by mohla byť zapojená do vyvoja PAS na už existujúcom genetickom pozadí. Okrem toho bolo preukázané, že zmeny v zložení črevnej mikrobioty sú asociované so zmenami v normálnom fungovaní nervového systému a modulujú mnoho aspektov správania, vrátane prejavov PAS. Takisto, väčšina detí s PAS má aj gastrointestinálne poruchy ako zápcha, hnačka a problémy s výživou, ktorých príčinou môže byť špecificky zmenená črevná mikrobiota. Nedávne metagenomické analýzy odhalili významné zmeny v črevnej mikrobiote detí s PAS v porovnaní s neurotypickým deťmi na úrovni kmeňov a na úrovni druhov. Aby sme mohli preukázať či črevná mikrobiota zahráva úlohu v etiológii a patogenéze alebo len v manifestácii PAS, môžeme urobiť fekálnu mikrobiálnu transplantáciu (FMT) autistickej mikrobioty od detí myšiam a sledovať zmeny v správaní takýchto zvierat. Táto práca je metodickým experimentom na overenie a vyhodnotenie efektivity rôznych schém FMT od človeka zvieratám. FMT bola prevedená per os gavažom jedenkrát alebo trikrát s odstupom jeden týždeň. Následne bola črevná mikrobiota analyzovaná 16s RNA sekvenovaním po troch týždňoch po dvoch mesiacoch od transplantácie. Všetky FMT schémy boli urobené na WT myšiach a takisto na SHANK3b^{-/-} myšiach, ktoré sú animálnym modelom PAS. Analýza črevnej mikrobioty preukázala, že pri FMT prichádza k zmene črevnej mikrobioty u WT aj SHANK3b^{-/-} myší, pričom je táto zmena výraznejšia u SHANK3b^{-/-} myší. Výsledky takisto preukázali, že 3xFMT je efektívnejšia, ako 1xFMT. Dôležitým zistením bolo aj to, že po dvoch mesiacoch sa zloženie črevnej mikrobioty myší vracia ku pôvodnej mikrobiote. Na základe našich predbežných výsledkov môžeme povedať, že pre analýzu úlohy črevnej mikrobioty v prejavoch PAS na animálnom modeli je možné použiť FMT od človeka, pričom odporúčame opakovať trikrát a následne sledovať zmeny hladín rôznych biologických markerov ako aj zmeny správania v krátkom časovom intervale po FMT.

Podporené grantmi APVV-20-0114, APVV-20-0070, APVV-20-0139, VEGA 1/0062/21

SLEDOVANIE UKAZOVATEĽOV SYNDRÓMU BAKTERIÁLNEHO PRERASTANIA V TENKOM ČREVE V SÚBORE DETÍ S PORUCHOU AUTISTICKÉHO SPEKTRA

Nemcsicsová D^{1,2}, Tomova A¹, Belica I¹, Ostatníková D¹, Babinská K¹

¹Fyziologický ústav LF UK, Bratislava, Slovenská republika, ²Gastroenterologické centrum ASSIDUO, Bratislava, Slovenská republika

Úvod: U detí s poruchou autistického spektra je pozorovaný vyšší výskyt gastrointestinálnych porúch v porovnaní s neurotypickou populáciou. Záujem smeruje k črevnej mikrobiote a jej poruchám. Iba malý počet štúdií sledoval u osôb s poruchou autistického spektra črevnú mikrobiotu v tenkom čreve. Nepriamou metódou na stanovenie dysbiózy v tenkom čreve sú dychové testy, ktoré sú založené na analýze plynov (vodíka - H, metánu - MT) produkovaných črevnými baktériami pri fermentácii sacharidov.

Metodika: Výskumný súbor pozostáva z dvoch skupín. Deti s potvrdenou poruchou autistického spektra (PAS; n = 25; vek = 8.2±3.2) a kontrolný súbor neurotypických detí (NT; n = 19; vek 8.9±3.8 rokov). Všetky deti absolvovali dychový test na dychovom analyzátore Bedfont GastroCH4ECK. Vyšetrenie sa realizovalo nalačno po vypití neresorbovateľného sacharidu (laktulóza) a vydychovaný vzduch bol meraný v 20 min. intervaloch počas 120 min. Zvýšenie hodnoty koncentrácie vodíka o ≥ 20 ppm a metánu o ≥ 10 ppm oproti bazálnym hodnotám je považované za signifikantné pre Syndróm bakteriálneho prerastania v tenkom čreve. Rodičia detí vyplnili dotazník ohľadom gastrointestinálnej dysfunkcie. Prvotná deskriptívna analýza zahŕňala výpočet stredných hodnôt, charakteristík variability a prevalencie pre obe skupiny. Následne – v rámci hľadania kľúčových rozdielov medzi PAS a NT deťmi – sme okrem hodnôt dychových testov analyzovali aj demografické (pohlavie, vek) a gastrointestinálne ukazovatele (stav a konzistencia stolice, bolesti brucha, typ diéty). Za použitia konceptu GLM sme vytvorili sériu 13-tich modelov (osobitne pre každú testovanú premennú), na ktorých komponenty bola aplikovaná analýza deviancie (2 testom). Následne sme z modelov extrahovali odds ratio s 95% intervalom spoľahlivosti (OR; “pomer šancí”), ktoré pre každú z testovaných premenných udáva, do akej miery je jej úroveň zvýšená (častejšia) u detí s PAS.

Výsledky: Pozitivita dychových testov (dtH, dtMT) je zhodná pre obe skupiny (dtH: PAS = 56%; CI95% = 35–76%; NT = 47%; CI95% = 24–71%; dtMT: PAS = 20%; CI95% = 7–41% NT = 11%; CI95% = 1–33%;). Deti s PAS v porovnaní s NT vykazujú častejšiu zápchu (OR = 10.6; CI95% = 1.9–205.4), tvrdú stolicu (OR = 5.2; CI95% = 1.6–34.3), bolesť brucha (OR = 4.1; CI95% = 1.7–13.7) a meteorizmus (OR = 2.5; CI95% = 1.4–5.0). Modely taktiež naznačujú, že deti s PAS vykazujú vyššiu selektivitu v jedle (OR = 2.8; CI95% = 1.5–6.7) a všeobecne problémy s trávením a vylučovaním sú intenzívnejšie, čo sa týka závažnosti (OR = 1.8; CI95% = 1.3–2.7). Vplyv veku alebo medzipohlavných rozdielov nebol preukázaný.

Záver: Výsledky dychových testov poukazujú, že Syndróm bakteriálneho prerastania v tenkom čreve sa u autistických detí nevyskytuje vo zvýšenej miere oproti neurotypickým deťom, napriek tomu, že vykazovali zvýšený výskyt gastrointestinálnych ťažkostí. Pomerne vysoké percento pozitivity dychových testov v oboch skupinách detí naznačuje prítomnosť dysbiózy v tenkom čreve a sú potrebné ďalšie analýzy markerov črevnej dysfunkcie a črevnej mikrobioty na vyjasnenie možných príčin.

VLIV PŘÍRODNÍ MINERÁLNÍ VODY VINCENTKA NA ZÁNĚTLIVÉ ONEMOCNĚNÍ ŽALUDKU A DUODENA U LABORATORNÍHO POTKANA

Budinskaya K, Nádeníček J, Stračina T, Hendrych M, Bartáková A, Šudáková M, Nováková Z, Nováková M, Babula P.

Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika

Gastritida je jedno z nejčastějších onemocnění gastrointestinálního traktu u člověka, které se projevuje i v dalších částech trávicí trubice, především v duodenu. Jelikož gastroenteritidy mají v populaci vysokou prevalenci, je cílem této pilotní studie ověřit na zvířecím modelu empiricky pozorované zmírnění až vymizení příznaků gastritidy u pacientů, kteří v rámci lázeňského pobytu procházejí pitnou kúrou přírodní minerální vody Vincentky.

Metodika: V rámci experimentu bylo použito 16 laboratorních potkanů kmene Wistar (samci ve věku jednoho měsíce, hmotnost 240–280 g), kteří byli rozděleni do dvou skupin. Jedna (kontrolní) skupina zvířat dostávala prvních 7 dní orogastrickou sondou vodu v denní dávce 0,9 ml/100 g aktuální tělesné hmotnosti (ExKo) a druhá skupina zvířat dostávala ve stejné dávce Vincentku (ExVi). Před zahájením aplikace tekutin probíhala u všech zvířat v rozsahu 1 týdne adaptační fáze. Osmý den byl oběma skupinám zvířat indukován zánět žaludku pomocí roztoku indomethacinu v dávce 1 ml roztoku na 100 g hmotnosti zvířete podávaný orogastrickou sondou. Dvacet čtyři hodin po indukci akutního zánětu byla zvířata utrácena, intrakardiální punkcí byl proveden odběr krve doprovázený pitvou a odběrem žaludku a duodena. Odebrané tkáně a krev byly vyšetřeny standardní histologickou mikroskopií, řadou imunohistochemických a biochemických metodik. Pro statistické hodnocení byl využit program Statistika 14.0.0.15.

Výsledky: V rámci experimentu jsme našli signifikantně vyšší hodnoty parametrů antioxidační kapacity plazmy krve u skupiny ExVi versus ExKo: koncentrace sulfanylové skupiny 225,5 (219,9-272,0) vs. 184,6 (108,4-234,8 $\mu\text{mol/l}$), $p < 0,05$; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid 0,104 (0,105-0,815) vs. 0,103 (0,102-0,104 (mgGA/ml)), $p < 0,05$. Dále pak signifikantně nižší parametry oxidativního stresu: malondialdehyd $4,22 \pm 0,76$ vs. $5,49 \pm 1,32$, $p < 0,05$.

Závěr: Dle našich pozorování a hodnocení v rámci histologické mikroskopie lze konstatovat, že skupina laboratorních potkanů kmene Wistar (samci) vykazuje při sedmidenním vystavení sliznice gastrointestinálního traktu účinkům „minerální vody Vincentka z přírodního léčivého zdroje“ snížené množství peptických erozí a ulcerací žaludku a duodena, oproti skupině bez „pití Vincentky“ před aplikací akutního zánětu. Můžeme se domnívat, že „minerální voda Vincentka z přírodního léčivého zdroje“ je pravděpodobně příčinou ochraňující sliznici GIT před působením akutního zánětu.

Dle výsledků vyšetření plazmy krve můžeme předpokládat, že Vincentka zvyšuje antioxidační schopnosti organismu. Z nálezu menšího množství ulcerací žaludku u skupiny ExVi lze usuzovat, že Vincentka zároveň snižuje i známky oxidativního stresu.

Podpořeno: Výzkumný projekt „Od buňky k medicíně“ MUNI/A/1133/2021; výzkumná studie „Ověření empirických pozorování účinků „minerální vody Vincentka z přírodního léčivého zdroje“ za využití experimentálních modelů“.

EXPOZÍCIA SVETLU POČAS NOCI NARÚŠA CIRKADIÁNNE REGULOVANÚ MOBILITU LEUKOCYTOV POČAS FYZIOLOGICKÝCH PODMIENOK AJ ZÁPALU U POTKANA

Jerigová V, Zeman M, Okuliarová M

Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta UK, Bratislava, Slovensko

Úvod: Fyziologické procesy, vrátane imunitných funkcií vykazujú cirkadiánne rytmy, ktoré sú synchronizované pravidelným striedaním svetla a tmy. Vystavenie tlmenému svetlu počas noci (dLAN) znižuje stabilitu cirkadiánneho systému, čo môže mať za následok narušenie cirkadiánnej kontroly fyziologických funkcií. Naším cieľom bolo preto zistiť, či dLAN môže ovplyvniť dennú variabilitu v mobilite bielych krviniek a od fázy dňa závislú akútnu zápalovú odpoveď stimulovanú lipopolysacharidom (LPS).

Metodika: Samce Wistar potkanov boli rozdelené na kontrolnú skupinu s režimom svetlo:tma 12:12 h (LD: L ~150 lux; D = 0 lux) a skupinu vystavenú tlmenému svetlu počas noci (dLAN: L ~150 lux; D ~2 lux). Po dvoch týždňoch bola polovica potkanov imunologicky stimulovaná i.p. injekciou LPS v dávke 1 mg/kg a druhej polovici zvierat bol aplikovaný sterilný fyziologický roztok (FR) buď na začiatku pasívnej (ZT2) alebo aktívnej fázy (ZT14) dňa. V krvi sme 24 h po LPS stimulácii pomocou prietokovej cytometrie analyzovali počet jednotlivých populácií leukocytov (Le), ako aj funkčnú aktivitu neutrofilov (Ne). Po deviatich dňoch boli zvieratá opätovne stimulované s LPS alebo FR v ZT2 alebo ZT14. Aby sme zistili tkanivovú infiltráciu imunitnými bunkami v reakcii na LPS, analyzovali sme pomocou imunofluorescencie špecifické markery makrofágov (CD68) a Ne (myeloperoxidázu) na rezoch obličiek 3 hodiny po stimulácii. Western blotom sme hodnotili expresiu proteínov asociovaných s renálnym zápalom (CD68 a NF- κ B).

Výsledky: Dvojtýždňová expozícia potkanov dLAN viedla k strate pozorovanej dennej variability počtu cirkulujúcich Le, predovšetkým lymfocytov (Ly) a Ne. Potkany na LD režime vykazovali zníženie počtu Le v cirkulácii po LPS stimulácii v ZT2 a naopak vzostup po stimulácii v ZT14. Počet Ne v odpovedi na LPS stúpol s výraznejšou neutrofiliou po podaní LPS v ZT14. Na druhej strane LPS indukoval pokles Ly v cirkulácii. Rovnako počet monocytov (Mo) sa znížil po imunitnej stimulácii v ZT2, zatiaľ čo LPS aplikovaný v ZT14 počet Mo neovplyvnil. U potkanov vystavených dLAN sme zaznamenali narušenie od fázy dňa závislú odpoveď voči LPS, ktorá sa prejavila absenciou zmeny v počte celkových Le, ako aj Mo. Navyše oxidačné vzplanutie Ne bolo potencované po stimulácii LPS v ZT2 u potkanov na dLAN režime, čo viedlo k strate dennej variability pozorovanej na LD režime. Podanie LPS zvýšilo infiltráciu Ne a makrofágov do obličiek LD aj dLAN potkanov a zároveň stimulovalo proteínovú expresiu CD68 a fosforylovanú podjednotku NF- κ B/p65. Bez ohľadu na imunologickú stimuláciu expozícia potkanov dLAN zvýšila počet Ne v kôre obličiek špecificky počas pasívnej fázy dňa v porovnaní s LD režimom.

Záver: Naše výsledky demonštrujú, že aj krátkodobá expozícia dLAN narušila dennú variabilitu kľúčových imunitných buniek v cirkulácii a zmenila ich optimálnu zápalovú reaktivitu v závislosti od fázy dňa. Predpokladáme, že pozorovaná chronodisrupcia imunitnej odpovede môže predstavovať dôležité mechanistické prepojenie medzi svetelným znečistením a jeho nepriaznivými dôsledkami na zdravie.

Podporené grantmi APVV-17-0178 a VEGA 1/0492/19.

TLMENÉ SVETLO POČAS NOCI OVPLYVŇUJE 24 -HODINOVÝ PROFIL EXPRESIE VYBRANÝCH PROTEÍNOV V AORTE POTKANA

Šutovská, H, Molčan, L, Zeman, M

Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovensko

Úvod: Tlmené svetlo v noci (ALAN) patrí v súčasnosti k fenoménu moderného životného štýlu, pretože narušuje pravidelný cyklus svetla a tmy, ktorý je dôležitým faktorom pre synchronizáciu cirkadiálneho systému. Cirkadiálny systém generuje 24 -hodinové rytmy fyziologických a behaviorálnych parametrov, čím pomáha organizmu predikovať záťaž v priebehu dňa. Nesprávne načasovanie svetla je jedným z hlavných rizikových faktorov cirkadiálnej disrupcie. Vystavenie ALAN preto pôsobí ako rušivý environmentálny faktor na fyziologické deje vrátane narušenia 24 -hodinového profilu kardiovaskulárnych parametrov, avšak jeho dôsledky na molekulárnej úrovni sú pomerne málo preskúmané. Cieľ: Analyzovať vplyv ALAN na 24 -hodinovú expresiu vybraných proteínov zapojených do regulácie vazoaktivity aorty v porovnaní s pravidelným svetelným režimom. Metodika: V experimente sme použili samce normotenzných potkanov kmeňa Wistar. Experimentálna skupina zvierat bola vystavená ALAN (1-2 lux) počas 2 týždňov. Kontrolná skupina zvierat bola vystavená pravidelnému svetelnému režimu 12 hodín svetlo (150 lux) a 12 hodín tma (0 lux). Na konci experimentu sme odobrali hrudné aorty potkanov počas 24 hodín (ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18, ZT22; ZT00 = začiatok svetlej fázy dňa). Pomocou western blot metódy sme merali expresiu mineralokortikoidného receptora (MR), angiotenzínového receptora typu 1 (AT1R), transformujúceho rastového faktoru- β 1 (TGF- β 1), kinázy myozínového ľahkého reťazca (MLCK), sarkoplazmatickej vápnikovej pumpy (SERCA) a fibulínu. Výsledky: Expresia proteínov MR ($p < 0,05$), AT1R ($p < 0,001$), TGF- β 1 ($p < 0,01$) a fibulínu ($p < 0,001$) bola signifikantne odlišná v závislosti od času odberu biologických vzoriek, pričom expresia MLCK a SERCA sa počas 24 hodín signifikantne nelíšila. Vystavenie ALAN signifikantne znížilo expresiu MR v ZT10 ($p < 0,05$) a ZT14 ($p < 0,05$) a expresiu AT1R v ZT02 ($p < 0,05$). Vystavenie ALAN nemalo vplyv na expresiu TGF- β 1, MLCK, SERCA a fibulínu. Záver: ALAN znižuje expresiu MR a AT1R u normotenzných potkanov v závislosti od času dňa. Získané výsledky sú v kontexte s našimi publikovanými prácami, ktoré demonštrovali, že ALAN znížil expresiu proteínov regulujúcich kontraktilitu ľavej komory srdca.

Práca bola podporená grantami APVV-17-0178 a VEGA 1/0492/19

OVLIVNÍ DLOUHODOBÁ ABSENCE SVĚTLA KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ ASPEKTY SPÁNKU U ČLOVĚKA? (HYPOTÉZA)

Cieslarová J¹, Zavadová A², Strakoš J², Jarkuliš V², Škrda D², Diomin E², Skopelidou V², Švorc Jr. P², Michalčák T², Malůš M¹

¹Katedra psychologie, Filozofická fakulta, Ostravská Univerzita, Ostrava, Česká republika

²Ústav fyziologie a patofyziologie, Lékařská fakulta, Ostravská Univerzita, Ostrava, Česká republika

Úvod: Spánkem strávíme zhruba třetinu svého života, lze proto říct, že spánek je nedílnou součástí našeho bytí. Ovlivňuje téměř všechny typy tkání a systémů v těle a jeho chronický nedostatek nebo špatná kvalita zvyšuje riziko poruch v mnoha oblastech zdraví. Cílem této studie je vyhodnotit efekt pobytů v prostředí s omezenou zevní stimulací (známe také pod názvem Terapie Tmou) na vybrané aspekty spánku, především, cykly spánku, délka spánku a jeho kvalitu.

Metodika: Experimentální skupinu budou představovat studenti ve věku od 19 do 26 let, umístěných na 96 hodin do speciální místnosti s maximální tmou. Místnost bude splňovat podmínky pro pohodlný a bezpečný pobyt, zároveň bude umístěna na tichém místě. Po celou dobu tohoto pobytu bude participant sám, bez možnosti používat zařízení, které by emitovalo světlo, zároveň mu nebude poskytnuta informace o aktuálním čase. Dostatek jídla a pití bude dle potřeby zajištěn. Participant bude mít během pobytu na svém těle připevněné zařízení, které bude telemetricky snímat EEG. Pro výzkum kvality spánku bude použita baterie testů skládajících se z PSQI a MEQ. Participant vyplní dotazník měsíc před nástupem k pobytu, v den ukončení pobytu a následně měsíc po ukončení pobytu s možností dalšího monitoringu. **Výsledky:** Spánek ovlivňuje téměř všechny typy tkání a systémů v těle, od mozku, srdce a plic až po metabolismus, imunitní funkce, náladu a odolnost vůči chorobám, důležitou roli hraje pro řadu mozkových funkcí. Výzkumy ukazují, že chronický nedostatek spánku nebo špatná kvalita spánku zvyšuje riziko poruch včetně vysokého krevního tlaku, kardiovaskulárních onemocnění, cukrovky, deprese a obezity. To jsou všechno již známé poznatky. Co není zkoumáno, je vliv dlouhotrvající tmy na spánek jako na jeden důležitý aspekt života. Nakolik se jedná o hypotézu, je předpokládán efekt (pozitivní/negativní) na kvalitu a kvantitu spánku po tak dlouhé absenci světla.

Závěr: Ačkoliv v posledních letech přibývalo studií zabývajících se omezenou zevní stimulací (Chamber REST, Flotation REST), její vliv na spánek člověka není dosud náležitě prozkoumán a adekvátně popsán. Studie má za cíl vyhodnotit dlouhotrvající expozici tmy na kvalitu spánku u zdravých mladých lidí, přinést nové poznatky v tomto směru a zjistit, zda pobyt v prostředí s omezenou zevní stimulací může mít benefity pro spánek všeobecně.

Cieslarová J¹, Zavadová A², Strakoš J², Jarkuliš V², Škrda D², Diomin E², Skopelidou V², Švorc Jr. P², Michalčák T², Malůš M¹

¹Katedra psychologie, Filozofická fakulta, Ostravská Univerzita, Ostrava, Česká republika

²Ústav fyziologie a patofyziologie, Lékařská fakulta, Ostravská Univerzita, Ostrava, Česká republika

STIMULÁCIA PULZNÝM SVETLOM AKTIVUJE NEUROTROFICKÉ A NEUROPROTEKTÍVNE FUNKCIE MÜLLEROVÝCH BUNIEK

Zloh M¹, Kutílek P², Štofková A¹

¹Ústav fyziologie, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Ke Karlovu 4, Praha 2, Česká republika, ²Fakulta biomedicínského inženýrství, České vysoké učení technické v Praze, nám. Sítná 3105, Kladno 2, Česká republika

Müllerové bunky predstavujú dominantný typ glie v sietnici, kde sa podieľajú na udržiavaní jej štruktúrálnej a funkčnej stability a zároveň podporujú regeneráciu poškodeného tkaniva. Cieľom tejto práce bolo charakterizovať neurotrofické a neuroprotektívne účinky stimulácie indukovanej striedavou zmenou svetlých a tmavých podnetov a určiť podiel Müllerových buniek na týchto procesoch v modeloch in vivo a in vitro. V modeli in vivo boli myši vystavené stimulácii 12 hod denne po dobu 14 dní. Výsledky ukázali, že svetelná stimulácia zvýšila génovú a proteínovú expresiu BDNF v sietnici kvantifikovanú qRT-PCR a Western blotom. Zároveň bola detegovaná up-regulácia BDNF v Müllerových bunkách pomocou imunofluorescencie. V experimentoch in vitro bola použitá línia potkaních Müllerových buniek (rMC-1), ktorá bola stimulovaná 48 hod pulzným svetlom s rovnakou frekvenciou zmien svetla a tmy ako v modeli in vivo. In vitro sa potvrdil neurotrofický účinok stimulácie Müllerových buniek pulzným svetlom, ktorý sa prejavil zvýšenou proteínovou expresiou BDNF. Súčasne výsledky Western blotu ukázali, že stimulácia pulzným svetlom potlačila v Müllerových bunkách aktiváciu transkripčného faktoru NF-kappaB a jadrovú expresiu sirotských nukleárných receptorov Nor-1 a Nur77, ktoré sa uplatňujú v regulácii zápalových procesov. Pridanie exogénneho BDNF k Müllerovým bunkám stimulovaným pulzným svetlom potencovalo inhibíciu NF-kappaB a Nur77 a viedlo k zvýšeniu tvorby nervového inductívneho faktora VGF. Podobné účinky boli pozorované aj po pridaní BDNF k nestimulovaným Müllerovým bunkám, avšak s nižšou inhibíciou aktivity NF-kappaB a nižším nárastom tvorby VGF v porovnaní s bunkami stimulovanými pulzným svetlom. Prietoková cytometria ďalej odhalila výrazný pokles počtu Müllerových buniek exprimujúcich markery reaktívnej gliózy, nestin a GFAP, po stimulácii pulzným svetlom v kombinácii s exogénnym BDNF. Tieto výsledky ukazujú, že stimulácia indukovaná striedaním svetlých a tmavých podnetov priamo pôsobí na Müllerové bunky a aktivuje ich neurotrofické a neuroprotektívne funkcie tým, že podporuje tvorbu BDNF v Müllerových bunkách a oslabuje reaktívnu gliózu. Tieto zistenia by mohli prispieť k rozvoju efektívnejších terapeutických stratégií v liečbe neurodegeneratívnych a neuroinflamačných ochorení sietnice.

Grantová podpora: GAUK 378421, PRIMUS/17/MED/7, Progres Q35

NERVOVÁ AKTIVITA TYČINEK REGULUJE VSTUP IMUNITNÍCH BUNĚK DO SÍTNICE PROSTŘEDNICTVÍM DOPAMINERGNÍ MODULACE HEMATORETINÁLNÍ BARIÉRY

Štofková A¹, Zloh M¹, Andreánská D¹, Fišerová I^{1,2}, Kubovčiak J³, Hejda J⁴, Kutílek P⁴, Murakami M⁵

¹Ústav fyziologie, 3. LF UK, Praha, ČR, ²Ústav patofyziologie, 3. LF UK, Praha, ČR, ³Servisní laboratoř funkční genomiky a bioinformatiky, ÚMG AV ČR, Praha, ČR, ⁴FBMI ČVUT v Praze, ČR, ⁵Molecular Psychoimmunology, Hokkaido University, Sapporo, Japan

Úvod: Poškození hematoretinální bariéry (HRB) hraje důležitou roli v patogenezi autoimunitní uveitidy a je hlavní příčinou ztráty zraku. Naše předchozí studie prokázaly, že interakce mezi neurony a endotelovými buňkami sítnicových, mozkových a míšních cév významně regulují průtok krve a propustnost bariér pro infiltraci autoreaktivních T lymfocytů do nervové tkáně v experimentální autoimunitní uveoretinitidě (EAU) a encefalomyelitidě. Cílem této studie bylo objasnit vliv a mechanismus působení nervové aktivity tyčinek na HRB a vznik EAU indukované aktivní imunizací.

Hypotéza a metodika: Ve studii byl použit model myši s mutací rd17 s defektem exprese alfa podjednotky tyčinkového transducinu vedoucí k dysfunkci tyčinek a šerosleposti. Základní hypotézou studie byl předpoklad, že dysfunkce tyčinek způsobí remodelaci nervové tkáně sítnice, která ovlivní HRB a rozvoj autoimunitního zánětu v modelu EAU. Remodelace sítnice a její vliv na rozvoj EAU byly hodnoceny pomocí profilování transkriptomu, identifikace klíčových diferenciálně exprimovaných genů a signálních drah a následného funkčního ověření jejich významu v sérii in vivo a in vitro experimentů. V analýzách byly použity metody: qRT-PCR, sekvenování nové generace, Western blot, průtoková cytometrie, ELISA, imunohistochemie, oftalmoskopie a behaviorální vyšetření zrakové ostrosti.

Výsledky: Výsledky ukázaly, že u myši s dysfunkcí tyčinek dochází především k remodelaci dopaminergního systému sítnice, která má za následek významné zhoršení průběhu EAU, jemuž lze předejít systémovým nebo lokálním podáním L-DOPA v časně (preklinické) fázi EAU. Výsledky in vitro studie potvrdily, že dopamin působí na endotelové buňky sítnicových kapilár inhibicí aktivity transkripčních faktorů NF-kappaB a STAT3 a snížením exprese jejich cílových genů, jako jsou geny kódující chemokiny, které se podílejí na infiltraci T lymfocytů do sítnice. **Závěr:** Studie ukazuje, že tyčinkami zprostředkovaná aktivace retinálního dopaminergního systému se významně uplatňuje v homeostatické kontrole integrity HRB a ochraně sítnice před nadměrnou infiltrací imunitních buněk. Naše studie také naznačuje, že léčba L-DOPA by mohla představovat novou terapeutickou strategii pro autoimunitní uveitidu u onemocnění spojených s dysfunkcí tyčinek.

Grantová podpora: GAČR 18-11795Y, PRIMUS/17/MED/7, Progres Q35

ASOCIÁCIA KONCENTRÁCIE VITAMÍNU D S MIEROU ZÁVAŽNOSTI PRÍZNAKOV PORÚCH AUTISTICKÉHO SPEKTRA

Repiská G¹, Janšáková K¹, Belica I¹, Bičíková M², Celušáková H¹, Máčová L², Janík Szapuová Ž¹, Ostatníková D¹

¹Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika, ²Endokrinologický ústav, Praha, Česká republika

Poruchy autistického spektra (PAS) sú charakterizované narušením sociálnej interakcie, komunikácie a stereotypným správaním a záujmami. Úloha vitamínu D v etiopatogenéze PAS je diskutovanou témou, avšak vzťah medzi jeho koncentráciou a behaviorálnymi ukazovateľmi nie je doposiaľ veľmi popísaný. Cieľom našej štúdie bola analýza vzťahu vitamínu D u detí s PAS a závažnosťou narušenia uvedenej triády príznakov.

Výskumný súbor tvorilo 41 chlapcov (4,91±1,7 rokov) s potvrdenou diagnózou PAS podľa diagnostických nástrojov objektívneho pozorovania (ADOS-2) a rozhovoru s rodičmi dieťaťa (ADI-R). V rámci ADOS-2 sa vyhodnocuje sociálny afekt a úzko vymedzené záujmy a repetitívne vzorce správania. ADI-R sleduje tri domény: A (sociálna interakcia), B (komunikácia) a C (repetitívne správanie a záujmy). Koncentrácie vitamínu D (kalcitriolu) boli stanovené použitím ECLIA metódy.

V rámci vyšetrovaného súboru neverbálnych chlapcov sme nepreukázali významný vzťah koncentrácie vitamínu D v plazme s mierou závažnosti príznakov PAS podľa ADOS-2 ani podľa rozhovoru s rodičmi dieťaťa ADI-R. Napriek tomu, že sme nepozorovali signifikantné rozdiely v koncentrácii vitamínu D u detí s PAS medzi letom a zimou, s poklesom vitamínu D v zimnom období bol spojený nárast závažnosti príznakov týkajúcich sa kvantitatívnych abnormalít v komunikácii (podľa ADI-R) ($r=0,615$, $p=0,002$).

Pre stanovenie asociácie aktuálnej koncentrácie vitamínu D spojenej s rôznymi komorbiditami vyskytujúcimi sa u detí s PAS, napr. gastroenterologického či spánkového charakteru, či stanovenie mechanizmu a metabolických dráh, sú potrebné ďalšie analýzy.

Podporené grantami APVV 15-0045, APVV 15-0085 a APVV 20-0070

AKÚTNY ÚČINOK PSYCHOSOCIÁLNEHO STRESU NA ÚROVEŇ SALIVÁRNYCH MARKEROV OXIDAČNÉHO STRESU U DETÍ

Belica, I^{1,2*}, Janšáková, K^{1*}, Rajčániová, E², Rajčáni, J³, Kyselíková, K¹, Celušáková, H¹, Lazníbatová, J², Ostatníková, D¹

¹Fyziologický ústav LF UK, Sasinkova 2, Bratislava, Slovenská republika

²Výskumný ústav detskej psychológie a patopsychológie, Cyprichova 42, Bratislava, Slovenská republika, ³Katedra psychológie, Filozofická fakulta UK, Gondova 2, Bratislava, Slovenská republika

*autori prispeli rovnako – zdieľané prvoautorstvo

Úvod: Účinok chronického stresu na koncentráciu markerov oxidačného stresu je skúmaný

pomerne často, ale účinok krátkodobého stresu je v tomto kontexte skúmaný zriedkavo. Naším cieľom bolo zistiť, či akútna psychosociálna záťaž u detí spôsobuje zmeny salivárnych ukazovateľov oxidačného stresu a antioxidačného statusu.

Metodika: Výskumný súbor tvorilo 46 neurotypických detí vo veku 10-12 rokov. Každé dieťa bolo vystavené psychosociálnej záťaži v podobe Trierovho sociálneho testu stresu (TSST). Pred aj po teste bola dieťaťu odobratá slina. Počas iného dňa, ktorý slúžil ako kontrolný, kedy deti neboli vystavené stresovému podnetu, boli odobrané opäť dve vzorky sliny v podobnom časovom rozpätí ako v deň expozície stresu. Vo vzorkách slín sme analyzovali ukazovatele peroxidácie lipidov ako sú látky reagujúce s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS), marker karbonylového stresu akým sú koncové produkty pokročilej glykácie (AGEs), ako aj markery antioxidačného statusu ako celková antioxidačná kapacita (TAC) a látky schopné redukovať železitý kation (FRAP). Štatistickú analýzu sme vykonali pomocou ANOVA pre opakované merania.

Výsledky: Po expozícii stresovému podnetu sme pozorovali významný nárast salivárnej koncentrácie FRAP ($p = 0,005$). Hoci sme nezistili zmenu koncentrácie TBARS po expozícii stresu, zaznamenali sme jeho významne vyššiu koncentráciu v prvej aj druhej vzorke sliny počas dňa expozície v porovnaní s prvou a druhou vzorkou sliny počas kontrolného dňa ($p = 0,000$). Nezaznamenali sme žiadne zmeny koncentrácií markerov AGEs ani TAC. Záver: Krátkodobé vystavenie stresu môže stimulovať antioxidačnú aktivitu, čo môže predstavovať ďalšiu z množstva kompenzačných reakcií organizmu pri vystavení psychosociálnej záťaži.

Práca bola podporená grantami: APVV 15-0045, APVV 15-0085, VEGA 1/0802/20, APVV-20-0070, APVV-20-0139

VPLYV OXYTOCÍNU NA ENDOPLAZMATICKÉ RETIKULUM NEURONÁLNYCH BUNIEK

Havránek T¹, Mihalj D¹, Bačová Z¹, Bakoš J^{1,2}

¹Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum, SAV, Bratislava, Slovensko

²Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko

Úvod: Oxytocín ovplyvňuje rast a morfológiu neuronálnych buniek a je pravdepodobné, že môže pôsobiť aj na cytoskeletové proteíny, vezikulárny aparát a endoplazmatické retikulum. Hoci je známe, že oxytocín stimuluje vyplavovanie vnútrobunkového vápnika, nie je dostatočne preskúmané, či má oxytocín účinky aj na štruktúru a komponenty endoplazmatického retikula. Cieľom predkladanej štúdie bolo určiť krátkodobý vplyv oxytocínu na 1) distribúciu markera endoplazmatického retikula v neuronálnych bunkách a 2) expresiu chaperónových proteínov, ktoré sa podieľajú na štruktúrnom usporiadaní endoplazmatického retikula.

Metodika: Myšacie hipokampálne neuronálne bunky E2 boli inkubované v prítomnosti 1 μ M oxytocínu. Po 15, 30, 60 a 120 minútach inkubácie boli vezikuly endoplazmatického retikula špecificky značené (ER-tracker) a ich distribúcia zaznamenaná fluorescenčným mikroskopom. Distribúcia intenzity signálu bola analyzovaná pomocou Image J. Génová expresia

chaperónových molekúl (Grp78 a Grp94) a oxidoreduktázy Ero1b v E2 bunkách v prítomnosti 1 μ M oxytocínu po 1, 2 a 6 hodinách bola stanovená prostredníctvom qPCR.

Výsledky: Inkubácia neuronálnych buniek v prítomnosti oxytocínu viedla k signifikantnému a časovo závislému poklesu intenzity signálu endoplazmatického retikula distálne od bunkového jadra. Aplikácia oxytocínu (1h) signifikantne znížila expresiu chaperónových proteínov (Grp78 a Grp94). Podobný účinok oxytocínu bol pozorovaný v prípade oxidoreduktázy Ero1b, ktorá je zapojená do tvorby disulfidových mostíkov pri maturácii endoplazmatického retikula. Podanie oxytocínu po 6 neovplyvnilo expresiu meraných komponentov endoplazmatického retikula.

Záver: Výsledky poukazujú na potenciál oxytocínu zmeniť membránové proteíny endoplazmatického retikula neuronálnych buniek, čo môže mať význam v transporte proteínov potrebných pre rast neuritov a tvorbu synaptických spojení.

Práca bola podporená grantami VEGA 2/0155/20, VEGA 2/0148/21

VÝVINOVÝ VPLYV OXYTOCÍNU NA INHIBIČNÉ NEURÓNY BULBUS OLFactorIUS

Mihalj D¹, Bukatova S¹, Reichová A¹, Havránek T¹, Bačová Z¹, Bakoš J^{1,2}

¹Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum, SAV, Bratislava, Slovensko

²Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko

Úvod: Neuropeptid oxytocín podnecuje sociálne interakcie prostredníctvom krátkodobého vplyvu na aktivitu inhibičných interneurónov bulbus olfactorius (BO), čo umožňuje jedincom lepšie rozlišovať relevantné čuchové podnety. Tvorba inhibičných synaptických spojení interneurónov BO počas postnatálneho vývinu závisí od expície viacerých skafoldových a cytoskeletových proteínov. Kľúčovou skafoldovou molekulou v inhibičných synapsiách je gefyrín, ktorý ukotvuje podjednotky receptorov pre kyselinu γ -aminomaslovú (GABA) a glycín v postsynaptickej membráne, čím prispieva k udržiavaniu rovnováhy medzi excitáciou a inhibíciou. Dôležitým väzobným partnerom gefyrínu je kolybistín, ktorý sa taktiež podieľa na zoskupovaní membránových receptorov inhibičnej neurotransmisie. Cieľom predkladanej štúdie bolo určiť: 1) vplyv podania oxytocínu na expresiu gefyrínu a kolybistínu v BO v troch vývinových štádiách 2) vplyv in vitro inkubácie oxytocínu na vetvenie neuritov inhibičných a excitačných primárnych neurónov izolovaných z BO.

Metodiky: Neonatálnym potkanom kmeňa Wistar bol subkutánne podávaný oxytocín na druhý a tretí postnatálny deň v koncentrácii 0,1 mg/ml/kg v 50 μ l. BO bol odobraný na 5., 7. a 9. postnatálny deň. Použitím qPCR bola stanovená génová expresia gefyrínu a kolybistínu, kým pomocou Western blot analýzy boli hodnotené ich proteínové hladiny. Primárne neuróny izolované z BO neonatálnych potkanov boli po 7 dňoch in vitro inkubované 48h v prítomnosti 1 μ M oxytocínu. Následne boli bunky fixované a farbené pomocou protilátok voči GAD65/67 (GABAergické inhibičné neuróny) a VGLUT2 (glutamatergické excitačné neuróny). Vetvenie neuritov bolo vyhodnotené pomocou Shollovej analýzy.

Výsledky: Oxytocín signifikantne znížil mRNA hladiny pre gefyrín u všetkých troch vývinových štádií. Génová expresia kolybistínu bola signifikantne znížená po podaní oxytocínu na deviaty postnatálny deň. Trend k poklesu proteínových hladín gefyrínu sa prejavil na piaty

postnatálny deň, kým v prípade kolybistínu sa rovnaký trend prejavil na deviaty postnatálny deň. Oxytocín neovplyvnil vetvenie neuritov GABAergických a glutamatergických neurónov izolovaných z BO. Potvrdili sme nižší počet vetiev neuritov u GABAergických neurónov v porovnaní s glutamatergickými vo vzdialenosti 100-200 µm od tela buniek.

Záver: Výsledky naznačujú, že oxytocín počas vývinu negatívne ovplyvňuje produkciu proteínov, ktoré sa podieľajú na tvorbe inhibičných synapsí. Nepotvrdil sa však jeho účinok na morfológiu a tvar neurónov v BO, čo môže byť spôsobené nedostatočnou citlivosťou buniek alebo dobou expozície oxytocínu.

Práca bola podporená grantami VEGA 2/0155/20, VEGA 2/0148/21.

VPLYV GENETICKEJ VARIABILITY MOZGOVÉHO NEUROTROFICKÉHO FAKTORA NA PAMÄŤ A UČENIE U ČLOVEKA

Rovný R¹, Marko M¹, Michalko D¹, Vančová Z², Dragašek J², Riečanský I¹

¹Oddelenie behaviorálnej neurovedy, Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovensko; ² 1. psychiatrická klinika LF UPJŠ v Košiciach a Univerzitnej nemocnice L. Pasteura v Košiciach, Slovensko

Mozgový neurotrofický faktor (BDNF) je sekretorický proteín, ktorý reguluje prežívanie a diferenciáciu neurónov počas vývinu mozgu. V dospelosti hrá BDNF významnú úlohu v neurogenéze a regulácii synaptickej plasticity a je preto vhodný kandidát pre výskum základných mechanizmov pamäti a učenia. Na dôležitú úlohu BDNF v kognícii poukazuje najmä súvislosť medzi zníženou produkciou tohto neurotrofínu v mozgu a starnutím ale aj viacerými psychiatrickými a neurodegeneratívnymi poruchami, ktorých spoločnou črtou sú poruchy pamäti a učenia. Pribúdajúce dôkazy nasvedčujú, že genetická variabilita BDNF súvisí s rizikom vzniku viacerých duševných porúch ale aj kogníciou u zdravých ľudí. Klinické aj predklinické štúdie opakovane preukázali, že experimentálne zásahy, ktoré zvyšujú produkciu BDNF, zlepšujú pamäť a učenie, čo poukazuje na klinický význam BDNF. Hoci je úloha BDNF v kognícii v súčasnosti čoraz viac diskutovanou témou, presný mechanizmus zapojenia tohto neurotrofínu v procesoch pamäti a učenia za normálnych a patologických podmienok je málo objasnený a predstavuje dôležitú výzvu pre ďalší výskum. Náš výskum je zameraný na úlohu genetickej variability BDNF v pamäti a učení a jeho výsledky svedčia o vplyve genotypu BDNF na konsolidáciu epizodickej pamäti.

Práca bola podporená grantami VEGA 2/0170/19, APVV-19-0570 a výskumným grantom Slovenskej psychiatrickej spoločnosti SLS č. 02/2018.

DOES PATERNAL METHAMPHETAMINE EXPOSURE AFFECT LOCOMOTOR ACTIVITY OF OFFSPRING?

Mihalčíková L, Ochozková A, Šlamberová R

Charles University, Third Faculty of Medicine, Department of Physiology, Prague, Czech Republic

Drug addiction and its influence on behavior and development of offspring has become a serious problem in our society. Methamphetamine (MA) is one of the most abused psychostimulant in the Czech Republic and its abuse rises worldwide. Previous studies demonstrated impairing effects of maternal MA administration on behavior of offspring. However, the effect of paternal MA exposure is not entirely clear. The aim of the present study was to examine the impact of paternal MA exposure on spontaneous locomotor activity of prenatally exposed rodents. MA was administered subcutaneously for period of 30 days in dose of 5mg/kg to adult male rats (PD 90). The control group was exposed to saline (SA). The spontaneous locomotor activity of their offspring was examined by Laboras apparatus (Metris, Netherland). An acute dose of MA (1 mg/kg) or SA was administered immediately prior to placing the animal in the Laboras cage to probe the sensitizing effect of MA treatment. Each animal was tested separately and recorded for 1 hour in unknown environment. The following parameters were automatically evaluated: time spent in locomotion (s), time spent immobile (s), time spent rearing (s), time spent grooming (s), distance traveled (m), and average speed (mm/s). Our results determinate that paternal MA administration does not affect locomotor activity of prenatally exposed offspring. Regarding the effect of acute MA application, our data demonstrate significant increase of locomotor activity. In comparison of gender differences, females show more activity than males. Financial support: GACR 18-09296S, PROGRES Q35, OPVVV PharmaBrain CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007444

EARLY METHAMPHETAMINE EXPOSURE ALONG WITH ALTERED ENVIRONMENT AFFECTS NEUROTRANSMITTERS AND OXIDATIVE STRESS LEVELS IN BRAIN OF LABORATORY RAT

Čechová B, Jurčovičová J, Vaculín Š, Šandera Š, Šlamberová R

Department of Physiology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Methamphetamine (MA), as massively abused psychoactive stimulant, has been associated with many neurological diseases. Chronic abuse of MA leads to significant changes in distribution and storage of brain monoamine NEUs, such as dopamine (DA), serotonin (5HT) and noradrenaline (NA) as well as glutamate (GLU). Adolescence is a transition period

between childhood and adulthood that occurs in both human and rodents, the ongoing development of the structure and function of neural systems implicated in emotion and cognition, particularly the prefrontal cortex and related pathway, making adolescence more or differentially susceptible to drug exposure.

On postnatal days 1-12, which contributes to 3th trimester in humans, male rat pups by MA or saline (SA) as control group. During the pre-weaning or post-weaning period animals were exposed to different environments. Pups were divided into groups which differed based on the housing (standard cage or enriched environment (EE) cage). After weaning pups were housed single or grouped. At PD 28,35,45 rats were sacrificed, perfused and the striatum (STR) and hippocampus (HIP) were collected. Samples were place to freezer at -80 till further processing. Samples were then homogenized, sonicated and then analyzed by corresponding ELISA kits according to manufacturer instructions.

The levels of NEUs differed based on the housing environment as well as the age of animals. EE predominantly increase levels of NEUs. NA and 5HT were increased in HIP of MA exposed animals of age PD 28. DA was increased in STR of MA-exposed PD35 animals. On the other hand, GLU was increased in HIP of SA animals of age PD 45. As a matter of oxidative stress, significant differences in levels of 4HNE among groups administered by SA. We suspected that higher levels occur within groups with standard environment before weaning. There are lower levels in MA group with enriched environment before weaning in group vs. SA administered with standard environment in group among PD 45 old animals. These results suggest, that there is impact of environment and it can be beneficial but also impact of SA administration itself as possible stressor.

The present data demonstrated, that MA administration, depending on way of exposure and also different environment or distribution of animals had huge impact on NEU levels as well as oxidative stress.

Financial support: GAUK 144212, 260533/SVV/2021, Progres Q35, OPVVV PharmaBrain CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007444

VLIV STÁRNUTÍ NA MITOCHONDRIÁLNÍ RESPIRACI RŮZNÝCH ORGÁNŮ POTKANA

Jedlička J1,2, Tůma Z2, Kohoutová M1,2, Kuncová J1,2

1Ústav fyziologie LF UK v Plzni

2Biomedicínské centrum LF UK v Plzni

Úvod: Vztah mezi mitochondriemi a stárnutím získává stále větší pozornost vědeckého světa, neboť mitochondrie jsou jedním z hlavních regulátorů procesu stárnutí. Většina dosud publikovaných studií o vlivu stárnutí na mitochondriální respiraci tkání a orgánů byla provedena na kosterním svalu a srdci, méně pak v mozku a parenchymatózních orgánech (např. ledvinách nebo játrech). Rozdíly mezi pohlavími zatím také nejsou uspokojivě popsány.

Metody: V této studii jsme se zabývali screeningem mitochondriální respirace v 8 různých tkáních, a to: v pravé a levé srdeční komoře, hipokampu, mozečku, kosterním svalu, kůře ledvin, játrech a krevních destičkách. Samci a samice rychle stárnoucích potkanů (Fischer 344) byly rozděleny do 3 skupin podle věku – 6, 12 a 24 měsíců (n každé skupiny = 10). Po dosažení cílového věku byly orgány vyjmuty a zpracovány pro oxygrafické měření standardizovanou homogenizací (PBI-Shredder, Oroboros; Innsbruck, Rakousko) nebo mechanickou permeabilizací. Mitochondriální spotřeba kyslíku byla stanovena v duplikátech vysoce účinnou respirometrií na 4 kalibrovaných oxygrafech O2k (Oroboros; Innsbruck, Rakousko). Po aplikaci substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů respiračního systému byly určeny 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.

Výsledky: Mitochondriální respirace v levé a pravé komoře srdeční s věkem klesala u obou pohlaví, což je v souladu s výsledky většiny recentních publikací. Respirace kosterního svalu se s věkem snižovala u samců, ale nikoliv u samic. V mozečku došlo k mírnému poklesu, zatímco v hipokampu jsme nepozorovali žádné změny respirace související s věkem. Mitochondriální spotřeba kyslíku v parenchymatózních orgánech byla nejvyšší u nejstarší skupiny. Krevní destičky nevykazovaly s věkem žádné signifikantní změny v měřených respiračních stavech.

Závěr: Mitochondriální spotřeba kyslíku se liší v závislosti na věku i na pohlaví. Krevní destičky, o kterých se mluví jako o periferním ukazateli celkové mitochondriální aktivity, neodpovídají respiračnímu stavu jiných orgánů.

TESTOVÁNÍ POTENCIÁLNÍCH LÉČIV NA CELOTĚLOVÉM MODELU ANESTEZOVANÉHO MORČETE

Bartáková A, Stračina T, Nováková M

Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika

Anestezované morče je využíváno v rámci preklinického testování potenciálních léčiv. Registrace EKG na tomto modelu umožňuje posoudit eventuální arytmogenní potenciál takových látek. Cílem této práce bylo hodnocení arytmogenního potenciálu klinicky užívaných léčiv s účinky na beta-adrenergní receptory.

Zvířata byla uvedena do hluboké anestezie inhalací isofluranu a poté byla provedena kanylace jugulární vény. Na hrudník morčete byly připevněny vpichové elektrody a pro kontinuální monitorování tělesné teploty byla zavedena rektální sonda. Zvířata byla rozdělena do tří skupin: VEH (zvířata dostávala fyziologický roztok), DOB (zvířata dostávala beta-sympatomimetikum dobutamin) a ESM (zvířata dostávala beta-lytikum esmolol). Experiment sestával z fáze stabilizace (15 min), následované třemi fázemi aplikování testované látky či fyziologického roztoku (10, 5 a 5 min) prostřednictvím kontinuální intravenózní infuze

a fází zotavení (5 min). EKG bylo registrováno a analyzováno pomocí LabChart 8 Pro softwaru. Hodnotili jsme RR interval (resp. srdeční frekvenci), PR interval, QRS komplex a QT interval. QT interval byl následně korigován podle Framinghama. Spolehlivost zavedeného modelu byla prokázána neměnností sledovaných parametrů během celého experimentu u zvířat ve skupině VEH. Aplikace beta-blokátoru esmololu snížila srdeční frekvenci, prodloužila PQ interval i trvání QRS komplexu, a zároveň neovlivnila QTc. Aplikace dobutaminu vedla ke zvýšení srdeční frekvence a ke zkrácení QT intervalu. Model anestetizovaného morčete je spolehlivý a cenný pro testování léčiv s účinkem na kardiovaskulární systém zprostředkovaným přes beta-adrenergní receptory. Podporováno granty MUNI/IGA/1098/2020 a MUNI/A/1133/2021.

REGULACE BUNĚČNÉ MOTILITY SEMAFORINY A MOŽNOSTI JEJÍHO FARMAKOLOGICKÉHO OVLIVNĚNÍ

Kripnerová M¹, Pešta M¹, Tymecka D², Misicka A², Hatina J¹

¹Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni, Ústav biologie, Alej Svobody 76, 323 00 Plzeň, Česká republika, ²Faculty of Chemistry, University of Warsaw, Pasteura 1, 02-093 Warsaw, Poland

Buněčná motilita je jedna z nejdůležitějších schopností buňky, která významným způsobem přispívá ke zdárnému průběhu fyziologických procesů, jako je embryonální vývoj či hojení ran, ale také k nežádoucím patologickým dějům, zejména pak k tvorbě metastáz u nádorových onemocnění. Jedná se o komplexní proces, který využívá různé mechanismy, nicméně nejčastěji probíhá jako odpověď na chemické signály, které jsou přijímány od okolních buněk. Jedním z mnoha popsaných aktivátorů motility normálních mezenchymálních buněk cév nebo některých typů nádorových buněk (glioblastom, fibrosarkom) je Semaforin3A (Sema3A), který je rovněž popsán jakožto široce aktivní inhibitor angiogeneze. Pro transdukcii signálu Sema3A je mimo jiné nezbytný membránový glykoproteinový receptor Neuropilin 1 (NRP-1), který slouží zároveň jako součást receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a hraje tak důležitou roli při rozvoji angiogeneze a nádorové progresi. Cílem naší pilotní studie bylo testovat syntetické rozvětvené pentapeptidy BPs (Tymecka et al. 2018), které mají potenciální schopnost kompetitivně inhibovat interakci VEGF165/NRP-1 komplexu a tím účinně ovlivnit nejen případný rozvoj nežádoucí angiogeneze, ale zejména zablokovat přenos signálu Sema3A pomocí společného ko-receptoru neuropilinu-1 a omezit tak buňkám schopnost buněčné motility. Inhibice nežádoucích vlastností nádorových buněk pomocí peptidových metabolicky stabilních inhibitorů by mohla být vhodným terapeutickým řešením některých nádorů zejména sarkomů, které mají aktivovanou Sema3A signalizaci a zároveň se u nich předpokládá rozvoj nádorové angiogeneze.

Výzkum byl podpořen projekty 4EU+/21/F1/1 a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 „Fighting Infectious Diseases „, udělený MŠMT ČR, financovaný z EFRR.

OPTIMIZATION OF DIFFERENT SEPARATION TECHNIQUES FROM SPIKED BLOOD FOR FUTURE SEPSIS DIAGNOSTICS WITH 3RD GENERATION SEQUENCING

Tamáš, M¹, Lipták R^{1,2}, Strečanský T³, Konečná B³, Tothová L³, Hodosy J^{1,2}

¹Institute of Physiology, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava, Slovakia

²Emergency Department Ružinov, University hospital Bratislava, Bratislava, Slovakia

³Institute of Molecular Biomedicine, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava, Slovakia,

Background: Sepsis is a common serious condition for intensive care unit (ICU) admissions and remains a significant challenge for modern healthcare. For successful antibiotic treatment, rapid and accurate diagnostics and the identification of pathogens are required. To overcome the shortcomings of slow and tedious traditional blood cultures, we would like to adopt nanopore sequencing to identify the pathogen and its resistance. To be successful in outlined approach, host DNA depletion and high-quality bacterial DNA content is essential. **Aim:** The aim was to compare 3 different separation methods of blood (centrifugal, chemical, and enzymatic) for bacterial DNA enrichment and isolation with subsequent product readily suitable for nanopore sequencing in order to identify the pathogen.

Methods: In the study, blood was collected from 4 healthy subjects and spiked with either gram-negative or gram-positive bacteria to obtain a final concentration of 100 CFU/ml of blood. Three different separation methods alongside negative control were performed. Spiked blood was aliquoted to obtain technical triplicates for each method. The performance of each method was evaluated by RT-qPCR of 16S gene and B2 microglobulin.

Results: In blood spiked with gram-negative bacteria, the mean Ct value of 16S gene of centrifugal, enzymatic, chemical methods, and negative control were 29.37 ± 0.39 , 29.38 ± 0.92 , 29.98 ± 0.67 , 30.64 ± 0.95 , respectively. In blood spiked with gram-positive bacteria the mean, Ct value of 16S gene of centrifugal, enzymatic, chemical methods, and negative control were 31.25 ± 0.77 , 29.24 ± 0.78 , 30.98 ± 0.78 , 31.45 ± 0.63 , respectively or 30.93 ± 2.52 , 31.47 ± 1.34 , 30.52 ± 1.82 , and 31.73 ± 2.03 , when lysozyme for bacterial cell lysis was added. Analysis of host DNA depletion using RT-qPCR of B2 microglobulin was performed for each method with Ct of 26.26 ± 1.31 , 21.89 ± 2.2 , 24.44 ± 3.33 , and 20.48 ± 0.59 for centrifugal, enzymatic, chemical methods, and negative control, respectively. Regarding the effectiveness, the DNA depletion was significantly higher for the centrifugal method compared to others. Reproducibility based on variability measured by the standard deviation in DNA quantity, quality, and RT-qPCR results was highest using the centrifugation method compared to the other three methods. Considering the turnaround time, the centrifugation method with 20 minutes procedure was faster than the chemical method lasting 30 minutes or the enzymatic method that stretched the turnaround time to 45 minutes.

Conclusion: Separation methods can be used for bacterial DNA enrichment and isolation with sufficient quantity and quality for further downstream processes such as RT-qPCR or nanopore sequencing. From all tested methods, centrifugation outperformed other basic isolation techniques considering turnaround time, reliability, and effectiveness. Further investigation is needed to confirm our promising results in a real-life scenario with nanopore

sequencing as point-of-care testing.

Keywords: sepsis, nanopore sequencing, isolation techniques, bacteria, 3rd generation sequencing

Acknowledgment:

The study was funded by VEGA grant number VEGA 1/0573/21 granted by Ministry of Education of Slovak republic and grant APVV-20-0472 granted by Slovak Research and Development Agency.

INTEGRÁCIA VÝUČBY KLINICKÉHO MYSLENIA A ROZHODOVANIA DO PREDMETU FYZIOLOGIA

*Hnilicová S, Drábek R, Szadvari I, Babinská K, Ostatníková D
FYU, LFUK, Bratislava, SR*

Výučba na lekárskech fakultách v 21. storočí prechádza k novým prístupom zahrňujúcim aktívny prístup, integráciu predklinickej a klinickej výučby, individuálny na študentov zameraný prístup a formatívnu a sumatívnu spätnú väzbu. Veľký dôraz sa kladie na skoré vystavenie študentov simulovaným alebo reálnym pacientom, s cieľom integrácie všetkých naučených poznatkov a zručností pre budúcu klinickú prax na úrovni súčasných vedeckých poznatkov v jednotlivých oblastiach medicíny. Klinické uvažovanie a rozhodovanie je zavádzané od začiatku štúdia ako súčasť tohto procesu. Súčasný prístup k výučbe klinického uvažovania a rozhodovania vychádza z dôkladného pochopenia fyziologických a následných patofyziologických procesov a ich transformácie do symptómov pacientov, ako prvého kroku pri tomto procese. Na lekárskej fakulte v Bratislave sme pristúpili k výučbe klinických prípadov simulácií ako aj patientskych prípadov s cieľom zlepšenia prípravy našich študentov ku klinickému rozhodovaniu vo vyšších ročníkoch. Tento presun od klasických laboratórnych praktických cvičení ku prípadovým simuláciám a klinickým prípadom s dôrazom na fyziológiu nám umožnili aj podmienky prechodu na online výučbu pri pandémie COVID-19, kde sa nedali niektoré úlohy uskutočňované v laboratóriách vykonať v pôvodnom rozsahu. Študenti výučbu vysoko oceňovali, 92% študentom by vyhovovalo mať takejto výučby ešte viac. Fyziologický ústav na LFUK v Bratislave takto napomáha prechodu k moderným trendom vo výučbe aj práve prístupom k integrácii našej výučby do celku ako bolo zadané aj našim vedením LFUK ako dlhodobý cieľ prestavby štúdia.

Projekt bol podporený KEGA MŠVVaŠ SR 041UK-4/2020.

congress prague

NA CELNÉ 826/8

150 00 PRAHA 5

ČESKÁ REPUBLIKA

TEL.: +420 241 445 759, +420 241 445 813, +420 241 445 815

E-MAIL: OFFICE@CONGRESSPRAGUE.CZ

WEB: WWW.CONGRESSPRAGUE.CZ