

ABSTRAKTA / ABSTRACTS

11. FAKULTNÍ KONFERENCE STUDENTŮ DOKTORSKÝCH PROGRAMŮ V HRADCI KRÁLOVÉ - 3. 10. 2017

11TH FACULTY CONFERENCE OF STUDENTS IN POSTGRADUATE PROGRAMS IN HRADEC KRÁLOVÉ - 3. 10. 2017

Jan Korábečný

Katedra toxikologie a vojenské farmacie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany, Hradec Králové, Česká republika

Přijato 20. listopadu 2017.

Zrevidováno 20. listopadu 2017.

Zveřejněno 8. prosince 2017.

1. sekce – Epidemiologie, Lékařská mikrobiologie

DSP Epidemiologie:

Hodnost, jméno a příjmení:

MUDr. Juraj Szanyi

(3. ročník)

Školitel:

pplk. doc. MUDr. Jan Smetana Ph.D.

Školitel-specialista:

doc. MUDr. Stanislav Plíšek Ph.D.

Téma sdělení:

Neuroborelioza – současná diagnostika, možnosti využití zrakových evokovaných potenciálů v diagnostice a následném monitoringu vývoje onemocnění

Cílem práce je na velkém souboru pacientů (cca 400) prokázat možnost využití vyšetření VEPs při neuro-borelioze. Využití jako pomocného vyšetření event. využití při diferenciální diagnostice i neinfekčních příčin (RSM). Principem výzkumu je VEP vyšetření pacientů (snaha o opakované vyšetření) s diagnózou neuroboreliozy a konfrontace získaných výsledků s ostatními vyšetřovacími metodami (likvorový nález, sérologie, intrathekální syntéza antiboreliových protilátek - index AI, MR mozku).

V současnosti probíhá sběr a zpracovávání dat. Výsledky jsou průběžné - zatím nelze jednoznačně reprodukovat. Po kompletaci a následné analýze výsledků bude provedeno celkové zhodnocení se snahou o publikaci v odborném časopise.

Hodnost, jméno a příjmení:

npor. MUDr. Renáta Šošovičková

(3. ročník)

Školitel:

plk. prof. MUDr. Roman Chlábek, Ph.D.

Téma sdělení:

Studium séroprevalence vybraných infekčních chorob

Cíl práce: I přes dlouhodobě vysokou proočkovanost proti spalničkám a příušnicím v České republice, se objevují lokální epidemie těchto onemocnění. Cílem naší práce bylo stanovit séroprevalenci IgG protilátek proti spalničkám a příušnicím u dospělé populace, porovnat jednotlivé věkové kohorty, muže a ženy a skupinu očkovaných a neočkovaných jedinců.

Metodika: Studie byla provedena v letech 2011 - 2012 u jedinců starších 18 let. Subjektům byly odebrány vzorky krve, které byly vyšetřeny na přítomnost protilátek metodou ELISA (komerční sety firmy R-Biopharm). Séra byla hodnocena kvalitativně jako negativní, hraniční a pozitivní. Pozitivní výsledky pak byly hodnoceny i kvantitativně.

Výsledky: Studie se zúčastnilo 1911 osob. Nejvíce séronegativních výsledků bylo v případě spalniček ve věkové kategorii 30 - 39 let a v případě příušnic v kategorii 18 - 29 let. Nejvyšší míra séropozitivity byla zaznamenána u jedinců nad 50 let věku. V případě spalniček byly mediány koncentrací protilátek séropozitivních osob nižší u očkovaných jedinců ve srovnání s neočkovanými. U příušnic se mediány koncentrací séropozitivních neočkovaných a očkovaných jedinců víceméně nelišily.

Závěr: Prodělání infekce spalničkami a příušnicemi zanechává dlouhodobou imunitu, zatímco po očkování dochází v čase k poklesu protilátek v séru. Vhodná je změna vakcinační strategie a častější plošné sérologické přehledy vakcínou preventabilních onemocnění.

Hodnost, jméno a příjmení:	MUDr. Markéta Dyrhonová (4. ročník)
Školitel:	plk. prof. MUDr. Roman Chlábek, Ph.D.
Téma sdělení:	Epidemiologie chronické virové hepatitidy C a kvalita života léčených pegylovaným interferonem alfa s ribavirinem

Cíl primární - analýza dat kohortové studie kvality života nemocných s chronickou hepatitidou C léčených pegylovaným interferonem alfa s ribavirinem, vyhodnocení strategie vedení léčby a spolupráce s takto nemocnými k zajištění jejich adherence k léčbě.

Cíl sekundární - rozšíření a uplatnění epidemiologických dat o HCV infekci v ČR.

Metodika: Dotazníková metoda – 5 standardizovaných dotazníků (škály pro hodnocení deprese, kognitivních funkcí, úzkostných poruch,...241 otázka) na zjištění kvality života nemocných s chronickou HCV infekcí vyplňovaných bezprostředně před terapií interferonem a ribavirinem a ve 12. týdnu této léčby. V 2016 projekt rozšířen o aktivní vyhledávání osob s chronickou HCV infekcí v dospělé populaci vystavené některému z rizik možného přenosu HCV – odběry periferní krve ke **stanovení hladiny anti HCV protilátek metodou ELISA**, v případě reaktivního vzorku konfirmované metodou polymerázové řetězové reakce (PCR), ke stanovení HCV RNA.

Výsledky: Celkem do kohortové studie zahrnuto 176 mužů a žen léčených v 2004-2014.

Potvrzena byla stigmatizace nemocných s chronickou hepatitidou C, negativní ovlivnění jejich psychické a fyzické kondice, zejména ve skupině nad 40 let. Zásadní zlepšení kvality života po eliminaci viru. Z hlediska epidemiologického, od 11/2016 do 05/2017 vyšetřeny anti HCV protilátky u 564 osob s alespoň jedním rizikovým faktorem možného přenosu HCV. Anti HCV pozitivních bylo 15 (prevalence 2,66%), z nich 2 viremici s chronickou HCV infekcí (prevalence 0,35%).

Závěr: Je trvalá potřeba edukace laické i odborné veřejnosti o virové hepatitidě C, její existenci v naší populaci, rizikových faktorech přenosu, potřebě aktivního vyhledávání a spolupráce lékaře s takto nemocným, o nutnosti včasné diagnostiky a možnostech léčby i o tom, že je současné době virová hepatitida C již dobře vyléčitelná. Naproti tomu náklady jsou zatím obrovské.

Hodnost, jméno a příjmení:	MUDr. Hana Zelená (4. ročník)
Školitel:	pplk. doc. MUDr. Jan Smetana, Ph.D.
Téma sdělení:	Klinická charakteristika hantavirových infekcí

Cíl práce: Charakteristika klinických projevů hantavirových infekcí u souboru pacientů vyšetřených v NRL pro arboviry.

Použitá metodika: U pacientů s podezřením na hantavirovou infekci byly vyšetřeny vzorky krve metodou ELISA IgG, IgM (Euroimmun) a Imunoblot IgG, IgM (Euroimmun). Pro molekulární diagnostiku byla použita metoda RT-PCR, pozitivní izoláty byly sekvenovány a dourčen genotyp viru. Ošetřujícím lékařům byl rozeslán dotazník týkající se klinických příznaků, závažnosti průběhu a dlouhodobých následků hantavirového onemocnění.

Dosažené výsledky: V období 2007-2017 (do 7/2017) byla sérologicky diagnostikována akutní hantavirová infekce u 56 pacientů, z nichž u 33 byla pozitivní také PCR. Sekvenací byla u 30 pacientů zjištěna infekce virem

Dobrava/Belgrade (15x genotyp Dobrava, 12x genotyp Kurkino, 3x genotyp neurčen), u 2 pacientů byl prokázán virus Puumala a u 1 pacienta virus Tula. Onemocnění probíhalo s různou závažností včetně jednoho úmrtí.

Závěr: V souboru pacientů bylo onemocnění způsobeno převážně virem Dobrava/Belgrade, a to jeho genotypy Dobrava a Kurkino, vyskytly se také infekce viry Puumala a Tula. Klinické příznaky mají různou závažnost, jejich vyhodnocování v současné době probíhá, protože se ještě nevrátily všechny dotazníky.

DSP Lékařská mikrobiologie:

Hodnost, jméno a příjmení:	Mgr. Markéta Benková (3. ročník)
Školitel:	PharmDr. Jan Marek, Ph.D.
Téma sdělení:	Testování antimikrobiální účinnosti nově syntetizovaných látek jako potenciálních aktivních složek dekontaminačních směsí dezinfekčních přípravků

Cílem dizertační práce je znovuzavedení metodik testování antimikrobiální účinnosti na pracovišti a testování několika skupin nově připravených látek na bázi kvartérních amoniových solí (KAS) jako potenciálních dezinfekčních látek.

V rámci projektu již byla zavedena metodika testování antimikrobiální účinnosti - mikrodiluční bujónová metoda. Tato metoda je používána ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC; nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zastaví růst mikroorganismů), minimálních baktericidních (MBC) a fungicidních (MFC) koncentrací antimikrobiálních látek (nejnižší koncentrace, která usmrtí bakterie/vlákn. houby a kvasinky).

Byly stanoveny bakteriální MIC a MBC u všech skupin látek na bázi kvartérních amoniových solí s různou strukturou. Tyto hodnoty byly následně porovnány s komerčně používanými látkami, tj. benzalkonium chloridy/bromidy. Nyní následuje stanovení MIC a MFC na vláknitých houbách a kvasinkách. V rámci rozšíření metodiky jsou na tříměsíční zahraniční stáži vybrané látky testované také difúzní metodou a také proti mikrořasám *Pseudokirchneriella subcapitata* zkouškou inhibice růstu sladkovodních zelených řas.

Získaná data budou publikována v zahraničním periodiku s impakt faktorem a z nejnadějnějších látek se budou formulovat směsi, které budou podrobeny dalšímu testování.

2. sekce – Infekční biologie, Vojenská radiobiologie

DSP Infekční biologie:

Hodnost, jméno a příjmení:	Ing. Miloslava Ďuráčová (2. ročník)
Školitel:	PharmDr. Jana Klimentová, Ph.D.
Téma sdělení:	Detekce a identifikace vysoce rizikových agens pomocí proteomických metod

Cíl práce: Vývoj metody cílené proteomické analýzy pro detekci toxinů bakterie *Clostridium perfringens*

Použitá metodika: Kultivační metody, Polymerázová řetězová reakce, Izolace DNA, Klonování do expresních systémů, Elektroforetické metody, Separační metody, Metody hmotnostní spektrometrie, Bioinformatické analýzy

Dosažené výsledky: Optimalizace protokolu pro kultivaci bakteriálních kmenů *Clostridium perfringens*, jež produkují požadované toxiny v různých kombinacích. Charakterizace kmenů *Clostridium perfringens* pomocí růstové křivky. Příprava rekombinantních proteinů, produkovaných bakteriálním expresním systémem, konkrétně *Escherichia coli*. Identifikace proteinových toxinů pomocí hmotnostní spektrometrie.

Závěr: Pro potřeby cílené proteomické analýzy byly připraveny rekombinantní standardy proteinových toxinů. Po vytvoření hmotnostně spektrometrické metody bude následovat otestování těchto metod na komplexních maticích.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Monika Kopečková**
(2. ročník)
Školitel: PharmDr. Ivona Pávková, Ph.D.
Téma sdělení: **Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza – moonlighting protein *Francisella tularensis***

Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) je protein, který kromě své základní enzymatické funkce v procesu glykolýzy plní i celou řadu dalších přídatných tzv. „moonlighting“ funkcí. U mnohých patogenních bakterií pak byl prokázán vztah tohoto proteinu i k virulenci. Z in vivo a in vitro provedených experimentů v rámci mé práce vyplývá, že u intracelulární patogenní bakterie *Francisella tularensis* (*F. tularensis*) má GAPDH také vztah k virulenci. Moje práce je zaměřena na hledání potenciálních interakčních partnerů na úrovni bakterie i uvnitř hostitelské buňky, pomocí kterých bude možné objasnit případné další neenzymatické funkce GAPDH u *F. tularensis*. K těmto účelům používám metody Far-western blot, Solid phase binding assay a afinitní purifikaci v kombinaci s kvantitativní SILAC MS/MS analýzou. Z předběžných výsledků vyplývá, že se protein GAPDH váže k extracelulárním proteinům eukaryotních buněk např. plazminogen, fibrinogen, fibronectin. První experimenty také naznačují schopnost GAPDH interagovat s dalšími proteiny v rámci *F. tularensis*. Získané poznatky přispívají k poznání molekulárních mechanismů patogenity *F. tularensis*.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Pavla Stojková**
(2. ročník)
Školitel: RNDr. Petra Špidlová, Ph.D.
Téma sdělení: ***Francisella* HU protein**

Nukleoid asociovaný protein HU je malý DNA-vazebný protein v bakteriální buňce, který ovlivňuje důležité buněčné procesy, jako je například transkripce, translace, buněčné dělení a v neposlední řadě exprese genů kódující faktory virulence. HU protein je sekvencně nespecifický, nicméně vykazuje vyšší afinitu ke strukturálně narušeným úsekům DNA, které vznikají například během růstu ve stresových podmínkách. Výsledky této práce dokazují nezbytnost tohoto proteinu ve virulenci a růstu *Francisella tularensis*. Mutantní kmen postrádající tento protein není schopen normálního růstu v podmínkách navozujících oxidativní stres a je defektní i v intracelulární replikaci v myších kostně dřeňových makrofázích. Snížení virulence bylo prokázáno i v in vivo systému. Mutantní kmen nebyl schopen vyvolat tularémii u myši a navíc navozoval protektivní účinky vůči divokému kmeni FSC200. Jeho širokou škálu působnosti naznačuje i proteomická studie, která, mimo jiné, detekovala sníženou produkci proteinů z ostrova patogenity *F. tularensis*.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Magdaléna Prokšová**
(3. ročník)
Školitel: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.
Téma sdělení: **Studium protein-proteinových interakcí hostitel-patogen**

Cíl práce: Cílem práce je identifikovat klíčové proteiny bakterie *Francisella tularensis*, které cestou interakcí s proteiny hostitelské buňky řídí průběh infekce ve svůj prospěch.

Metodika: Byl vybrán minimalistický experimentální přístup, kde jsou geny pro vybrané bakteriální proteiny spolu s afinitní kotvou FLAG-tag exprimovány v eukaryotních HEK293T buňkách, která umožňuje jejich následnou purifikaci přes specifický sorbent. Spolu s bakteriálními proteiny by se měly ko-purifikovat silně interagující eukaryotní proteiny. Tyto proteiny jsou následně identifikovány pomocí nanoHPLC-MS/MS. Pro rozlišení správně pozitivních interakcí od falešně pozitivních může posloužit SILAC kultura původních HEK293T buněk značená těžkými aminokyselinami.

Dosažené výsledky a závěr: Imunoblotem i LC-MS metodikou byla potvrzena exprese vybraných bakteriálních proteinů v HEK293T buňkách. Pomocí stejných metodik byla potvrzena přítomnost proteinů v eluátu po afinitní purifikaci prostřednictvím FLAG-tag kotvy. V současné době se snažíme o snížení pozadí nespecificky purifikovaných proteinů a kombinaci afinitní purifikace se SILAC experimentem. Byla připravena SILAC kultura HEK293T buněk, s téměř 100% metabolickou inkorporací těžkých aminokyselin Lys a Arg do proteinů a minimalizována biochemická konverze Arg na Pro.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Valeria Šeško**
(3. ročník)
Školitel: prof. MUDr. Jiří Stulík, CSc.
Téma sdělení: **Příprava systému pro expresi proteinů s imunostimulačním potenciálem v mikrobu *Francisella tularensis***

Cílem práce je hledání vhodných kandidátních proteinů bakterie *Francisella tularensis* s imunostimulačním potenciálem. Všechny rekombinantní proteiny, které už byly otestovány, byly připraveny v expresním systému *E. coli*, kde ale nejsou zachovány původní modifikace proteinů (např. glykosylace), což může významně ovlivnit jejich imunostimulační potenciál a protektivní schopnosti. Vývoj systému produkce proteinů přímo v bakterii *F. tularensis*, které budou mít všechny posttranslační modifikace, je proto dalším nezbytným krokem k přípravě účinné podjednotkové vakcíny proti *F. tularensis*.

Různé typy regulovaných bakteriálních promotorů byly naklonovány do vektoru schopného se replikovat ve *F. tularensis*. Pro kontrolu exprese byly vybrány proteiny FTT_1029, FTT_1368 a GFP jako marker. Schopnost indukovat expresi byla testována jak v buňkách *E. coli*, tak i v buňkách *F. tularensis*. Úroveň exprese byla stanovena pomocí Western blotu a měření fluorescence. Jen vybrané promotorové systémy se jeví jako funkční a mohly by být použity v dalších studiích.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Lenka Plzáková**
(4. ročník)
Školitel: plk. gšt. doc. RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.
Téma sdělení: **Úloha B lymfocytů v časně fázi imunitní odpovědi proti intracelulárnímu patogenu *Francisella tularensis***

Cíl práce: Cílem disertační práce je charakterizovat úlohu B lymfocytů v časně fázi imunitní odpovědi proti intracelulárnímu patogenu *Francisella tularensis*. Mezi dílčí cíle pak patří určení aktivačních znaků v peritoneu a slezině v průběhu infekce *F. tularensis* u BALB/c myši, určení mechanismu vstupu *F. tularensis* do B lymfocytů pomocí blokace receptorů důležitých pro vstup a dále „trafficking“ *F. tularensis* v B lymfocytech.

Použitá metodika: Pro popis mechanismu vstupu *F. tularensis* do B lymfocytů a detekce aktivačních znaků byla využita metoda průtokové cytometrie. „Trafficking“ *F. tularensis* v B lymfocytech byl sledován pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Dosažené výsledky a závěr: Byla provedena detekce mechanismu vstupu *F. tularensis* do B lymfocytů pomocí blokace komplementových receptorů CR1/2, CR3 a CR4, dále pak pomocí FcγR a BCR receptorů. Na myším modelu BALB/c byly pomocí infekce *F. tularensis* také definovány podmínky vstupu *F. tularensis* do jednotlivých B buněčných subtypů. Získané výsledky poukazují na to, že rozhodující vliv při vstupu do CD19+ buněk mají receptory BCR a CR1/2. U měření aktivačních znaků bylo prokázáno zvýšení aktivačního znaku MHC II u všech měřených B buněčných podtypů (tedy B-1a, B-1b a B2) v peritoneu, ve slezině to byl naopak znak CD69. Dále byla provedena detekce kolokalizace *F. tularensis* v B lymfocytech, která byla sledována pomocí fluorescenčního mikroskopu. Při níž jsme prokázali maximum kolokalizace s EEA1 a s LAMP-1 do 30 minut po infekci, což se shoduje s buněčným osudem *F. tularensis* u monocytů a makrofágů.

DSP Vojenská radiobiologie:

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Marcela Jeličová**
(2. ročník)
Školitel: plk. gšt. doc. MVDr. Zuzana Šinkorová, Ph.D.
Téma sdělení: **Elektrochemická detekce poškození DNA po gama ozáření**

Cíl práce: Stanovit zpětně obdrženou dávku ionizujícího záření pomocí nově vyvinuté elektrochemické metody, která detekuje míru strukturního poškození nukleových kyselin po ozáření, dvojitých zlomů DNA v lymfocytech periferní krve. V současné době probíhá optimalizace metody.

Použitá metodika: Z elektrochemie byla použita diferenční pulsní voltmetrie a tištěná uhlíková elektroda, na které byly testovány roztoky vybraných interkalátorů a standard DNA z telecího brzlíku. Pro srovnání metodického přístupu byl dále použit mikrojaderný test metodou optické mikroskopie. Pomocí průtokové cytometrie byl stanoven histon γ H2AX.

Dosažené výsledky: Byly zvoleny časové intervaly (1, 4 a 24hod po ozáření) a rozmezí dávek (0,5 – 5Gy) a pro každý interval byly sestaveny kalibrační křivky. Současně byly vytvořeny biodozimetrické křivky zpětného odečtu dávek obou srovnávacích biodozimetrických metod. Pomocí elektrochemie byly charakterizované vybrané interkalátory a byla jimi detekována DNA.

Závěr: Kalibrační křivky odpovídají výsledkům dosaženým v odborných publikacích. Předem ocharakterizované interkalátory byly použity pro detekci DNA ve vzorku, podařilo se DNA zachytit při povrchu elektrody při požadovaném zeslabení signálu interkalátoru.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Lucie Čecháková**
(3. ročník)

Školitel: pplk. doc. PharmDr. Aleš Tichý, Ph.D.

Téma sdělení: **Radiosenzibilizace nádorových buněk: význam modulace autofagie**

Cíl práce: Pacienti s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) jsou z převážné většiny léčeni pomocí radioterapie, nicméně radiorezistence NSCLC přispívá k častým relapsům. Je proto žádoucí využití vhodných látek zvyšujících účinek ionizujícího záření (IZ) na nádorové buňky. Cílem práce je sensibilizace NSCLC buněk (H1299) k IZ pomocí specifických autofagických inhibitorů - Spautinu-1 a Lys05, jelikož inhibicí autofagie buňky ztrácí důležitý cytoprotektivní mechanismus.

Použitá metodika: Vhodné koncentrace inhibitorů a dávky IZ byly stanoveny pomocí real-time monitoringu buněčné proliferace systémem xCELLigence. Protein p62/SQSTM1, který je součástí signální dráhy autofagie, byl detekován metodou ELISA. Morfologická analýza ovlivněných buněk byla provedena pomocí elektronové mikroskopie. RT-PCR byla využita ke stanovení změn exprese autofagických genů.

Dosažené výsledky: Inhibitory autofagie i samotné IZ vedlo k poklesu buněčné proliferace, přičemž kombinace obou nox tento efekt ještě více prohloubila. Hladina proteinu p62/SQSTM1 byla zvýšena u buněk ovlivněných Lys05, ale i samotným IZ, což svědčí o inhibici autofagie i po pouhém ozáření. Tento výsledek byl rovněž potvrzen metodou elektronové mikroskopie.

Závěr: Inhibice autofagie byla signifikantně zvýšena u buněk ovlivněných jak Lys05, tak samotným zářením, ale také v kombinaci s IZ. Použití inhibitorů autofagie se tak jeví jako perspektivní léčebná strategie pro eradikaci NSCLC buněk H1299. Naše výsledky potvrzují, že oba inhibitory - Spautin-1 i Lys05, které v kombinaci s IZ způsobují pokles proliferace rakovinných buněk, vedou k účinné radiosenzibilizaci H1299 buněk a mohou najít uplatnění v protinádorové terapii.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Anna Lierová**
(3. ročník)

Školitel: plk. gšt. doc. MVDr. Zuzana Šinkorová, Ph.D.

Téma sdělení: **Testovanie nanočastíc z kyseliny hyalurovej in vitro a in vivo**

Cieľom tejto práce bolo stanoviť účinky nanočastíc z kyseliny hyaluronovej (NP). Prvotné experimenty boli zamerané na zistenie prípadnej toxicity rozdielne veľkých nanočastíc (84,5 a 124 nm) a taktiež nanočastíc s rozdielne modifikovaným povrchom. V druhom sete experimentov sa NP aplikovali *in vivo* a boli sledované ich účinky v kombinácii s celotelovým a parciálnym ožarovaním.

Použitá metodika: Na zistenie prípadne toxicity NP *in vitro* bola použitá proliferačná esej - WST test. Bunková línia J774.2 bola vystavená rozsiahlej koncentračnej rade NP a taktiež rozdielnym dávkam ionizujúceho žiarenia. Myšiemu kmeňu C57Bl/6 boli intra-tracheálne aplikované NP a následne bol vystavený dávke 8 Gy (celotelové ožarovanie) a 17 Gy (parciálne ožarovanie hrudníka). Pomocou mnohofarebnej cytometrie boli imunofenotypizované populácie buniek v periférnej krvi a v pľúcach. Pľúca boli následne podrobené histopatologickej a imunofluorescenčnej analýze.

Dosažené výsledky: NP sa nejavili ako toxické. Najväčší nárast viability bol zaznamenaný v koncentračnom

bode 0,1 mg/ml. U skupiny ktorej boli aplikované NP bol periférnej krvi stanovený zvýšený počet lymfocytov v porovnaní s len ožiarenou skupinou. V pľúcnom tkanive však došlo pri parciálnom ožarovaní k zhoršeniu sledovaných parametrov.

Záver: Nanočastice z kyseliny hyaluronovej o veľkosti 84,5 a 124 nm nevykazujú protektívny účinok po intra-tracheálnom podaní pri rozvoji radiačného poškodenia pľúc.

Hodnosť, meno a priezvisko: **npor. Ing. Markéta Němcová**
(3. ročník)
Školiteľ: plk. gšt. doc. MVDr. Zuzana Šinkorová, Ph.D.
Téma sdělení: **Změny ve vývoji thymocytů po vnitřní kontaminaci a celotělovém ozáření experimentálního modelu myši**

Práce je zaměřena na odlišnosti procesu migrace prekurzorových kostňedřevých buněk po vnitřní kontaminaci vojensky významnými radioizotopy Sr^{85} , Cs^{134} a celotělovém gama ozáření myšího experimentálního modelu. Změny v procesu migrace jednotlivých subpopulací jsou vztaženy k neovlivněné kontrole.

Pokus byl proveden na experimentálním modelu myši C57BL/6. Pro vnitřní kontaminaci myši byly použity kapalné radionuklidy Sr^{85} , Cs^{134} v chemickém složení roztoku 20 mg $\text{SrCl}_2/\text{L} + 3 \text{ g HCl}/\text{l}$ a 20 mg $\text{CsCl}_2/\text{l} + 3 \text{ g HCl}/\text{l}$. K celotělovému ozáření byl využit zdroj ionizujícího záření Co^{60} . Charakterizace populací subpopulací thymu a periferní krve probíhala metodou mnohobarevné průtokové cytometrie. Pro měření vnitřní kontaminace bylo využito gamaspektrometrické trasy a kapalinové scintilace.

Celotělové ozáření experimentálního modelu myši dávkou 9 Gy vedlo v intervalu 17 dní k postupnému úbytku erytrocytů, do 10 dní k poklesu leukocytů a v průběhu 10 dní k postupnému nárůstu monocytů. U vzorků thymu i periferní krve dále dochází k vyplavování jednotlivých populací ve vlnách. Z vývoje jednotlivých subpopulací je však patrné, že 3. a 17. den dochází k depleci v tkáni thymu. Opětný nárůst buněk thymu je závislý na vyplavení krevních elementů z kostní dřeně, jejich migraci periferní krví a následně citlivě vyladěným procesem diferenciací pro-thymocytů.

Bližší pohled na působení IZ na thymus a mechanismy s ním spjaté může vést k rozvoji a ucelení pohledu na probíhající procesy v ozářeném nebo kontaminovaném organismu.

Hodnosť, meno a priezvisko: **Mgr. Martin Ondrej**
(3. ročník)
Školiteľ: pplk. doc. PharmDr. Aleš Tichý, Ph.D.
Téma sdělení: **Radiosensibilizace nádorových buněk pomocí modulace autofagie: fosfo-proteomická analýza**

Cíl práce: Práce je zaměřena na studium fosforylovaných proteinů v nádorových buňkách nemalobuněčného karcinomu plic H1299 po ovlivnění inhibitorem autofagie Lys05 v kombinaci s ionizujícím zářením. Hlavním předmětem zájmu je charakterizace signálních drah uplatňujících se v radiosensibilizaci s ohledem na možnou cytoprotektivní roli autofagie u nádorových buněk.

Metodika: Pro studium biologických procesů probíhajících v ozářených buňkách ovlivněných inhibitorem autofagie Lys05 byla použita metoda SILAC s následným stanovením pomocí hmotnostní spektrometrie. Jako experimentální model byla vybrána buněčná linie nemalobuněčného karcinomu plic. Experimentální postup byl postaven na základech „shotgun“ proteomiky, přičemž frakce fosfopeptidů byla získána obohacením pomocí TiO_2 mikropartikulí a následně identifikována/kvantifikována použitím LC-MS/MS.

Výsledky: Celkově bylo identifikováno více než 1100 proteinů, na kterých bylo identifikováno přes 6000 fosforylačních míst. Signifikantně modifikované fosfoproteiny se podílely na regulaci biosyntetických a metabolických procesů a také buněčné odpovědi na stres. Kromě toho byly identifikovány proteiny podílející se na regulaci dráhy mTOR, hlavní regulační dráhy autofagie.

Záver: Provedli jsme pilotní studii změn molekulárních mechanismů vlivem inhibitoru autofagie Lys05 v kombinaci s ionizujícím zářením s výsledky naznačujícími ovlivnění hlavních regulačních drah autofagie. Další experimenty budou zaměřeny na verifikaci získaných výsledků.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Adéla Kmochová**
(4. ročník)
Školitel: pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D.
Téma sdělení: **Terapeutické možnosti ovlivnění poškození epiteliálních tkání ionizujícím zářením**

Cíl práce: Cílem projektu je zhodnotit účinek epidermálního růstového faktoru (EGF) a keratinocytárního růstového faktoru (KGF) stran poškození plic při lokálním ozáření hrudníku.

Použitá metodika: V roce 2016/2017 byly provedeny 2 experimenty. V 1. modelu byly myši (C57Bl/6) rozděleny do skupin: 0 Gy, 15 Gy, 15 Gy + EGF (8 dávek, 1mg/kg) a 15 Gy + EGF (21 dávek, 1mg/kg). Odběr vzorků proběhl 191. den po ozáření. V 2. modelu byly myši (Balb/c) rozděleny do skupin: 0 Gy, 10 Gy, 10 Gy + KGF (8 dávek, 5mg/kg). Odběr vzorků proběhl 114. den po ozáření. V obou modelech byl hodnocen krevní obraz, histopatologické změny, infiltrace imunitními buňkami a změny v cytokinovém profilu plic.

Dosažené výsledky: V 1. modelu došlo u 1t aplikace EGF k signifikantnímu zvýšení bílé krevní řady. V plicích došlo k signifikantnímu zvýšení cytokinů TNF- α , MCP-1, TGF- β , MMP-2 a MMP-9 a k poklesu KC. U 3t aplikace EGF je nárůst výraznější a u všech cytokinů. 1t aplikace vedla k statisticky významnému poklesu infiltrace plicní tkáně granulocyty. U 3t aplikace EGF došlo ke snížení vzdušnosti plicní tkáně. Obě aplikace vedly k statisticky významnému nárůstu ukládání kolagenu. U 2. modelu došlo k signifikantnímu nárůstu cytokinů TNF- α , MCP-1, MIP-1 α , IFN- γ , IL-6, TGF- β , MMP-2, MMP-9 a KC. Dále došlo ke snížení vzdušnosti plicní tkáně a k nárůstu akutních zánětlivých parametrů a ukládání kolagenu.

Závěr: Experimenty ukazují, že aplikace růstových faktorů musí být kratší než 1 týden, tak, aby nevyvolávala zánětlivé změny v plicní tkáni.

Hodnost, jméno a příjmení: **MUDr. Aleš Hlávka**
(5. ročník)
Školitel: emeritní prof. RNDr. Jiřina Vávrová, CSc.
Téma sdělení: **Význam IGRT v léčbě karcinomu prsu**

Cíl práce: Pro správné ozáření je nutné zajistit přesné nastavení polohy pacienta. Standardně používané značky na kůži vyžadují široký bezpečnostní lem. Cílem práce je zjištění možné redukce bezpečnostního lemu při použití IGRT bez rizika poddávkování cílového objemu a tím zajištění šetření okolních tkání (plíce, srdce, druhý prs).

Použitá metodika: Měříme rozdíl v nastavení pacientek na ozařovači (jejich polohu těla vůči svazku lineárního urychlovače) při použití standardních značek na kůži a při provedení 2D/2D ortovoltážních snímků zobrazovacím zařízením lineárního urychlovače.

Dosažené výsledky: Máme dokončen sběr dat (více než 6.500 měření získaných od více než 200 pacientů) a jejich statistické zpracování. Připravena jejich publikace v odborném časopisu. Připravena přednáška.

Závěr: Z naměřených hodnot je zřejmé, že standardně užívaný bezpečnostní lem 1cm (k expanzi z CTV na PTV) je u některých pacientek zářených bez použití IGRT nedostatečný. Z toho důvodu jsme na našem pracovišti zařadili IGRT u pacientek léčených s karcinomem prsu jako standardní metodu.

3. sekce – Preventivní medicína a ochrana veřejného zdraví, Vojenská chirurgie, Vojenské vnitřní lékařství

DSP Preventivní medicína a ochrana veřejného zdraví:

Hodnost, jméno a příjmení: **Ing. Lenka Vymlátílová**
(2. ročník)
Školitel: pplk. MUDr. Jana Fajfrová, Ph.D.
Téma sdělení: **Účinnost kognitivně behaviorální terapie aplikované ve skupinových kurzech redukce tělesné hmotnosti na změnu antropometrických a biochemických parametrů**

Společnost STOB vypracovala strukturovaný 12ti týdenní program pro redukci tělesné hmotnosti vycházející z terapeutického směru kognitivně behaviorální terapie (KBT).

Naše studie sledovala efektivitu tohoto programu na změnu antropometrických a biochemických parametrů a také na změnu stravovacích a pohybových návyků.

Studie se účastnilo prozatím 44 žen, které podstoupily na počátku a na konci kurzu KBT antropometrické (přístroj Tanita BC-545) a biochemické vyšetření (celkový cholesterol, HDL a LDL cholesterol, triglyceridy, glykémie a kyselina močová). Dále bylo provedeno zhodnocení týdenních jídelních záznamů na počátku a na konci studie pomocí nutričního programu NutriDan 2 a po celou dobu studie byla monitorována pohybová aktivita účastnic pomocí akcelerometru InBody band.

Průměrný věk žen ve studii byl $41,2 \pm 11,8$ let. Vstupní průměrná hmotnost byla $93,7 \pm 17,5$ kg a průměrný vstupní BMI byl $32,7 \pm 6,1$ kg.m⁻². Redukce tělesné hmotnosti byla zaznamenána u 40 žen (tj. 91%). Průměrný váhový úbytek byl $-4,6 \pm 2,6$ kg, z toho úbytek tukové hmoty $-4,5 \pm 2,4$ kg. Úbytek svalové hmoty byl nevýznamný $-0,1 \pm 1,4$ kg. Ve výživových zvyklostech byl zaznamenán pozitivní trend ve snížení příjmu energie, sacharidů a tuků, a naopak zvýšení příjmu vlákniny. Ženy v průměru za celý kurz nachodily 11.388 ± 2654 kroků denně.

KBT je efektivní metoda při změně stravovacích a pohybových návyků. Účastnice kurzu redukují efektivně nadbytečné kilogramy, což se pozitivně projevilo na zlepšení antropometrických i biochemických ukazatelů. Ve studii budeme i nadále pokračovat. Studie se nově rozšířila i na analýzu střevního mikrobiomu před zahájením intervence a jeho změnu po ukončení intervence.

Hodnost, jméno a příjmení:

Ing. Šárka Salajková
(3. ročník)

Školitel:

doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

Téma sdělení:

Povrchově aktivní sloučeniny potenciálně využitelné v diagnostice nebo terapii onkologických onemocnění

Kvartérní amonné soli jsou povrchově aktivní sloučeniny mající široký potenciál využití zejména díky svému permanentnímu náboji, který může usnadňovat prostup sloučeniny do buňky, případně interagovat s buněčnou membránou. Tyto sloučeniny jsou často využívány v průmyslu jako desinfekční či konzervační činidla, např. pyridinové soli v očních kapkách. V dnešní době jsou povrchově aktivní látky zkoumány a využívány také jako ligandy pro nanočástice využitelné nejen v biomedicině. Cílem práce je příprava vhodných kvartérních amonných solí, které budou použity na povrchovou úpravu zlatých nanočástic, resp. zlatých nanotyčinek. Takto upravené zlaté nanotyčinky by měly být dále testovány jako potenciální teranostika (diagnostika, imaging, terapie) u onkologických onemocnění. V této práci je popsána syntéza nových kvartérních amonných solí s postranním pegylovým řetězcem a koncovou thiolovou skupinou, jejich charakterizace a *in vitro* testování.

DSP Vojenská chirurgie:

Hodnost, jméno a příjmení:

kpt. MUDr. Ondřej Malý
(2. ročník)

Školitel:

pplk. doc. MUDr. Zdeněk Šubrt, Ph.D.

Téma sdělení:

Inhalační aplikace směsi kyslíku a vodíku jako potencionálního antioxidantu k prevenci ischemicko-reperfúzního poškození jater v průběhu velké jaterní resekce

Cílem předkládaného experimentu bude vyhodnocení antioxidačního potenciálu vodíku u velkého laboratorního zvířete (prasete) podstupujícího velkou jaterní resekci (hemihepatektomii – chirurgické odstranění poloviny jater), kdy po obnovení cirkulace dochází k různě závažnému tzv. ischemicko-reperfúznímu poškození, jehož podkladem je oxidativní stres. Experimenty na zvířatech tuto účinnost vodíku již ukázaly jak u reperfúzního poškození jater, tak reperfúzního poškození dalších orgánů (např. myokardu, plic a centrální nervové soustavy), většinou však pouze u malých laboratorních zvířat (potkanů).

Hodnost, jméno a příjmení: **kpt. MUDr. Jan Šimek**
(3. ročník)
Školitel: plk. doc. MUDr. Jiří Páral, Ph.D., MBA
Téma sdělení: **Operační léčba diafyzárních zlomenin klíční kosti pomocí intramedulární vs. extramedulární vnitřní fixace**

Cíl práce: Zhodnocení průběžných výsledků odoperovaných pacientů pro zlomeninu klíční kosti ve studii zabývající srovnáním vnitřní intramedulární a extramedulární osteosyntézy zlomeniny střední třetiny klíční kosti po 12 měsících od operace.

Použitá metodika: Do studie jsou zařazeni všichni pacienti indikováni k operační léčbě zlomeniny diafýzy klíční kosti. Jedná se o prospektivní randomizovanou studii. Sledujeme věk, pohlaví, etiologii úrazu, místo, datum a způsob prvního ošetření, dobu ve dnech od úrazu po operaci, délku operace, velikost incize, délku hospitalizace, délku expozice RTG záření, délku hojení rány a kosti, délku rehabilitace a pracovní neschopnosti a jedná-li se o mono trauma, sdružené poranění či polytrauma. Nutnost extrakce. Klinické a RTG kontroly jsou po 1,2,3,6 a 12 měsících od operace. Po roce od operace je zhodnoceno Constant score.

Dosažené výsledky: Doposud jsme odoperovali 52 pacientů, 22 nitrodřeňovou osteosyntézou a 30 pacientů dlahovou osteosyntézou. 12 měsíců od operace je zatím 34 pacientů. Mezi nejvýznamnější dosavadní výsledky patří delší RTG expozice u nitrodřeňové osteosyntézy a dle délky expozice RTG a operačnímu času se zdají jako nevhodná indikace k nitrodřeňové osteosyntéze spirální zlomeniny.

Závěr: Nutnost pokračování ve studii k získání více dat ke srovnání.

DSP Vojenské vnitřní lékařství:

Hodnost, jméno a příjmení: **MUDr. Tomáš Grega**
(2. ročník)
Školitel: pplk. MUDr. Martin Jakl, Ph.D.
Téma sdělení: **Metabolická rizika vzniku kolorektálního karcinomu**

Cíl práce: Identifikovat metabolické rizikové faktory spojené s kolorektální neoplázií (adenomy a pokročilé adenomy) a vyhodnotit jejich dopad na screening kolorektálního karcinomu.

Použitá metodika: Prospektivní sběr dat, pacienti přicházející ke kolonoskopii v rámci screeningu (TOKS pozitivní, nebo screeningová kolonoskopie) jsou konsekutivně zařazeni do cílové a kontrolní skupiny dle přítomnosti definovaných metabolických rizikových faktorů. Cílovou skupinu tvoří pacienti s diabetes mellitus 2. typu (DM 2. typu) nebo s přítomností kardiovaskulárního rizika SCORE ≥ 10 %; kontrolní skupinu tvoří pacienti bez těchto rizikových faktorů. Demografické charakteristiky, antropometrické měření, metabolické rizikové faktory a koloskopické patologické nálezy jsou hodnoceny u pacientů v cílové a kontrolní skupině.

Dosažené výsledky: Kolonoskopie byla provedena v období od r. ledna 2016 do května 2017 u 1057 pacientů. Kompletní výsledky jsme zpracovali u 551 jedinců. Prevalence adenomů a pokročilých adenomů byla 2x vyšší v cílové skupině (pacienti s DM 2. typu nebo s vysokým kardiovaskulárním rizikem), než u jedinců v kontrolní skupině. Kardiovaskulární riziko (SCORE ≥ 10 %) se zdá být silnějším rizikovým faktorem výskytu kolorektální neoplázie než izolovaná přítomnost DM 2. typu.

Závěr: Přítomnost kardiovaskulárního rizika (SCORE ≥ 10 %) je silnějším rizikovým faktorem kolorektální neoplázie, než samotná přítomnost DM 2. typu. Jedinci s kardiovaskulárním rizikem (SCORE ≥ 10 %) by měli být považováni za vysoce rizikovou skupinu výskytu kolorektální neoplázie.

Hodnost, jméno a příjmení: **MUDr. Martin Hajšl**
(3. ročník)
Školitel: doc. MUDr. Martin Malý, Ph.D.
Téma sdělení: **Metabolická studie markerů akutního koronárního syndromu**

Komplexní 'fingerprinting' lipidomu plasmy pacientů s akutním koronárním syndromem si klade za cíl hledat nové biomarkery a léčebně ovlivnitelné vztahy metabolismu lipidů. Kontrolní skupinu tvoří pacienti bez manifestního

postižení věnčitých tepen aterosklerózou. Metodika je založena na analýze lipidomu plazmy pacientů s akutním koronárním syndromem v délce trvání do 6 hodin od začátku obtíží a kontrolní skupiny, to je pacientů s negativním katetrizačním nálezem koronárních tepen. Vzorky jsou zpracovávány kapalinovou chromatografií UHPLC-HRMS/MS s následným softwarovým zpracováním výsledků programy firmy Agilent Technologies.

V minulém roce byl dokončen sběr dat. V rámci projektu byla získána plazma od 103 pacientů s akutním koronárním syndromem a 102 pacientů kontrolní skupiny. U 83 pacientů s akutním koronárním syndromem byly provedeny odběry plasmy s odstupem 3-5 dnů s již nastavenou terapií.

V současné době probíhá zpracování výsledků. První výsledky ukazují výrazné rozdíly lipidomu jednotlivých skupin. Největší rozdíly jsou patrné v obsahu volných mastných kyselin a monoacylglycerolů, zatím bez dalšího určení. Po zpracování všech vzorků se předpokládá, že budou objeveny nové (kandidátské) biomarkery s prediktivní schopností, které předčí / doplní ty, které jsou používány pro tradiční posouzení rizik.

4. sekce – Toxikologie:

Hodnost, jméno a příjmení:	npor. Mgr. Tomáš Kučera (2. ročník)
Školitel:	doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.
Téma sdělení:	Léčiva Alzheimerovy nemoci nebo tuberkulózy? Využití cross-dockingu ve vývoji léčiv

Metody výpočetní chemie nalézají stále širší uplatnění ve vývoji léčiv. Vedle dnes už klasických užití, tedy virtuálního screeningu a optimalizace struktury malých molekul, se nově prosazují v dalších oblastech. Jednou z těchto oblastí je hledání biologických cílů pro malé molekuly – tedy tzv. reverzní screening. Informace o biologických cílech je použitelná pro možnost nalézání nových způsobů užití léčiv i pro predikci jejich vedlejších účinků. Práce si klade za cíl najít biologické cíle pro nové inhibitory ABAD (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasa 2).

Pro práci byla zvolena metoda molekulového dockingu. Jako základ byla použita databáze lékových cílů scPDB obsahující více než 9 000 proteinů a 59 nových experimentálních inhibitorů ABAD. Vhodnost softwaru AutoDock Vina byla prokázána dockingem známých ligandů a čtyřicetinasobku návnad. Vazebné místo pro molekulový docking bylo nastaveno individuálně pro každý cíl podle údajů z primární databáze. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí konstrukce ROC křivek (receiver operating characteristic curve), predikovaných vazebných energií i manuální inspekce vazebných interakcí.

Na základě výsledků bylo predikováno 19 různých biologických cílů testovaných sloučenin. Tyto cíle se liší svou klinickou významností – od prospěšných (např. antimikrobiální efekt, protizánětlivé účinky), přes klinicky nevýznamné, až po nežádoucí (např. riziko lékových interakcí).

Hodnost, jméno a příjmení:	Mgr. Lukáš Górecki
Školitel:	doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.
Téma sdělení:	Monokvarterní reaktivátory, nová skupina látek k léčbě intoxikace organofosforovými inhibitory

Mezi organofosforové inhibitory patří nervově paralytické látky a pesticidy, při jejichž intoxikaci dochází k život ohrožujícímu stavu. Současná terapie je především kauzálního charakteru a vyžaduje včasnou aplikaci. V posledních letech se v oblasti vývoje nových antidot proti organofosfátům zaměřuje největší pozornost na skupinu nekvarterních reaktivátorů. Nekvarterní reaktivátory mají sice řadu výhod oproti stávajícím, klinicky užívaným antidotům, selhávají však v klíčových oblastech zejména z pohledu fyzikálně-chemických parametrů (zejména nízká solubilita) a tedy i jejich nedostačující biologická aktivita in vivo. Navíc, díky zvýšené lipofilitě se může projevovat jejich zvýšená kumulace v organismu a následná toxicita. Bis-kvarterní reaktivátory spolu s mono kvarterním pralidoximem tak stále zaujímají místo první volby v léčbě těchto intoxikací. Z tohoto důvodu byla navržena a připravena nová série mono kvarterních reaktivátorů, které přinášejí rovnováhu mezi bis kvarterními a nekvarterními a s tím i příslib vývoje nových a účinných antidot. Efektivita této série sloučenin byla racionálně podpořena pomocí metod molekulově modelovacích studií. Biologické in vitro testování tyto předpoklady potvrdilo. Celá série je tak v porovnání s klinicky užívanými standardy velmi účinná nejen proti nervově paralytickým látkám,

ale i proti organofosforovým pesticidům. Budoucím doplněním in vivo výsledků tak můžeme docílit potenciálních kandidátů, které by mohly překonat milník klinického testování.

Hodnost, jméno a příjmení: **Ing. David Herman**
(3. ročník)
Školitel: plk. doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.
Téma sdělení: **Biomedical proficiency test (BioPT)**

Hlavním cílem bylo vyvinout, zavést a optimalizovat metody pro stanovení markerů expozice bojovou chemickou látkou (BCHL).

Tyto metody byly využity při účasti na testech způsobilosti pořádaných organizací pro zákaz chemických zbraní (OPCW). Dle fiktivního scénáře byly osobám, které vykazovaly symptomy otravy BCHL, odebrány vzorky plasmy a moči. Tyto vzorky (3 vzorky plasmy, 3 vzorky moči) byly odeslány do laboratoří ke stanovení markerů expozice BCHL s časovým limitem 14 dnů včetně reportu. Pro 1st BioPT byl jako BCHL vybrán yperit a pro 2nd BioPT byl vybrán sarin.

Pro stanovení aduktů a metabolitů BCHL byly použity kapalinová a plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Naše hodnocení od OPCW v 1st BioPT bylo „D“ a v 2nd BioPT bylo „A“.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Martina Hrabínová**
(3. ročník)
Školitel: plk. doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.
Téma sdělení: **Expres a purifikace lidského rekombinantního proteinu beta-sekretasy (BACE1)**

Cílem práce je získání rekombinantního proteinu, beta-sekretasy (BACE1), který je důležitým biochemickým markerem v patologii Alzheimerovy nemoci. Na základě dosažených výsledků a rešeršní práce byla zvolena produkce lidského rekombinantního proteinu v Expi293^{FTM} buňkách.

Bylo připraveno celkem 6 fragmentů DNA o různých délkách kódující různé kombinace domén proteinu BACE1. Všechny konstrukty kódovaly na C-konci histidinovou kotvu pro potřeby detekce proteinu a jeho purifikace. Byl připraven konstrukt kódující protein BACE1 bez lokalizačního signálu. Expres v Expi293 buňkách byla prokázána pomocí imunoblotu za použití anti-His protilátky. Na westernblotu byly přítomny dva proužky o velikostech okolo 70kDa (obr. 1), což odpovídá proteinu plně štěpenému v kombinaci s proteinem neštěpeným (propeptid). Byly vytvořeny další konstrukty s delecí transmembránové části proteinu, vzhledem k neschopnosti vyizolovat protein z buňky. Tyto konstrukty obsahovaly signální peptid lidského imunoglobulinu pro sekreci proteinu do média. Nebyla detekována expres požadovaného proteinu ani u jednoho z konstruktů a protein nebyl nalezen ani v buňkách, ani v médiu. Vzhledem k předchozím výsledkům byla u dalších konstruktů zvolena kombinace delecí transmembránové části spolu s delecí lokalizačního signálu pro Golgiho aparát. Byly vytvořeny dva konstrukty, z nichž jeden konstrukt obsahoval pouze katalytickou část (45-454) a druhý konstrukt obsahoval ještě prodoménu (22-454). Z analýzy prvních výsledků je patrné, že dochází k expresi rekombinantního proteinu u konstruktů (22-454), který byl potvrzen imunodetekcí anti-His protilátkou. V tuto chvíli byla provedena pouze jedna purifikace rekombinantního proteinu, avšak protein nebyl izolován v dostatečném množství pro použití v dalších analýzách a pro stanovení aktivity v kolorimetrické esaji.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Pavla Martinková**
(3. ročník)
Školitel: pplk. prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc.
Téma sdělení: **Využití mobilního fotoaparátu jako detekčního zařízení v toxikologické analýze**

Na diagnostickou analýzu v oblasti toxikologie se v současné době kladou čím dál větší nároky, a to hlavně v oblasti rychlosti a přenosnosti měřících zařízení. Rychlá analýza, ať už biochemických markerů, jejichž hladiny v průběhu intoxikace kolísají, nebo přímo otravných tox, může zamezit rozvoji fatálních následků otrav a zmírnit poškození

organismu. V současné době může měření biochemických markerů otrav za jakýchkoli i polních podmínek zajistit mobilní telefon. Glukóza je jeden z biochemických markerů, jehož hladina v průběhu intoxikace dosahuje patologických hodnot, např. při otravách organofosfáty nebo karbamáty dochází ke značné alteraci hladiny tohoto markeru. Enzymatická analýza glukózy je založena na reakci analytu s enzymy glukóza oxidázou a peroxidázou, které katalyzují přeměnu bezbarvého chromogenu o-fenylendiaminu na žluto-oranžový produkt. Enzymy jsme postupně imobilizovali do sol-gelové membrány, chitosanové membrány a na povrch magnetických částic za použití různých platforem a barevná změna byla vždy vyfotografována a následně analyzována v systému barevných kanálů RGB. Fotografická detekce ve všech případech vykazovala dostatečnou citlivost, přesnost a rovněž nebylo zjištěno ovlivnění metody ani interferenty (další sacharidy) ani látkami, které se vyskytují v plazmě (albumin, kyselina askorbová, glutation, močovina apod.). Na základě získaných výsledků můžeme fotografickou detekci kolorimetrických metod hodnotit jako ideální metodu pro měření analytů mimo laboratoř, což umožní rychlejší analýzu, než tomu bylo dosud.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Ľubica Múčková**
(3. ročník)
Školitel: plk. doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.
Téma sdělení: **In vitro charakterizace látek modulujících aktivitu acetylcholinestasy**

Reaktivátory acetylcholinestasy (AChE) mají klíčovou úlohu pri liečbe otráv organofosfátmi mechanizmom prerušenia kovalentnej väzby medzi AChE a organofosfátom. Cieľom práce bolo *in vitro* sledovanie zmeny hladiny reaktívnych foriem kyslíka (ROS).

Pre testovanie boli použité 4 bunkové línie – HepG2, ACHN, NHLF a SH-SY5Y. Produkcia ROS bola stanovená pomocou flourescenčnej sondy 2',7'-dichlorofluoresceín diacetát a pomocou mikropilárnej prietokovej cytometrie, ktorá založená na detekcii ROS pomocou reagentie dihydroethidium po 4 a 24 hodinách od ovplyvnenia buniek.

Testované reaktivátory vykazovali rozdielnu zmeny intracelulárnej hladiny ROS u všetkých typoch buniek po nami zvolenom časovom intervale (4 a 24 hodín) od ovplyvnenia buniek. Intenzita flourescenčného signálu je závislá rovnako ako od koncentrácie tak aj od jednotlivých látok. Na základe výsledkov by sme sa mohli domnievať, že ROS by mohli zastávať určitú úlohu v mechanizme cytotoxicity reaktivátorov AChE.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Martin Andrš**
(3. ročník)
Školitel: plk. doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.
Téma sdělení: **Syntéza a in vitro hodnocení inhibitorů fosfatidylinositol 3-kinasam příbuzných kinas jako potenciálních antiproliferativních a radiosensitizujících látek**

I přes významné pokroky v oblasti cílené léčby patří radio- i chemoterapie stále mezi základní metody léčby onkologických onemocnění. Bohužel, tento typ léčby bývá spojen se závažnými nežádoucími účinky a nemusí být vždy dostatečně účinný. Vyřazení reparačních drah DNA inhibicí proteinů, které se účastní oprav DNA, signalizace nebo jiné role, nám může poskytnout možnost jak zvýšit účinnost léčby, ale i specificky zacílit nádorové buňky. Mezi celou řadu perspektivních cílů patří i tři atypické protein kinasy příbuzné fosfatidylinositol 3-kinasam: ataxia telangiectasia mutated (ATM), ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) a DNA-dependentní protein kinasa (DNA-PK). Při návrhování inhibitorů těchto kinas jsme vycházeli z neselektivního inhibitoru fosfatidylinositol 3-kinas 2-morfolin-4-yl-8-fenylchromen-4-onu (LY294002) a kofeinu, který také inhibuje ATM a ATR. U připravených látek se testuje jejich účinek na jednotlivé kinasy a efekt na proliferaci buněk, jak samostatně, tak v kombinaci s klasickými cytostatiky nebo ozařováním. Připravené inhibitory poslouží jako základ pro návrh dalších sloučenin se zaměřením na vyšší účinnost a selektivitu k jednotlivým kinasam.

Hodnost, jméno a příjmení: **Mgr. Nela Váňová**
(4. ročník)
Školitel: plk. doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.
Téma sdělení: **Sledování biomarkerů oxidačního stresu HPLC metodami**

Oxidační stres se podílí na toxickém působení mnoha chemických látek včetně léčiv a hraje významnou roli v patogenezi řady onemocnění. Sledování biomarkerů oxidačního stresu (BOS) tak může poskytnout podrobnější informace o mechanismech toxicity vybraných léčiv.

Pro simultánní stanovení BOS malondialdehydu (MDA) a 3-nitrotyrosinu (3NT) vznikajících působením oxidantů na HepG2 buněčnou linii byla vyvinuta LC-MS/MS metoda včetně postupu pro úpravu a zpracování vzorků. Tato metoda slouží k monitorování oxidativního/nitrosativního poškození biomolekul *in vitro*. Metoda byla rozšířena o postupy pro zpracování dalších biologických matric (plasma, moč) za účelem hodnocení vzorků pocházejících z testování léčiv *in vivo*. Za účelem sledování vlivu oxidačního agens na hladiny antioxidantů v průběhu experimentu byla zavedena HPLC-UV metoda pro stanovení redukovaného/oxidovaného glutationu (GSH/GSSG). V dalších experimentech budou tyto metody použita pro sledování vzniku MDA, 3NT, GSH a GSSG v rámci hodnocení biologických vlastností nových potenciálních léčiv syntetizovaných na Katedře toxikologie a vojenské farmacie FVZ UO.