

70 let Fyziologického ústavu AV ČR

Jan Kopecký

POMÁHÁME ODHALOVAT PODSTATU ZÁVAŽNÝCH ONEMOCNĚNÍ

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky byl založen před sedmdesáti lety, 1. ledna 1954, v rámci (tehdy ještě Československé) Akademie věd. Věřen svému názvu se od té doby systematicky věnuje výzkumu v oblasti normální i patologické fyziologie. Stále více do hloubky charakterizujeme základní biologické mechanismy se vztahem k člověku a medicíně.

Za těch sedmdesát let, které od založení ústavu uplynuly, naše společnost výrazně zestárla a ztloustla. Moderní medicína tak čelí novým výzvám v podobě zvýšeného náporu tzv. civilizačních onemocnění. Hlavním současným cílem Fyziologického ústavu AV ČR je právě výzkum příčin vzniku těchto neinfekčních onemocnění, spojených s obezitou a stárnutím. Genetické vloh v kombinaci se škodlivými vlivy prostředí a životních návyků, kumulovanými v průběhu celého života, mohou vyvolat patologické metabolické a zánětlivé změny, jejichž charakter se v různých orgánech a tkáních liší. Jakmile je už organismus není schopen kompenzovat, pozorujeme širokou paletu celotělových projevů těchto onemocnění.

VZÁJEMNĚ PROVÁZANÉ CIVILIZAČNÍ CHOROBY

Příčiny vzniku civilizačních chorob spolu přitom úzce souvisejí a jedno onemocnění zpravidla výrazně zvyšuje riziko onemocnění dalších (obr. 1). Nadváha a obezita vedou k cukrovce (diabetu) 2. typu, kterou trpí nejméně 10 % naší populace. Rozvrat glukózového a lipidového metabolismu při této chorobě vede k poškození velkých tepen, čímž narůstá riziko ischemické choroby srdeční, mozkové mrtvice a nedokrevnosti dolních končetin. Na kardiovaskulární onemocnění v ČR umírá polovina z nás, což je třikrát větší úmrtnost než např. ve Francii. Poruchy mikrocirkulace vedou k poškození ledvin (nefropatii), nervů (neuropatii), zraku (retinopatii) i k erektilní dysfunkci. Zvyšuje se riziko vzniku Alzheimerovy choroby, úzce svázané se stárnutím. I z tohoto důvodu trpí touto dosud nevléčitelnou neurodegenerativní nemocí více než 40 % osob starších pětadesáti let. Naše obyvatelstvo je také jedním z nejpostiženějších z hlediska četnosti kolorektálního karcinomu – dalšího onemocnění spjatého s cukrovkou, nevhodnou stravou a životním stylem.¹

Nárůst civilizačních onemocnění přináší obrovské náklady. Jen léčba obezity a jejích komplikací spolkne pětinu výdajů na zdravotní péči v ČR. Ke zlepšení tohoto neblahého stavu je třeba jak lepší prevence, tak účinnější léčby. Potřebujeme důkladně porozumět tomu, co se v těle děje, abychom mohli účinně zasáhnout. Příkladem takového úspěchu světové medicíny z poslední

doby je objev inkretinů, hormonů produkovaných buňkami tenkého a tlustého střeva (mj. glucagon-like peptide 1 – GLP1), a následný vývoj agonistů receptoru pro GLP1, které jsou účinné jak v potlačování diabetu, tak ve snižování tělesné hmotnosti.

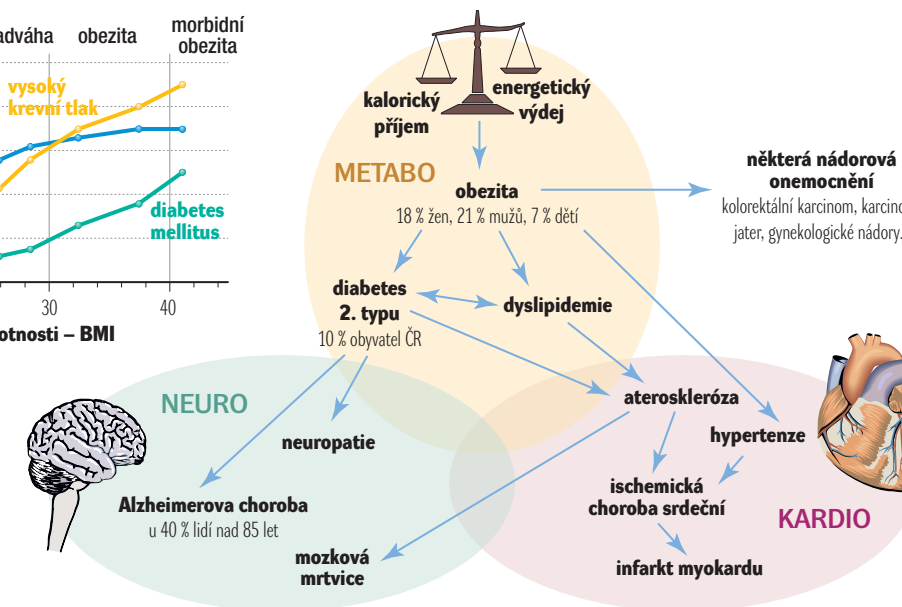
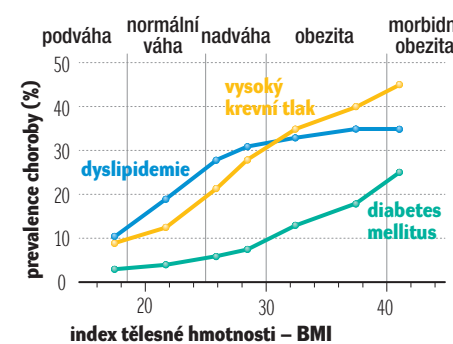
NEJMODERNĚJŠÍ METODOLOGICKÉ PŘÍSTUPY

Fyziologický ústav AV ČR je pro odhalování příčin civilizačních onemocnění velmi dobře vybaven. Disponuje moderním zvěřincem, jehož náročná rekonstrukce bude letos dokončena a který umožňuje provádění dlouhodobých pokusů na myších a potkaních modelech řady onemocnění. Přístrojové vybavení ústavu poskytuje pravděpodobně nejlepší možnosti pro celotělovou charakterizaci těchto modelů v ČR. Zahrnuje mj. analýzy metabolického obratu, tělesného složení, telemetrii krevního tlaku, srdeční činnosti, citlivosti k hormonům nebo chování zvířat.

Vedle celotělové úrovně jsou příčiny chorob zkoumány i na úrovni jednotlivých buněk či molekul. Díky zapojení ústavu do infrastruktury CzechBioimaging² jsou snadno dostupné moderní přístroje pro nejrozličnější zobrazování v biologii a medicíně. Rutinně také využíváme moderní vysokokapacitní analytické metody, které umožňují získat desetitisíce informací z jediného biologického vzorku. Ve spolupráci s Národním centrem lékařské genomiky³ na Univerzitě Karlově lze analyzovat aktivitu všech genů v dané tkáni pomocí kvantifikace jejich transkriptů (transkriptom). Společně s Ústavem molekulární genetiky AV ČR náš ústav vybudoval vlastní proteomickou laboratoř, která ve vzorcích stanovuje hladiny jednotlivých proteinů. V poslední době se také podařilo rozvinout metody pro charakterizaci malých polárních i nepolárních molekul v tkáních i krevních tekutinách (metabolomika/lipidomika). Pro interpretaci všech těchto dat je zaváděna bioinformatika, ale klíčové jsou zejména zkušenosti a pochopení souvislostí na mnoha různých úrovních.

MUDr. JAN KOPECKÝ, DrSc., (*1951)

se již od studia na 2. lékařské fakultě UK věnoval laboratornímu výzkumu, zprvu mitochondriální přeměny energie a tvorby tepla v hnědé tukové tkáni, později vlivu omega-3 mastných kyselin na metabolismus při obezitě, v současnosti termogenezi v kosterním svalu. Od roku 2015 je ředitelem Fyziologického ústavu AV ČR a od roku 2022 je koordinátorem „metabolického výzkumu“ v Národním institutu pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (CarDia), jehož hlavním cílem je přispět k efektivnějšímu zvládnutí epidemie civilizačních onemocnění (https://cardia.ikem.cz).



1. *Vzájemná provázanost a dopady civilizačních onemocnění. S rostoucí tělesnou hmotností je mj. spojen vyšší výskyt diabetu, hypertenze a dyslipidemie (viz vložený graf, zobrazující data z americké studie SHIELD), ale i dalších kardiovaskulárních a onkologických onemocnění (čísla ve schématu se vztahují k situaci v ČR).*

Charakterizace podstaty civilizačních onemocnění nebo zlepšení jejich prevence a léčby se neobejde bez kombinace pokusů na laboratorních zvířatech s klinickými pokusy (obr. 2). Studie na pacientech jsou prováděny na několika klinických pracovištích, která s námi spolupracují. Tuto spolupráci usnadňuje zapojení ústavu do výzkumných konsorcií podporovaných z prostředků Národního plánu obnovy (2022–2025), v rámci Národního institutu pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (CarDia),⁴ jehož hlavním cílem je přispět k efektivnějšímu zvládnutí epidemie civilizačních onemocnění, a dále Národního ústavu pro neurologický výzkum (NPO-NEURO-D),⁵ který se zaměřuje na charakterizaci poruch vývoje a stárnutí mozku. V obou projektech náš ústav spolupracuje s nejvýznamnějšími centry klinického výzkumu u nás, zejména s lékařskými fakultami a s Institutem klinické a experimentální medicíny. Významná je i spolupráce s Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR.

VĚDCI VČERA A DNES

Špičkové přístrojové a materiální vybavení představuje důležitý prostředek úspěchu, základem jsou ale vždy nadšení a originálně přemýšlející lidé. A na mimořádné vědce měl Fyziologický ústav ve své historii štěstí. Už u jeho základů stály výrazné osobnosti profesorů lékařství Zdeňka Servíta a Arnošta Gutmanna, expertů na poli neurověd. K nim se brzy připojili Petr Hahn a Jiří Křeček, objevitelé významu kritických vývojových period v období kolem porodu pro pozdější vývoj. K těmto osobnostem patřili též Otakar Poupa, který v ústavu založil tradici výzkumu vývoje srdce, nebo neurofyziolog Jan Bureš, žák Zdeňka Servíta. V ústavu pracovala v průběhu sedmdesáti let jeho dosavadní existence i řada dalších významných vědců,⁶ z nichž mnoho odešlo během normalizace po roce 1968 do zahraničí.⁷ Je s ním spjata i kariéra veřejnosti dobře známé profesorky Heleny Illnerové, někdejší předsedkyně Akademie věd (2001–2005) a nestorky výzkumu na poli chronobiologie a cirkadiálních rytmů.

V průběhu let postupně vykristalizovaly tři hlavní, navzájem úzce propojené výzkumné směry, kterým se Fyziologický ústav

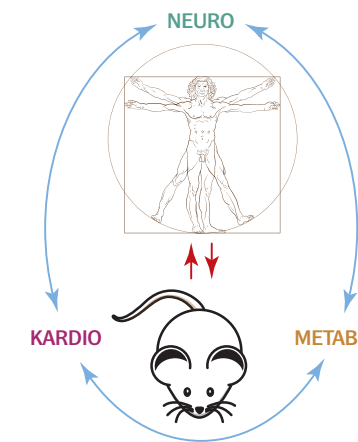
AV ČR věnuje dodnes: výzkum na poli neurověd (NEURO), metabolismu (METABO) a kardiovaskulární fyziologie (KARDIO).

Dnes má ústav více než 400 zaměstnanců, sdružených ve 22 vědeckých odděleních a v řadě servisních laboratořích, což z něj činí jeden z největších mezi všemi 54 ústavu Akademie věd ČR. Nesporně je jedním z nejvýznamnějších center výzkumu podstaty civilizačních onemocnění u nás.

Pro ilustraci pestrosti našeho současného výzkumu v třech výše zmíněných výzkumných směrech jsem požádal o krátké články tři kolegyně, které jsou na začátku vlastní výzkumné kariéry. V příspěvku dr. Heleny Janíčkové čtenář nahlédne do neurovědního výzkumu s cílem poznat význam jednoho konkrétního typu receptoru. V článku dr. Markéty Hlaváčkové (ve spolupráci s jejím doktorandem) získáme představu o mechanismech, které na molekulární úrovni zprostředkovávají vliv prostředí na srdce. A v neposlední řadě dr. Lydie Plecítá přibliží nový mechanismus kontroly sekrece inzulínu z buněk pankreatu a také možnost „přeprogramování“ těchto buněk v závislosti na změnách metabolismu. Věřím, že s těmito kolegyněmi a se všemi ostatními spolupracovnicemi a spolupracovníky včetně našich studentek a studentů má Fyziologický ústav AV ČR perspektivu smysluplného bádání i do budoucna.

Poděkování: kolegyním HJ, MH a LP, jmenovaným výše, za jejich příspěvky; dr. Petrovi Zoubarovi za pomoc s textem a jeho redakci.

2. *Komplementarita pokusů na laboratorních zvířatech a klinických studiích. Modelové pokusy na zvířatech odhalují základní biologické mechanismy. Jejich platnost a využití v medicíně jsou pak ověřovány na pacientech. V pokusech na laboratorních zvířatech také hledáme vysvětlení pro primární nálezy z klinických studií.*



1) Viz také Vyskočil F.: Vesmír 103, 12, 2024/1.
 2) https://www.czech-bioimaging.cz
 3) https://ncmg.cz
 4) https://cardia.ikem.cz
 5) https://www.ninr.cz
 6) https://www.fgu.cas.cz/about/243-historie-a-soucasnost
 7) Štrbáňová S., Kostlán A.: Sto českých vědců v exilu. Academia, Praha 2011

Padesát odstínů malých šedých buněk

Helena Janíčková

Když se slavný detektiv Hercule Poirot s oblibou chlubil svými „malými šedými buňkami“, měl nutně jen mlhavou představu o tom, jak vlastně fungují. I když toho dnes o našich neuronech víme mnohem, mnohem víc, pořád to nestačí k tomu, abychom trvale a účinně vyléčili velkou část z jejich mnoha onemocnění.

Součástí světové komunity neurovědčů, kteří se o to přesto snaží, je osm týmů z Fyziologického ústavu AV ČR a navzdory rozdílům v metodách i konkrétních tématech máme jedno společné: náš obor je stále mladý a praktické výsledky našeho snažení se nezískávají lehko. To hlavní, co neurovědci v uplynulých desetiletích svého výzkumu pochopili, je vlastně to, že lidský mozek je mnohem složitější, než si s pomocí lidského mozku zatím umíme představit.

KOMPLEXNOST KOMPLIKUJE LÉČBU

Byť produktivita vývoje nových léků (měřeno počtem nově schválených léků v poměru k vynaloženým prostředkům) statisticky dlouhodobě klesá ve všech oblastech medicíny [1], v psychiatrii je riziko neúspěchu obzvláště vysoké, srovnatelné snad jen s náročným odvětvím onkologie. Zatímco však dnes lékaři umějí úspěšně léčit mnohé dříve neřešitelné onkologické případy, v psychiatrii žádný zázračný pokrok nenastal. Důvodů je jistě více, ale jedním z těch nejčastěji zmiňovaných je stále nedostatečná znalost podstaty psychických onemocnění a jejich komplexnost [2, 3]. Většina psychických nemocí, jako je deprese nebo schizofrenie, vzniká jako důsledek kombinace mnoha faktorů. Můžeme však ve světě umělé inteligence a začínajícího osidlování vesmíru ospravedlnit naši neschopnost vyléčit depresi pouze její komplexností? Na první pohled těžko.

Pochopení toho, jak psychická onemocnění vznikají a jak v mozku působí, ve skutečnosti v posledních desetiletích obrovsky pokročilo. V základním neurovědním výzkumu dnes máme k dispozici technologie, které nám u myši a dalších experimentálních zvířat umožňují zapínat a vypínat jednotlivé nervové okruhy podle potřeby. Vídeňská myš, které se po aktivaci příslušných neuronů začnou prát s gumovou rukavicí nebo se krmí „na povel“, obletěla svět již před deseti lety [4, 5]. Avšak kupodivu ani podrobné zmapování nervových okruhů a jejich funkce v experimentální medicíně zatím nepřineslo žádný velký průlom ve farmaceutickém výzkumu. Léky používané v psychiatrii mění v mozku hladiny neurotransmiterů, jako je dopamin, serotonin nebo acetylcholin, nebo se vážou na jejich receptory. Ale zatímco přirozené neurotransmitery a jejich receptory dokážou aktivovat konkrétní nervové okruhy podle potřeby, zvenčí podané léčivo tuto schopnost nemá: bude aktivovat či tlumit všechny receptory svého druhu, bez ohledu na to, na jakém nervovém okruhu či druhu neuronu se nacházejí. Přitom v posledních letech se díky rozvoji technik molekulární biologie stále více potvrzuje, co vědci už dlouho tušili: že naše „malé šedé buňky“ jsou

ve skutečnosti velice různobarevné a vůbec není jedno, které z nich aktivujeme nebo tlumíme.

BAREVNÉ, NIKOLI ŠEDÉ NEURONY

Už slavný španělský histolog Santiago Ramón y Cajal na počátku 20. století dobře věděl, že neurony v lidském mozku nejsou všechny stejné a že se liší tvarem i způsobem větvení. Další podoby rozmanitosti malých šedých buněk se začaly objevovat spolu s tím, jak se vyvíjely technické možnosti neurovědčů: možnost měřit elektrické potenciály v živé tkáni ukázala, že různé neurony mají svůj specifický rytmus, ve kterém vysílají signály. Pak byla objevena biochemická identita neuronů, které se liší nejen neurotransmitery, ale i dalšími specifickými molekulami. Neurony se dále rozdělily podle toho, do jakých částí mozku vysílají své výběžky, pomocí kterých komunikují. A nejnověji do klasifikace neuronů zasáhla bioinformatická analýza, která je dokáže rozdělit do skupin na základě podobnosti a rozdílů v genové expresi.

TUPÉ NÁSTROJE V NAŠEM MOZKU

Pokud tedy uvážíme obrovskou rozmanitost a zároveň složité propojení neuronů v lidském mozku, je vlastně překvapivé, že naše léčba psychických onemocnění dokáže pomoci alespoň někomu. Jak napsal Samuel Barondes, emeritní profesor Kalifornské univerzity v San Francisku a autor populárních knih o biologických základech psychiatrie: „Dokonce i ta nejlepší antidepressiva jsou jenom tupé nástroje. V mozku mají velké množství různých účinků, z nichž pouze některé jsou terapeutické.“ [6]

Většina léků používaných v psychiatrii působí nespecificky na velké množství receptorů a dalších molekul, z nichž mnohé ani neznáme. Výsledný účinek na psychiku je tak dán mnoha různými faktory a je prakticky nemožné ho u konkrétního člověka předvídat.

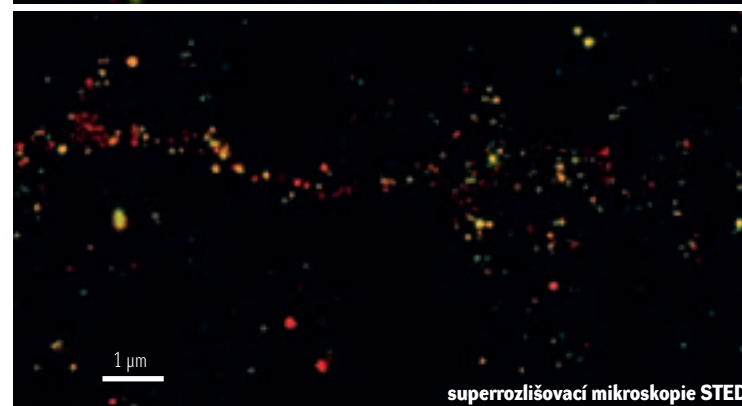
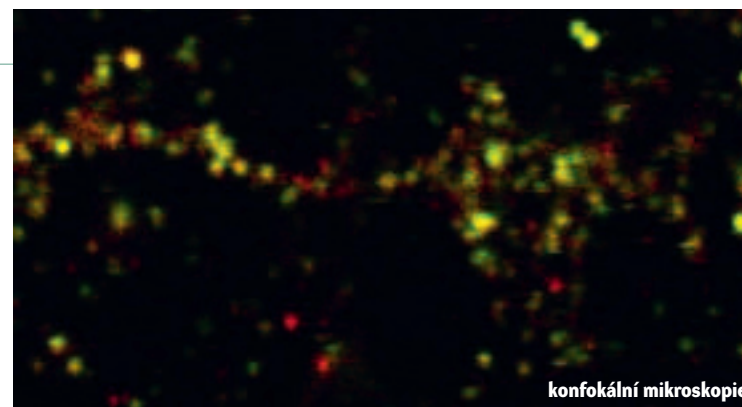
Musíme se ale smířit s tím, že mozek je příliš komplikovaný, nástroje léčby příliš tupé a účinek léčby do značné míry dílem náhody?

VELKÝ ÚČINEK MALÉHO RECEPTORU

Zatímco někteří vědci z oboru hovoří o tom, že naše poznání duševních onemocnění je dosud v „žárodečném“ stadiu [2], neustále pokračují snahy detailně popsat i ty nejmenší části lidského mozku, jejich vzájemné vztahy a funkce. Jen vzhledem k pouhému

MUDr. et Mgr. HELENA JANIČKOVÁ, Ph.D., (*1982)

vystudovala všeobecné lékařství na 1. LF UK a biochemii na PFF UK, postdoktorandskou stáž absolvovala na University of Western Ontario v Kanadě. Ve Fyziologickém ústavu AV ČR se v Oddělení neurochemie zabývá funkcí nikotinových receptorů ve specifických neuronových populacích.



Uvidět znamená uvěřit: nikotinové receptory zobrazené pomocí superrozlišovací mikroskopie. Technický pokrok v mikroskopii a dalších oblastech nabývá novým objevům i v neurovědě. Například superrozlišovací mikroskopie (Vesmír 94, 168, 2015/3), dosahující rozlišení v řádu desítek nanometrů (dole), nám umožňuje studovat lokalizaci nikotinových receptorů a jejich případné interakce s dalšími proteiny s přesností, která by s využitím klasické konfokální mikroskopie (nahoře) byla těžko představitelná. Na obrázcích je vidět beta₂ nikotinová podjednotka (červeně) a protein PSD95, typický pro postsynaptickou membránu (zeleně), oboje přítomné v myším neuronu rostoucím v kultuře. Žluté body značí kolokalizaci obou proteinů, tedy přítomnost nikotinových receptorů v postsynaptické membráně.

Snímky Alice Abbondanza

počtu všech částí (90 miliard neuronů různých druhů, 7000 synapsí různých druhů na jediném neuronu a až několik milionů proteinů různých druhů v jediné synapsi) [7, 8] se jedná o nadlidský úkol. Možná že právě to k němu neurovědec tak přitahuje.

V našem týmu ve Fyziologickém ústavu AV ČR nyní studujeme alfa₄beta₂ nikotinový receptor – jeden konkrétní druh nikotinového receptoru, tedy jednoho z těch, které zprostředkovávají příjemné i nebezpečné účinky nikotinu. Zajímá nás, ve kterých typech neuronů se tento receptor nachází, do jakých svých synapsí ho neurony směřují, jak rychle ho v nich odbourávají a obnovují a především to, jakou má v různých neuronech funkci.

Ve většině oblastí mozku jsou nikotinové receptory velmi běžné. Ovšem v jedné specifické struktuře, tzv. striatu, které řídí naše pohyby a je pod velkým vlivem neurotransmiteru dopaminu, se překvapivě na místních neuronech nikotinové receptory téměř nevyskytují. Jak jsme ukázali v nedávné studii [9], v nejběžnějším typu striálních neuronů (který tvoří 95 % všech neuronů ve striatu) nikotinové receptory vůbec nejsou a ze vzácnějších typů, které tvoří zbývajících 5 %, je má jenom sem tam některý. Hned na začátku jsme si proto položili otázku: má i takto malá skupina receptorů šanci ovlivnit aktivitu okolních neuronů a vyvolat změny v chování celého organismu? Pod „organismem“ si prosím představte laboratorní myš. Genetické odstranění studovaného

nikotinového receptoru z toho malého počtu neuronů, které ho ve striatu původně měly, stačilo k tomu, aby se zvýšila celková aktivita všech okolních neuronů (tedy těch, které samy tento receptor nikdy neměly). Zároveň myšky s příslušnou genetickou úpravou také v průměru změnilly svoje chování: oproti kontrolním sourozencům projevovaly větší strach z neznámého prostředí, byly citlivější na stimulační účinky drogy amfetaminu a místo přirozeného zájmu o neznámého myšího soukmenovce se raději zabývaly průzkumem rovněž nového, ale neživého předmětu.

Jestliže i tak málo receptorů v konkrétním typu neuronů může takto významně ovlivnit celý organismus, pak je namísto otázky, zda mají stejné receptory přítomné v různých druzích neuronů stejné nebo různé účinky. Abychom to zjistili, tentokrát jsme geneticky odstranili nikotinový receptor ze dvou různých neuronových populací v prefrontální kůře, části mozku zodpovědné za sociální chování, pozornost a emoce. Jakkoli si na finální odpověď musíme ještě chvíli počkat, už nyní víme, že dobře mířené odstranění nikotinových receptorů v prefrontální kůře udělá s myškami divy: z průměrných myši se mohou stát nebojácní a kamarádští jedinci, kteří se beze strachu vydají do neznámých prostor a ochotně se seznamují s každým novým jedincem svého druhu. Důležité je tu slovo „mohou“. Ne v každé myši skupině je účinek stejný a výsledný efekt závisí zřejmě na dalších proměnných, jejichž vliv teprve začínáme odkrývat.

POMALÉ, DRAHÉ, VZRUŠUJÍCÍ

V každodenním provozu v laboratoři to člověk nevnímá, ale stačí o výzkumu někomu vyprávět a zdánlivá marnost našeho počínání vpluje na povrch: několik let usilovné práce, abychom částečně rozkryli účinky jednoho podtypu receptoru v několika typech neuronů ve dvou různých mozkových strukturách?

Základní výzkum je skutečně pomalý, drahý a člověku čekajícímu na lék se nutně zdá spíš nevděčný než vzrušující. Ale když uvážíme komplexnost (nejen) lidského mozku a jeho mnoha onemocnění, není se vlastně čemu divit. I v neurovědním výzkumu může do hry vstoupit šťastná náhoda, která nás přivede k účinnému léku třeba proti Alzheimerově chorobě, podobně jako Alexander Fleming díky kontaminaci jedné z bakteriálních platen objevil penicilin. Abychom význam takové náhody rozpoznali a nový lék nehodili do koše v domnění, že je to bezcenný omyl, je v neurovědě potřeba kombinovat mravenčí práci, nové technologie, sběr a analýzu velkých dat a úsilí lidského mozku, kterému především zvědavost, znalosti a zkušenost umožní rozpoznat skryté zákonitosti v sobě samém.

LITERATURA

- [1] Scannell J. W. et al.: Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 191–200, 2012, DOI: 10.1038/nrd3681.
- [2] Blackburn T. P.: Depressive disorders: Treatment failures and poor prognosis over the last 50 years. *Pharmacol Res Perspect.* 7, e00472, 2019, DOI: 10.1002/prp2.472.
- [3] Zhu T.: Challenges of Psychiatry Drug Development and the Role of Human Pharmacology Models in Early Development – A Drug Developer's Perspective. *Front. Psychiatry* 11, 562660, 2021, DOI: 10.3389/fpsyt.2020.562660.
- [4] Gaidos S.: Aggression Avenue: Tracing how the brain is wired for violence. *Science News* 187, 6, 2015.
- [5] Jennings J. H. et al.: The Inhibitory Circuit Architecture of the Lateral Hypothalamus Orchestrates Feeding. *Science* 341, 1517–1521, 2013, DOI: 10.1126/science.1241812.
- [6] Barondes S.: Better than Prozac, Creating the next Generation of Psychiatric drugs. New York: Oxford University Press, 2003, ISBN 978-0-19-515130-5.
- [7] Max-Planck-Gesellschaft, <https://www.mpg.de/brain>.
- [8] Grant S. G. N., Fransén E.: The Synapse Diversity Dilemma: Molecular Heterogeneity Confounds Studies of Synapse Function. *Front. Synaptic Neurosci.* 12, 590403, 2020, DOI: 10.3389/fnsyn.2020.590403.
- [9] Abbondanza A. et al.: Nicotinic acetylcholine receptors expressed by striatal interneurons inhibit striatal activity and control striatal-dependent behaviors. *J. Neurosci.* 42, 2786–2803, 2022, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1627-21.2022.

Lydie Plecítá Hlavatá

Inzulinem to nekončí

ZDRAVÉ BETA-BUŇKY JSOU BUDOUCNOSTÍ LÉČBY DIABETU

Cukrovka (diabetes mellitus) je chronické onemocnění, jehož hlavním znakem je porušená glukózová rovnováha v těle, která se projevuje zvýšenou hladinou krevního cukru (hyperglykemií). Porozumění procesům kontroly glukózy na buněčné a molekulární úrovni otevírá cesty k novým způsobům léčby.

Hladinu cukru v krvi reguluje hormon inzulin (Vesmír 101, 40, 2022/1). Je produkován pankreatickými beta-buňkami, jež jsou součástí Langerhansových ostrůvků slinivky břišní (pankreatu). Zvýšená hladina cukru v krvi indukuje výlev inzulinu z pankreatických beta-buněk, který následně signalizuje v periferních tkáních (zejména játrech, kosterní svalovině a tuku), že je potřeba odstranit cukr z oběhu vstřebáním do těchto tkání. Cukr je následně přetvořen na zásobní produkty jako glykogen či tuk.

Rozlišujeme dva typy tohoto onemocnění. Cukrovka 1. typu je autoimunitního původu. Imunitní systém reaguje proti samotným beta-buňkám a jejich úbytek následně způsobí nedostatek inzulinu pro regulaci hladiny glukózy. Cukrovka 2. typu v populaci převažuje a je asociována převážně s obezitou a nezdravým životním stylem. Ačkoliv je inzulin beta-buňkami produkován, snižuje se citlivost tkání k inzulinové regulaci (nastává tzv. inzulinová rezistence) a chronicky se zvyšuje hladina krevního cukru. To má za následek sekundární komplikace v podobě poškození tkání, jako například očí (retinopatie), nervů (neuropatie), ledvin (nefropatie) atd. S růstem životní úrovně v posledních desetiletích celosvětově výrazně narůstá prevalence tohoto onemocnění, zejména cukrovky 2. typu.

Převládající léčba aplikací inzulinu (u cukrovky 1. typu), resp. podáváním antidiabetik a dietou (u cukrovky 2. typu) rozhodně není konečným řešením, neboť představuje poměrně invazivní přístup a pacientům přináší mnohé strasti. Díky novým molekulárním technikám, zejména na úrovni jednotlivých buněk, se v poslední době ukazují další možnosti, jak přispět k zachování zdravých beta-buněk, a tím nástup cukrovky včas odvrátit.

REDOXNÍ ROVNŮHA V BETA-BUŇKÁCH

Beta-buňka je majoritní endokrinní buněčný typ, který se nachází ve zdravých Langerhansových neboli pankreatických ostrůvcích slinivky. Již před mnoha lety byl popsán mechanismus výlevu inzulinu jakožto odpovědi na zvýšenou koncentraci glukózy. Zahnuje metabolickou dráhu zpracování glukózy (glykolýzu), dále oxidativní metabolismus jejich metabolitů v mitochondriích, který vyústí v produkci buněčné energetické molekuly ATP. Ta následně inhibičně kanálu K_{ATP} ovlivňuje přenos draslíkových iontů přes plazmatickou membránu buňky. Inhibice kanálu způsobuje depolarizaci plazmatické membrány a následný vtok vápníkových iontů, které umožní vylití inzulinových granulí mimo buňku (obr. 1).

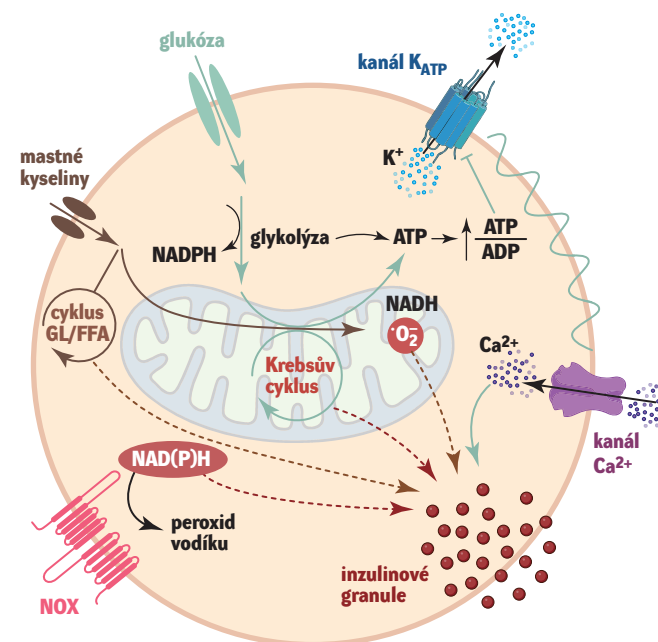
Toto dogma výlevu inzulinu bylo považováno za konečné, a tak další výzkum v oblasti beta-buněk a pankreatických

ostrůvků stagnoval. V posledních letech se ale ukazuje, že tento centrální mechanismus výlevu je laděn mnoha dalšími metabolity, které vznikají při zpracování glukózy v beta-buňce a jsou důležité i z hlediska dlouhodobého působení (obr. 1). Jedním takovým metabolitem jsou reaktivní formy kyslíku, zejména peroxid vodíku, které vznikají např. během aktivity mitochondrií při výrobě ATP jako její vedlejší produkt nebo pomocí specifických enzymů během buněčných pochodů. V nízké koncentraci a krátkodobě fungují jako důležité regulátory buněčných pochodů (redoxní signalizace). Zvýšené množství v dlouhodobém horizontu způsobuje jejich nahromadění, tzv. oxidativní stres, který poškozuje buněčné komponenty a je součástí řady patologií včetně cukrovky.

V posledních letech se ukazuje, že právě beta-buňky udržují křehkou redoxní rovnováhu a používají redoxní signalizaci ke správné funkci. Narušení redoxně-oxidační rovnováhy u beta-buněk vede k rozvoji cukrovky. Výzkumem jednoho z enzymů, které tuto rovnováhu v beta-buňkách ovlivňují, NADPH oxidázy 4 (NOX4), se dlouhodobě zabýváme. Zjistili jsme, že během akutní signalizace výlevu inzulinu jakožto odpovědi na zvýšenou přítomnost glukózy dochází k metabolické aktivaci NOX4. Následná produkce peroxidu vodíku spolu s buněčným ATP vedou k efektivnímu výlevu inzulinu a správné funkci beta-buněk (obr. 1). Zároveň ale při chronickém nadbytku živin (a tím i buněčného substrátu, např. glukózy), který je v moderní společnosti běžný (přejídání), může dojít k dlouhodobé aktivaci enzymu NOX4 a jeho zvýšené produkci peroxidu vodíku. Tomu se již beta-buňka v dlouhodobém měřítku neumí bránit. Mění se signalizace, která může vést k aktivaci imunitního systému a zánětu provávajícího cukrovku. Podobně samotné mastné kyseliny, které se při chronickém přejídání uvolňují do krve z tučné stravy v nadbytku, mohou aktivovat produkci kyslíkových radikálů z mitochondrií beta-buněk a redoxní signalizaci dlouhodobě měnit (obr. 1).

Redoxní stav beta-buněk je tedy důležitým hráčem v regulaci fyziologických a patologických pochodů. Jeho účinky závisejí zejména na množství a časové stopě. Jeho detailní výzkum v beta-buňkách může přinést poznatky umožňující včasnou intervenci

RNDr. LYDIE PLECÍTÁ HLAVATÁ, Ph.D., (* 1977) vystudovala Přírodovědeckou fakultu UK, po stážích na Univerzitě v Göteborgu a Univerzitě v Salcburku nastoupila do Fyziologického ústavu AV ČR, kde se nyní v Oddělení výzkumu pankreatických ostrůvků zabývá výzkumem beta-buněk v souvislosti s rozvojem cukrovky.

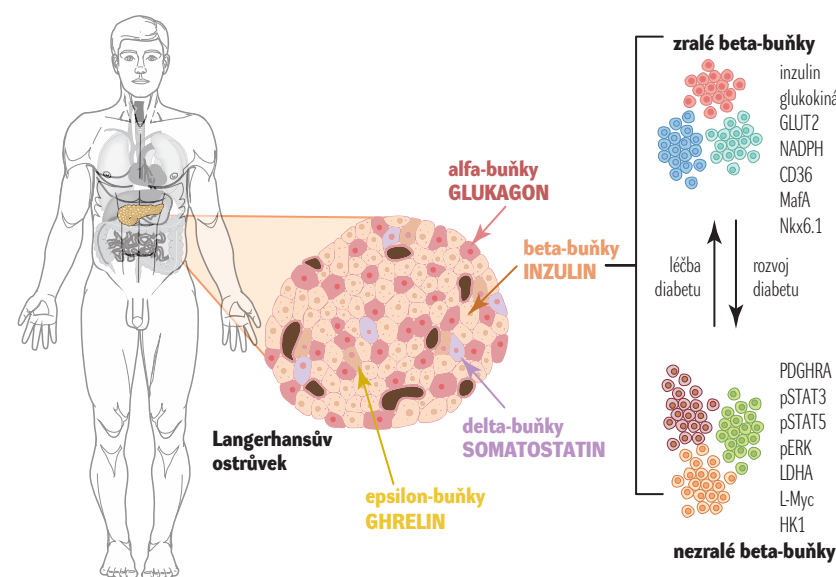


1. Mechanismus výlevu inzulinu u beta-buněk. Glukóza je metabolizována v beta-buňkách glykolýzou a mitochondriální oxidací na molekuly ATP, které inhibují draslíkový kanál (K_{ATP}). To způsobí depolarizaci plazmatické membrány buňky a vtok vápníkových iontů. Vápníkové ionty pak regulují výlev inzulinu z inzulinových granulí. Mastné kyseliny jsou metabolizovány v mitochondriích a zároveň v cyklu GL/FFA (glycerolipid/free fatty acid cycle), během kterého dochází k rozkladu mastných kyselin (lipolýze) a jejich tvorbě (lipogenezi). Během zpracování glukózy (aktivací enzymu NOX) i mastných kyselin (aktivitou mitochondriálního respiračního řetězce) vznikají reaktivní formy kyslíku, které podporují výlev inzulinu, stejně jako další vznikající metabolity.

pomocí specificky cílených antioxidantů. Ta by mohla pomoci oddálit vývoj cukrovky zejména 2. typu.

BUNĚČNÁ TRANSFORMACE

Dalším důležitým poznatkem výzkumu pankreatických beta-buněk je odhalení jejich heterogenity. Metoda RNA



2. Beta-buněčná heterogenita a možnosti přeprogramování. Langerhansův ostrůvek slinivky břišní obsahuje různé druhy endokrinních buněk, přičemž beta-buňky převládají. Jejich populace je značně heterogenní. Zjednodušeně, vznikají subpopulace zralých beta-buněk (podmíněno příklady exprimovaných genů), které dobře odpovídají na živiny v krvi výlevem inzulinu, a nezralé subpopulace beta-buněk (opět podmíněno příklady exprimovaných genů), které mají buď proliferativní potenciál, nebo jsou multihormonální a nespecifické. Během rozvoje diabetu se jejich poměr mění ve prospěch nezralých beta-buněk.

sekvenování jednotlivých buněk (single cell RNA seq) odhalila, že populace beta-buněk se dělí na buňky metabolicky vyspělé, efektivně odpovídající na výskyt glukózy v okolí výlevem inzulinu, a na buňky nevyzrálé, které si zachovávají spíše proliferativní potenciál (obr. 2). V průběhu vývoje diabetu 2. typu se nejprve beta-buňky snaží kompenzovat zvýšenou koncentraci glukózy v krvi. Zvýší produkci a výlev inzulinu (hyperinzulinemie), což vede v dlouhodobém měřítku k jejich vyčerpání (hypoinzulinemie) a v krajních případech ke smrti buněk.

Pro identifikaci beta-buněk v ostrůvcích se používá detekce inzulinu. Pokud na řezech slinivky jeho signál vymizel, např. u vzorků diabetických jedinců, mělo se za to, že došlo k vymizení beta-buněk pomocí programované buněčné smrti (apoptózy). Nyní se ale zjistilo, že metabolicky vyzrálé buňky se vlivem nadměrné produkce inzulinu, která vede k jejich vyčerpání, mohou dediferencovat, aniž by zanikly. Dediferencované buňky jsou často schopné výlevu více hormonů. Kromě inzulinu též glukagonu či somatostatinu, jež jsou za normálních okolností vylučovány výhradně jinými endokrinními buňkami Langerhansových ostrůvků (obr. 2). V případě včasného odeznění metabolického přesycení, např. úbytkem váhy, dietou, se mohou tyto dediferencované beta-buňky opět diferencovat zpět v metabolicky vyzrálé buňky, které obnoví syntézu inzulinu a dalších proteinů potřebných k jejich efektivní odpovědi na zvýšenou glukózu v krvi.

Podobně beta-buňky, které jsou méně vyzrálé, mohou sloužit během života jedince jako „náhradníci“ pro případ zániku zralých beta-buněk vlivem vyhoření. Mohou se pak diferencovat jako jejich náhrada. I zde by svou roli mohla hrát redoxní signalizace a množství reaktivních forem kyslíku. Dokonce se ukázalo, že i další důležité endokrinní buňky Langerhansových ostrůvků, např. alfa buňky, jsou schopné se v krizových situacích adaptace na nepříznivé nutriční podmínky diferencovat v beta-buňky. Alfa buňky za normálních okolností vylučují hormon glukagon, který jakožto protihráč inzulinu za podmínek nízké glukózy v krvi iniciuje naopak uvolňování glukózy z jaterní zásobárny glykogenů.

Těto transformační schopnosti jednotlivých subpopulací beta-buněk, ale i dalších endokrinních buněk Langerhansových ostrůvků, by se v budoucnu dalo využít k udržení populace zdravých beta-buněk během života jedince a k zabránění rozvoji diabetu. Transformace endokrinních buněk lze využít i k „laboratorní produkci“ nových zdravých beta-buněk. Ty by pak mohly být transplantovány pacientům, kteří je potřebují.

Daniel Benák a Markéta Hlaváčková

Epitranskriptom: klíč ke zdravému srdci?

Kardiovaskulární onemocnění jsou celosvětově nejčastější příčinou úmrtí.¹ V Oddělení vývojové kardiologie ve Fyziologickém ústavu AV ČR se dlouhodobě věnujeme studiu srdce a jeho patologií ve snaze přispět ke snížení vysoké morbidity a mortality těchto onemocnění. Zajímá nás role epitranskriptomu (souboru epigenetických modifikací RNA) ve vývoji srdce a rozvoji vrozených srdečních vad, úloha v patogenezi ischemické choroby srdeční, ale také jeho funkce v ochraně srdce.

Abychom pochopili, co je to epitranskriptom, musíme si nejprve připomenout, jak v buňce vznikají proteiny. Představme si buňčné jádro jako centrální knihovnu, v níž jsou uloženy návody k tvorbě všech proteinů buňky. Knihám v této knihovně se obecně říká DNA, manuál pro tvorbu konkrétního proteinu se označuje jako gen. Z knihovny však není možné odnášet žádné knihy, a informaci uloženou v genu je tedy potřeba nějak dopravit do cytoplazmy, což je továrna buňky, kde probíhá výroba proteinů. Obsah genu se proto nejprve musí přepsat do molekuly mRNA (messenger RNA), která slouží jako poslíček mezi buňčným jádrem a cytoplazmou. Tento proces se nazývá transkripce (přepis). Podle mRNA pak v cytoplazmě buňky dělníci (ribozomy) skládají protein, což je označováno jako translace (překlad). Souhrnně potom mluvíme o genové expresi. Jedná se o dynamický proces, který je pro fungování buněk zcela klíčový a jehož narušení může mít pro organismus fatální důsledky.

Jedním z mechanismů, jak může být genová exprese regulována, jsou epigenetické modifikace (obr. 1). Jedná se o chemické značky (často jde o metylovou skupinu), které mohou být navázané na DNA, na histony (proteiny, na kterých je DNA v jádře navázaná – v podstatě regály knihovny) nebo právě na mRNA. Soubor všech modifikací DNA a histonů přítomných v buňce se nazývá epigenom, soubor všech modifikací RNA se označuje jako epitranskriptom. Tyto změny mohou být dědičné, významné je však ovlivňují také vnější faktory, jako například prostředí či životní styl.

EPITRANSKRIPDOMICKÉ MODIFIKACE

Existuje velké množství epitranskriptomických modifikací (obr. 2), které plní v buňkách různorodé funkce. Tyto úpravy molekul RNA mohou být porovnány k dopravním značkám lemujícím silnice. Zatímco dopravní značky podávají instrukce řidičům aut, a regulují tak provoz na silnicích, RNA modifikace poskytují specifické signály pro RNA-vazebné proteiny, a ovlivňují tak genovou expresi. Stejně jako dopravní značka „zákaz vjezdu“ může zamezit autům vjet na určitou silnici, konkrétní modifikace

RNA může zablockovat interakci RNA s RNA-vazebnými proteiny a zamezit třeba právě tvorbě proteinu.

Enzymy, které jsou zodpovědné za epitranskriptomické regulace, se dělí do tří skupin. *Writers* RNA modifikují, *readery* se na modifikovanou RNA vážou, a tak zprostředkovávají její biologické funkce, a *erasery* modifikaci z RNA odstraňují.

Studium modifikací RNA se datuje do poloviny 20. století, kdy vědci poprvé identifikovali chemické změny v nukleotidech RNA. V osmdesátých a devadesátých letech si začali uvědomovat, že tyto modifikace RNA nejsou náhodné, ale mají specifické funkce. Přelomovým objevem byla v roce 2011 identifikace proteinu FTO (Fat Mass and Obesity-Associated protein). Jednalo se o první popsanou RNA demetylázu schopnou odstranit metylovou skupinu z N⁶-metyladenosinu (m⁶A) v RNA. Tím byla odhalena dynamická povaha této dlouho známé všudypřítomné RNA modifikace a naznačena její funkční role v regulaci osudu RNA.

S pokračujícím odhalováním modifikací RNA jsou identifikovány další regulační proteiny, čímž se funkční význam modifikací RNA stává zřejmější. Nyní víme, že epitranskriptomické regulace hrají klíčovou roli v různých molekulárních procesech (včetně sestřihu mRNA, její lokalizace, degradace či translace), a ovlivňují tak fyziologii buňky a její odpověď na stres. Modifikace RNA se vyskytují napříč druhovým spektrem, což naznačuje, že jsou to evolučně konzervované mechanismy řídicí genovou expresi v reakci na vnější podněty. Dysregulace epitranskriptomických modifikací je spojena s řadou chorob, včetně kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny, neurologických poruch a virových infekcí. Epitranskriptomika je rychle rozvíjejícím se oborem s terapeutickým potenciálem pro léčbu výše zmíněných onemocnění.

ROZVOJ VROZENÝCH SRDEČNÍCH VAD

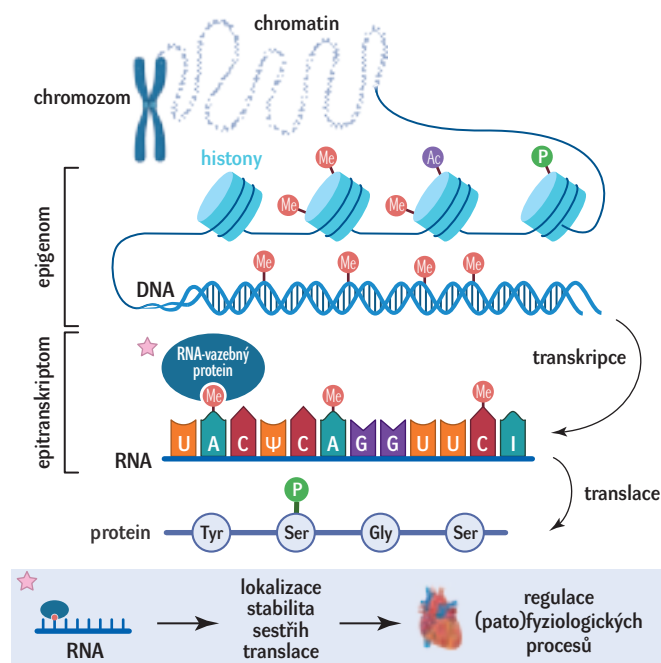
Epitranskriptomické regulace jsou klíčové pro správný vývoj srdce. Hrají roli v přeměně kmenových buněk v kardiomyocyty



Mgr. DANIEL BENÁK (*1993) vystudoval fyziologii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Ve Fyziologickém ústavu AV ČR se jako doktorand zabývá zejména rolí epitranskriptomu ve fyziologii a patofyziologii srdce.

RNDr. MARKÉTA HLAVÁČKOVÁ, Ph.D. (*1980) vystudovala biochemii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Po návratu

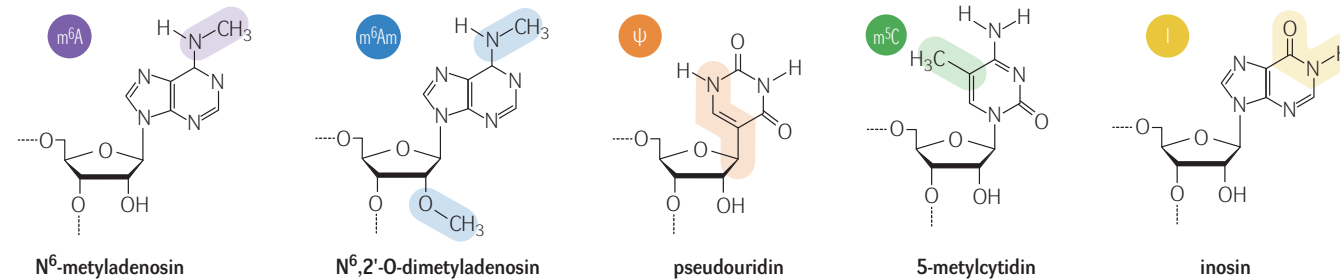
z postdoktorských stáží v Kanadě a USA se začala v Oddělení vývojové kardiologie Fyziologického ústavu AV ČR věnovat především úloze epitranskriptomických regulací ve vývoji a onemocněních srdce.



1. Epigenetická regulace genové exprese. Epigenetické značky (např. metylová skupina) se vážou na histony, na DNA i na mRNA. Značky na RNA fungují jako signály pro proteiny, které se na RNA vážou, čímž ovlivňují její další osud (lokalizaci, sestřih...) a zprostředkovávají i fyziologii buňky. Chyby v této regulaci jsou spojeny s řadou chorob.

(diferenciaci) a následně i v buňčném dělení kardiomyocytů (proliferaci). Není proto překvapivé, že narušení těchto regulací během embryonálního či fetálního vývoje může vést ke vzniku vrozených srdečních vad. Ty patří mezi nejběžnější vývojové vady, které jsou zároveň nejčastější příčinou úmrtí v prenatálním období a v prvním roce života.

U jedné palestinské rodiny byla nedávno objevena mutace v genu *FTO*, která vedla k nefunkčnosti tohoto enzymu. Děti s touto mutací se rodily s různými srdečními defekty a umíraly během prvních tří let života. Jednou z vrozených srdečních vad způsobených touto mutací byla např. otevřená Botallova dučej (*ductus arteriosus patens*). Jedná se o cévu, která slouží jako „objíždka plic“ v krevním oběhu plodu (v děloze nejsou plice potřeba) a která se uzavírá krátce po porodu. Její neuzavření může v závislosti na velikosti zkratu vyústit až v srdeční selhání. Kromě této mutace byly vrozené srdeční vady, včetně otevřené Botallovy dučej, asociovány i s mutacemi v genu kódujícím protein HNRNPA1, který se na m⁶A-modifikovanou RNA váže. Mimo m⁶A byl popsán také vliv dalších modifikací a regulátorů na vrozené srdeční vady, například pseudouridinu (mutace v genu *PUS3*), 5-metylcytidinu (mutace v genech *NSUN2* a *NSUN3*) nebo inosinu (mutace v genu *ADAR1*). Jakou přesně mají



2. Běžné epitranskriptomické modifikace.

epitranskriptomické modifikace úlohu ve vzniku těchto vad, ale zatím nevíme.

ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ

Podle WHO je ischemická choroba srdeční, zahrnující infarkt myokardu, celosvětově nejběžnější příčinou úmrtí. Nejnovější studie ukázaly, že v srdeční oblasti, která byla zasažena infarktem, dochází ke snižování hladin demetylázy FTO a s tím souvisejícímu zvýšení hladin m⁶A. Změny v hladinách této modifikace v srdci přitom přispívají k progresi srdečního selhání ovlivněním translace (buňčné výroby proteinů). Zvýšení exprese FTO potom zmírňuje rozvoj srdečního selhání regulací metabolismu glukózy. Dysregulace epitranskriptomické mašinerie tedy může výrazně ovlivňovat osud srdce. Na základě těchto znalostí mohou být vyvinuty nové terapeutické strategie cílící na klíčové regulátory (např. FTO), které by mohly snížit vysokou morbiditu a mortalitu srdečních onemocnění.

ZVÝŠENÍ ODOLNOSTI SRDCE

Pozitivní zpráva je, že si svůj epitranskriptom můžeme sami ovlivnit a před nemocí (nejen) srdce se tak chránit. Ke změnám na epitranskriptomické úrovni totiž v srdci dochází například při adaptaci na chronickou hypoxii (nedostatek kyslíku), krátkodobém hladovění či fyzické aktivitě, které mají ochranné účinky.

Adaptace organismu na hypoxii je jev běžný třeba ve vysokých nadmořských výškách. Kardioprotektivní účinek chronické hypoxie je znám již od padesátých let 20. století. Tehdy byl u skupiny peruánských obyvatel And pozorován nižší výskyt infarktu myokardu než u lidí žijících blíže hladině moře. Následné experimenty skutečně ukázaly, že po adaptaci na chronickou hypoxii je myokard odolnější ke všem projevům akutního nedostatku kyslíku. Tento jev je typický také pro novorozence, protože plod je de facto rovněž adaptován na hypoxii. Parciální tlak kyslíku v děloze totiž odpovídá pobytu ve výšce přibližně 8 tisíc metrů, jedná se tedy o „Mount Everest in utero“.

V naší laboratoři jsme přišli na to, že adaptace na chronickou hypoxii vede ke změnám hladin epitranskriptomických regulátorů v srdeční tkáni, včetně zmiňované demetylázy FTO, jejíž množství se za těchto podmínek zvyšuje. Množí se přitom důkazy o tom, že právě tento enzym může srdce ochraňovat před poškozením akutním nedostatkem kyslíku (jev běžný při neprokrvení srdce během infarktu). Podobný blahodárny efekt na srdce má kromě chronické hypoxie i krátkodobé hladovění. Tímto tématem se zabývá naše recentní publikace v časopise *RNA Biology*.² Hladovění snižuje úroveň metylace RNA v srdci a ovlivňuje i mašinerii epitranskriptomických regulačních proteinů včetně FTO. Podobný účinek má také střídavé hladovění.

Už dlouho je známo, že fyzická aktivita je zdravá pro srdce. Až v poslední době ale začíná vycházet najevo, že i zde mají své slovo epitranskriptomické regulace. Stejně jako u hladovění dochází i při tréninku k změnám hladin metylace RNA v srdci. Epitranskriptomika tedy může být jedním z klíčů ke zdraví našeho srdce.

1) Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) na ně každoročně umírá téměř 18 milionů lidí.
2) Benak D. et al.: Epitranscriptomic regulation in fasting hearts: implications for cardiac health. *RNA Biology* 21, 1, 1-14, 2024. DOI: 0.1080/15476286.2024.2307732.