



HORIZONTY ANATÓMIE

**Eliška Kubíková
Peter Weismann
Jana Jakimová**



**Anatomický ústav LF UK v Bratislave
Slovenská anatomická spoločnosť
Dekan LF UK v Bratislave**

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
LEKÁRSKA FAKULTA**

Eliška Kubíková
Peter Weismann
Jana Jakimová

HORIZONTY ANATÓMIE

**2018
UNIVERZITA KOMENSKÉHO BRATISLAVA**

© Vydavateľstvo PROPRINT s.r.o., Bratislava, 2018

Editori: doc. MUDr. Eliška Kubíková, PhD.
 doc. RNDr. Peter Weismann, PhD.
 MUDr. Bc. Jana Jakimová

Recenzenti: doc. MUDr. Luděk Vrtík, CSc.
 doc. MUDr. Augustín Prochotský, CSc.

ISBN: 978-80-89747-10-8
EAN: 9788089747108

Milé kolegyně, kolegovia, vážení čitatelia!

Som veľmi rada, že tradícia Ladzianskeho dňa sa zachováva naďalej pre osobnosť slovenskej anatómie profesora Ladzianskeho.

Jeho osobnosť nám vytvára tradíciu slovenskej anatómie. Anatómia bude predstavovať vždy základ tak teoretickej ako aj klinickej disciplíny. Anatómia ako báza všetkých odborov medicíny však nikdy nesmie sklznúť tak, že zabudneme na realitu, ale realitu skutočnú a neopakovateľnú, čo ľudské telo predstavuje. Preto musí byť pitva ľudského tela pre študentov medicíny navždy zachovaná. Ale musíme sa prispôbiť aj k dnešnému tretiemu tisícročiu. Moderné zobrazovacie metódy dokážu zobrazit' ľudské telo s absolútnou dokonalosťou, ale nikdy nesmieme zabudnúť na realitu, akou je anatomická pitva.

O tom sú aj dnešné horizonty anatómie. 3D zobrazovania sú dokonalé, ale kontakt s ľudským telom aj keď mŕtvym bude to najdokonalejšie.

Ale keďže horizonty... Každá ľudská bytosť si myslí, že horizont je čiara medzi zemou a oblohou, ale v skutočnosti každý človek má mať svoje horizonty, kde tuší niečo neznáme, lákajúce a to ho má posúvať ďalej a to je aj v anatómií, ktorá robí medicínu horizontom.

Eliška Kubíková

OBSAH

PREDSLOV	3
-----------------------	---

KAPITOLA I. ANATÓMIA

S. Bálentová, D. Kalenská, P. Muríň, E. Hajtmanová, J. Lehotský, M. Adamkov Histopatologické zmeny v mozgu potkana po expozícii ionizujúcim žiarením.....	9
K. Bevízová, E. Kubíková, A. Mifkovič, P. Lukáčiková Oblička a jej cievy, transplantácia obličiek z anatomického hľadiska.....	13
M. Frištáková Akcesórne a sezamské kosti nohy a členka.....	16
G. Hešková, D. Výbohová, Y. Mellová Anatomické orientačné body významné v axilárnej chirurgii.....	23
F. Horváthová, Z. Kováčová, N. Hvizdošová, S. Matéffy Anatómia a sociálne siete jednoduchý prístup k informáciám	27
Z. Kováčová, F. Horváthová, N. Hvizdošová, S. Matéffy, I. Hodorová Nervus obturatorius accesorius	30
F. Korim, M. Kuricová, T. Lipták Porovnanie účinnosti dvoch maceračných médií pri osteologickej preparácii	33
J. Líška, R. Zamborský, E. Ujházy, P. Malovec, V. Ríšová, Š. Polák Kľúčna kosť človeka a laboratórneho potkana	37
P. Lukáčiková, E. Kubíková, A. Mifkovič, H. El Falougy, K. Bevízová, J. Pappová Panva z anatomického a klinicko-funkčného uhla pohľadu.....	42
V. Mešťanová, I. Varga, M. Adamkov Histomorfologická adaptácia týmusu pediatrických kardiologických pacientov	45
M. Urda, T. Kalpakidis, M. Pribula, M. Kušnier, Š. Tóth, M. Mareta, E. Mechírová Morfologická a funkčná analýza ischemicko-reperfúzneho poškodenia tenkého čreva a vzdialených orgánov potkana	51
D. Výbohová, A. Boleková, G. Hešková, Y. Mellová Povrchový a hĺbkový učebný štýl vo vzťahu k akademickej úspešnosti v anatómii	57
G. Verbová, B. Verba, K. Lovásová, A. Boleková, M. Eötvösová Hodnotenie tvárovej estetiky u pacientov s orofaciálnym rázštepom.....	64

KAPITOLA II. ONKOLÓGIA

- K. Fabišíková, R. Lohajová Behulová, K. Závodná, L. Šebest, R. Valenčíková, V. Repiská**
Molekulárne biomarkery v diagnostike a liečbe pacientov s kolorektálnym karcinómom..... 71
- L. Gergely, H. Gbelcová, V. Repiská, V. Šišovský, E. Danihel, E. Straka, B. Rychlý, P. Priščáková**
Mutácie génu *PTEN* v seróznom papilárnom adenokarcinóme endometria 75
- F. Korim, V. Almášiová, M. Karamanová, K. Holovská**
Morfologický obraz multicentrického lymfómu na obličkách u koní..... 82
- A. Perželová, I. Siváková, P. Mráz, E. Kubíková**
Heterogénna expresia cytokeratínov v glioblastómových lúniách..... 86
- I. Siváková, A. Perželová, E. Kubíková, P. Mráz**
Koexpresia GFAP a nestínu v glioblastómových lúniách 170-MG-BA a 538-MG-BA 89
- V. Škuciová, S. Drahošová, D. Výbohová, M. Adamkov**
Imunohistochemická detekcia antigénu p16 v malígnych melanómoch..... 92

KAPITOLA III. UROLÓGIA

- S. Zaťkuliaková, P. Ďubjaková, O. Novotná, K. Leiva Demetrová, J. Breza, K. Slobodníková**
Chlopňa zadnej uretry 99
- S. Zaťkuliaková, K. Leiva Demetrová, K. Slobodníková, P. Ďubjaková, J. Jakimová**
Manažment pacientov s exstofiou močového mechúra 104
- S. Zaťkuliaková, O. Novotná, P. Ďubjaková, K. Leiva Demetrová**
Kongenitálna hydrokéla 109
- S. Zaťkuliaková, P. Ďubjaková, O. Novotná, K. Leiva Demetrová, J. Breza, K. Slobodníková**
Nezostúpené semenníky..... 112

KAPITOLA IV. VARIA

- L. Cádrová, M. Horváthová, K. Bauerová, J. Muchová**
Vplyv kyseliny hyalurónovej na aktivitu antioxidantných enzýmov potkanov s adjuvantnou artritídou 117
- M. Danková, E. Mechírová, I. Domoráková, Z. Fagová, M. Stebnický**
Detekcia ubiquitínovej aktivity v gliových bunkách bielej hmoty miechy kráľika po farmakologickom prekonšitovaní a následnej ischémií/reperfúzií 123

M. Dvořáková, L. Slemenská, S. Scsuková, E. Rollerová, I. Žitňanová Vplyv komerčne využívaných PEG- <i>b</i> -PLA nanočastíc na aktivitu glutatiónperoxidázy v homogenátoch pečene potkanov	128
Z. Fagová, I. Domoráková, M. Danková, E. Mechírová, M. Stebnický Imunoreaktivita antioxidantných enzýmov v mieche kráľika po postkondicionovaní bradykinínom	133
M. Horváthová Eikozanoidy a ich úloha v patogenéze aterosklerózy u diabetických pacientov.....	138
M. Chomová Diabetes mellitus indukuje zmeny v regulácii cytochróm c oxidázy v mozgovom kortexe potkana	143
M. Chomová Skoré obdobie diabetes mellitus ovplyvňuje funkciu mitochondrie v kortexe a hipokampe potkana	151
M. Janubová, I. Žitňanová Vplyv etanolových hubových extraktov <i>G. lucidum</i> a <i>H. erinaceum</i> na rast mladých a starých buniek.....	160
K. Koňariková, J. Frivaldská, H. Gbelcová, M. Švéda, T. Ruml, L. Andrezálová, I. Žitňanová Inhibícia proteazómu v bunkách A549	168
L. Laubertová, Z. Ďuračková, I. Žitňanová Účinok oleja z vlašských orechov na aktivitu superoxididismutázy monocytov U937 v hyperglykemických podmienkach.....	172
M. Marčeková, E. Neščáková, Y. Mellová Vzťah medzi dĺžkou dojčenia a výskytom alergie u skupiny detí z okresu martin.....	176
J. Muchová, M. Janubová, I. Žitňanová Molekulové základy kognitívnej krehkosti seniorov, vplyv intervencie (fyzická aktivita a/alebo suplementácia omega-3 masnými kyselinami).....	181
Z. Paduchová Vplyv probiotík na lipidový metabolizmus.....	187
Z. Szentesiová, B. Trebatický, J. Muchová Oxidačný stres a úloha prírodných antioxidantov v liečbe chronického ochorenia obličiek.	193
Š. Tóth, T. Kalpakidis, M. Pribula, M. Kušnier, M. Urda, Z. Jonecová, K. Čurgali, M. Mareta, E. Mechírová Imunomodulačný vplyv betanínu pri ischémii a reperfúzií tenkého čreva	200
M. Trepáč, B. Liščák, M. Kokavec, R. Zamborský Využitie kultivovaných buniek pri liečbe chondrálnych defektov.....	206

V. Tupá, S. Drahošová, M. Grendár, M. Adamkov Expresia hypoxiou-indukovaného faktora 1 α a karbonickej anhydrázy IX v kolorektálnych karcinómoch	210
L. Turecký, V. Kupčová, M. Ďurfinová, M. Laššánová, E. Uhlíková Niektoré antiproteinázy v sére pacientov s Crohnovou chorobou	217
A. Viktorínová, K. Svitekova, S. Choudhury, M. Ďurfinová Vybrané markery oxidačného stresu a lipidové rizikové faktory kardiovaskulárnych chorôb u zdravých dobrovoľníkov stredného veku	227
M. Záborská Pneumokokové invázne infekcie u dospelých a prevencia	235
I. Žitňanová, S. Oravec, M. Dvořáková, L. Laubertová, M. Janubová, K. Koňariková, J. Muchová Prostacyklín a ateroskleróza	243

I. ANATÓMIA

HISTOPATOLOGICKÉ ZMENY V MOZGU POTKANA PO EXPOZÍCIÍ IONIZUJÚCIM ŽIARENÍM

(Histopathological changes in the rat brain after exposure to ionizing radiation)

***Soňa Báľentová¹, Dagmar Kalenská², Peter Murín³, Eva Hajtmanová³,
Ján Lehotský^{2,4}, Marian Adamkov¹***

¹Ústav histológie a embryológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin, balentova@jfmed.uniba.sk

² Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Malá Hora 4D, 036 01 Martin

³Onkologické centrum, Univerzitná nemocnica Martin, Kollárova 2, 036 01 Martin

⁴ Biomed Martin, Divízia Neurovedy, Jesseniova lekárska fakulta UK, Malá Hora 4D, 036 01 Martin

Súhrn

V našej štúdií sme skúmali histopatologické zmeny v mozgu potkanov po ožiarení. Dospelým samcom potkanov (kmeň Wistar) sme ožiarili mozog pomocou frakcionovanej expozície (celková dávka cD=40Gy, rozdelená na 5 frakcií s dávkou na frakciu=8Gy) a to 1-krát týždenne počas 5 týždňov. Po histochemickom farbení preparátov z mozgu sme identifikovali histopatologické, neurodegeneratívne zmeny v dvoch neurogénnych regiónoch: v prednej stene subventrikulárnej zóny (SVZa) a následne osi subventrikulárna zóna – bulbus olfactorius (SVZ-BO) a tiež v gyrus dentatus (GD) hipokampu. Pomocou obrazovej analýzy sme v preparátoch z mozgu identifikovali zvýšené neurodegeneratívne zmeny vo všetkých hodnotených oblastiach 16 týždňov po ožiarení. Výsledky potvrdili prítomnosť subakútnych zmien a postupný vývoj neskorých radiačných zmien.

Kľúčové slová

radiačné poškodenie mozgu, neurodegenerácia, Fluoro-Jade C

Summary

In the present study we investigated radiation-induced histopathological changes in the brain of rats. Adult male Wistar rats received fractionated whole-brain irradiation (fWBI) with a total dose of 40Gy delivered in 5 fractions (dose 8Gy per fraction) once per week in the same weekday during 5 consecutive weeks. Histopathological changes were evaluated by histochemical staining of brain sections to determine the rate of neurodegeneration in two neurogenic regions: the anterior subventricular zone (SVZa) and following subventricular zone-olfactory bulb axis (SVZ-OB axis) and the hippocampal dentate gyrus (DG). Image analysis of the brain sections 16 weeks after the exposure showed a radiation-induced increased neurodegenerative changes in all counted regions. Results revealed presence of subacute and gradual development of late radiation-induced changes.

Keywords

radiation-induced brain injury, neurodegeneration, Fluoro-Jade C

Úvod

Poškodenie mozgového tkaniva po frakcionovanej expozícii ionizujúcim žiarením je často sprievodným javom pri rádioterapii pacientov s primárnymi nádormi mozgu a metastázami. Na základe klinických prejavov a časovej postupnosti poznáme akútne, subakútne a neskoré symptómy poškodenia mozgu po ožiarení. Je známe, že u pacientov, ktorí absolvujú rádioterapiu primárnych nádorov mozgu sa po určitom čase môžu vyvinúť výrazné kognitívne zmeny bez in vivo detekovateľných štrukturálnych zmien (1). Vzhľadom na narastajúcu skupinu pacientov s neskorými symptómami sa tento problém stáva čoraz viac akútnejší. Zmeny v mozgovom tkanive po ožiarení odrážajú zložitú interakciu medzi jednotlivými typmi buniek. Dôležitým fenoménom, ktorý často stojí v pozadí kognitívnych zmien je inhibícia neurogenézy. Experimentálne zvieracie štúdie ukazujú, že neurogenéza v dospelosti pretrváva v dvoch oblastiach: v prednej stene subventrikulárnej zóny (SVZa) v stene bočných mozgových komôr a subgranulárnej zóne (SGZ) v gyrus dentatus (GD) hipokampu. Štúdie na zvieratách poskytujú prehľad o širokom spektre zmien na molekulárnej a bunkovej úrovni a tiež funkčné zmeny tkaniva mozgu po frakcionovanom ožiarení. Tieto zmeny zahŕňajú napr. poškodenie endotelu, aktiváciu mikrogliových buniek a astrocytov, inhibíciu neurogenézy, zvýšenú expresiu zápalových mediátorov a narušenie kognitívnych funkcií minimálne šesť mesiacov po ožiarení (2-5).

Materiál a metódy

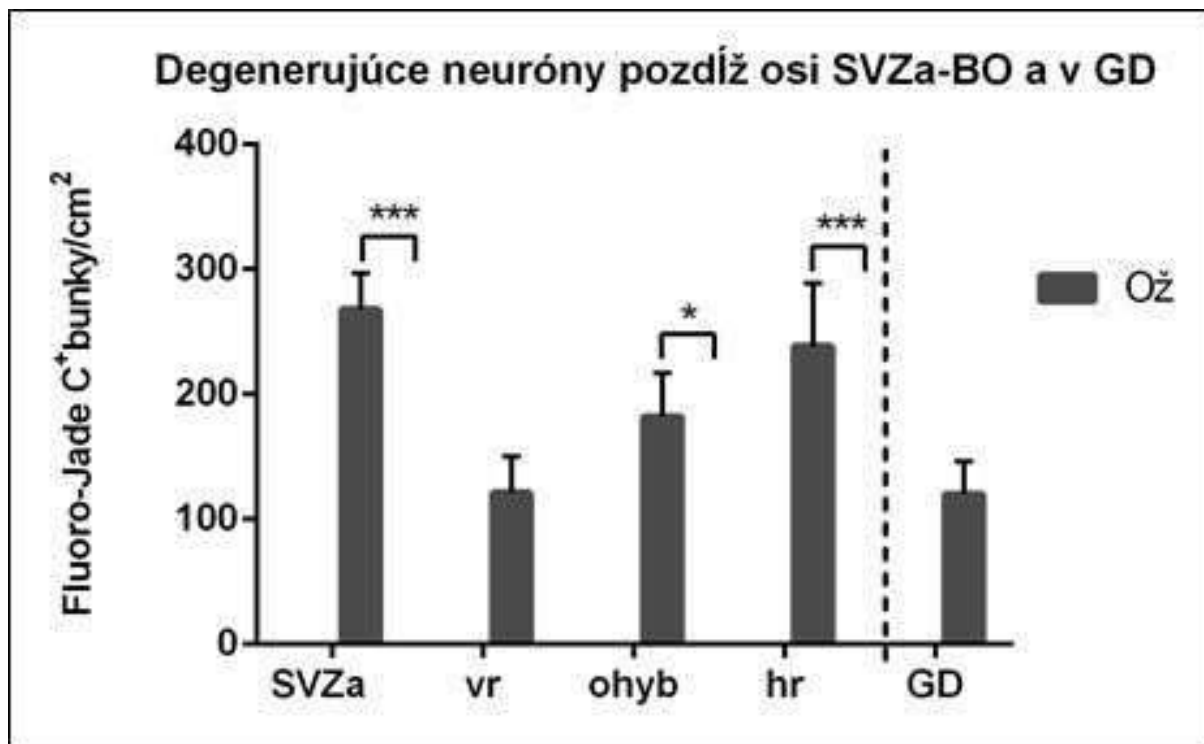
Samce potkanov kmeňa Wistar vo veku 3-4 mesiace sme rozdelili na dve skupiny: kontrolnú (n=10) a druhú skupinu (n=7), ktorú sme ožiarili celkovou dávkou cD=40Gy ionizujúceho žiarenia rozdelenú na 5 frakcií, s dávkou na frakciu=8Gy. Ožarovaný objem predstavoval hlavu, krk a zdrojom žiarenia bol rádioizotop ^{60}Co (prístroj TERAGAM ÚJP Praha, ČR). Po uplynutí stanovenej doby prežívania po ožiarení (16 týždňov) sme vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu pomocou 4% paraformaldehydu a po dekapitácii sme z mozgových hemisfér narezali sériové sagitálne 30 μm zmrazené rezy. Po histochemickom fluorescenčnom farbení preparátov pomocou metódy Fluoro-Jade C sme vyhodnocovali počet Fluoro-Jade C pozitívnych (Fluoro-Jade C⁺) odumierajúcich neurónov v jednotlivých anatomických oblastiach osi subventrikulárna zóna-bulbus olfactorius (SVZ-BO): SVZa, vertikálne rameno, ohyb a horizontálne rameno a v stratum granulosum v gyrus dentatus (GD) hipokampu. Kvantitatívnu obrazovú analýzu preparátov sme uskutočnili pomocou programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Výsledky uvádzame ako počet Fluoro-Jade C⁺ buniek/cm².

Výsledky

V oblasti SVZa mozgu ožiarovaných potkanov sme identifikovali veľmi heterogénnu populáciu Fluoro-Jade C⁺ buniek. Túto populáciu tvorili okrem nezrelých a zrelých neurónov aj ependýmové bunky a pravdepodobne aj astrocyty. V ďalších anatomických oblastiach osi SVZ-BO boli ako Fluoro-Jade C identifikované len neuróny. V porovnaní s kontrolnou skupinou (K) sme v ožiarenej skupine (Ož) zistili signifikantné zvýšenie počtu Fluoro-Jade C⁺ buniek v ožiarenej skupine, a to v SVZa (Ož: 267,85 \pm 29,35/cm² verus K: žiadne bunky; P<0,001), ohybe (Ož: 182,30 \pm 34,70 vz. K: žiadne bunky; P<0,05) a v horizontálnom ramene (Ož: 238,65 \pm 50,34 vz. K: žiadne bunky; P<0,001). Mierne zvýšenie počtu Fluoro-Jade C⁺ buniek sme zistili v stratum granulosum v GD v hipokampe (Ož: 120,14 \pm 26,26 vz. K: žiadne bunky).

Diskusia

Fluoro-Jade C je vysoko špecifické fluorescenčné farbivo, ktoré sa používa v základnom výskume na identifikáciu a znázornenie degenerujúcich alebo odumierajúcich neurónov



Ob. 1 Distribúcia Fluoro-Jade C⁺ buniek pozdĺž osi subventrikulárna zóna-bulbus olfactorius (SVZ-BO) a v gyrus dentatus (GD) hipokampu v ožiarenej skupine (Ož) potkanov, ktorí preživali 16 týždňov po frakcionovanom ožiarení mozgu (cD=40Gy). Hodnoty sú uvedené ako *priemer*± SEM. Štatistická významnosť rozdielov medzi kontrolnou (nulové hodnoty) a Ož skupinou: **P* <0.05; ****P* <0.001.

v CNS. Po ofarbení pomocou Fluoro-Jade C metódy dokážeme znázorniť perikarya, axóny a dendrity neurónov v orgánoch CNS, ktoré boli vystavené rôznym druhom poškodenia (napr. traumatické poškodenie, cievna mozgová príhoda, epilepsia a pod.) (6-8). V zdravom, intaktnom nervovom tkanive je pozitivita Fluoro-Jade minimálna alebo žiadna. V našom experimente sme zistili zvýšenie počtu Fluoro-Jade C⁺ vo všetkých hodnotených oblastiach osi SVZ-BO a v GD hipokampu, pričom najvyššie počty boli v SVZa a v horizontálnom ramene. Výsledky sú v súlade s našimi predchádzajúcimi štúdiami, v ktorých sme tiež zistili krátkodobý ale aj dlhodobý nárast počtu Fluoro-Jade C⁺ (9,10). V ďalšej hodnotenej neurogénnej oblasti, v GD hipokampu sme zistili len mierne zvýšenie počtu Fluoro-Jade C⁺ buniek. Tieto výsledky sa odlišujú od údajov získaných v predchádzajúcej štúdii (cD=20Gy, rozdelená na 4 frakcie, veľkosť frakcie=5Gy) v ktorej sme identifikovali signifikantné zvýšenie degenerujúcich neurónov v tejto oblasti (10). V mozgu ožiarených potkanov sme identifikovali okrem neurónov aj niektoré typy gliových buniek. V niektorých štúdiách sa uvádza, že po vyvolaní rôznych druhov poškodenia CNS pomocou metódy Fluoro-Jade C sa dajú znázorniť aj gliové bunky najmä aktivované formy mikroglie a astrocyty (11,12). Existuje len málo štúdií s modelom radiačného poškodenia CNS, v ktorých bola použitá metóda Fluoro-Jade. Jednou z príčin môže byť aj to, či Fluoro-Jade C⁺ bunky možno považovať za apoptotické. V štúdiách s modelom ischemického alebo neurotoxického poškodenia bola identifikovaná kolokalizácia Fluoro-Jade C⁺ buniek a apoptotických buniek, ktoré boli farbené metódou TUNEL (13,14). V našej štúdii sme jednoznačne identifikovali nárast neurodegeneratívnych zmien v mozgu po frakcionovanom ožiarení.

Záver

Neurodegeneratívne zmeny neurónov v mozgu môžu byť predzvesťou rozvoja závažnejších kognitívnych dysfunkcií a štrukturálnych zmien. Výsledky poukazujú na to, že základný, experimentálny výskum je nevyhnutný pre uplatnenie výsledkov v klinickej praxi.

PodĎakovanie

Práca bola financovaná z prostriedkov grantov VEGA č. 1/0129/16, 1/0128/16 a 1/0243/18.

Literatúra

1. **Sundgren PC, Cao Y. Brain irradiation:** Effects on normal brain parenchyma and radiation injury. *Neuroimaging Clin N Am* 2009; 19: 657-668.
2. **Cicciarello R, d'Avella D, Gagliardi ME, Albiero F, Vega J, Angileri FF, D'Aquino A, Tomasello F.** Time-related ultrastructural changes in an experimental model of whole brain irradiation. *Neurosurgery* 1996; 38: 772-779.
3. **Gaber MW, Sabek OM, Fukatsu K, Wilcox HG, Kiani MF, Merchant TE.** The differences in ICAM-1 and TNF- α expression between high single fractions and fractionated irradiation in mouse brain. *Int J Radiat Biol* 2003; 79: 359-366.
4. **Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, VandenBerg SR, Morhardt DR, Fike JR.** Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol* 2004; 188: 316-330.
5. **Yuan H, Gaber MW, Boyd K, Wilson CM, Kiani MF, Merchant TE.** Effects of fractionated radiation on the brain vasculature in a murine model: blood-brain barrier permeability, astrocyte proliferation, and ultrastructural changes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66: 860-866.
6. **Eisch AJ, Schmued LC, Marshall JF.** Characterizing cortical neuron injury with Fluoro-Jade labeling after a neurotoxic regimen of methamphetamine. *Synapse* 1998; 30: 329-333.
7. **Poirier JL, Capek R, De Koninck Y.** Differential progression of dark neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience* 2000; 97: 59-68.
8. **Obernier JA, Bouldin TW, Crews FT.** Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 547-557.
9. **Báľentová S, Hajtmanová E, Filova B, Borbelyova V, Lehotský J.** Effect of fractionated irradiation on the hippocampus in an experimental model. *Klin Onkol* 2015; 28: 191-199.
10. **Báľentová S, Hajtmanová E, Filová B, Borbélyová V, Lehotský J, Adamkov M.** Effects of fractionated whole-brain irradiation on cellular composition and cognitive function in the rat brain. *Int J Radiat Biol* 2018; 94: 238-247.
11. **Anderson KJ, Fugaccia I, Scheff SW.** Fluoro-Jade B stains quiescent and reactive astrocytes in the rodent spinal cord. *J. Neurotrauma* 2003; 20: 1223-1231.
12. **Damjanac M, Rioux Bilan A, Barrier L, Pontcharraud R, Anne C, Hugon J, Page G.** Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2007; 1128: 40-49.
13. **Kundrotiene J, Wägner A, Liljequist S.** Fluoro-Jade and TUNEL staining as useful tools to identify ischemic brain damage following moderate extradural compression of sensorimotor cortex. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2004; 64: 153-162.
14. **Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC.** Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *J Comp Neurol* 2000; 427: 440-454.

OBLIČKA A JEJ CIEVY, TRANSPLANTÁCIA OBLIČIEK Z ANATOMICKÉHO HĽADISKA

(Vascular system of the kidney, kidney transplantation from anatomical point of the view)

Katarína Bevizová, Eliška Kubíková, Andrej Miškovič, Petra Lukáčiková

Anatomický ústav, Lekárska Fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovenská Republika, katarina.bevizova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Obličky patria stavbou aj funkciou k najzložitejším orgánom organizmu. Predložená publikácia sa venuje anatomickej stavbe obličky so zameraním na obličkové cievy (normálne vetvenie a priebeh *a. et v. renalis*). Primeraný anatomický stav týchto ciev je jedným z hlavných aspektov úspešnej transplantácie obličiek.

Kľúčové slová

obličky, cievne zásobenie obličiek, transplantácia obličiek

Summary

The kidneys belong to the most complex organs of the body (according to their structure and function). This publication deals with the anatomical structure of the kidney with a focus on the renal vessels (normal branching and the course of the renal artery and vein). The adequate anatomical status of these vessels is one of the most important aspects of successful kidney transplantation.

Keywords

kidneys, vessels, transplantation

Úvod

Obličky sú párový orgán fazuľovitého tvaru, ktoré v organizme plnia viacero životne dôležitých funkcií (tvorba moču, osmoregulácia, tvorba hormónov). Napriek zložitej makroskopickej a mikroskopickej štruktúre a mnohým procesom, na ktorých sa obličky podieľajú, je k fungovaniu organizmu postačujúca aj jedna správne fungujúca oblička.

Súčasný stav riešenie problematiky

Obličky sú uložené v retroperitoneálnom priestore po bokoch lumbálnej časti chrbtice v rozsahu stavcov TXI-LII-LIII. Pravá oblička je uložená asi o polovicu výšky stavca nižšie ako ľavá, čo je podmienené polohou pečene. Zadná plocha obličiek cez tukové puzdro nalieha na dolný okraj bráničnej klenby a na svaly brušnej steny. Na predné plochy obličiek cez peritoneum a vrstvu tukového tkaniva naliehajú orgány brušnej dutiny.

Obličky sú predozadne sploštené, predná plocha *facies anterior* je vyklenutá dopredu, zadná plocha *facies posterior* je plochá. Horná a dolná plocha obličiek sú mierne zúžené a tvoria horný a dolný pól *extremitas superior* a *extremitas inferior*. Na *extremitas superior* naliehajú nadobličky. Na vnútornom okraji *margo medialis* je orientovaná vkleslina *sinus renalis*, kde

vstupujú a vystupujú cievy a obličková panvička *hilum renale*. Vonkajší okraj *margo lateralis* prebieha konvexne.

Obličky aj nadobličky sú obklopené riedkym tukovým väzivom *capsula adiposa* (perirenálne tukové puzdro), ktorý má ochrannú funkciu a umožňuje obličkám nasledovať dýchacie pohyby. Tukové puzdro obaľuje *fascia renalis* (Gerotova fascia). *Facies posterior* obličky nalieha na zadnú brušnú stenu cez tukový vankúš *corpus adiposum pararenale*.

Povrch obličky pokrýva väzivové puzdro *capsula fibrosa*, ktoré jej dodáva pevnosť. Z povrchu obličky sa puzdro pomerne ľahko oddelí. Po jeho porušení je oblička veľmi krehká a difúzne krváca. Na pozdĺžnom reze obličkou je možné rozlíšiť dve vrstvy. Vonkajšiu kôru *cortex renalis* a vnútornú dreň *medulla renalis*. Dreň tvorí 6-20 ihlanovitých útvarov *pyramides renales*. Širšia strana pyramídy je obrátená základňou ku kôre, užšia strana smeruje k *sinus renalis* a prechádza do obličkovej bradavky *papilla renalis*. Na povrchu bradavky *area cribrosa* sú otvory *foramina papillaria*, v ktorých ústia *ductus papillares*.

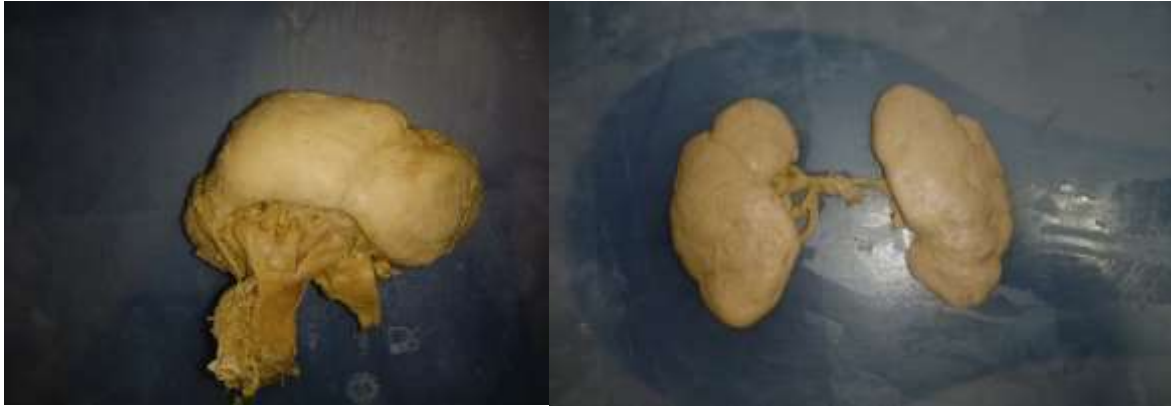
Polohu a fixáciu obličiek zabezpečuje *capsula adiposa*, *fascia renalis*, vnútrobrušný tlak a štruktúry vstupujúce a vystupujúce z *hilum renale*. *Mesocolon transversum* svojim úponom na zadnú brušnú stenu fixuje dolné póly obličiek (1,2).

Arteria renalis dextra et sinistra sú priamymi vetvami brušnej aorty. Vľavo je *a. renalis* kratšia, vpravo *a. renalis dextra* podbieha *vena cava inferior*. Pred vstupom do obličky sa *a. renalis* rozvetví na r. anterior a r. posterior.

Ramus anterior (r. *prepelvicus*) vstupuje do obličky po prednej ploche *pelvis renalis* a rozvetví sa na štyri segmentové vetvy na a. segmenti superioris, a. segmenti anterioris superioris, a. segmenti anterioris inferioris, a. segmenti inferioris).

Ramus posterior (r. *retropelvicus*) vstupuje do obličky po zadnej ploche *pelvis renalis* a pokračuje na zadnú plochu obličky ako a. segmenti posterioris. V parenchýme obličky sa segmentové tepny ďalej vetvia na *aa. lobares* (pre každý lobus renalis). *Aa. lobares* sa delia na dve až tri *aa. interlobares*, ktoré prebiehajú v dreni medzi pyramídami. Na hranici kôry a drene sa *aa. interlobares* dichotomicky vetvia na *aa. arcuatae*. Miesto priebehu *aa. arcuatae* sa nazýva *juxtamedulárna zóna*. Z *aa. arcuatae* odstupujú *aa. interlobulares*, ktoré do kôry vysielajú *arterioly glomerulares afferentes* (prívodné tepničky glomerulu), ktoré vstupujú v cievnom póle glomerulu do priestorov Bowmanovho puzdra a formujú glomerulus. V cievnom póle glomerulu vystupuje *arteriola glomerularis efferens* (odvodné tepničky glomerulu). Ak je glomerulus lokalizovaný na vonkajšej strane kôry, odvodné tepničky vytvárajú hustú sieť kapilár okolo stočených kanálikov, z ktorej vznikajú drobné žilky spájajúce sa do *vv. interlobulares*. Ak je glomerulus uložený vo vnútornej vrstve kôry (*juxtamedulárna zóna*), odvodné tepničky sa pred vstupom do drene delia na *aa. rectae*, ktoré následne prechádzajú do drene smerom k bradavkám, kde sú v tesnom kontakte s kanálikmi Henleho kľučiek. V dreni vytvárajú hustú sieť kapilár okolo tubulov (*peritubulárny plexus*). Koncové úseky *aa. rectae* sa stáčajú naspäť do kôry a stávajú sa začiatkom *venulae rectae*.

Žily odvádzajúce krv z puzdra a povrchu obličky *venulae stellatae* prebiehajú hviezdicovito v kôre obličky tesne pod *capsula fibrosa*, kde tvoria *peritubulárnu kapilárnu sieť*. Z tejto siete sa formujú *vv. interlobulares*, ktoré sa v oblasti drene spájajú do *vv. arcuatae*. Do *vv. arcuatae* sa vlievajú *venulae rectae*, ktoré odvádzajú žilovú krv z drene obličky. *Vv. arcuatae* sa vlievajú do *vv. interlobares*, ktorých sútokom vzniká *v. renalis*. *Vv. renales* vystupujú z *hilum renale* pred *a. renalis*. Vpravo sa *v. renalis* priamo vlieva do *v. cava inferior*. Vľavo je *v. renalis* dlhšia, priberá prítoky *v. suprarenalis sinistra* a *v. testicularis (ovarica) sinistra*, kladie sa pred brušnú aortu a následne sa vlieva do *v. cava inferior* (3,4).



Obr. 1 Vena renalis

Obr. 2 Arterie segmentales

Transplantácia obličiek z anatomického hľadiska

V súčasnej dobe sa používajú dve transplantáčne techniky – *heterotopická* a *ortotopická* technika. Pri heterotopickej technike sa transplantované oblička nevkladá na pôvodné miesto ale vkladá sa do *fossa iliaca* príjemcu (*extraperitoneálne* uložená). *A. renalis* sa prišije k *a. iliaca externa* (prípadne *a. iliaca interna*). *V. renalis* sa prišije k *v. iliaca externa*. Následne sa močovod transplantovanej obličky implantuje do močového mechúra príjemcu. U príjemcov, u ktorých je z rôznych dôvodov (stav po *heterotopickej* transplantácii, traumy vo *fossa iliaca*) nemožné obličku uložiť do *fossa iliaca* sa využíva *ortotopická* technika. Pri nej sa príjemcovi odstráni slezina a ľavá oblička, ponechá sa celý ľavý močovod. Ľavý močovod sa následne spojí s obličkovou panvičkou transplantovanej obličky. *A. renalis* transplantovanej obličky sa prišije ku koncu *a. lienalis*, *v. renalis* sa prišije k *v. renalis* pôvodnej obličky (5,6).

Záver

Obličky sú životne dôležitým orgánom, ktoré plnia sekrečnú aj exkretčnú funkciu. Existuje mnoho patologických procesov, ktorých následkom oblička stráca svoju pôvodnú anatomickú štruktúru (na mikro aj makroskopickú úroveň) s následnou čiastočnou alebo až úplnou stratou normálnej funkcie. Pri definitívnej strate funkcie sa pristupuje k transplantácii obličiek, pri ktorej sú nevyhnutné anatomické vedomosti.

Literatúra

1. **Mráz P et al.** Anatomia ľudského tela 2. Bratislava. Slovak Academic Press. 2006. ISBN 978-80-89607-39-6.
2. **Čihák R.** Anatomie. 2. Praha. Grada. 2002. ISBN 802470143X.
3. **Mráz P et al.** Anatomia ľudského tela 1. Bratislava. Slovak Academic Press. 2004. ISBN 9788089607372.
4. **Petrovický P. et al.** Systematická, topografická a klinická anatomie VI. Močovopohlavní ústrojí. Praha: Vydavatelství Karolinum 1995. ISBN 80-7184-108-0.
5. **Tanagho EA., McAninch JW.** Smithova všeobecná urológia. Slovak edition. Martin. Vydavateľstvo Osveta. 2006. ISBN 80-8063206-5.
6. **Breza J., Kliment J., Valanský L. et al.** Všeobecná a špeciálna urológia pre poslucháčov lekárskech fakúlt. Bratislava. Univerzita Komenského, 2007. ISBN 978802232271.

AKCESÓRNE A SEZAMSKÉ KOSTI NOHY A ČLENKA

(Accessory ossicles and sesamoids of the foot and ankle)

Martina Frištáková

Ortopedická klinika LFUK a NÚDCH, Limbova 1, 83340 Bratislava

Súhrn

Anatómia nohy zahŕňa početné varianty nadpočetných kostí a sezamských kostí v oblasti nohy a členka. Vo väčšine prípadov sú klinicky nevýznamné a sú iba náhodným nálezom na rtg snímkach.

Avšak v prípade traumy môžu byť akcesórne kosti zdrojom diagnostických pochybností a omylov.

Patologické nálezy alebo normálne varianty skeletu vedú pri chybnom zhodnotení k neadekvátnej konzervatívnej alebo zbytočne excesívnej operačnej liečbe.

Kľúčové slová

nadpočetné kosti nohy, akcesórne kosti nohy, sezamské kosti nohy

Summary

The anatomy of the foot and ankle includes numerous variants of the accessory ossicles and sesamoid bones. In most cases, they are clinically insignificant and are often recognised as only incidental radiographic finding.

However, pathological findings or normal skeletal variants of these ossicles, in the context of trauma, may result in under or overtreatment.

Keywords

sesamoids, accessory ossicles, accessory bones, foot

Definícia

Sezamká kosť je malá oválna kosť nachádzajúca sa v priebehu šľachy alebo kĺbneho púzdra. Typickou lokalitou jej výskytu je miesto prechodu šľachy ponad kĺb. Znižuje trenie medzi šľachou a kĺbnym púzdrom a tým zvyšuje biomechanickú účinnosť šľachy v smere jej ťahu. Nadpočetné sezamské kosti vznikajú nezlúčením sekundárnych osifikačných centier s primárnou kostnou masou, štandardne lokalizovanej sezamskej kosti.

Akcesórna kosť je viac alebo menej častá anatomická varianta skeletu. Vzniká nesplynutím primárneho alebo sekundárneho jadra s príľahlou kosťou. Ich funkcia nie je jednoznačne definovaná, naopak, môžu byť príčinou bolestivých stavov.

Prítomnosť sezamských a akcesórnych kostí je unilaterálna alebo bilaterálna. Sú to obvykle kosti malých rozmerov, oválneho tvaru s jasne definovanou a pevnou kortikou (1, 2).

Os trigonum - sekundárne osifikačné centrum sa objavuje na rtg snímkach medzi 8. a 13. rokom, v oblasti zadnej hrany talu. Obvykle toto osifikačné jadro fúzuje v priebehu jedného roka s os tali a vzniká procesus/tuberkulum trigonum alebo „Stiedov procesus“. V prípade

nezlúčenia sekundárneho osifikačného jadra a pri jeho separátnom pretrvaní až do dospelosti, hovoríme o os trigonum. Prevalencia os trigonum je popisovaná od 1-25% podľa štúdií v rôznych etnikách (3, 4).

Charakteristickým tvarom tejto akcesórnej kosti na bočnej rtg. snímke nohy je trojuholník, no môže mať aj oválny alebo kruhový obrys (Obr. 1). Jej veľkosť len málo kedy presiahne 1 cm. Vyskytuje sa ako solitárna kosť ale aj vo variante ako bipartitná alebo multipartitná nadpočetná kosť. Fraktúra samotnej akcesórnej kosti je extrémne vzácna. V niektorých prípadoch v závislosti od veľkosti a uloženia, je príčinou impingementu zadného členka.

V rámci diferenciálnej diagnostiky treba myslieť na fraktúru mediálneho alebo laterálneho tuberu procesus tali, ktorá vzniká pri násilnej plantárnej flexii členka, na podklade kompresie talu zadnou hranou túbie a tuberom kalkanea (4).



Obr. 1 Os trigonum

Os tibiale externum (akcesórna os naviculare, os tibiale, os naviculare secundarium)- je jednou z najčastejších akcesórnych kostí nohy (Obr. 2 a, b). Vyskytuje sa s incidenciou 4-28,3 % a nachádza sa na mediálnej strane nohy naliehajúca na posteromediálnu tuberozitu os naviculare (5). V literatúre sú popisované 3 typy akcesórnej navikulárnej kosti. Typ I má charakter sézamskej kosti, ktorá je zavzatá do šľachy m. tibialis posterior. Jej veľkosť býva 2-3 mm. Typ II sa vyskytuje ako sekundárne osifikačné jadro os naviculare a nalieha na navikulárnu kosť v oblasti proximálnej inzercie šľachy m. tibialis posterior. Jej veľkosť býva 9-12 mm a je to najčastejšia varianta popisovaná vo viac ako 55% prípadoch. S navikulárnou kosťou je spojená synchondrózou. Typ III vzniká fúziou sekundárneho jadra s primárnou os naviculare a vytvára hypertrofickú navikulárnu kosť rohovitého tvaru (6).



Obr. 2 Os tibiale externum

Type I				}	2-3mm	30%	
Type II A					}	9-12mm	55%
Type II B							
Type III							
	a	b	c				

Tab. 1 Klasifikácia os tibiale externum

Os vesalianum - nachádza sa pri báze piateho metatarzu (na šikmej rtg. snímke), je zavzatá v šľache m. peroneus brevis, artikuluje s bázou piateho metatarzu a súčasne s os kuboideum. Jej výskyt je relatívne vzácny 0,1%-5,9%. Vo väčšine prípadov je asymptomatická, málokedy spôsobuje bolesti laterálnej strany nohy (7).

Pri pochybnostiach o jej náleze treba vylúčiť avulznú fraktúru piateho metatarzu, Jonesovu fraktúru, stress fraktúru a nezrastenie osifikačného jadra bázy piateho metatarzu (8).

Os subfibulare - je oválna alebo podlhovastá akcesórna kosť, nachádzajúca sa pod dolným okrajom distálneho konca fibuly (Obr. 3). Jej origo je podľa rôznych autorov popisované ako samostatné, akcesórne osifikačné centrum alebo ako primárne nezrastená avulzná fraktúra laterálneho maleolu, spôsobená ťahom predného talofibularneho ligamenta. Incidencia os subfibulare je 0,2-2% (3, 9).



Obr. 3 Os subfibulare

Os peroneum - akcesórna kosť nachádzajúca sa v priebehu šlachy m. peroneus longus v tesnej blízkosti kalkaneokuboidálneho kĺbu. Dominantne sa prezentuje ako jedna sezamská kosť, no môže sa vyskytovať aj v bipartitnej alebo multipartitnej forme. Jej výskyt na šikmej rtg snímke nôh je popisovaný v 4,7- 31,7%. Vzhľadom na to, že býva aj jej kartilaginózna a fibrokartilaginózna forma, predpokladaná incidencia aj týchto foriem je ešte vyššia (10). Pri diferenciálnej diagnostike os peroneum prichádza do úvahy fraktúra os kuboideum a fraktúra samotnej nadpočetnej kosti- kedy jeden z fragmentov je proximalizovaný ťahom šlachy v jej priebehu. Os vesalianum a fraktúra bázy piateho metatarzu sú na rozdiel od os peroneum lokalizované distálnejšie, pri báze 5. metatarzu (11).

Os intermetatarseum - ojedinelá, oválna alebo podlhovastá akcesórna kosť nachádzajúca sa v intermetatarzálnom priestore medzi prvým a druhým metatarzom. Incidencia výskytu sa v štúdiách pohybuje v rozmedzí 0,1-6,8%. Os intermetatarseum má tri základné formy- samostatnú kosť, kosť artikulujúca synovialným kĺbom s bázou niektorého metatarzu alebo ako kostný výrastok v oblasti proximálnej časti prvého či druhého metatarzu (2, 3). Pri diferenciálnej diagnostike bolesti môže byť falošne interpretovaná ako fraktúra bázy metatarzov alebo Lisfrankového kĺbu pri luxačných zlomeninách tarzometatarzálnych kĺbov (12).

Os calcaneus secundarius - akcesórna kosť nachádzajúca sa na hranici medzi kalkaneom a artikulačnými plochami os kuboideum, hlavou talu a navikulárnou kosťou. Táto raritná akcesórna kosť sa vyskytuje s prevalenciou 0,6-7%, no jej diagnostika na AP a laterálnej rtg.

snímke nohy je obtiažna (2, 3). Vizualizácia, vzhľadom na jej polohu, je možná čiastočne na šikmej rtg. snímke, no ideálne CT vyšetrením. Pri diagnostike bolestí nohy ako následok úrazu býva ťažké odlíšenie nadpočetnej kosti od avulznej zlomeniny predného processu kalkanea. Diferenciálne diagnosticky je nápomocné MRI vyšetrenie, ktoré pri fraktúre zobrazuje kostný edém kalkanea a fragmentu, nevyskytujúci sa pri akcesórnej kosti (13, 14).

Os subtibiale - oválna akcesórna kosť nachádzajúca sa pod dolným okrajom mediálneho maleolu. Prevalencia výskytu je 0,2- 1,2%. Akcesórne osifikačné centrum sa môže vyskytnúť u detí medzi 7.-10. rokom, po 11. roku dochádza zvyčajne k fúzii s primárnou kostnou masou túbie (3). Na rozdiel od avulznej fraktúry mediálneho maleolu, ktorá vzniká najčastejšie následkom násilnej pronácie a extrarotácie nohy a členka, nadpočetná kosť má oválny tvar väčšieho priemeru s ostro ohraničeným kortikálnym okrajom (15).

Os supratolare - malá oválna a extrémne raritná akcesórna kosť nachádzajúca sa na dorzálnej strane krčka talu v oblasti inzercie talonavikulárneho ligamenta. Prevalencia je 0,2-0,9 % s dobrou viditeľnosťou na laterálnej rtg. snímke nohy (3). Pri odlíšení nadpočetnej kosti od avulznej fraktúry dorzálnej kortikalis talu napomáha jej typický zrnkovitý tvar. Na rozdiel od fraktúry, ktorá je tranzverzálna orientovaná a fragment je tenkého šupinatého tvaru (1).

Os supranaviculare - malá trojuholníkovitá alebo oválna kosť nachádzajúca sa na dorzálnej strane talonavikulárneho kĺbu. Nazýva sa tiež os talonaviculare dorsale alebo Pirieho kosť. Jej výskyt je zaznamenávaný s prevalenciou okolo 1% (3). V identickej lokalite nachádzame avulznú fraktúru dorzálnej hrany os naviculare alebo hlavy talu, ktorá sa zvykne vyskytovať u žien stredného veku nosiacich vysoké podpätky. Pri hyperplantárnej flexii nohy a členka a následnej extenzii môže dôjsť k avulzii kortiky talu alebo os naviculare a spomínanej fraktúre. Odlíšenie týchto dvoch nálezov môže byť obtiažne a nápomocná je hlanve anamnéza a prítomnosť algických prejavov pri fraktúre, eventuálne typický triangulárny tvar nadpočetnej kosti (16).

Sezamské kosti palca

Dve sezamské kosti na plantárnej strane nohy, v oblasti I. metatarzofalangeálneho kĺbu, sú u ľudí fyziologickým nálezom. Mediálna a laterálna sezamská kosť palca sú umiestnené po oboch stranách šľachy m. flexor halucis brevis, na úrovni hlavičky I. metatarzu. Veľkosť a tvar sezamských kostí sa môže značne líšiť. Ich prítomnosť je zrejmá na AP a axiálnej rtg. snímke nohy (1, 2). Mediálna sezamská kosť sa môže prezentovať aj ako bipartitná. Bipartitné formy sezamských kostí je nutné diferencovať od skutočnej zlomeniny (17, 18). Fraktúra sezamskej kosti obvykle vykazuje akútny nástup bolesti a citlivosti pri palpácii nad poškodenou sesamoidnou kosťou. Zlomenina sa na rtg. snímke znázorňuje s ostrou líniou a s presne do seba zapadajúcimi okrajmi fragmentov. Zatiaľ čo bipartitná sezamská kosť má dva fragmenty s celistou kortikou s nepravidelnou líniou kĺbového spojenia.

Malé metatarzálne sezamské kosti

Sú popisované ako malé kostné telieska (solitárne alebo multipartitné), zavzaté do kĺbnej kapsuly na plantárnej strane pri II.-V. metatarze. Prevalencia tohto typu sezamských kostí bola zdokumentovaná na úrovni 0,4% pri druhom metatarze, 0,2% pri treťom, 0,1% pri štvrtom a 4,3% pri piatom metatarzale (2, 3). Ak sú prítomné, tieto sesamoidy sú najlepšie hodnotiteľné na AP a šikmých rtg snímkach nohy. Patológia spojená s týmito kostičkami je veľmi zriedkavá, aj keď je možná infekcia spôsobená priamym šírením z priľahlých mäkkých tkanív.



Obr. 4 Schéma lokalizácie akcesórnych a sezamských kostí na AP rtg. snímke.

1.os tibiale externum, 2. os vesalianum, 3. os peroneum, 4. os intermetatarseum, 5. mediálna sezamská kosť palca, 6. laterálna sezamská kosť palca, 7. interfalangeálne sezamské kosti palca, 8. metatarzofalangeálna sezamská kosť, 9. os subfibulare, 10. os subtibiale, 11. os supratalare, 12. os calcaneus, 13. os trigonum, 14. os supranaviculare



Obr. 5 – Schém lokalizácie akcesórnych a sezamských kostí na bočnej rtg. snímke (označenie identické s obr. 4).

Literatúra

1. **Özkan K.** The accessory ossicles of the foot and ankle. Diagnostic pitfall in emergency department in context of foot and ankle trauma. *JEAM*, 2012, č. 11, s. 106-114.
2. **Nwawka OK, Hayashi D, Diaz LE a spol.** Sesamoids and accessory ossicles of the foot: anatomical variability and related pathology, *Insights Imaging*. 2013, č. 4(5), s. 581–593.
3. **Tsuruta T, Shiokawa Y, Kato A. a spol.** Radiological study of the accessory skeletal elements in the foot and ankle. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, 1981, č. 55, s. 357-370.
4. **Karasick D, Schweitzer ME.** The os trigonum syndrome: imaging features. *AJR Am J Roentgenol*, 1996, č. 166, s. 125-129.
5. **Keles CN, Arican RY, Utuk A, Ozcanli H, Sindel T.** The incidence of accessory navicular bone types in Turkish subjects. *Surg Radiol Anat*, 2009, č. 31, s. 675-679.
6. **Miller TT, Staron RB, Feldman F, Parisien M, Glucksman WJ, Gandolfo LH.** The symptomatic accessory tarsal navicular bone: assessment with MR imaging. *Radiology*, 1995, č. 195, s. 849–853.
7. **Boya H, Ozcan O, Tandoğan R, Günal I, Araç S.** Os vesalianum pedis. *J Am Podiatr Med Assoc*, 2005, č. 95, s. 583-585.
8. **Inoue T, Yoshimura I, Ogata K, Emoto G.** Os vesalianum as a cause of lateral foot pain: a familial case and its treatment. *J Pediatr Orthop B*, 1999, č. 8, s. 56-58.
9. **Champagne IM, Cook DL, Kestner SC, Pontisso JA, Siesel KJ.** Os subfibulare. Investigation of an accessory bone. *J Am Podiatr Med Assoc*, 1999, č. 89, s. 520-524.
10. **Muehleman C, Williams J, Bareither ML.** A radiologic and histologic study of the os peroneum: prevalence, morphology, and relationship to degenerative joint disease of the foot and ankle in a cadaveric sample. *Clin Anat*, 2009, č. 22, s. 747-754.
11. **Peterson JJ, Bancroft LW.** Os peroneal fracture with associated peroneus longus tendinopathy. *Am J Roentgenol*, 2001, č. 177, s. 257-258.
12. **Saab M.** Lisfranc fracture-dislocation: an easily overlooked injury in the emergency department. *Eur J Emerg Med*, 2005, č. 12, s. 143-146.
13. **Petrover D, Schweitzer ME, Laredo JD.** Anterior process calcaneal fractures: a systematic evaluation of associated conditions. *Skeletal Radiol*, 2007, č. 36, s. 627-632.
14. **Kürklü M, Köse O, Yurttas Y, Oğuz E, Atesalp AS.** Anterosuperior calcaneal process fracture or os calcaneus secundarius? *Am J Phys Med Rehabil*, 2010, č. 89, s. 522.
15. **Coral A.** The radiology of skeletal elements in the subtibial region: incidence and significance. *Skeletal Radiol*, 1987, č. 16, s. 298-303.
16. **Bayramoğlu A, Demiryürek D, Fırat A, Oznur A, Ozsoy MH.** Differential diagnosis in a professional basketball player with foot pain: is it an avulsion fracture or an os supranaviculare? *Eklem Hastalik Cerrahisi*, 2009, č. 20, s. 59-61.
17. **Christensen SE, Cetti R, Niebuhr-Jorgensen U.** Fracture of the fibular sesamoid of the hallux. *Br J Sports Med*, 1983, č. 17, s. 177-179.
18. **Zinman H, Keret D, Reis ND.** Fracture of the medial sesamoid bone of the hallux. *J Trauma*, 1981, č. 21, s. 581-582.

ANATOMICKÉ ORIENTAČNÉ BODY VÝZNAMNÉ V AXILÁRNEJ CHIRURGII

(Anatomical landmarks important for axillary surgery)

Gabriela Hešková, Desanka Výbohová, Yvetta Mellová

*Ústav anatómie, Jesseniova lekárska fakulta Martin, UK Bratislava, Malá Hora 4, 037 54
Martin, heskova@jfmed.uniba.sk*

Súhrn

Axilárna chirurgia zahŕňa disekciu axilárnych lymfatických uzlín, alebo biopsiu sentinelovej uzliny, alebo biopsiu s následnou disekciou. Biopsia sentinelovej lymfatickej uzliny je všeobecne akceptovaná miniinvazívna metóda, ktorá umožňuje spoľahlivo zhodnotiť axilárny „staging“ lymfatických uzlín napr. u pacientov so včasným karcinómom prsníka. Najčastejšia poloha sentinelových lymfatických uzlín v axile je vytýčená rozhodujúcimi anatomickými štruktúrami a orientačnými bodmi. V axilárnej chirurgii takéto konštatné body predstavujú: nervus intercostobrachialis, vena thoracica lateralis, vena axillaris, nervus pectoralis medialis. Práca tiež poukazuje na klinickú klasifikáciu uloženia lymfatických uzlín v axile, ktorá je podrobnejšia v porovnaní s anatomickým delením a berie do úvahy chirurgicko-patologický „staging“ uzlín.

Kľúčové slová

nodii lymphatici axillares, nervus intercostobrachialis, vena thoracica lateralis, vena axillaris, nervus pectoralis medialis, biopsia sentinelovej lymfatickej uzliny, axilárna chirurgia, klinická anatómia

Summary

Axillary surgery includes either dissection of axillary lymph nodes or sentinel lymph node biopsy or biopsy followed by dissection. Sentinel lymph node biopsy is a widely accepted a minimally invasive surgery that allows a credible assessment of axillary lymph nodes staging, e.g. of the patients with early breast cancer. Most frequent location of the sentinel lymph nodes is delineated by the anatomical crucial structures and landmarks. In the axillary surgery there are several constant reliable landmarks: intercostobrachial nerve, lateral thoracic vein, axillary vein, medial pectoral nerve.

Our report also highlights the clinical classification of location of axillary lymph nodes that is more detailed than anatomical division in accordance with surgical and pathological staging of the nodes.

Keywords

axillary lymph nodes, intercostobrachial nerve, lateral thoracic vein, axillary vein, pectoral medial nerve, sentinel lymph node biopsy, axillary surgery, clinical anatomy

Úvod

Axilárne lymfatické uzliny (LU) sú najčastejším miestom lymfatickej drenáže prsníka. Až 75 – 95% lymfy, zo všetkých kvadrantov prsníka, je odvádzaná do uzlín v axile. Z toho vyplýva

aj najčastejšia lokalizácia metastáz karcinómov prsníka do ipsilaterálnych axilárnych LU. Prítomnosť metastáz v lymfatických uzlinách je najsilnejší prognostický ukazovateľ prežívania žien s karcinómom prsníka, od ktorého sa následne vyvíja terapia. Chirurgické odstránenie a histologické vyšetrenie LU v axile má hlavne diagnostický význam (1, 2, 3, 4). V axilárnej chirurgii je v súčasnosti štandardne akceptovaná minimálne invazívna metóda - biopsia sentinelovej uzliny, ktorá je vhodná pre určenie stavu axilárnych LU u pacientov, u ktorých radikálny zákrok v axile nie je potrebný. Biopsia sentinelovej LU, v porovnaní s axilárnou lymfadenektómiou, znižuje peroperačné riziká a záťaž, ako aj postoperačné komplikácie (2, 3, 4, 5, 6).

Sentinelová lymfatická uzlina/uzliny

Sentinelová lymfatická uzlina/uzliny (strážna uzlina) je prvá lymfatická uzlina v lymfatickom povodí, ktorá prijíma lymfu priamo z primárneho tumoru a má teda najväčšie riziko metastatického postihnutia. Predpokladá sa, že ak sentinelová LU neobsahuje metastatické bunky, pravdepodobnosť nádorového postihnutia ostatných LU je minimálna (2, 3, 4, 5, 7). Histologicky potvrdený pozitívny stav sentinelovej uzliny s metastatickým procesom vedie následne k disekcii axilárnych LU. Podľa medzinárodného konsenzu je potrebné vyšetriť 8 – 10 LU, aby bolo vyšetrenie dostatočne priekazné. Obvykle je dostačujúca disekcia LU I. a II. etáže (2, 3, 5, 8, 9).

Anatomická klasifikácia nodi lymphatici axillares

Nodi lymphatici axillares (NLA) v počte 8 – 50, v priemere 10 – 20, prijímajú lymfu z hornej končatiny, zadnej časti krku, z oblasti lopatky a chrbta, z hrudníka, vrátane mliečnej žľazy a zo steny brušnej dutiny až po pupok. Z anatomického hľadiska sú lymfatické uzliny v axile usporiadané do 5 skupín (10), resp. 6 skupín (1, 11, 12). Takéto členenie vystihuje tok lymfy z tributárnych oblastí do spádových lymfatických uzlín a berie do úvahy lokalizáciu uzlín na základe určitých topograficko-anatomických bodov.

NLA centrales sú uložené v tesnej blízkosti nn. intercostobrachiales v strede bázy axily. NLA laterales (brachiales) sú lokalizované za v. axillaris, príp. v. brachialis, pri úpone m. latissimus dorsi. NLA subscapulares (posteriores) sú uložené na vnútornej strane m. subscapularis a m. teres major, pozdĺž a. subscapularis. NLA pectorales (anteriores) sú uložené na m. serratus anterior, pozdĺž a. thoracica lateralis, v úrovni 2 – 6 rebra. Sú usporiadané v dvoch skupinách. Kraniálna skupina je uložená pod dolným okrajom m. pectoralis minor a pred a. thoracica lateralis, v rozsahu 2. – 4. rebra. Táto skupina môže v 26% prípadov chýbať (1). Kaudálna skupina leží na vnútornej strane m. pectoralis major, za a. thoracica lateralis, v rozsahu 4. – 6. rebra. Táto skupina je nekonštatná, v 50% prípadov chýba. NLA interpectores sú uložené medzi mm. pectorales a chýbajú v 50% prípadov (1, 11). NLA apicales (infraclaviculares) sú uložené vo vrchole axily, nad prvým medzirebrovým priestorom a nad prvým zubom m. serratus anterior, v hĺbke trigonum clavipectorale, zakryté mm. pectorales (1, 10, 11, 12).

Klinická klasifikácia nodi lymphatici axillares

Klinická klasifikácia berie do úvahy spôsob a smer šírenia patologických procesov a zohľadňuje chirurgicko-patologický „staging“ ochorenia. Axilárne LU sa rozdeľujú podľa Berga do 3 etáží polohou m. pectoralis minor. Prvá etáž predstavuje NLA lokalizované distálne (laterálne) od kaudálneho okraja m. pectoralis minor, ventrálne od okraja m. latissimus dorsi. Tento stupeň, z hľadiska anatomického delenia LU, zahŕňa NLA brachiales, pectorales et subscapulares. Druhá etáž predstavuje NLA uložené za m. pectoralis minor a zahŕňa NLA centrales, prípadne aj niektoré NLA apicales. Tretia etáž obsahuje NLA uložené proximálne od horného okraja m. pectoralis minor a zahŕňa NLA apicales. Všeobecne

platí, že tok lymfy (aj prípadné šírenie metastatického procesu) smeruje z periférie do lymfatických uzlín, krok za krokom, od prvej etáže, postupne do druhej až tretej. Takýmto smerom, sa v prípade indikácie chirurgického zákroku v axile, vykonáva aj disekcia axilárnych LU (2, 5, 8, 9, 14, 15).

Anatomické orientačné body v axile

Fossa axillaris má svoje špecifiká – nervy, cievy a variabilný počet LU sú „skryté“ v tukovom tkanive. Primárnu orientáciu tvoria svaly ohraničujúce axilu. Dôležitou orientačnou štruktúrou je n. pectoralis medialis. Nerv zvyčajne prebieha za m. pectoralis minor (hlbšie od svalu) a v určitom mieste sa obtáča okolo jeho dolného okraja a smeruje ku m. pectoralis major. Miesto, kde sa objavuje n. pectoralis medialis na laterálnom okraji m. pectoralis minor je konštantným bodom pre určenie polohy ďalších štruktúr. V. axillaris leží približne 1 – 3 cm kraniálnejšie a dorzálnejšie a n. intercostobrachialis sa nachádza približne 1 – 2 cm kaudálnejšie a dorzálnejšie od tohto bodu, prípadne sa nachádza 1 – 2 cm v hĺbke za týmto bodom. N. intercostobrachialis prechádza po fascia axillaris na rameno, kde prebieha paralelne s v. axillaris, približne 1,5 cm distálnejšie od nej. N. thoracicus longus leží dorzálne od n. intercostobrachialis smerom ku m. subscapularis. Ak sa nepokračuje v disekcii hlbšie od n. intercostobrachialis, n. thoracicus longus nemôže byť poranený. Proximálnu hranicu disekcie tvorí v. axillaris (9, 15, 16).

Najčastejšie sa sentinelové LU nachádzajú v prvej etáži, resp. dolnej časti druhej etáže axily. Ešte presnejšiu lokalizáciu sentinelových LU určuje nervus intercostobrachialis II. a vena thoracica lateralis ako rozhodujúce anatomické orientačné štruktúry. Nerv svojim horizontálnym priebehom rozdeľuje prvú etáž na hornú a dolnú časť. Li et al. vo svojej štúdii 72 pacientov, našli celkovo 1503 LU, z toho všetky sentinelové uzliny lokalizovali v dolnej časti – pod priebehom n. intercostobrachialis II. Kolmo na nerv (vertikálne) prebieha v. thoracica lateralis. Véna je uložená za strednou tretinou laterálneho okraja m. pectoralis major (17) a prebieha rovnobežne s laterálnym okrajom m. pectoralis minor, približne $28,7 \pm 12,6$ mm od svalu (18). Venu doprevádza rovnomenná artéria. Obidve nervovocievne štruktúry sa krížia v bode, ktorý je konštantným anatomickým bodom v strede prvej etáže axily (7). Clough et al. v klinickej štúdii s 242 pacientami našli 98,2% sentinelových LU pozdĺž v. thoracica lateralis a z toho 86,8% bolo pod priebehom n. intercostobrachialis II., teda pod bodom kríženia týchto dvoch štruktúr. Ani jednu sentinelovú LU nenašli laterálne od v. thoracica lateralis a nad priebehom spomínaného nervu. Chvalný et al. uvádzajú najčastejší výskyt sentinelových LU v trojuholníku medzi v. thoracica lateralis, m. pectoralis major a n. intercostobrachialis II., resp. III.

Záver

Chirurgická intervencia v axile, distálnejšie od m. pectoralis minor a hlbšie ako je tento sval, predstavuje kritické miesto s väčším rizikom poškodenia rozhodujúcich orientačných štruktúr, ako je nervus intercostobrachialis a vena thoracica lateralis. Táto prvá etáž axily je zónou, kde sa nachádza najviac sentinelových lymfatických uzlín a to hlavne pozdĺž vena thoracica lateralis a distálne od nervus intercostobrachialis. Anatomické orientačné body uľahčujú onkologickým chirurgom orientáciu v operačnom poli. Ich znalosť a identifikácia je dôležitá pre primeranosť, precíznosť aj bezpečnosť chirurgických zákrokov so snahou minimalizovať možné riziká poškodenia nervových a cievnych štruktúr.

Literatúra

1. **Petrovický P a kol.** Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi. II. svazek. Orgány a cévy. Vydavatelství Osveta Martin, 2001. 493 – 546.
2. **Mardiak J, Mego M, Palacka P a kol.** Karcinóm prsníka. Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta. 2012.
3. **Chvalný P, Straka V a kol.** Biopsia sentinelovej uzliny pri včasnóm karcinóme prsníka. Onkológia. 2009; 4 (6).
4. **Pecha V, Kolařík D a kol.** Biopsie sentinelové uzliny u žen s časným karcinomem prsu. Onkologie. 2011; 5 (1).
5. **Pohlodek K, Sečanský P a kol.** Sentinelová biopsia axily pri karcinóme prsníka. Slov. Gynek. Pôrod. 2004; 11, 110 – 117.
6. **Schijven MP, Vingerhoets AJJM et al.** Comparison of morbidity between axillary lymph node dissection and sentinel node biopsy. European J of Surgical Oncology. 2003 (29); 341 – 350.
7. **Clough KB, Nasr R et al.** New anatomical classification of the axilla with implications for sentinel lymph nodes. British Journal of Surgery Society. 2010 (97): 1659 – 1665.
8. **Ecanow JS, Hiroyuki A. et al.** Axillary staging of Breast cancer: What the radiologist Should know. RadioGraphics.2013; 33: 1589 – 1612.
9. **Li J, Zhang Y.** Intercostobrachial Nerves as a Novel Anatomic Landmark for Dividing the Axillary Space in Lymph Node Dissection. ISRN Oncology. 2013, article 279013, 7 pages.
10. **Drake R, Vogl W and Mitchell A:** Gray's Anatomy for Students. Churchill Livingstone, 2nd Edition. 2010.
11. **Mráz P a kol.** Anatómia ľudského tela 1. Bratislava: SAP, 2004. 509 s.
12. **Čihák R:** Anatomie 3. Praha: Grada Publishing, 1997: 672 s.
13. **Berg JW.** The significance of axillary node levels in the study of breast carcinoma. National Cancer Institute, Public Health Service. 1955
14. **Maxwell F, de Margerie Mellon C et al.** Diagnostic strategy fo the assessment of axillary lymph node status in brest cancer. Diagnostic and Interventional Imaging. 2015 (96): 1089 – 1101.
15. **Nadkarni MS, Raina S et al.** Medial pectoral pedicle: a critical landmark in axillary dissection. ANZ Journal Surgery. 2006 (76): 652 – 654.
16. **Aripin YM, Ibrahim N et al.** Medial pectoral pedicle is a reliable landmark for axillary lymph node dissection. Asian Journal of Surgery. 2013 (36): 150 – 153.
17. **Ivanovič N, Granic M et al.** Fragmentacion of axillary fibrofatty tissue during dissection facilitates preservation of the intercostobrachial nerve and the lateral thoracic vein. The Breast. 2008; 17: 293 – 295.
18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6020335/> (04.10.2018)

ANATÓMIA A SOCIÁLNE SIETE JEDNODUCHÝ PRÍSTUP K INFORMÁCIÁM

(Anatomy and social networks – easy approach to information)

*Františka Horváthová¹, Zuzana Kováčová¹, Natália Hvizdošová¹,
Stanislav Matéffy¹*

¹Ústav anatómie LF UPJŠ, Šrobárova 2, 041 80 Košice, frantiska.horvathova@upjs.sk

Súhrn

Anatómia tvorí základ medicínskeho štúdia. Jej zvládnutie je predpokladom úspešného štúdia a úspešnej budúcej klinickej praxe. Súčasnú vyučovacie prístupy v anatómii musia byť aplikovateľné na širokú škálu klinických disciplín. Za týmto účelom sa moderná topografická anatómia kombinuje s inými vednými odbormi. Niektoré inovácie zahŕňajú multimediálny softvér a využívanie sociálnych sietí. AskAnatomist je iniciatíva na podporu lekárskech disciplín, s osobitným dôrazom na anatómiu. Twitter účet @AskAnatomist umožňuje každému zverejniť otázku týkajúcu sa anatómie. Skupina anatómov na celom svete potom spoločne pracuje na zodpovedaní otázok. Séria podcastov sa zameriava na lekárske témy a umožňuje diskusiu medzi odborníkmi v danej oblasti. Cieľom tejto platformy je sťahovanie, zdieľanie podcastov, zasielanie otázok a predovšetkým vychutnávanie si učenia počúvaním tém súvisiacich s anatómiou.

Kľúčové slová

anatómia, učenie, sociálne siete, podcast, zdieľanie

Summary

Anatomy is the basis of a medical study and its proper understanding is a prerequisite for successful clinical practice. Modern anatomy teaching must be applied to a variety of clinical disciplines. Therefore, modern topographic anatomy is combined with other scientific disciplines. Some innovations include multimedia software and the use of social platform. AskAnatomist is an initiative in the disciplines of medical science, with a particular focus on anatomy. The @AskAnatomist Twitter account allows anyone with access to Twitter to post an anatomy-related question. A group of anatomists located across the globe then work together to address answers. The AskAnatomist podcast series focuses on relevant medical topics, providing discussion between experts within the field on a medically interesting topic. The aim of this platform is download and share podcasts, post a question, but most of all enjoy learning and listening to anatomy related topics.

Keywords

anatomy, teaching, social networks, podcast, sharing

Úvod

Anatómia je právom považovaná za prvý krok do štúdia medicíny a základný míľnik pre budúcu klinickú prax. Pochopenie anatomických vzťahov je kľúčové pre rozvoj zručností lekárov (1). Výučba anatómie sa neustále vyvíja súbežne s napredovaním diagnostických

a terapeutických procesov. Na tomto podklade sa aj praktické cvičenia sa neustále inovujú. Informácie sú študentom predávané učiteľmi a odborníkmi, ktorí anatómii a edukácii v anatómii často venujú celú svoju profesionálnu kariéru.

Výučba anatómie - od tradičného prístupu k integrovanému

Tradičný prístup v edukácii anatómie sa zameriava na chirurgický tréning a rozvíjanie zručností podložených teoretickými informáciami (2). Moderná anatomická literatúra musí byť aplikovateľná na široké spektrum klinických disciplín. Toto musia brať do úvahy aj aktuálne pedagogické prístupy. Svetovým trendom je vytvárať integrované učebné plány v kontexte s klinickými predmetmi, klinickými zručnosťami, patológiou a rádiológiou. Preto sa súčasná topografická anatómia učí spoločne s inými predmetmi ako je embryológia, histológia a neurovedy. Vzhľadom na potrebu mnohých iných predmetov, ako fyziológia, imunológia a biochémia, je výhodné vo výučbe anatómie angažovať a zamestnávať učiteľov z týchto oblastí. Zamestnanci s rôznymi odbornými znalosťami a skúsenosťami prispievajú k bohatšiemu vzdelávaciemu prostrediu. Svojou prítomnosťou napomáhajú k lepšej integrácii týchto vedomostí, ich spojeniu s klinickými predmetmi a ku kritickému a komplexnému mysleniu (3).

Prínos sociálnych sietí a podcastov v anatómii

Tak ako sa neustále vyvíja výuka v oblasti anatómie, musí sa v anatómii meniť a expandovať aj úloha pedagóga. Aby sa vyhovel meniacim sa potrebám študentov, je nutná spolupráca odborníkov z rôznych vedeckých oblastí (3). Medzi inovatívne metódy patria multimedialny software, body painting na učenie sa povrchových štruktúr a svalov, tiež tlačené trojdimenzionálne modely a multimedialne stoly (4,5). Oblíbené medzi študentmi sú najmä videá anatomických disekcií a prednášok, ktoré sú prístupné na youtube vo viacerých jazykoch. K zdieľaniu odkazov týchto videí dochádza veľmi často prostredníctvom sociálnych sietí ako facebook, instagram alebo twitter. Vysokú aktivitu študentov na sociálnych sieťach využila skupina vedcov z Monash University na vytvorenie platformy askanatomist.com. Ich cieľom bolo vytvoriť komunitu zameranú na medicínske vedy so zreteľom na anatómiu. @AskAnatomist umožňuje každému s účtom na Twitteri, aby položil otázku týkajúcu sa anatómie. Skupina anatómov následne danú otázku zodpovie. Tieto otázky sú zároveň podkladom tém na podcast menovanej stránky. Sériu podcastov je zameraná na medicínske otázky, umožňuje diskusiu medzi hosťujúcimi odborníkmi z rôznych odborov ako anatómia, fyziológia, farmakológia, nelekárske odbory a iné. Podcasty uvádzajú poslucháča do problematiky najskôr jednoduchým jazykom a následne odbornými medicínskymi a vedeckými termínmi. Popisujú klinické prípady, s ktorými sa študenti najčastejšie môžu stretnúť. Každý podcast trvá približne 30 minút. Poslucháči sú vyzývaní, aby podcasty aktívne sťahovali, zdieľali a pridávali svoje komentáre na ďalšie možné podcasty. Predpokladá sa, že prístupom prostredníctvom sociálnej siete, pre súčasnú generáciu študentov veľmi obľúbenú, dôjde k zvýšeniu záujmu o anatómiu. Počúvanie podcastov pod vedením skúsených vedcov, klinikov a pedagógov z danej oblasti povedie k lepšiemu pochopeniu a osvojeniu si vedomostí (6).

Ďalšie výhody sociálnych sietí

Ďalším nesporným prínosom podcastov je skorá ukážka primeranej komunikácie medzi odborníkmi z lekárskeho a nelekárskeho odborov, odbúravanie hierarchie a zefektívnenie komunikácie. Toto môže prispieť k lepšej starostlivosti o pacienta v klinických odboroch počas profesionálnej kariéry súčasných poslucháčov (7). Pre zahraničných poslucháčov, ktorých materinský jazyk nie je angličtina, to vedie k zlepšeniu ich jazykových schopností a osvojeniu si odborných termínov v anglickom jazyku.

Záver

Donedávna sa predpokladalo, že ideálom vo výučbe anatómie, je mať skupinu odborníkov z jednej disciplíny, anatómie. Je však pravdepodobnejšie, že vyššia kvalita vzdelávania v anatómii sa dosiahne zamestnaním skupiny motivovaných, rôznorodo špecializovaných pedagógov, spoločne s pracovníkmi z klinických odborov (2,8).

Spolupráca medzi vedcami a klinikmi je pre zlepšenie výuky anatómie nevyhnutná. Navyše, úlohou moderného vyučujúceho v digitálnom veku, je uľahčiť prístup k informáciám, ich utvrdenie a prenos do praxe, čo umožňuje využívanie digitálnych médií a sociálnych sietí. To poukazuje na fakt, aké dôležité je, aby títo učitelia mali odborné znalosti, ktoré presahujú rámec anatomických poznatkov, zahŕňajú pedagogickú spôsobilosť a sledovali trendy v moderných technológiách.

Literatúra

1. **Turney BW.** Anatomy in a modern medical curriculum. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, 89 (2) (2007), pp. 104-107
2. **Ramsey-Stewart G.** Anatomy teaching: confusion continues. Do surgeons have the answer? *ANZ J Surg* 2014; 84: 800-801.
3. **McMenamin PG, Eizenberg N, Buzzard A, Fogg Q, Lazarus M.** A broad perspective on anatomy education: celebrating teaching diversity and innovations. *Med J Aust.* 2016 Feb 1;204(2):57.
4. **Finn GM, McLachlan JC.** A qualitative study of student responses to body painting. *Anat Sci Educ* 2010; 3: 33-38.
5. **McMenamin PG, Quayle MR, McHenry CR, Adams JW.** The production of anatomical teaching resources using three-dimensional (3D) printing technology. *Anat Sci Educ* 2014; 7: 479-486
6. <http://www.askanatomist.com/>
7. **Vermeir P, Vandijck D, Degroote S, Peleman R, Verhaeghe R, Mortier E, Hallaert G, Van Daele S, Buylaert W, Vogelaers D.** Communication in healthcare: A narrative review of the literature and practical recommendations. *Int J Clin Pract* 69(2015):1257–1267.
8. **Burgess A, Ramsey-Stewart G.** The importance of surgeons teaching anatomy, especially by whole-body dissection. *Med J Aust* 2015; 202: 18-19.

NERVUS OBTURATORIUS ACCESORIUS

(Accessory obturator nerve)

**Zuzana Kováčová, Františka Horváthová, Natália Hvizdošová,
Stanislav Matéffy, Ingrid Hodorová**

*Ústav anatómie, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, 041 80 Košice
zuzana.kovacova@upjs.sk*

Súhrn

Vo väčšine prípadov je nervus obturatorius jediným nervom z plexus lumbalis vystupujúci mediálne od musculus psoas major. Počas rutínnej anatomickej pitvy sa nám podarilo odhaliť nález raritného prídavného unilaterálne sa vyskytujúceho nervus obturatorius accesorius. Opomenutie jeho výskytu v klinickej praxi by mohlo viesť k jeho poškodeniu, a to najmä počas chirurgických operačných zákrokov a následne aj k vzniku s ním súvisiacej neuropatie v príslušnej inervačnej oblasti.

Kľúčové slová

nervus obturatorius, nervus obturatorius accesorius, variácie

Summary

In most of cases, the obturator nerve is only one nerve of the lumbar plexus that runs medially from psoas major muscle. We have detected during routine anatomical dissection a rare accessory obturator nerve (nervus obturatorius accesorius), which occurs unilaterally. An omission of its appearance in clinical practice may lead to its damage, particularly during surgery, and consequently to related neuropathy in the innervation area.

Keywords

obturator nerve, accessory obturator nerve, variability

Úvod

Nervus obturatorius pochádza z rami ventrales druhého až štvrtého drierkového miechového segmentu plexus lumbalis. V roku 1672 bol však prvýkrát Isbrandom van Diemberbroeckom opísaný prídavný nervus obturatorius accesorius (6). V našej práci popisujeme nález nervus obturatorius accesorius vyskytujúci sa unilaterálne vpravo. Poznanie takýchto anatomických variácií periférnych nervov je dôležité najmä z klinického hľadiska v odvetviach medicíny ako je ortopedická chirurgia, fyzioterapia, či rádiológia.

Materiál a metódy

V tejto práci sme použili preparát panvy z humánneho kadáveru mužského pohlavia vo veku približne 72 rokov. Kadáver bol fixovaný bežným spôsobom roztokom používaným na fixáciu preparátov určených na výučbu anatómie a pri zaobchádzaní s ním boli dodržiavané etické zásady. Po zdokumentovaní bol kadáver zaradený do výučbového plánu študentov 1. ročníka Lekárskej fakulty odboru Všeobecné lekárstvo.

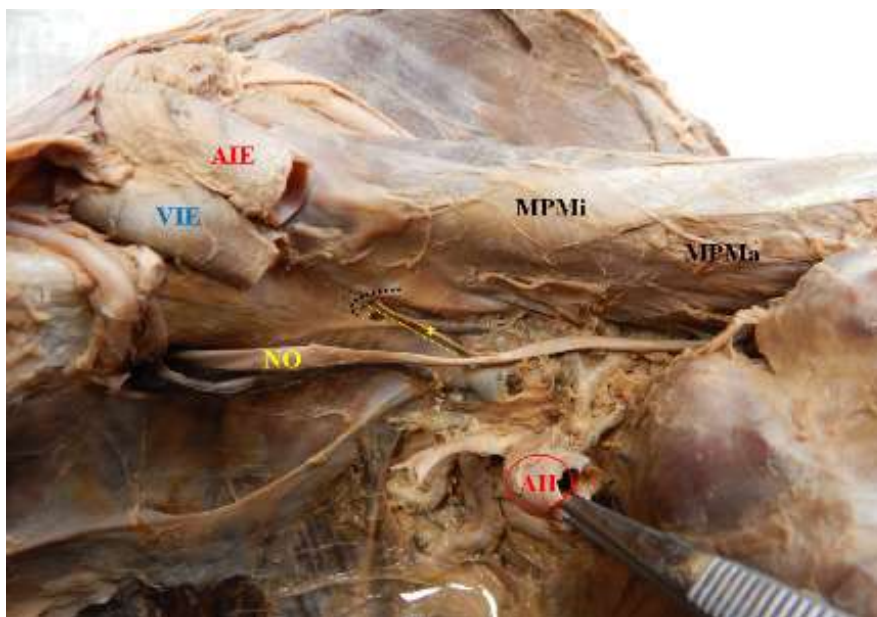
Súčasne sme používali nástroje určené na pitvu ako skalpel, anatomické pinzety, nožnice, ochranné pomôcky a na zdokumentovanie pitevného nálezu digitálny fotoaparát.

Výsledky a diskusia

Nervus obturatorius je zmiešaný nerv vznikajúci z plexus lumbalis v rozsahu druhého až štvrtého lumbálneho segmentu miechy. Po sformovaní v hĺbke musculus psoas major, vystupuje z jeho mediálneho okraja, pozdĺž ktorého vstupuje do priestoru malej panvy. Prebieha poza vasa ilaca communis a opúšťa priestor malej panvy cez canalis obturatorius, kde sa delí na ramus anterior a ramus posterior. Ramus anterior zabezpečuje motorickú inerváciu svalov mediálnej skupiny stehna (adduktory) a súčasne vydáva variabilný ramus cutaneus pre senzitivnú inerváciu kože mediálnej strany stehna. Ramus posterior sa zanára dozadu do musculus obturatorius externus a do musculus adductor magnus, ktoré spolu s musculus adductor brevis inervuje (2, 3).

Počas rutinnej anatomickej pitvy sme vypreparovali raritnú vetvu nervus obturatorius – nervus obturatorius accesorius. Nervus obturatorius accesorius (Obr. 1) sa v našom prípade vyskytuje unilaterálne na pravej strane. Vo svojom priebehu odstupuje z nervus obturatorius dexter pred jeho prechodom cez linea terminalis do priestoru malej panvy. Bez vetvenia smeruje laterálne k mediálnemu okraju musculus psoas major. Pred úponom aponeurózy musculus psoas minor na eminentia iliopectinea, preráža povrchovú fasciu svalov a vytvára tak zreteľne formovaný hiatus, do ktorého sa vnára so sprievodným ramus iliacus vasae iliolumbalis. Nervus obturatorius accesorius o dĺžke 5,30 mm a šírke 1,14 mm následne podbehne priebeh musculus psoas major a vytráca sa v svalovej mase musculus pectineus. Incidencia akcesórneho nervus obturatorius sa v literatúre pohybuje v rozmedzí približne od 3,33% až do 25% (4).

Neodhalenie, či opomenutie prídavného nervus obturatorius môže negatívne ovplyvniť klinický účinok blokády nervus obturatorius. Akkaya a kol. (2008) odporúča okrem blokády nervus obturatorius zároveň vykonať blokádu aj nervus obturatorius accesorius. Blokáda nervus obturatorius accesorius môže byť indikovaná pri rôznych povrchových operačných zákrokoch v oblasti stehna alebo pri liečbe bolesti (v analgézií), napríklad pri osteoartritíde (1). Zároveň je potrebné poznať možný výskyt tohto nervu aj pri diagnostikovaní a hodnotení periférnych neuropatií (5). Pri jeho opomenutí pri chirurgických zákrokoch v oblasti chrbtice (najmä predný a bočný prístup), dochádza častokrát k jeho poškodeniu (7).



Obr. 1 Nervus obturatorius accesorius dexter (*) sa oddeľuje z nervus obturatorius dexter (NO) na mediálnom okraji musculus psoas major (MPMa). Jeho priebeh je krytý naliehajúcimi vasa iliaca externa (AIE, VIE) a doprevádza ho vetva z arteria iliaca interna (AII) s rovnomennou vénou. Fasciu svalov preráža pred úponom musculus psoas minor (MPMi).

Záver

Cieľom našej práce je predstaviť a súčasne priblížiť jednu z možných anatomických variácií periférnych nervov, a to nervus obturatorius accesorius. Zvýšenie informovanosti odbornej verejnosti môže zabrániť vzniku prípadných diagnostických omylov alebo terapeutických zlyhaní a prispieť tak k zlepšeniu kvality a úspešnosti v chirurgii, ortopedickej chirurgii, algeziológii, či anesteziológii.

Literatúra

- 1. Akkaya T, Comert A, Kendir S, Acar HI, Gumus H, Tekdemir I, Elhan A.** Detailed anatomy of accessory obturator nerve blockade. *Minerva Anesthesiol* 2008; 74: 119-22.
- 2. Čihák R.** Rami anteriores (ventrales) nervorum lumbalium. 531-535. In: Čihák. *Anatomie 3*. Praha; Grada Publishing, a.s., 2004.
- 3. Drake LR, Wayne Vogl A, Mitchell MWA.** Abdomen. 255-410. In: Drake LR, Wayne Vogl A, Mitchell MWA. *Gray's Anatomy for students*, 3rd edition. Philadelphia; Churchill Livingstone, 2015.
- 4. Manasa B, Samala N, Mokkalapati P.** Incidence of Accessory Obturator Nerve – A Case Study. *JMSCR* 2017; 5 (9): 28237- 28239.
- 5. Rohini M, Yogesh AS, Banerjee C, Goyal M.** Variant Accessory Obturator Nerve – A Case Report and Embryological Review. *RRJMHS* 2012; 1 (1): 7-9.
- 6. Swanson LW.** Neuroanatomical terminology: a lexicon of classical origins and historical foundations. Oxford; Oxford University Press, 2015: 29.
- 7. Turgut M, Protas M, Gardner B, Oskouian RJ, Loukas M, Shane Tubbs R.** The accessory obturator nerve: an anatomical study with literature analysis. *Anatomy* 2017; 11 (3): 121-127.

POROVNANIE ÚČINNOSTI DVOCH MACERAČNÝCH MÉDIÍ PRI OSTEOLÓGICKEJ PREPARÁCII

(Comparison of efficiency of two maceration media in osteological preparation)

Filip Korim, Mária Kuricová, Tomáš Lipták

*Klinika malých zvierat, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
filip.korim@student.uvlf.sk*

Súhrn

V súčasnosti existuje mnoho metód prípravy osteologických preparátov, ktoré vyžadujú rozličné podmienky. V našej práci sme porovnávali dva najčastejšie používané roztoky pri príprave osteologických preparátov. V práci sme použili 15 kadáverov psov rôznych plemien. Zistili sme, že najlepší výsledok dosiahneme použitím NaOH, použitím KOH výrazne vieme skrátiť čas macerácie, ale preparáty sú mnohokrát poškodené. Kostí, ktoré boli navrtané pred maceráciou mali najlepšiu výslednú kvalitu. Nami zistené poznatky možno aplikovať do humánnej anatómie.

Kľúčové slová

macerácia, pes, kosti, osteológia, hydroxid

Summary

There are many methods of preparation of bone specimens, which require different conditions. We compared two maceration solutions - sodium hydroxide and potassium hydroxide. We used 15 mix breeds dog's cadavers. We found out that the best results were recorded when sodium hydroxide was used, however, the shortest time of maceration was recorded with potassium hydroxide. Some specimens were destroyed by potassium hydroxide. The best quality of the bones was recorded in a group of bones which were drilled before maceration. Our result can be applied to human anatomy.

Keywords

maceration, dog, bones, osteology, hydroxide

Úvod

Osteologické preparáty hrajú dôležitú úlohu nie len v rámci pedagogického procesu, ale aj pri demonštrácii patologických zmien jednotlivých kostných štruktúr majiteľom zvierat za účelom lepšieho pochopenia konkrétnych ochorení ich zvierat. Pri príprave osteologických preparátov je mimoriadne dôležité zvoliť tú najvhodnejšiu metódu prípravy. Mnoho autorov opisuje ako nevýhodu prípravy kostrových preparátov veľkých zvierat (psy, kone, hovädzí dobytok) sprevádzajúci nepríjemný zápach a taktiež dlhý čas prípravy (1,4,5,7).

Medzi najčastejšie používané maceračné média v súčasnosti patrí hydroxid sodný a hydroxid draselný, ktoré sa od seba rozlišujú najmä svojou silou (disociačnou konštantou), chemickými

vlastnosťami tvoriť výsledné produkty macerácie a najmä výsledným efektom na kvalitu preparátov (4,6).

V našej práci sme hodnotili účinnosť dvoch maceračných médií, čas macerácie, vznikajúci zápach a výslednú kvalitu osteologických preparátov.

Metodika a materiál

V práci sme na základe súhlasu majiteľov použili 15 celých kadáverov psov rôznych plemien, ktoré boli eutanazované na žiadosť majiteľov zo zdravotných dôvodov. Kadávery slúžili v pedagogickom procese Kliniky malých zvierat. Jednotlivé časti kadáverov boli odseparované a macerované zvlášť. Vzorky boli rozdelené do dvoch skupín a niekoľko podskupín. V skupine 1 sme vzorky macerovali v hydroxide sodnom, kde boli 3 podskupiny: Dlhé kosti navrátené pred maceráciou, Dlhé kosti navrátené počas macerácie, Dlhé kosti nenavrátané. V skupine 2 sme vzorky macerovali v hydroxide draselnom, kde boli 3 podskupiny: Dlhé kosti navrátené pred maceráciou, Dlhé kosti navrátené počas macerácie, Dlhé kosti nenavrátané. Priemerná teplota macerácie bola 22°C. Kostí po macerácii boli sušené pri laboratórnej teplote.

Výsledky

Čas macerácie mäkkých tkanív závisel na vzrastajúcej teplote. Priemerný čas macerácií pri použití hydroxidu sodného bol 12 dní a pri použití hydroxidu draselného 7 dní. Teplota prijateľná pre maceráciu mäkkých tkanív bola v rozpätí od 22°C do 70°C. Pri vyššej teplote dochádza k lámaniu tenkých kostí, praskaniu kompakty a typickému stmavnutiu kostí. Dôležitý je fakt, že odstránením čo najväčšej časti mäkkých tkanív preparáciou vieme výrazne skrátiť dobu macerácie. Veľkou výhodou je potom minimálny zápach vznikajúci počas macerácie. Výraznejší zápach sme zaznamenali len pri macerácii hláv, čo si vysvetľujeme rozkladom mozgového tkaniva.

Navrátenie dlhých kostí neovplyvňuje čas macerácie tkanív, ale výrazne ovplyvňuje kvalitu osteologických preparátov. Navrátené kosti sa jednoduchšie odtučňovali a nebolo pozorované presakovanie tuku po konečnom bielení a sušení ako u kostí navrátených počas macerácie a nenavrátaných. Najlepšie výsledky sme zaznamenali keď sme kosti navrátili ešte pred maceráciou mäkkých tkanív. Avšak niekedy, aj po dokonalej macerácii sme zaznamenali u 30% prípadov presakovanie tuku v oblasti diafýzy.

V porovnaní účinnosti roztokov, sme lepšie výsledky zaznamenali s hydroxidom sodným (NaOH). Čas macerácie bol dlhší, kvalita preparátov bola lepšia, nedochádzalo k odľučovaniu kompakty po macerácii ako u hydroxidu draselného. Pri hydroxide draselnom (KOH) sme zaznamenali výrazne kratší čas macerácie, avšak veľmi dlhá macerácia môže poškodiť kompakty kostí. Zaujímavé bolo to, že v prípade použitia KOH sme mohli dočasne pozorovať aj väzový aparát kĺbu, ktorý sa použitím NaOH ihneď deštruoval. Výsledná farba kostí po macerácii bola krémová až biela v oboch prípadoch.

Diskusia

Využitie hydroxidu sodného/draselného bolo študované pri príprave osteologických preparátov vtákov, mäsožravcov, krýs a koní (1,2,3,4,5). Štúdie viacerých autorov dokázali, že pri použití hydroxidu draselného sú kosti hnedé a často poškodené (5). Kostí v našej práci po macerácii boli biele, nepoškodené a nezapáchali. Hydroxid sodný má preto lepšie vlastnosti ako hydroxid draselný. Nevýhodou je, že rebrové chrupky a chrupkovité spoje jazylky boli účinkom NaOH deštruované, avšak podľa našich doterajších pozorovaní u koní k tomuto javu nedochádza. V porovnaní s metódou varu, ktorú skúmali niektorí autori na mäsožravcoch (psy, kuny, mačky) je čas macerácie oveľa dlhší, pretože preparácia kostier

varom je otázkou niekoľkých hodín, avšak intenzita zápachu počas varu je veľmi silná (5,7). V tomto smere sa nami použitá metóda macerácie javí ako viac vhodná.

Záver

Výber vhodnej metódy prípravy osteologických preparátov má vplyv na časovú a finančnú náročnosť prípravy, ako aj na kvalitu výsledných preparátov. V našom experimente sme dosiahli najlepšie výsledky použitím chemickej macerácie, kde maceračný roztok bol hydroxid sodný (NaOH). Avšak najkratšie časy macerácie sme zaznamenali pri príprave kostí, kde ako maceračný roztok bol použitý hydroxid draselný (KOH) $t=7$ dní. Najlepšiu kvalitu výsledných preparátov vykazovali kosti, ktoré boli navítané ešte pred maceráciou mäkkých tkanív. Získané poznatky možno aplikovať do humánnej medicíny a fórenzných vied.



Obr. 1 Rozdiel v kvalite preparátov – Ramenná kosť psa

Pravý a ľavý Humerus psa: Vľavo kosť navítaná pred koncom macerácie (Skupina 3), vpravo kosť navítaná pred maceráciou (Skupina 2.)

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantom Nadácie Axa v Nadačnom fonde Pontis.

Literatúra

1. **Boyle, C.** Maceration and preparation of mamma skeletons for long term curation. Archaeology and forensic laboratory. University of Indianapolis, 2010.
2. **Grygon.** Tutorial cleaning of Bones PART 1., 2010. Available in: <http://fav.me/d21xl1el>
3. **Christensen, A.M and Myers, S.W.** Macroscopic observations of the effects of varying fresh water pH on bone. Journal of forensic sciences, 2011; 56(2), 475–9.

4. **Onwuama, K. T.; Salami, S. O.; Ali, O. & Nzalak, J. O.** Effect of different methods of bone preparation on the skeleton of the african giant pouched rat (*Cricetomys gambianus*). *Int. J. Morphol.*, 2012; 30(2):425-427.
5. **Solov'ev, V.A., Segeyev, A.A., Zhiryakov, A.S., Rukavishnikova, T.L.** A method of preparation of osteological specimens of mammals and birds. *Russian J. Theriol.*, 2013; 12(1):33 – 38.
6. **Vohlídal, Jiří; Štulík, Karel; Julák, Alois.** *Chemické a analytické tabulky*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 1999; ISBN 80-7169-855-5.
7. **Weiss, F.** Metodický postup pri zhotovovaní kostrového preparátu jastraba lesného. Nitra: SPU FAPZ, 2011; 79 s.

KLÚČNA KOSŤ ČLOVEKA A LABORATÓRNEHO POTKANA

(Clavicle in human and laboratory rat)

*Ján Liška¹, Radoslav Zamborský², Eduard Ujházy³, Peter Malovec⁴,
Vanda Rísová¹, Štefan Polák¹*

¹ Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta UK, Špitálska 24, 813 72 Bratislava
e-mail:jan.liska@fmed.uniba.sk

² Ortopedická klinika LFUK a NÚDCH, Limbova 1, 83340 Bratislava

³ Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie SAV, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava
⁴ Anatomický ústav, Lekárska fakulta UK, Špitálska 24, 813 72 Bratislava

Súhrn

Kľúčna kosť sprostredkujúca kostné spojenie medzi hornou končatinou a axiálnym skeletom vykazuje v porovnaní s inými dlhými kosťami určité morfológické odlišnosti. Najvýraznejším, zjavným rozdielom je odlišný typ kĺbovej chrupky na oboch koncoch kľúčnej kosti. Potkania klavikula sa od ľudskej čiastočne líši. Jej kĺbová chrupka je totožná s typom chrupky ostatných dlhých kostí. Odlišnosti čiastočne obmedzujú používanie potkana v štúdiu ľudskej kĺbovej chrupky klavikuly. Na druhej strane niektoré vlastnosti súvisiace s týmito odlišnosťami ponúkajú možnosti pre aplikáciu v medicínskom výskume.

Kľúčové slová

kľúčna kosť človeka a potkana, osifikácia, sternoklavikulárny a akromioklavikulárny kĺb

Summary

The clavicle mediating bone-to-bone link between the upper limb and the axial skeleton shows some morphological differences compared to other long bones. The most striking, obvious difference is the type of articular cartilage at both ends of the clavicle. The rat's clavicle is somewhat different from human. Its articular cartilage is identical to the type of cartilage of other long bones. The differences partially restrict the use of the rat as a model for the study of human clavicular cartilage but on the other hand they can provide some valuable possibilities for application in medical research.

Keywords

human and rat clavicle, ossification, sternoclavicular and acromioclavicular joint

Úvod

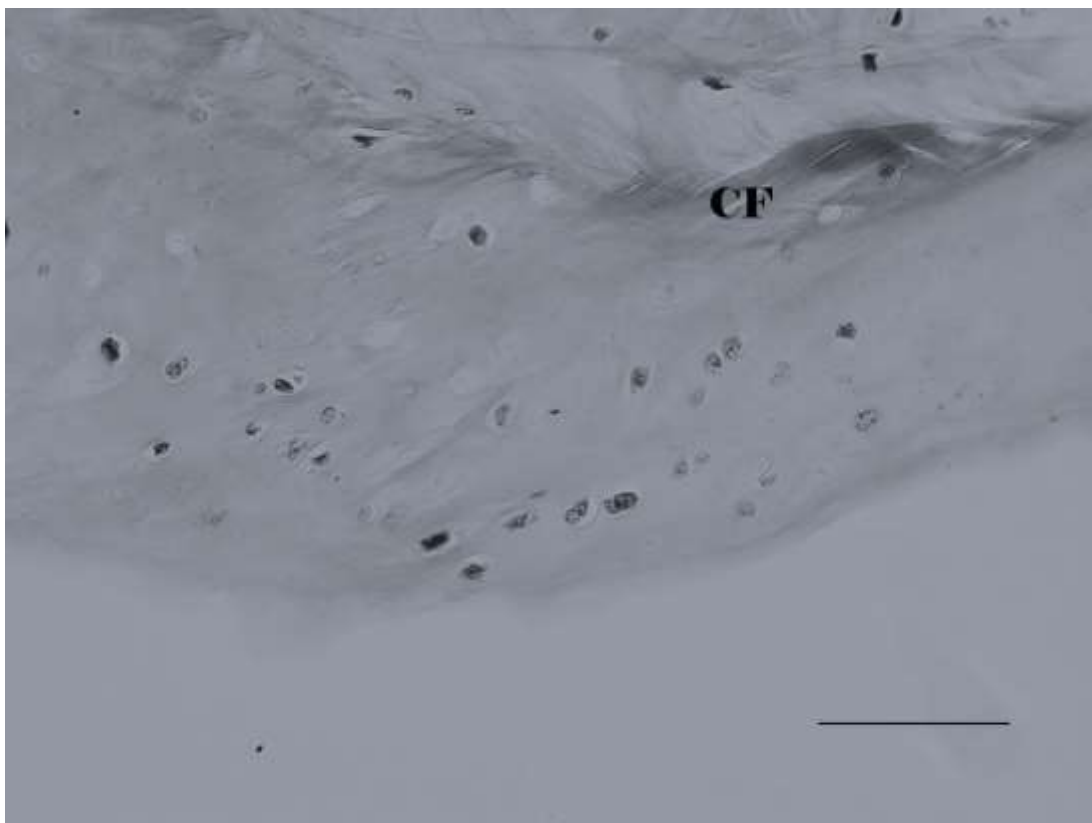
Kľúčna kosť človeka funguje v prenose záťaže pozdĺž jej osi z hornej končatiny na hrudník. U človeka nie je kosťou nesúcou váhu a nemá dreňovú dutinu ako iné dlhé kosti (4). V prípade novorodencov je to kosť najčastejšie postihnutá fraktúrou (10). Napriek jej významu a častému postihnutiu, je zriedkavo predmetom výskumu a takisto málo prác bolo publikovaných na tému týkajúcu sa morfológie kľúčnej kosti.

Charakteristia kľúčnej kosti

Kľúčna kosť je z dostupnej literatúry známa ako jediná dlhá kosť, ktorá osifikuje intramembranóznym spôsobom (12, 5). V skutočnosti ide o počiatočnú fázu jej osifikácie. V ľudskej populácii sa rastové hyalínové chrupavky tvoria na oboch koncoch klavikuly počas osifikácie o niečo neskôr (6). Huang a kol. (3) identifikovali vývojové fázy a opísali ich ako jedinečnú kombináciu membránovej a endochondrálnej tvorby kostí. Ako prvá spomedzi kostí osifikuje a je poslednou kosťou podliehajúcou fúzii (2) Jej sternoklavikulárny a tiež akromioklavikulárny kĺb sa odlišujú od kĺbov ostatných dlhých kostí.

Klavikulárne kĺby človeka

Na rozdiel od hyalínovej chrupky pokrývajúcej ostatné dlhé kosti dospelých ľudí, sú obidva kĺby kľúčnej kosti pokryté väzivovou chrupkou (obr. 1). Charakterizovať ich možno ako atypické synoviálne diartrotické kĺby. U človeka je mediálny - sternoklavikulárny kĺb (SCJ) tvorený proximálnym koncom klavikuly, klavikulárnym zárezom manubria hrudnej kosti a chrupkou prvého rebra (8). Hyalínová chrupka dočasne pretrváva na sternálnom konci u detí a mladých dospelých(2). Tento typ chrupky je typický pre dlhé kosti a uľahčuje hladké pohyby kostí v kĺboch. Laterálne umiestnený akromioklavikulárny kĺb (ACJ) sprostredkuje spojenie medzi najvyšším bodom lopatky a kľúčnou kosťou. Podobne ako oba kĺby kľúčnej kosti dospelých, väzivovou chrupkou je pokrytý aj artikulárny povrch ďalšieho veľmi dôležitého temporomandibulárneho kĺbu. Takisto rast kľúčnej kosti je porovnateľný s rastom mandibuly (11). Väzivová chrupka ako prechodná forma medzi hustým kolagénovým väzivom a hyalínovou chrupkou umožňuje obmedzenú mobilitu kĺbov.



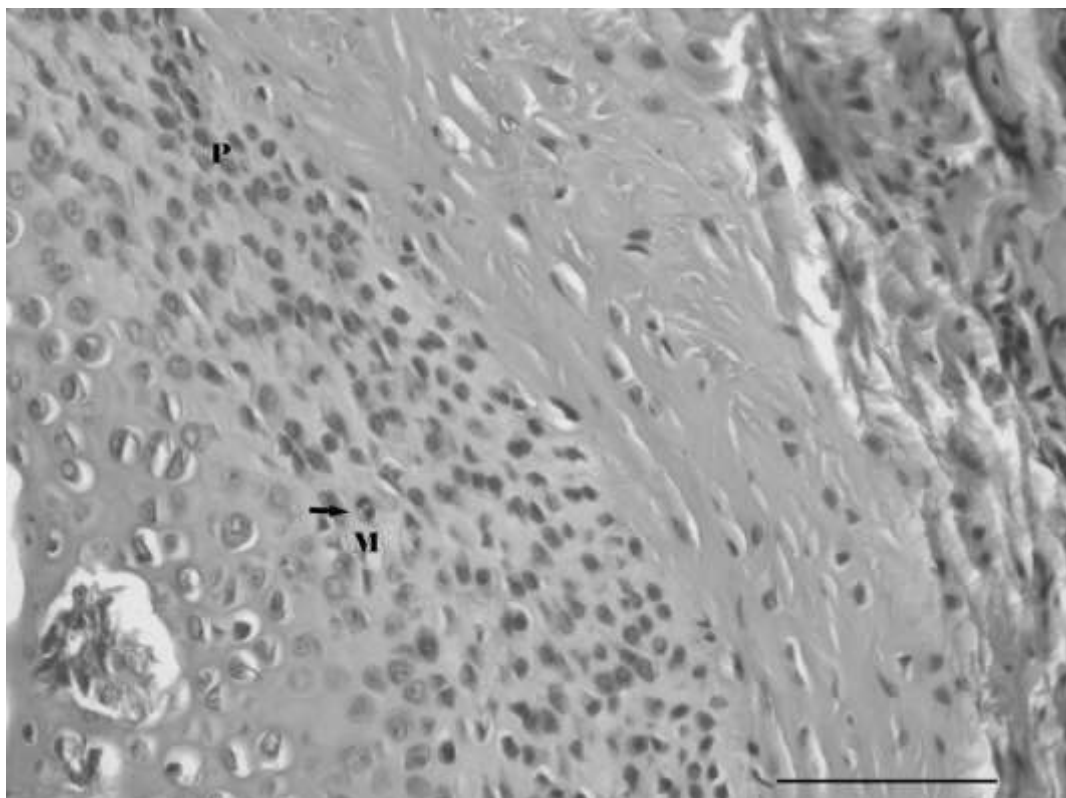
Obr. 1 Klavikulárna plocha ľudského sternoklavikulárneho kĺbu 68 ročnej ženy, pokrytá väzivovou chrupkou obsahujúcou kolagénové vlákna (kolagén typu I) tvoriace zväzky (CF). Chondrocyty zväčša uložené samostatne alebo sa zoskupujú. Zelený trichróm. Bar=20 µm

Potkan ako model

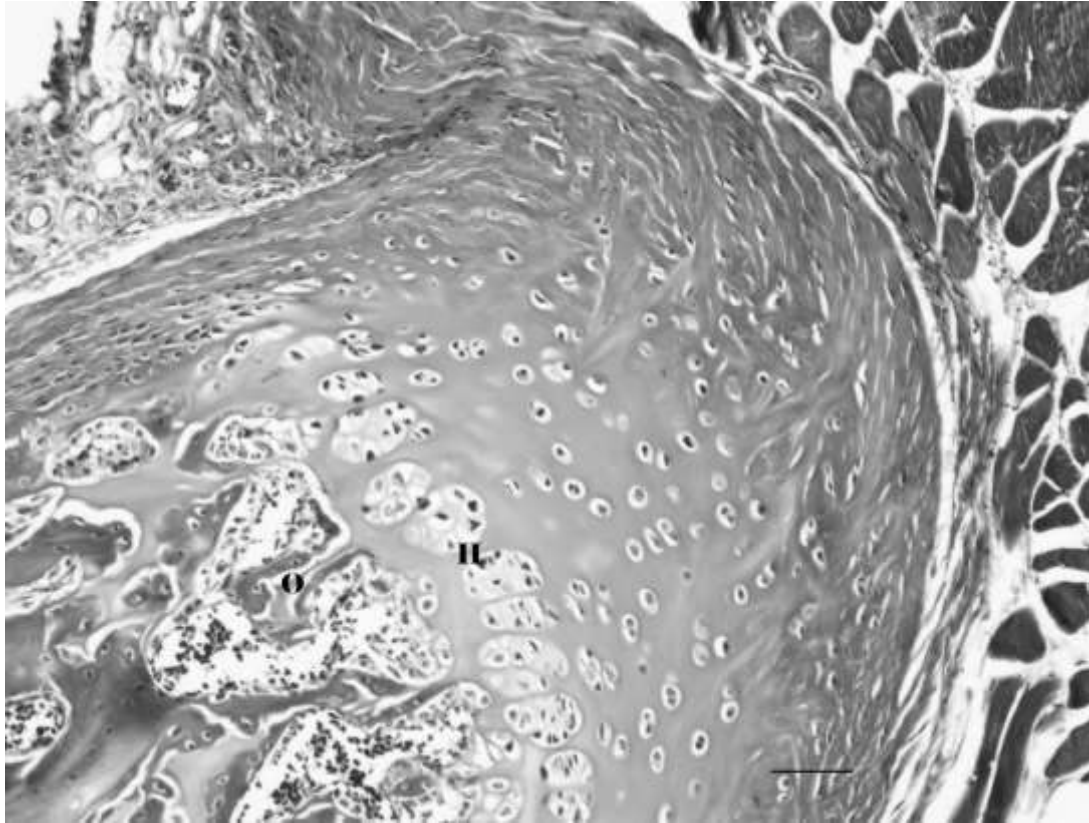
Napriek určitým medzidruhovým rozdielom, zvieracie laboratórne modely pre poruchy kĺbov v ľudskej populácii sa používajú pomerne bežne. Väčšina laboratórných zvieracích modelov bola vhodne opísaná v literatúre a posudzovanie ich vhodnosti ako modelu pre ľudské ochorenie je založené predovšetkým na histopatologických kritériách (1). Potkany sa používajú ako model všeobecne v rámci štúdií zmien a reparácie kĺbových chrupaviek, ktorých výsledky sa aplikujú na ľudí (7, 9)

Kľúčna kosť a jej kĺby u potkana

Oba kĺbové konce kľúčnej kosti dospelých potkanov sú pokryté hyalínovou chrupkou. Kľúčne kosti týchto zvierat obsahujú dreňovú dutinu, podobne ako ostatné dlhé kosti. Mediálny koniec sa u potkanov zúčastňuje rastu tejto kosti do dĺžky a pozostáva z dvoch chrupavkových štruktúr oddelených vrstvou husto natlačených mezenchýmových buniek (11) a povrchovej alebo periférnej fibróznej vrstvy. Odlíšiteľné sú tri vrstvy chondrogénnych bunkových línií vytvárajúcich proliferatívnu, chondrocytovú a hypertrofickú bunkovú vrstvu (obr. 2). Proliferatívna aktivita buniek chrupky - sternoklavikulárneho kĺbu pretrvávala u našich intaktných potkanov ešte vo veku 5 mesiacov, čo výrazne prekračuje vekový limit udávaný vyššie uvedenými autormi. V priebehu rastu reaguje klavikula na mechanické zaťaženie a napätie súvisiace so spôsobom pohybu (4). Počas enchondrálnej osifikácie kostné trabekuly mediálnej strany rastú v smere kolmom k artikulárnemu povrchu a tým sa odchyľujú od pozdĺžnej osi kosti, čoho výsledkom je zakrivený tvar klavikuly potkana (11). Rönning a Kantomaa (11) v rámci štúdií kĺbov kľúčnej kosti potkanov nepozorovali v mezenchýme chrupavky akromioklavikulárneho kĺbu osteogénnu aktivitu a dospeli k záveru, že laterálny koniec kosti dospelých potkanov má v podstate len kĺbovú funkciu. V našich podmienkach boli zjavné prejavy osteogenézy aj v chrupke ACJ 50 dní starých experimentálnych potkanov (obr. 3)



Obr. 2 Pretrvávajúca proliferatívna aktivita buniek SCJ s mitotickými figúrami (M a šípka) v proliferáčnej bunkovej vrstve (P) u 5 mesiacov starých potkaních samíc. HE. Bar=20 µm



Obr. 3 Osteogénna aktivita hyalínovej chrupavky ACJ u 50 dní starých samíc potkanov s transparentnou hypertrofickou (H) vrstvou a osifikačnými zónami (O). Zelený trichróm. Bar=10 µm

Záver

Hlodavce používajú horné končatiny do určitej miery podobne ako ľudia. Podobnosť vo vývoji sternoklavikulárneho kĺbu predurčuje potkany pre používanie v pokusoch. Horné končatiny potkana sú zároveň pri pohybe zaťažené odlišným spôsobom ako ruky človeka. Medzi morfológiou a kĺbovým rastovým vzorom existuje vzťah. Podrobnejší výskum pretrvávajúcej osteogénnej aktivity chrupky mediálneho konca klavikuly dospelých potkanov ponúka rôzne možnosti výskumu, jedným z nich môže byť použitie potkanov ako modelu pre štúdium osteogénneho potenciálu a aktívnej adaptačnej remodelácie sternoklavikulárnej a do určitej miery snád' aj akromioklavikulárnej kĺbovej chrupavky aj po ukončení jej prirodzeného rastu.

Literatúra

1. **Bendele AM** Models of Osteoarthritis, *J Musculoskel Neuron Interact*, 2001, 1: 363-376
2. **Calixto LF, Penagos R, Jaramillo L, Gutiérrez ML, Garzón-Alvarado D** A Histological Study of Postnatal Development of Clavicle Articular Ends. *Univ Sci (Bogota)*, 2015, 20: 361-368
3. **Huang L-H, Fukai N, Selby PB, Olsen, BR, Mundlos** Mouse clavicular development: Analysis of wild-type and cleidocranial dysplasia mutant mice. *Dev Dynam*, 1997, 210: 33-40
4. **Inthasan C, Mahakkanukrauh P** Age Estimation from Clavicle by Histomorphometry Method: A Review. *Med & Health*, 2017, 12: 4-17.
5. **Mescher AL** Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. Fourteenth Edition, McGraw-Hill Education chpt 8 Bone, 2016: 138 -160
6. **Moore, KL, Persaud, TVN, Torchia MG** Musculoskeletal System. 223 – 242. In: *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects*. Saunders, 8th Edition, 2013

- 7. Moriyama H, Yoshimura O, Kawamata S, Takayanagi K, Kurose T, Kubota A, Hosoda M, Tobimatsu Y** Alteration in articular cartilage of rat knee joints after spinal cord injury. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16: 392-8
- 8. Phadnis J , Bain GI** Clavicle Anatomy. In : Bain GI, Itoi E, Di Giacomo G, Sugaya H (eds) *Normal and Pathological Anatomy of the Shoulder*. Publisher: SPRINGER, 2015: 71-80
- 9. Piel MJ, Kroin JS, van Wijnen AJ, Kc R, Im HJ** Pain assessment in animal models of osteoarthritis. *Gene*, 2014, 537: 184–188
- 10. Precious DA, Hall BK** Repair of fractured membrane bones. In: Hall BK, (ed.) *Bone, Differentiation and morphogenesis of bone*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994, 9: 145–163
- 11. Rönning O, Kantomaa T** The growth pattern of the clavicle in the rat. *J Anat*, 1988, 159: 173-9
- 12. Ross MH, Pawlina W** *Histology. A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology* 7th Edition chpt Bone, 2016: 214 -258

PANVA Z ANATOMICKÉHO A KLINICKO-FUNKČNÉHO UHLA POHĽADU

(Pelvis from anatomical and clinically-functional point of the view)

*Petra Lukáčiková¹, Eliška Kubíková¹, Andrej Mifkovič¹, Hisham El Falougy¹,
Katarína Bevízová¹, Júlia Pappová²*

¹Anatomický ústav, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava,
petra.lukacikova@fmed.uniba.sk

²Oddelenie ortopédie a úrazovej chirurgie, Všeobecná nemocnica s poliklinikou Lučenec
n.o.

Súhrn

Kosti panvy predstavujú súbor kostí, ktoré spájajú trup s dolnými končatinami, tvoria oporu trupu, prenášajú váhu tela a chránia vnútorné orgány, cievy a nervy. Panva ako celok teda predstavuje z anatomického i klinického hľadiska veľmi dôležitú oblasť, s mnohými funkciami.

Kľúčové slová

os coxae, pelvis minor, zlomenina

Summary

Pelvic girdle, also called bony pelvis, represents a complex of bones that connects the trunk and the legs, supports and balances the trunk, contains and supports the internal organs, the vessels and the nerves. Thus, the pelvis represents a very important area from anatomical and clinical aspect.

Keywords

hip bone, pelvis minor, fracture

Úvod

Pletencu dolnej končatiny, teda panvovej kosti (os coxae: os ilium, os pubis et os ischii), i celej panve ako takej, prináležia viaceré anatomické funkcie, medzi ktoré patrí transmisný, protektívny a podporný systém. Taktiež sa jedná o inzerčnú plochu, od ktorej začínajú, alebo sa sem upínajú mnohé svaly. Nemenej dôležitý je i fakt, že na panve nachádzame významné pohlavné rozdiely. (4, 6)

Problematika

Panva je kompaktný útvar, ktorý sa skladá z ossa coxae, os sacrum a os coccygis. Spojením krížovobedrových kĺbov, lonovej spony (symphysis pubica), a tiež väzov, sa vytvorí pevný kostný kruh/prstenec, ktorým sa prenáša váha trupu na dolné končatiny. Tvar, šírka a postavenie panvy sú pre človeka charakteristické a súvisia so vzpriameným držaním tela. (2, 4)

Na panve rozoznávame pelvis major (veľká panva) a pelvis minor (malá, alebo „pôrodnica“ panva). Hranicu medzi panvovými priestormi tvorí linea terminalis (hraničná čiara).

Táto siaha od promontória, cez linea arcuata, až k hornému okraju symfýzy. Pelvis major ohraničujú krídla bedrovej kosti, kým pelvis minor zozadu ohraničuje krížová kosť a kostrč, po stranách a vpredu dolná časť tela bedrovej kosti, sedacie kosti a lonové kosti. V rámci pelvis minor rozlišujeme, mimo iné, i dôležité roviny: apertura pelvis superior et inferior, amplitudo pelvis a angustia pelvis. (2, 6)

Pohyblivosť a záťaž panvy

Transportný systém tvorí pevný, pružný prstenec, ktorý prenáša váhu na dolné končatiny. Pri stoja je panva naklonená najmä dopredu, v uhle, ktorý podľa postoja mierne kolíše. Panvový sklon, inclinatio pelvis, na živom tele ťažko určiteľný, vyjadruje uhol, ktorý zvierá rovina vchodu malej panvy s horizontálnou rovinou. Tento sklon, v prípade inclinatio pelvis normalis, dosahuje 60°. Každá zmena panvového sklonu sa prejavuje zmenami bedrovej lordózy; zväčšený sklon panvy súvisí s prehĺbením bedrovej lordózy. Panvový sklon má teda podstatný vplyv na stabilitu a funkciu svalov panvového dna. (2, 4, 6) V praxi používaný uhol - inclinatio coxae je uhol, ktorý zvierá spojnicu spina iliaca posterior superior a horný okraj symfýzy s horizontálnou rovinou. Za normálnych okolností dosahuje približne 40°. Sklon panvy ovplyvňuje i namáhanie symfýzy. Symphysis pubica je veľmi pevné spojenie. Podľa sklonu panvy je symfýza vystavená tlaku, alebo ťahu. Pri veľkom sklone panvy pôsobí na symfýzu najmä tlak, pri malom sklone (napríklad pri pohodlnom státi) pôsobí hlavne ťah. Articulatio sacroiliaca je amphiarthrosis (articulatio mobilitatis minimae). (2, 6)

Panvové dno predstavuje podporný systém panvy. Vzhľadom na panvový sklon, nesie predná časť dna hlavnú váhu panvových orgánov, kým zadné a pomerne slabé dno je iba minimálne zaťažené. Lievikovitý tvar časti panvového dna mení tlakové zaťaženie na ťahové. (4)

Konečný tvar panvy sa začína formovať až po osvojení si chôdze. U novorodenca sú kostrč a bedrové lopatky ešte vyrovnané a ležia skoro v sagitálnej rovine. (3)

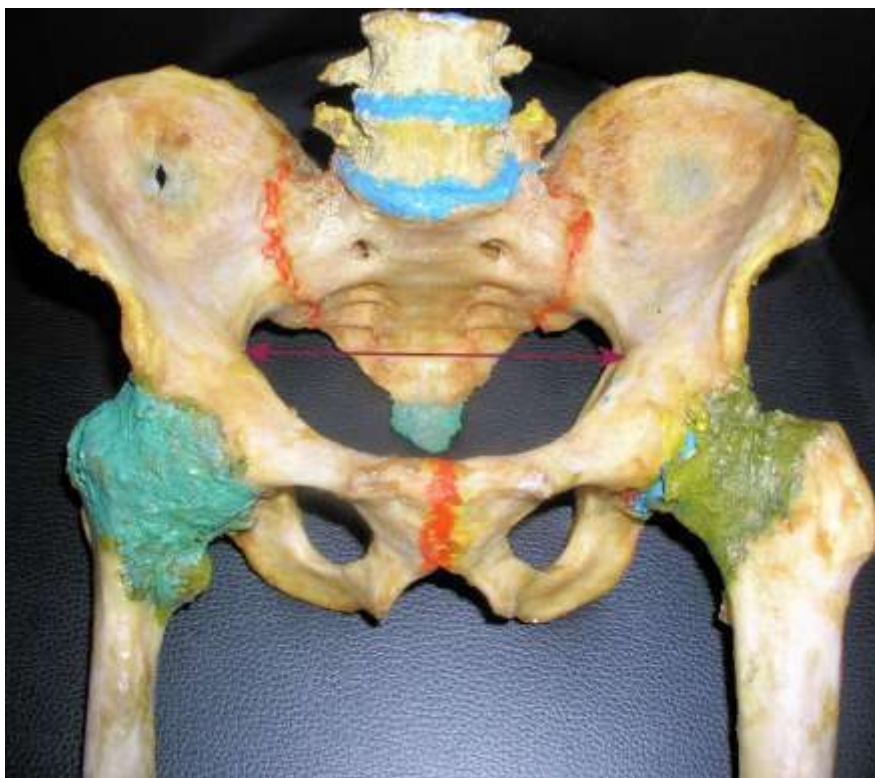
Oslabené miesta panvy

Protektívny a podporný systém panvy je podmienený silou a mechanickou odolnosťou panvových stien v rozsahu horného segmentu krížovej kosti. Najtenšie miesta kostnej panvovej steny sú: stred bedrových kostí, horné a dolné okraje foramen obturatum a dno acetabula. V týchto miestach je kostený podklad tvorený iba slabou platničkou kompakty, spongióza chýba. Na týchto zoslabených miestach nie je periost pevne fixovaný. Väčšina panvových zlomenín je charakterizovaná priebehom lomných línií, ktoré prechádzajú cez kostené okraje foramen obturatum, dno acetabula, až do krížového kanála. (4) Zaťaženie trupu sa prenáša cez piaty lumbálny stavec, sacrum, krížovobedrové kĺby a linea terminalis ossis ilii na bedrové kĺby, a ďalej na dolné končatiny. Predná časť panvy je menej zaťažená, a preto tu nachádzame tenšiu štruktúru kosti. (1)

Zlomeniny panvy predstavujú komplexné poranenie. Pri pelvickej traume sa vyskytujú i fraktúry os sacrum. Zlomeniny kostí, prípadne disrupcie articulatio sacroiliaca et symphysis pubica, bývajú najčastejšie spôsobené anteroposteriornou a laterálnou kompresiou a bývajú sprevádzané silným krvácaním, poškodením nervov a tiež mäkkého tkaniva (svaly, orgány). Medzi tzv. stabilné fraktúry panvy (bez postihu panvového prstenca; teda okraj panvy je stabilný) s minimálnou dislokáciou patria izolované fraktúry kostí os coxae a priečne fraktúry os sacrum, a/alebo kostrče. Rotačná a vertikálna instabilita panvy nastáva v prípade postihu prstenca panvy, vrátane kĺbov. (5, 7, 8, 9)

Záver

Panva je súčasťou pohybového systému, má i ochrannú funkciu, nesie intersexuálne znaky. Toto všetko z nej činí významnú, a tiež veľmi zaujímavú topografickú oblasť tela.



Obr. 1 Kostená (mužská) panva
(Pozn.: šípka v úrovni linea terminalis / apertura pelvis superior)

Literatúra

1. **Bodzay T.** Instabil medencegyűrű-sérülések műtéti ellátása: biomechanikai és klinikai vizsgálatok. Doktori értekezés [dostupné online]: https://repo.lib.semmelweis.hu/bitstream/handle/123456789/1346/bodzaytamas.m_t%C3%A9zis.pdf?sequence=6 (12.11.2018)
2. **Čihák R., Grim M.** Anatomie 1. 2011, Grada Publishing, ISBN 9788024738178.
3. **Csoknya M., Wilhelm M.** A sportmozgások biológiai alapjai I (2011) [dostupné online]: http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0025_Csoknya_Maria-Wilhelm_Marta-A_sportmozgasok_biologiai_alapjai_I/ch05.html (12.11.2018)
4. **Dylevský I.** Funkční anatomie. 2009, Grada Publishing, ISBN 9788024732404.
5. **Hansen J.T.** Netter's clinical anatomy (second edition). 2010, Saunders Elsevier, ISBN 9781437702729.
6. **Mráz P., Binovský A., Holomáňová A., Osvaldová M., Ruttkay-Nedecká E.** Anatómia ľudského tela 1. 2012, Slovak Academic Press, ISBN 978-8080950811.
7. **Snell R.S.** Clinical anatomy for medical students. 1995, Little, Brown and Company, ISBN 0316801356.
8. **Vojtaššák J.** Ortopédia. 1998, Slovak academic press, ISBN 8088908000.
9. **Vojtaššák J.** Traumatológia. 2004, Slovak Academic Press, ISBN 8089104479.

HISTOMORFOLOGICKÁ ADAPTÁCIA TÝMUSU PEDIATRICKÝCH KARDIOLOGICKÝCH PACIENTOV

(Histomorphological adaptation of thymus in hypoxic pediatric cardiologic patients)

Veronika Mešťanová¹, Ivan Varga², Marian Adamkov¹

¹Ústav histológie a embryológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovenská republika, mestanova.veronika@gmail.com

²Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika

Súhrn

Narušený embryonálny vývin často vyústi do komplexných vývinových malformácií, ktoré sa prejavujú štrukturálnou a / alebo funkčnou destabilizáciou integrity organizmu. Vrodené chyby výtokovej časti srdca sú spravidla asociované s vývinovými defektmi orgánov vývojovo viazaných na faryngovú oblasť embrya. U pacientov s vybranými vrodenými chybami srdca dochádza k poklesu obranyschopnosti a rozvoju autoimunitných ochorení. Úlohou centrálného lymfatického orgánu – týmusu je produkcia imunokompetentných buniek schopných rozlíšiť telu vlastné a nevlastné antigény a ne / vyvolať adekvátnu reakciu. V predloženej práci sa zameriavame na hodnotenie histomorfologických a imunohistochemických odchýlok v štruktúre týmusu s prihliadnutím na diagnózu ako aj vek 48 pacientov s vrodenými chybami srdca. Archívny materiál vo forme parafrínových bločkov bol spracovaný na účely histologického (HE), histochemického (PAS) a imunohistochemického farbenia (cytokeratíny AE1/AE3, HMW cytokeratíny, vimentin V9, dezmin). Prvky histomorfologickej zmeny v korelácii s imunohistochemickou analýzou boli - pokles kortikálnej celularity, eliminácia kortikomedulárnej hranice, výskyt penových makrofágov, redukcia počtu a zároveň nárast veľkosti Hassallových teliesok a zvýšený podiel dezmin-pozitívnych buniek najmä v tkanive pacientov s predpokladom zvýšenej miery hypoxie. Výrazné odchýlky od normálnej štruktúry sme pozorovali najmä u pacientov s diagnózou transpozícia veľkých ciev, defekt komorovej priehradky a Fallotova tetralógia.

Kľúčové slová

týmus, vrodené chyba srdca, epitelové retikulárne bunky, Hassallove telieska, myoidné bunky, pericyty

Summary

Disrupted embryonal development often results in complex malformations with structural and / or functional destabilization of organism integrity. Congenital defects of outflow part of heart are usually associated with developmental anomalies of organs that are embryonically bound to pharyngeal region of embryo. Patients with particular congenital heart defects often suffer from decreased immunocompetency or autoimmune diseases. Role of thymus – central

lymphoid organ, is to generate immunocompetent cells, capable of recognition between self and non-self antigens, and provoking an adequate immunological response. Authors assessed histomorphological and immunohistological alterations in thymic structure with respect to diagnose as well as age of 48 patients with congenital heart diseases. Archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue was processed by means of histology (hematoxylin-eosin), histochemistry (PAS reaction) and immunohistochemistry (cytokeratins AE1/AE3, HMW cytokeratins, vimentin V9, desmin). Elements of histomorphological changes in correlation with immunohistochemical analysis were - reduction of cortical cellularity, effacement of corticomedullary junction, foamy macrophages presentation, reduction in number and increase in size of Hassall's corpuscles and elevated ratio of desmin-positive cells, especially in tissue with increased hypoxia predisposition. Frequent aberrancies were observed in patients with transposition of great vessels, ventricular septal defect and tetralogy of Fallot.

Keywords

thymus, congenital heart defects, thymic epithelial reticular cells, Hassall's corpuscles, myoid cells, pericytes

Úvod

Vrodené chyby srdca (VCHS) sú významnou súčasťou detských kardiovaskulárnych ochorení a predstavujú výrazné percento klinicky závažných kongenitálnych defektov, s odhadovanou prevalenciou do jedného percenta živorodených novorodencov (1,2). Štrukturálne VCHS zahŕňajú chyby septácie, malformácie chlopní a lézie postihujúce výtokovú časť srdca, ktoré negatívne ovplyvňujú kyslíkové zásobenie, a teda priamo podmieňujú mieru hypoxie v tkanivách. Navyše, vývinové chyby srdca zvyknú byť nezriedka asociované s imunitnou nedostatočnosťou postihnutého pacienta. Sprievodné komplikácie v podobe oneskorených obranných reakcií môžu súvisieť s rovnakými migračnými dráhami buniek v embryogenéze srdca a týmusu (3,4,5). Bunky neurálnej lišty, zohrávajúce kľúčovú úlohu v normogenéze srdca, migrujú cez tretí, štvrtý a šiesty faryngový oblúk do vyvíjajúceho sa trunkokonálneho septa (6). V dôsledku narušenej migrácie a diferenciácie neuroektodermových buniek cez faryngovú oblasť embrya, dochádza k vrodeným vývinovým chybám žiabrových oblúkov a ich derivátov – týmusu, štítnej žľazy a prístítnych teliesok (7). Vystavenie hypoxickým podmienkam spôsobuje zmeny v expresii génov, ktoré iniciujú buď regeneráciu kyslíkového zásobenia vo forme de novo angiogenézy, alebo ovplyvňujú bunkové prežívanie v podmienkach s nízkym pO_2 (8). Uvedené regulačné procesy môžu vyústiť do modifikácií vo formovaní normálnej štruktúry tkanív. Autori predloženej práce sa preto zamerali na histomorfologické a imunohistochemické hodnotenie tkaniva týmusu u pacientov s vrodenými chybami srdca.

Materiál a metódy

Histomorfologická a imunohistochemická analýza bola vykonaná na súbore 48 vo formalíne fixovaných v parafíne zaliatých (FFPE) archívnych vzorkách týmusu z diagnosticky uzavretých prípadov pacientov s rôznymi vrodenými chybami srdca. K sprievodnej parciálnej alebo totálnej tymecktómií tkaniva dochádzalo počas chirurgickej korekcie VCHS (Detské kardiocentrum v Bratislave, SR). Pacienti boli vo veku od štyroch dní do 13 rokov. Viac než 77 % (37/48) pacientov bolo mladších než jeden rok. Priemerný vek pacientov bol $1,17 \pm 2,47$ roka. Podiel pohlaví bol 1 : 1,53 v prospech chlapcov. Vzorky boli hodnotené pomocou svetelnej mikroskopie (Olympus BX41), obraz bol spracovaný s použitím Olympus E-420. FFPE tkanivo týmusu bolo narezané na 5 μ m hrubé rezy, deparafinované a farbené s použitím základných histologických a histochemických metód hematoxylín-eozín a PAS reakcia. Histomorfologická analýza bola cielená na hodnotenie odchýlok funkčného cytoretikula

a dominantných aberácií v počte, veľkosti a štruktúre Hassallových teliesok drene pri rôznych typoch VCHS. Pre imunohistochemickú detekciu variabilnej topografickej distribúcie bunkových populácií týmusu a ich odchýlok u rozdielnych VCHS sme použili širokú škálu protilátok – epitelové retikulárne bunky (cytokeratíny AE1/AE3, HMW (High Molecular Weight) cytokeratíny, vimentin V9), myoidné bunky / pericyty (dezmin). Metodický postup imunohistochemického farbenia sa riadil odporúčaniami výrobcu. Po aplikácii primárnej protilátky nasledovala inkubácia po dobu 20 minút pri izbovej teplote. V prípade doporučenia linkeru sme aplikovali EnVision™ FLEX (Dako, Denmark) a následne sme vzorku inkubovali so sekundárnou protilátkou (HRP SM802). Pozitívna imunoreakcia bola vizualizovaná pomocou detekčného systému EnVision FLEX a DAB chromogénu (Dako, Denmark). Jadrá boli dofarbené Mayerovým hematoxylínom (Lillie's modification, Dako, Denmark). Premyté a dehydrované vzorky boli následne montované do média Entelan (Merck, Germany). Semikvantitatívne bola hodnotená intenzita imunoreakcie (-/negatívna, +/-slabá, ++/stredná, +++/silná) ako aj percento antigén-exprimujúcich buniek ($\leq 10\%$; 11 – 50 %; $\geq 51\%$).

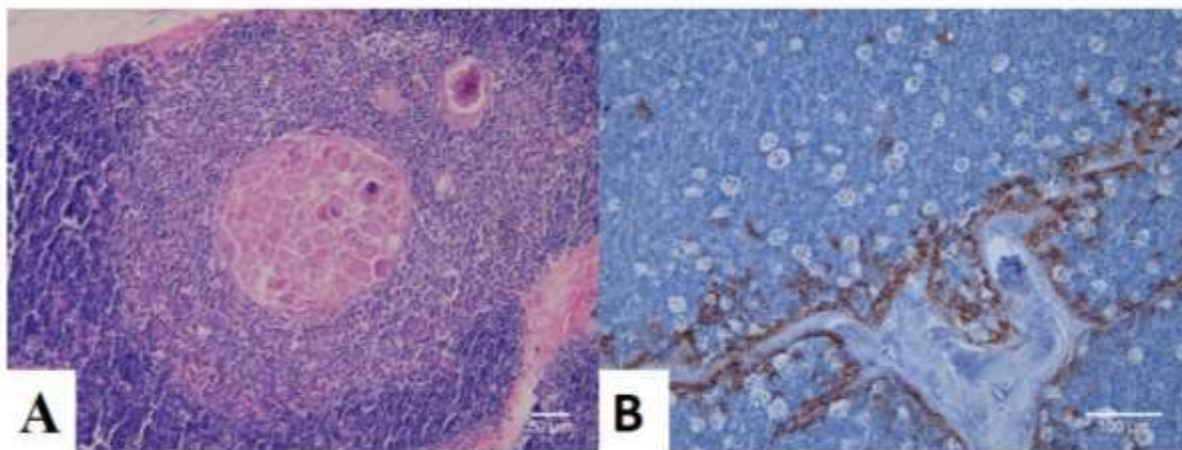
Výsledky

Z celkového počtu 48 prípadov, v siedmich (14,58 %) sme pozorovali markantný pokles celularity v kôre týmusu. Kortikálne zúženie bolo natoľko dominantné, že niektoré pseudolaloky boli obkolesené len tenkým marginálnym lemom kôry. Navyše, evidentné bolo stieranie kortikomedulárneho spojenia, čiže eliminácia definovanej hranice medzi kôrou a dreňou. Dve vzorky (4,16 %) vykazovali nadmerný pokles bunkového obsahu kôry do takej miery, že dreň sa javila ako denzný akumulát lymfocytov a kôra bola presýtená zväzkami spojivového tkaniva. Kortikálne prejasnenie bolo v šiestich prípadoch (12,5 %) sprevádzané prítomnosťou penových makrofágov (Obr. 1B), čo evokovalo vzhľad „hviezdnej oblohy“ v danom histotopografickom regióne.

V dreni najväčšie odchýlky vykazovali Hassallove telieska (Obr. 1A). Zväčšené Hassallove telieska s hypertrofickými epitelovými bunkami retikula usporiadanými do lamelárnej štruktúry boli prítomné v 13 vzorkách (27,08 %). Cystické Hassallove telieska obsahujúce široké dilatácie medzi retikuloepitelovými bunkami boli často asociované s akumuláciou amorfného PAS-pozitívneho obsahu vo svojej štruktúre (39,58 %). Navyše, s narastajúcou veľkosťou Hassallových teliesok sme evidovali klesajúci počet týchto štruktúr. Odchýlky v architektúre Hassallových teliesok dominovali v skupine starších pacientov.

Cytoplazmatická expresia protilátok viazaných na populáciu epitelových retikulárnych buniek vykazovala identický vzor topografickej distribúcie. Pozitívna imunoreakcia dominovala v dreni, s intenzívnou akumuláciou cytokeratín-pozitívnych buniek v blízkosti Hassallových teliesok. Naopak, expresia antigén-pozitívnych buniek v kôre bola nízka. Pozoruhodným nálezom bola asociácia poklesu percentuálneho výskytu cytoretikula vo vzorkách s kortikálnym prejasnením a stieraním kortikomedulárnej hranice.

Odchýlky v normálnej distribúcií a výskyte sme zachytili aj v prípade myoidných buniek týmusu. Dezmin-exprimujúce vretenovité bunky boli lokalizované zväčša v regióne kortikomedulárnej hranice a drene. Avšak, vo vzorkách starších pacientov s „hviezdnou oblohou“ a modifikovanými Hassallovými telieskami drene bol evidentný nárast v počte myoidných buniek týmusu. Popísané odchýlky štruktúry týmusu vykazovali variabilitu nielen vrámci rozdielnych diagnóz vrodených chýb srdca, ale aj medzi pacientmi s rovnakým kardiologickým defektom. Vzorky týmusu pacientov s transpozíciou veľkých ciev, defektom komorovej priehradky a Fallotovou tetralógiou vykazovali najfrenkventovanejší výskyt pozorovaných histomorfologických a imunohistochemických odchýlok.



Obr. 1 Histomorfologické odchýlky v štruktúre týmusu detí s vrodenými chybami srdca. **A** Variabilita vo veľkosti a štruktúre Hassallových teliesok, **B**. prítomnosť penových makrofágov v kôre, s expresiou cytokeratínov AE1/AE3 v subkapsulárnej oblasti.

Diskusia

Typické členenie histologickej štruktúry týmusu zahŕňa periférne uloženú kôru s denzným obsahom proliferujúcich a diferencujúcich tymocytov a centrálnu lokalizovanú dreň, bohatú na lamelárne Hassallove telieska. Primárnou funkciou týmusu je produkcia imunokompetentných T lymfocytov zodpovedných za mechanizmy adaptívnej imunity, imunologického dozoru a imunologickej tolerancie. S progredujúcim vekom však týmus mení svoje zloženie. Dochádza k redukcii funkčnej cytotetrikulárnej strômy – fyziologickej involúcií. Tá je kontinuálne nahrádzaná väzivovým a tukovým tkanivom, s následným poklesom generácie imunokompetentných T lymfocytov (9,10). Napriek značnej involúcií sú reziduálne ostrovčeky aktívneho tkaniva týmusu po adekvátnej stimulácii schopné iniciovať tvorbu T lymfocytov do vysokého veku (11). Okrem nezastupiteľnej imunitnej funkcie je týmus spoľahlivým indikátorom stresu heterogénneho pôvodu, na ktorý reaguje akútnou resp. chronickou patologickou involúciou tkaniva (12,13).

Zníženie bunkovej hustoty kôry, vymiznutie kortikomedulárneho rozhrania s predominciou lymfocytov v dreni, spoločne s výskytom penových makrofágov a dilatáciou väzivových priehradiek ako aj s redukcii počtu a nárastom veľkosti Hassallových teliesok drene sú klasické prejavy involučných zmien týmusu (14). Napriek tomu, že popísané štrukturálne prejavy sú spojené s pribúdajúcim vekom, výrazne kopírujú histomorfologické a imunohistochemické pozorovania v nami hodnotených vzorkách od pacientov do jedného roku života. Predpokladáme, že sa nejedná o znaky fyziologickej involúcie, ale prejavy patologickej stresom-podmienennej prestavby tkaniva. Práce iných autorov (15,16) pripisujú tieto zmeny strate kortikálnych tymocytov, vzostupu de-novo angiogenézy a rozšíreniu perivaskulárnych priestorov v dôsledku hypoxie, ktorá priamo znižuje schopnosť bunkového rastu a prežívania. Naše výsledky môžu podporiť hypotézu, že nedostatočná saturácia tkaniva kyslíkom môže spúšťať skorý nástup involučných zmien týmusu u detí s VCHS. Morfologické odchýlky sme pozorovali najmä u diagnóz s pretrvávajúcou hypoxiou – Fallotova tetralógia, transpozícia veľkých ciev a defekt komorovej priehradky. Zvýšená imunopozitivita pre dezmin u hypoxických diagnóz môže svedčiť o narastajúcom počte pericytov – buniek aktívnych pri de novo angiogenéze (17). Táto asociácia môže byť podmienená pretrvávajúcimi nevhodnými hypoxickými podmienkami, kedy v týmuse pravdepodobne dochádza k už spomínanej kompenzačnej remodelácii tkaniva v snahe zvýšiť prísun kyslíka. Hypoxiu ako jeden z primárnych stimulov histopatologickej transformácie Hassallových teliesok označujú aj Ceyran et al. (18).

Navyše, naše výsledky vykazovali komplexné progresívne histopatologické zmeny s pribúdajúcim vekom, resp. s pretrvávajúcou dobou pôsobenia stresového faktoru, v tomto prípade pravdepodobne hypoxie, prípadne fluktuujúcej hladiny adrenokortikoidných stresových hormónov (19). Senzitívna reakcia týmusu na kolísavé hodnoty glukokortikoidov môže rovnako vyústiť do apoptózy kôrových lymfocytov s následnou redukciou kôry a hypertrofiou Hassalových teliesok (20). Savino a Dardenne (21) a Loginova et al. (16) uvádzajú zvýšenú asociáciu hodnotených histomorfologických odchýlok s negatívnym funkčným poškodením týmusu s dopadom na diferenciačný proces T lymfocytov u detí s VCHS. Heterogénny stres u detských pacientov s vrodenými chybami srdca môže negatívne regulovať nielen histomorfologickú štruktúru týmusu, ale perzistujúce stresom- podmienené involučné zmeny by mohli stimulovať včasné starnutie imunitného systému (22,23).

Literatúra

1. **Fletcher CD.** Diagnostic histopathology of tumors, fourth ed. Elsevier Saunders. 2013.
2. **Parnell AS, Correa A.** Analyses of trends in prevalence of congenital heart defects and folic acid supplementation. *J Thorac Dis* 2017; 9 (3): 495-500.
3. **Varga I, Pospisilova V, Gmitterova K, Galfiova P, Polak S, Galbavy S.** The phylogenesis and ontogenesis of the human pharyngeal region focused on the thymus, parathyroid, and thyroid glands. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29 (6):837-45. Review.
4. **Berkley AM, Hendricks DW, Simmons KB, Fink PJ.** Recent thymic emigrants and mature naive T cells exhibit differential DNA methylation at key cytokine loci. *J. Immunol.* 2013; 190 (12):6180-6.
5. **Roosen J, Oosterlinck W, Meyns B.** Routine thymectomy in congenital cardiac surgery changes adaptive immunity without clinical relevance. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2015; 20 (1):101-6.
6. **Plein A, Fantin A, Ruhrberg C.** Neural crest cells in cardiovascular development. *Curr Top Dev Biol* 2015; 111:183-200.
7. **Adams A, Mankad K, Offiah C, Childs L.** Branchial cleft anomalies: a pictorial review of embryological development and spectrum of imaging findings. *Insights Imaging.* 2016; 7 (1):69-76.
8. **Semenza GL.** Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem. Pharmacol* 2000; 59: 47-53.
9. **Raica M, Encică S, Motoc A, Cîmpean AM, Scridon T, Bârsan M.** Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Hassall corpuscles in normal human thymus. *Ann Anat* 2006; 188 (4):345-52.
10. **Jablonska-Mestanova V, Sisovsky V, Danisovic L, Polak S, Varga I.** Immunohistochemical study: The normal human newborns thymus. *Bratisl Lek Listy* 2013; 114 (7):402-8.
11. **Gui J, Mustachio LM, Su DM, Craig RW.** Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. *Aging Dis* 2012; 3 (3):280-90.
12. **Poliani P, Vermi W, Facchetti F.** Thymus microenvironment in human primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; 9 (6):489-95.
13. **Varga I, Pospisilova V, Jablonska V, Sisovsky V, Galfiova P, Polak S, Adamkov M.** Thymic Hassall's bodies of children with congenital heart defects. *Bratisl Lek Listy* 2010; 111 (10):552-7.
14. **Mikušová R, Mešťanová V, Polák Š, Varga I.** What do we know about the structure of human thymic Hassall's corpuscles? A histochemical, immunohistochemical, and electron microscopy study. *Ann Anat* 2017, 211:140-148.

15. **Hale LP, Braun RD, Gwinn WM, Greer PK, Dewhirst MW.** Hypoxia in the thymus: role of oxygen tension in thymocyte survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282 (4):H1467-77.
16. **Loginova NP, Chertvetnykh VA, Khromtsova GA.** Morphological and immunohistochemical features of the thymus structure in neonatal infants with congenital heart diseases. *Arkh Patol* 2013; 75 (4):9-14.
17. **Daneman R, Keller A.** Pericytes in vascular development and function. In: Schmidt, M. H. H. et al. *Endothelial signaling in development and disease.* Springer Science+Business Media New York; ISBN 987-1-4939-2906-1, 2015.
18. **Ceyran AB, Şenol S, Güzelmeriç F, Tunçer E, Tongut A, Özbek B, Şavluk Ö, Aydın A, Ceyran H.** Effects of hypoxia and its relationship with apoptosis, stem cells, and angiogenesis on the thymus of children with congenital heart defects: a morphological and immunohistochemical study. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8 (7):8038-47.
19. **Dixit VD.** Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. *Curr Opin Immunol* 2010; 22 (4):521-8.
20. **Gomez-Sanchez CE.** Glucocorticoid Production and Regulation in Thymus: Of Mice and Birds. *Endocrinology* 2009; 150 (9):3977-9.
21. **Savino W, Dardenne M.** Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cel-mediated immune responses. *Proc Nutr Soc* 2010; 69 (4):636-43.
22. **Elder RW, George RP, McCabe NM, Rodriguez FHIII, Book WM, Mahle WT, Kirk AD.** Immunologic aging in adults with congenital heart disease. Does infant sternotomy matter? *Pediatr Cardiol* 2015; 6 (7):1411-6.
23. **Zlamy M, Almanzar G, Parson W, Schmidt C, Leierer J, Weinberger B, Jeller V, Unsinn K, Eyrich M, Würzner R, Prelog M.** Efforts of the human immune system to maintain the peripheral CD8+ T cell compartment after childhood thymectomy. *Immun Ageing* 2016; 13:3.

MORFOLOGICKÁ A FUNKČNÁ ANALÝZA ISCHEMICKO-REPERFÚZNEHO POŠKODENIA TENKÉHO ČREVA A VZDIALENÝCH ORGÁNOV POTKANA

(Morphological and functional analysis of small intestine and remote organs after ischemia-reperfusion injury in rat)

Martin Urda¹, Theodoros Kalpakidis¹, Martin Pribula¹, Matúš Kušnier¹, Štefan Tóth¹, Milan Mareta², Eva Mechírová¹

¹Ústav histológie a embryológie, UPJŠ LF, Šrobárova 2, 040 01 Košice
m4rtin.urda@gmail.com

²Neurologická klinika, UPJŠ LF a UNLP, Trieda SNP 1, 040 11 Košice

Súhrn

Ischemicko-reperfúzne poškodenie (IRP) tenkého čreva patrí medzi závažné poruchy cirkulácie. V klinických podmienkach sa prezentuje IRP tenkého čreva ako nosologická jednotka asociovaná s vysokou morbiditou a mortalitou vyššou než 50 %. Najčastejšie sú takýto pacienti hospitalizovaní na traumatologických a chirurgických jednotkách intenzívnej starostlivosti alebo anesteziologických oddeleniach. IRP indukuje priame poškodenie čreva a nepriame poškodenie vzdialených orgánov, ktoré vzniká narušením črevnej bariéry s následnou translokáciou baktérií a produkciou zápalových substancií, ktoré sa uvoľňujú do lymfo-hematogénnej cirkulácie. V najzávažnejších prípadoch dochádza k rozvoju syndrómu multiorgánovej dysfunkcie (MODS).

Kľúčové slová

ischemicko-reperfúzne poškodenie, potkan, tenké črevo, vzdialené orgány

Summary

Ischemia-reperfusion injury (IRI) of small intestine is a complex belonging to severe failures of circulation. Small intestine IRI in clinical conditions presents itself as nosologic unit associated with high morbidity and mortality higher than 50 %. These patients are most commonly hospitalised in traumatological or surgical intensive care units or anesthesiological wards. IRI induces direct damage to intestines and indirect damage to remote organs, which is a result of intestinal barrier impairment following translocation of bacteria and production of pro-inflammatory substances that are released to lympho-haematogenous circulation. In the most severe cases, there is an onset of a multiorgan dysfunction syndrome (MODS).

Keywords

ischemia-reperfusion injury, rat, small intestine, distal organs

Ischemicko-reperfúzne poškodenie tenkého čreva

Tenké črevo patrí medzi jeden z najcitlivejších orgánov na ischémii, pričom už samotná ischémia je pre stenu čreva nebezpečná, no v komplexe IRP závisí rozsah jeho poškodenia aj od následnej reperfúzie, ktorá poškodenie prehľbuje (1). IRP predstavuje vážny problém pri rekonštrukciách aneuryziem abdominálnej aorty, transplantáciach tenkého čreva, kardiopulmonálnom bypasse, strangulovaných herniách a patrí aj medzi jeden z etiologických podkladov pri poškodení transplantovaného čreva a nekrotizujúcej enterokolitídy u predčasne narodených detí (2,3). Fyziologická ischémia s reperfúziou je pozorovaná u jedincov, ktorý vykonávajú submaximálnu alebo maximálnu fyzickú záťaž (napr. pri športe) v dôsledku sympatikovej aktivácie a redistribúcie krvi do životne dôležitých orgánov (4). Patologické IRP tenkého čreva vyvoláva arteriálna oklúzia spôsobená trombózou, embóliou, tlakom na cievy (tumor, volvulus, strangulovaná hernia) a v experimentálnych podmienkach aj ich ligatúrou. Poznáme aj neokluzívne procesy spúšťajúce ischémii, akými sú napríklad kardiálna insuficiencia, sepsa, šok a aplikácia liečiv (alfa-1-agonisty, digitalisové glykozidy a i.). Najviac postihnuté sú hlavné nepárové viscerálne tepny odstupujúce z aorty – *truncus coeliacus*, *a. mesenterica superior* a *a. mesenterica inferior* (5,6).

Ischémia zastavuje aeróbnym metabolizmus v bunkách, čím stopne syntézu ATP. Zvyšná glukóza sa anaeróbnou glykolýzou mení na laktát. Postupom času v bunke dochádza k deplécii energetických zásob, narušeniu iónovej homeostázy, acidóze a hromadeniu toxických metabolitov, ktoré priamo alebo aktiváciou mediátorov poškadzujú bunku (7). Podľa Vollmarovej a Mengera (8) dochádza k deštrukcii čreva v priebehu reperfúzie hlavne kvôli zmenám v mikrocirkulácii. Prvou zmenou je tzv. kapilárny „no-reflow“ fenomén, kedy v dôsledku kapilárnej obturácie leukocytmi, opuchom cievneho endotelu a kontrakciou perivaskulárnych pericytov v priebehu ischémie sa ani po reperfúzii nedostáva krv do postihnutej časti. Druhou zmenou je tzv. „kyslíkový paradox“ kedy prívod kyslíka stimuluje tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a dusíka (RNS) a indukuje sterilnú zápalovú reakciu. Zdá sa, že hlavnú úlohu v reperfúznom procese zohráva aktivácia nukleárneho faktora kappa B (NF- κ B), ktorý spúšťa koordinovanú expresiu prozápalových cytokínov (IL-1, IL-6, TNF- α), enzýmov (napr. cyklooxygenázy 2) a adhezívnych molekúl (ICAM-1, CD11b/CD18 a i.) (9,10). Po narušení protektívnej hlienovej a epitelovej vrstvy, zmene fenotypu črevných baktérií na viac agresívny, ich translokácii a produkcii toxínov sa spúšťa systémová zápalová odpoveď (SIRS). Tá je potencovaná uvoľnením zápalových mediátorov z rekrutovaných zápalových buniek, ktoré vo vzdialených orgánoch vyvolávajú zápal (11). Vyprodukované cytokíny, ROS, endotoxín a ďalšie zápalové molekuly sa do vzdialených orgánov transportujú nielen hematogénnou cestou, ale aj lymfogénne. Zápalovo „zmenená“ lymfa zvyšuje zápalovú aktivitu v pľúcach a mozgu, znižuje kardiálnu kontraktilitu a má zrejme veľký význam v aktivácii MODS po IRP (12,13). He *a kol.* (14) popisujú, že pri experimentálnom zavedení drenáže lymfatického odtoku pred IRP tenkého čreva bola u myši pozorovaná znížená aktivita meraných zápalových markerov v plazme po IRP.

Histopatologické zmeny v stene tenkého čreva

Morfologické zmeny tenkého čreva sú pozorovateľné už po 15 minútach ischémie a postupujú od apikálnej časti črevných klkov smerom bazálne k črevným kryptám. V apikálnej časti klkov dochádza ku kontrakcii bazálnej membrány aktiváciou myofibroblastov a z kontrahovanej časti bazálnej membrány sa oddelia enterocyty. Medzi enterocytmi a obnaženou bazálnou membránou vznikajú tzv. *Grünhagenove* priestory. Po 30 minútach ischémie po celom obvode klkov pozorujeme prvotné známky nekrózy enterocytov. Zároveň na obnaženú časť bazálnej membrány migrujú enterocyty z oblasti krýpt a bazálnej časti klkov. Pri trvaní ischémie nad 45 minút sa samotný klk zmenšuje, rozširuje a „sťahuje“ ranu po poškodení, čím zrejme bráni prieniku patogénov do hlbších vrstiev (5,15). Krátko po

reperfúzií je možné sledovať zápalový infiltrát, edém a kongesciu tkaniva sliznice. Po asi 3 hodinách vidieť známky prvotnej regenerácie a po 24 a viac hodinách reperfúzie nastáva kompletná regenerácia, ústup edému a zníženie stupňa kongescie, zatiaľ čo mierny zápalový infiltrát naďalej pretrváva. Tieto regeneračné zmeny postupujú od črevných krýpt k apikálnym častiam klkov (16,17). Podľa zistení Pontella *a kol.* (18) je po IRP postihnutá aj longitudinálna podvrstva vonkajšej svaloviny. V hladkých svalových bunkách dochádza k intracelulárnej vakuolizácii sarkoplazmy a objaveniu sa opticky prázdnych intercelulárnych priestorov medzi jednotlivými bunkami. Tieto zmeny sú zjavné aj po troch dňoch a postupne sa reparujú. Zmeny cirkulárnej vrstvy pozorované neboli. Od 2. týždňa po IRP je pozorovaná výrazná infiltrácia aktivovanými mastocytmi predovšetkým vo vrstve serózy a svaloviny, s vysokou koncentráciou predovšetkým v okolí ganglií *plexus myentericus Auerbachi*. Bola zaznamenaná aj pomalá a postupná infiltrácia eozinofilmi po IRP, ktorá postihuje celú hrúbku steny čreva (19). *In vivo* sa krátko po IRP funkčne predlžuje čas pasáže črevného obsahu. To sa vysvetľuje znížením produkcie NO črevnou sliznicou a postupnou degeneráciou až stratou intersticiálnych Cajalových buniek (ICC). V oblastiach enterického neurálneho systému dochádza v tejto fáze ku kompenzačným zmenám: zvyšuje sa výskyt neurónov pozitívnych na vazoaktívny intestinálny polypeptid (VIP) a NO-syntázu (NOS). V priebehu jedného až desiatich týždňov po reperfúzií sa však v oblasti *plexus submucosus Meissneri* a *plexus myentericus Auerbachi* pozoruje postupná degenerácia až nekróza neurónov (18,19).

Ovplyvnenie a zmeny vo vzdialených orgánoch

Prvým orgánom, do ktorého cez *v. portae* smeruje krv z čreva je **pečeň**. V priebehu ischémie sa prietok cez pečeň znižuje na 70-75 % normy, pričom v portálnej cirkulácii stúpa v tejto fáze koncentrácia laktátu, sukcinátu a anorganického fosfátu (P_i). Po reperfúzií dochádza v pečenovom parenchýme ku dezorganizácii pečenových trámcov, dilatácii a kongescii sínusoidných kapilár, v ktorých sa vyskytuje bunkový detritus (20,21). Disseho priestory sú opuchnuté a hromadia sa v nich trombocyty, lymfocyty a albumín. V intermediárnej zóne pečenových lalôčikov sa akumulujú neutrofilny a v centrolobulárnej zóne je detekované zlyhanie oxidatívneho metabolizmu, deplécia ATP so znížením proteosyntézy, glukoneogenézy, sekrécie žlčových kyselín a detoxifikačných procesov. Elevované AST, ALT a ALP v sére po IRP naznačujú rôznu stupeň dystrofického poškodenia hepatocytov (20,22,23). Zápalové bunky, ROS a rôzne kardiotoxické substancie smerujú z pečene v druhom slede do srdca a spôsobujú jeho postihnutie. Dochádza ku poškodeniu beta-oxidácie mastných kyselín v kardiomyocytoch, čo sa prejavuje zníženou kontraktilitou a relaxačnou dysfunkciou. To vedie ku poklesu pulzovej frekvencie a vývrhového objemu srdca s následným poklesom stredného arteriálneho tlaku. To všetko ešte ďalej potencuje a prehĺbuje zhoršenie perfúzie tenkého čreva, ale aj iných orgánov (1,24). Po reperfúzií tenkého čreva je typickým nálezom kongescia kapilár s miernym zápalovým infiltrátom medzi kardiomyocyty. Pozorovaná bola aj nepravidelnosť usporiadania a zvlnenie kardiomyocytov s vakuolizáciou a zvýšením eozinofilie sarkoplazmy. Okrem toho sú v nich disperzne pozorovateľné aj tzv. kontrakčné pásy značiace zónu nekrózy (25).

Poškodenie pľúc je najnebezpečnejšou, najsmrteľnejšou a najrýchlejšie sa rozvíjajúcou komplikáciou pri IRP tenkého čreva. Toto poškodenie je spôsobené masívnou transmurálnou migráciou aktivovaných neutrofilov do interstícia, ktoré poškodzujú cievny endotel a zvyšujú mikrovaskulárnu permeabilitu s následným rozvojom kongescie a intersticiálneho edému pľúc. Okrem toho dochádza k rozvoju syndrómu akútnej dychovej tiesne (ARDS), kedy v dôsledku poškodenia alveolo-kapilárnej membrány zápalom nastáva tzv. kapilárny leak proteínov plazmy do alveol. Tie na povrchu pneumocytov a pľúcneho surfaktantu koagulujú a vytvárajú tzv. hyalínove membrány. To sa prejavuje respiračnou insuficienciou, hypotenziou a cyanózou. Samotný ARDS potencuje a urýchľuje MODS, ktorý sa rozvíja po

ischemicko-reperfúznom inzulte čreva (1,26,27). Arruda *a kol.* (28) pozorovali po IRP tenkého čreva hyperreaktivitu bronchiálneho hladkého svalstva potkanov po stimulácii metacholínom, čo naznačuje, že mezenterálne IRP vyvoláva respiračnú dysfunkciu nielen morfológickými, ale aj funkčnými zmenami.

V dôsledku zvýšenej vaskulárnej permeability v oblasti pľúc a tenkého čreva a **poškodenia srdca** po IRP sa rozvíja systémová hypovolémia s hypotenziou, ktorá u potkanov indukuje prerenálne akútne zlyhanie obličiek (AKI). To sa prejavuje postupným znižovaním glomerulárnej filtrácie s následnou oligúriou, metabolickou acidózou a eleváciou hodnôt sérového kreatinínu. Tesne po reperfúzii dochádza u potkanov ku akútnej tubulárnej dysfunkcii, kedy sa zvyšuje funkčná exkrécia nátria do moču až o 25 % viac oproti kontrolným skupinám. V takto postihnutých obličkách sa zvyšuje aj aktivita sympatikovej eferentnej renálnej inervácie, ktorá zvyšuje vaskulárnu rezistenciu (29,30). Varga *a kol.* (31) uvádzajú, že 4 hodiny po reperfúzii sú v parenchýme obličiek potkanov pozorovateľné morfológické zmeny, pričom bol pozorovaný výrazný edém kôry obličiek a deformácia glomerulov. Prítomný je aj opuch epitelových buniek tubulov so stratou kefkovitého lemu a taktiež výrazná vakuolizácia cytoplazmy epitelu proximálneho a distálneho tubulu. Okrem toho dochádza ku kondenzácii jadrového chromatinu a v jednej až dvoch tretinách celého tubulárneho profilu aj ku kompletnej karyorexii bunkových jadier (31,32).

IRP tenkého čreva je nebezpečné aj pre **mozog**. Aj keď Hall *a kol.* (33) prvotne preukázali, že po IRP nedochádza ku žiadnym morfológickým a biochemickým zmenám v tkanive CNS potkanov, ďalšie štúdie už určité zmeny popisujú. Tieto rozdielne pozorovania zrejme vychádzajú z rôznej doby trvania experimentálnej ischémie a následnej doby reperfúzie pred odobratím a zhodnotením tkanív. Po IRP tenkého čreva trpí mozog primárne v dôsledku zvýšenej zápalovej aktivity a v menšej miere aj kvôli systémovej hypoperfúzii. Cirkulujúce ROS a prozápalové cytokíny poškodzujú štruktúru hematoencefalickej bariéry a zvyšujú jej priechodnosť. Dochádza ku vazogénnemu edému, perivaskulárnej akumulácii sérových proteínov a aktivácii perivaskulárnych makrofágov, ktoré vzápätí aktivujú populáciu neurogliových buniek (mikroglia aj astrocyty). Aktivované mikrogliové bunky sa zväčšujú, menia svoj pôvodný tvar na nepravidelný až ameboidný, stávajú sa IBA1-pozitívne a začínajú produkovať ROS a prozápalové cytokíny. Táto „reaktívna glióza“ je známkou akútneho reaktívneho zápalového procesu nervového tkaniva (34,35). Zmeny nervového tkaniva mozgu sú viditeľné už 6 hodín po reperfúzii čreva, kedy sú pozorované zmeny neurónov v rôznych oblastiach kôry mozgovej a vo veľkej miere aj v hippokampálnom CA1 regióne. Zasiiahnuté neuróny sú scvrknuté a farbja sa výrazne intenzívne. To je predzvesť začínajúceho procesu apoptózy. U potkanov bol pred a po IRP tenkého čreva vykonaný štandardizovaný *Morris water maze test* (MWM). Po IRP boli preukázané zmeny v MWM, predovšetkým v zmysle poklesu priestorovej orientácie, pamäte a učenia. To naznačuje, že po inzulte nedochádza len ku morfológickým, ale aj výkonnostným a kognitívnym zmenám v mozgu potkanov (36).

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore projektu VEGA 1/0386/17.

Literatúra

1. **Pierro A, Eaton S.** Intestinal ischemia reperfusion injury and multisystem organ failure. *Semin Pediatr Surg* 2004; 13(1): 1-17.
2. **Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM.** Ischemia—reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Digest Dis Sci* 2004; 49(9): 1359-1377.
3. **Young CM, Kingma SD, Neu J.** Ischemia-reperfusion and neonatal intestinal injury. *J Pediatr* 2011; 158(2): 25-28.

4. **van Wijck K, Lenaerts K, Grootjans J, Wijnands KA, Poeze M, Van Loon LJ, Buurman WA.** Physiology and pathophysiology of splanchnic hypoperfusion and intestinal injury during exercise: strategies for evaluation and prevention. *Am J Physiol-Gastr L* 2012; 303(2): 155-168.
5. **Grootjans J, Lenaerts K, Buurman WA, Dejong CH, Derikx JP.** Life and death at the mucosal-luminal interface: New perspectives on human intestinal ischemia-reperfusion. *World J Gastroentero* 2016; 22(9): 2760-2770.
6. **Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB.** Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 2005; 20(4): 336-343.
7. **Eltzschig HK, Eckle T.** Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med* 2011; 17(11): 1391-1401.
8. **Vollmar B, Menger MD.** Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbeck Arch Surg* 2011; 396(1): 13-29.
9. **Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ.** Ischemia/reperfusion. *Compr Physiol* 2012; 7(1): 113-170.
10. **Souza DG, Vieira AT, Pinho V, Sousa LP, Andrade AA, Bonjardim CA, Teixeira MM.** NF- κ B plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *Brit J Pharmacol* 2005; 145(2): 246-254.
11. **Stallion A, Kou TD, Latifi SQ, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, Levine AD.** Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *J Pediatr Surg* 2005; 40(3): 470-477.
12. **Mittal R, Coopersmith CM.** Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends Mol Med* 2014; 20(4): 214-223.
13. **Zhao ZG, Yang LN, Zhao YQ, Niu CY.** Mesenteric lymph reperfusion after superior mesenteric artery occlusion shock exacerbates endotoxin translocation in brain. *Acta Cir Bras* 2014; 29(6): 359-364.
14. **He GZ, Zhou KG, Zhang R, Wang YK, Chen XF.** Impact of intestinal ischemia/reperfusion and lymph drainage on distant organs in rats. *World J Gastroentero* 2012; 18(48): 7271-7278.
15. **Guillaumon AT, Couto MA.** Hystopathological study of the intestinal epithelium submitted to different times of programmed ischemia and twenty four hours reperfusion. *Acta Cir Bras* 2013; 28(4): 288-298.
16. **Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, Billiar TR, Tweardy DJ, Bauer AJ.** Molecular And Functional Contractile Sequelae Of Rat Intestinal Ischemia/reperfusion Injury. *Transplantation* 1999; 68(9): 1244-1254.
17. **Chang JX, Chen S, Ma LP, Jiang LY, Chen JW, Chang RM, Huang ZT.** Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. *World J Gastroentero* 2005; 11(35): 5485-5491.
18. **Pontell L, Sharma P, Rivera LR, Thacker M, Tan YH, Brock JA, Furness JB.** Damaging effects of ischemia/reperfusion on intestinal muscle. *Cell Tissue Res* 2011; 343(2): 411-419.
19. **Sand E, Themner-Persson A, Ekblad E.** Infiltration of mast cells in rat colon is a consequence of ischemia/reperfusion. *Digest Dis Sci* 2008; 53(12): 3158-3169.
20. **Horie Y, Ishii H.** Liver dysfunction elicited by gut ischemia-reperfusion. *Pathophysiology* 2001; 8(1): 11-20.
21. **Inan M, Uz YH, Kizilay G, Topcu-Tarladacalisir Y, Sapmaz-Metin M, Akpolat M, Aydogdu N.** Protective effect of sildenafil on liver injury induced by intestinal ischemia/reperfusion. *J Pediatr Surg* 2013; 48(8): 1707-1715.

22. **Hartmann R, Licks F, Schemitt EG, Colares JR, da Silva J, Moura RM, Marroni NP.** Effect of glutamine on liver injuries induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Nutr Hosp* 2017; 34(3): 548-554.
23. **Goulimaris I, Kanellos D, Kazantzidou D, Kaldrimidou E, Papageorgiou G, Tsali E, Betsis D.** Glutamine and Liver Dysfunction Elicited by Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Open Surg J* 2008; 2: 10-14.
24. **Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB, Padovani CR.** Systemic evaluation on ischemia and reperfusion injury of splanchnic organs in rats. *Acta Cir Bras* 2009; 24(4): 290-295.
25. **Montero MF, Saurim R, Bonservizi WGS, Koike MK, Taha MO.** Heart injury following intestinal ischemia reperfusion in rats is attenuated by association of ischemic preconditioning and adenosine. *Acta Cir Bras* 2014; 29: 67-71.
26. **Mura M, Andrade CF, Han B, Seth R, Zhang Y, Bai XH, Liu M.** Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs. *Shock* 2007; 28(2): 227-238.
27. **Marqui CE, Silva HCA, Ferez D, Cavassani SS, Moraes JB, Silva DAMD, Oliveira-Júnior IS.** Pretreatment with pentoxifylline attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Acta Cir Bras* 2011; 26(6): 438-444.
28. **Arruda MJCD, Poggetti RS, Fontes B, Younes RN, Souza Jr. AL, Birolini D.** Intestinal ischemia/reperfusion induces bronchial hyperreactivity and increases serum TNF-alpha in rats. *Clinics* 2006; 61(1): 21-28.
29. **Skott M, Nørregaard R, Birke-Sørensen H, Palmfeldt J, Kwon TH, Jonassen T, Nielsen S.** Development of intestinal ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in rats with or without chronic kidney disease: Cytokine/chemokine response and effect of α -melanocyte-stimulating hormone. *Kidney Res Clin Pract* 2014; 33(2): 79-88.
30. **Lai IR, Ma MC, Chen CF, Chang KJ.** The effect of an intestinal ischemia-reperfusion injury on renal nerve activity among rats. *Shock* 2003; 19(5): 480-485.
31. **Varga J, Tóth Š, Staško P, Tóth Š Jr, Bilecová-Rabajdová M, Ostró A, Veselá J.** Intestinal ischemia-reperfusion injury-the histopathological status of remote vital organs in acute and subacute phases. *Ann Trans* 2005; 17(1): 11-20.
32. **Sagiroglu T, Sezer A, Altaner S, Umit H, Yalta T, Yagci MA.** The Effects of Sirolimus on Target Organs During Mesenteric Ischemia and Reperfusion Damage in an Experimental Rat Model. *Curr Ther Res* 2011; 72(2): 79-93.
33. **Hall NJ, Smith VV, Harding B, Pierro A, Eaton S.** Intestinal ischemia-reperfusion injury does not lead to acute central nervous system damage. *J Surg Res* 2005; 129(2): 288-291.
34. **Hsieh YH, McCartney K, Moore TA, Thundyil J, Gelderblom M, Manzanero S, Arumugam TV.** Intestinal ischemia-reperfusion injury leads to inflammatory changes in the brain. *Shock* 2011; 36(4): 424-430.
35. **Hamasaki MY, Machado MCC, Pinheiro da Silva F.** Animal models of neuroinflammation secondary to acute insults originated outside the brain. *J Neurosci Res* 2018; 96(3): 371-378.
36. **Zhou J, Huang WQ, Li C, Wu GY, Li YS, Wen SH, Liu KX.** Intestinal ischemia/reperfusion enhances microglial activation and induces cerebral injury and memory dysfunction in rats. *Crit Care Med* 2012; 40(8): 2438-2448.

POVRCHOVÝ A HĹBKOVÝ UČEBNÝ ŠTÝL VO VZŤAHU K AKADEMICKÉJ ÚSPEŠNOSTI V ANATÓMII

(Superficial and deep learning styles in relation to academic success
in anatomy)

Desanka Výbohová¹, Adriana Boleková², Gabriela Hešková¹, Yvetta Mellová¹

¹ Ústav anatómie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin,
vybohova@jfmed.uniba.sk

² Ústav anatómie, Lekárska fakulta UPJŠ, Šrobárova 2, 041 80 Košice

Súhrn

V našej práci sme sa zamerali na zisťovanie povrchového a hĺbkového učebného štýlu vo vzťahu k akademickú úspešnosť v anatómii. Výskumný súbor tvorilo 98 študentov 2. ročníka všeobecného lekárstva, ktorým sme administrovali dotazník na zisťovanie povrchového a hĺbkového prístupu k učeniu. Výsledky štúdie nepotvrdili významné rozdiely v akademickú úspešnosť mužov a žien. Deväťdesiatšesť z 98 študentov malo vyššie skóre povrchového učebného štýlu ako hĺbkového. Štatistická analýza ukázala významnú pozitívnu koreláciu medzi hodnotami skóre pre povrchový učebný štýl a akademickou úspešnosťou v anatómii. Pri porovnaní skóre povrchového a hĺbkového učebného štýlu medzi mužmi a ženami sme zistili významnú korelačnú mieru rozdielu medzi mužmi a ženami iba v skóre hĺbkového učebného štýlu.

Kľúčové slová

anatómia, akademická úspešnosť, učebné štýly, povrchový a hĺbkový učebný štýl

Summary

This study focuses at the the surface and deep learning style in relation to the academic success in anatomy. Inventory for the identification of the superficial and deep learning style was administrated to 98 students of the general medicine - second class. Results revealed no significant gender differences in anatomy academic success. Ninety six of 98 students had higher scores of superficial learning than the scores of the deep learning. Statistical analysis showed significant positive correlation between the scores of superficial learning style and academic success in anatomy. Comparison of the superficial and deep learning style scores between males and females confirmed significant difference only in deep learning style scores.

Keywords

anatomy, academic success, learning styles, superficial and deep learning

Úvod

Tematika procesu učenia je v súčasnej dobe stále aktuálnejšia. Vyplýva to najmä z potreby osvojovať si stále väčšie množstvo nových informácií čo najefektívnejším spôsobom. Proces

učenia má svoju kognitívnu, konatívnu a sociálnu stránku. Kognícia je proces poznávania zahŕňajúci vnímanie, zapamätávanie, usudzovanie, myslenie a reč. V procese učenia je však veľmi dôležitá aj konatívna stránka učenia - motivácia a samozrejme sociálna stránka - kto alebo s kým sa učíme (1). Učebný štýl charakterizujú postupy resp. spôsoby učenia, ktoré jedinec v danom období pri učení uprednostňuje (1,2). Pojem učebný štýl je často zamieňaný s pojmom kognitívny štýl. Tak ako je kognícia iba jednou stránkou učenia je kognitívny štýl iba súčasťou učebného štýlu. Je to spôsob akým prijímame a spracúvame informácie, je vrodený a v priebehu života sa iba ťažko mení. Naopak učebný štýl sa v priebehu života môže meniť, vyvíja sa a môže sa zdokonaľovať (1). V súčasnosti existuje niekoľko teórií určujúcich rôzne typy učebných štýlov. Fleming (1,3) napríklad klasifikuje učebné štýly podľa zmyslových preferencií a vyčleňuje vizuálny, akustický, verbálny a kinestetický štýl (VARK – visual, aural, read/write, kinesthetic). Gardnerova klasifikácia charakterizuje učebné štýly na základe prevažujúcich druhov inteligencie na linguistický, logicko-matematický, priestorový, kinestetický, muzikálny, interpersonálny, intrapersonálny a prírodný (1,2). Podľa Kolbovej teórie ľudského učenia sa učebné štýly líšia podľa toho akým spôsobom ľudia vnímajú realitu (konkrétne alebo abstraktne) a akým spôsobom spracúvajú informácie (aktívne alebo reflektívne) (1,2). Marton a Säljö (4) charakterizovali učebné štýly z kvalitatívneho hľadiska na povrchový (surface learning) a hĺbkový (deep learning) učebný štýl. Povrchový učebný štýl preferuje najmä pamäťové učenie, memorovanie a kvantitatívne rozširovanie poznatkov. Hĺbkový štýl je založený na snahe pochopiť a porozumieť študované javy a veci, nachádzať v nich súvislosti a logiku, vytvárať vlastné závery a stanoviská (1,2). Študenti si svoj učebný väčšinou neuvedomujú a ani neanalyzujú. Používaný učebný štýl môže ovplyvňovať akademickú úspešnosť v pozitívnom, ale aj v negatívnom zmysle podľa typu informácií resp. učiva, ktorému sa študent práve venuje. V súčasnosti sú dostupné diagnostické testy na základe ktorých je možné určiť preferenciu učebných štýlov jednotlivca v danom období. Učebné štýly je možné meniť, najlepšie s pomocou učiteľa alebo spolužiaka, ale môže ich meniť aj sám študent (1).

V našej práci sme sa zamerali na zisťovanie povrchového a hĺbkového učebného štýlu vo vzťahu k akademickej úspešnosti v anatómii a tiež zistenie rozdielov v štýloch učenia a akademickej úspešnosti v predmete anatómia medzi študentami a študentkami.

Materiál a metódy

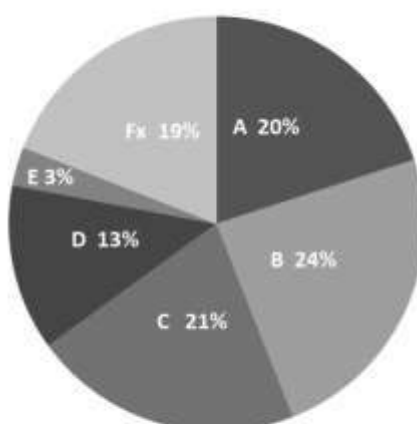
Výskumu sa zúčastnilo 100 participantov, študentov 2. ročníka všeobecného lekárstva, vo veku od 19 do 28 rokov, priemerný vek bol 20,65 rokov. Dvaja respondenti nevyplnili dotazník podľa požadovaných kritérií a museli byť zo súboru vylúčení. Dotazník bol administrovaný po písomnom teste k záverečnej skúške. Na zisťovanie učebného štýlu sme použili Entwistlov dotazník na zisťovanie povrchového a hĺbkového prístupu k učeniu z roku 1996, ktorý upravil a preložil Ivan Turek. Dotazník pozostáva z 20 výrokov, ku ktorým respondent priraduje počet bodov podľa Likertovej škály (1 bod - plne súhlasím, 2 body - súhlasím, robím tak väčšinou, 3 body - neviem, 4 body - nesúhlasím, robím tak málokedy, 5 bodov - plne nesúhlasím) (1). Akademickú úspešnosť sme hodnotili na základe záverečného hodnotenia skúšky z anatómie pozostávajúcej z písomného testu, praktickej skúšky a ústnej skúšky (A – 5 bodov, B - 4 body, C - 3 body, D - 2 body, E - 1 bod, Fx – 0 bodov) v riadnom termíne (nie počas opravných termínov) a aj pomocou skóre v % získaných v písomnom teste k záverečnej skúške z anatómie. Písomný test pozostával zo zatvorených otázok s výberom správnych odpovedí (cca 50% otázok) a z otvorených otázok so stručnou odpoveďou (cca 50%). Štatistická analýza bola vykonaná prostredníctvom štatistického programu PSPP verzia 0.9.0. Boli zisťované deskripcie premenných – priemer a štandardná odchýlka, medián, minimum a maximum, a metódy bivariačnej analýzy – Spearmanov koeficient poradovej korelácie, korelačná miera rozdielu mediánov a korelačný koeficient ETA.

Výsledky

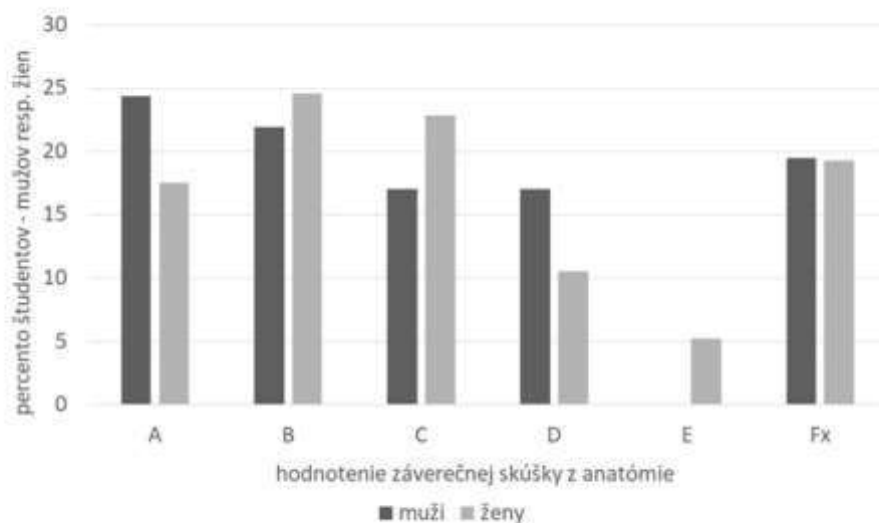
Pri analýze akademickej úspešnosti sme hodnotili percentuálnu úspešnosť pri písomnom teste k záverečnej skúške (viď tabuľka 1) a výsledné hodnotenie zo záverečnej skúšky z anatómií v riadnom termíne (viď obr. 1). Štatistická analýza nepotvrdila signifikantné rozdiely v akademickej úspešnosti mužov a žien, ani v % úspešnosti z písomného testu ($p=0,114$) a ani v hodnotení ústnej skúšky ($p=0,689$).

Percentuálna úspešnosť z písomného testu k záverečnej skúške z anatómie					
	priemer	std	minimum	medián	maximum
spolu(n=98)	86,00	13,60	28	89,5	100
A (n=20)	85,85	3,95	83	96	100
B (n=23)	91,43	4,72	82	92	100
C (n=20)	87,95	8,10	67	87,5	98
D (n=13)	81,92	4,59	69	83	97
E (n=3)	85,00	6,08	78	88	89
Fx (n=19)	69,95	20,02	28	74	95
Muži (n=41)	83,44	17,07	28	88	100
Ženy (n=57)	87,84	10,21	49	91	99

Tab. 1 Percentuálna úspešnosť z písomného testu k záverečnej skúške z anatómie



Obr.1 Hodnotenie záverečnej skúšky z anatómie v riadnom termíne – percentuálne zastúpenie počtu študentov v jednotlivých stupňoch záverečného hodnotenia skúšky z anatómie



Obr. 2 Vzájomné porovnanie percentuálneho zastúpenia žien a mužov v jednotlivých stupňoch záverečného hodnotenia skúšky z anatómie

Z výsledkov bolo zrejmé, že až 96 z 98 študentov malo vyššie skóre povrchového učebného štýlu ako hĺbkového. Priemerný rozdiel v skóre medzi povrchovým a hĺbkovým štýlom bolo celkovo $10,21 \pm 7,12$; u mužov $12,71 \pm 7,87$; u žien bol rozdiel menej výrazný $9,49 \pm 5,60$. Štatistická analýza potvrdila signifikantnú pozitívnu koreláciu medzi skóre pre povrchový učebný štýl a hodnotením zo záverečnej skúšky z anatómie a slabú insignifikantnú mieru korelácie medzi skóre pre povrchový učebný štýl a výsledkom písomného testu (viď tabuľka 2). Skóre pre povrchový učebný štýl korelovalo s hodnotením zo záverečnej skúšky z anatómie a výsledkom písomného testu iba veľmi slabo (viď tabuľka 3).

Hodnoty skóre pre povrchový učebný štýl (muži+ženy)					
	priemer	std	minimum	medián	maximum
Celkovo (n=98)	30,49	4,00	19	30	39
A (n=20)	31,85	3,47	26	32	37
B (n=23)	32,09	4,13	25	32	39
C (n=20)	30,3	3,88	25	30	38
D (n=13)	28,92	4,59	19	28	35
E (n=3)	28,67	3,51	25	29	32
Fx (n=19)	28,68	3,22	20	29	34
Korelácia hodnoty skóre pre povrchový učebný štýl a hodnotenie ústnej skúšky $r_s=0,34$ $p=0,001$					
Korelácia skóre pre povrchový učebný štýl a výsledok písomného testu k záverečnej skúške $r_s=0,14$ $p=0,178$					

Tab. 2 Hodnoty skóre pre povrchový učebný štýl u mužov a žien spolu

Hodnoty skóre pre hĺbkový učebný štýl (muži+ženy)					
	priemer	std	minimum	medián	maximum
Celkovo (n=98)	19,65	4,80	10	19	43
A (n=20)	19,15	6,92	10	18	43
B (n=23)	20,57	4,96	14	20	31
C (n=20)	20,2	3,81	11	20	31
D (n=13)	18,23	3,03	14	17	24
E (n=3)	19,00	3,46	15	21	21
Fx (n=19)	19,58	4,20	14	18	29
Korelácia skóre pre hĺbkový učebný štýl a hodnotenie ústnej skúšky $r_s = -0,05$ $p = 0,605$					
Korelácia skóre pre hĺbkový učebný štýl a výsledok písomného testu k záverečnej skúške $r_s = -0,01$ $p = 0,885$					

Tab. 3 Hodnoty skóre pre hĺbkový učebný štýl u mužov a žien spolu

Pri porovnaní skóre povrchového a hĺbkového učebného štýlu medzi mužmi a ženami (viď tabuľka 4 a tabuľka 5) sme zistili signifikantnú korelačnú mieru rozdielu medzi mužmi a ženami iba v skóre hĺbkového učebného štýlu. Skóre hĺbkového učebného štýlu bolo signifikantne vyššie u žien ako u mužov (viď tabuľka 5). Korelačná miera rozdielu medzi mužmi a ženami v skóre povrchového učebného štýlu bola štatisticky nevýznamná (viď tabuľka 4).

Hodnoty skóre pre povrchový učebný štýl					
muži - študenti					
	priemer	std	minimum	medián	maximum
celkovo	31,44	3,88	24	31	39
A	31,9	3,96	26	33	37
B	33,56	4,13	27	33	39
C	31,71	4,35	26	32	38
D	29,29	3,73	24	28	35
E	-	-		-	
Fx	30,13	2,36	27	30,5	34
ženy - študentky					
	priemer	std	minimum	medián	maximum
celkovo	29,78	4,13	19	30	39
A	32,18	3,22	28	32	37
B	31,14	4	25	31	39
C	29,54	3,55	25	30	35
D	28,5	5,79	19	29	35
E	27	4,4	22	27	32
Fx	27,64	3,44	20	28	32
korelačná miera rozdielu muži vs ženy v skóre povrchového štýlu $r_m = 0,17$ $p 0,083$					

Tab. 4 Hodnoty skóre pre povrchový učebný štýl samostatne u mužov a žien

Hodnoty skóre pre hĺbkový učebný štýl					
muži - študenti					
	priemer	std	minimum	median	maximum
celkovo	18,73	5,77	10	17	43
A	19,6	9,4	10	15,5	43
B	19	5,41	14	17	31
C	19	4,16	11	20	23
D	17,29	2,21	14	17	21
E	-	-	-	-	-
Fx	18,38	4,57	14	16,5	18
ženy - študentky					
	priemer	std	minimum	medián	maximum
celkovo	20,23	3,81	13	19	31
A	18,64	3,35	13	18	26
B	21,4	4,45	14	20	30
C	20,85	3,6	17	20	30
D	19,33	3,67	16	17,5	24
E	19	2,83	15	20	21
Fx	20,45	3,91	16	18	29
korelačná miera rozdielu muži vs ženy v skóre hĺbkového štýlu					
$r_m = 0,24$ $p=0,014$					

Tab. 5 Hodnoty skóre pre hĺbkový učebný štýl samostatne u mužov a žien

Diskusia

Poznanie anatómie ľudského tela je bázou pre štúdium ďalších predmetov teoretických, predklinických a samozrejme aj klinických. Svojim rozsahom a náročnosťou na vizuálnu pamäť patrí anatómia zvyčajne k tým najťažším predmetom počas štúdia medicíny. A práve preto je pri štúdiu anatómie pre študentov nevyhnutné nájsť ten najefektívnejší spôsob učenia, učebný štýl. Ako sme spomenuli v úvode študenti svoj učebný štýl iba zriedka analyzujú. Časť študentov vďaka preferencii vhodného štýlu anatómiu bez problémov zvláda. Nemalá časť študentov však práve pri štúdiu anatómie prichádza na to, že ich štýl učenia nie je práve optimálny pre tento predmet. Aký je vlastne ten optimálny štýl pre štúdium anatómie? Výsledky štúdií sa rôznia a nezriedka prinášajú aj protichodné tvrdenia.

McNulty a Richbourg (5), ktorí rovnako ako my, zisťovali vzťah medzi povrchovým a hĺbkovým prístupom k učeniu a úspešnosťou v prípravnom kurze k veterinárnej anatómii muskuloskeletálneho systému končatín, zistili, že vyššie skóre povrchového učebného štýlu negatívne korelovalo s výslednou známkou z kurzu, resp. študenti s vyšším skóre pre povrchový štýl ukončili prípravný kurz s horšou známkou. Naopak v štúdiu Nicholisa a Edmondsonovej (6) študenti s preferenciou povrchového učebného štýlu uspeli na skúškach z anatómie a neurovied signifikantne lepšie ako študenti, ktorí preferovali hĺbkový štýl (porovnanie percentuálnej úspešnosti – „superficial learners“ vs „deep learners“ - anatómia 87% vs 83%; neurovedy 90% vs 84,2%). Zaujímavé zistenia priniesla štúdia Smithovej a Mathiasa (7), keď zistili, že študenti preferujúci štúdium v pitevni priamo na kadaveroch využívali hĺbkový učebný štýl a študenti, ktorí nepreferovali prácu s kadaverom využívali najmä povrchový učebný štýl.

V našej štúdiu sme zistili, že vyššie skóre pre povrchový učebný štýl signifikantne pozitívne koreluje s lepším výsledkom zo záverečnej skúšky z anatómie a mierne aj s výsledkom písomného testu. Vysvetlením môže byť fakt, že anatómia je v prvom rade morfológická disciplína a v prvom kroku vyžaduje poznanie polohy a tvaru anatomických štruktúr a súčasne

poznanie anatomickej terminológie. Následne dochádza k poznaniu súvislostí, oboznámení sa s funkciou a po absolvovaní štúdia embryológie nachádza študent aj nové logické súvislosti. Štúdium anatómie teda pozostáva z potreby vizualizácie anatomických štruktúr, ich tvaru a priestorového usporiadania, súčasne z potreby zapamätania si anatomickej terminológie označujúcej jednotlivé štruktúry a v neposlednom rade z pochopenia vzájomných anatomických a funkčných vzťahov (8).

V poslednom období sa v pedagogickej psychológii stále častejšie spomína pojem metakognícia, poznávanie ako poznávame resp. metaučenie, teda učenie ako sa učiť (1). Práve vďaka metakognitívnym poznatkom, resp. poznatkom z neuropsychológie a neurodidaktiky je možné zlepšovať a zefektívňovať učebné štýly.

Najmä náročné štúdium medicíny, obzvlášť v prvých dvoch rokoch teoretických disciplín, kladie na študentov veľmi vysoké nároky. Problémom je, že mnohí nastupujúci vysokoškóľáci stále nevedia ako sa učiť. Práve pre nich by bolo vhodné zaradiť do prvého semestra predmet, ktorý by im umožnil nájsť optimálny učebný štýl, naučil ich učiť sa a uľahčil a zefektívnil ich náročné štúdium.

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantom KEGA 019UPJŠ -4-2018 Nový predmet na lekárskej fakulte: "metódy efektívneho učenia"

Literatúra

1. **Turek I.** Didaktika. Tretie, prepracované a doplnené vydanie. Bratislava; Wolters Kluwer, 2014.
2. **Bajtoš J.** Didaktika vysokej školy. Bratislava; Iura Edition- člen skupiny Wolters Kluwer, 2013.
3. **Fleming ND.** VARK: a guide to learning styles. 2001. <http://vark-learn.com/introduction-to-vark/the-vark-modalities/> (20.10.2017)
4. **Marton F & Saljo R.** On qualitative differences in learning: I. Outcome and process. Br J Educ Psychol 1976; 46(1):4-11. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2044-8279.1976.tb02980.x>
5. **McNulty MA & Richbourg HA.** Superficial Versus Deep Learning in A Professional Veterinary Anatomy Curriculum. FASEB J 2017; 31(1)supplement: 732.11-732.11
6. **Nichols CT & Edmondson AC.** Examination of the Roles of Learning Style and Learning Strategy on the Academic Performance of First Year Medical Students. FASEB Journal 2016; 30(1)supplement: 569.5-569.5
7. **Smith CF & Mathias HS.** Medical students' approaches to learning anatomy: students' experiences and relations to the learning environment. Clin Anat 2010; 23(1):106-14. doi: 10.1002/ca.20900.
8. **Pandey P & Zimitat C.** Medical students' learning of anatomy: memorisation, understanding and visualisation. Med Educ 2007; 41: 7-14. doi:10.1111/j.1365-2929.2006.02643.x

HODNOTENIE TVÁROVEJ ESTETIKY U PACIENTOV S OROFACIÁLNYM RÁZŠTEPOM

(Assessment of facial aesthetics in patients with orofacial cleft)

**Gabriela Verbová¹, Boris Verba², Květuše Lovásová³, Adriana Boleková⁴,
Mária Eötvösová⁵**

¹Ortodontické odd. I. Stomatologickej kliniky UPJŠ v Košiciach, Tr. SNP 1, 040 11, Košice, gabulw@gmail.com

²Stomatologické odd. Nemocnica Šaca, Lúčna 55, Košice-Šaca

³Ústav anatómie LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárová 2, 040 01, Košice

⁴Ortodontické odd. Kliniky stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie UPJŠ v Košiciach, Rastislavova 43, 040 01, Košice

Súhrn

Jedným z hlavných cieľov liečby pacienta s orofaciálnym rázštepom je zmeniť nežiaduce následky rázštepu, ako aj zlepšiť celkový vzhľad tváre. Základným vyšetrením pacienta s orofaciálnym rázštepom zahŕňa vyšetrenie tváre a jej proporcií, vyšetrenie oklúzie, prevedenie kefalometrickej analýzy a analýzy modelov chrupu. Z najnovších metód možno použiť k diagnostike CT alebo MRI s následnou 3D rekonštrukciou faciálneho skeletu pomocou PC programov, ktoré umožňujú diagnostiku a zároveň i modeláciu operačného zákroku a veľmi presnú predpoveď jeho výsledkov (1). Správna diagnostika vady potom indikuje správny operačný výkon a jej korekciu.

Kľúčové slová

orofaciálny rázštep, estetika, antropometria, kefalometria, trojdimenzionálna analýza

Summary

One of the main goals of treating a patient with orofacial cleft is to change the undesirable consequences of the cleft, as well as to improve the overall appearance of the faces. Basic examination of a patient with an orofacial specimen includes facial examination and proportions, occlusion examination, cephalometric analysis, and dental model analysis. The latest methods can be used to diagnose CT or MRI with 3D reconstruction of the facial skeleton using PC programs that allow for diagnosis, as well as modeling of surgery and very accurate prediction of its results (1). Correct fault diagnosis then indicates correct operating performance and correction.

Keywords

orofacial cleft, aesthetic, anthropometry, cephalometrics, three-dimensional analysis

Úvod

Antropometria je užitočným nástrojom hodnotenia anatómie hlavy, mäkkých tkanív tváre a poskytuje lekárovi kvantitatívne indikácie o štruktúrach a regiónoch, ktoré sa najviac líšia od normy. Od samého začiatku ortodoncie bol uznávaný vzťah medzi chrupom, oklúziou

a profilom tváre. Je dôležité vytvoriť rovnováhu a harmóniu medzi oklúziou a profilom tváre. Účinok ortodontickej terapie na profil tváre je však väčšinou limitovaný na bradu, tvárovú konvexnosť a morfológiu pier. S príchodom kombinovanej ortodontickej/chirurgickej liečby je stále dôležitejšie, aby hodnotenie profilu tváre bolo rutinne zahrnuté v diagnostických procedúrach a to tak, aby bolo možné predvídať účinok zmeny pevného tkaniva, následkom operačného zákroku, na štruktúry mäkkých tkanív.

Tvárová estetika sa dá hodnotiť podľa:

1. Somatometria : priama a nepriama
2. Kefalometrickej analýzy mäkkých tkanív
3. 3D skenu tváre

Somatometria

Biologické vlastnosti ľudskej tváre je možné skúmať z hľadiska jeho variability, medzipopulačných rozdielov, sexuálneho dimorfizmu či vekových zmien. Tradičnou metódou skúmania týchto rozdielov je meranie - somatometria, ktorej výstupmi sú číselné hodnoty štandardizovaných rozmerov. U klasickej priamej somatometrie sú rozmery merané priamo na tvári jedinca, nepriama somatometria využíva k získaniu rozmerov napríklad štandardizované fotografie s merítkom (2). Využitie fotografického záznamu je v lekárskej dokumentácii a výzkumu veľmi rozšírené. Faciálna analýza zahŕňa vyšetrenie jednotlivých proporcií tváre s jeho fotografickou dokumentáciou. Jednotlivé proporcie tváre sú posudzované podľa základných 9 gréckych kanónov krásy, ktoré Farkas a kol. (2) podrobili kritickej analýze a stanovili proporcie modernej tváre bielej rasy.

Kefalometrická analýza mäkkých tkanív

Posudzujeme nasledovné štruktúry v kefalometrickej analýze mäkkých tkanív profilu:

1. **Celková konvexnosť tváre**, najmä sagitálna pozícia brady.
2. **Morfológia hornej pery**, jej prečnievanie a vzťah ku dolnej časti nosa ako aj hĺbka hornej labiálnej ryhy
3. **Morfológia dolnej pery**, jej prečnievanie vo vzťahu k hornej pere, ako aj hĺbka dolnej rýhy
4. **Vertikálne tvárové proporcie**

Na základe vyššie uvedených štruktúr sa vytvára a vyhodnocuje množstvo uhlových a lineárnych parametrov, ako je to popísané vo vyhodnocujúcej tabuľke.

BRADA	Priemer	Rozsah			
Faciálny uhol mäkkých tkanív	91°	84°-98°	recesívny	normálny	prečnievajúci
Faciálny obrysový uhol	-11°	-7° - -15°	recesívny	normálny	prečnievajúci
Dĺžka brady			krátka	ideálna	dlhá
NOS	Priemer	Rozsah			
Vyčnievanie nosa	18.4mm	14°-24°	malý	normálny	veľký
HORNÁ PERA	Priemer	Rozsah			
Vyčnievanie (uhol H)		7 °-14°	zasunutý	normálny	prečnievajúci
Estetická línia pera-pera	-4.0 mm		zasunutá	normálna	prečnievajúca
Naso-labiálny uhol	110°		malý	normálny	veľký
Dolná hranica/F.H.	5.0°	0°-10°	malá	normálna	veľká
Horný sulcus	-3.0 mm	1.0-4.0 mm	plytký	normálny	hlboký

DOLNÁ PERA	Priemer	Rozsah			
Vyčnievanie (lína H)	-0.5 mm	0.0 -0.5 mm	zasunutá	normálna	prečnievajúca
Est. Línia pera-pera	-2.0 mm		zasunutá	normálna	prečnievajúca
Dolný sulcus (H línia)	-5.0 mm		plytký	normálny	hlboký
Rovina pera-mandibula	75°	73°-78°	zasunutá	ideálna	prečnievajúca
Dolný sulcus – hĺbka	-4.0 mm	-6.0- -2.0mm	hlboká	normálna	plytká
VERTIKÁLNE ROZMERY	Priemer	Rozsah			
Horná faciálna výška	40%		znížená	normálna	zvýšená
Dolná faciálna výška	60%		znížená	normálna	zvýšená
Horná pera (UL)	20%		znížená	normálna	zvýšená
Dolná pera (LL)	40%		znížená	normálna	zvýšená

Tab. 1 Kefalometrická analýza mäkkých tkanív (upravené podľa Williams, 2004)

Brada je pri vnímaní profilu tváre veľmi dominantnou črtou a štruktúrou, ktorú je pravdepodobne možné najjednoduchšie zmeniť v súvislosti s ortográdnou chirurgiou. Poloha brady určuje os dolnej časti tváre. Treba mať na pamäti, že poloha brady bude do značnej miery určovať ideálnu pozíciu pier. Skúsenosti ukazujú, že ak sú pery správne umiestnené, dobrú estetiku tváre možno dosiahnuť i v prípade „biedneho“ profilu brady. Sagitálna pozícia brady môže byť z tohto dôvodu u jedincov s dobrým profilom tváre a proporciami značne premenlivá. Vyčnievanie (prominencia) nosa je v tejto analýze merané nie preto, že je ho jednoduché meniť, ale preto, že nos spolu s bradou, je jedným z dominujúcich faktorov vzhľadu tváre. Podobne ako brada, prominencia nosa môže tiež ovplyvniť ideálnu pozíciu pier, a treba ju brať do úvahy. Vyčnievanie nosa sa meria v milimetroch od špičky nosa k bodu kolmo projektovanému na priamku kolmú na Frankfurtskú horizontálu, dotýkajúcej sa najhlbšieho bodu na hornom labiálnom sulcu. (7).

Trojdimenzionálna analýza faciálnej estetiky prostredníctvom laserového scanu

Metódy štúdia tvárovej symetrie a estetiky sú stále viac doplňované o pokročilé záznamové metódy spojené s počítačovou podporou, medzi ktoré patrí optické 3D skenovanie doplnené o vytváranie digitálnych trojrozmerných (3D) modelov (5). V súčasnej dobe je však klasická priama a nepriama somatometria doplňovaná, alebo dokonca nahradzovaná rôznymi 3D snímacími zariadeniami, ktoré prinášajú celú radu výhod pre vyšetrujúceho i vyšetrovaného. Trojrozmerné digitálne modely môžu byť prevedené do fyzickej podoby pomocou 3D tlačiarne. Táto rýchle sa rozvíjajúca technológia predstavuje veľký potenciál pre mnoho medicínskych odborov (4). Hodnotenie morfológie tváre v klinickej praxi je založené na využití tzv. vyznačených bodov-landmarov, ktoré sú umiestnené na presne zadefinovaných miestach 3D modelov a potom kvantitatívne a štatisticky spracové. Týchto 7 mediálnych a 7 bilaterálnych bodov je ručne umiestnených do faciálnych skenov ošetrujúcim. Potom špeciálne navrhnutý program vyhodnotí faciálnu asymetriu v každom súradnicovom systéme (6).

Orientačný bod	Skratka	Definícia
Mediálne orientačné body		
1 Glabella	g	Najviac prominujúci bod medzi obočím
2 Nasion	n	Bod ležiaci medzi koreňom nosa a sutura frontonasalis, nad líniou spájajúcou vnútorné očné kútiky
3 Pronasale	prn	Najviac vyčnievajúci bod na nose
4 Subnasale	sn	Bod, kde sa stretáva spodná hranica nosnej prepážky a plocha hornej pery
5 Labiale superius	ls	Bod uprostred červene hornej pery
6 Labiale inferius	li	Bod uprostred červene dolnej pery
7 Pogonion	pg	Najviac prominujúci bod na brade
Bilateralne orientačné body		
8Palpebrale superius	ps	Najvyšší bod strednej časti voľného okraja horného viečka
9 Palpebrale inferius	pi	Najnižší bod strednej časti voľného okraja dolného viečka
10 Exocanthion	ex	Bod ležiaci vo vonkajšej komisúre očného kútika
11 Endocanthion	en	Bod ležiaci vo vnútornej komisúre očného kútika
12 Alare	al	Najlaterálnejší bod na krídle nosa
13 Crista philtri	cph	Bod ležiaci na červení pier v oblasti zvýšeného okraja philtra
14 Cheilion	ch	Bod ležiaci v strede ústneho kútika

Tab. 2 Definícia antropometrických bodov faciálneho skenu

Nedávno bol špeciálne navrhnutý INDEX ASYMETRIE (AI), cez ktorý sa vypočíta celkový rozdiel asymetrie landmarkov.

$$AI = \sqrt{(Ldx - Rdx)^2 + (Ldy - Rdy)^2 + (Ldz - Rdz)^2}$$

X,Y, Z sú súradnice landmarkov, L znamená vľavo a R vpravo. Norma AI indexu varíruje od 0,76 po 2,82(3).

Materiál a metódy

Do štúdie bolo zaradených 10 pacientov, 5 mužského a 5 ženského pohlavia, 8 s unilaterálnym a 2 s bilaterálnym kompletným rúžštepom pery a podnebia vo veku 8 – 19 rokov, ktorý boli liečení na oddelení Čelústnej ortopédie na Klinike stomatoógie a maxilofaciálnej chirurgie v Košiciach. Merania boli vykonané priamo na tvári pacienta prostredníctvom priamej somatometrie, pričom bola hodnotená bočná asymetria polohy brady, polohy nosa, pozícia hornej a dolnej pery. Referenčný bodmi boli: glabela (g), pronasale (prn), subnasale (sn), labiale superius (ls), labiale inferius (li) a pogonium (pg). Poloha týchto bodov bola hodnotená vzhľadom na rovinu symetrie, ktorú sme zostrojili spusteným kolmicou z bodu glabela na bipupilárnu rovinu. Body, ktoré sa nachádzali mimo tejto roviny boli hodnotené ako asymetrické. Asymetria mohla byť kolaterálna, alebo na strane postihnutia. Naše sledovania sme doplnili dotazníkom spokojnosti s estetikou jednotlivých častí tváre, ktoré vyplňali vyšetrovaní jedinci.

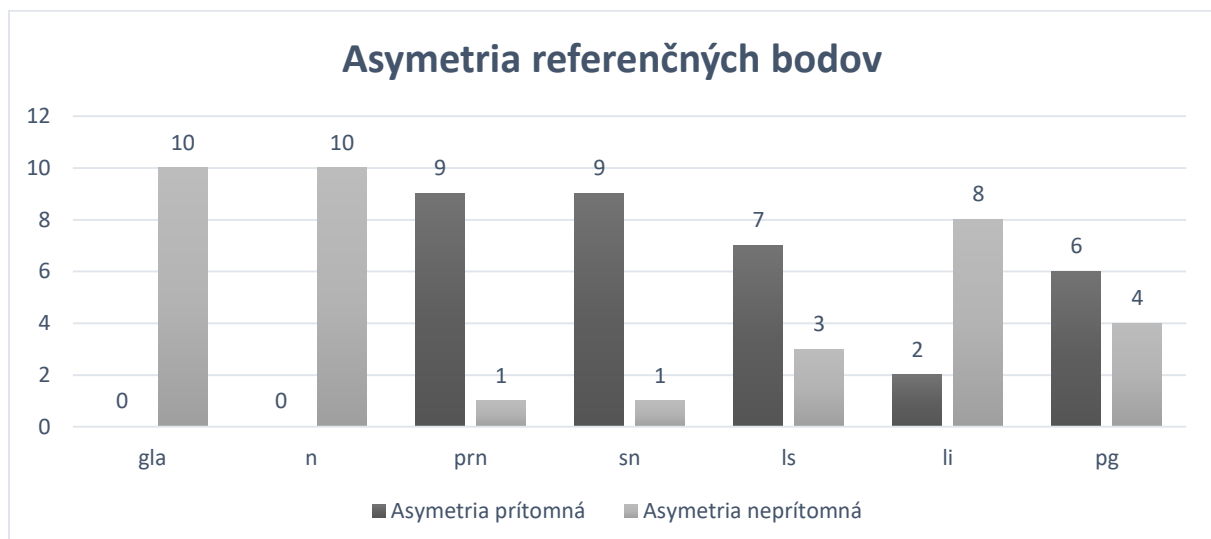
Výsledky

Celkovo u pacientov s rúžštepom pery a podnebia nachádzame len miernu disproporciu. Najviac asymetrický je nos, ktorý je pri unilaterálnom rúžštepe vybočený na kontralaterálnu stranu. Po nose bola najviac asymetrická horná pera a potom brada. Unilaterálny rúžštep

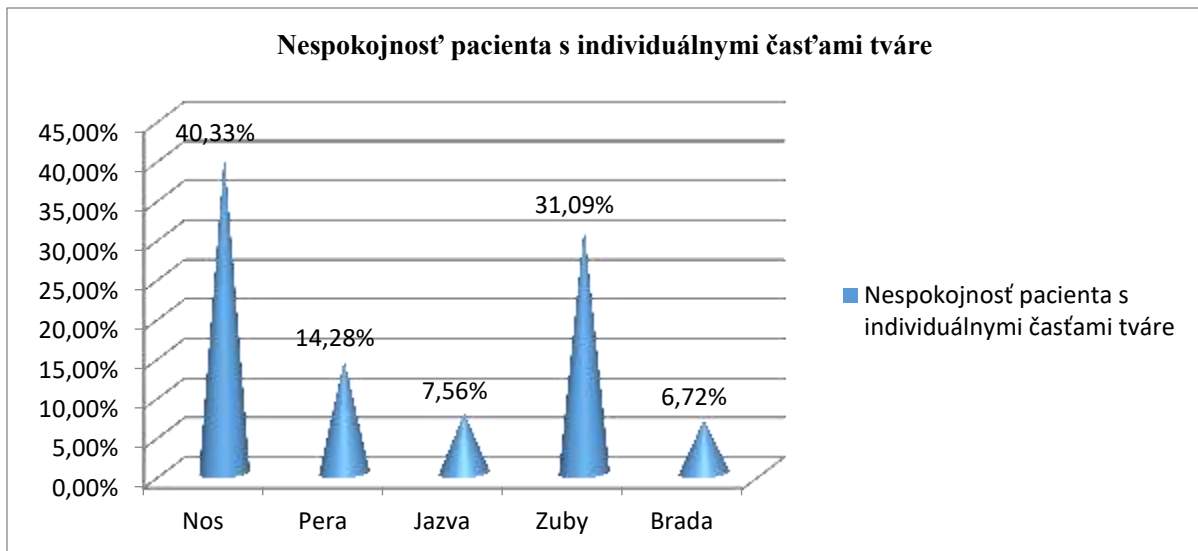
vykazuje väčšiu asymetriu ako bilaterálny. V jednom prípade bola pri bilaterálnom rúžštepe pravostranná asymetria nosa a ľavostranná asymetria hornej pery. Pacienti ženského pohlavia s unilaterálnym rúžštepom majú o niečo väčšiu bočnú asymetriu, ako pacienti mužského pohlavia. Body glabela a nasion nevykazovali žiadnu asymetriu. Naše zistenia korelovali so subjektívnymi názormi vyšetrovaných jedincov. Najviac nevyhovujúci bol pre nich nos, brada sa im až tak asymetrická nezda.

	g			n			prn			sn			ls			li			pg		
UL CL P	-	+	K+	-	+	K+	-	+	K+	-	+	K+	-	+	K+	-	+	K+	-	+	K+
♀	4			4					4			4	1	4		3	1		1	3	
♂	4			4					4			4	1	2		3	1		1	2	1
BC CL P	-	+	K+	-	+	K+	-	+	K+	-	+	K+	-	+	K+	-	+	K+	-	+	K+
♀	1			1			1			1			1			1			1		
♂	1			1					1 d x			1 d x			1 si n	1			1		

Tab. 3 Súhrn polohy referenčných bodov u pacientov mužského a ženského pohlavia s unilaterálnym a bilaterálnym kompletným rúžštepom pery a podnebia (ULCLP a BCCLP). Asymetria bodu na postihnutej strane je značená +, asymetria na kolaterálnej strane K+ a v prípade neprítomnosti asymetrie -



Obr. 1 Asymetria referenčných bodov



Obr. 2 Nespokojnosť pacienta s individuálnymi časťami tvár

Záver

Konvenčná antropometria má niekoľko obmedzení (t. j. zložitosť, odchýlky merania, nedostatok počítačových nástrojov), časovú náročnosť a náročnosť na zhromažďovanie údajov pre kliniku i pacienta. Vytváranie 3D modelov s následnou analýzou má pre klinickú prax veľké potencionálne využitie. Jednak môže byť formou subjektívneho vizuálneho hodnotenia, kde lekár hodnotí mieru a charakter deformít tváre oproti priemerným tváram, alebo porovnáva model tváre pred a po liečebnom zákroku. Navyše vytvorenie 3D modelov je rýchle a na probandy nekladie vysoké časové nároky, ako tomu je u tradičného merania.

Literatúra

- Eales, EA., Newton, C., Jones, ML., Sugar, A.:** The accuracy of computerized prediction of the soft tissue profile: a study of 25 patients treated by means of the Le Fort I osteotomy. *Int J Adult Orthod Orthognath Surg* 9:141, 1994.
- Farkas, LG et al:** Vertical and horizontal proportions of the face in young adult North American caucasians: Revision of neoclassical canons. *Plast Reconstr Surg* 75:328, 1985
- Ferrario et al.:** A quantitative three-dimensional assessment of soft tissues facial asymetry of cleft lip and palate adult patients. *Journal of craniofacial surgery*, 2003, Vol. 4, p. 739-746
- Jandová M., Kotulová Z., Urbanová P.:** Databáze trojrozměrných modelu obličeje dětí a její využití v ortodoncii. . In:*Ortodoncie*. ISSN 1210-4272, 2015, roč. 24, č. 4, s.14-21
- Pogrel, M. A.:**What a normal esthetic values. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 49:963-969, 1991
- Šmahel, Z., Trefný, P., Formánek, P., Mullerová, Z., Peterka, M.:** Three-Dimensional Morphology of Palate in Subjects with Unilateral Complete Cleft Lip and Palate at the Stage of Pernament Dentition. *Cleft Palate-craniofacial Journal*, 2004, 41: 416-423
- Williams S. :** Koncepčná ortodoncia. Bratislava : Orthoexpress, 2002. S KA 32-59

II. ONKOLÓGIA

MOLEKULÁRNE BIOMARKERY V DIAGNOSTIKE A LIEČBE PACIENTOV S KOLOREKTÁLNÝM KARCINÓMOM

(Molecular biomarkers in the diagnostic and treatment of patients with colorectal cancer)

**Katarína Fabišíková¹, Regína Lohajová Behulová², Katarína Závodná²,
Lukáš Šebest², Romana Valenčíková², Vanda Repiská¹**

¹ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, katarina.fabisikova@gmail.com

² Oddelenie lekárskej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety, Heydukova 10, 812 50 Bratislava

Súhrn

Kolorektálny karcinóm (CRC) je tretím najčastejším typom nádorového ochorenia. Väčšina CRC (70-80%) vzniká akumuláciou somatických mutácií v protoonkogénoch a tumor-supresorových génoch. 5-10% prípadov je zapríčinených zárodočnou mutáciou v génoch, ktoré sú zodpovedné za reguláciu proliferácie buniek a opravy DNA a 20% pacientov s CRC má familiárny výskyt ochorenia. Najčastejším typom hereditárnej formy CRC je Lynchov syndróm (LS), ktorý je spôsobený zárodočnou mutáciou v niektorom z génov „mismatch“ reparačného systému (MMR) bunky. 90% LS asociovaných tumorov vykazuje mikrosatelitovú instabilitu (MSI), ktorá je markerom poškodenia MMR systému nádorovej bunky.

Využitie molekulárnych biomarkerov má v diagnostike nádorových chorôb nezastupiteľné miesto. *RAS* onkogény sú prediktívne biomarkery odpovede na liečbu monoklonálnymi protilátkami proti receptoru epidermálneho rastového faktora (*EGFR*). Pacienti s *wild-type RAS* statusom profitujú z tejto liečby, zatiaľ čo prítomnosť *RAS* mutácií indikuje nedostatočnú odpoveď na anti-*EGFR* liečbu.

Cirkulujúca nádorová DNA (ctDNA) predstavuje potenciálnu možnosť neinvazívneho prístupu v prognostike nádorových ochorení, čoho dôsledkom môže byť skorší záchyt vzniku a progresie ochorenia alebo vznikajúcej rezistencie na prebiehajúcu terapiu.

Kľúčové slová

kolorektálny karcinóm, molekulárne biomarkery, *RAS* onkogény, mikrosatelitová instabilita, Lynchov syndróm, „mismatch“ reparačný systém (MMR)

Summary

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer. The majority of CRCs (70-80%) results from the accumulation of somatic mutations in protooncogenes and tumor suppressor genes. 5-10% of cases are caused by germline mutations in genes that regulate cell proliferation and DNA repair, and 20% of CRCs have familial component. The most common hereditary CRC is Lynch syndrome (LS), which is caused by germline mutation in one of the

mismatch repair system genes (MMR). 90% of tumors associated with LS show microsatellite instability (MSI), which is a hallmark of MMR system deficiency.

Molecular biomarkers have an important role in the diagnostic of cancer. *RAS* oncogenes are predictive biomarkers for response to monoclonal antibodies against the epidermal growth factor receptor (EGFR). Patients with wild-type *RAS* status benefit from this treatment, while the presence of *RAS* mutations represents predictive marker of resistance to anti-EGFR treatment.

Circulating tumor DNA (ctDNA) represents potential non-invasive approach to the prognosis of the disease, which may be beneficial for the detection of early stages and progression of the disease or resistance to on-going therapy.

Keywords

colorectal cancer, molecular biomarkers, *Ras* oncogenes, microsatellite instability, Lynch syndrome, mismatch repair system

Kolorektálny karcinóm (CRC) predstavuje celosvetovo tretí najčastejší typ nádorového ochorenia. Vzniká v dôsledku postupnej akumulácie somatických mutácií alebo z dôvodu prítomnosti zárodočných mutácií v génoch, ktoré zohrávajú esenciálnu úlohu v rámci kontroly bunkového cyklu, bunkovej proliferácie a opravy DNA. Tieto patologické zmeny môžu viesť k transformácii normálneho črevného epitelu na invazívny karcinóm (4). 70-80% kolorektálnych karcinómov vzniká sporadicky a 20-30% prípadov súvisí s genetickými faktormi. V rámci geneticky podmienených foriem sa rozlišuje familiárny a hereditárny pôvod kolorektálneho karcinómu. Familiárny typ (20-25%) je spojený s výskytom konkrétneho typu karcinómu v rodine avšak bez asociácie so známym genetickým syndrómom. Hereditárny kolorektálny karcinóm je výsledkom zárodočných mutácií v konkrétnych génoch a vyskytuje sa v 5-10% prípadov (8).

Hereditárne nádorové syndrómy sa na rozdiel od sporadických foriem nádorov vyskytujú v mladšom veku, nádory sú častokrát mnohopočetné a v rámci rodiny dochádza k opakovanému výskytu špecifických typov nádorov. Včasný dôkaz zárodočnej mutácie (patogénneho variantu) umožňuje nastavenie preventívnych a profylaktických programov pre asymptomatických nosičov dokázanej mutácie v rodine a tým skorý záchyt nádorového ochorenia so včasným nastavením liečby.

Využitie molekulárnych biomarkerov má v diagnostike nádorových chorôb nezastupiteľné miesto. Je to nástroj na stanovenie potenciálneho rizika vzniku CRC, monitorovanie priebehu ochorenia a taktiež sa môže uplatňovať v predikcii odpovede pacienta na navrhovanú liečbu (5). Molekulárne biomarkery umožňujú personalizáciu onkologickej liečby na základe genetických charakteristík nádoru.

Lynchov syndróm (LS) je najčastejšia hereditárna forma CRC s autozomálne dominantnou dedičnosťou. Pacienti s Lynchovým syndrómom majú okrem predispozície na vznik nádoru hrubého čreva aj zvýšené riziko vzniku iných asociovaných nádorov: endometria, ovárií, hepatobiliárneho traktu, žalúdka, mozgu a kože. Transformácia adenómu na invazívny karcinóm je pri Lynchovom syndróme rýchla, trvá približne 2 až 3 roky (13).

Lynchov syndróm je spôsobený zárodočnými mutáciami v génoch reparačného systému bunky (MMR systém): *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *MLH3*, *MSH3*.

MMR systém je zodpovedný za opravu chýb, ktoré sú navodené DNA polymerázou v priebehu replikácie DNA. Poškodenie MMR systému sa dá pozorovať najmä v tzv. mikrosatelitových repetitívnych oblastiach DNA. Mutácie v génoch „mismatch“ reparačného systému vedú k zmenám v počte opakovaní týchto sekvencií, čo sa označuje ako mikrosatelitová instabilita (MSI). MSI je častým charakteristickým znakom LS asociovaných

tumorov (13). Mikrosatelitová instabilita je dôsledkom poruchy MMR systému a používa sa ako diagnostický marker sporadickej (12%) a rovnako aj hereditárnej (3%) formy CRC (1).

Selekciu sporadických MSI nádorov je možné uskutočniť pomocou analýzy prítomnosti aktivačnej mutácie v kodóne 600 génu *BRAF* alebo metylácie promótoru génu *MLH1*. V prípade nádoru s dokázanou MSI a prítomnosťou mutácie v géne *BRAF* alebo metylácie promótoru *MLH1* ide s vysokou pravdepodobnosťou o sporadický typ kolorektálneho karcinómu (12).

Familiárna adenomatózna polypóza (FAP) predstavuje 1% hereditárnych kolorektálnych karcinómov. Ide o autozomálne dominantné ochorenie, ktoré je zapríčinené zárodočnou mutáciou v géne *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*). Klinický prejav zahŕňa rozvoj stoviek až tisícok polypov v hrubom čreve a konečníku (6).

Medzi zriedkavejšie dedičné formy polypózy s nižším rizikom malígnej transformácie patria Peutz-Jeghersov syndróm, juvenilná polypóza a Cowdenov syndróm (14).

Klasický model vzniku sporadickej formy CRC známy ako adenóm-karcinómová sekvencia bol popísaný Fearonom a Vogelsteinom v roku 1990. Tento model je definovaný ako postupný proces akumulácie mutácií v génoch *APC*, *DCC*, *TP53*, *KRAS*, *NRAS*, ktoré korelujú s morfológickými zmenami tkaniva (4). Prvou a zároveň kľúčovou udalosťou na molekulárno-genetickej úrovni je inaktivácia génu *APC*. *APC* je tumor-supresorový gén, ktorý je významným členom Wnt signálnej dráhy regulujúcej rast a proliferáciu buniek. Mutácie (patogénne varianty) v géne *APC* sa môžu vyskytovať pri sporadickej ako aj hereditárnej forme CRC (3).

V pokročilejších štádiách karcinogenézy často dochádza ku strate expresie tumor-supresorového génu *DCC*. Delícia génu *DCC* je spojená s horšou prognózou CRC (10). Mutácia v tumor-supresorovom géne *TP53* sa vyskytuje približne v 70% prípadov CRC a je spojená s pokročilým štádiom tumorogenézy. Nadexpresia proteínu p53 zapríčiňuje stratu kontroly nad mechanizmom apoptózy. Deregulácia funkcie proteínu p53 súvisí s neovaskularizáciou a agresívnym rastom nádoru (11).

KRAS a *NRAS* onkogény predstavujú prediktívne biomarkery stanovenia možnej rezistencie na liečbu monoklonálnymi protilátkami proti receptoru epidermálneho rastového faktora. *KRAS* a *NRAS* patria do rodiny *RAS* onkogénov a sú súčasťou MAP-kinázovej (MAPK) signálnej dráhy, ktorá reguluje bunkovú proliferáciu, diferenciáciu a apoptózu. Až 90% bodových mutácií sa vyskytuje v kodónoch 12 a 13 exónu 2 a 5% mutácií vzniká v kodóne 61 exónu 3 génu *KRAS*. Prítomnosť *RAS* mutácií u pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom vedie ku konštitutívnej aktivácii *RAS* proteínov. Nositelia mutácií v génoch *KRAS* a *NRAS* neprofitujú z liečby založenej na monoklonálnych protilátkach proti receptoru epidermálneho rastového faktora (2).

Cirkulujúca nádorová DNA (ctDNA) predstavuje potenciálny neinvazívny molekulárny biomarker. V prípade vysokej úrovne nádorovej heterogenity môže analýza len časti nádorového tkaniva získaného biopsiou poskytnúť neúplnú genetickú charakteristiku nádoru. ctDNA je z tohto hľadiska vhodným zdrojom biologického materiálu pre komplexnú genomickú analýzu. ctDNA je fragmentovaná DNA uvoľnená z nádorových buniek do krvného riečiska. ctDNA možno špecificky detegovať v krvi, a to kvalitatívne (detekcia nádorovo špecifických patogénnych zmien v cirkulujúcej DNA) alebo kvantitatívne (množstvo ctDNA koreluje s veľkosťou nádorovej masy). Viaceré štúdie potvrdili vysokú konkordanciu výsledkov mutačných analýz pri simultánnej analýze vzoriek nádorového tkaniva a ctDNA. Výhodou ctDNA je jednoduchá a ekonomická príprava vzoriek bez nutnosti spracovania vzorky po odbere a pred izoláciou nukleových kyselín (9). Potenciálne využitie ctDNA v klinickej onkológii zahŕňa kontinuálne sledovanie priebehu a progresie ochorenia a monitorovanie minimálnej reziduálnej choroby. ctDNA môže byť tiež využitá ako nástroj pre skríning ochorenia vo vysokorizikových populáciách (7).

V súčasnosti sa dostáva do popredia multigénové testovanie pri hereditárnych aj sporadických typoch CRC. Multigénové testovanie umožňuje simultánnu analýzu viacerých génov, ktoré sú asociované s konkrétnym nádorovým fenotypom v rodine. Analýza je založená na princípe masívneho paralelného sekvenovania. V diagnostike heterogénnych genetických ochorení je panelové sekvenovanie ekonomicky efektívne a takisto perspektívne z hľadiska personalizácie onkologickej liečby (15).

Kolorektálny karcinóm predstavuje významný spoločenský a medicínsky problém, a to aj napriek výraznému pokroku v jeho diagnostike a liečbe. Základným predpokladom zníženia mortality a zlepšenia prognózy kolorektálneho karcinómu je najmä prevencia a taktiež skorý záchyt ochorenia.

Literatúra

1. **Boland CR, Goel A.** Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138 (6): 2073-2087.
 2. **Bolocan A, Ion D, Ciocan DN, Paduraru DN.** Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Chirurgia (Bucur)* 2012; 107 (5): 555-563.
 3. **Coppede F, Lopomo A, Spisni R, Migliore L.** Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol: WJG* 2014; 20 (4): 943-956.
 4. **Fearon ER, Vogelstein B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61 (5): 759-767.
 5. **Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M.** Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int* 2015: 1490.
 6. **Half E, Bercovich D, Rozen P.** Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* 2009; 4: 22.
 7. **Kyker-Snowman K, Ho Park B.** Circulating Free Tumor DNA (ctDNA): The Real-Time Liquid Biopsy. 105-118. In: Cristofanilli M. *Liquid Biopsies in Solid Tumors*. Switzerland; Springer International Publishing AG, 2017.
 8. **Lorans M, Dow E, Macrae FA, Winship IM, Buchanan DD.** Update on Hereditary Colorectal Cancer: Improving the Clinical Utility of Multigene Panel Testing. *Clin Colorectal Cancer* 2018; 17 (2): 293-305.
 9. **Minárik G.** Molekulárna genomika nádorových ochorení a jej perspektívy. *Onkológia* 2014; 9 (5): 292-295.
 10. **Mlkvá I.** Genetika tumorigenézy nádorov kolorekta (možnosti testovania a screeningovej predikcie dedičnej formy ochorenia – Lynchovho syndrómu) *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 1): S55–S 61.
 11. **Prochotský A.** Karcinóm hrubého čreva a konečníka. Bratislava: Litera Medica; 2006: 181-188.
 12. **Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al.** Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96 (4): 261–268.
 13. **Závodná K, Vavrová E, Hamidová O, Markus J, Konečný M, Kajo K, Lohajová Behulová R.** Diagnostika pacientov s Lynchovým syndrómom. *Onkológia* 2017; 12 (6): 414-420.
 14. **Žitňan E, Májek J, Pekárek B.** Skrining kolorektálneho karcinómu – pohľad gastroenterológa. *Onkológia (Bratisl.)* 2015; 10 (1): 33–35.
- Internet:
15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK126744/> (11.11.2018)

MUTÁCIE GÉNU *PTEN* V SERÓZNOM PAPILÁRNOM ADENOKARCINÓME ENDOMETRIA

(Mutations of *PTEN* gene in uterine serous papillary adenocarcinoma)

Lajos Gergely¹, Helena Gbelcová¹, Vanda Repiská¹, Vladimír Šišovský², Eudovít Daniheľ², Lubomír Straka³, Boris Rychlý⁴, Petra Priščáková¹

¹ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR, prednosta Doc. MUDr. Daniel Böhmer, PhD.

² Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, SR

³ Klinická patológia Prešov, s.r.o., Prešov, SR

⁴ Cytopathos, s.r.o. Bratislava, SR

Súhrn

Serózný papilárny adenokarcinóm endometria (SC) je málo frekventovaným a agresívnym typom karcinómu endometria. Pre tento typ sú typické mutácie tumorsupresorového génu *TP53* na rozdiel od endometroidného typu, pre ktorý sú typické mutácie tumorsupresorového génu *PTEN*. *PTEN* mutácie sa považujú v SC na základe medzinárodných databáz za atypické. V našej štúdii sme vykonali sekvenčnú analýzu génu *PTEN* nádorov SC pacientok z populácie Slovenskej republiky a našli sme viac mutácií, než sme na základe známych štatistík očakávali, niektoré z nich sú dokonca zriedkavé.

Kľúčové slová

gén *PTEN*, mutácie, sekvenovanie, serózný papilárny adenokarcinóm endometria

Summary

Uterine serous papillary adenocarcinoma (SC) is a less frequent and aggressive type of uterine cancer. For this type are typical mutations of tumoursuppressor gene *TP53* in contrast with the endometroid type, where dominate the mutations of tumoursuppressor gene *PTEN*. *PTEN* mutations in SC according to international databases are considered as atypical. In our study we performed *PTEN* sequence analysis in tumours of SC patients from the population of Slovak Republic and we found more mutations (some of them are even rare) than we expected based on the data known.

Keywords

PTEN gene, mutations, sequencing, uterine serous papillary adenocarcinoma

Úvod

Karcinóm endometria je najčastejšou malignitou ženského genitálneho traktu v našej populácii. Rozoznávame dva hlavné typy, endometroidný a neendometroidný typ, ktoré majú odlišné molekulárne charakteristiky. Pre endometroidný typ sú typické mutácie v tumorsupresorovom géne *PTEN*, kým pre neendometroidný typ, ako serózný papilárny

adenokarcinóm (SC), sú typické mutácie tumorsupresorového génu *TP53* (1). Genetický profil nádoru však nie je vždy úplne zhodný s profilom očakávaným na základe histopatologickej klasifikácie (2). Tumorsupresorový gén *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog*) sa nachádza na desiatom chromozóme (10q23.31) a má deväť exónov. Týmto génom kódovaný proteín je tvorený 403 aminokyselinami (3). Štruktúra *PTEN* pozostáva z N-terminálnej fosfatázovej domény a C2 domény. Fosfatázová doména obsahuje aktívne centrum zodpovedné za enzymatickú funkciu proteínu (fosfatázovú aktivitu), zatiaľ čo C2 je väzobná doména pre membránové fosfolipidy (4). *PTEN* je lokalizovaný v cytoplazme. Jeho substrátom je fosfatidylinozitol (3, 4, 5)-trifosfát (PIP3) – lipidový druhý posol (3). *PTEN* je hlavným negatívnym regulátorom PI3K/Akt/mTOR signálnej dráhy, ktorá reguluje rast, prežívanie a proliferáciu buniek. *PTEN* reguluje PI3K signalizáciu defosforyláciou PIP3 na fosfatidylinozitol (4, 5)-bifosfát (PIP2), a tým účinkuje ako antagonista fosfatidylinozitol 3-kinázy (PI3K) (5). Mutácie génu *PTEN* v SC sú podľa viacerých štúdií atypické. Podľa údajov TGCA (*The Cancer Genome Atlas*) približne 2 % SC majú *PTEN* mutácie (2), kým databáza COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) uvádza 7 % (6). V našej štúdii sme vykonali sekvenčnú analýzu génu *PTEN* zo serózných papilárných adenokarcinómov endometria pacientok zo SR.

Materiál a metódy

Ako materiál slúžila DNA izolovaná z parafínových bločkov biopsií nádorov SC pacientok pomocou *Quiagen Tissue Midikit*. V analyzovanom súbore bolo 8 SC pacientok a ako kontrolná skupina slúžili dve pacientky s normálnym endometriom v proliferáčnej fáze, jedna s normálnym endometriom v sekrečnej fáze menštruačného cyklu a jedna s atrofickým endometriom. Pomocou PCR (kde sme používali *GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix*) sme amplifikovali všetkých 9 exónov génu *PTEN*. *Upstream* (U) a *downstream* (D) primery mali nasledujúce sekvencie:

Exón 1 U.: 5'-CAGAAGAAGCCCCGCCACCAG-3',
Exón 1 D.: 5'-AGAGGAGCAGCCGCAGAAATG-3',
(177-bp amplikón);
Exón 2 U.: 5'-TTTCAGATATTTCTTTCCTTA-3',
Exón 2 D.: 5'-AACATGAATATAAACATCAA-3',
(171-bp amplikón);
Exón 3 U.: 5'-TAATTTCAAATGTTAGCTCAT-3',
Exón 3 D.: 5'-AAGATATTTGCAAGCATACAA-3',
(147-bp amplikón);
Exón 4 U.: 5'-GTTTGTTAGTATTAGTACTTT-3',
Exón 4 D.: 5'-ACAACATAGTACAGTACATTC-3',
(150-bp amplikón);
Exón 5 U.: 5'-TATTCTGAGGTTATCTTTTTTA-3',
Exón 5 D.: 5'-AGGAAAAACATCAAAAAATAA-3',
(292-bp amplikón);
Exón 6 U.: 5'-TTGGCTTCTCTTTTTTTTCTG-3',
Exón 6 D.: 5'-ACATGGAAGGATGAGAATTTC-3',
(202-bp amplikón);
Exón 7 U.: 5'-CCTGTGAAATAATACTGGTATG-3',
Exón 7 D.: 5'-CTCCCAATGAAAGTAAAGTACA-3',
(229-bp amplikón);
Exón 8 U.: 5'-TTAAATATGTCATTTTCATTTCTTTTTTC-3',
Exón 8 D.: 5'-ACACATCACATACATACAAGTC-3',

(331-bp amplikón);

Exón 9 U.: 5'-TTCATTTTAAATTTTCTTTCT-3',

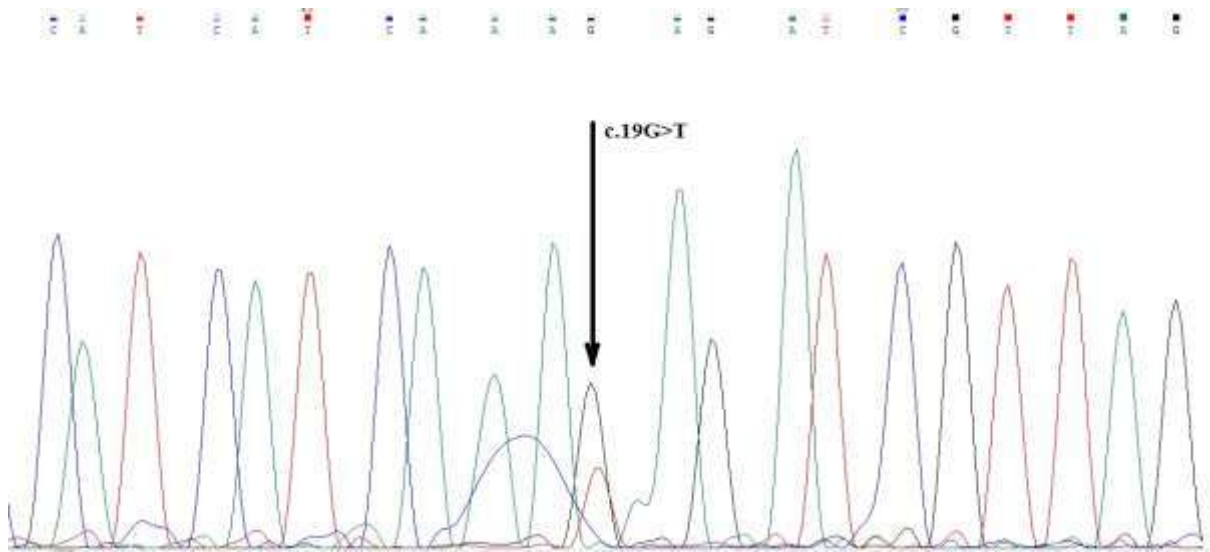
Exón 9 D.: 5'-TGGTGTTTTATCCCTCTTGAT-3',

(242-bp amplikón).

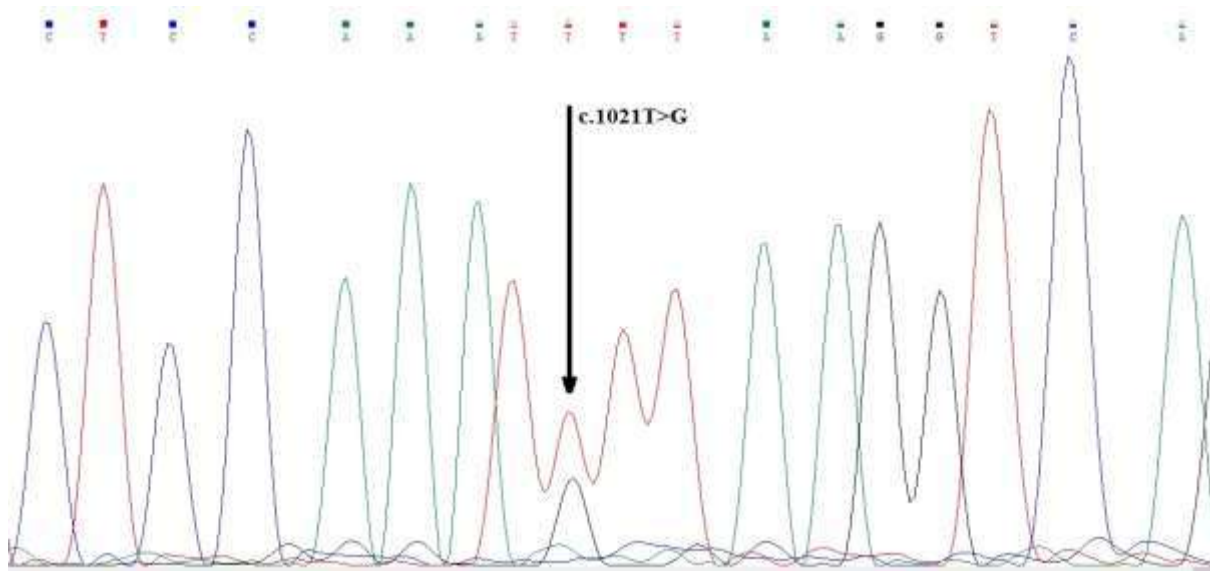
Kontrolu amplifikácií sme vykonali pomocou agarózovej gélovej elektroforézy. Po overení úspešnosti amplifikácie boli produkty PCR prečistené pomocou dvojice enzýmov EXO/SAP, pričom sme k 5 µl PCR produktu pridali 0,5 µl exonukleázy 1 (EXO1) a 1 µl alkalickéj fosfatázy (FASTAP). Pripravenú zmes sme inkubovali 15 minút pri teplote 37°C a 15 minút pri teplote 85°C (tepelná inaktivácia enzýmov). Po EXO/SAP nasledovala Sangerova sekvenačná reakcia – terminovaná asymetrická PCR. Po sekvenačnej reakcii nasledovala purifikácia DNA pred sekvenačnou analýzou pomocou komerčnej súpravy EXTERMINATOR založenej na adsorpcii DNA na membránu centrifugačných kolóniek, premývaní a elúcii nasledovanej 10 minútovou denaturáciou pri 96°C. Elektroforetogramy sme vyhodnotili pomocou programov Vector NTI 10 a Chromas.

Výsledky

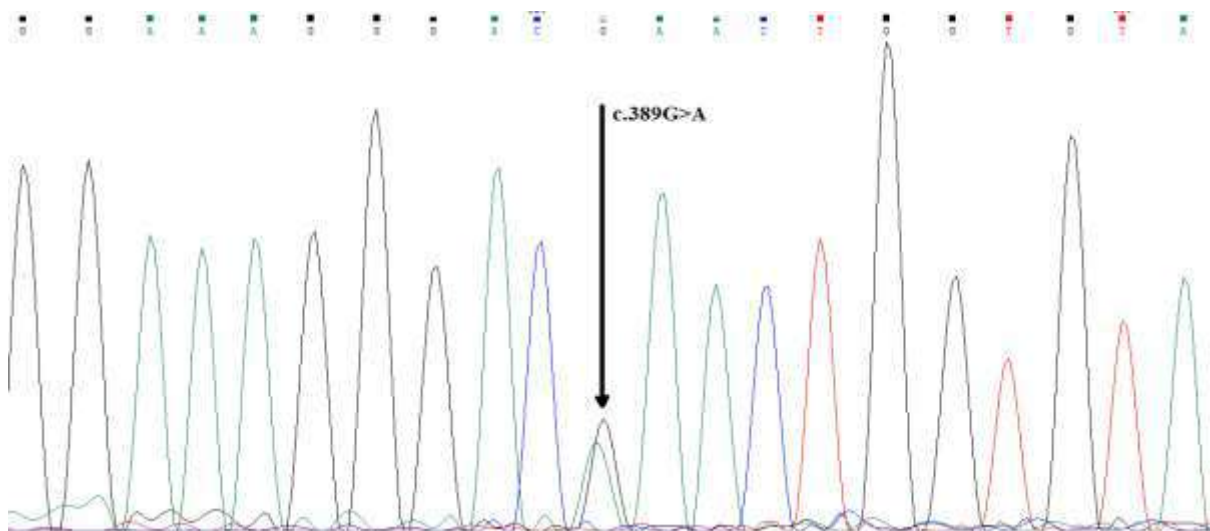
V našom súbore SC pacientok sme našli mutácie v troch prípadoch, z ktorých dve mali dve mutácie v heterozygotnom stave. Jedna pacientka mala jednu mutáciu v homozygotnom stave. V prípade pacientky SC3 sme našli mutácie v exónoch 1 (c.19G>T) a 8 (c.1021T>G). Mutácia c.19G>T v prípade pacientky SC3 (obrázok č. 1) je *nonsense* substitúciou prvého nukleotidu kodónu 7 (GAG) v exóne 1. Má za následok zmenu kodónu pre aminokyselinu glutamát na stop kodón (UAG), a teda spôsobuje predčasné ukončenie syntézy proteínu PTEN. Je to patogénna mutácia, ktorá sa našla aj v SC (7). Mutácia c.1021T>G rovnako v prípade pacientky SC3 (obrázok č. 2) je zriedkavá patogénna *missense* substitúcia týkajúca sa prvého nukleotidu kodónu 341 (UUU) v exóne 8. Má za následok zmenu aminokyseliny fenylyalanín na valín. Exón 8 sa zúčastňuje na kódovaní C2 domény, preto uvedená mutácia poškodzuje C2 doménu PTEN, a tým porušuje supresorovú aktivitu proteínu znížením jeho schopnosti viazať sa na membránové fosfolipidy, čo ovplyvňuje jeho intracelulárnu lokalizáciu (8, 9). V nádore pacientky SC8 sme našli dve heterozygotné mutácie v *PTEN* géne v exóne 5 (c.389G>A a c.419T>G). Exón 5 kóduje katalytické jadro PTEN proteínu (8). Mutácia c.389G>A (obrázok č. 3) je *missense* substitúciou druhého nukleotidu kodónu 130 (CGA), ktorá sa nachádza v exóne 5. Má za následok zmenu aminokyseliny arginínu na glutamín. Je to patogénna mutácia v katalytickom jadre proteínu PTEN a vedie k strate supresorovej funkcie (10). Ide o *hot spot* opísaný aj v endometriálnych hyperpláziách a karcinómoch slovenských žien (11). Druhou mutáciou v tej istej vzorke je c.419T>G (obrázok č. 4), ktorá je *nonsense* substitúciou druhého nukleotidu v kodóne 140 (UUA) exónu 5. Má za následok zmenu kodónu pre aminokyselinu leucín na stop kodón (UGA), a teda spôsobuje predčasné ukončenie syntézy proteínu PTEN. Je to zriedkavá patogénna mutácia (12). U pacientky SC5 sme našli v nádore mutáciu c.730C>T v homozygotnom stave (obrázok č. 5) v exóne 7. Ide o *missense* substitúciu prvého nukleotidu kodónu 244 (CCU), ktorý spôsobuje zmenu kodónu pre prolín na kodón pre serín (UCU). Táto mutácia sa dá nájsť v databáze COSMIC len v jednom prípade a potom v malígnom melanóme kože (13). Podľa databázy ClinVar (NCBI) mutácie c.730C>T a c.1021T>G majú neurčitý význam (14, 15), c.19G>T je pravdepodobne patogénna (16), a c.389G>A je patogénna (17). V tejto databáze nie je mutácia c.419T>G dostupná. V databáze COSMIC sú dostupné všetky nami nájdené mutácie a sú označené ako patogénne na základe predikcie FATHMM (*Functional Analysis through Hidden Markov Models*). V kontrolnom súbore sme nenašli žiadne mutácie *PTEN* génu.



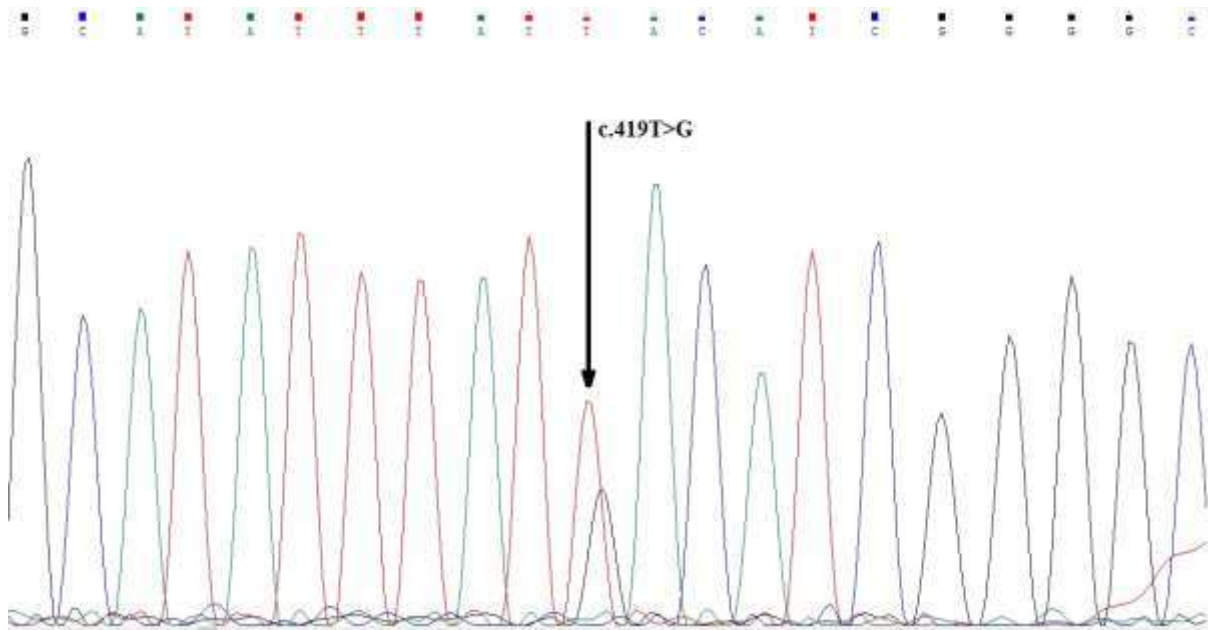
Obr. 1 Elektroforetogram s mutáciou c.19G>T u pacientky SC3



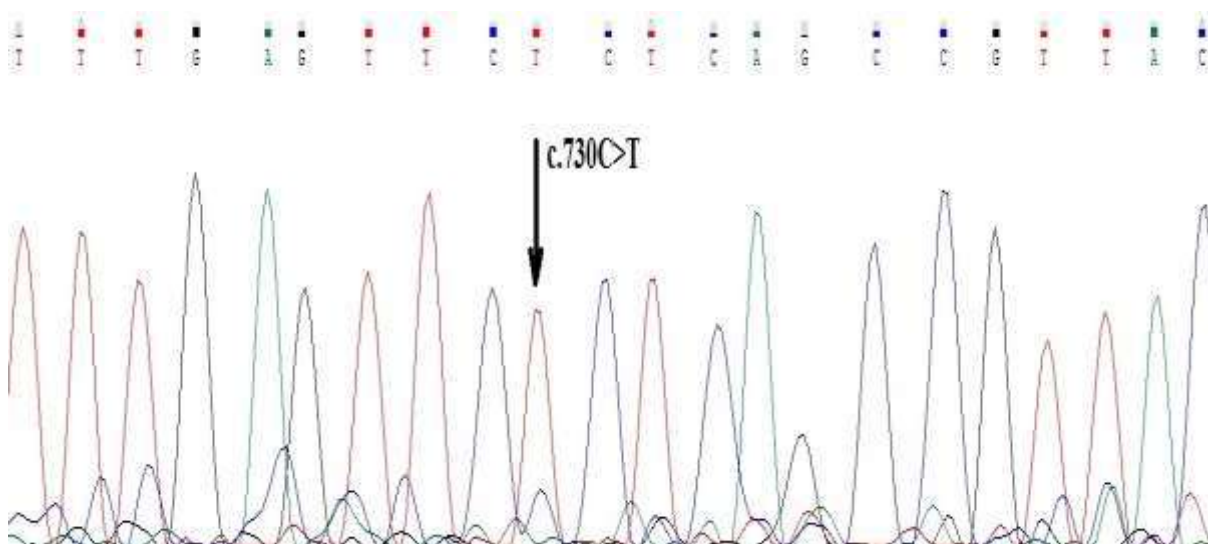
Obr. 2 Elektroforetogram s mutáciou c.1021T>G u pacientky SC3



Obr. 3 Elektroforetogram s mutáciou c.389G>A u pacientky SC8



Obr. 4 Elektroforetogram s mutáciou c.419T>G u pacientky SC8



Obr. 5 Elektroforetogram s mutáciou c.730C>T u pacientky SC3

Diskusia

Mutácie génu PTEN sa vyskytujú v seróznom papilárnom adenokarcinóme endometria aj v prípade pacientok v SR, čo ešte nebolo potvrdené v žiadnych verejných publikáciách. Dokonca je možné, že v našej populácii môžeme očakávať vyššiu frekvenciu mutácií PTEN génu ako je uvedené v medzinárodných databázach. V našom súbore pacientok sme mali 8 SC prípadov, z ktorých 3 niesli mutácie. Vo verejných publikáciách môžeme nájsť zatiaľ päť prípadov SC pacientok zo SR, u ktorých bola vykonaná sekvenčná analýza génu PTEN, v ich nádoroch sa PTEN mutácie nenašli (11). Takže v našej populácii bolo zatiaľ vyšetrených 13 žien a z nich 3 mali mutácie, čo prevyšuje medzinárodný štandard. SC je menej častým, ale oveľa agresívnejším typom karcinómu endometria. Hoci tvorí menej ako 10 % prípadov karcinómu endometria, je zodpovedný za oveľa väčší podiel úmrtí. Základom liečby SC je operačný zákrok nasledovaný chemoterapiou. Hlbšie pochopenie molekulárneho profilu týchto nádorov by mohlo viesť k vývoju účinnejších cielených terapií. Približne tretina

SC exprimuje vysoké hladiny HER2/NEU, čo je nádejným terčom biologických terapií. Tiež sa zistila v časti SC deregulácia PI3K/Akt/mTOR signálnej dráhy (hlavne cez aktivačné mutácie PI3K), a tým sa inhibítory tejto signálnej dráhy stali potenciálnymi terapeutickými činidlami (18). Strata funkcie PTEN vedie tiež k deregulácii signálnej dráhy PI3K/Akt/mTOR (19) a na základe našich výsledkov sa dá predpokladať, že by v našej populácii vyšetrenie génu PTEN mohlo poskytnúť relevantné informácie pre určenie najprospešnejšej terapie SC pacientok.

Záver

V populácii SR by bolo prospešné vyšetrenie génu PTEN v serózných papilárnych adenokarcinómoch endometria, pretože by potvrdil alebo vyvrátil podozrenie na dereguláciu signálnej dráhy PI3K/Akt/mTOR u niektorých pacientok, a tak by sa táto signálna dráha stala potenciálnym terčom úspešnejšej terapie alebo sa mohla pozornosť definitívne zamerať na iný cieľ.

PodĎakovanie

Práca vznikla vďaka podpore grantového výskumného projektu 2007/28-UK-05 MZ SR, ako aj vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie multidisciplinárneho centra pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES, ITMS 26210120041, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. **Mohan H.** Ženský pohlavný systém. Mohan H. Patológia. Bratislava, Balneotherma. 2015. ISBN 978-80-970156-6-4.
2. **Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, et al.** Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013, 497 (7447): 67-73.
3. **Longy M.** PTEN (phosphatase, tensin homolog deleted on chromosome ten). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 1999, 3 (3): 128-129. On line version: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/PTENID158.html>
4. **Lee JO, Yang H, Georgescu MM, et al.** Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 1999, 99 (3): 323–334.
5. **Konopka B, Janiec-Jankowska A, Paszko Z, Goluda M.** The coexistence of ERBB2, INT2, and CMYC oncogene amplifications and PTEN gene mutations in endometrial carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2004, 130 (2): 114–121. doi: 10.1007/s00432-003-0518-7.
6. https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue?wgs=off&sn=endometrium&ss=all&hn=carcinoma&sh=serous_carcinoma&in=t&src=tissue&all_data=n (28.10.2018)
7. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=5298> (28.10.2018)
8. **Ngeow J, Sesock K, Eng C.** Clinical Implications for Germline PTEN Spectrum Disorders. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2017, 46 (2): 503-517. doi: 10.1016/j.ecl.2017.01.013.
9. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=5255> (28.10.2018)
10. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=5033> (28.10.2018)
11. **Gbelcová H, Bakeš P, Priščáková P, et al.** PTEN Sequence Analysis in Endometrial Hyperplasia and Endometrial Carcinoma in Slovak Women. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)*. 2015; 2015: 746856. doi:10.1155/2015/746856.
12. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=921095> (28.10.2018)
13. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=5119> (28.10.2018)
14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/420743/> (28.10.2018)

15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/27541188/> (28.10.2018)
16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/493079/> (28.10.2018)
17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/7829/> (28.10.2018)
18. **Black JD, English DP, Roque DM, Santin AD.** Targeted therapy in uterine serous carcinoma: an aggressive variant of endometrial cancer. *Womens Health (Lond)* 2014, 10 (1): 45-57.
19. **Chalhoub N, Baker SJ.** PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009, 4: 127-150.

MORFOLOGICKÝ OBRAZ MULTICENTRICKÉHO LYMFÓMU NA OBLIČKÁCH U KONÍ

(The morphological picture of the multicentric lymphoma in equine kidneys)

Filip Korim¹, Viera Almášiová², Michaela Karamanová¹, Katarína Holovská²

¹*Klinika koní, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice,
filip.korim@student.uvlf.sk*

²*Ústav histológie a embryológie, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice*

Súhrn

V práci prezentujeme nález multicentrického lymfómu s odlišným makroskopickým nálezom na obličkách u dvoch koní. Mikroskopický nález preukázal difúzne infiltrácie neoplastických lymfocytov a lymfoblastov v celom parenchýme orgánu, poškodenie obličkových teliesok a močových kanálikov. V niektorých močových kanálikoch sme pozorovali poškodenie až úplnú absenciu epitelu. U prvého koňa bola morfológicky zmenená len ľavá oblička. U ďalšieho koňa boli morfológicky zmenené obe obličky. Diagnostika lymfómu u koní je obtiažna a terapia lymfómov u koní je obmedzená a je často len paliatívneho charakteru.

Kľúčové slová

lymfóm, oblička, patológia, kôň, multicentrický lymfóm

Summary

We presented cases of multicentric lymphoma in two horses with different macroscopic appearance in our study. We discovered diffuse infiltration of neoplastic lymphocytes and lymphoblasts in parenchyma of the kidneys. Glomeruli and distal tubules were damaged and epithelium was absent in some distal tubules. In the first case left kidney was morphologically changed. In the second case both kidneys were morphologically changed. Diagnostic of lymphoma in horses is complicated and therapy is limited and it's often palliative only.

Keywords

lymphoma, kidney, pathology, equine, multicentric lymphoma

Úvod

Lymfóm je nádor hematopoetického pôvodu malígneho charakteru, ktorý vzniká z rôznych foriem lymfocytov (10). Prvý krát bol lymfóm u koňa zaznamenaný v roku 1858, v súčasnosti je to jeden z najčastejšie diagnostikovaných nádorov hematopoetického pôvodu u koní (7,10). Podľa distribúcie lézií môžeme rozdeliť lymfómy na multicentrické, alimentárne, mediastinálne, kožné a solitárne nádory extranodálnych oblastí.

Makroskopicky sú neotvary lymfómu mäkké, šedo-žlté masy, ktoré sú na rezoch homogénnej štruktúry. V histopatologickom obraze sú viditeľné trámce okrúhlych nádorových buniek, ktoré deštruujú normálnu štruktúru postihnutých orgánov. Nádorové bunky sú podporované

fibrovaskulárnou strómou (2,5,6). V lymfatických cievach možno nájsť veľké množstvo proliferujúcich lymfoidných buniek B a T lymfocytov (9).

Metodika a materiál

V mesiacoch január a máj 2018 boli prijaté na Kliniku koní UVLF v Košiciach 2 kone (kobyľa 6r., plemeno quarter horse a valach 17r., plemeno shagya arab). Kobyľa z dôvodu straty apetítu a chudnutia, valach kvôli chronickému chudnutiu, dyspnoe a chronickej hnačke. Pre zlý zdravotný stav, kachexiu, rektálne palpovateľné brušné masy a infaustnú prognózu boli kone utratené. Ihneď po utratení bola vykonaná patologicko – anatomická pitva s následným odberom vzoriek na histopatologické vyšetrenie. Vzorky boli fixované v 10% neutrálnom formalíne a následne spracované rutinnou histologickou metodikou. Histologické preparáty boli ofarbené hematoxylínom – eozínom a vyšetrované pod svetelným mikroskopom Zeiss Axio Lab. A1 (Carl Zeiss AG, Germany) a na fotodokumentáciu bolo použité zariadenie Axio Cam ICc 5 (Carl Zeiss AG, Germany).

Výsledky

U oboch koní sme potvrdili multicentrický lymfóm. Patologicko- anatomický nález u 6 ročnej kobyly preukázal pevnú, homogénnu masu v brušnej dutine, ktorá zahrňovala ľavú obličku, slezinu a tenké črevá. Váha masy po vypreparovaní z brušnej dutiny bola 36,4 kg a masa bola prirastená na *m. psoas major*. Ľavá oblička sa adspekčne nedala vôbec identifikovať, jej prítomnosť indikovalo až vytekanie moču po narezaní časti masy. Pravá oblička nebola patologicky zmenená. Taktiež boli pozorované solitárne útvary na *crura diaphragmatis*. V histopatologickom obraze ľavej obličky sme pozorovali difúzne infiltrácie neoplastických lymfocytov a lymfoblastov podporených fibrovaskulárnou strómou v celom parenchýme orgánu. V kôre bol pozorovaný nepravidelný tvar obličkových teliesok a v dreni sme pozorovali deštrukciu močových kanálikov. Mitotická aktivita buniek bola pozorované zriedka.

Patologicko - anatomický nález u 17 ročného valacha preukázal svetlo – žlté, veľmi pevné, solitárne útvary na pľúcach, mediastíne, pečeni, slezine a obličkách. Pozorované útvary mali priemer cca 3,5 cm a vnárali sa do parenchýmu orgánu. Histopatologickým vyšetrením sme v oboch obličkách potvrdili lymfóm. Parenchým obličiek bol difúzne infiltrovaný neoplastickými lymfocytmi a lymfoblastmi, bez zaznamenananej mitotickej aktivity nádorovo zmenených buniek. V kôre sme pozorovali nepravidelný tvar obličkových teliesok a niektoré obličkové telieska boli úplne deštruované. V dreni boli prítomné dilatované krvné kapiláry a močové kanáliky. V tomto prípade sa tiež jednalo o multicentrický lymfóm.

Diskusia

Vo vyšetrovaných obličkách sme konštantne pozorovali výrazné lymfocytárne infiltrácie nádorovo zmenenými bunkami, ktoré boli prestúpené tenkými okrskami fibrovaskulárnej strómy. Na presnejšiu diagnostiku foriem nádorových buniek je potrebné imunohistochemické vyšetrenie, ktoré sme nevykonali, avšak na základe pozorovaní iných autorov predpokladáme, že sa jednalo prevažne o B lymfocyty (1,3,6). V niektorých prípadoch sa vzácne môže objaviť kalcifikácia steny aorty, veľkých ciev a parenchýmu obličky. Niektorí autori v nádorovo zmenených tkanivách pozorovali aj výskyt plazmatických buniek a makrofágov (6). V našom prípade sme zaznamenali výskyt týchto buniek len v červenej a bielej pulpe sleziny, v obličkách sme ich výskyt nepotvrdili. V nádorovo zmenených bunkách sme len ojedinele pozorovali odumieranie, avšak neidentifikovali sme či sa jedná o apoptózy, alebo nekrózy buniek.

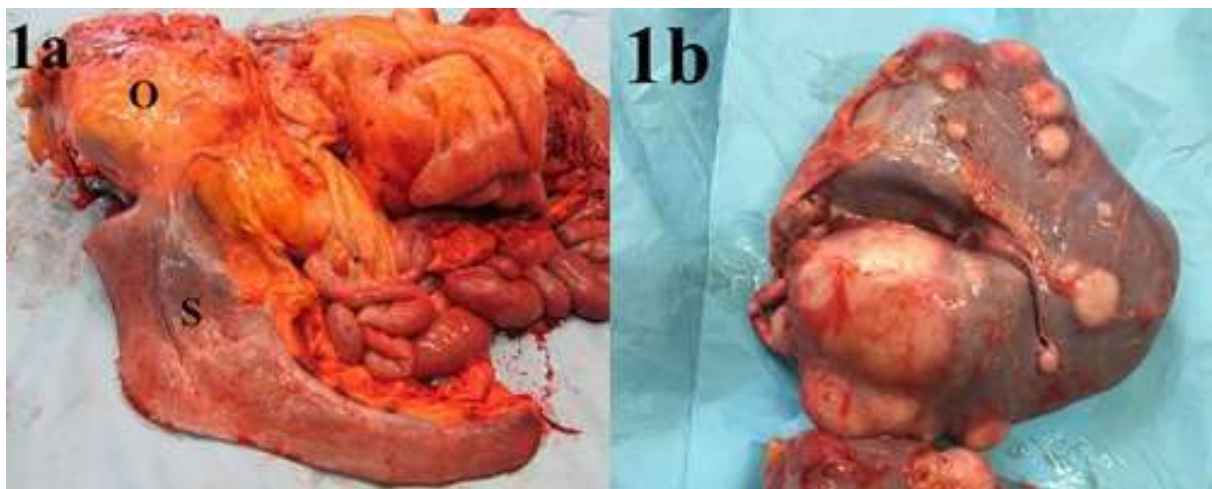
Zaujímavý je nález, že pravá oblička nebola v jednom prípade patologicky zmenená. Môžeme predpokladať vyššiu náchylnosť ľavej obličky kvôli komunikácii so slezinou pomocou *lig.*

lienorenale a možným cievnym anastomózam, ktoré podporujú rýchlejšie šírenie metastáz do ľavej obličky.

V súčasnosti je navrhnutých niekoľko liečebných postupov ,ktoré dokážu zmierniť utrpenie pacienta, avšak nedokážu zastaviť nezastavili progresiu ochorenia (4,8). Možnosť terapie lymfómu v hipiatrickej medicíne oproti humánnej medicíne a medicíne malých zvierat je výrazne limitovaná najmä lokalizáciou lézií, ich veľkosťou a neskorou diagnostikou a preto je terapia u koní často len paliatívneho charakteru.

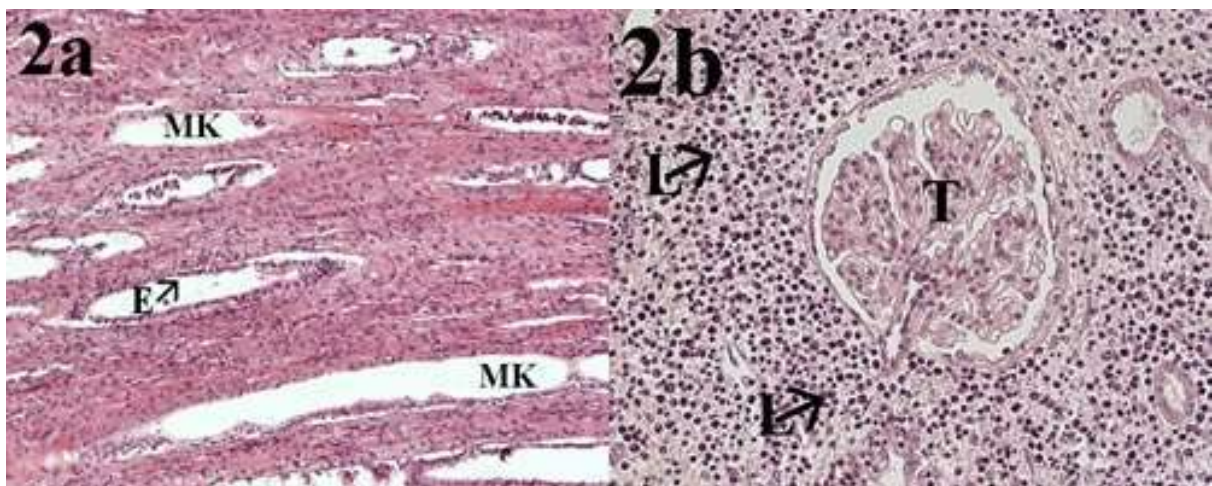
Záver

Môžeme konštatovať, že v oboch prípadoch malo ochorenie veľmi rýchly priebeh bez možnosti ďalšej terapie. Ďalším výskumom lymfómov, pochopením ich správania a používaním vhodných diagnostických metód môžeme výrazne zvýšiť šance na efektívnu terapiu. V súčasnosti existujú len veľmi málo záznamov o úplnom vyliečení koní z tejto choroby.



Obr. 1 Makroskopický nález

1a - masa izolovaná z brušnej dutiny u kobyly: O – oblička, S – slezina; 1b – pravá oblička u valacha



Obr. 2 Histopatologický nález z ľavej a pravej obličky

2a – dreň ľavej obličky: MK – močové kanáliky, E – epitel; 2b – kôra pravej obličky: T – obličkové teliesko, L – lymfocyty

Literatúra

1. **Henson, K.L., Alleman, A.R., Kelley, L.C., Mahaffey, E.A.** Immunohistochemical characterization of estrogen and progesterone receptors in lymphoma of horses. *Veterinary Clinical Pathology* 2000; 29, 40-46.
2. **Knottenbelt, D., Patterson – Kane, J., Snalune, K.** *Clinical equine oncology*, Elsevier, New York, USA, 2015; 720 pp.
3. **Kofler, J., Kubber-Heiss, A., Schilcher, F., 1998.** Cutaneous, multilocular T-cell lymphosarcoma in a horse - Clinical, ultrasonographic and pathological findings. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine* 1998; 45, 11-19.
4. **Munoz, A., Riber, C., Trigo, P. and Castejon, F.** Hematopoietic neoplasias in horses: Myeloproliferative and lymphoproliferative disorders. *J. Equine Sci.* 2009; 20, 59-72.
5. **Rhind, S.M., Dixon, P.M.** T cell-rich B cell lymphosarcoma in the tongue of a horse. *Veterinary Record* 1999; 145, 554-555.
6. **Siegers, E.W., van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.S., van den Wollenberg, L., Jansen, S., Teske, E., Ankringa, N., van den Belt, A.J.M., Westerman, C.M.** Advanced multicentric lymphoma in a Belgian Draft Horse mare. *Pferdeheilkunde* 2017; 33, 30-36.
7. **Theilen, G. and Madewell, B.** Leukemia-Sarcoma disease complex. In **Theilen, G., and Madewell, B.**: *Veterinary Cancer Medicine*. Lea & Febiger, Philadelphia 1979; 272-278.
8. **Valentine, B.A.** Neoplasia. In **Bertone J.J.**: *Equine geriatric medicine and surgery*. Saunders Elsevier, St Louis 2006; 147–167.
9. **Valli, V.E., Jacobs, R.M., Parodi, A.L.** Histological classification of haematopoietic tumours of domestic animals. In: **Armed Forces Institute of Pathology AROp, and The World Health Organization Collaborating Centre for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington, DC, eds.** Second Series 2000
10. **Valli V.E.** Haematopoietic system. In **Maxie, M.J.**: *Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals*. Elsevier Saunders, Philadelphia 2007; 107–324.

HETEROGÉNNA EXPRESIA CYTOKERATÍNOV V GLIOBLASTÓMOVÝCH LÍNIÁCH

(Heterogeneous expression of cytokeratins in glioblastoma cell lines)

Anna Perželová, Ivana Siváková, Peter Mráz, Eliška Kubíková

*Anatomický ústav, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava
anna.perzelova@fmed.uniba.sk*

Súhrn

Cytokeratíny (CK) sú intermediárne filamentá (IF) špecifické pre normálne a neoplastické epiteliálne bunky. Nedávno CK boli detekované v gliómoch s rôznym stupňom malignity. Avšak niektorí autori považujú pozitívne farbenie na CK v gliómoch za krížovú reaktivitu protilátok proti ďalším proteínom IF. V tejto štúdií sme vyšetrovali expresiu CK v dvoch nových glioblastómových líniách (170-MG-BA a 538-MG-BA). Subpopulácia CK pozitívnych buniek (3-5%) vznikla v bunkovej línii 538-MG-BA vo vyšších pasážach. Na druhej strane, CK pozitívne bunky sa vyskytovali v línii 170-MG-BA len vo včasných pasážach, kedy prevažne ploché bunky boli CK pozitívne. V tejto štúdií poskytujeme ďalší dôkaz o špecifickom farbení gliómových buniek s CK protilátkami a poukazujeme na heterogénnu expresiu CK.

Kľúčové slová

intermediárne filamentá, cytokeratíny, glioblastómy, bunkové línie

Summary

Cytokeratins (CK) are intermediate filaments (IF) specific for normal and neoplastic epithelial cells. Recently, CK were detected in gliomas with various degree of malignancy. However, some authors indicated that positive staining for CK in gliomas is due to cross-reactivity of antibodies to other IF proteins. In this study we examined CK expression in two new glioblastoma cell lines (170-MG-BA and 538-MG-BA). A CK-positive subpopulation (3-5%) arose in 538-MG-BA cell line at higher passages. On the other hand, CK-positive cells appeared in 170-MG-BA only in early passages where mainly flat cells were positively stained. In this study we demonstrate further evidence about specific glioblastoma staining with CK antibodies and we indicate the heterogeneous expression of CK.

Keywords

intermediate filaments, cytokeratins, glioblastoma, cell lines

Úvod

Gliómy s vysokým stupňom malignity (anaplastické astrocytómy a glioblastómy) sú primárne mozgové nádory s charakteristickým infiltratívnym rastom a pozoruhodnou heterogenitou bunkových populácií, ktorá je jedným z najzávažnejších problémov v neúspešnej liečbe glioblastómov (1). Na testovanie nových terapeutických prístupov a na výskum biológie a heterogenity gliómov sa najčastejšie používajú permanentné bunkové línie. Pred 20 rokmi sme získali prvé dve glioblastómové línie (8-MG-BA a 42-MG-BA), ktoré sa

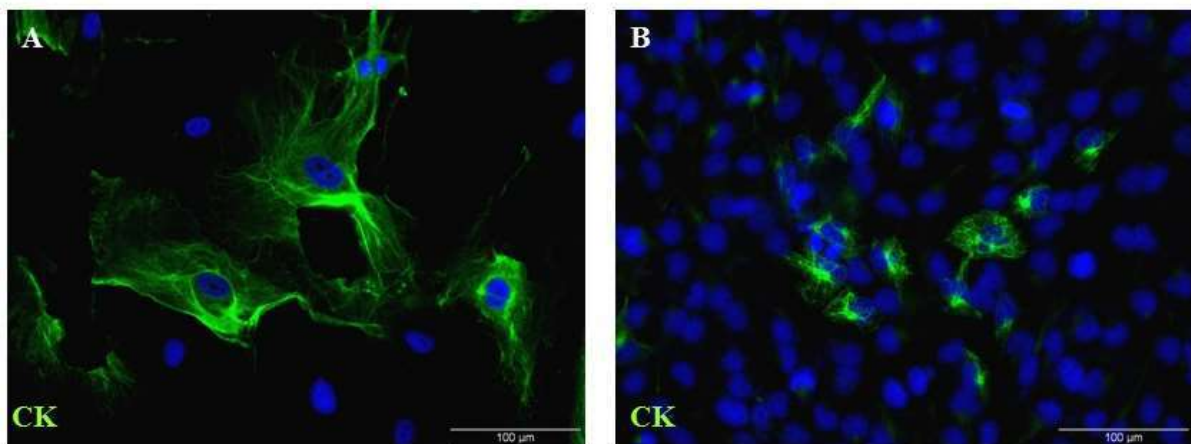
v súčasnosti používajú na výskumné účely vo viacerých našich a zahraničných pracoviskách (2). V priebehu posledných dvoch rokov sme etablovali ďalšie dve glioblastómové línie (170-MG-BA a 538-MG-BA). V tejto štúdií sme sledovali expresiu CK v nových glioblastómových líniách.

Materiál a metódy

Glioblastómové línie (170-MG-BA a 538-MG-BA) sme kultivovali v MEM médiu, ktoré obsahovalo neesenciálne aminokyseliny, L-glutamín a 10% fetálne teľacie sérum. Línie boli pasážované pomocou 0,2% EDTA a 0,25% trypsínu. Metanol/acetónom (1:1) fixované bunky, ktoré rástli na krycích sklíčkach sme vyšetřovali pomocou imunofluorescenčných metód. Na detekciu CK sme použili mixtúru monoklonálnych protilátok anti-pan CK (1,4,5,6,8,10,13,18,19). Bunky boli inkubované 1 hod. s primárnou a ½ hod. s vhodnou sekundárnou protilátkou. Jadrá boli farbené Hoechstom.

Výsledky

Glioblastómové bunkové línie sme vyšetřovali v priebehu dlhodobej kultivácie. Sledovali sme expresiu CK vo včasných pasážach (5-20), kedy sme v bunkovej línii 170-MG-BA pozorovali CK-pozitívne prevažne ploché bunky (Obr. 1 A). V línii 538-MG-BA sa CK-pozitívne bunky vo včasných pasážach nevyskytovali. V priebehu 40-50. pasáže sme detekovali subpopuláciu CK-pozitívnych buniek v línii 538-MG-MG, ktoré v 50. pasáži tvorili približne 3% (Obr. 1B). Pozoruhodné je, že v tomto kultivačnom období v línii 170-MG-BA, CK-pozitívne bunky úplne vymizli. Pomocou imunofarbenia s anti-pan CK protilátkami sa znázornili cytokeratínové vlákna nerovnomerne distribuované v cytoplazme glioblastómových buniek.



Obr. 1 Nepriama imunofluorescencia s anti-pan CK protilátkami. A: CK-pozitívne ploché bunky v línii 170-MG-BA. B: subpopulácia CK-pozitívnych buniek v línii 538-MG-BA.

Diskusia a záver

V predchádzajúcich štúdiách sme detekovali prítomnosť CK v glioblastómových líniách 8-MG-BA a 42-MG-BA (3). Taktiež sme zistili aj neočakávanú a v literatúre zatiaľ nepopísanú expresiu CK v tkanivových kultúrach z dospelého ľudského mozgového tkaniva a to v dominantnej populácii “glia-like“ buniek (4). V tejto práci popisujeme prítomnosť CK v ďalších nových glioblastómových líniách 170-MG-BA a 538-MG-BA. V prvých 8-MG-BA a 42-MG-BA líniách percento CK-pozitívnych buniek bolo konštantné ale v nových etablovaných líniách bola expresia CK odlišná. V línii 538-MG-BA sme prvé CK-pozitívne bunky pozorovali až v priebehu neskoršej kultivácie a naopak v línii 170-MG-BA v priebehu krátkodobej kultivácie.

V poslednom období však viaceré štúdie poukazujú na expresiu CK nielen v karcinómoch, ale aj v gliómoch s rôznym stupňom malignity (5, 6). Niektorí autori však považujú prítomnosť CK v gliómoch za krížovú reaktivitu medzi protilátkami farbiacimi IF (7). Imufluorescenčnou metódou sme potvrdili prítomnosť CK v glioblastómových líniiach. Analýzou distribúcie a štruktúry cytokeratínových vlákien v cytoplazme buniek sme potvrdili, že neočakávaná expresia CK v gliómoch a gliii nie je výsledkom krížovej reaktivity IF protilátok. Vplyvom kultivačných podmienok dochádza v kultúrach k rôznemu stupňu dediferenciácie buniek. Vzhľadom na ektodermálny pôvod epitelových a gliových buniek môže dediferenciácia indukovať variabilnú expresiu CK v kultivovaných bunkách

Literatúra

1. **Friedmann-Morvinski D.** Glioblastoma heterogeneity and cancer cell plasticity. *Crit Rev Oncog* 2014; 19: 327-336.
2. **Perzelova A, Macikova I, Mraz P, Bizik I, Steno J.** Characterization of two new permanent glioma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA. *Neoplasma* 1998; 45: 25-9.
3. **Macikova I, Perzelova A, Mraz P, Bizik I, Steno J.** Heterogeneity of keratin intermediate filaments expression in human glioma cell lines. *Neoplasma* 1999; 46: 390-393.
4. **Sivakova I, Perzelova A, Kubikova E, Mraz P.** Unexpected presence of cytokeratins in human "glia-like" cells. *Bratisl med J* 2013; 114: 274-278
5. **Cosgrove, M., Rich K.A., Kunin, S.A., Sherrod A.E., Martin, S.E.** Keratin intermediate filament expression in astrocytic neoplasms: Analysis by immunocytochemistry, Western blot, and Northern hybridization. *Mod Pathol* 1993; 6: 342-347.
6. **Hirato J., Nakazato, Y., Ogawa, A.** Expression of non-gliial intermediate filament protein in gliomas. *Clin neuropathol* 1994; 13: 1-11.
7. **Kriho, V.K., Yang, H.Y., Moskal, J.R., Skalli, O.** Keratin expression in astrocytomas: An immunofluorescent and biochemical reassessment. *Virchows Arch* 1997; 431: 139-147.

KOEXPRESIA GFAP A NESTÍNU V GLIOBLASTÓMOVÝCH LÍNIÁCH 170-MG-BA A 538-MG-BA

(Coexpression of GFAP and nestin in glioblastoma cell lines 170-MG-BA and 538-MG-BA)

Ivana Siváková, Anna Perželová, Eliška Kubíková, Peter Mráz

*Anatomický ústav, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava
ivana.sivakova@fmed.uniba.sk*

Súhrn

Intermediárne filamentá (IF) sa často používajú ako špecifické markerové proteíny na určovanie jednotlivých typov buniek. Použili sme imunofluorescenčné metódy na vyšetrenie koexpresie dvoch IF proteínov: gliový fibrilárny acidický proteín (GFAP) a nestín. GFAP je špecifický proteín pre bunky astrogliového pôvodu. Nestín je v súčasnosti považovaný za marker pre kmeňové nádorové bunky. Zistili sme vysoké percento nestín pozitívnych buniek v glioblastómových líniách 170-MG-BA a 538-MG-BA. Na druhej strane, GFAP pozitívne bunky boli prítomné len v línii 170-MG-BA vo včasných pasážach a kompletne vymizli po 20. pasáži. Dvojité farbenie znázornilo koexpresiu GFAP a nestínu v bunkovej línii 170-MG-BA. Táto štúdia demonštruje pozoruhodnú expresiu nestínu v oboch GFAP pozitívnych ako aj GFAP negatívnych glioblastómových bunkách.

Kľúčové slová

GFAP, nestín, intermediárne filamentá, glioblastómy

Summary

Intermediate filaments (IF) are often used as specific marker proteins for the detection of single cell-types. Using immunofluorescence methods we examined the co-expression of two IF proteins: glial fibrillary acidic protein (GFAP) and nestin. GFAP is specific protein for cells of astroglial origin. Nestin is currently considered as marker for cancer stem cells. We detected a high percentage of nestin positive cells in 170-MG-BA and 538-MG-BA glioblastoma cell lines. On the other hand, GFAP-positive cells were present only in the 170-MG-BA cell line in early passages and completely disappeared after passage number 20. Double labeling showed the co-expression of GFAP and nestin in 170-MG-BA cell line. This study demonstrate a remarkable nestin expression in both GFAP-positive and GFAP-negative glioblastoma cells.

Keywords

GFAP, nestin, intermediate filaments, glioblastoma

Úvod

Intermediárne filamentá (IF) majú vlákňitú štruktúru a tvoria súčasť cytoskeletu väčšiny eukaryotických buniek. Sú rozdelené do šiestich tried na základe biochemických

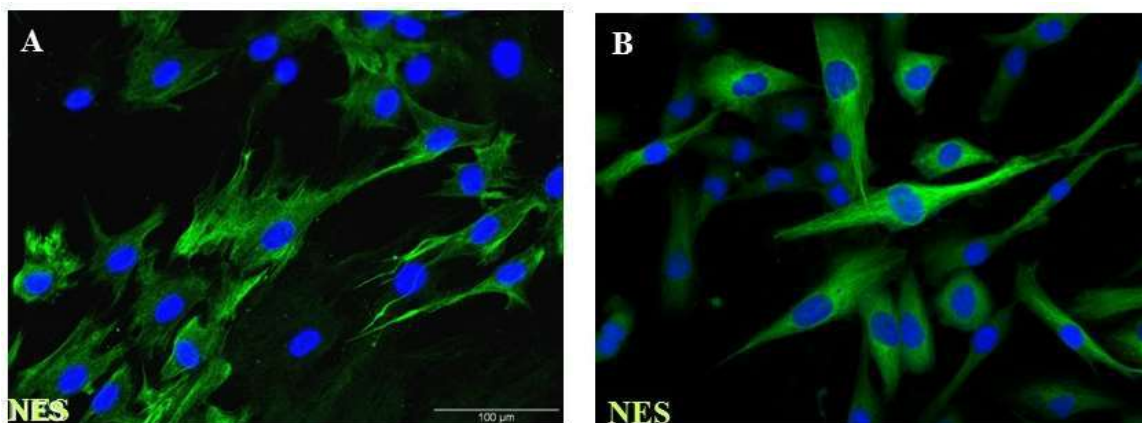
a imunochemických kritérií. Ich dôležitou funkciou je regulácia bunkových procesov spojená s diferenciáciou buniek. Využívajú sa v klinickej praxi, hlavne na diagnostiku nádorových ochorení a na určovanie stupňa malignity. GFAP je špecifický proteín charakteristický pre bunky astrogliového pôvodu. Pôvodne bol nestín identifikovaný ako markerový proteín pre neuroepiteliálne prekursorové bunky (1). Ďalšie štúdie poukázali na prítomnosť nestínu v gliových prekursorových bunkách (2). Expresiu nestínu sme detekovali aj v subpopulácii "glia-like" buniek v kultúrach z dospelého ľudského mozového tkaniva (3). V súčasnosti je nestín označovaný za markerový proteín pre kmeňové nádorové bunky (4). Jeho zvýšená hladina bola popísaná aj v gliómoch, hlavne glioblastómoch (5). Imunofluorescenčnými metódami sme sledovali koexpresiu GFAP a nestínu v nových glioblastómových líniiach (170-MG-BA a 538-MG-BA), ktoré sme etablovali v našom laboratóriu.

Materiál a metódy

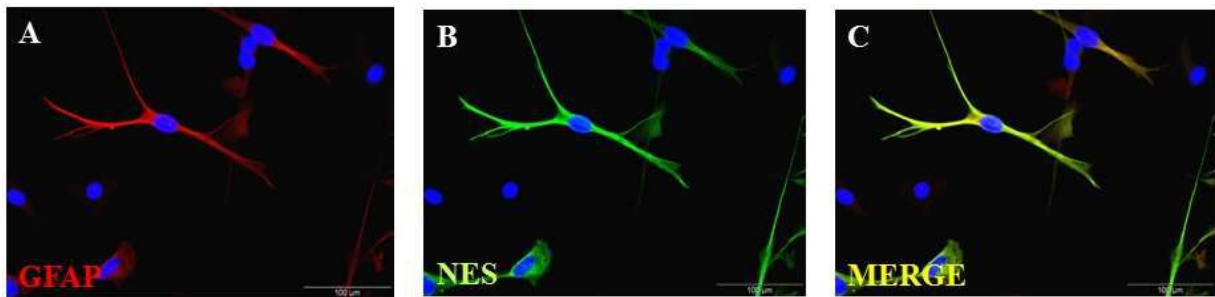
Glioblastómové línie 170-MG-BA a 538-MG-BA boli kultivované v médiu MEM, ktoré obsahovalo L-glutamín, neesenciálne aminokyseliny a 10% FCS. Línie boli pasážované dvakrát týždenne pomocou 0,2% EDTA a 0,25% trypsinu. Bunky na imunofluorescenčné vyšetrenia rástli na krycích sklíčkach a boli fixované v metanol:acetóne (1:1) 15 minút pri teplote -15°C . Fixované bunky sme použili na nepriamu a dvojitú imunofluorescenčnú analýzu s pomocou monoklonálnej protilátky proti GFAP (klon GF-01) a polyklonálneho séra proti nestínu. Bunky boli inkubované 1 hod. s primárnou protilátkou (riedenie 1:100) a 30 min. so sekundárnou protilátkou (riedenie 1:200). Jadrá boli farbené Hoechstom.

Výsledky

Nové glioblastómové línie sme označili ako 170-MG-BA a 538-MG-BA. Nepriamou imunofluorescenciou sme v uvedených líniiach sledovali dve IF. GFAP proteín sa nachádzal len v bunkovej línii 170-MG-BA. GFAP-pozitívne bunky tvorili 50-70% morfoloicky variabilnej populácie do 5. pasáže a postupne počet týchto buniek klesal. V 15. pasáži tvorili GFAP-pozitívne bunky 10-15% a tento pokles pokračoval až do úplného vymiznutia v priebehu 20. pasáže. V línii 538-MG-BA sme počas celej kultivácie nezistili žiadne GFAP-pozitívne bunky. Nestín sa nachádzal v oboch glioblastómových líniiach. Počet nestín pozitívnych buniek v línii 170-MG-BA bol do 20. pasáže 50-70%. Vo vyšších pasážach sa percento pozitívnych buniek mierne zvýšilo na 70-80% (Obr. 1A). V línii 538-MG-BA sme v priebehu celej kultivácie pozorovali konštantný počet nestín pozitívnych buniek, ktoré tvorili 70-80% (Obr. 1B). Dvojitou imunofluorescenciou sme zistili koexpresiu GFAP a nestínu v glioblastómovej línii 170-MG-BA (Obr. 2 A-C). Morfoloicky variabilné GFAP-pozitívne bunky napr. aj s dlhými tenkými vybežkami sa pozitívne farbili s nestínovými protilátkami.



Obr. 1 Glioblastómové línie v 50. pasáži, nepriama imunofluorescencia s nestínovými protilátkami. A: 170-MG-BA, B: 538-MG-BA.



Obr. 2 Glioblastómová línia 170-MG-BA v 5. pasáži, dvojitá imunofluorescencia. A: GFAP-pozitívne bunky, B: nestín pozitívne bunky, C: merge.

Záver

V glioblastómových líniách sme zistili výraznú heterogenitu v expresii GFAP, ktorý je považovaný za najvýznamnejší markerový proteín pre astrocyty a gliómy. GFAP-pozitívne bunky sa vyskytovali len v priebehu včasnej kultivácie v líni 170-MG-BA. Je pozoruhodné, že tento markerový proteín neexprimuje väčšina glioblastómových línií (6). IF nestín ktorý je považovaný za markerový proteín pre nádorové kmeňové bunky (4) bol stabilne prítomný vo väčšine glioblastómových buniek v oboch líniách. Dvojitou imunofluorescenciou sme potvrdili koexpresiu GFAP a nestínu v líni 170-MG-BA. Nestín bol exprimovaný aj v morfológicky diferencovaných GFAP-pozitívnych neoplastických astrocytoch. Imunofluorescenčné farbenia poukazujú na variabilnú expresiu GFAP a stabilnú expresiu nestínu v súvislosti s dlhodobou kultiváciou a morfológickou dediferenciáciou glioblastómových buniek.

Literatúra

1. **Frederiksen K, McKay RDG.** Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci* 1988; 8:1144-1151.
2. **Tohyama T, Lee VM, Rorke LB, Marvin M, McKay RD, Trojanovski JQ.** Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest* 1992; 66: 303-313.
3. **Perzelova A, Macikova I, Tardy M, Mraz P, Bizik I, Steno J.** Subpopulation of nestin positive glial precursor cells occur in primary adult human brain cultures. *Biologia* 2007; 62 (5): 633-640.
4. **Neradil J, Veselska R.** Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci*, 2015; 106 (7): 803-811.
5. **Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U.** Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res*, 1992; 52: 5334-5341.
6. **Restrepo A, Smith CA, Agnohotri S, Shekarforousch M, Kongkham PN, Seol HJ, Northcott P, Rutka JT.** Epigenetic regulation of glial fibrillary acidic protein by DNA methylation in human malignant gliomas. *Neuro-Oncol*, 2011; 13: 42-50.

IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCIA ANTIGÉNU p16 V MALÍGNYCH MELANÓMOCH

(Immunohistochemical detection of p16 antigen in malignant melanomas)

*Veronika Škuciová^{1,4}, Slávka Drahošová², Desanka Výbohová³,
Marian Adamkov⁴*

¹ Alphamedical s.r.o., Záborského 2, 03601 Martin, veronikaskuciova@gmail.com

² Hermes LabSystems, s.r.o., Bratislava, Púchovská 12, 831 06 Bratislava

³ Ústav anatómie JLFUK, Malá hora 4A, 03601 Martin

⁴ Ústav histológie a embryológie JLFUK, Malá hora 4A, 03601 Martin

Súhrn

Malígnym melanómom je závažné, rýchlo metastazujúce ochorenie. Skorá diagnostika a rýchle chirurgické odstránenie zlepšujú prežívanie pacientov. Histopatologická diagnóza vyžaduje skúsenosť vyšetrujúceho patológa, ktorý sa niekedy stretáva s diagnostickými rozpakmi pri rozlišovaní medzi benígnym névom, dysplastickým névom a malígnym melanómom.

Súbor 39 malígnych melanómov, vo forme archívnych formol-parafinových vzoriek, bol podrobený imunohistochemickej analýze s detekciou antigénu p16.

Strata expresie p16 bola signifikantne asociovaná s prítomnou ulceráciou ($p = 0,008$) a s väčšou hrúbkou tumoru podľa Breslawa ($p = 0,000$) v primárnych melanómoch. Taktiež bola spojená vyšším stupňom invázie podľa Clarka ($p = 0,006$), vyšším počtom mitóz na 1 mm^2 ($p = 0,000$) a nižšou intenzitou zápalového infiltrátu ($p = 0,040$) v primárnych melanómoch i metastázach.

V našom súbore je strata expresie proteínu p16 častým javom najmä v pokročilých melanómoch a metastázach s agresívnym správaním, čo potvrdzuje úlohu p16 ako tumor supresorového proteínu a podporuje význam imunohistochemickej detekcie proteínu p16 ako nezávislého diagnostického a prognostického markera v rámci histopatologického vyšetrovania malígneho melanómu.

Kľúčové slová

melanóm, metastáza, p16, imunohistochemia

Summary

Malignant melanoma is a serious disease with rapid metastatic spread. Early diagnosis and large surgical removal improve patients survival. Histopathologic diagnosis requires experience of examining pathologist, who sometimes face to diagnostic dilemmas with distinguishing between a benign nevus, a dysplastic nevus and a malignant melanoma.

Set of 39 formalin-fixed and paraffin embedded tumour samples were studied using immunohistochemical staining to detection of antigen p16.

Lack of p16 expression was significantly associated with the presence of ulceration ($p = 0,008$) and with Breslow tumour thickness ($p = 0,000$) in primary melanomas. There was also

negative correlation with Clark level of invasion ($p = 0,006$), mitotic activity on 1 mm^2 ($p = 0,000$) and lower intensity of inflammatory infiltrate ($p = 0,040$) in primary melanomas and metastasis.

Our data suggest that loss of p16 expression is more common in advanced melanomas and metastasis with more aggressive behavioral, which further substantiates the role of p16 as a major tumor suppressor and approves using of immunohistochemical determination of p16 as an independent diagnostic and prognostic marker in the histopathological investigation of malignant melanoma.

Keywords

melanoma, metastasis, p16, immunohistochemistry

Úvod

Malígnny melanóm je ochorenie s vysokou úmrtnosťou a celosvetovo stúpajúcou incidenciou. Podozrivé pigmentované lézie kože by mali byť urýchlene chirurgicky odstránené a histopatologicky vyšetrené. V niektorých prípadoch sa diagnostika komplikuje a vyjadrenie sa k dignite tumoru na základe samotnej morfológie nie je vždy jednoznačné (1-2). Použitie imunohistochemických metód, napríklad detekcie antigénu p16, môže diagnostický proces uľahčiť a naznačiť tiež prognózu ochorenia (2, 22, 23).

Tumor supresorový proteín p16, kódovaný génom CDK2NA ($p16^{INK4a}$), má dôležitú úlohu v regulácii bunkového cyklu. Spomaľuje prechod G1 fázy do S fázy prostredníctvom inhibičného efektu na cyklín D/CDK4-pRb dráhu (3,4). Alterácie génu CDKN2A sa podieľajú na tumorigenéze viacerých typov nádorov. Homozygotné delécie, bodové mutácie a metylácia promotéra spôsobujú inaktiváciu p16 génu a hrajú dôležitú rolu v patogenéze familiárneho melanómu. Niektoré ďalšie štúdie tvrdia, že i v sporadickom melanóme sa vyskytujú alterácie spomínaného génu (4). Expozícia slnečného UV žiarenia je známy činiteľ v etiológii mnohých kožných nádorov avšak strata funkcie p16 génu môže byť ešte skorším, prípadne súbežným faktorom pri genéze nádoru (5).

V našej práci sme skúmali prítomnosť expresie proteínu p16 v súbore 39 malígnych melanómoch v korelácii s klinickopatologickými i prognostickými aspektami ako je vek, pohlavie, lokalita, histopatologický typ melanómu, hrúbka nádoru, hĺbka invázie, prítomnosť ulcerácie, počet mitotických figúr a intenzita tumor infiltrujúcich lymfocytov.

Materiál a metodika

Pacienti a vzorky

Náš súbor predstavoval 39 malígnych melanómov od 38 pacientov. Vzorky boli vyšetrené na našom pracovisku od januára 2016 do februára 2018. Súbor predstavoval 33 primárnych melanómov rôznych histologických typov, prevažne kože (14 superficiálne sa šíriacich, 19 typu lentigo maligna) a 6 metastáz. Jedna metastáza bola z lymfatickej uzliny, dve boli prítomné v podkožnom tuku. V 2 prípadoch metastáz išlo o ložiská v podkoží, v ktorých nebolo možné jednoznačne určiť, či sa jedná o metastázu alebo prípadný nodulárny melanóm. V ďalšom prípade ložiska v podkoží sa nedalo jednoznačne rozlíšiť, či ide o recidívu alebo metastázu melanómu. Všetky tri sporné prípady sme ponechali v kategórii metastáz.

Spracovanie vzoriek

Bioptické vzorky boli štandardne formalínom fixované a zaliate parafínom. Následne boli narezané na hrúbku $4 \mu\text{m}$, štandardne spracované a ofarbené hematoxylin eozínom. Pri hodnotení sme použili svetelný mikroskop (Olympus CX31).

Klinickopatologické aspekty

Pri každej vzorke malígneho melanómu boli zaznamenané nasledujúce premenné: a) primárny tumor/metastáza, b) histopatologický typ melanómu, c) vek pacienta v čase stanovenia

diagnózy, d) pohlavie, e) prítomnosť ulcerácie, f) hĺbka invázie podľa Clark et al. (6), g) hrúbka tumoru podľa Breslow (7), h) počet mitóz na 1 mm², i) intenzita zápalového infiltrátu (0 až +++), j) intenzita pigmentu (0 až +++), k) lokalizácia (hlava a krk, končatiny, trup).

Imunohistochemia

Po vybratí vhodných tkanivových blokov sme vykonali imunohistochemickú detekciu použitím Ventana BenchMark Ultra (Roche). Proteín p16 sme detekovali monoklonálnou protilátkou, (E6H4 Roche), použitím štandardných automatických metód. Vizualizácia prebehla vďaka naviazaniu chromogénu 3,3-diaminobenzidínu (DAB). Nakoniec sme vzorky opäť hodnotili svetelným mikroskopom (Olympus CX31).

Hodnotenie p16

Hodnotili sme jadrovú, prípadne i pridruženú cytoplazmatickú pozitivitu melanoblastov. Ako pozitívne sme určili všetky prípady so zaznamenanou difúznou alebo fokálnou expresiou. Stratu expresie sme hodnotili ako negativitu. Ako internú pozitívnu kontrolu sme využili fokálnu p16 pozitivitu buniek ekrinných potných žliaz v koži (8).

Výsledky

39 malígnych melanómov bolo vyšetrených na prítomnosť antigénu p16.

p16	SPF	LMM	MTS/nodulárne	spolu
negatívne	7	5	6	18
pozitívne	7	14	0	21
spolu	14	19	6	39

Tab.1 Expresia p16 v jednotlivých typoch MM

Imunohistochemické farbenie p16 bolo v prípade pozitívnych malígnych melanómov prevažne homogénne a viazané na jadro. Niekedy sa vyskytla navyše i cytoplazmatická pozitivita. V niektorých prípadoch bolo prítomné zafarbenie nehomogénneho charakteru, najmä mozaikovitého vzoru.

Viac ako polovica prípadov (n = 21; 53,8%) bola fokálne či difúzne pozitívna, pričom vždy sa jednalo o primárny melanóm. Spomedzi primárnych melanómov (n = 33) bolo pozitívnych 21 prípadov (63,6 %). V žiadnej z metastáz (n = 6; 0 %) sa nevyskytla pozitivita expresie p16.



Obr. 1 Imunohistochemické farbenie p16 v malígnych melanómoch

a) silná pozitivita v LMM, b) silná pozitivita v SPF, c) strata expresie p16 v metastáze MM.

Absencia expresie p16 bola signifikantne spojená s prítomnou ulceráciou (negatívna korelácia $r = -0,42$, $p = 0,008$) v primárnych melanómoch. Expresia p16 negatívne koreluje v hrúbkou tumoru podľa Breslowa ($r = -0,54$, $p = 0,000$), hĺbkou invázie podľa Clarka ($r = -0,43$, $p = 0,006$) a počtom mitóz na 1 mm² ($r = -0,64$, $p = 0,000$). Pozitívna korelácia bola zaznamenaná s prítomným zápalovým infiltrátom ($r = 0,32$, $p = 0,040$). Ostatné sledované klinickopatologické aspekty (vek, pohlavie, pigment a lokalizácia) nemali v našom súbore s expresiou p16 žiadny vzťah.

Diskusia

Všeobecným pravidlom zostáva, že p16 expresia je zachovaná v benígnych névoch a v malígnych melanómoch často dochádza ku strate expresie. Jednako však veľa malígnych melanómov zostáva p16 pozitívnych, preto p16 pozitivita neposkytuje jednoznačný dôkaz benignity melanocytárnej lézie (2, 9, 10, 12, 13, 19, 21).

V našej štúdií sme sa sústredili na hodnotenie jadrovej positivity, keďže cytoplazmatická pozitivita je vo výsledkoch niektorých štúdií hodnotená ako kontroverzná a nešpecifická (5, 9, 19, 20).

Viac ako polovica prípadov z nášho súboru melanómov bolo pozitívnych na expresiu proteínu p16 (n = 21; 53,8%). Spomedzi primárnych melanómov (n = 33) bolo pozitívnych 21 prípadov (63,6 %). V iných štúdiách percento pozitívnych prípadov variovalo medzi 12 až 93 % (5, 9 - 14). V žiadnej z metastáz nášho súboru (n = 6; 0 %) sa nevyskytla pozitivita expresie p16. Iné štúdie udávajú p16 pozitivitu metastáz od 0 do 71% (9, 12, 14-18). Každá z vybraných štúdií posudzuje expresiu p16 iba ako pozitívnu alebo negatívnu. Porovnanie je však limitované subjektívnou interpretáciou výsledkov, použitím neštandardizovaných laboratórných techník, druhom protilátky a inými faktormi.

Strata jadrovej positivity p16 bola v našom súbore signifikantne spojená s prítomnosťou nádorovej ulcerácie, vyšším stageom (Clark level invázie), väčšou hrúbkou invázie (Breslow), vyšším počtom mitóz a menším množstvom lymfocytového infiltrátu. Ohľadom prítomnosti ulcerácie mal rovnaké zistenia Straume et al. (4), avšak ich výsledky ohľadom expresie p16 vo vzťahu s hrúbkou tumoru (Breslow) a Clark levelom invázie boli s našimi výsledkami nekonzistentné. V práci sa navyše pojednáva o silnej asociácii straty p16 so schopnosťou melanómu vaskulárnej invázie a tým i horšej prognóze ochorenia. V práci Talve et al. (5) rovnako popisuje stratu expresie p16 v malígnych melanómoch asociovanú s invazívnym stageom, navyše ju spája aj so zvýšeným proliferatívnym potenciálom tumoróznych buniek. Pavey et al. (22) rovnako ako my asociove stratu p16 expresie s vyšším Clark levelom, väčšou hrúbkou tumoru i vysokým mitotickým indexom, avšak postráda asociáciu s ulceráciou či lymfocytovým infiltrátom. Štúdia Lade-Keller et al. (23) spája absenciu p16 expresie s nepriaznivými prognostickými faktormi ako je ulcerácia, pokročilý tumorózny stage a väčšia hrúbka tumoru (Breslow), ale vyjdruje sa i k nepriaznivému celkovému prežívaniu (OS) a krátkemu obdobiu prežívania bez tvorby vzdialených metastáz (DMFS) pri strate p16 expresie, dokonca nezávisle od prítomnosti ulcerácie, tumorózneho stageu a hrúbky nádoru.

Z molekulárneho hľadiska, niektorí autori (9, 24) podporujú možnosť, že strata expresie p16 nie je pre iniciáciu melanómagenézy nevyhnutná, pretože väčšina melanómov v in situ štádiu a primárnych invazívnych melanómov v ich súboroch mala zachovanú expresiu p16. Niektoré iné práce naopak tvrdia, že p16 stojí na začiatku procesu (5, 19, 25). Keller-Melchior et al. (21) pripúšťa, že hoci strata p16 expresie koreluje s progresiou ochorenia, nie je prítomná v iniciačnom štádiu. Väčšina štúdií sa však zhoduje, že postupná strata p16 súvisí s progresiou nádorového ochorenia (14), čo sa zhoduje i s našimi závermi.

Ak uvažujeme, že strata expresie p16 proteínu znamená i stratu supresorovej funkcie p16, v svetle našich výsledkov možno záverom konštatovať, že strata p16 nemusela byť na začiatku malígneho zvrhávania a pravdepodobne k nej došlo počas progresie tumoru. V našom súbore je spojená s agresívnejším správaním malígnych melanómov a naznačuje tým i horšiu prognózu ochorenia.

Záver

Použitie imunohistochemického markera p16 v kontexte s hodnotením morfológie, prípadne použitím ďalších imunohistochemických vyšetrení, predstavuje nápomocnú metódu pri určovaní dignity a progresívnosti melanocytárnych lézií a nepriamo sa vyjdruje i k prognóze

pacientov. Jeho využitie by potenciálne malo byť rutinnou súčasťou diagnostického procesu každej podozrivej melanocytárnej lézie.

Literatúra

1. **Fast Stats: An interactive tool for access to SEER cancer statistics.** Surveillance Research Program, National Cancer Institute. <https://seer.cancer.gov/faststats>. (Accessed on 10-10-2018).
2. **Uguen A, et al.** A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Diagn Pathol.* 2015;10:195.
3. **"Entrez Gene: CDKN2A cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)".**
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1029>. (Accessed on 10-10-2018).
4. **Straume O, Sviland L, Akslen LA.** Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1845–53.
5. **Talve L, et al.** Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer.* 1997; Jun 20;74(3):255-9.
6. **Clark W. J., From L., and Bernardino E.** The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969; 29: 705–727.
7. **Breslow, A.** Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surg.* 1970;172:902–908.
8. **Tsujita J. et al.** Immunohistological Expression of p16INK4a is Commonly Present Both in Benign and Malignant Sweat Gland Neoplasias. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 2015 Dec;106(12):323-
9. **Reed JA, et al.** Loss of expression of the p16/cyclindependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res.* 1995;55(13):2713–2718.
10. **Wang YL, et al.** Immunohistochemical detection of CDK4 and p16INK4 proteins in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 1996;134(2):269–275.
11. **Sini MC, et al.** Molecular alterations at chromosome 9p21 in melanocytic naevi and melanoma. *Br J Dermatol.* 2008;158(2):243–250.
12. **Funk JO, et al.** p16INK4a expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma. *J Cutan Pathol.* 1998;25(6):291–296.
13. **Demirkan NC, et al.** The effect of the sun on expression of beta-catenin, p16 and cyclin d1 proteins in melanocytic lesions. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32(6):733–739.
14. **Koh SS and Cassarino DS.** Immunohistochemical Expression of p16 in Melanocytic Lesions: An Updated Review and Meta-analysis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* 2018;142(7):815-828.
15. **Piccinin S, et al.** p16/CDKN2 and CDK4 gene mutations in sporadic melanoma development and progression. *Int J Cancer.* 1997;74(1):26–30.
16. **Alonso SR, et al.** Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarraybased study. *Am J Pathol.* 2004;164(1):193–203.
17. **Sanki A, et al.** Reduced expression of p16 and p27 is correlated with tumour progression in cutaneous melanoma. *Pathology.* 2007; 39(6):551–557.
18. **De Sa´ BC, et al.** Proteins involved in pRb and p53 pathways are differentially expressed in thin and thick superficial spreading melanomas. *Melanoma Res.* 2009;19(3):135–141.

19. **Sparrow LE, et al.** p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am. J. Dermatopathol.*, 20: 255–261, 1998.
20. **Geradts J, et al.** Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INK4A in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. *Cancer Res.* 1996;55: 6006–6011.
21. **Keller-Melchior R, Schmidt R, Piepkorn M.** Expression of the tumor suppressor gene product p16INK4 in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol.* 1998; 110: 932-8.
22. **Pavey SJ, et al.** Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion, *Melanoma Res.* 2002;12(6):539–547.
23. **Lade-Keller J, et al.** Immunohistochemical analysis of molecular drivers in melanoma identifies p16 as an independent prognostic biomarker. *Journal of Clinical Pathology* 2014;67:520-528.
24. **Stefanaki C, et al.** G1 cell cycle regulators in congenital melanocytic nevi: comparison with acquired nevi and melanomas. *J Cutan Pathol.* 2008;35(9):799–808.
25. **De Andrade BA, et al.** Immunohistochemical expression of p16, p21, p27 and cyclin D1 in oral nevi and melanoma. *Head Neck Pathol.* 2012 Sep;6(3):297–304.

III. UROLÓGIA

CHLOPŇA ZADNEJ URETRY

(Posterior urethral valve)

***Simona Zaťkuliaková, Petra Ďubjaková, Oľga Novotná,
Kristína Leiva Demetrová, Ján Breza, Kvetoslava Slobodníková***

*Klinika pediatrickej urológie LFUK A NÚDCH, Limbová 1, 833 40 Bratislava,
petra.dubjakova@gmail.com*

Súhrn

Chlopne zadnej uretry stále zostávajú veľmi závažným problémom v detskej urológii, ktorý svojim charakterom ovplyvňuje renálne funkcie aj v dospelosti. Ide o vrodenú obštrukciu lokalizovanú v zadnej uretre chlapcov, ktorá spôsobuje trvalé zmeny močového traktu a to napriek adekvátnej liečbe. Najťažšie stupne ohrozujú pacienta v neonatálnom období pľúcny zlyhaním, ktoré je dôsledkom pľúcnej hypoplázie. Poškodenie renálnych funkcií má veľkú variabilitu, podľa UK Transplant Registry až 25-30% pacientov s chlopňou zadnej uretry sa stávajú kandidátmi pre dialýzu, či transplantáciu liečbu už v detskom veku (1).

Kľúčové slová

chlopňa zadnej uretry, obštrukcia, renálna dysplázia, pulmonálna dysplázia, transplantácia liečba

Summary

Posterior urethral valve remain very serious problem in pediatric urology which affects renal function even in adulthood. Valve causes obstruction in posterior uretra of boys and permanent permanent changes of urogenital system despite of adequate treatment. The most severe cases endanger neonates by pulmonary failure as consequence of pulmonary hypoplasia. Damage of renal function has great variability, according to the UK Transplant Registry, up to 25-30% of patients with the valve are becoming candidates for dialysis or transplantation treatment already in childhood.

Keywords

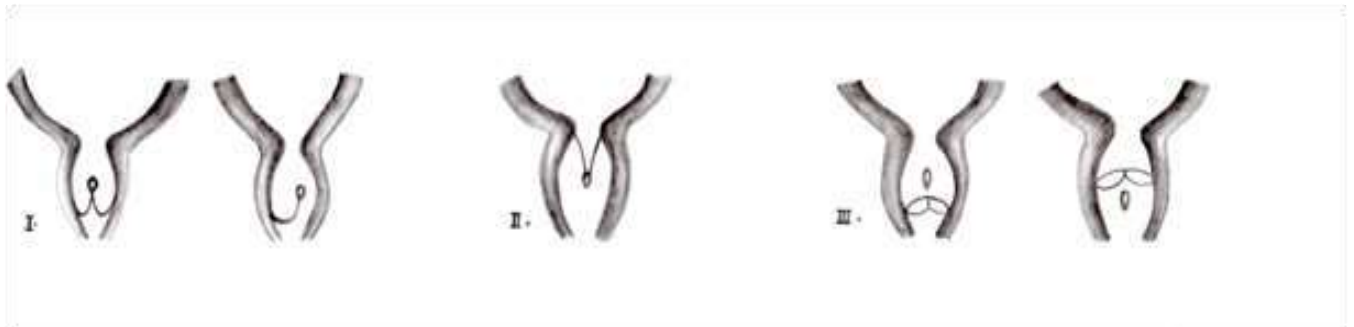
posterior urethral valve, obstruction, renal dysplasia, pulmonary dysplasia, transplantation therapy

Incidencia a klasifikácia

Chlopňa zadnej uretry sa môže prezentovať v rôznom veku, s rôznym stupňom renálneho poškodenia a rôznorodými mikčnými ťažkosťami.

Incidencia ochorenia zostáva stabilná, teda 1 z 5000 chlapcov. Jej dedičnosť nie je potvrdená, rovnako ako embryologický mechanizmus. Predpokladá sa, že vzniká okolo 8 gestačného týždňa a pravdepodobne sa spája s abnormálnou inzerciou mesonefritického ductu do kloaky. Chlopňu ako prvý klasifikoval Hugh Hempton Young v r. (1919) na základe pitevných nálezov. Názov vychádza z Youngovho pozorovania, že anomália sa správa ako jednocestná chlopňa. Potvrdil voľný prechod tekutiny retrográdne z meatu do močového mechúra, na rozdiel od antegrádneho smeru, kedy prekážka spôsobuje obštrukciu (2).

V súčasnosti sa považuje za chlopňu typ I a III. A podľa niektorých autorov je typ I len variáciou typu III. Chlopne druhého typu z klasifikácie vypadli, lebo nespôsobujú obštrukciu.



Obr. 1 Klasifikácia chlopní

I. odstupuje od kolikulu ako riasa, ktorá sa spája v strednej čiare proximálne od priečne pruhovaného zvierača. V anteriórnej časti spojenie nie je úplné, (hoci podľa niektorých teórií dochádza k vytvoreniu kanála v prednej časti uretry až sekundárne po inštrumentálnom zásahu v uretre). Predstavuje 90- 95% chlopní. Hrúbka membrány varíruje (rigidná, tenká,..), tak isto kvantita obštrukcie, býva rozličná.

II. Typ II je neobštrukčný, slizničné riasy prebiehajú od kolikulu k hrdlu m. mechúra. Vznikajú hypertrofiou svalstva povrchového trigona a prostatickej uretry ako odpoveď na distálnu obštrukciu (striktúry uretry, detrussorovo-sfynkterická dyssynergia. Nepovažujú sa za pravé chlopne.

III. Typ III predstavuje 5-10% a vytvára obvodový prstenec, malý otvor sa nachádza v strede. Membrána je prítomná distálne od kolikulu v rôznej úrovni zadnej uretry.

Patofyziológia

Obštrukcia v zadnej uretre ovplyvňuje všetky vyššie etáže močových ciest nad obštrukciou, ktorých klinická závažnosť je veľmi variabilná.

V prípade normálneho vývoja sa mechúr cyklicky naplňa a vyprázdňuje. Tento mechanizmus vedie k vývoju mechúra s normálnou akomodáciou(compliance). V prípade subvezikálnej prekážky sa rozvíja porucha cyklického vyprázdňovaniu mechúra, čím je narušený jeho vývoj. Samotný rozvoj zmien prebieha v 3 štádiách (3).

V iniciálnej fáze narastá hrúbka steny močového mechúra a jeho kapacita. Postupne sa zvyšuje tlak v močovom mechúri, ktorý je potrebný na jeho vyprázdňovanie. V tejto kompenzátornej fáze sú zmeny ešte reverzibilné. Ak obštrukcia pretrváva, nastáva progresia postmikčného rezidua a destabilizácia močového mechúra, teda fáza dekompenzácie. V tejto fáze je už v močovom mechúri aj vysoký uskladňovací tlak.

Kľúčovým miestom je ureterovezikálne spojenie, ktoré chráni močovod a obličku pred pôsobením tlaku počas kontrakcie močového mechúra. Postupnou dekompenzáciou ureterovezikálneho spojenia sa tlak prenáša na horné močové cesty, čo spôsobí renálne poškodenie.

K poškodeniu dochádza vysokým tlakom, ale v prenatalnom období je dôležitým faktorom aj dysplázia renálneho parenchýmu. Viacerými štúdiami sa podarilo dokázať, že po vyvolaní obštrukcie u zvieracích embryí došlo k dysplastickým zmenám na parenchýme obličiek(18).

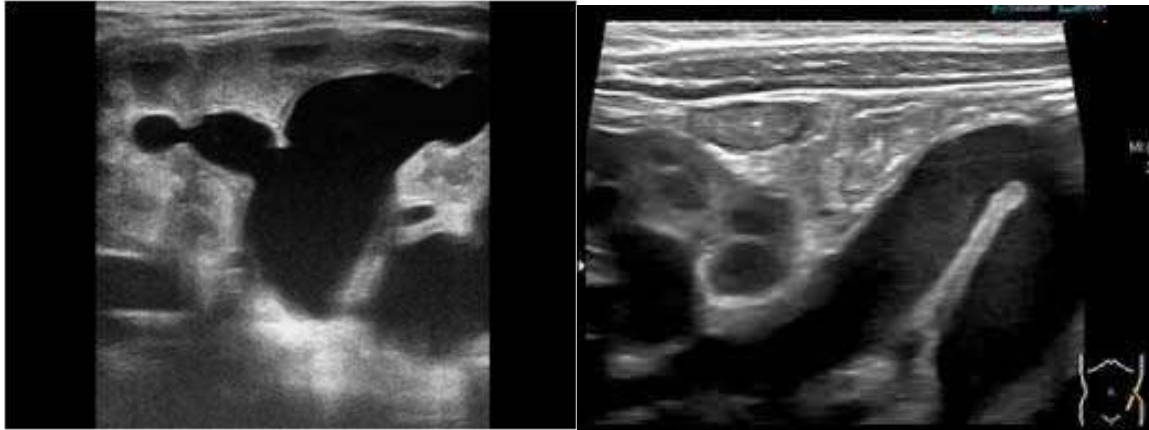
Práve dysplastické zmeny sú kľúčové v ďalšom priebehu ochorenia, kedy časť pacientov smeruje do štádia renálnej insuficiencie aj napriek adekvátnej terapii.

K závažným zmenám však dochádza aj pri vývoji pľúcneho parenchýmu a to u pacientov s výraznou obštrukciou, ktorá vedie k oligohydramnionu a tým k pľúcnej hypoplázii.

Diagnostika

S rozvojom ultrasonografie je väčšina pacientov diagnostikovaná už v prenatalnom období. Typický ultrasonografický nález predstavuje bilaterálna, resp. unilaterálna ureterohydronefróza, s naplneným močovým mechúrom a so zhrubnutou stenou, je dilatovaná zadná uretra tzv key hole sign. V tomto období sa môže jednať aj o iné príčiny. V prípade oligohydramnionu je však diagnóza veľmi suspektná. Ultrasonografické vyšetrenie do 24 týždňa gestácie sa neodporúča, môže byť prehliadnuté. V ojedinelých prípadoch je možné v tomto období využiť MRI vyšetrenie.

Ultrasonografia je tiež základným zobrazovacím vyšetrením v postnatálnom období, nález býva často totožný s prenatalným.



Obr. 2, 3 Ultrasonografický obraz dilatovaného dutého systému obličky, dilatovaný, tortuózný močovod.

V dôkaze chlopne zadnej uretry má význačné postavenie mikčná cystouretografia, ktorá zobrazí trabekulizáciu močového mechúra, rozšírenie hrdla močového mechúra so zúžením v distálnej časti prostatickej uretry, bočná projekcia často odhalí chlopňu. Mikčná uretrocystografia by mala byť realizovaná u každého pacienta s podozrením na chlopňu zadnej uretry. Zároveň potvrdí prípadný reflux, eventuálne divertikulum močového mechúra. Vezikorenálny reflux je prítomný až u 50% pacientov, býva spojený s renálnou dyspláziou. Jeho prítomnosť sa považuje za priaznivý faktor (tzv pop off mechanizmus).

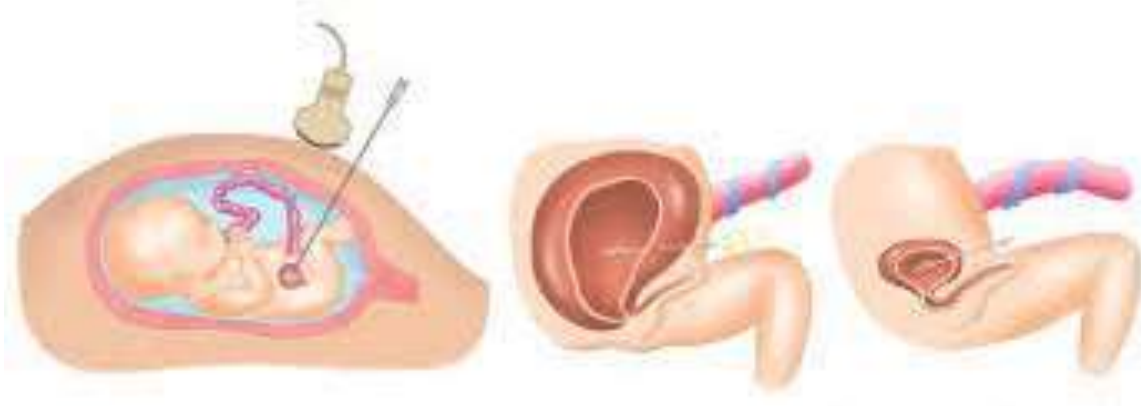


Obr. 4 Mikčná cystouretografia s bilaterálnym refluxom a dilatovanou zadnou uretrou.

Dôležitú úlohu v posúdení renálnych funkcií má rádionuklidové vyšetrenie. Používa sa MAG3(merkaptacetylglýcil), ktoré sa považuje za štandard, lebo poskytuje informáciu o funkčnosti renálneho parenchýmu a zároveň jeho zobrazenie.

Terapia

S včasnou diagnostikou, teda už v prenatalnom období (40-60% pacientov) súvisí aj rozvoj prenatalnej intervencie už v 80 rokoch minulého storočia. Vychádzal z predpokladu, že skorý zásah zlepši prognózu pacientov. Veľké multicentrické štúdie dokázali, že táto terapia je indikovaná len v úzkej skupine pacientov, najmä tých, ktorí sú ohrození pľúcnou hypopláziou dôsledkom oligohydramnionu. Ani včasný zásah totiž nevie zvrátiť renálnu hypopláziu a zavedenie vezikoamniotického shuntu so sebou nesie vysoké riziká (komplikácie 21-59%, mortalita 33-43%).



Obr. 5 Prenatálna intervencia, zavedenie vezikoamniotického shuntu

Postnatálny manažment pacienta s chlopňou zadnej uretry závisí od niekoľkých faktorov. Dôležitá je pľúcna funkcia. Pacient s potvrdenou hypopláziou pľúc a prípadnou prematuritou vyžaduje najmä manažment neonatologický, z urologického hľadiska je v tomto štádiu indikované zavedenie permanentného katétra do stabilizácie stavu novorodenca.

U pacientov bez pľúcnej hypoplázie je indikovaná iniciálna drenáž permanentným katétrom, eventuálne suprapubickým katétrom a po mikčnej cystourethrografii a stabilizácii pacienta sa vykonáva cystoskopické vyšetrenie a ablácia chlopne zadnej uretry.



Obr. 6 Cystoskopický nález chlopne zadnej uretry, naznačené miesta discízie.

U pacientov, ktorí nie sú vhodní na discíziu chlopne z dôvodu prematurity so zhoršenými renálnymi hodnotami je za metódu voľby považovaná vezikostómia, umožňuje zníženie tlaku v močovom mechúri a zachovanie cyklického plnenia močového mechúra, ďalej umožňuje reštitúciu renálnej funkcie(4,5). Dočasná vezikostómia vedie k zlepšeniu a stabilizácii močových ciest u viac ako 90% pacientov. Obavy z ovplyvnenia kapacity močového mechúra sa nepotvrdili.

Dočasná supravetikálna derivácia moču zostáva metódou voľby u pacientov so závažnejším postihnutím, respektíve s nedostatočnou odpoveďou na deriváciu moču v mechúrovej úrovni. Rozhodnutie o supravetikálnej derivácii je závislé od mnohých faktorov, teda renálnej funkcie, infekcie, stupňa ureterohydronefrózy. Práve novorodenecké obdobie sa považuje za kritické na zotavenie a pokračovanie renálneho vývoja. Iniciálne derivácia moču vedie k zlepšeniu renálnych parametrov a umožňuje fyziologickejšie podmienky pre zotavenie, aj keď v súčasnosti nie je z dlhodobého hľadiska potvrdená lepšia prognóza renálnych funkcií. Rozhodnutie o suprapubickej derivácii moču po predchádzajúcej discízii chlopne závisí najmä od hodnoty kreatinínu v sére, nakoľko reštitúcia ureterohydronefrózy si vyžaduje niekoľko mesiacov, taktiež od závažnosti nálezu v močovom mechúri. Do úvahy prichádza viacero typov ureterostómii eventuálne pyelostómia podľa osobných preferencií chirurga s ohľadom na rôzne výhody a nevýhody jednotlivých metód. Rekonštrukčná chirurgia by sa mala realizovať až po maximálnom zlepšení nálezu na horných močových cestách a v močovom mechúri, približne v 2-3 roku života. Rekonštrukcii predchádza funkčné vyšetrenie močového mechúra, v prípade predpokladanej nutnosti transplantácie obličky u pacienta je možné rekonštrukciu močových ciest ponechať na toto obdobie.

V čase diagnózy chlopne zadnej uretry má až 72 % pacientov vezikorenálny reflux, 32% bilaterálny (6). Reflux je považovaný za sekundárny v dôsledku subvezikálnej obštrukcie. K jeho vymiznutiu dochádza po discízii chlopne u cca 30% pacientov do niekoľkých mesiacov, v niektorých prípadoch sa udáva vymiznutie refluxu až po 3 rokoch od discízie chlopne. V prvých mesiacoch života je často potrebná antibiotická profylaxia.

Vysoký stupeň refluxu býva asociovaný so zlou renálnou funkciou, nakoľko vo väčšine prípadov nespôsobuje ťažkosti, v súčasnosti sa už neodporúča ureteronefektómia, ale táto oblička sa ponecháva a v budúcnosti môže dilatovaný močovod slúžiť ako materiál v prípade nutnosti augmentácie m. mechúra(7)

Samozrejmosťou zostáva celoživotný monitoring pacientov s chlopňou zadnej uretry. Veľmi častá je dysfunkcia močového mechúra, v niektorých prípadoch je nutná anticholinergická terapia, eventuálne v kombinácii s čistou intermitentnou katetrizáciou.

Skupina pacientov, ktorí dospejú do konečného štádia renálnej insuficiencie (10-47%) vyžaduje transplantáciu obličiek, ktorá sa považuje za bezpečnú a efektívnu (8).

Literatúra

1. **Steven L, Desai D.** *Pediatric urology.* London, Oceana 2010. 622 s. ISBN 19-3386-422-2. 218
2. **Young HH, Frontz WA, Baldwin JC.** Congenital obstruction of the posterior uretra. *J Urol* 1919, 3:289.
3. **Levin RM, Monson FC, Haugaard N, Buttyan R, Hudson A, Roelofs M, et al.** Genetic and cellular characteristics of bladder outlet obstruction. *Urol Clin North Am.* 1995;22:263–83
4. **Walker and Padron,** 1990. Walker RD, Padron M: Management of posterior urethral valves by initial vesicostomy and delayed valve ablation. *J Urol* 1990; 144:1212.
5. **Narasimhan et al.,** 2004. Narasimhan KL, Kaur B, Chowdhary SK, et al: Does mode of treatment affect the outcome of neonatal posterior urethral valves?. *J Urol* 2004; 171:2423.
6. **Hulbert and Duckett,** 1992. Hulbert WC, Duckett JW: Posterior urethral valve obstruction. *AUA Update Series* 1992; II:Lesson 26.
7. **Bellinger,** 1993. Bellinger MF: Ureterocystoplasty: A unique method for vesical augmentation in children. *J Urol* 1993; 149:811.
8. **Fine MS, Smith KM, Shrivastava D, et al.** Posterior urethral valve treatments and outcomes in children receiving kidney transplants. *J Urol* 2011 Jun;185(6 Suppl):2507-11.

MANAŽMENT PACIENTOV S EXSTROFIOU MOČOVÉHO MECHÚRA

(Management of patients with bladder exstrophy)

***Simona Zaťkuliaková¹, Kristína Leiva Demetrová¹, Kvetoslava Slebodníková¹,
Petra Ďubjaková¹, Jana Jakimová^{2,3}***

¹ *Klinika pediatrickej urológie LFUK a NÚDCH, Limbová 1, 83340 Bratislava,
demetrova.kristina.87@gmail.com*

² *Ortopedická klinika LFUK a NÚDCH, Limbová 1, 83340 Bratislava*

³ *Anatomický ústav, Lekárska Fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 2,
81108 Bratislava*

Súhrn

Exstrofia močového mechúra je raritná a ťažká vrodená vývojová chyba uropoetického systému, prednej brušnej steny a panvových kostí. Incidencia je približne 1:10 000 až 1:50 000 živonarodených detí, a je častejšia u chlapcov. Hlavným cieľom liečby je zachovanie normálnej renálnej funkcie, dosiahnutie primeraných funkcií močového mechúra, kontinencie moču a vytvorenie kozmeticky prijateľného a funkčného vonkajšieho genitálu.

Kľúčové slová

exstrofia močového mechúra, malformácia genitálu, operácia, novorodenec

Summary

The bladder exstrophy is a rare and severe congenital malformation of the genitourinary system, abdominal wall musculature and pelvic bones due to incomplete fetal development. The incidence is estimated at 1:10 000 to 1:50 000 live births, and, it is more frequent in males. The main goals of treatment are the preservation of normal renal function, obtaining adequate bladder function, promoting urinary continence, achieving an acceptable appearance and function of the external genitalia.

Keywords

bladder exstrophy, malformation of genitalia, surgery, newborn

Úvod

Patogenéza

Existuje viacero teórií o vzniku exstrofie močového mechúra či kloaky. Vďaka poznaniu embryológie človeka sa vznik exstrofie pripisuje chybnému vývoju v prvotných štádiách embyogenézy. Exstrofia močového mechúra vzniká chybným vývojom mezodermy na kaudálnom konci zárodkového štítu. Z tohto dôvodu sa normálne nevyvíja kloaková membrána a dolná brušná stena. V mieste rázštiepu chýbajú všetky vrstvy prednej brušnej steny aj predná stena močového mechúra. (1) Ak vznikne porucha vývoja už v 5. gestačnom týždni, vyvinie sa tzv. exstrofia kloaky. Pokiaľ sa porucha vývoja mezodermy uskutoční okolo 7. gestačného týždňa vznikne klasická exstrofia močového mechúra. (2)

Príčina vzniku exstrofie je multifaktoriálna s možnou genetickou predispozíciou. Aj keď dedičnosť exstrofie ostáva nie úplne objasnená, bolo identifikovaných niekoľko možných genetických lokusov, ktoré by mohli byť genetickou príčinou exstrofie. Boyadjiev a kol. popísali prítomnosť bodových zlomov na 5' mieste génu CASPR3 na 9. chromozome. (3) U niektorých pacientov s exstrofiou boli nájdené anomálie karyotypu ako napr. 47XYY, 47XX, 45XO/46XX. Avšak priama príčina žiadnej genetickej mutácie nebola jednoznačne potvrdená.

Z možných rizikových faktorov podieľajúcich sa na vzniku exstrofie močového mechúra majú významný vplyv hormonálne zmeny u matky. Užívanie vysokých dávok progesterónu v prvom trimestri sa spája s 10 násobným rizikom vzniku exstrofie močového mechúra. U detí z in vitro fertilizácie bol popísaný 7,5 násobný nárast incidencie exstrofie. (4) Ďalšie možné rizikové faktory v perikoncepčnom období predstavujú fajčenie, abúzus drog, radiácia a infekcia u matky.

Diagnostika

Diagnostika exstrofie je možná už pred 20. gestačným týždňom a to pomocou USG. V ultrasonografickom obraze sa deteguje absencia náplne močového mechúra, normálny nález na obličkách, nízko nasadajúci pupočník, protrúzia v dolnej časti brucha, rozstup symfýzy, menší genitál u chlapcov. Množstvo plodovej vody je normálne vzhľadom na normálnu produkciu moču plodom.

Charakteristika exstrofie močového mechúra

Konečná diagnóza sa určí postnatálne inšpekciou novorodenca. Pri klasickej exstrofii močového mechúra je postihnutá predná brušná stena, močový mechúr, genitál, panvové kosti, rektum a konečník.

Deformity panvových kostí

Najzreteľnejšou deformitou je rozstup panvových kostí, ktorý je spôsobený ich vonkajšou rotáciou, everziou ramus ossis pubis a skrútením ramus ossis pubis o 30%. Používaním počítačovej tomografie a 3D štúdiu sa zistili rotačné a priestorové abnormality. Vonkajšia rotácia alae ossis ilii o 12 stupňov, vonkajšia rotácia predného segmentu panvy o 18 stupňov. (5) Uhol v sakroiliakálnom spojení je o 10 stupňov väčší, prítomná je retroverzia acetábula a femoru. Panva je o 14,7 stupňa vyrotovaná inferiórne, os sacrum je o 42,6% väčšia. (6) Priestorovo sa pozoruje rozstup symfýzy, skrútený predný segment panvy a väčšia vzdialenosť medzi pubickými kosťami. Tieto deformity zapríčiňujú u jedincov s exstrofiou močového mechúra široké boky, kolísavú chôdzu a určitý stupeň invalidity.

Defekty panvového dna

Postihnutím panvových kostí u jedincov s exstrofiou močového mechúra dochádza k zmenám na panvovom dne. Musculus puborectalis tvorí oporu dvojnásobnému objemu dutiny brušnej ako u zdravých jedincov. Skupina svalov tvoriacich levator ani je posunutá posteriórne vzhľadom na konečník, svaly sú rotované vonkajším smerom o 15,5 stupňa a sú sploštené. Následkom toho je konečník predsunutý dopredu. Tieto muskuloskeletálne malformácie vysvetľujú zvýšený výskyt prolapsu konečníka, najmä u ženského pohlavia s exstrofiou močového mechúra. (7)

Defekty prednej brušnej steny

Na prednej brušnej stene sa nachádza trojuholníkovitý defekt, ktorý je vyplnený exstrofickým mechúrom a zadnou uretrou, na jeho vrchole sa nachádza pupočník. Pupočník je nízko nasadajúci, umiestnený pod spojnicou oboch spina iliaca anterior superior. Častými sú

inguinálne hernie, sú pozorované u viac ako 80% chlapcov a 10% dievčat s exstrofiou močového mechúra. (8)

Anorektálne malformácie

Perineum u pacientov s exstrofiou močového mechúra je krátke a široké, konečník je posunutý dopredu. Análny sfinkter je tak isto posunutý dopredu, avšak zvyčajne je intaktný. U niektorých jedincov sa vyskytujú kolorektálne anomálie ako neperforovaný konečník, rektálna stenóza či vrodený prolaps konečníka.

Anomálie mužského genitálu

Penis je široký a krátky, pretože corpora cavernosa sú laterálne rozťahnuté, pripojené k rozostúpeným panvovým kostiam. Penis je dorzálne ohnutý, často s prítomnou dorzálnou chordou. Dĺžka penisu je kratšia ako u normálnych jedincov. Prostata, vas deferens a ductuli ejaculatorii sú normálne vyvinuté. Autonómne nervy inervujúce corpora cavernosa cez nervus cavernosum sú uložené laterálne, bývajú zachované takmer u všetkých pacientov, pretože je u nich zachovaná potencia po rekonštrukčnej operácii. Skrótum zvyčajne nie je postihnuté, avšak väčšina pacientov má väčšiu penoskrótálnu vzdialenosť. Testes sú často nezostúpené, alebo retraktilné s adekvátnou dĺžkou spermatického povrazca.

Anomálie ženského genitálu

U dievčat mons pubis, labia a klitoris su oddelené, vchod do vagíny je predsunutý dopredu a častokrát stenotický, vagína býva kratšia, ale normálneho priemeru. Krčok maternice sa nachádza na prednej stene vagíny blízko pri introite, pretože maternica nasadá na vagínu vyššie. Vajcovody a vaječníky sú zvyčajne normálne vyvinuté. Defekt v panvovom dne v mieste hiatus levator ani, ktorý je dvakrát širší, predisponuje k prolapsu maternice.

Anomálie močového systému

Sliznica močového mechúra býva náchylná na cystické a metaplastické zmeny, je gracilná a ľahko sa poraní. Niekedy sú na sliznici prítomné polypózne zmeny – fibrotické a edematózne. Horné močové cesty bývajú zvyčajne normálne vyvinuté, aj keď môžu byť prítomné pridružené anomálie ako duplexný dutý systém, podkovovitá oblička, hypoplázia, dysplázia, solitárna oblička, či dystopia obličiek. Priebeh ureterov je abnormálny v ich terminálnom úseku, močovody vchádzajú do močového mechúra kaudálnejšie a laterálnejšie a ich priebeh v stene močového mechúra nie je šikmý. To spôsobuje u takmer 100% pacientov vezikoureterálny reflux.

Materiál a metódy

Liečba je chirurgická, pozostáva z rekonštrukcie močového mechúra, uretry a vonajšieho genitálu. Na Klinike pediatrickej urológie sa od januára 2016 používa chirurgický postup tzv.– viacdobá moderná rekonštrukcia (z anglického Modern Staged Reconstruction of Exstrophy - MSRE) v spolupráci s prof. Musthaqom z Great Ormond Street Hospital v Londýne. Princípom tejto operačnej techniky je v prvej dobe vykonať uzáver exstrofického mechúra s ponechaním inkontinentnej epispadickej uretry v prvých 72 hodín života dieťaťa. V prípade veľkého rozostupu symfýzy alebo ak sa prvá doba MSRE neuskutoční do 72 hodín života dieťaťa, vykonáva sa osteotómia panvových kostí. Uzatvorením močového mechúra sa stimuluje jeho rast a vývoj, ponechaním inkontinentnej uretry sa zabezpečí ochrana renálnych funkcií. Druhá doba rekonštrukcie sa vykonáva od 18. mesiaca života a spočíva v úprave epispádie, mobilizácie močového mechúra (tzv. operácia podľa Kellyho) a rekonštrukcii hrdla močového mechúra (napr. operácia podľa Young-Dees-Laedbettera) s prípadnou reimplantáciou refluktujúcich močovodov. Po 3 týždňoch od druhej doby operácie

sa epicystostomická cievka, ktorá slúžila ako derivácia moču, uzatvorí a pacient začína s nácvikom močenia. Postmikčné rezíduum sa kontroluje pomocou USG močového mechúra. Pokiaľ je nácvik močenia u pacienta úspešný, epicystostómia sa zruší. Pokiaľ má pacient po vymocení veľké postmikčné rezíduum zaučí sa v čistej intermitentnej katetrizácii za účelom úplného vyprázdňovania močovéh mechúra.

Výsledky

Od januára 2016 sme na Klinike pediatrickej urológie začali s modifikovanou viacdobou rekonštrukciou exstrofie močového mechúra. Od toho času 6 pacienti podstúpili druhú dobu rekonštrukcie močového mechúra. U všetkých pacientov bola vykonaná Kellyho operácia, rekonštrukcia hrdla močového mechúra podľa Young-Dees-Laedbettera a rekonštrukcia epispádie. Väčšina pacientov je schopná spontánne močiť a má len nízky stupeň inkontinencie moču. U dvoch pacientov je nutná čistá intermitentná katetrizácia, pretože nie je u nich prítomná spontánna mikcia. U všetkých pacientov je prítomná dobrá renálna funkcia bez dilatácie alebo len s miernou dilatáciou dutého systému obličiek. Časový manažment operačnej liečby bol u našich pacientov rôzny. Takmer u všetkých pacientov bola prvá doba rekonštrukcie močového mechúra realizovaná tesne po narodení. Avšak manažment druhej doby je výrazne ovplyvnený jednak celkovým zdravotným stavom pacienta a spoluprácou rodičov pacientov, ktorí mnohokrát pre strach z operačného výkonu odkladajú druhú dobu rekonštrukcie.

Diskusia

Po narodení novorodenca s exstrofiou močového mechúra by mal stav čo najskôr zhodnotiť detský urológ, ktorý má skúsenosti s operačnou liečbou exstrofie. Veľmi dôležité je posúdenie močového mechúra, od čoho sa odvíja ďalší manažment pacienta. Hypoplastický fibrotický močový mechúr nie je vhodný na okamžité primárne operačné riešenie. (9) Je akceptovateľné počkať 6 až 12 mesiacov a sledovať rast močového mechúra a indikovať odložené operačné riešenie. Ak sa počas tohto obdobia močovový mechúr nezväčší, jednou z možností je cystektómia s deriváciou moču. Kontraindikáciou k primárnemu operačnému riešeniu je vysoký stupeň bilaterálnej hydronefrózy.

Operačná liečba exstrofie je jednou z najnáročnejších výziev pre detského urológa. U jedincov s exstrofiou močového mechúra čelíme úplnej inkontinencii moču, opakovaným infekciám močových ciest a s nimi spojeným renálnym jazvením, výskytu urolitiázy, malignít močového mechúra, prolapsu orgánov malej panvy, inguinálnym herniám a malformovanému vonkajšiemu genitálu, ktorý má na jedincov sexuálne, sociálne a psychologické následky.

Primárnym cieľom chirurgickej terapie je korekcia urogenitálneho defektu tak, aby sa vytvoril močový mechúr, ktorý bude slúžiť ako nízkotlakový rezervoár, s možnosťou spontánneho močenia bez postmikčného rezídua, ktorý bude zachovávať renálne funkcie a dosiahnuť funkčný a esteticky akceptovateľný vonkajší genitál. Sekundárnym cieľom je predchádzať infekcii močových ciest, znižovať výskyt urolitiázy a malignít v uropoetickom trakte, zachovať integritu prednej brušnej steny a panvového dna.

V dnešnej dobe svetové pracoviská vykonávajú dva typy operačných techník: kompletná primárna rekonštrukcia (z anglického complete primary repair of exstrophy - CPRE) a MSRE. Priklonenie sa k jednej z nich vychádza z historických podmienok daného pracoviska, alebo preferencii jednotlivých urológov. CPRE predstavuje najnovší operačný postup. Počas jednej operácie sa vykonáva uzavretie močového mechúra, rekonštrukcia hrdla močového mechúra s rekonštrukciou epispádie s prípadnou osteotómiou v prvých 72 hodinách života. (10) Priaznivci tejto techniky veria, že týmto spôsobom sa umožní močovému mechúru správne a rýchlejšie sa vyvíjať. Ďalším argumentom je zníženie psychologického dopadu viacerých operácií na jedinca s exstrofiou a jeho rodinu, pretože pacient podstúpi len jednu operáciu. 76% pacientov

operovaných CPRE dosiahne kontinenciu, ktorú definujú ako suchý interval dlhší ako 2 hodiny a vôľové močenie, bez nutnosti čistej intermitentnej katetrizácie. Napriek tomu výrazné percento pacientov musí podstúpiť ďalšiu operáciu za účelom dosiahnutia kontinencie moču. Na rozdiel od MSRE hrozí pri CPRE skoré poškodenie obličiek vplyvom vysokého tlaku v močovom mechúri. Prítomný vezikoureterálny reflux môže situáciu zhoršiť opakovanými pyelonefritídami s renálnym jazvením. Okolo 30% pacientov si vyžaduje následnú reimplantáciu močovodov. Podľa rôznych štúdií 36-68% pacientov po kompletnom uzávere exstrofie močového mechúra ostáva s hypospadickou uretrou a vyžadujú ďalšiu rekonštrukciu močovej rúry v budúcnosti. Nekróza glansu, poškodenie kavernózných telies či strata kože penisu bola tak isto popísaná po CPRE. (11) Počet operácií potrebný k dosiahnutiu požadovaného výsledku nie je ako ukazuje prax jednotný. Napriek snahe priaznivcom CPRE pacienti vyžadujú často ďalšie operácie na zlepšenie kontinencie moču, úpravu vezikoureterorenálného refluxu či úpravu vonkajšieho genitálu. Strata tkaniva genitálu či možné poškodenie obličiek sú príčinami prečo sa prikláňame aj na našej klinike k modernej viacdobej rekonštrukcii exstrofie močového mechúra.

Literatúra

1. **Kapeller, K., Pospíšilová, V.** 2001. Embryológia človeka. Martin : Osveta, 2001. 371 s. ISBN 8080630720.
2. **Muecke EC.** The role of the cloacal membrane in exstrophy: the first successful experimental study. *J Urol* 1964; 92:659–67.
3. **Boyadjiev SA, South S, Radford C, et al.** Characterization of reciprocal translocation 46XY,t(8,9)(p11.2;13) in a patient with bladder exstrophy identifies CASPR3 as a candidate gene and shows duplication of the regions flanking the pericentric heterochromatin on chromosome 9 in normal population. Presented at American Society of Genetics, Oct 29, 2004b, Toronto, Ontario, Canada.
4. **Wood HP, Trock BP, Gearhart JP.** In vitro fertilization and the cloacal-bladder exstrophy-epispadias complex: is there any association? *J Urol* 2003;169:1512-5.
5. **Sponseller PD, Bisson LJ, Gearhart JP, et al.** The anatomy of the pelvis in the exstrophy complex. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:177.
6. **Stec AA, Wakim A, Barbet P, et al.** Fetal bony pelvis in the bladder exstrophy complex: Normal potential for growth? *Urology* 2003;62:337.
7. **Stec AA, Pannu HK, Tadros YE, et al.** Pelvic floor evaluation in classic bladder exstrophy using 3-dimensional computerized tomography-Initial insights. *J Urol* 2001;166:1444.
8. **Connolly JA, Peppas DS, Jeffs RD, et al.** Prevalence in repair of inguinal hernia in children with bladder exstrophy. *J Urol* 1995;154:1900.
9. **Gearhart JP.** Failed bladder exstrophy closure: evaluation and management. *Urol Clin North Am* 1991;18:687.
10. **Grady R, Mitchell ME.** Complete repair of exstrophy. *J Urol* 1999;162:1415.
11. **Gearhart JP, Baird AD.** The failed complete repair of bladder exstrophy: insights and outcomes. *J Urol* 2005;174:1669.
12. **Wein AJ, et al.** 2016. Campbell-Walsh Urology. Philadelphia : Elsevier. 2016. 3201 s. ISBN: 978-1-4557-7567-5.

KONGENITÁLNA HYDROKÉLA

(Congenital hydrocele)

***Simona Zaťkuliaková, Oľga Novotná, Petra Ďubjaková,
Kristína Leiva Demetrová***

Klinika Pediatrickej urológie LFUK A NÚDCH, Limbová 1, 833 40 Bratislava

Súhrn

Hydrokéla je častou príčinou nebolestivého opuchu skróta u detí. Vzniká nahromadením tekutiny v skróte pri perzistujúcej komunikácii medzi brušnou dutinou a obalmi skróta. Vo väčšine prípadov dôjde k spontánnemu vymiznutiu. Perzistujúca hydrokéla po 2.roku života je indikovaná na chirurgickú intervenciu.

Kľúčové slová

kongenitálna hydrokéla, semenník, tekutina, perzistujúci processus vaginalis peritonei

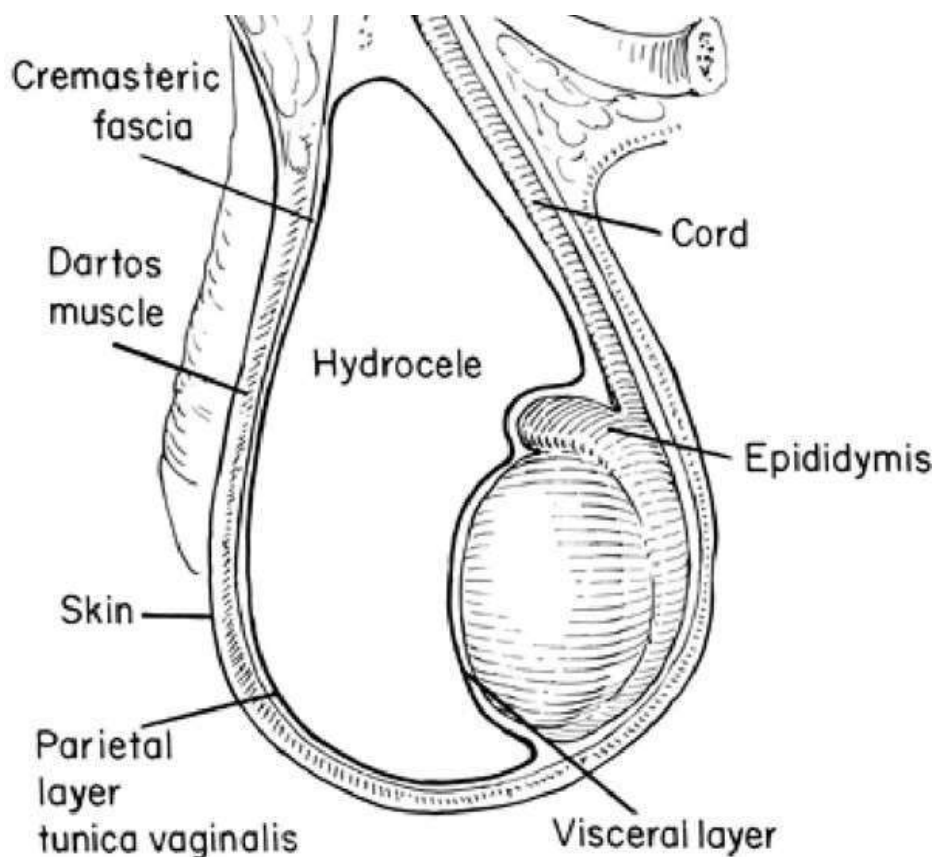
Summary

Hydrocele is a type of painless swelling in the scrotum. Hydrocele is common in newborn. It occurs when fluid collects around a testicle through communication between abdominal and scrotal cavity. Hydrocele usually resolve spontaneously. If a hydrocele is still present after two years, an operation is suggested.

Keywords

congenital hydrocele, testicle, fluid, persistent processus vaginalis peritonei

Hydrokéla je charakterizovaná kolekciovou čírej tekutiny v cavum serosum scroti medzi parietálnym a viscerálnym listom tunica vaginalis, čo spôsobuje vakovité rozšírenie obalov semenníka. Hydrokéla sa objavuje u 80 – 94% novorodencov a nájde ju u približne 20% dospelých (2). Príčinou primárnej kongenitálnej hydrokély je pretrvávajúci processus vaginalis peritonei, ktorý adheruje k funikulu. Kongenitálna hydrokéla má abdominálnu a skrotálnu komponentu, ktoré spolu komunikujú spôsobom presýpacích hodín. Processus vaginalis sa v priebehu embryogenézy vyvíja ako otvorená výchlípka peritonea, ktorá umožňuje descensus semenníka do skróta. Postnatálne dochádza k obliterácii jeho proximálnej časti. Distálna časť ostáva vo forme cavum serosum scroti. Perzistujúci processus vytvára rôzne typy komunikujúcej hydrokély (7). V prípade širokej otvorenej komunikácie sa do nej dostávajú aj orgány brušnej dutiny a vytvára sa hernia. Vo väčšine prípadov sa komunikácia spontánne uzatvára približne do jedného roka života. Ak dôjde k uzáveru niekde v priebehu kanála, klinicky sa tento stav prejaví ako hydrokéla funikulu (3). Hydrokéla sa môže objaviť aj u dievčat ako (hydrocele canalis Nuckii)(6). Získaná, sekundárna hydrokéla, ktorá nie je asociovaná s perzistujúcou komunikáciou na podklade processus vaginalis, je podmienená nerovnováhou medzi tvorbou a reabsorbciou tekutiny (1). Sekundárna hydrokéla môže byť idiopatická, často sa však objavuje po traume, testikulárnej torzii, epididymitíde, eventuálne po operácii varikokély alebo primárnej hydrokély.

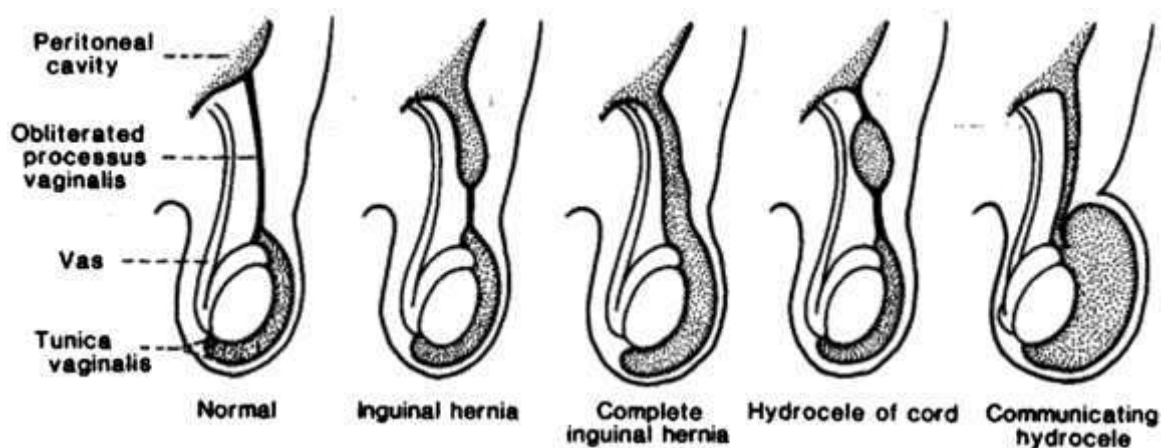


Obr. 1 Hydrokéla (8)

Hydrokéla je diagnostikovaná na základe fyzikálneho vyšetrenia a dôkladnej anamnézy. Charakteristickým znakom komunikujúcej hydrokély je zmena veľkosti podľa aktuálneho množstva tekutiny. Fyzikálne vyšetrenie má byť realizované v ľahu aj v stoji. Je hmatný guľovitý až oválny nebolestivý útvar v skróte. Nález je väčšinou jednostranný. Pri bimanuálnom vyšetrení občas môžeme pozorovať príznak prelievania obsahu, tzv. „cross fluctuation“. Hydrokéla väčšinou nie je bolestivá, ak nie je spojená so zápalovým postihnutím orgánov skróta. V prípade tenznej hydrokély sa môže zhoršovať perfúzia semenníka, čo môže spôsobovať bolesti (6). Diferenciálne diagnostické je potrebné odlišiť spermatokélu, torziu semenníka, varikokélu, nádorové a zápalové postihnutie semenníka. Vo väčšine prípadov je dobrým diagnostickým nástrojom transluminiscencia, ale je potrebné brať do úvahy, že presvietiť sa dá aj črevo naplnené tekutinou a taktiež niektoré tumory. Akekoľvek pochybnosti vyvráti sonografické vyšetrenie, ktoré má takmer 100% senzitivitu detekcie intratestikulárnych lézií. Varikokélu, torziu semenníkov od hydrokély spoľahlivo odlíži Dopplerovská sonografia, aj keď tieto stavy sú často sprevádzané hydrokélou.

Vo väčšine prípadov, kongenitálna hydrokéla nevyžaduje intervenciu skôr ako po dovŕšení 1. roku života. Skoršia intervencia je indikovaná v prípade podozrenia na testikulárnu patológiu alebo pridruženú inguinálnu herniu. V prípade, že hydrokéla perzistuje po 12 - 24. mesiaci života, môže to byť indikáciou k chirurgickej korekcii. V súčasnosti sa však odporúča 6 až 9-mesačná observácia, nakoľko nie sú priame dôkazy, že oddiaľovanie operácie by viedlo k testikulárnemu poškodeniu (2). Dlhodobý tlak tekutiny vo vaku na testis môže však spôsobiť atrofiu semenníka na postihnutej strane. Správne načasovanie operácie je stále diskutabilné a indikácia k chirurgickému riešeniu by mala byť vysoko individualizovaná. V prípade neskôr vzniknutej, nekomunikujúcej hydrokély, je až 75%-ná možnosť spontánnej regresie.

Chirurgické riešenie hydrokély spočíva v revízií testis, spermatického povrazca a v ligácii perzistujúceho processus vaginalis peritonei cez inguinálnu incíziu. Distálny koniec kanála ostáva otvorený, pričom tekutina sa vypustí. Riziko testikulárneho poškodenia v súvislosti s operačným výkonom je minimálne. Instilácia sklerotizujúcich látok sa neodporúča (7). Skrotálny operačný prístup je využívaný v prípade sekundárnej nekomunikujúcej hydrokély. Spočíva v exízií a everzii obalov testis, prípadne v resekcii nadbytočného tkaniva obalov. Punkcia komunikujúcej kongenitálnej hydrokély je kontraindikovaná pre riziko vzniku peritonitídy, aj vzhľadom na rýchlu recidívu (2). Prognóza ochorenia je väčšinou veľmi priaznivá.



Obr. 2 Typy hydrokély (9)

Literatúra

1. **Horn F., a kol.** Detská chirurgia. Bratislava : SAP, 2014 : 493
2. **Tekgül (Chair), H.S. Dogan, P. Hoebeke, R. Kocvara.** EAU Guidelines on Pediatric Urology. European Society for Pediatric Urology : 2016. <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Paediatric-Urology-2016-1.pdf>. (30.11.2018)
3. **Novotná M., Novák I.,** Hydrocele congenitalis permagna bilateralis : kazuistika operačného riešenia u 6mesičného kojence. Urologie pro praxi 2015, 16(2), 80-82. https://www.urologiepropraxi.cz/artkey/uro-201502-0008_Hydrocele_congenitalis_permagna_bilateralis_kazuistika_operacniho_reseni_u_6mesicniho_kojence.php (30.11.2018)
4. **Kawaciuk I.** Urologie. Praha : Galén, 2009 : 530
5. **Wein AJ, et al.** Campbell-Walsh Urology. Philadelphia : ElsevierSaunders, 2012 : 4320
6. **Kubíček V.** Hydrokéla, varikokéla, spermatokéla. Doporučené postupy pro praktického lékaře. 2002. <http://www.cls.cz/dokumenty2/os/t178.rtf> (30.11.2018)
7. **Bulínová R., Handrejch L., Koch M., Ladman J., Šafařík L.** Abdominoskrotální hydrokéla. 2013. <https://www.czechurolog.cz/pdfs/cur/2013/04/08.pdf> (30.11.2018)
8. Hydrocele . <https://www.epharmapedia.com/diseases/profile/1434?lang=en> (1.12.2018)
9. **Palmer S. Lane.** Hernias and Hydrocele.
10. <http://pedsinreview.aappublications.org/content/34/10/457> (1.12.2018)

NEZOSTÚPENÉ SEMENNÍKY

(Undescended Testes)

***Simona Zaťkuliaková, Petra Ďubjaková, Oľga Novotná,
Kristína Leiva Demetrová, Ján Breza, Kvetoslava Slobodníková***

*Klinika Pediatrickej urológie LFUK a NÚDCH, Limbová 1, 831 01 Bratislava
s.kobyliakova@gmail.com*

Súhrn

Nezostúpené semenníky alebo kryptorchizmus je najčastejšou vrodenou poruchou mužských endokrinných žliaz u detí. Kryptorchizmus je chýbanie jedného alebo oboch semenníkov v normálnej pozícii- na dne skróta. Incidencia závisí od gestačného veku, postihuje 1.0-4.6% donosených novorodencov a 1.1-45% predčasne narodených novorodencov. Najrozšírenejšou klasifikáciou nezostúpených semenníkov je rozdelenie na hmatné a nehmatné semenníky. Odporúčané je operačné riešenie do 12 mesiacov veku dieťaťa najneskôr do 18 mesiacov veku. Chlapci, ktorí majú nezostúpený semenník alebo podstúpili operačný zákrok majú zvýšené riziko vzniku testikulárnej malignity.

Kľúčové slová

nezostúpený semenník, cryptorchizmus, retentio testis, fertilita, tumor testis, chirurgická operácia

Summary

Cryptorchidism or undescended testes is the most common congenital disorder of the male endocrine glands in children. Cryptorchidism is the absence of one or both testes in normal scrotal position. Incidence varies and depends on gestational age, affecting 1.0-4.6% of full-term and 1.1-45% of preterm neonates. The most useful classification of undescended testes is distinguishing into palpable and non-palpable testes. Early surgical correction of undescended testes is highly recommended before twelve months of age, and by eighteen months at the latest. Boys who are treated for an undescended testis have an increased risk of developing testicular malignancy.

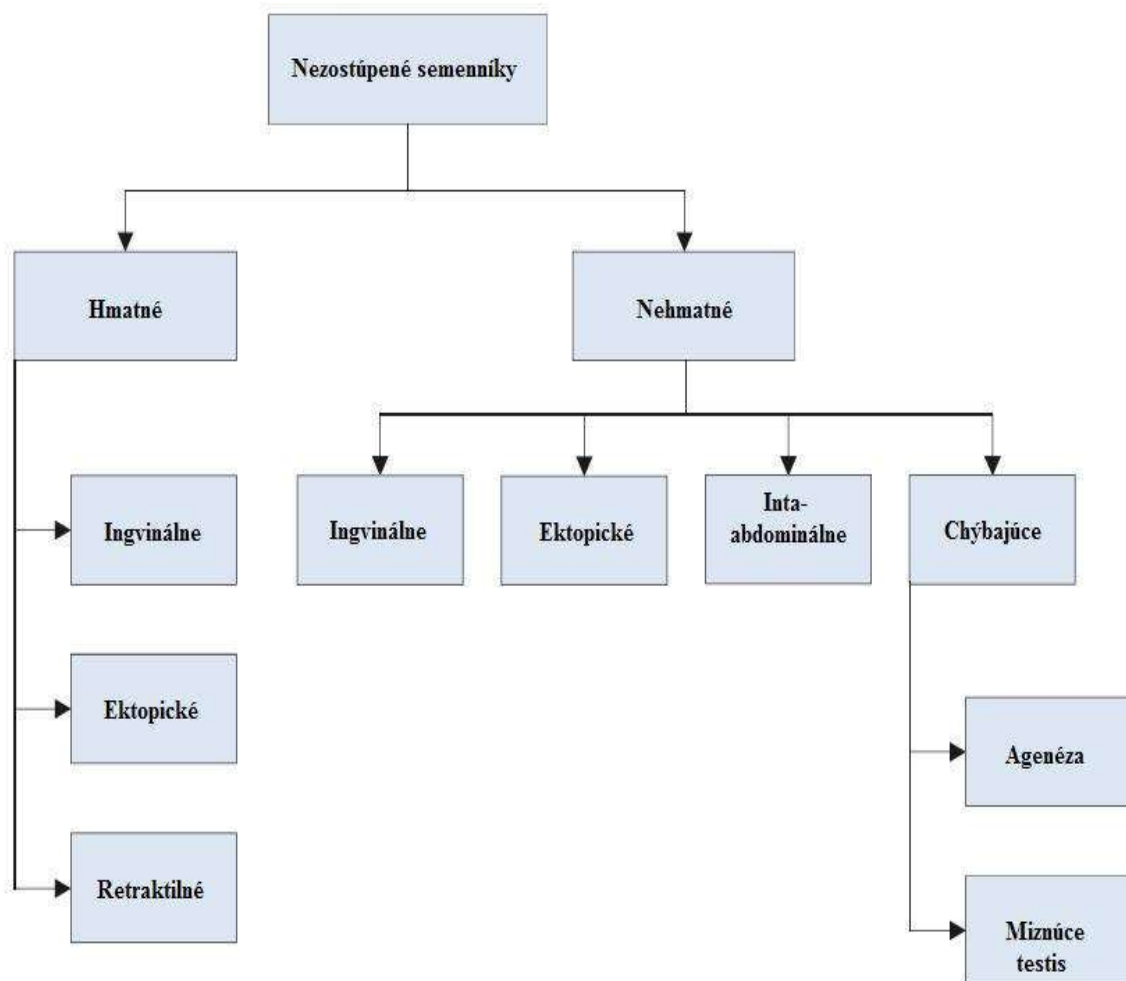
Keywords

undescended testis, cryptorchidism, retractile testicle, fertility, tumor testis, surgical operation

Nezostúpené semenníky alebo kryptorchizmus je najčastejšou vrodenou poruchou mužských endokrinných žliaz u detí. Kryptorchizmus je chýbanie jedného alebo oboch semenníkov v normálnej pozícii- na dne skróta. (1) Jedna tretina chlapcov má nezostúpené oba semenníky (bilaterálny kryptorchizmus), zatiaľ čo dve tretiny chlapcov má nezostúpený iba jeden semenník (unilaterálny kryptorchizmus). (2) Incidencia varíruje a závisí od gestačného veku, postihuje 1.0-4.6% donosených novorodencov a 1.1-45% predčasne narodených novorodencov. (3)

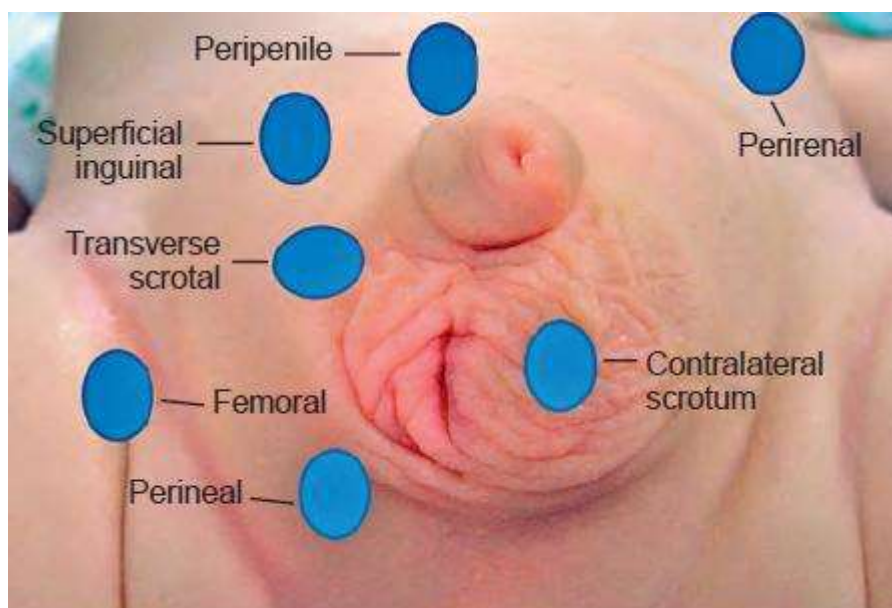
Klasifikácia

Najrozšírenejšou klasifikáciou nezostúpených semenníkov je rozdelenie na hmatné a nehmatné semenníky, rozhodujúcim faktorom pre ďalší klinický manažment je umiestnenie a prítomnosť testis.



Obr. 1 Klasifikácia nezostúpených semenníkov

Nezostúpené semenníky môžu byť lokalizované pozdĺž línie normálnej dráhy zostupovania semenníkov v rozmedzí brucha a skróta. Ak je testis mimo jeho normálnu cestu zostupu a mimo skróta považujeme ho za ektopické. Najčastejšia poloha je v tzv. Denis Brown vaku (medzi scarpovou fasciou a fasciou m. externus obliquus susediacou s anulus inguinalis superficialis). Zdiekavo sú lokalizované perirenálne, prepubicky, femorálne, perineálne, alebo v kontraleterálnom hemiskróte. Zvyčajne ektopické testis nezostúpi spontánne do správnej pozície. Navyše ektopické testis kvôli svojej polohe nemusí byť hmatné. (4)



Obr. 2 Pozícia ektopicky umietneného semenníka. Ektopický semenník môže byť identifikovaný v rôznych pozíciách- ako je znázornené.

Retraktilné semenníky sa väčšinu času nachádzajú v skróte, ale pre zvýšenú aktivitu kremasterického reflexu migrujú do supraskrotálnej polohy. Jednoducho môžu byť stiahnuté do skróta, kde ostávajú aspoň dočasne. (5)

Intra abdominálne semenníky sú najčastejšie lokalizované v blízkosti anulus inguinalis profundus. Možné polohy: v okolí obličky, predná brušná stena, retrovezikálny priestor.

Chýbajúce semenníky zahŕňajú agenézu testis a atrofiu po intrauterinnej torzii semenníka (najpravdepodobnejšie po in utero infarktácii normálneho semenníka torziou gonadálnych ciev). (6)

Manažment

Liečba kryptorchizmu by mala začať v 6 mesiaci života dieťaťa. Po tomto veku nezostúpený semenník zostúpi len veľmi zriedka. Chirurgická liečba by mala byť riešená najneskôr do 18 mesiacov veku dieťaťa, pretože histologické vyšetrenie nezostúpených semenníkov v tomto veku odhalilo postupnú stratu zárodočných a leydigových buniek. Skoré načasovanie zákroku vedie k optimálnym výsledkom spermiogenézy a hormonálnej produkcie, rovnako ako zníženiu rizika vzniku tumoru v neskoršom veku. (7)

Orchiopexia z inguinálneho prístupu je najrozšírenejšou technikou s vysokou mierou úspešnosti až do 92%.

Pre orchiopexiu zo skrotálneho prístupu sa rozhodujeme pri nižšie uloženom testis tzv. migrujúcom testis, kedy testis fixujeme cez skrotálnu incíziu.(8)

Pri nehmatnom testis operáciu musí byť jednoznačne určené či je testis prítomné alebo nie. Ak je počas operácie nájdené buď sa stiahne do skróta, ale pri výraznej hypoplázii až aplázii sa odstráni. Dôležitým krokom pred operáciou je opätovné vyšetrenie pacienta, ktorý je už v celkovej anestézii, pretože predtým nehmatné testis môže byť nájdené a následne sa chirurgický postup zmení z laparoskopického prístupu na štandardnú orchiopexiu z priameho inguinálneho prístupu. Zvyčajne ak je testis uložené viac ako 2 cm od anulus inguinalis profundus nedosiahne skrótum bez poškodenia testikulárnych ciev. A kvôli týmto okolnostiam je technikou voľby operácie orchiopexia Fowler-Stephens. (9) Pri jednodobej Fowler-Stephens technike je úspešnosť v rozmedzí 50-60% a pri dvojdobej sa úspešnosť zvyšuje až na 90%. (10) Výhodou dvojdobej operácie, kedy druhá časť je realizovaná po

minimálne 6 mesiacoch je dostatok času na vytvorenie cievnych kolaterál a vytvorenie vyššej testikulárnej mobility. (11)

Fertilita

Chlapci s jedným nezostúpeným semenníkom majú nižšiu plodnosť, ale rovnajú mieru paternity ako tí, ktorí majú semenníky od narodenia v skróte. Chlapci s bilaterálne nezostúpenými semenníkmi trpia oboma, aj nižšou fertilitou aj mierou paternity. Dôležitý prediktívny faktor určujúci fertilitu v neskoršom veku je vek, v ktorom je realizovaná chirurgická intervencia. Vysoko odporúčané je operačné riešenie do 12 mesiacov veku dieťaťa a najneskôr do 18 mesiacov veku. (12)

Malignita

Chlapci, ktorí majú nezostúpený semenník alebo boli liečení majú zvýšené riziko vzniku testikulárnej malignity. A preto je odporúčaný skrining a samovyšetovanie oboch semenníkov počas puberty ako aj v dospelosti. (13)

Literatúra

1. **Abeyaratne MR, Aherne WA, Scott JE.** The vanishing testis. *Lancet* 1969;2: 822–4.
2. **Scorer CG.** The descent of the testis. *Arch Dis Child*, 1964; 39:605–9.
3. **Radmayr, C., et al.** Management of undescended testes: European Association of Urology/European Society for Paediatric Urology Guidelines. *J Pediatr Urol*, 2016.
4. **Campbell-Walsh,** *Urology*, Chapter 148 Etiology, Diagnosis, and Management of the Undescended Testis p. 3439,2012
5. **Caesar, R.E., et al.** The incidence of the cremasteric reflex in normal boys. *J Urol*, 1994. 152: 779.
6. **Barthold, J.S., et al.** The epidemiology of congenital cryptorchidism, testicular ascent and orchiopexy. *J Urol*, 2003. 170: 2396.
7. **Ritzen, E.M.** Undescended testes: a consensus on management. *Eur J Endocrinol*, 2008. 159 Suppl 1: S87.
8. **Martin, J.M., et al.** Is radiotherapy a good adjuvant strategy for men with a history of cryptorchidism and stage I seminoma *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010. 76: 65.
9. **Kirsch, A.J., et al.** Surgical management of the nonpalpable testis: the Children's Hospital of Philadelphia experience. *J Urol*, 1998. 159: 1340.
10. **Esposito, C., et al.** Exploration of inguinal canal is mandatory in cases of non palpable testis if laparoscopy shows elements entering a closed inguinal ring. *Eur J Pediatr Surg*, 2010. 20: 138.
11. **Radmayr, C., et al.** Long-term outcome of laparoscopically managed nonpalpable testes. *J Urol*, 2003. 170: 2409.
12. **Wenzler, D.L., et al.** What is the rate of spontaneous testicular descent in infants with cryptorchidism *J Urol*, 2004. 171: 849.
13. **Tasian, G.E., et al.** Age at orchiopexy and testis palpability predict germ and Leydig cell loss: clinical predictors of adverse histological features of cryptorchidism. *J Urol*, 2009. 182: 704.

IV. VARIA

VPLYV KYSELINY HYALURÓNOVEJ NA AKTIVITU ANTIOXIDAČNÝCH ENZÝMOV POTKANOV S ADJUVANTNOU ARTRITÍDOU

(The effect of hyaluronic acid on the activity of antioxidant enzymes in rats with adjuvant arthritis)

Lucia Cádrová¹, Martina Horváthová¹, Katarína Bauerová², Jana Muchová¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave; jana.muchova@fmed.uniba.sk

²Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie –PIM, Centrum experimentálnej medicíny SAV, SAV

Súhrn

Adjuvantná artritída, ako reumatoidná artritída (RA) u ľudí, je progresívne zápalové ochorenie, postihujúce kĺby rúk a nôh. Oxidačný stres je dôležitý rizikový faktor v patogenéze viacerých ochorení, vrátane reumatoidnej artritídy. Cieľom štúdie bolo porovnať vplyv rôznych molekulových foriem kyseliny hyalurónovej, podávanej v dvoch rôznych koncentráciách, na parametre oxidačného stresu a zmenu objemu zadných končatín u potkanov s adjuvantnou artritídou. Adjuvantná artritída vyvolala u potkanov zvýšenie objemu zadných končatín počas celej doby experimentu, pričom kyselina hyalurónová tento parameter neovplyvnila. Z výsledkov vyplýva, že kyselina hyalurónová má antioxidantné účinky, pretože vplyvom jej podávania sa zvýšila aktivita antioxidantných enzýmov (SOD a GPx) a znížila hladina markera oxidačného poškodenia lipidov – lipidových hydroperoxidov. Naša štúdia preukázala, že kyselina hyalurónová zvyšuje aktivitu antioxidantných enzýmov, čo by mohlo pozitívne ovplyvniť zápal a byť prínosom v liečbe RA.

Kľúčové slová

reumatoidná artritída, kyselina hyalurónová, oxidačný stres

Summary

Adjuvant arthritis, as a rheumatoid arthritis (RA) in human, is a progressive inflammatory disease affecting the joints of the hands and feet. Oxidative stress is an important risk factor in the pathogenesis of multiple diseases, including rheumatoid arthritis. The aim of this study was to compare the effect of different molecular forms of hyaluronic acid applied in two various concentrations on the parameters of oxidative stress and on the change in hind paw volume in rats with adjuvant arthritis. Adjuvant arthritis caused increase values of the volume of hind paws in rats during the experiment, whereas hyaluronic acid did not affect this parameter. The results have shown that hyaluronic acid has antioxidant effects, due to the fact, that applying of hyaluronic acid increased the activity of antioxidant enzymes (SOD and GPx) and reduced the marker of oxidative damage to lipids – lipid hydroperoxides. Our study has shown that hyaluronic acid increases the activity of antioxidant enzymes which could positively affect inflammation and be beneficial also in the treatment of RA.

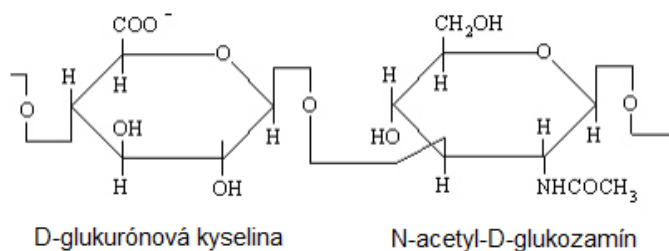
Keywords

rheumatoid arthritis, hyaluronic acid, oxidative stress

Úvod

Reumatoidná artritída je definovaná ako chronické autoimunitné ochorenie s progresívnym priebehom (5). Ochorenie primárne postihuje kĺby rúk a nôh, avšak môže poškodzovať aj iné orgány, ako srdce, pľúca alebo oči (13). Vyznačuje sa postupnou deštrukciou kĺbov, vznikom deformít a v neposlednom rade zhoršením pohybových schopností pacienta (5). Pri tomto ochorení vzniká zápal v synoviálnej membráne, ktorý následne spôsobuje edém mäkkých tkanív (13). V patogenéze reumatoidnej artritídy zohráva dôležitú úlohu oxidačný stres. V synoviálnych tkanivách pacientov s reumatoidnou artritídou bola zistená prítomnosť markerov oxidačného poškodenia lipidov, lipoproteínov a prítomnosť karbonylovej skupiny (6).

Jedným z prístupov k liečbe reumatoidnej artritídy je podávanie kyseliny hyalurónovej. Kyselina hyalurónová (HA) je polysacharid, ktorý vo svojej chemickej štruktúre obsahuje opakujúce sa disacharidové jednotky, zložené z β (1,3)-D-glukurónovej kyseliny a β (1,4)-N-acetyl-D-glukozamínu (obr. 1) (14). V ľudskom tele sa kyselina hyalurónová nachádza v koži, cievach, mozgu, chrupavke, srdcových chlopniach a pupočnej šnúre. Najvyššiu koncentráciu HA obsahuje synoviálna tekutina, pričom pacienti trpiaci artritídou majú túto koncentráciu zníženú. Pri liečbe artritídy je dôležitá obnova normálnej hladiny HA, na čo sa používajú intraartikulárne injekcie s HA. Tento prístup liečby je spojený s bolesťou a rizikom infekcie pacienta (9). Preto vhodnou alternatívou je podávanie HA per os, avšak je potrebný výskum na určenie dávky HA pre efektívnu liečbu tohto ochorenia.



Obr. 1 Vzorec opakujúcich sa jednotiek kyseliny hyalurónovej (Upravené podľa Nečas a kol. (8))

Cieľom našej štúdie bolo posúdiť, ako vplýva podávanie kyseliny hyalurónovej s odlišnou molekulovou hmotnosťou (0,43 MDa, 0,99 MDa a 1,73 MDa) v dvoch rôznych koncentráciách (0,5 a 5 mg/kg telesnej hmotnosti) na vybrané markery oxidačného stresu – superoxid-dismutázu (SOD), glutatiónperoxidázu (GPx), katalázu (CAT), lipoperoxidy (LPx), celkovú antioxidačnú kapacitu (TEAC) a na zmenu objemu zadných končatín potkanov.

Materiál a metódy

V experimentálnej štúdiu boli použité samce potkanov kmeňa Lewis (n=55) vo veku 5-6 týždňov z chovnej stanice Oddelenia toxikológie a chovu laboratórnych zvierat, Ústavu experimentálnej farmakológie a toxikológie, Slovenskej akadémie vied, Dobrá voda, Slovensko. Projekt bol schválený Štátnou potravinovou a veterinárnou správou Slovenskej republiky a Etickou komisiou Ústavu experimentálnej farmakológie a toxikológie. Adjuvantná artritída bola vyvolaná aplikáciou suspenzie *Mycobacterium butyricum* (MB) v nekompletnom Freundovom adjuvans (12 mg MB na 1 ml NFA).

Zvieratá boli randomizáciou rozdelené do 8 skupín podľa formy (molekulová hmotnosť - 0,43 MDa, 0,99 MDa a 1,73 MDa) a koncentrácie (0,5 a 5 mg/kg telesnej hmotnosti) kyseliny

hyaluronovej, ktorá bola podávaná gastrickou sondou počas 28 dní. Potkany boli usmrtené na 28. deň experimentu, pričom im zo srdca bola odobratá krv. Centrifugáciou (20 min. pri 3000 ot/min., 4°C) sme získali plazmu, ktorá bola následne uskladnená pri teplote -80°C až do analýzy. Pre stanovenie aktivity SOD (Sigma – Aldrich, Nemecko) a GPx (Cayman Chemical, USA) boli použité komerčné sety. Enzýmová aktivita CAT bola stanovená metódou podľa Bergmayer (2), TEAC bola stanovená metódou podľa Re a kol. (10) a koncentrácia LPx bola stanovená metódou podľa El-Saadani a kol. (3). Objem zadných končatín bol meraný prostredníctvom elektronického vodného pletyzmometra.

Výsledky

Výsledky sledovania zmeny objemu zadných končatín sú uvedené v tabuľke 1. Meraním opuchu zadných končatín sme zistili stúpajúci trend pre tento parameter u potkanov s adjuvantnou artritídou počas doby trvania experimentu. Porovnaním nameraných hodnôt medzi zdravou kontrolnou skupinou (HC) a skupinou s artritídou bez podávania kyseliny hyaluronovej (AA) sme zistili štatisticky významný nárast objemu zadných končatín u artritických potkanov v 14., 21. a 28. dni experimentu. U skupín, kde bola podávaná kyselina hyaluronová, neboli preukázané žiadne signifikantné zmeny pre tento marker.

Skupina zvierat	Parameter	Čas (deň)			
		7.	14.	21.	28.
HC	OZK (%)	5,39	7,73	12,65	16,51
	SEM	1,275	1,304	1,364	1,411
AA	OZK (%)	1,76	56,78**	66,48***	60,53***
	SEM	1,281	1,994	2,089	2,014
NHA	OZK (%)	0,89	47,85	62,23	60,26
	SEM	1,268	1,857	2,036	2,014
5 NHA	OZK (%)	6,63	48,48	74,31	65,53
	SEM	1,208	1,679	1,971	1,871
SHA	OZK (%)	1,82	45,39	60,44	53,45
	SEM	1,222	1,744	1,925	1,844
5 SHA	OZK (%)	7,24	54,72	73,18	71,28
	SEM	1,200	1,736	1,943	1,925
VHA	OZK (%)	3,75	53,26	64,20	59,47
	SEM	1,256	1,856	1,988	1,931
5 VHA	OZK (%)	0,00	53,94	67,73	62,99
	SEM	1,180	1,820	1,980	1,925

Tab. 1 Percentuálna zmena objemu zadných končatín

Prehľad aktivity antioxidantných enzýmov a celková antioxidantná kapacita u zdravých potkanov a potkanov s adjuvantnou artritídou sú uvedené v tabuľke 2. Porovnaním aktivity antioxidantných enzýmov medzi zdravými potkanmi (HC) a potkanmi s artritídou (AA) sme zaznamenali signifikantné rozdiely v aktivite superoxidodismutázy – SOD ($p=0,002$) a katalázy – CAT ($p=0,053$).

Výsledky merania aktivity antioxidantných enzýmov a celkovej antioxidantnej kapacity plazmy po podávaní kyseliny hyaluronovej sú uvedené v tabuľke 3. Celková antioxidantná kapacita plazmy (TEAC) sa štatisticky významne zvýšila pri podávaní vyššej dávky kyseliny hyaluronovej v porovnaní so skupinou, ktorej nebola podaná táto látka (AA vs. 5 NHA, $p = 0,0021$; AA vs. 5 SHA, $p = 0,0099$; AA vs. 5 VHA, $p = 0,0039$). Takisto aktivita SOD

v dávke 5 mg/kg (AA vs. 5 NHA; AA vs. 5 SHA; AA vs. 5 VHA, $p < 0,001$) a v dávke 0,5 mg/kg (AA vs. SHA; AA vs. VHA, $p < 0,001$) a aktivita GPx vo vyššej dávke (AA vs. 5 NHA, $p = 0,0366$; AA vs. 5 SHA, $p = 0,0167$; AA vs. 5 VHA, $p = 0,0004$) a pri dávke 0,5 mg/kg (AA vs. VHA, $p = 0,0166$) boli signifikantne zvýšené vplyvom podania kyseliny hyalurónovej. Naopak, aktivita CAT bola u všetkých sledovaných skupín signifikantne nižšia (AA vs. NHA, $p = 0,0016$; AA vs. 5 NHA, $p = 0,0379$; AA vs. SHA, $p = 0,0106$; AA vs. 5 SHA, $p = 0,0014$; AA vs. VHA, $p = 0,0019$; AA vs. 5 VHA, $p = 0,003p$). Parameter oxidačného poškodenia lipidov (LPx) nepreukázal žiadnu štatisticky významnú zmenu.

Parameter	HC	AA	P
TEAC (mmol/l)	4,01 ± 0,07	4,04 ± 0,09	n.s.
SOD (U/mg Hb)	422,65 ± 15,93	546,48 ± 14,25	0,0001
GPx (μkat/mg Hb)	45,01 ± 3,89	48,78 ± 4,28	n.s.
CAT (μkat/g Hb)	2,61 ± 0,18	3,06 ± 0,09	0,044
LPx (nmol/ml)	20,76 ± 3,55	53,34 ± 5,83	0,003

Tab. 2 Vplyv adjuvantnej artritídy na markery oxidačného stresu

Parameter	AA	NHA	5 NHA	SHA	5 SHA	VHA	5 VHA
TEAC (mmol/l)	4,04 ± 0,09	4,23 ± 0,09	4,57** ± 0,03	4,07 ± 0,10	4,80** ± 0,24	4,19 ± 0,10	4,73** ± 0,06
SOD (U/mg Hb)	546,48 ± 14,25	615,26* ± 23,00	817,37** ± 28,45	661,41** ± 24,34	944,73** ± 41,35	777,17** ± 30,91	869,42** ± 34,96
CAT (μkat/g Hb)	3,06 ± 0,09	2,61* ± 0,15	2,40*** ± 0,08	2,81 ± 0,12	2,06*** ± 0,10	2,02*** ± 0,05	2,28*** ± 0,09
GPx (μkat/mg Hb)	48,78 ± 4,28	51,97 ± 5,27	74,61** ± 8,67	69,74** ± 7,37	80,99** ± 10,19	61,26** ± 4,31	77,17** ± 5,50
LPx (nmol/ml)	53,34 ± 5,83	18,37** ± 2,11	46,84* ± 11,47	25,3** ± 4,67	30,98 ± 8,45	25,13** ± 5,53	24,49* ± 2,67

*Štatistická významnosť oproti skupine AA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Tab. 3 Vplyv kyseliny hyalurónovej na markery oxidačného stresu u potkanov s adjuvantnou artritídou

Diskusia

V predkladanej štúdií sme sledovali, ako sa menili markery oxidačného stresu a opuch zadných končatín u potkanov s adjuvantnou artritídou vplyvom kyseliny hyalurónovej. Indukovaná adjuvantná artritída sa u potkanov prejavila výrazným opuchom zadných končatín, ktorý mal kontinuálne rastúci trend počas celého experimentu. Skúmané látky však tento parameter významne neovplyvnili. K podobným záverom dospeli v štúdií aj Slovák a kol. (12) pri monitorovaní vplyvu ferulaldehydu, avšak v danej štúdií kombinácia ferulaldehydu s metotrexátom spôsobila výrazné zmenšenie opuchu. Analýza výsledkov merania antioxidantnej kapacity preukázala, že kyselina hyalurónová signifikantne zvyšuje celkovú antioxidantnú kapacitu plazmy počas artritídy pri porovnaní s nesuplementovanou skupinou chorých potkanov. Podobne, Gardi a kol. (4) vo svojej štúdií dosiahli zvýšenie TEAC u artritických potkanov účinkom kvercetínu. Signifikantný nárast aktivity SOD po podávaní HA sme pozorovali takmer vo všetkých skupinách, okrem skupiny potkanov, ktorá bola suplementovaná nízkomolekulovou HA v nižšej koncentrácii. Rovnaký efekt na aktivitu

SOD má tiež napríklad polyfenolová frakcia panenského kokosového oleja (15) a kyselina algínová v monoterapii alebo v kombinácii s indometacínom (11). Pozitívny vplyv podávania HA sa prejavil aj v aktivite enzýmu GPx, ktorá bola štatisticky významne vyššia po podávaní všetkých molekulových foriem HA vo vyššej koncentrácii. V štúdií Kalaiselven a Rasool (7) tiež preukázali priaznivý účinok zmesi prírodných látok – Triphala na aktivitu GPx v modeli adjuvantnej artritídy. Na rozdiel od enzýmov SOD a GPx, sa meraním enzýmu CAT v našej štúdií zistilo signifikantné zníženie jej aktivity po podaní sledovanej látky – kyseliny hyalurónovej. Tieto zistenia sa zhodujú s výsledkami štúdií Akramas a kol. (1) a Sarithakumari a kol. (11).

Zo zistených poznatkov môžeme konštatovať, že kyselina hyalurónová pozitívne pôsobí na znižovanie oxidačného stresu pri adjuvantnej artritíde.

PodĎakovanie

Projekt MŠ SR APVV-15-0308.

Literatúra

1. Akramas L, Leonaviciene L, Bradunaite R, Vasiliauskas A, Dumalakiene I, Zabulyte D, Normantiene T, Jonauskiene I, Vaitkiene D. Antiinflammatory effect of herbal preparations on adjuvant arthritis in rats. *Turk J Vet Anim Sci* 2017; 41, 748–756.
2. Bergmeyer, H. *Methods of Enzymatic Analysis*, Volume III: Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases. VCH, Weinheim 1987.
3. El-Saadani M, Esterbauer H, El-Sayed M, Goher M, Nassar AY, Jürgens G. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J. Lipid Res* 1989; 30, 627–30.
4. Gardi C, Bauerova K, Stringa B, Kuncirova V, Slovak L, Ponist S, Drafi F, Bezakova L, Tedesco I, Acquaviva A, Bilotto S, Russo GL. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. *Arch Biochem Biophys* 2015; 583, 150–157.
5. Hirose T, Fukuma Y, Takeshita A, Nishida K. The role of lymphotoxin- α in rheumatoid arthritis. *Inflamm Res Springer International Publishing* 2018; 67:495–501.
6. Islam S, Mir AR, Arfat MY, Khan F, Zaman M, Ali A, Moinuddin. Structural immunological characterization of hydroxyl radical modified human IgG: Clinical correlation in rheumatoid arthritis. *Spectrochim Acta - Part A Mol. Biomol Spectrosc* 2018; 194, 194–201.
7. Kalaiselvan S, Rasool MK. The anti-inflammatory effect of triphala in arthritic-induced rats. *Pharm Biol* 2015; 53, 51–60.
8. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet Med* 2008 (Praha); 53, 397–411.
9. Oe M, Tashiro T, Yoshida H, Nishiyama Y, Masuda Y, Maruyama K, Koikeda T, Maruya R, Fukui N. Oral hyaluronan relieves knee pain: a review. *Nutrition Journal* 2016; 15:11.
10. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26, 1231–7.
11. Sarithakumari CH, Renju GL, Kurup GM. Anti-inflammatory and antioxidant potential of alginic acid isolated from the marine algae, *Sargassum wightii* on adjuvant-induced arthritic rats. *Inflammopharmacology* 2013; 21, 261–268.
12. Slovák L, Švík K, Mihalová D, Tóth J, Czige S, Pašková L, Bilka F, Bauerová K. Ferulaldehyde improves the effect of methotrexate in experimental arthritis. *Molecules* 2017; 22, 1–12.

- 13. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, Kavanaugh A, McInnes IB, Solomon DH, Strand V, Yamamoto K.** () Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Prim* Macmillan Publishers Limited 2018; 4, 1–23.
- 14. Sudha PN, Rose MH.** Beneficial Effects of Hyaluronic Acid. *Adv Food Nutr Res* 2014; 1:72.
- 15. Vysakh A, Ratheesh M, Rajmohanan TP, Pramod C, Premlal S, Girish Kumar B, Sibi PI.** Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant aanti-inflammatory action. *Int Immunopharmacol* 2014; 20, 124–130.

DETEKCIA UBIKVITÍNOVEJ AKTIVITY V GLIOVÝCH BUNKÁCH BIELEJ HMOTY MIECHY KRÁLIKA PO FARMAKOLOGICKOM PREKONDICIONOVANÍ A NÁSLEDNEJ ISCHÉMII/REPERFÚZII

(Detection of ubiquitin activity in the glial cells of rabbit's spinal cord white matter after pharmacological preconditioning followed by spinal cord ischemia /reperfusion)

Marianna Danková¹, Eva Mechírová¹, Iveta Domoráková¹, Zuzana Fagová¹, Milan Stebnický²

¹Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta UPJŠ, Šrobárova 2, 040 01 Košice, marianna.dankova@upjs.sk

²II. Chirurgická klinika, Lekárska fakulta UPJŠ a UNLP, Rastislavova 43, 041 90 Košice

Súhrn

Naším cieľom bolo posúdiť účinky bradykinínového alebo noradrenalinového prekondicionovania na aktivitu ubikvitínu v gliových bunkách bielej hmoty miechy králikov po ischémii/reperfúzii. Významný nárast ($P < 0,001$) ubikvitín pozitívnych gliových buniek sme pozorovali v oboch prekondicionovaných skupinách (Br / 20I / 24hR a Nor / 20I / 24hR) zvierat v porovnaní s kontrolnou skupinou. Významné zvýšenie ($P < 0,001$) ubikvitín pozitívnych gliových buniek pretrvávalo aj po 48 hodinách reperfúzie v oboch prekondicionovaných skupinách (Br / 20I / 48hR a Nor / 20I / 48hR) v porovnaní nielen s kontrolnou skupinou, ale aj s ischemickou skupinou (20I / 48hR) zvierat. Po 24 hodinách reperfúzie sa pozoroval signifikantný nárast ($P < 0,001$) gliových buniek pozitívnych na ubikvitín v ischemickej skupine (20I / 24hR) oproti kontrolnej skupine. Naopak, v ischemickej skupine po 48h reperfúzie (20I / 48hR) bol prítomný významný pokles ($P < 0,01$) ubikvitín pozitívnych gliových buniek oproti kontrolnej skupine zvierat. Podľa našich zistení prekondicionovanie bradykinínom alebo noradrenalinom, po ktorom nasleduje ischémia/reperfúzia, aktivuje ubikvitín sprostredkovanú stresovú odpoveď, ktorá pretrváva aj 48 hodín po ischémii.

Kľúčové slová

miecha, biela hmota, králik, gliové bunky, bradykinín, noradrenalin, prekondicionovanie, ubikvitín

Summary

We aimed to assess the effects of bradykinin or noradrenaline preconditioning on ubiquitin activity in ischemia/reperfusion model in the rabbit spinal cord. Significant increase ($P < 0.001$) of ubiquitin positive glial cells was observed in both preconditioned groups (Br/20I/24hR and Nor/20I/24hR) of animals in comparison to the control group. Significant increase ($P < 0.001$) of ubiquitin positive glial cells persisted also after 48h of reperfusion in

both preconditioned groups (Br/20I/48hR a Nor/20I/48hR) in comparison not only to control group but also versus ischemic group (20I/48hR) of animals. After 24h of reperfusion was observed significant increase ($P < 0.001$) of ubiquitin positive glial cells in the ischemic group (20I/24hR) versus control group observed. On the contrary, in the ischemic group after 48h of reperfusion (20I/48hR) the significant decrease ($P < 0.01$) of ubiquitin positive glial cells versus control group was present. According our findings bradykinin or noradrenaline preconditioning followed by ischemia/reperfusion activates ubiquitin mediated stress response which persist 48h after ischemia.

Keywords

spinal cord, white matter, rabbit, glial cells, bradykinin, noradrenaline, preconditioning, ubiquitin

Úvod

Ubikvitín je proteín vyskytujúci sa v eukaryotických bunkách aj za fyziologických podmienok. Je súčasťou ubikvitín - proteazómového systému, zameriava sa na značenie početných bunkových proteínov určený na degradáciu, a teda je nevyhnutný na kontrolu širokého spektra základných bunkových procesov a prežitia buniek. Predpokladá sa, že jeho zvýšená imunopozitivita v bunkách je pozorovaná pri oxidačnom strese (2). Naším cieľom v práci bolo posúdiť účinky farmakologického prekondicionovania bradykinínom (Br) alebo noradrenalinom (Nor) na aktivitu ubikvitínu v gliových bunkách bielej hmoty miechy králikov po ischémii (I) / reperfúzi (R).

Materiál a metódy

Ischémia bola vyvolaná 20 minútovým podväzom brušnej aorty pod ľavou renálnou artériou. Novozélandské dospelé samce králikov boli prekondicionované bradykinínom alebo noradrenalinom 2 dni pred 20 minútovou ischémiou miechy. Po 24 alebo 48 hodinách reperfúzie sme zvieratá transkardiálne prepláchli 0,9 % fyziologickým roztokom a 4 % paraformaldehydrom v 0,1 M roztoku PBS (pH = 7,4). Celá miecha bola vypreparovaná, postfixovaná v 4 % paraformaldehyde. Parafínové rezy z L₅ segmentov miechy (5µm) boli spracované imunohistochemickou metódou na dôkaz ubikvitínu. Funkčnosť panvových končatín sme sledovali pomocou skóre podľa Tarlova (0-5). Výsledky experimentu boli štatisticky vyhodnotené pomocou štatistického programu GraphPad InStat 3 (ANOVA test a Tukey–Kramerov test). Údaje v grafe sú uvádzané ako priemerné hodnoty a sú vyjadrené ako \pm S.E.M. (štandardná odchýlka). Zvieratá boli rozdelené do 7 skupín:

- 1. kontrolná skupina** - (n = 7)
- 2. ischemická skupina** - 20 minút ischémie / 24 hodín reperfúzie (n = 8)
- 3. ischemická skupina** - 20 minút ischémie / 48 hodín reperfúzie (n = 8)
- 4. experimentálna skupina** – bradykinín + 20 minút ischémie / 24 hodín reperfúzie (n = 10)
- 5. experimentálna skupina** - bradykinín+ 20 minút ischémie / 48 hodín reperfúzie (n = 11)
- 6. experimentálna skupina** - noradrenalin + 20 minút ischémie / 24 hodín reperfúzie (n = 9)
- 7. experimentálna skupina** - noradrenalin + 20 minút ischémie / 48 hodín reperfúzie (n = 9)

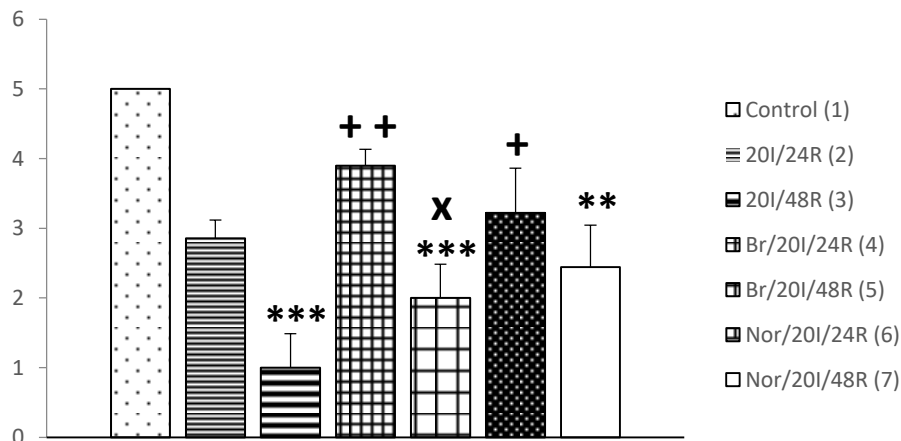
Výsledky

Zaznamenali sme rozdiely v počte ubikvitín pozitívnych gliových buniek (graf č. 1). Významný nárast ($***P < 0,001$) ubikvitín pozitívnych gliových buniek sa pozoroval v oboch prekondicionovaných skupinách (Br/20I/24hR a Nor/20I/24hR) po 24h reperfúzie v porovnaní s kontrolnou skupinou zvierat. V týchto prekondicionovaných skupinách (Br/20I/24hR a Nor/20I/24hR) sme pozorovali v bielej hmote miechy difúzne rozptýlené

gliové bunky s vyššou ubikvitínovou pozitivitou v jadre v porovnaní s ich cytoplazmou. Významné zvýšenie počtu ubikvitín pozitívnych gliových buniek pretrvávalo aj po 48 hodinách reperfúzie v obidvoch prekondicionovaných skupinách (Br/20I/48hR a Nor/20I/48hR) v porovnaní s kontrolnou skupinou (**P <0,001) a aj s ischemickou skupinou (20I/48hR) zvierat (+++P <0,001). Bradykinínom prekondicionovaná skupina (Br/20I/48hR) a noradrenálnom prekondicionovaná skupina (Nor/20I/48hR) zvierat preukázali mierne zmeny v ubikvitínovej pozitivite gliových buniek. Niektoré z gliových buniek znížili jadrovú ubikvitín pozitivitu, na druhej strane sa zvýšila ubikvitín pozitivita v ich cytoplazme v podobe jemných ubikvitín pozitívnych zhlukov. Neuropil bol bez výrazných ubikvitínových agregátov.

V ischemickej skupine (20I/24hR) po 24 hodinách reperfúzie došlo k významnému zvýšeniu počtu (**P <0,001) gliových buniek pozitívnych na ubikvitín oproti kontrolnej skupine zvierat. V cytoplazme týchto gliových buniek boli viditeľné tmavohnedé ubikvitínové agregáty. Významný pokles (**P <0,01) ubikvitín pozitívnych gliových buniek sa pozoroval v ischemickej skupine (20I/48hR) po 48 hodinách reperfúzie v porovnaní s kontrolnou skupinou zvierat. Biela hmota javila známky poškodenia, axóny a väčšina gliových buniek boli poškodené. Výskyt ubikvitínovej aktivity v týchto gliových bunkách sa výrazne zmenil, pozorovali sme zníženie ubikvitín pozitivity v ich cytoplazme, ale na druhej strane boli v neuropile viditeľné výrazné tmavohnedé ubikvitínové agregáty. Väčšina prítomných gliových buniek nebola pozitívna na ubikvitín.

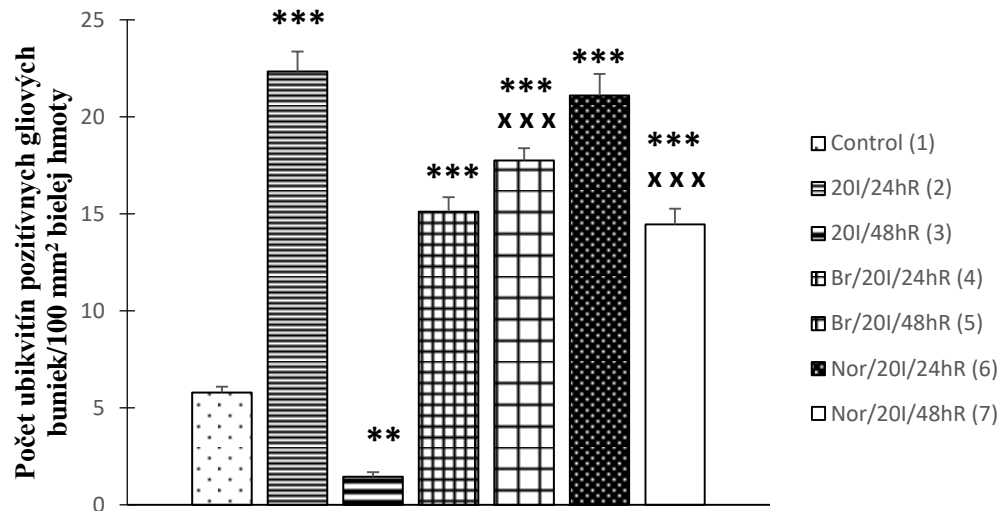
Tarlovo skóre



Graf 1 Počet ubikvitín pozitívnych gliových buniek v bielej hmote L₅ segmentu miechy kráľika. Grafické hodnoty znázorňujú aritmetický priemer ± S.E.M. **Štatistická významnosť rozdielov:** (**P < 0,001), (**P < 0,01) pri porovnaní s kontrolnou skupinou; (+++P <0,001) pri porovnaní s ischemickou skupinou 20I/48hR.

Na zhodnotenie funkčnosti panvových končatín sme sa opierali o skóre podľa Tarlova (7). Hodnoty sú znázornené v grafe č. 2. Signifikantné rozdiely v Tarlovom skóre boli zaznamenané medzi kontrolnou skupinou zvierat a skupinami 20I/48hR; Br/20I/48hR (**P <0,001) a medzi kontrolnou skupinou v porovnaní s noradrenálnom prekondicionovanou skupinou Nor/20I/48hR (**P <0,01). Ďalšie signifikantné rozdiely v Tarlovom skóre sme pozorovali pri porovnaní ischemickej skupiny 20I/48hR s prekondicionovanými skupinami Br/20I/24hR (++P <0,01), Nor/20I/24hR (+P <0,5). Signifikantný pokles (x P <0,5) Tarlovo skóre bol pozorovaný po 48 hodinách reperfúzie v bradykinínom prekondicionovanej skupine (Br/20I/48hR) v porovnaní s bradykinínom prekondicionovanou skupinou (Br/20I/24hR)

zvierat, ktoré preživali 24 hodín. Podobný, ale štatisticky nesignifikantný pokles v Tarlovom skóre sme zaznamenali aj v noradrenalinom prekondicionovaných skupinách. V ischemickej skupine zvierat (20I/48hR) sme po 20 minútovej ischemii a 48 hodinovej reperfúzii pozorovali výraznú paraplégiu panvových končatín a inkontinenciu moču a stolice u takmer všetkých experimentálnych zvierat, na rozdiel od prekondicionovaných skupín (Br/20I/48hR a Nor/20I/48hR), kde zvieratá boli schopné čiastočného pohybu a inkontinencia prítomná nebola.



Graf 2 Tarlovo skóre. 0- paraplégia, 1- postrehnuteľný pohyb panvových končatín, 2- aktívny pohyb, bez schopnosti sedu, 3- schopnosť sedu, bez schopnosti skoku, 4- chabé skákanie, 5- kompletná normálna funkčnosť panvových končatín. Grafické hodnoty znázorňujú aritmetický priemer \pm S.E.M. **Štatistická významnosť rozdielov:** (***) $P < 0,001$), (** $P < 0,01$) pri porovnaní s kontrolnou skupinou; (++) $P < 0,01$), (+ $P < 0,5$) pri porovnaní s ischemickou skupinou 20I/48hR a (x $P < 0,5$) pri porovnaní s bradykinínom prekondicionovanou skupinou Br/20I/24hR.

Diskusia a záver

Naše výsledky naznačujú, že farmakologické prekondicionovanie bradykinínom alebo noradrenalinom zaujímavovo vplyva na ubikvitín pozitívitu v gliových bunkách bielej hmoty miechy kráľika po ischemii a reperfúzii. Vyššiu ubikvitínovú pozitívitu sme pozorovali v jadrách gliových buniek bielej hmoty miechy v skupinách Br/20I/24R a Nor/20I 24R. Táto ubikvitínová pozitívita v jadrách gliových buniek bola vyššia v porovnaní s cytoplazmou. Naopak, v ischemickej skupine 20I/24R distribúcia ubikvitínu bola odlišná po 20 minútach ischemie a 24 hodinovej reperfúzii. Zaznamenali sme tu zníženú jadrovú ubikvitínovú pozitívitu a naopak, bola zvýšená cytoplazmatická ubikvitínová pozitívita v podobe tmavých agregátov. Vo všetkých prekondicionovaných skupinách sme pozorovali štatisticky významné zvýšenie počtu ubikvitín pozitívnych gliových buniek v bielej hmote miechy vzhľadom ku kontrolnej skupine zvierat a v prekondicionovaných skupinách Br/20I/48R a Nor/20I 48R aj vzhľadom k ischemickej skupine zvierat 20I/48R.

V ischemickej skupine 20I/48R nervové tkanivo bielej hmoty miechy bolo po 20 minútach ischemie a 48 hodín reperfúzie vakuolizované, na mnohých miestach, kde boli predtým prítomné gliové bunky, sme pozorovali tmavé ubikvitín pozitívne agregáty alebo prázdne priestory. Prítomnosť ubikvitínových agregátov predstavuje známky poškodených degenerovaných buniek, ktoré stratili schopnosť intracelulárnej hydrolytickej degradácie pozmenených proteínov (4). Gliové bunky neschopné syntetizovať nový ubikvitín sa javia ako tie, ktoré podliehajú degeneratívnejmu procesu, pretože ubikvitín v jadrách môže zohrávať

úlohu pri oprave DNA pôsobiac na poškodený chromatin (1,5 a 6). Liu a kol. (3) pozorovali, že ischemické prekondicionovanie zmiernuje agregáciu proteínov v neurónoch. Prekondicionovanie vedie pravdepodobne k vytvoreniu ischemickej tolerancie, čo má za následok produkciu stresových proteínov, ktoré znižujú tvorbu proteínových agregátov (3). Podľa našich zistení bradykinínom alebo noradrenalínom realizované prekondicionovanie pred ischémiou/reperfúziou vplyva na ubikvitínom sprostredkovanú stresovú odpoveď, ktorá pretrváva aj 48 hodín po realizovanej ischémií v podobe zvýšeného počtu ubikvitín pozitívnych gliových buniek.

Pod'akovanie

Práca vznikla v rámci grantov VEGA: 1/0348/10, 1/0815/14 a 1/0439/17.

Literatúra

- 1. Hofmann RM, Pickart CM.** Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 1999; 96:645–53.
- 2. Jansen AHP, Reits EAJ, Hol EM.** The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Molecular Neurosci* 2014; 7(73):1-14.
- 3. Liu C, Chen S, Kamme F, Hu BR.** Ischemic preconditioning prevents protein aggregation after transient cerebral ischemia. *Neurosci* 2005; 134 (1), 69-80.
- 4. Mechírová E, Feriková M, Domoráková I.** Extract EGb 761 pretreatment limits ubiquitin positive aggregates in rabbit spinal cord neurons after ischemia/reperfusion. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26:1443–52.
- 5. Picologlou S, Brown N, Liebman SW.** Mutations in rad6, a yeast gene encoding a ubiquitin-conjugating enzyme, stimulate retrotransposition. *Mol Cell Biol* 1990; 10:1017–22.
- 6. Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D.** A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 1995; 15:1265–73.
- 7. Tarlov IM.** Acute spinal cord compression paralysis. *J Neurosurg* 1972; 36:10–20.

VPLYV KOMERČNE VYUŽÍVANÝCH PEG-*b*-PLA NANOČASTÍC NA AKTIVITU GLUTATIÓNPEROXIDÁZY V HOMOGENÁTOCH PEČENE POTKANOV

(Exposure of commercially used PEG – *b* – PLA nanoparticles on glutathione peroxidase activity in liver homogenates of rats)

**Monika Dvořáková¹, Lucia Slemenská¹, Soňa Scsuková², Eva Rollerová³,
Ingrid Žitňanová¹**

¹ Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, monika.dvorakova@fmed.uniba.sk

² Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05, Bratislava

³ Oddelenie toxikológie, Fakulta verejného zdravotníctva, Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 12, 833 03 Bratislava

Súhrn

V poslednom období sú už nanočastice bežnou súčasťou každodenného života. Poly(etylén)glykol – blok – polylaktidmetyléterové (PEG – *b* – PLA) nanočastice, ktoré sa používajú pri cielelom transporte liečiv, zlepšujú rozpustnosť liečiva a umožňujú jeho dlhšiu cirkuláciu v krvi. Potenciálny vplyv dvoch dávok nanočastíc [20 mg/kg telesnej hmotnosti (PEG20), alebo 40 mg/kg telesnej hmotnosti (PEG40)] na aktivitu glutatióneroxidázy (GPx) bol študovaný na samiciach potkanov z rodu Wistar v dvoch štádiách života – u infantilných a dospelých jedincov. U infantilných jedincov sme zistili signifikantný nárast aktivity GPx po podávaní PEG40. V prípade dospelých potkanov, signifikantný vplyv na aktivitu GPx bol zaznamenaný už v prípade PEG20, s ešte väčším nárastom po podaní PEG40. Aj napriek preukázateľnému pozitívnemu vplyvu nanočastíc, ich zvýšená incidencia v prostredí môže mať na ľudský život aj negatívny dosah. Potenciálna toxicita by preto mala byť predmetom ďalšieho štúdia nanočastíc.

Kľúčové slová

PEG - *b* - PLA nanočastice, oxidačný stres, glutatióneroxidáza (GPx)

Summary

Recently, nanoparticles have become a regular part of everyday life. The poly (ethylene) glycol - *block* - polylactide methyl ether (PEG - *b* - PLA) nanoparticles used in targeted drug delivery improve the drug's solubility and allow it to circulate longer in the blood. The potential impact of two doses of nanoparticles [20 mg/kg body weight (PEG20) or 40 mg/kg body weight (PEG40)] on glutathione peroxidase activity (GPx) was studied in two different life stages of female Wistar rats - infantile and adult individuals. In infantile individuals, we found a significant increase in GPx activity after PEG40 administration. In the case of adult rats, a significant effect on GPx activity was noted already with PEG20, with an even greater increase after PEG40 administration. Despite the demonstrable positive impact of

nanoparticles, their increased incidence in the environment may also have a negative impact on human life. Potential toxicity should therefore be the subject of further study of nanoparticles.

Keywords

oxidative stress, PEG - *b* - PLA nanoparticles, glutathione peroxidase (GPx)

Úvod

Vývoj a využívanie nanočastíc nielen v biomedicíne v poslednej dobe zažíva expanziu. Ich veľkosť, tvar, rozpustnosť a náboj, ale najmä schopnosť biodegradácie a schopnosť prenášať iné molekuly ich predurčujú na využitie v biomedicíne. Poly(etylén)glykol – blok – polylaktidmetyléterové (PEG – *b* – PLA) nanočastice nám poskytujú možnosť cieľového transportu liečiv a to predovšetkým zvýšením ich rozpustnosti vo vode a predĺžením cirkulácie v krvnom riečišti. Okrem toho sú schopné kontrolovať uvoľňovanie lieku v presne definovaných časových intervaloch (1-5) a tým zvyšovať cytotoxické účinky liečiv. Jednou z najzaujímavejších aplikácií nanotechnológií je práve cieľový transport liečiv do tkanív. Cieľová terapia vyvoláva žiaduce terapeutické účinky pri relatívne malej dávke. Navyše, riadené uvoľňovanie liečiva zabraňuje vedľajším účinkom liečby a znižuje negatívny dosah na zdravé tkanivo. Nanočastice, vrátane nami použitých PEG - *b* – PLA nanočastíc, sú schopné liečivo enkapsulovať, transportovať ho na miesto určenia a na základe interakcie so špecifickými receptormi na povrchu buniek cieľových tkanív ho do prostredia vypustiť.

Okrem pozitívnych účinkov sa čoraz viac upriamuje pozornosť na potenciálnu toxicitu nanočastíc, v neposlednom rade na vzťah medzi fyzikálno – chemickými vlastnosťami nanočastíc a ich vplyvom na oxidačný status organizmu. Preto cieľom našej štúdie bolo zistiť vplyv komerčne využívaných PEG – *b* – PLA nanočastíc na aktivitu enzýmu glutatiónperoxidázy v homogenátoch pečene v podmienkach *in vivo*.

Nedostatok informácií o účinku PEG – *b* – PLA na redoxnú rovnováhu organizmu potkanov nás viedol k sledovaniu vplyvu nanočastíc na aktivitu antioxidantného enzýmu, glutatiónperoxidázy, v pečeni potkanov v podmienkach *in vivo*.

Materiál a metódy

Micely PEG – *b* – PLA boli pripravené podľa Du a kol. (2009) (6) a Shin a kol. (2009) (7) a ocharakterizované transmisnou elektrónovou mikrografiou (TEM), metódou elektroforetického rozptylu svetla (ELS) a dynamického rozptylu svetla (DLS) (7). Detailný postup prípravy nanočastíc bol popísaný v práci Rollerová a kol. (2015) (8).

Do štúdie bolo zahrnutých 64 samíc potkanov z rodu Wistar. V postnatálne dni (PND) 4 – 7, bolo denne potkanom intraperitoneálne podávané PEG-*b*-PLA v dvoch rozdielnych dávkach: 20 mg/kg telesnej hmotnosti (PEG20) (infantilné potkany, n = 10, dospelé jedince, n = 12) , alebo 40 mg/kg telesnej hmotnosti (PEG40) (infantilné potkany, n = 10, dospelé jedince, n = 12). V prípade kontrolných skupín bola potkanom intraperitoneálne podávaná ultrapurifikovaná voda po odparení tetrahydrofuránu (nosič použitý pri príprave nanočastice) (infantilné potkany, n = 10, dospelé jedince, n = 10).

Samice potkanov boli usmrtené dekapitáciou po ketamín/xylazínovej anestézii (60/10 mg/kg telesnej hmotnosti) a to v dvoch štádiách života: infantilné potkany v PND17 a dospelé jedince v deň prvého estru po PND 176.

Pečeň potkanov bola po usmrtení odobratá do skúmaviek ošetrených argónom a uskladnená do ďalšej analýzy pri teplote -75°C.

Vzorka pečene bola homogenizovaná v homogenizačnom roztoku (0,01M Na₂HPO₄.12H₂O, 0,14M NaCl, 0,01M NaH₂PO₄.2H₂O), scentrifugovaná (20 min, 2000g, 4°C) a rozdelená na alikvóty na stanovenie koncentrácie karbonylov proteínov a celkovej antioxidantnej kapacity.

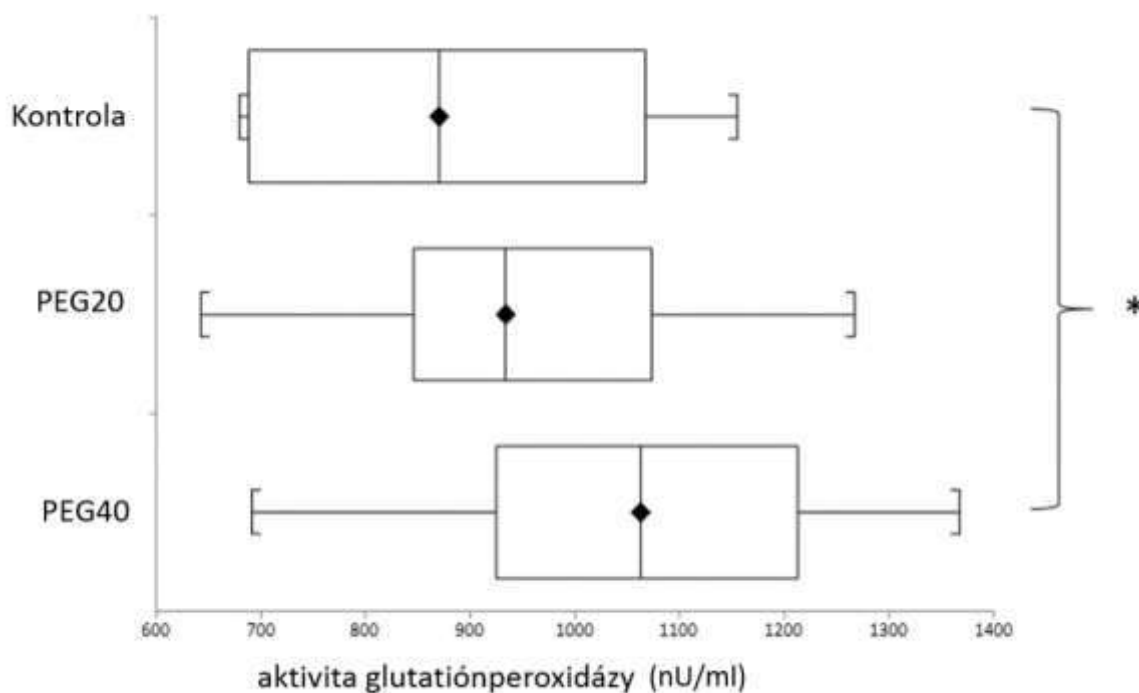
Pelet so zvyšným supernatantom bol opätovne rozsuspendovaný a scentrifugovaný (60 min, 10 000g, 4°C). Supernatant bol použitý na stanovenie aktivít antioxidantných enzýmov. Na stanovenie aktivity glutatiónperoxidázy bol použitý kit Glutathione Peroxidase Assay Kit (CaymanChemical, USA).

Aktivita enzýmu GPx je vyjadrená ako *nU/ml/mg Hb*.

Výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou programu StatsDirect3 Statistical Software, verzia 2.3.7. (StatsDirect® Ltd., UK). Hladina signifikancie bola nastavená ako $p < 0,05$. Kvôli nerovnomerne rozdeleným dátam, hodnoty sú vyjadrené ako medián s interkvartilovým rozmedzím (Q1-Q3, 25-75%). Grafické znázornenie bolo urobené pomocou *Box - and - Whisker Plot*.

Výsledky

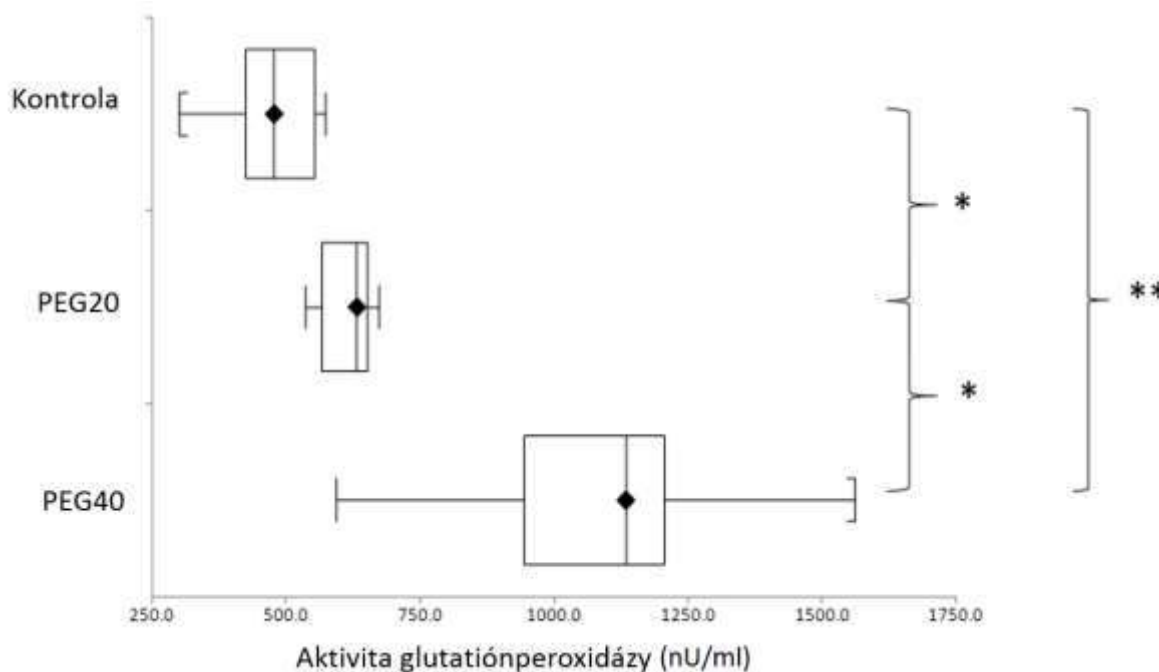
Trend nárastu aktivity GPX u infantilných jedincov v porovnaní s kontrolnou skupinou [870,197 (688,274-1067,279) nU/ml] sme pozorovali po podaní PEG20 [933,870 (845,94 (1073-344) nU/ml/mg Hb, ($p > 0,05$)]. Tento trend sa však ukázal významný až v prípade podávania PEG40 [1062,731 (924,773-1212,818) nU/ml, $p < 0,05$] (Obr. 1).



Obr. 1 Aktivita glutatiónperoxidázy v pečeni infantilných samíc potkanov po neonatálnej administrácii PEG-*b*-PLA (PEG20 - dávka 20 mg/kg telesnej hmotnosti, alebo PEG40 - 40 mg/kg telesnej hmotnosti). Hodnoty sú vyjadrené ako medián s interkvartilovým rozmedzím (Q1-Q3, 25-75%).

* $p < 0,05$ - kontroly vs. PEG40

V porovnaní s kontrolnou skupinou [477,547 (424,486-553,348) nU/ml] sme u dospelých jedincov zistili signifikantne zvýšenú aktivitu GPX v pečeni po podaní oboch dávok nanočastíc PEG - *b* - PLA [PEG20 - 632,181 (566,992-651,889) nU/ml, $p < 0,05$ vs. PEG40 - 1133,984 (1061,215-1197,657) nU/ml, $p < 0,01$] (Obr. 2).



Obr. 2 Aktivita glutatióneroxidázy v pečeni dospelých samíc potkanov po neonatálnej administrácii PEG-*b*-PLA (PEG20 - dávka 20 mg/kg telesnej hmotnosti, alebo PEG40 - 40 mg/kg telesnej hmotnosti). Hodnoty sú vyjadrené ako medián s interkvartilovým rozmedzím (Q1-Q3, 25-75%).

* $p < 0,05$ - kontroly vs. PEG20

** $p < 0,01$ - kontroly vs. PEG40

Diskusia a záver

Cieľom našej štúdie bolo u samíc potkanov z rodu Wistar zistiť vplyv neonatálneho podávania dvoch rozličných koncentrácií PEG-*b*-PLA nanočastíc (PEG20 - dávka 20 mg/kg telesnej hmotnosti, alebo PEG40 - 40 mg/kg telesnej hmotnosti) na aktivitu glutatióneroxidázy pečeni cicavcov, ktorá patrí medzi orgány s najvyššou metabolickou aktivitou.

Zvýšená hladina reaktívnych metabolitov s následnou zmenou v hladinách antioxidačných enzýmov sú spájané s procesom starnutia (9). Túto hypotézu potvrdzuje aj naše zistenie zvýšenej aktivity glutatióneroxidázy (GPx) u kontrolnej skupiny dospelých jedincov v porovnaní s kontrolnou skupinou infantilných potkanov. Zároveň, podobne ako Tunçsoy a kol. (10), ktorí namerali zvýšenú aktivitu GPx v pečeni rýb *Oreochromis niloticus* po podávaní CuO nanočastíc, sme aj my potvrdili predpokladaný vplyv PEG-*b*-PLA na aktivitu GPx a to u infantilných aj dospelých potkanov.

Podobne ako v plazme (11), aj v pečeni, ktorá sa považuje za cieľový orgán akumulácie nanočastíc, sme po podávaní PEG-*b*-PLA nanočastíc zistili zvýšenie aktivity GPx v závislosti od podávanej dávky. U infantilných jedincov sme pozorovali trend zvyšovania aktivity GPx v prípade PEG20, so signifikanciou pri PEG40. U dospelých jedincov bola aktivita GPx zvýšená už po podaní PEG20, čo môže súvisieť aj s už spomínanou akumuláciou oxidačného stresu v dôsledku vyššieho veku potkanov. Tieto výsledky podporuje aj teória Haser a Furll (2015), ktorí potvrdili zníženú antioxidačnú kapacitu a teda aj zvýšené následky redoxnej nerovnováhy aj na aktivity antioxidačných enzýmov.

Výsledky našej štúdie poukazujú na možný vzťah medzi oxidačným stresom a neonatálnym podávaním PEG-*b*-PLA. Výsledky by mohli mať vplyv na lepšie pochopenie a rozšírenie poznatkov o PEG-*b*-PLA nanočasticiach.

Pod'akovanie

Projekt vznikol na základe finančnej podpory grantov APVV-0404-11 a APVV-15-0296.

Literatúra

1. **Donaldson, K.; Stone, V.; Tran, C.L.; Kreyling, W.; Borm, P.J.** Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.*, 61, 727 – 728. 2004.
2. **Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J.** Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.*, 113, 823 – 839. 2005.
3. **Khanna P., Ong C., Bay BH., Baeg GH.** Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. *Nanomaterials*, 5, 1163-1180, 2015.
4. **Lanone, S.; Boczkowski J.** Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: Molecular mechanisms. *Curr. Mol. Med.*, 6, 651 – 663. 2006.
5. **Emeje MO., Obidike IC., Akpabio EI. a Ofoefule SI.** Nanotechnology in drug delivery. i *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, 69–106, InTech, <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-noveldrug-carrier-systems/nanotechnology-in-drug-delivery>. 2012.
6. **Du JZ., Tang LY., Song W.-J., Shi Y., Wang J.** Evaluation of polymeric micelles from brush polymer with poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(ethylene glycol) side chains as drug carrier, *Biomacromolecules* 10, 2169–2174, 2009.
7. **Shin H., Alani AWG., Rao DA., Rockich NC., Kwon GS.** Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs. *Journal of controlled release*, 140 (3), 294-300, 2009.
8. **Rollerova E., Jurcovicova J., Mlynarcikova A., Sadlonovac I., Bilanicova D., Wsolova L, Kiss A., Kovriznycha J., Kroneke J., Ciampor F, Vavra I, Scsukova S.** Delayed adverse effects of neonatal exposure to polymeric nanoparticle poly(ethylene glycol)-block-poly(lactide methyl ether) on hypothalamic–pituitary–ovarian axis development and function in Wistar rats. *Reproductive Toxicology* 57, 165–175, 2015.
9. **Dittmar, M., Knuth, M., Beineke, M., Epe, B.** Role of Oxidative DNA Damage and Antioxidative Enzymatic Defense Systems in Human Aging. *The Open Anthropology Journal*, 1, 38 – 45. 2008.
10. **Tunçsoy, M., Duran, S., Ay, Ö., Cicik, B. a Erdem, C.** Effects of copper oxide nanoparticles on antioxidant enzyme activities and on tissue accumulation of *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 99, 360-364, 2017.
11. **Dvořáková, M., Rollerová, E., Scsuková, S., Bujňáková Mlynářčiková, A., Laubertová, L. a Žitňanová, I.** Effect of neonatal exposure to poly(ethylene glycol)-block-poly (lactic acid) nanoparticles on oxidative stress in infantile and adult female rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017.
12. **Haser D. a Fürll M.** Age-related changes in antioxidant parameters in healthy calves between the first day of life and the 18th month taking into consideration selected metabolic parameters,” *Tierärztliche Praxis Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere*, 43, 1, 5–13, 2015.

IMUNOREAKTIVITA ANTIOXIDAČNÝCH ENZÝMOV V MIECHE KRÁLIKA PO POSTKONDICIONOVANÍ BRADYKINÍNOM

(Immunoreactivity of antioxidant enzymes in the rabbit spinal cord after bradykinin postconditioning)

Zuzana Fagová¹, Iveta Domoráková¹, Marianna Danková¹, Eva Mechírová¹, Milan Stebnický²

¹Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Šrobárova 2, 040 01 Košice, zfagova@gmail.com

²II. Chirurgická klinika, Lekárska fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Rastislavova 43, 040 01 Košice

Súhrn

Ischémia a následná reperfúzia zapríčiňuje vznik oxidačného stresu v nervových bunkách. Súčasťou hlavného obranného mechanizmu zneškodňujúceho voľné radikály sú antioxidantné enzýmy superoxid dismutáza a kataláza. V našej práci sme študovali neuroprotektívny účinok bradykinínového postkondicionovania v rôznych časových intervaloch na miechu králika po 20 minútovej ischémií a 3 dňovej reperfúzií. Bradykinín bol aplikovaný i.p. 1, 6, 12 alebo 24 hodín po ischémií. Zamerali sme sa na sledovanie zmien imunoreaktivity endogénnych antioxidantných enzýmov (SOD1, SOD2 a katalázy) v motorických neurónoch predných rohov miechy králika.

Kľúčové slová

antioxidantné enzýmy, ischémia, postkondicionovanie, bradykinín, miecha

Summary

Ischemia and subsequent reperfusion cause oxidative stress in nerve cells. Antioxidant enzymes, superoxide dismutase and catalase, are major agents involved in the main protective mechanism for scavenging of free radicals. The aim of our study was to investigate neuroprotective effect of bradykinin postconditioning in different time periods on the rabbit spinal cord after 20 min of ischemia and 3 days of reperfusion. Bradykinin was administered by a single i.p. application at 1, 6, 12 or 24 hours after ischemia. In the present study we described changes of endogenous antioxidant enzymes (SOD1, SOD2 and catalase) immunoreactivity in motor neurons in anterior horns of the rabbit spinal cord.

Keywords

antioxidant enzymes, ischemia, postconditioning, bradykinin, spinal cord

Úvod

Oxidačný stres je jedným z hlavných faktorov podieľajúcich sa na ischemicko-reperfúznom poškodení nervového tkaniva (1). Nadmerná produkcia voľných radikálov a postupné vyčerpanie kapacity endogénnych antioxidantných enzýmov spôsobuje poškodenie

biomakromolekul a vedie ku smrti bunky (2,3,4). Najvýznamnejšími voľnými kyslíkovými radikálmi vznikajúcimi pri oxidačnom strese sú superoxidové a reaktívnejšie hydroxylové anióny, ktoré sú najčastejšie produktom reakcie peroxidu vodíka a superoxidových aniónov (4). V bunkách sa vyvinulo viacero mechanizmov zabezpečujúcich ochranu proti oxidačnému stresu (3,5). Hlavnými antioxidantnými enzýmami v bunkách sú superoxid dismutázy (SOD1 a SOD2) a kataláza (6). Endogénne antioxidantné enzýmy sa významne podieľajú na ochrane nervových buniek pred ischemicko-reperfúznym poškodením. Nárast ich aktivity a neuroprotektívny účinok boli zistené pri viacerých modeloch kondicionovania aplikovaného na orgány centrálného nervového systému (7,8,9,10).

Materiál a metódy

V práci bolo použitých 48 samcov novozélandského králika. Zvieratá boli rozdelené do skupín: (I) kontrolná skupina (n=6), (II) ischemická skupina: 20 minútová ischemia a 3 dňová reperfúzia (n=6) a (III-VI) štyri skupiny s 20 minútovou ischemiou a bradykinínovým postkondicionovaním v rôznych časových intervaloch po 1, 6, 12 alebo 24 hodinách (každá skupina n=9, dĺžka reperfúzie: 3 dni). Bradykinín bol podaný jednorazovo po ischemii v určených časových intervaloch (150 µg/kg, i.p., Bradykinín, Sigma). Po navodení celkovej anestézie (zolazepam 20 mg/kg, i.m. + tiletamin 20 mg/kg, i.m., Virbac; xylazín 3 mg/kg, i.m. ECUPHAR N.V.) bola vykonaná 20 minútová ischemia lumbálnej miechy podväzom abdominálnej aorty pod odstupom *a. renalis sinistra* podľa Zivina a De Girolamiho (11). Po uplynutí doby reperfúzie bola zvieratám navodená hlboká anestézia, vykonaná transkardiálna perfúzia 0,9% fyziologickým roztokom a následne 4% paraformaldehydom vo fosfátovom pufri (pH 7,4). Z odobratých miech boli do parafínu zaliate miechové segmenty L₄₋₆. Získaný materiál bol spracovaný imunohistochemicky na dôkaz hlavných antioxidantných enzýmov superoxid dismutázy (CuZn-SOD/SOD 1, Mn-SOD/SOD 2) a katalázy (CAT). Rezy hrubé 5-6 µm boli inkubované s primárnou protilátkou (polyclonal rabbit antibody to superoxide-dismutase 1, superoxide-dismutase 2, catalase; Abcam, 1:500) a následne bol na spracovanie použitý UltraVision LP (HRP DAB) kit (Thermo Scientific). Rezy boli dofarbené Mayerovým hematoxylínom a kvalitatívne hodnotené (v škále: slabá – stredná – výrazná imunoreaktivita) pomocou svetelného mikroskopu OLYMPUS BX50 s digitálnou kamerou OLYMPUS SP350 (Olympus, Tokyo, Japonsko).

Výsledky

Vyhodnotenie imunohistochemického dôkazu superoxid dismutázy 1 (SOD 1)

V kontrolnej skupine (I) sa v predných rohoch miechy vyskytovali zachované neuróny so slabou SOD1-imunoreaktivitou v cytoplazme. Jadro, jadierko a Nisslova substancia boli SOD1-negatívne. V ischemickej skupine (II) boli pozorované poškodené scvrknuté neuróny s tmavým pyknotickým jadrom a výraznou SOD1-pozitivitou v cytoplazme. V predných rohoch sa nachádzali aj svetlé neuróny (chromatolýza v cytoplazme a tmavé pyknotické jadro). Niektoré poškodené výrazne SOD1-pozitívne neuróny boli vtiahnuté do bielej hmoty. V skupine s bradykinínovým postkondicionovaním 1 hodinu po ischemii (III) boli pozorované najmä prežívajúce neuróny so slabou až stredne intenzívnou SOD1-pozitivitou v cytoplazme. Zriedkavo sa vyskytovali mierne scvrknuté neuróny s výraznou SOD1-imunoreaktivitou a tmavým jadrom. V skupine s bradykinínovým postkondicionovaním 6 hodín po ischemii (IV) sa v predných rohoch nachádzali neuróny so slabou alebo stredne intenzívnou SOD1-imunoreaktivitou. Početné boli poškodené svetlé neuróny a ojedinele boli pozorované aj scvrknuté motorické neuróny so slabou SOD1-pozitivitou v cytoplazme. V skupine s postkondicionovaním bradykinínom 12 hodín po ischemii (V) sa nachádzalo malé množstvo prežívajúcich neurónov so slabou alebo stredne intenzívnou SOD1-imunoreaktivitou v cytoplazme. V predných rohoch miechy prevládali poškodené svetlé a tmavé scvrknuté

výrazne SOD1-pozitívne neuróny. Podľa našich zistení najúčinnějšía neuroprotektia bola zaznamenaná pri postkondicionovaní bradykinínom 24 hodín po 20 minútovej ischémii (VI). Neuróny predných miechových rohov mali slabo SOD1-pozitívnu cytoplazmu, podobne ako v kontrolnej skupine.

Vyhodnotenie imunohistochemického dôkazu superoxid dismutázy 2 (SOD 2)

V kontrolnej skupine (I) boli pozorované slabo alebo stredne SOD2-pozitívne neuróny s výraznými SOD2-pozitívnymi granulami v cytoplazme. V ischemickej skupine (II) sa vyskytovali najmä poškodené scvrknuté neuróny s tmavým jadrom a výraznou SOD2-pozitívou cytoplazmy a granúl. Svetlé neuróny s tmavým jadrom a chromatolýzou obsahovali slabo SOD2-pozitívne granuly. V skupine s postkondicionovaním bradykinínom 1 hodinu po ischémii (III) boli sledované zachované neuróny so slabo SOD2-pozitívnou cytoplazmou s granulami. Ojedinelo sa vyskytovali mierne scvrknuté neuróny. V skupine s bradykinínovým postkondicionovaním 6 hodín po ischémii (IV) sa vyskytovali tmavé scvrknuté neuróny a prežívajúce neuróny so slabou SOD2-imunoreaktivitou cytoplazmy a slabými alebo výraznými SOD2-pozitívnymi granulami. V skupine s postkondicionovaním bradykinínom 12 hodín po ischémii (V) bolo sledované malé množstvo zachovaných neurónov. Najpočetnejšie boli neuróny s morfológiou ako v ischemickej skupine. V skupine s postkondicionovaním bradykinínom 24 hodín po ischémii (VI) sa vyskytovali najmä zachované neuróny ako v kontrolnej skupine. Zriedkavo bolo možné pozorovať mierne scvrknuté stredne SOD2-pozitívne neuróny. Vo všetkých skupinách sa granuly často vyskytovali aj v neuropile.

Vyhodnotenie imunohistochemického dôkazu katalázy (CAT)

V kontrolnej skupine (I) sa v predných rohoch nachádzali neuróny s negatívnou CAT-imunoreaktivitou. V ischemickej skupine (II) sa vyskytovali scvrknuté výrazne CAT-pozitívne neuróny s tmavými jadrami. Zriedkavo boli pozorované aj poškodené svetlé neuróny s chromatolýzou v cytoplazme. Niektoré poškodené CAT-pozitívne neuróny boli vtiahnuté do bielej hmoty. V skupine s bradykinínovým postkondicionovaním 1 hodinu po ischémii (III) sa v predných rohoch miechy nachádzali prežívajúce CAT-negatívne neuróny. V skupine s bradykinínovým postkondicionovaním 6 hodín po ischémii (IV) sa vyskytovalo malé množstvo prežívajúcich neurónov so slabou CAT-pozitívnou, svetlých poškodených neurónov a scvrknutých výrazne CAT-pozitívnych neurónov. V skupine s bradykinínovým postkondicionovaním 12 hodín po ischémii (V) boli pozorované najmä poškodené svetlé neuróny. Prežívajúce neuróny boli CAT-negatívne alebo mali slabú CAT-imunoreaktivitu. V skupine s bradykinínovým postkondicionovaním 24 hodín po ischémii (VI) boli sledované prežívajúce neuróny bez CAT-imunoreaktivity, podobne ako v kontrolnej skupine. Ojedinelo boli prítomné neuróny so slabou alebo strednou CAT-pozitívnou v cytoplazme.

Diskusia

Aktivita antioxidantných enzýmov sa prejavuje najmä v období reperfúzie, kedy dochádza ku zvýšenej tvorbe voľných radikálov (7). Zmiernenie oxidačného poškodenia zabezpečuje najmä nárast aktivity antioxidantných enzýmov (12). Vo viacerých výskumoch bolo dokázané, že na vzniku ischemickej tolerancie pomocou kondicionovania sa podieľali aj antioxidantné enzýmy. Aktivita antioxidantných enzýmov bola zvýšená pri ischemickom postkondicionovaní v mieche kráľika, čo malo pravdepodobne vplyv na ochranu a prežívanie nervových buniek (7). Zvýšená aktivita superoxid dismutázy a katalázy v mieche kráľika bola pozorovaná aj pri farmakologickom postkondicionovaní sevofluránom (8). Protektívny účinok bol zaznamenaný aj pri kombinácii prekondicionovania a postkondicionovania propofolom, ktoré zvýšilo aktivitu SOD1 v mieche kráľika (9). Prekondicionovanie alebo postkondicionovanie

bradykinínom ovplyvňuje aktivitu endogénnych antioxidantných enzýmov pri fokálnej aj globálnej ischémii mozgu potkana (10,13,14). Podobne, aj pri ischémii a bradykinínovom prekondicionovaní miechy kráľika boli pozorované zmeny v aktivite superoxid dismutázy a katalázy (15). Pri kvalitatívnom hodnotení katalázovej imunoreaktivity v neurónoch predných rohov miechy kráľika sme zistili, že reaktivita katalázy sa výrazne zvyšuje v poškodených neurónoch po 20 minútovej ischémii a 3 dňovej reperfúzii.

Záver

Výsledky našej práce dokázali vplyv bradykinínového postkondicionovania na prežívanie neurónov a imunoreaktivitu endogénnych antioxidantných enzýmov, superoxid dismutázy a katalázy, v neurónoch predných rohov miechy kráľika po 20 minútovej ischémii a 3 dňovej reperfúzii. Pozitívny účinok bradykinínového postkondicionovania sa prejavil aj na výsledkoch hodnotenia funkčného stavu panvových končatín podľa Tarlova. Na základe našich výsledkov je možné zhodnotiť, že najvhodnejší čas aplikácie postkondicionovania bradykinínom je 24 hodín po ischémii.

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantmi: VEGA 1/0815/14, 1/0439/17.

Literatúra

- 1. Saito A, Maier CM, Narasimhan P et al.** Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. *Molecular Neurobiology* 2005; 31: 105-116.
- 2. Chan PH.** Reactive oxygen radicals in signaling and damage in ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001; 21: 2-14.
- 3. Wong CHY, Crack PJ.** Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury. *Curr. Med. Chem.* 2008; 15: 1-14.
- 4. Nita DA, Nita V, Spulber S et al.** Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. *J. Cell. Mol. Med.* 2001; 5: 163-170.
- 5. Genovese T, Cuzzocrea S.** Role of free radicals and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the development of spinal cord injury: new potential therapeutic targets. *Curr. Med. Chem.* 2008; 15: 477-487.
- 6. Homi HM, Freitas JJS, Curi R et al.** Changes in superoxide dismutase and catalase activities of the rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion. *Neuroscience Letters* 2002; 333: 37-40.
- 7. Song W, Sun J, Su B et al.** Ischemic postconditioning protects the spinal cord from ischemia-reperfusion injury via modulation of redox signaling. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2013; 146: 688- 695.
- 8. Wang Q, Chen Q, Ding Q et al.** Sevoflurane attenuates spinal cord reperfusion injury through free radicals-mediated up-regulation of antioxidant enzymes in rabbits. *Journal of Surgical Research* 2011; 169: 292-300.
- 9. Yu QJ, Yang Y.** Function of SOD1, SOD2, and PI3K/AKT signaling pathways in the protection of propofol on spinal cord ischemic reperfusion injury in a rabbit model. *Life Sciences* 2016; 148: 86-92.
- 10. Danielisová V, Gottlieb M, Bonova P et al.** Bradykinin postconditioning ameliorates focal cerebral ischemia in the rat. *Neurochemistry International* 2014; 72: 22-29.
- 11. Zivin JA, De Girolami U.** Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model. *Stroke* 1980; 11: 200-202.
- 12. Ji X, Liu W, Xie et al.** Beneficial effects of hydrogen gas in a rat model of traumatic brain injury via reducing oxidative stress. *Brain Research* 2010; 1354: 196-205.

- 13. Danielisová V, Gottlieb M, Némethová M et al.** Effects of bradykinin postconditioning on endogenous antioxidant enzyme activity after transient forebrain ischemia in rat. *Neurochem. Res.* 2008; 33: 1057-1064.
- 14. Ping A, Chun ZX, Xue XY.** Bradykinin preconditioning induces protective effects against focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research* 2005; 1059: 105-112.
- 15. Mechírová E, Danielisová V, Domoráková I.** Bradykinin preconditioning affects the number of degenerated neurons and the level of antioxidant enzymes in spinal cord ischemia in rabbits. *Acta Histochemica* 2014; 116: 252-257.

EIKOZANOIDY A ICH ÚLOHA V PATOGENÉZE ATEROSKLERÓZY U DIABETICKÝCH PACIENTOV

(Eicosanoids and their role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetic patients)

Martina Horváthová

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava; martina.horvathova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Diabetes mellitus (DM) je nevyliciteľné ochorenie často sprevádzané rôznymi diabetickými komplikáciami, ktoré sú príčinou zvýšenej chorobnosti a úmrtnosti diabetických pacientov. Kardiovaskulárne ochorenia (KVO) sa považujú za najčastejšiu príčinu smrti diabetikov. Riziko vzniku KVO je u diabetikov 2x až 4x vyššie ako u bežnej populácie. Hlavnou príčinou KVO je endotelová dysfunkcia, ktorá sa následne vyvíja do aterosklerózy. Diabetes mellitus je ochorenie, ktoré sa spája nielen so zvýšeným oxidačným stresom, ale aj s aktiváciou zápalových procesov, a spoločne sa uplatňujú v patogenéze aterosklerózy. Významnú úlohu v zápalových procesoch zohrávajú eikozanoidy.

Kľúčové slová

ateroskleróza, zápal, eikozanoidy, prostanoidy, diabetes mellitus

Summary

Diabetes mellitus (DM) is an unhealthy disease often accompanied by various diabetic complications that are the cause of increased morbidity and mortality in diabetic patients. Cardiovascular diseases (CVD) are considered the most common cause of death in diabetic patients. The risk of CVD is 2 to 4 times higher in diabetic patients than in the normal population. The main cause of CVD is endothelial dysfunction, which subsequently develops into atherosclerosis. Diabetes mellitus is a disease that is associated not only with increased oxidative stress but also with the activation of inflammatory processes, and they are together applied in the pathogenesis of atherosclerosis. Eicosanoids play an important role in inflammatory processes.

Keywords

atherosclerosis, inflammation, eicosanoids, prostanoids, diabetes mellitus

Úvod

Diabetes mellitus (DM) je nevyliciteľné ochorenie často sprevádzané rôznymi diabetickými komplikáciami, ktoré sú príčinou zvýšenej chorobnosti a úmrtnosti diabetikov. Kardiovaskulárne ochorenia (KVO) sa považujú za najčastejšiu príčinu smrti diabetikov. Riziko vzniku KVO je u diabetikov 2x až 4x vyššie ako u bežnej populácie (1). Hlavnou príčinou KVO je endotelová dysfunkcia, ktorá sa následne vyvíja do aterosklerózy. Diabetes

mellitus je ochorenie, ktoré sa spája nielen so zvýšeným oxidačným stresom, ale aj s aktiváciou zápalových procesov, a spoločne sa uplatňujú v patogenéze aterosklerózy (2). Zápal je odpoveď imunitného systému na infekciu alebo poškodenie a zohráva významnú úlohu v patogenéze viacerých chronických ochorení, ako sú artritída, neurodegeneratívne a KVO. Zápal je prospešná reakcia, ktorá vedie k odstráneniu škodlivých faktorov a zabezpečuje obnovenie tkanivovej štruktúry a fyziologických funkcií. Ak zápal pretrváva, prechádza do chronického zápalu a spôsobuje nadmerné poškodenie tkaniva (3). Významnú úlohu v zápalových procesoch zohrávajú eikozanoidy.

Eikozanoidy

Eikozanoidy sú komplexná rodina lipidových signálnych molekúl, ktoré regulujú viaceré fyziologické a patologické procesy. Sú tvorené rôznymi typmi buniek a na cieľové bunky pôsobia prevažne lokálne prostredníctvom receptorov spriahnutých s G-proteínmi. Eikozanoidy sa uplatňujú vo viacerých fyziologických procesoch ako regulácia zápalu, renálnych funkcií, kontrakcie hladkého svalstva, cievnej permeability a agregácie trombocytov. V rámci modulácie zápalového procesu regulujú viaceré zložky imunitnej odpovede (produkcia cytokínov, syntéza protilátok, diferenciácia a proliferácia buniek, migrácia) a spolupracujú s ďalšími signálnymi molekulami, ako sú cytokíny a chemokíny. Počas zápalu je produkcia eikozanoidov podstatne zvýšená a zohrávajú významnú úlohu v patogenéze viacerých ochorení, ktoré sú spájané s chronickým zápalovým procesom. Eikozanoidy sú syntetizované prevažne z kyseliny arachidónovej (AA), ale ako substrát tiež môže poslúžiť kyselina eikozapentaénová (EPA) a kyselina dihomo- γ -linolénová. Ako odpoveď na rôzne aktivačné signály (ako napr. cytokíny, hormóny, stres) dochádza ku aktivácii cytosolovej fosfolipázy A₂ (cPLA₂), ktorá z membránových fosfolipidov uvoľňuje AA a tá môže byť enzýmovo metabolizovaná cez tri rôzne biochemické dráhy (4, 5):

a) enzýmy lipoxygenázy (LO) katalyzujú tvorbu leukotriénov (LT), lipoxínov (LX) a 12-hydroperoxyeikozatetraénovej kyseliny (12-HPETE)

b) cytochróm P-450 (CYP) katalyzuje tvorbu kyseliny hydroxyeikozatriénovej (HETE) a kyseliny epoxyeikozatriénovej (EET, epoxydy)

c) enzýmy cyklooxygenázy (COX) katalyzujú tvorbu prostaglandínov (PG), prostacyklínu (PGI₂) a tromboxánov (TXA₂)

Lipoxygenázy a ich produkty

Lipoxygenázy (LO) sú dioxygenázy, ktoré oxidujú AA na určitom uhlíku za vzniku hydroxyderivátov vyšších karboxylových kyselín s konjugovanými dvojíťmi väzbami. Podľa toho, ktorý uhlík v molekule AA oxidujú, rozlišujeme 4 typy LO: 5-LO, 8-LO, 12-LO a 15-LO (6, 7).

V reakcii katalyzovanej 5-LO vznikajú LTA₄, ktoré sú nestabilné a rýchlo sú hydrolyzované za vzniku LTB₄. LTA₄ sa môžu pomocou enzýmu glutatión-S-transferázy konjugovať s glutatiónom a tvoriť leukotriény obsahujúce cysteín (cysLT) – cysLTC₄, ktoré sú rýchlo metabolizované na cysLTD₄ a cysLTE₄. LTA₄ sú tiež prekursorom pre vznik lipoxínov (LXA₄ a LXB₄), ktoré môžu vzniknúť aj účinkom 15-LO. Lipoxíny sú známe svojimi protizápalovými účinkami.

Leukotriény (LTB₄) a cysLT (LTC₄, LTD₄ a LTE₄) sú prozápalové mediátory, ktoré sa uplatňujú pri rôznych zápalových ochoreniach. Sú syntetizované prevažne v leukocytoch a endotelových bunkách, a plnia dôležitú funkciu pri vrodenej aj získanej imunite. Dosť významná je účasť LT v patogenéze aterosklerózy, kde sa zúčastňujú na viacerých procesoch: vazokonstrikcia, chemotaxia, akumulácia lipidov a tvorba penových buniek, prestavba cievnej steny, tvorba a ruptúra aterosklerotického plaku (4, 8-11).

Cytochróm P-450 a jeho produkty

Cytochróm P-450 (CYP) epoxigenázy (2C a 2J rodiny) katalyzujú tvorbu epoxyeikozatriénových kyselín (EET), CYP ω -hydroxylázy naopak katalyzujú tvorbu hydroxeikozatriénových kyselín (HETE). EET a HETE sa líšia nielen spôsobom syntézy, ale predovšetkým svojimi účinkami na kardiovaskulárny systém. HETE spôsobujú vazokonstrikciu, EET majú naopak vazodilatačné, protizápalové a anti-aterogénne účinky (5).

Cyklooxygenázy a ich produkty

COX sú bifunkčné enzýmy, ktoré majú cyklooxygenázovú (COX) aj peroxidázovú aktivitu, a existujú v dvoch izoformách - COX-1 a COX-2. Napriek tomu, že sú to štruktúrne homológy, sú kódované odlišnými génmi a dosť odlišným spôsobom sú aj regulované.

COX-1 je konštitutívny enzým a jeho produkty zabezpečujú fyziologickú odpoveď na hormóny, ktoré vyžadujú trvalú a rýchlu odpoveď. Zabezpečujú tzv. „housekeeping“ funkcie. COX-1 je vysoko exprimovaná v tých bunkách a tkanivách, kde prostanoidy majú špecializované signálne funkcie, ako napr. žalúdok, obličky, cievy. COX-1 má dôležitú funkciu predovšetkým v trombocytoch, kde sa prednostne podieľa na syntéze TXA₂.

COX-2 je indukovateľný enzým, ktorý za fyziologických podmienok nie je veľmi exprimovaný. Jeho expresia sa zvyšuje ako odpoveď na rôzne extracelulárne a intracelulárne signály ako sú rastové faktory alebo cytokíny. COX-2 sa exprimuje predovšetkým v leukocytoch, ktoré sa zúčastňujú zápalu. Zabezpečuje syntézu prostanooidov, ktoré sa uplatňujú prevažne v patologických procesoch, počas akútneho a chronického zápalu. Zatiaľ čo lipopolysacharid (LPS), prozápalové cytokíny (IL-1 β , TNF- α) a rastové faktory zvyšujú expresiu COX-2, glukokortikoidy a protizápalové cytokíny (IL-4, IL-10 a IL-13) potláčajú expresiu COX-2. Dôležitú úlohu v regulácii exprese COX-2 má transkripčný faktor NF- κ B, ktorý stimuluje jeho syntézu. Výskumy v posledných rokoch ukazujú, že COX-2 má dôležitú úlohu v endotelových bunkách, kde sa podieľa na syntéze PGI₂ (3, 12, 13).

Cyklooxygenázy, tiež známe ako prostaglandín endoperoxid H syntázy (PGHS), naviazaním dvoch molekúl kyslíka premieňajú AA na vysoko reaktívny a nestabilný endoperoxid PGG₂, ktorý sa rýchlo mení na stabilný endoperoxid PGH₂. PGH₂ v závislosti od prítomnosti špecifických enzýmov vstupuje do rôznych biochemických reakcií až vznikajú jednotlivé skupiny prostaglandínov (PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α}), prostacyklíny (PGI₂) a tromboxány (TXA₂), ktoré sa súhrnne nazývajú prostanoidy (14).

Prostaglandíny

Prostaglandíny zohrávajú významnú úlohu pri tvorbe zápalovej odpovede. Ich syntéza je významne zvýšená v zápalovom ložisku, kde sa podieľajú nielen na rozvoji akútneho zápalu, ale aj na jeho utlmení, rozklade zápalových zložiek a obnove poškodeného tkaniva. Prostaglandíny nie sú len mediátory akútneho zápalu, ale zdá sa, že majú dôležitú úlohu aj pri jeho prechode do chronického zápalu, ako aj na jeho pretrvávaní (3, 15). Výskumy v posledných rokoch ukazujú, že PGE₂ sa vyznačujú viacerými rozmanitými a protichodnými účinkami. Táto rozmanitosť je spôsobená rôznymi typmi receptorov pre PGE₂, ktoré po naviazaní ligandu aktivujú rôzne intracelulárne signálne dráhy a výsledkom je expresia génov s protichodnými účinkami. PGE₂ môžu v závislosti od typu receptora, bunkového typu a spôsobu aktivácie uplatňovať prozápalové aj protizápalové účinky. PGD₂ sú aktívne produkované v rôznych tkanivách ako hlavné prostaglandíny, predovšetkým sú však tvorené v mastocytoch, endotelových bunkách a centrálnom nervovom systéme. Sú zahrnuté vo viacerých fyziologických a patologických procesoch.

PGI₂ sú jedným z najdôležitejších prostanooidov, ktoré zabezpečujú homeostázu kardiovaskulárneho systému. Hlavným zdrojom PGI₂ sú endotelové bunky, hladké svalové bunky ciev a endotelové progenitorové bunky. Prostacyklíny sa kvôli svojim anti-

aterogénnym účinkom považujú za dôležitý ochranný faktor v prevencii aterosklerózy. Spôsobujú vazodilatáciu ciev, inhibujú agregáciu trombocytov a adhéziu leukocytov na povrch endotelových buniek, inhibujú proliferáciu a migráciu hladkých svalových buniek ciev.

TXA₂ sú nestabilné metabolity s polčasom rozpadu okolo 30 sekúnd. TXA₂ sú tvorené predovšetkým v trombocytoch účinkom COX-1, ale môžu byť produkované aj inými bunkami ako napr. v makrofágoch, kde sa na ich tvorbe podieľa COX-2. TXA₂ sú veľmi nestabilné a rýchlo sa hydrolyzujú na stabilné, ale neaktívne TXB₂. Receptory pre TXA₂ sa označujú ako TP receptory a ich aktivácia spôsobuje adhéziu a agregáciu trombocytov, proliferáciu a migráciu hladkých svalových buniek ciev, a aktiváciu zápalových reakcií v endotelových bunkách. Prostacyklíny a tromboxány majú protichodné účinky na kardiovaskulárny systém a rovnováha medzi týmito mediátormi je dôležitá za fyziologických aj patologických podmienok. V prípade narušenia tejto rovnováhy v prospech TXA₂ dochádza k endotelovej dysfunkcii a rozvoju aterosklerózy (3, 12, 13).

Úloha COX-2 v patogeneze aterosklerózy u diabetických pacientov

Na vzniku a rozvoji aterosklerózy v patogeneze DM sa významnou mierou podieľajú aj prostanoidy, ktoré vznikajú z AA účinkom enzýmu COX-2. Hyperglykémia a koncové produkty pokročilej glykácie (AGEs) prostredníctvom aktivácie transkripčného faktoru NF-κB selektívne zvyšujú expresiu a syntézu COX-2, čo vedie k zvýšenej tvorbe a uvoľňovaniu prozápalových a vazokonstrikčných prostanoidov. Hyperglykémia a AGEs sa podieľajú nielen na zvýšenej expresii COX-2, ale prostredníctvom proteínkinázy C závislej aktivácie cPLA₂ súčasne zvyšujú koncentráciu voľnej AA, ktorá môže vstupovať do reakcie s COX-2 a zvyšovať hladinu prostanoidov (16-19).

Štúdie dokazujú, že expresia COX-2 makrofágmi, endotelovými bunkami a hladkými svalovými bunkami ciev podporuje priebeh zápalových procesov v stene ciev pri progresii aterosklerózy. V priebehu diferenciacie monocytov na makrofágy dochádza účinkom NADPH oxidázy k zvýšenej tvorbe reaktívnych metabolitov kyslíka a aktivácii NF-κB, ktorý sa viaže v promótorovej oblasti génu pre COX-2 a stimuluje jeho expresiu a syntézu. COX-2 následne sprostredkúva tvorbu prozápalových prostaglandínov a dochádza k prehĺbovaniu zápalového procesu. Prostaglandíny syntetizované aktivovanými makrofágmi môžu podporovať priebeh aterosklerózy viacerými mechanizmami:

- a) aktivácia chemotaxie
- b) indukcia cievnej permeability
- c) syntéza zápalových cytokínov
- d) migrácia hladkých svalových buniek ciev

Niektoré z týchto mechanizmov rýchlo spätne indukujú COX-2, čím vytvárajú pozitívnu spätnú väzbu a dochádza k zosilneniu zápalových procesov závislých od COX-2. Úloha COX-2 v ateroskleróze je zložitá a je spôsobená tým, že COX-2 môže byť spriahnutá s rôznymi syntázami a má za následok tvorbu prostaglandínov s protichodnými účinkami, ktorých rovnováha ovplyvňuje viacero patologických procesov.

Expresia COX-2 v makrofágoch má prozápalové účinky, pretože jej expresia je spriahnutá predovšetkým so syntézou PGE₂ – prostaglandínov prevažne s prozápalovými a proaterogénnymi účinkami. PGE₂ tvorené v aterosklerotickom plaku sa podieľajú na zvýšenej syntéze prozápalových cytokínov – IL-1, IL-6 a TNF-α. Popri iných účinkoch sa však PGE₂ dosť významnou mierou zúčastňujú tvorby nestabilného aterosklerotického plaku. PGE₂ totiž zvyšujú expresiu a aktivitu proteolytických enzýmov – matrixových metaloproteináz, ktoré zapríčiňujú vznik nestabilného aterosklerotického plaku a jeho ruptúru (12, 20).

Literatúra

1. **Shen GX.** Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88: 241-248.
2. **Cheung BMY, Li Ch.** Diabetes and hypertension: is there a common metabolic pathway? *Curr Atheroscler Rep* 2012; 14: 160-166.
3. **Ricciotti E, FitzGerald GA.** Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 986-1000.
4. **Harizi H, Corcuff JB, Gualde N.** Arachidonic acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* 2008; 14: 461-469.
5. **Bellien J, Joannides R, Richard V, Thuillez C.** Modulation of cytochrome-derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: a promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? *Pharmacol Ther* 2011; 131: 1-17.
6. **Dröge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-96.
7. **Luo P, Wang MH.** Eicosanoids, β -cell function, and diabetes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011; 95: 1-10.
8. **Jala VR, Haribabu B.** Leukotrienes and atherosclerosis: new roles for old mediators. *Trends Immunol* 2004; 25: 315-322.
9. **Lötzer K, Funk CD, Habenicht AJ.** The 5-lipoxygenase pathway in arterial wall biology and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1736: 30-37.
10. **Riccioni G, Zanasi A, Vitulano N, Mancini B, D'Orazio N.** Leukotrienes in atherosclerosis: New target insight and future therapy perspectives. *Mediators Inflamm* 2009; 2009: 737282
11. **Gleim S, Stitham J, Tang WH, Martin KA, Hwa J.** An eicosanoid-centric view of atherothrombotic risk factors. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 3361-3380.
12. **Cipollone F, Cicolini G, Bucci M.** Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: Recent insights and future perspectives. *Pharmacol Ther* 2008; 118: 161-180.
13. **Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM.** Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 2011; 164: 894-912.
14. **Basu S.** Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin $F_{2\alpha}$ from physiology to new principles in inflammation. *Med Res Rev* 2007; 27: 435-468.
15. **Aoki T, Narumiya S.** Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 304-311.
16. **Ischii H, Koya D, King GL.** Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* 1998; 76: 21-31.
17. **Pop-Busui R, Sima A, Stevens M.** Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 257-273.
18. **Gallicchio MA, Bach LA.** Advanced glycation end products inhibits $Na^+ K^+$ ATPase in proximal tubule epithelial cells: Role of cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ and phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase γ . *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 919-930.
19. **Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto GK, Oliveira HT, Rossoni LV.** Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 920-932.
20. **Linton MF, Fazio S.** Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 116-123.

DIABETES MELLITUS INDUKUJE ZMENY V REGULÁCIÍ CYTOCHRÓM C OXIDÁZY V MOZGOVOM KORTEXE POTKANA

(Diabetes mellitus induces alterations in regulation of cytochrome c oxidase in the cortex of the rat brain)

Mária Chomová

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárskej fakulty UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, maria.chomova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Terminálny multijednotkový respiračný komplex cytochróm c oxidáza (CIV, COX) je považovaný za kľúčové regulačné miesto oxidačnej fosforylácie a tvorby ROS v respiračnom reťazci (RR). Preto dysfunkcia enzýmu výrazne ovplyvňuje bunkovú signalizáciu a prežitie bunky. Cieľom štúdie bolo a) analyzovať funkciu CIV a účasť jeho podjednotky COX4 v regulácii RR v mozgovom diabetickom kortexe a b) potenciál diétnych n-3 mastných kyselinami (n-3MK) emulzie rybieho oleja (FOE) modulovať funkciu RR. Výsledky ukázali, že diabetes viedol k hyperfunkcii CIV a súčasne inhibícii mitochondriálneho komplexu I (CI). Podávanie n-3MK diabetickým zvieratám viedlo k ďalšej stimulácii CIV-aktivity a čiastočne aktivovalo CI. V mechanizme stimulácie CIV je pravdepodobne zapojená podjednotka COX4, pretože sme pozorovali zmeny jej fosforylačného stavu. Okrem toho, sme pozorovali diabetom indukované poruchy v štruktúrnych asociáciách tejto podjednotky do nadmolekulových štruktúr (suprekomplexov) s ďalšími členmi respiračného reťazca, ktoré reagovali na suplementáciu n-3MK. Získané výsledky naznačujú diabetom-indukovanú mitochondriálnu dysfunkciu a možnú účasť n-3MK v regulácii funkcie RR v diabetickom kortexe.

Kľúčové slová

diabetes mellitus, cytochróm c oxidáza, COX4, kortex, n-3 mastné kyseliny

Summary

A central site in the regulation of oxidative phosphorylation and the ROS formation in the respiratory chain (RC) is the terminal multi-unit enzyme complex cytochrome c oxidase (CIV). Enzyme dysfunction significantly affects cell signaling and survival. The aim of the study was a) to analyze the function of CIV and its COX4 subunit in the regulation of RC function in the brain diabetic cortex and b) the potential of n-3 FA (n-3FA) of fish oil emulsion (FOE) to modulate the RC. We have found that diabetes led to CIV hyperfunction and inhibition of mitochondrial complex I (CI). Administration of n-3FA to diabetic animals partially restore CI activity, presumably due to further stimulation of CIV enzyme activity. The mechanism of CIV stimulation probably involves the COX4 subunit of the enzyme because we have observed the alterations in the phosphorylation state of the subunit. In addition, we have observed diabetes-induced disturbances in structural associations of the subunit to supramolecular structures (supercomplexes) with other members of the RC that

responded to n-3FA supplementation. The results of the study suggest diabetes-induced mitochondrial dysfunction and probably the n-3FA participation in the regulation of the RC function in the cortex of the brain.

Keywords

diabetes mellitus, brain, cytochrom c oxidase, cortex, n-3 fatty acids

Úvod

Kauzálnou príčinou DM-indukovanej neurodegenerácie mozgových štruktúr je vzájomné pôsobenie metabolických, vaskulárnych, endokrinných či genetických faktorov, odlišná senzitivita jednotlivých mozgových regiónov na patologické podnety a porušená schopnosť mozgu cez neuronálne obvody na dennom podklade kontrolovať, koordinovať a regulovať periférne odpovede. V konečnom dôsledku, kumulatívny efekt pôsobenia týchto faktorov môže viesť k fenotypovej zmene v mitochondriálnej biológii. Kvôli limitovanej glykolytickej kapacite a vysokej požiadavke na ATP sú neuróny zvlášť citlivé na zmeny v mitochondriálnej štruktúre a funkcii, preto mitochondriálna dysfunkcia má vždy vážne dôsledky pre nervovú bunku. Cytochróm c oxidáza (COX, CIV) je terminálny enzým respiračného reťazca, ktorý sa skladá sa z 3 mitochondriálne kódovaných podjednotiek (COX1, 2, 3) a 10 podjednotiek kódovaných jadrovou DNA. Enzým je považovaný za centrálnu miesto regulácie oxidačnej fosforylácie a ROS v respiračnom reťazci, ktoré následne môžu ovplyvniť bunkovú signalizáciu a jej prežitie (3). Okrem bigenomickej regulácie, enzým vykazuje unikátne regulačné vlastnosti, ktoré zahŕňajú alosterickú reguláciu, expresiu izozforiem a reguláciu cez signálne cesty (15). Regulácia cez signálne cesty využíva aktiváciu niekoľkých kináz, ktoré fosforylujú početné Ser a Thr zvyšky v podjednotkách 1, 2, 3, 4 a 5b v závislosti na type tkaniva, bunky a patologického podnetu. Výsledným efektom môže byť aktivácia (13) alebo inhibícia enzymatickej aktivity CIV (12). V mozgu, neuronálna aktivita určuje aktivitu CIV, ktorá závisí od množstva proteínu, ktoré je regulované transkripčne (15). Pretože patologický podnet môže ovplyvňovať expresiu proteínu a tým jeho aktivitu a funkčnosť danej metabolickej dráhy, v našej práci sme študovali vplyv diabetu na funkciu CIV v cerebrálnom kortexe diabetických potkanov. Zároveň sme testovali potenciál n-3 esenciálnych mastných kyselín emulzie rybieho oleja modulovať funkciu tohto enzýmu a tým aj mitochondriálnu funkciu.

Materiál a metódy

Experimentálny design

V experimente boli použité samce laboratórneho potkana kmeňa Wistar (Dobrá Voda, SAV), ktoré boli náhodne rozdelené do kontrolnej (n = 24) a diabetickej skupiny (n = 36). DM bol indukovaný jednou dávkou streptozotocínu (STZ, 45 mg/kg v citrátovom roztoku) do chvostovej vény. Kontrolným potkanom bol aplikovaný rovnaký objem citrátového pufru. Zvieratá boli považované za diabetické, keď hladina glukózy bola >16 mmol/l. Diabetické zvieratá boli rozdelené do i) neovplyvnenej diabetickej podskupiny (D, n = 12), ii) diabetickej podskupiny (DOC1, n = 12) suplementovanej FOE s nízkou koncentráciou n-3 MK (160mg/kg/deň) a iii) diabetickej podskupiny (DOC2, n = 12) ovplyvnenej FOE s vysokou koncentráciou n-3 MK (800mg/kg/deň). Nediabetické kontrolné potkany boli rovnako rozdelené do neovplyvnenej kontrolnej podskupiny (C, n = 8) a kontrolných podskupín (COC1, COC2, po n = 8) suplementovaných s nízkym a vysokým obsahom n-3 MK. 45% FOE (Cultech Limited, UK) obsahovala 8,1% eikozapenténovej (EPA, C20:5, n-3) a 5,9% dokozahexénovej (DHA C22:6, n-3) nenasýtenej MK. FOE suplementácia gastrickou sondou začala na 7 deň po indukcii DM a trvala 8 týždňov. Po tomto období boli zvieratá usmrtené,

z mozgu boli ihneď izolované kortikálne mitochondrie a stanovená koncentrácia proteínov (DC assay kit, BioRad). Mitochondrie boli alikvotované a uskladnené pri -80°C .

Stanovenie aktivity cytochróm c oxidázy (COX, CIV) a aktivity komplexu I (CI)

Aktivita enzýmu bola stanovená spektrofotometricky vo vzorkách kortikálnych mitochondrií (50 $\mu\text{g/ml}$ proteínu) monitorovaním poklesu absorbancie redukovaného cytochrómu c (50 $\mu\text{M}/50\text{ mM}$ Tris/HCl pufri, pH 8,0) pri 550 nm. Aktivita CIV bola vypočítaná odčítaním rýchlosti oxidácie cytochrómu c v prítomnosti 7,5 mM azidu sodného od oxidácie cyt c bez prítomnosti azidu a vyjadrená v nmol/min/mg (7). Aktivita CI bola stanovená podľa (11) s modifikáciami ako rýchlosť oxidácie NADH v reakčnej zmesi obsahujúcej 50 μg mitochondriálneho proteínu v prítomnosti alebo absencii rotenónu. Aktivity boli vypočítané a udané v nmol/min/mg.

Elektroforetické a Westernblot analýzy

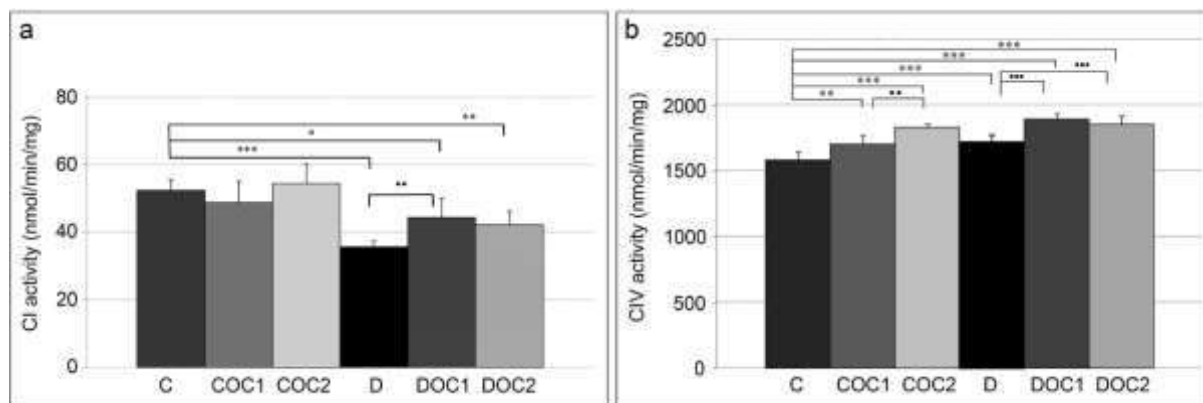
Vzorky (20-25 μg proteínu) boli separované modifikovanou Tricín alebo SDS PAGE podľa (7). Po ELFO delení a transfere proteínov na PVDF membránu boli membrány inkubované 1 hod. pri izbovej teplote v 4% blokovacom roztoku a po premytí v primárnych protilátkach (myšia monoklonálna protilátka proti podjednotke 4 cytochróm c oxidázy, COX4, 1:500, Santa Cruz, myšia monoklonálna protilátka proti podjednotke 1 cytochróm c oxidázy, COX1, 1:2000, Abcam) a v sekundárnej HRP-konjugovanej protilátke (1:5000, Santa Cruz). Alkalická fosfatáza (CIP, calf intestine, Sigma-Aldrich) bola použitá na monitorovanie fosforylačného stavu proteínu. Membrány boli rozdelené na dve polovice a inkubované (1hod, 25°C) v defosforylačnom pufri (100mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 10 nM MgCl_2 , 1 mM ditiotritol) za absencie alebo v prítomnosti CIP (25 U/ml). Membrány boli následne inkubované s COX4 primárnymi a sekundárnymi protilátkami podľa štandardnej imunoblotovacej procedúry. Imunoreaktívne proteíny boli vizualizované chemiluminiscenčne (Clarity Western ECL Substrate, BioRad) a detekované s ChemiDocTM MP zobrazovacím systémom (BioRad). Dáta boli kvantifikované za použitia normalizácie na celkový proteín a vyjadrené relatívne ku kontrole. V experimentoch využívajúcich natívnu vysoko rozlišovaciu elektroforézu (hrCNE) bol použitý protokol podľa (14). Permeabilizované (2,5 g/g proteín) mitochondriálne vzorky (300 μg proteínu) boli v I. dimenzii separované v natívnych podmienkach s cieľom rozdeliť jednotlivé respiračné komplexy. V II. dimenzii bola uskutočnená SDS PAGE za účelom rozdelenia respiračných komplexov na jednotlivé podjednotky. Po separácii a transfere proteínov na PVDF mebránu bola uskutočnená štandardná imunoblotovacia procedúra za použitia primárnej protilátke proti COX4 podjednotke CIV.

Štatistická analýza výsledkov využila ANOVU s Tukey post hoc testom. Dáta sú prezentované ako priemer \pm SD, $P < 0,05$ bola použitá ako „cutoff“ hodnota štatistickej významnosti.

Výsledky

Meranie enzymatických aktivít CIV (Obr.1b) ukázalo, že diabetes (D) zvýšil aktivitu CIV o 8,7% (1720,1 \pm 48,9 nmol/min/mg, $P < 0,001$ vs. C). Suplementácia diabetických zvierat s FOE viedla k ďalšiemu zvýšeniu aktivít enzýmu o 19,6% (1864,1 \pm 40,5 nmol/min/mg, $P < 0,001$ vs.C) v podskupine DOC1 a o 16,9% (1850,5 \pm 65,5 nmol/min/mg, $P < 0,001$ vs. C) v podskupine DOC2. U nediabetických kontrolných podskupín COC1 a COC2 bol tiež pozorovaný efekt zvýšenia aktivít CIV po suplementácii FOE o 7,7% (1704,5 \pm 48,9 nmol/min/mg, $P < 0,01$ vs. C) a o 15,5% (1828,5 \pm 32,3 nmol/min/mg, $P < 0,001$ vs. C). Naopak, perzistentná hyperglykémia viedla k signifikantnému poklesu CI aktivity o 32,1% ($P < 0,001$ vs C). V diabetických podskupinách DOC1 a DOC2, ktoré boli suplementované FOE,

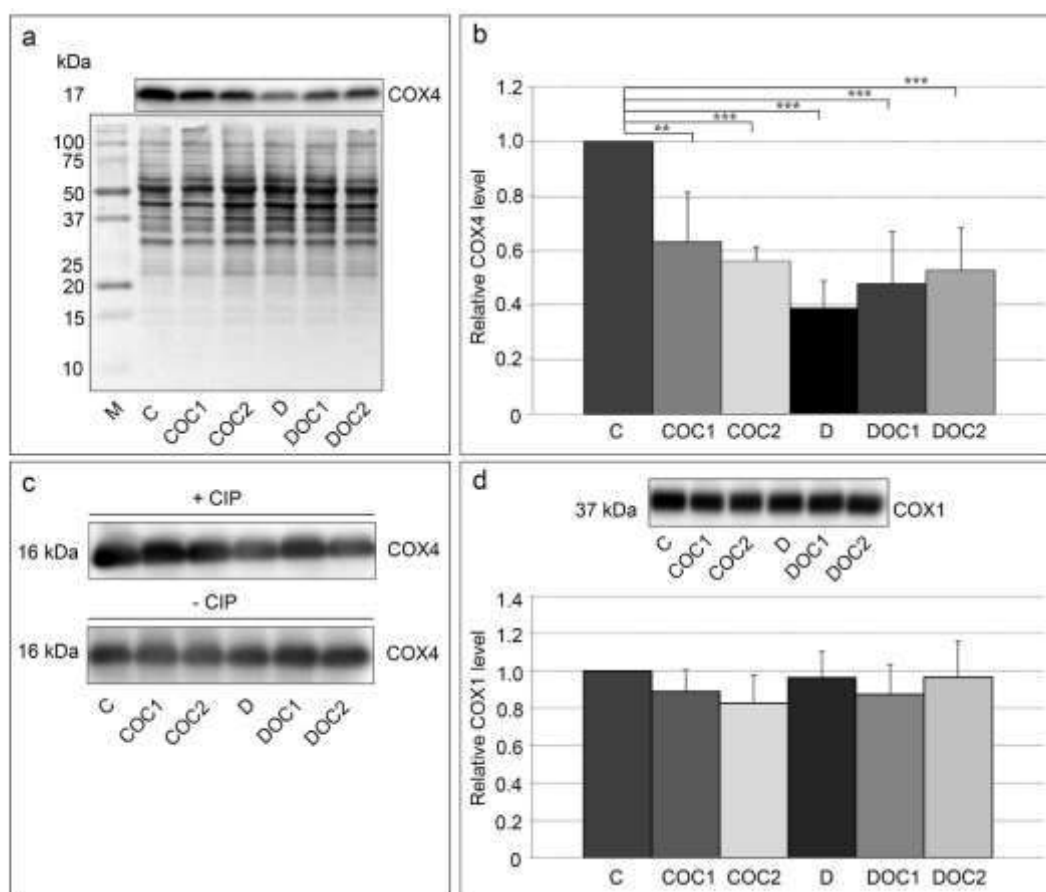
aktivita CI bola zachovaná na 84,6% ($P < 0,05$) a 80,5% ($P < 0,01$) kontrolnej hodnoty. FOE suplementácie nemala žiaden efekt na enzymatické aktivity v kontrolných vzorkách (Obr. 1a).



Obr. 1 Vplyv STZ-indukovaného diabetu a FOE suplementácie na enzymatické aktivity CI a CIV. Enzymatické aktivity boli merané v kortikálnych mitochondriách izolovaných z kontrolných ($n=24$) a diabetických ($n=36$) zvierat. Dáta sú vyjadrené ako priemer \pm SD. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. C, •• $P < 0,01$ vs. COC1, •• $P < 0,01$ vs. D, *** $P < 0,001$ vs. D.

C - kontrola, COC1 - kontrola s nízkym príjmom FOE, COC2 - kontrola s vysokým príjmom FOE, D - neošetrená diabetická podskupina, DOC1, DOC2 - diabetické podskupiny s nízkym resp. vysokým príjmom FOE. CI - komplex I, CIV - cytochróm c oxidáza

V ďalších experimentoch sme vykonali elektroforetické a Westernblot analýzy s cieľom identifikovať možný mechanizmus vedúci k zvýšenej aktivite CIV. Analýza podjednotky COX1, ktorá je súčasťou katalytického jadra enzýmu neodhalila signifikantnú zmenu v expresii tejto podjednotky (Obr.2d). Analýza COX4 podjednotky považovanej za kľúčovú regulačnú jednotku CIV odhalila jej signifikantný pokles v neovplyvnenej diabetickej podskupine, suplementovaných diabetických podskupinách, ale nečakane aj v suplementovaných kontrolných vzorkách (Obr. 2a,b). Vzhľadom na aeróbny energetický metabolizmus mozgu je nepravdepodobné, že v kontrolných vzorkách by samotná diéta mohla mať takýto vplyv. Preto sme vykonali defosforylačné experimenty s cieľom identifikovať možnú posttranslačnú modifikáciu-fosforyláciu COX4 podjednotky, ktorá by mohla brániť väzbe protilátky na rozpoznávaný epitop, a tak prispievať k pozorovanej redukcii proteínovej expresie. Inkubácia blotov v CIP (Obr. 2c) a následná COX4 imunodetekcia produkovala silnejší chemiluminiscenčný signál s kratším saturačným časom vo FOE suplementovaných vzorkách. Toto pozorovanie naznačuje, že diabetes a n-3MK vo FOE by mohli aktivovať cesty vedúce k fosforylácii COX4 podjednotky, avšak aktivované kinázy a konkrétne fosforylované miesta sú neznáme a vyžadujú ďalšie experimenty.

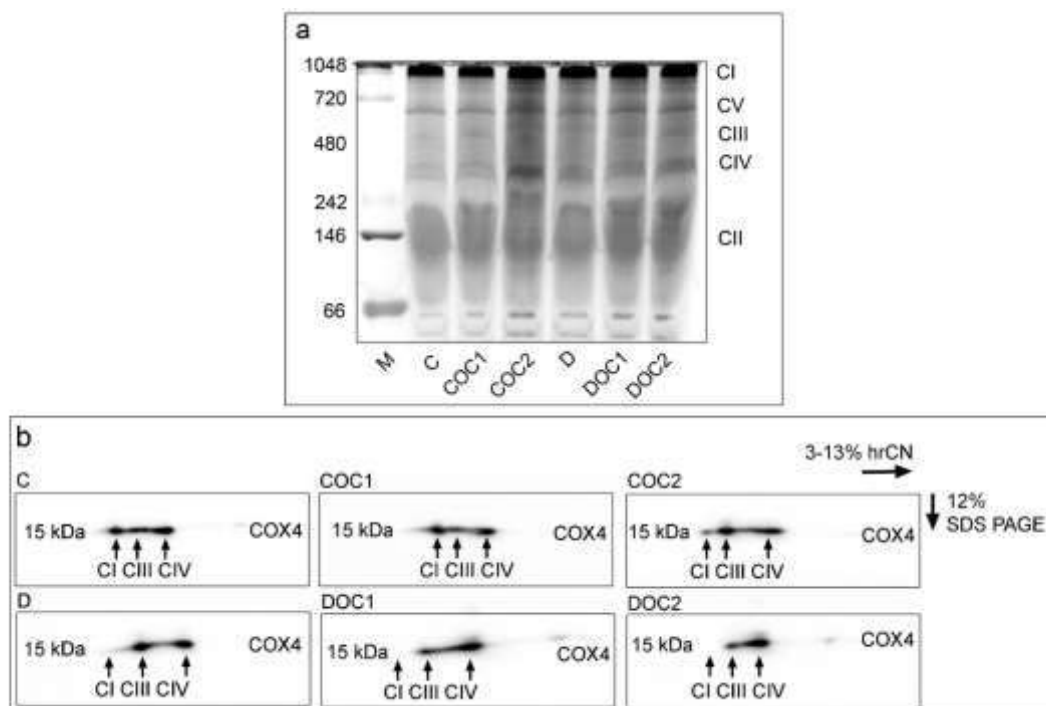


Obr. 2 Streptozotocínom indukovaný diabetes, FOE suplementácia a ich vplyv na proteínovú expresiu COX1 a COX4 podjednotky cytochróm c oxidázy

Mitochondrie z mozgového kortexu boli separované s Tricin SDS PAGE a imunoblotované s anti-COX4 protilátkou.

a) reprezentatívny blot COX4 hladín a celkového množstva proteínov ako kontroly nanášky proteínu, b) semikvantitatívne hodnotenie COX4 hladín je udané ako priemer \pm SD (n=5), dáta boli normalizované na celkový proteín a vyjadrené relatívne ku kontrole, c) reprezentatívny blot COX4 hladín, ktorý bol inkubovaný v prítomnosti (+CIP) a v neprítomnosti (-CIP) fosfatázy, d) reprezentatívny blot a semikvantitatívne vyhodnotenie COX1 hladín CIV, dáta sú udané ako priemer \pm SD (n=5), normalizované na celkový proteín a vyjadrené relatívne ku kontrole. ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. C. M - marker, C - kontrola, COC1 - kontrola s nízkym príjmom FOE, COC2 - kontrola s vysokým príjmom FOE, D - neošetrená diabetická podskupina, DOC1, DOC2 - diabetické podskupiny s nízkym a vysokým príjmom FOE

Následne sme analyzovali účasť COX4 podjednotky v respiračných superkomplexoch. Respiračné superkomplexy predstavujú nadmolekulové asociácie jednotlivých enzýmov respiračného reťazca, ktorých cieľom je zabezpečiť efektívny elektrónový transfer a redukovanú tvorbu ROS. Pomocou hrCN/SDS PAGE (Obr. 3) sme detekovali COX4 imunoreaktívne spoty v migračných dráhach CI a CIII, čo poukazuje na asociáciu tejto podjednotky s uvedenými členmi respiračného reťazca. Asociácia COX4/CI klesala postupne v kontrolných COC1 a COC2 podskupinách a úplne vymizla v diabetických podskupinách. Naopak, COX4 monomerné formy boli zvýšené vo všetkých diabetických podskupinách. Získané výsledky naznačujú, že zmeny vo fosforylačnom stave a účasti COX4 podjednotky v superkomplexoch by mohli byť zapojené v regulačnom mechanizme kontrolujúcom aktivitu CIV.



Obr. 3 Účasť COX4 podjednotky cytochróm c oxidázy v nadmolekulovej organizácii respiračného reťazca

Mitochondrie boli separované a) natívnou hrCN elektroforézou do jednotlivých respiračných komplexov a b) SDS PAGE do jednotlivých podjednotiek s následnou imunodetekciou COX4 podjednotky CIV. Zobrazené sú reprezentatívne bloty. M - marker, C - kontrola, COC1 - kontrola s nízkym príjmom FOE, COC2 - kontrola s vysokým príjmom FOE, D - neošetrená diabetická podskupina, DOC1, DOC2 - diabetické podskupiny s nízkym a vysokým príjmom FOE, CI - komplex I, CII -komplex II, CIII - komplex III, CIV - komplex IV respiračného reťazca

Diskusia

Pozorované zmeny v aktivitách CI a CIV v diabetickom kortexe ukazujú, že DM dereguluje funkciu respiračného reťazca (RR). Hyperaktivita CIV naznačuje adaptačnú odpoveď tejto metabolickej cesty na redukovaný tok elektrónov cez CI, snahu stimulovať ho a tým brániť zotrvávaniu CI v redukovanom stave. Dôvodom tejto odpovede môže byť nielen nutnosť zabezpečiť vysoké energetické požiadavky neurónov, ale zároveň aj snaha regulovať tvorbu ROS. Zdá sa, že v diabetickom prostredí n-3MK amplifikujú tento efekt, pretože CIV-stimulujúci efekt na CI aktivitu bol pozorovaný len vo FOE suplementovaných diabetických zvieratách. Pozorovaná dysfunkcia CI v diabetickej kortikálnej mitochondrii je konzistentná s inými štúdiami, ktoré tiež popisujú pokles aktivity prvého člena RR v mozgu i periférnych diabetických tkanivách (9). Kým údaje vo vzťahu ku CI sú konzistentné, značná variabilita existuje vo vzťahu k aktivitám CIV. Tá, okrem zmien v experimentálnom dizajne, môže odrážať aj dynamické zmeny mitochondriálnej funkcie počas DM, pretože CIV hyperaktivita bola pozorovaná v počiatočnom a hypoaktivita v neskoršom štádiu ochorenia (10). Navyše, krátkodobá konzumácia rybieho oleja zvýšila, kým dlhodobá konzumácia znížila fyziologické aktivity CIV v pečeni, srdci a mozgu potkana (4). Zvýšené aktivity CIV boli pozorované aj vo fat-1 myšiach, transgenickom modeli zvýšenej produkcie n-3MK (6). K variabilite aktivít CIV prispieva aj to, že enzým je považovaný za jedno z hlavných regulačných miest oxidačnej fosforylácie (8), a je teda aktívnym účastníkom a cieľom rôznych signálnych dráh. Pri hľadaní odpovede, aké molekulárne cesty by mohli byť zapojené v diabetom-indukovanej hyperaktivite CIV v našej štúdii, sme najprv analyzovali proteínovú expresiu COX1 katalytickej podjednotky enzýmu, vychádzajúc z predpokladu, že aktivita enzýmu je úmerná množstvu proteínu. Analýzy však neidentifikovali signifikantnú zmenu expresie tejto

podjednotky, a tak je nepravdepodobné, že zvýšená expresia katalytickej podjednotky je zodpovedná za diabetom-indukovanú stimuláciu CIV. V ďalších experimentoch sme preto pozornosť upriamili na mechanizmy regulácie, ktorými je kontrolovaná aktivita tohto enzýmu. Zamerali sme sa na COX4 podjednotku, najväčšiu jadrom kódovanú podjednotku CIV, ktorá sa zúčastňuje na alosterickej regulácii enzýmu. Pozorovali sme výrazný pokles proteínových hladín tejto podjednotky v neovplyvnenej diabetickej skupine, čo môže oslabiť regulačnú funkciu tejto podjednotky v alosterickej kontrole aktivity enzýmu a viesť následne k hyperaktivite enzýmu. Rovnako, analýza asociácií COX4 podjednotky s ostatnými členmi RR do superkomplexov odhalila výraznú stratu tejto podjednotky v superkomplexe CI/CIV a zoslabenie interakcií s ostatnými členmi RR. Superkomplexy ako nadmolekulové štruktúry asociovaných respiračných komplexov zabezpečujú a regulujú efektívnosť elektrónového transferu medzi komplexami RR a zároveň kontrolujú produkciu ROS. Tieto výsledky naznačujú, že DM ovplyvňuje nielen proteínovú expresiu regulačnej podjednotky COX4, ale zároveň aj jej asociácie s jednotlivými členmi RR, tvorbu superkomplexov a tým aj funkčnosť celého RR. Znížená proteínová expresia COX4 a zvýšená enzymatická aktivita bola však pozorovaná aj vo FOE-suplementovaných kontrolných podskupinách. Pretože mozog závisí na aeróbnom energetickom metabolizme aj keď dochádza k zmene diéty, je nepravdepodobné, že samotná suplementácia s FOE by mala takýto efekt. Je však možné, že pozorovaná COX4 redukcia v kontrolných podskupinách by mohla pochádzať z maskovania epitopu protilátky v dôsledku posttranslačnej modifikácie proteínu, akou je napr. fosforylácia. V literatúre je dokumentovaná fosforylácia viacerých podjednotiek CIV, vrátane fosforylácie COX4^{Ser58}, ktorá inhibovala alosterickú reguláciu s ATP a viedla k zvýšeniu aktivity enzýmu (1). Aby sme odhalili možnú posttranslačnú modifikáciu, vykonali sme defosforylačné experimenty s nešpecifickou CIP fosfatázou. Zvýšený signál v defosforylačných experimentoch síce naznačil, že diabetes a n-3MK by mohli indukovať zmenu fosforylačného stavu COX4 podjednotky, zatiaľ však nedisponujeme presvedčivým a jasným dôkazom existencie tejto modifikácie, vrátane identifikácie fosforylačného miesta a kináz zodpovedných za túto modifikáciu. Bližšia identifikácia by však pomohla pochopiť, akými cestami je regulovaná aktivita CIV, oxidačná fosforylácia a tvorba ATP v diabetickej kortexe. Výsledky našej štúdie korelujú s pozorovaniami iných štúdií v periférnych diabetickej tkanivách, ktoré rovnako pozorovali redukciu COX4 podjednotky (5; 2). Zároveň naznačujú, že zmeny v mitochondriálnom proteóme sú v zhode so zmenenou mitochondriálnou funkciou v diabetickej kortexe.

Záver

Naša štúdia ukazuje, že DM okrem nepriaznivého dopadu na periférne orgány, ovplyvňuje funkciu mozgového kortexu. Začínajúc na metabolickej úrovni, deregulácia RR vedie k štruktúrnym zmenám reprezentovaných potlačením proteínovej expresie regulačnej podjednotky COX4 cytochróm c oxidázy. Primárne poruchy sú prenášané do sekundárnej úrovne prejavujúcej sa porušenou tvorbou superkomplexov a nadmolekulovej organizácie RR. Tieto defekty ďalej znižujú schopnosť bunky udržiavať energeticky plne funkčnú mitochondriu za diabetickej podmienok. I keď FOE suplementácia čiastočne zlepšila funkčnosť RR, nebola schopná výrazne ovplyvniť diabetom indukované štruktúrne zmeny. Vzhľadom na zložité nutričné efekty n-3 MK ako aj samotné diabetickej prostredie, je potrebné uskutočniť ďalšie experimenty, aby bolo možné jednoznačne hodnotiť terapeutický potenciál n-3 MK.

Podakovanie

Štúdia bola podporená grantom VEGA 1/0349/16 MŠVVŠ SR. Podakovanie patrí aj firme Cultech Limited, Port Talbot, UK za poskytnutie emulzie rybieho oleja.

Literatúra

1. **Acin-Perez R, Gatti DL, Bai Y, Manfredi G (2011):** Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell Metab.* 13(6):712-719
2. **Akude E, Zhrebetskaya E. et al. (2011):** Diminished superoxide generation is associated with respiratory chain dysfunction and changes in the mitochondrial proteome of sensory neurons from diabetic rats. *Diabetes.*60(1):288-297
3. **Arnold S (2012):** The power of life--cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. *Mitochondrion.*12(1):46-56
4. **Barzanti V, Battino M. et al. (1994):** The effect of dietary lipid changes on the fatty acid composition and function of liver, heart and brain mitochondria in the rat at different ages. *Br J Nutr.* 71(2):193-202
5. **Beaudoin MS, Snook LA. et al. (2013):** Resveratrol supplementation improves white adipose tissue function in a depot-specific manner in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*305(5):R542-551
6. **Hagopian K, Weber KL. et al. (2010):** Complex I-associated hydrogen peroxide production is decreased and electron transport chain enzyme activities are altered in n-3 enriched fat-1 mice. *PLoS One.*5(9):e12696
7. **Chomova M, Tatarkova Z. et al. (2012):** Ischemia-induced inhibition of mitochondrial complex I in rat brain: effect of permeabilization method and electron acceptor. *Neurochem Res.*37(5):965-976
8. **Kadenbach B, Hüttemann M (2015):** The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion.*24:64-76
9. **Kamboj SS, Sandhir R (2011):** Protective effect of N-acetylcysteine supplementation on mitochondrial oxidative stress and mitochondrial enzymes in cerebral cortex of streptozotocin-treated diabetic rats. *Mitochondrion.* 11(1):214-22
10. **Katyare SS, Patel SP, Modi HR (2008):** Diabetic modulation of the temperature kinetics properties of cytochrome oxidase activity in rat brain mitochondria. *Neurochem Res.* 33(3):422-429
11. **Maklashina E, Sher Y, Zhou HZ, Gray MO, Karliner JS, Cecchini G (2002):** Effect of anoxia/reperfusion on the reversible active/de-active transition of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in rat heart. *Biochim Biophys Acta.*1556(1):6-12
12. **Ogbi M, Johnson JA (2006):** Protein kinase Cepsilon interacts with cytochrome c oxidase subunit IV and enhances cytochrome c oxidase activity in neonatal cardiac myocyte preconditioning. *Biochem J.*393(Pt 1):191-199
13. **Prabu SK, Anandatheerthavarada HK. et al. (2006):** Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *J Biol Chem.*281(4):2061-2070
14. **Wittig I, Karas M, Schagger H (2007):** High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics.*6(7):1215-1225
15. **Wong-Riley MT (2012):** Bigenomic regulation of cytochrome c oxidase in neurons and the tight coupling between neuronal activity and energy metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 748:283-304

SKORÉ OBDOBIE DIABETES MELLITUS OVPLYVŇUJE FUNKCIU MITOCHONDRIE V KORTEXE A HIPOKAMPE POTKANA

(The early period of diabetes mellitus affects the function
of mitochondria in the cortex and hippocampus of rat brain)

Mária Chomová

*Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárskej fakulty UK, Sasinkova 2,
813 72 Bratislava, maria.chomova@fmed.uniba.sk*

Súhrn

Diabetická encefalopatia je v súčasnosti akceptovaná komplikácia diabetes mellitus (DM) charakterizovaná neurofyziologickými a štruktúrnymi zmenami v mozgu, poruchou kognitívnych funkcií, zvýšeným rizikom vzniku mozgovej príhody alebo Alzheimerovej choroby. V našej 8-týždňovej štúdii sme i) analyzovali mitochondriálnu funkciu v kortexe a hipokampe diabetického potkana a ii) účinok diétného podávania podávania n-3 nenasýtených mastných kyselín (n-3MK). Výsledky odhalili deregulovanú funkciu respiračného reťazca (RR) ako dôsledok inhibície aktivity komplexu I (CI) v oboch mozgových regiónoch a hyperfunkcie cytochróm c oxidázy (CIV) v diabetickom kortexe. Diétné podávanie n-3 MK stimulovalo aktivitu CIV nielen v diabetických skupinách, ale aj v kontrolných skupinách v oboch mozgových regiónoch. Kým zvýšená aktivita CIV v diabetickom kortexe čiastočne stimulovala CI, v hipokampe n-3MK neboli schopné remodelovať aktivity CI. Dysfunkcia RR narušila mitochondriálnu redoxnú rovnováhu, ktorá sa prezentovala stratou aktivity superoxidodismutázy v kortexe a redukovaných mitochondriálnych tiolov v oboch mozgových regiónoch. Signifikantný nárast hladín dityrozínov a proteín-lipoperoxidových konjugátov pozorovaný v kortexe, ale nie v hipokampe, indikoval prooxidačné prostredie v diabetickej kortikálnej mitochondrii, ktoré nebolo ovplyvnené podávaním n-3 MK. Získané výsledky naznačujú odlišnú senzitivitu a patofyziologickú odpoveď kortikálnej a hipokampálnej mitochondrie v skorom štádiu DM. Suplementácia diabetických potkanov s n-3 MK emulzie rybieho oleja (FOE) nevedla k pozitívnej modulácii mitochondriálnej funkcie v kortexe a hipokampe.

Kľúčové slová

diabetická encefalopatia, mitochondria, kortex, hipokampus, oxidačný stres

Summary

Diabetic encephalopathy has recently been proven to be a common complication of diabetes mellitus (DM). It is associated with neurophysiological and structural changes in the brain, moderate cognitive dysfunction and dementia, the increased risk of stroke or Alzheimer's disease. In our 8 week-long study we focused on i) the analysis of mitochondrial function in the cortex and hippocampus of rats with DM and ii) the effect of dietary administration of n-3 unsaturated fatty acids (n-3FA) on diabetic mitochondrial function. We observed deregulated respiratory chain function (RC) as result of inhibition of complex I activity (CI) in both brain

regions, as well as the hyperfunction of cytochrome c oxidase (CIV) in the diabetic cortex. Dietary administration of n-3 FA resulted in additional CIV stimulation not only in diabetic groups but also in control groups in both brain regions. While CIV stimulation in the diabetic cortex led to incomplete CI activation, n-3 FA supplementation was not able to remodulate CI activities in hippocampus. RC deregulation has led to a breakdown of redox balance in the mitochondria presented by the loss of superoxide dismutase activity in the cortex and mitochondrial thiols in both brain regions. Significant increase in the levels of dityrosines and protein-lipoperoxide conjugates observed in the cortex, but not in the hippocampus, indicated the pro-oxidant environment in diabetic cortical mitochondria that has not been mitigated by administration of n-3 FA. The results suggest a different sensitivity and pathophysiological response of cortical and hippocampal mitochondria to an early period of DM. n-3 FA supplementation to diabetic rats did not lead to positive modulation of mitochondrial function in the brain cortex and hippocampus.

Keywords

diabetic encephalopathy, mitochondria, cortex, hippocampus, oxidative stress

Úvod

Diabetes mellitus (DM) vedie k rozvoju sekundárnych komplikácií postihujúcich okrem periférnych orgánov aj CNS. Početné zobrazovacie, post-mortem a psychologické štúdie ukazujú, že DM prispieva k anatomicke-morfologickým zmenám mozgových štruktúr (hipokampus, kortex, amygdala), ktorých poškodenie je asociované s poruchami v pamäťových a behaviorálnych charakteristikách (2; 3). Štúdie zároveň poukazujú na značnú podobnosť diabetom-indukovaných neurodegeneratívnych zmien s nálezmi v mozgoch pacientov s Alzheimerovou chorobou (11), pričom tieto zmeny sú klinicky relevantné najmä u starších pacientov s DM 2 typu (10). Diabetická encefalopatia môže vznikáť v prvých 5-7 rokoch života počas vývinu mozgu (T1DM) alebo v období, keď mozog podlieha neurodegeneratívnym zmenám v dôsledku starnutia (2TDM). Prebiehajúce molekulárne mechanizmy sú však nejasné kvôli synergickému efektu početných ciest ovplyvňujúcich cerebrálnu energetickú a hormonálnu reguláciu, inzulínovú signalizáciu, redoxnú rovnováhu alebo schopnosť mozgu cez neuronálne obvody kontrolovať a regulovať periférne odpovede. Na rozdiel od inzulín-senzitívnych tkanív, vstup glukózy do neurónov sa uskutočňuje najmä uľahčenou difúziou cez inzulín-insenzitívne glukózové transportéry. Nadmerný tok glukózy cez metabolické cesty a porušená inzulínová signalizácia vedú k indukcii pasívnych a aktívnych odoziev bunky. Kým pasívne odpovede na chronickú hyperglykémiu sú spojené s oxidačným stresom a vaskulárnym poškodením, aktívne odozvy vedú k zmenám v génovej expresii, funkcii, plasticite a môžu spúšťať fenotypovú zmenu mitochondrií. Neuróny sú zvlášť citlivé na zmeny v mitochondriálnej funkcii kvôli limitovanej glykolytickej kapacite a vysokej požiadavke na ATP. Preto mitochondriálna dysfunkcia má vždy vážne dôsledky pre nervovú bunku. Kým odozvy diabetickej mitochondrie v inzulín-senzitívnych tkanivách sú dlhodobo študované, odpovede mozgovej mitochondrie na DM nie sú jasné. Cieľom tejto práce bolo sledovať odpoveď kortikálnej a hipokampálnej mitochondrie na porušenie glukózovú/inzulínovú homeostázu a zároveň analyzovať potenciál n-3 MK emulzie rybieho oleja benefične ovplyvniť oxidačný stres a mitochondriálnu funkciu v mozgu laboratórneho potkana.

Materiál a metódy

Experimentálny design

V experimente boli použité samce laboratórneho potkana kmeňa Wistar (Dobrá Voda, SAV), ktoré boli rozdelené do kontrolnej (n = 24) a diabetickej skupiny (n = 36). DM bol

indukovaný jednou dávkou streptozotocínu (45 mg/kg v citrátovom roztoku) do chvostovej vény. Kontrolným potkanom bol aplikovaný rovnaký objem citrátového pufru. Zvieratá boli považované za diabetické, keď hladina glukózy bola >16 mmol/l. Diabetické zvieratá boli rozdelené do i) neovplyvnenej diabetickej podskupiny (D, n = 12), ii) diabetickej podskupiny (DOC1, n = 12) suplementovanej FOE s nízkou koncentráciou n-3 MK (160mg/kg/deň) a iii) diabetickej podskupiny (DOC2, n = 12) ovplyvnenej FOE s vysokou koncentráciou n-3 MK (800mg/kg/deň). Nediabetické kontrolné potkany boli rovnako rozdelené do kontrolnej podskupiny (C, n = 8) a kontrolných podskupín (COC1, COC2, po n = 8) suplementovaných s nízkym a vysokým príjmom n-3 MK. 45% FOE (Cultech Limited, UK) obsahovala 8,1% eikozapenténovej (EPA, C20:5, n-3) a 5,9% dokozahexénovej (DHA C22:6, n-3) nenasýtenej MK. FOE suplementácia gastrickou sondou začala na 7 deň po indukciu DM a trvala 8 týždňov. Po tomto období boli zvieratá usmrtené, z mozgu boli ihneď izolované kortikálne a hipokampálne mitochondrie a stanovená koncentrácia proteínov (DC assay kit, BioRad). Mitochondrie boli alikvotované a uskladnené pri -80°C.

Stanovenie enzymatických aktivít komplexu I (CI), komplexu IV (CIV), citrát syntázy (CS) a superoxid dismutázy (SOD2)

Aktivita CI (NADH: ubichinón oxidoreduktáza) bola stanovená spektrofotometricky vo vzorkách kortikálnych a hipokampálnych mitochondrií (50 µg/ml) podľa (9) ako rýchlosť oxidácie NADH v prítomnosti alebo absencii rotenónu. Aktivity boli vypočítané a udané v nmol/min/mg. Aktivita cytochróm c oxidázy (CIV, 50 µg/ml proteínu) bola stanovená monitorovaním poklesu absorbancie redukovaného cytochrómu c (50 µM v 50 mM Tris/HCl pufru, pH 8,0) pri 550 nm a vypočítaná odčítaním rýchlosti oxidácie cytochrómu c v prítomnosti 7,5 mM azidu sodného od oxidácie cyt c bez prítomnosti azidu a vyjadrená v nmol/min/mg (6). Aktivita CS (50 µg/ml mitochondriálneho proteínu) bola stanovená podľa inštrukcií výrobcu kitu (Sigma-Aldrich) a vypočítaná v nmol/min/mg proteínu. SOD2 aktivita (1 mg/ml mitochondriálneho proteínu) bola meraná podľa inštrukcií výrobcu kitu (Sigma-Aldrich) a aktivita vypočítaná z kalibračnej krivky získanej riedením štandardného roztoku SOD a vyjadrená ako U/mg. 1U je definované ako množstvo enzýmu potrebného inhibovať 50% dismutáciu superoxidového radikálu.

Celkový obsah tiolových skupín (-SH skupiny)

SH skupiny boli stanovené spektrofotometricky v mitochondriálnych vzorkách (0,15 mg proteínu) podľa (7). Vzorky boli inkubované v reakčnej zmesi obsahujúcej DTNB a absorbancia bola monitorovaná pri 412 nm. Celkové tioly boli vypočítané pomocou $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a vyjadrené v nmol SH/mg proteínu.

Fluorescenčné merania

Fluorescenčné merania dityrozínov a konjugátov proteínov s lipoperoxidačnými produktmi (LPO) boli vykonané v mitochondriálnych vzorkách (25 µg/ml). Emisné spektrá dityrozínov boli monitorované pri 380-440 nm po excitácii pri 325 nm. Proteín-LPO konjugáty boli monitorované pri emisných spektrách 425-480 nm po excitácii pri 365 nm. Fluorescencia ANS sondy bola monitorovaná vo vzorkách (15 µg/ml) pri 480 nm po excitácii pri 365 nm. Výsledky sú vyjadrené v jednotkách fluorescenčnej intenzity (AU).

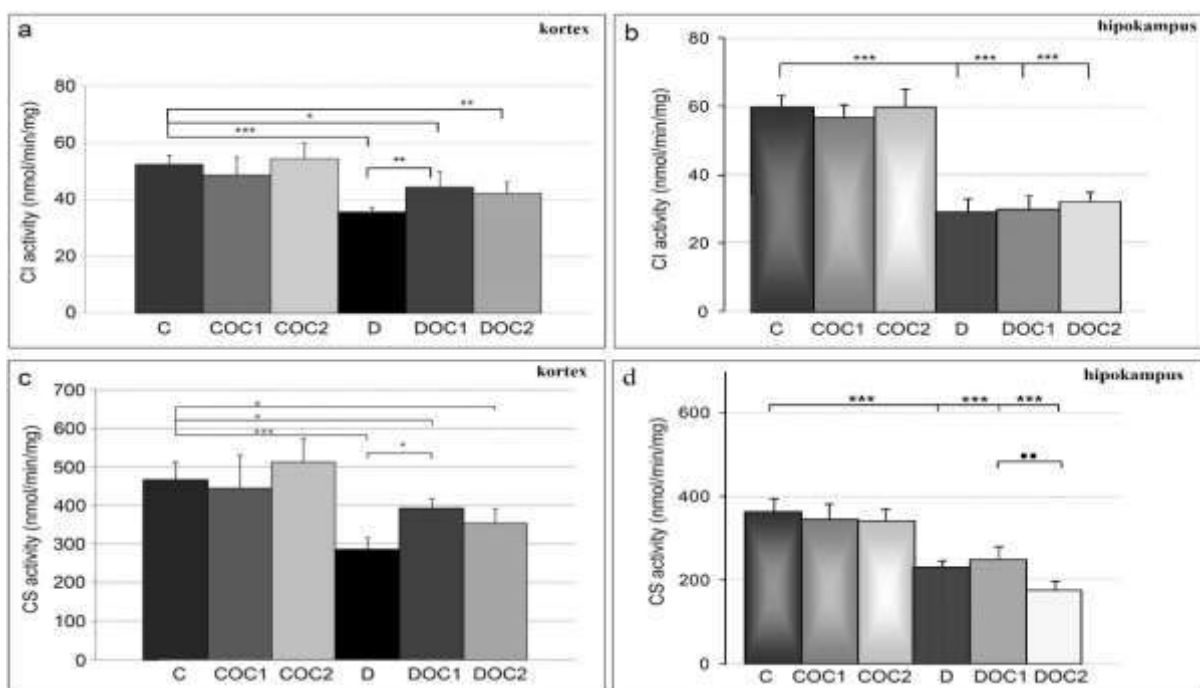
Štatistické hodnotenie

Na štatistické hodnotenie analytických výsledkov bola použitá ANOVA a Tukey post hoc test. Dáta sú prezentované ako priemer \pm SD, $P < 0,05$ bola použitá ako „cutoff“ hodnota štatistickej významnosti.

Výsledky

Enzymatické aktivity CI, CIV, CS a SOD2

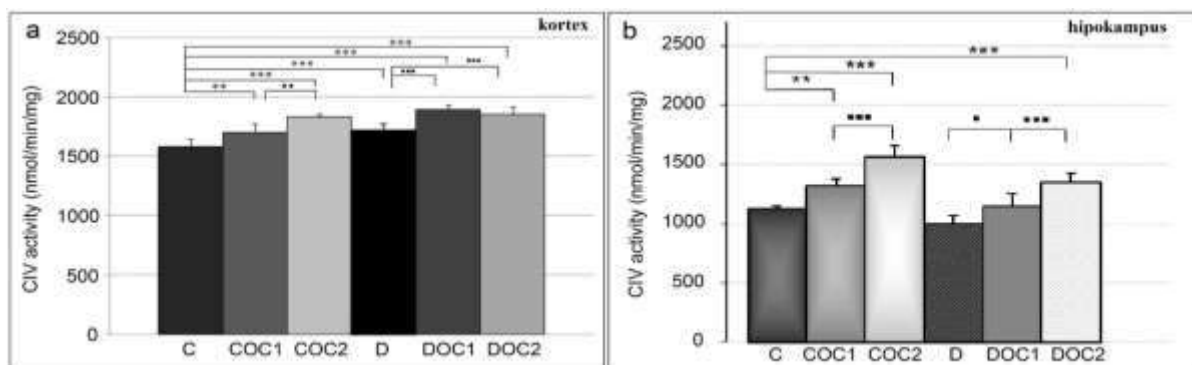
Perzistentná hyperglykémia v kortexe (obr. 1a) viedla k signifikantnému poklesu CI aktivity o 32,1% ($P < 0,001$ vs C). V diabetických podskupinách DOC1 a DOC2 suplementovaných s FOE, kortikálna aktivita CI bola zachovaná na 84,6% ($P < 0,05$) a 80,5% ($P < 0,01$) z kontrolnej hodnoty. FOE suplementácia neovplyvnila enzymatické aktivity v kontrolných vzorkách. V diabetickom hipokampe CI aktivita (Obr. 1b) bola inhibovaná na 51,6 % ($P < 0,001$). Diabetická hipokampálna mitochondria neodpovedala na FOE suplementáciu a CI aktivity zostali inhibované na úrovni diabetetickej podskupiny D. Aktivity CS, ktorá katalyzuje prvú reakciu Krebsovho cyklu a je používaná ako hrubý marker mitochondriálneho obsahu, boli konzistentné s priebehom CI aktivít v kortikálnej aj hipokampálnej mitochondrii (Obr. 1c, d).



Obr. 1 Vplyv DM a FOE suplementácie na enzymatické aktivity komplexu I a citrát syntázy

Aktivity boli stanovené v kortikálnej a hipokampálnej mitochondrii izolovanej z kontrolných ($n=24$) a diabetických ($n=36$) podskupín. Dáta sú prezentované ako priemer \pm SD. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. C, ■ $P < 0,05$, ■■ $P < 0,01$ vs. D. C - kontrola, COC1 - kontrola s nízkym príjmom FOE, COC2 - kontrola s vysokým príjmom FOE, D - neošetrená diabetická podskupina, DOC1, DOC2 - diabetické podskupiny s nízkym resp. vysokým príjmom FOE. CI - komplex I, CS - citrát syntáza

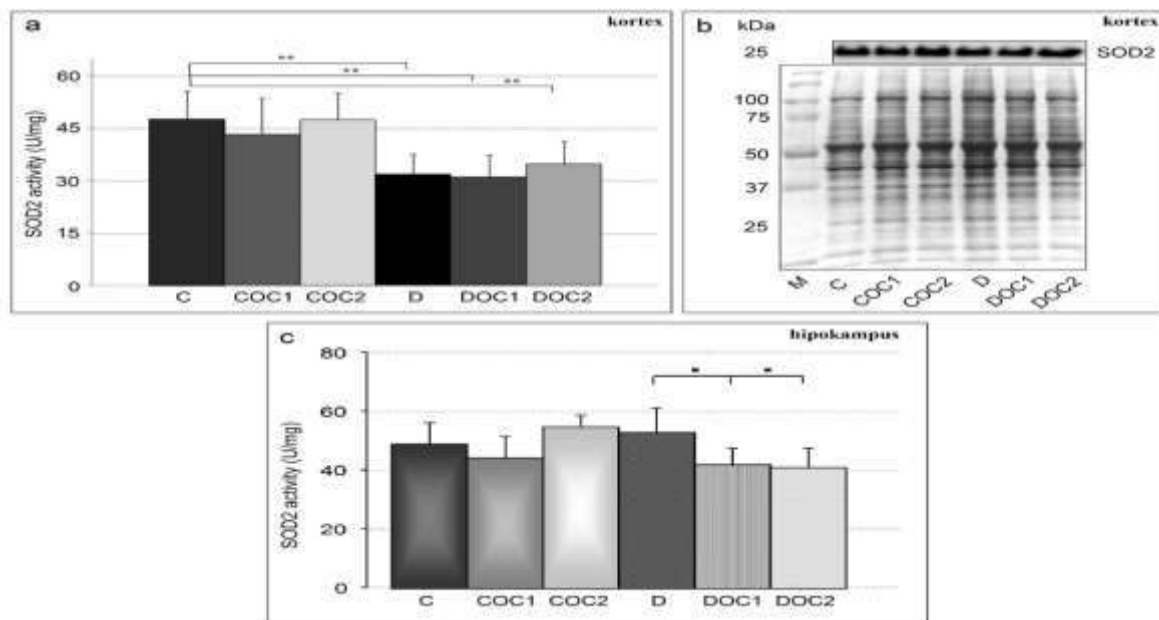
Meranie aktivít CIV (Obr. 2a) v kortexe ukázalo, že diabetes (D) zvýšil aktivitu CIV o 8,7% ($P < 0,001$ vs. C). Suplementácia diabetických zvierat s FOE viedla k ďalšiemu zvýšeniu aktivít enzýmu o 19,6% ($P < 0,001$ vs. C) v podskupine DOC1 a o 16,9% ($P < 0,001$ vs. C) v podskupine DOC2. V nediabetických kontrolných podskupín COC1 a COC2 boli tiež pozorované zvýšené aktivity CIV po suplementácii FOE o 7,7% ($P < 0,01$ vs. C) a 15,5% ($P < 0,001$ vs. C). Na rozdiel od kortexu, v diabetetickej hipokampálnej mitochondrii (D, Obr. 2b) sme nepozorovali zvýšené aktivity CIV ($1003,1 \pm 67,3$ nmol/min/mg vs. C). Podobne ako v kortexe, FOE suplementácia viedla k zvýšeniu aktivity enzýmu v diabetických (14,4 % vs. D, $P < 0,05$, resp. 34,5 %, $P < 0,001$ vs D) skupinách a k hyperaktivite v kontrolných podskupinách (17,8%, $P < 0,01$ vs C, resp. 39,4%, $P < 0,001$ vs C).



Obr. 2 Vplyv DM a FOE suplementácie na aktivity cytochróm c oxidázy

Aktivity boli stanovené v kortikálnej a hipokampálnej mitochondrii izolovanej z kontrolných (n=24) a diabetických (n=36) podskupín. Údaje sú prezentované ako priemer \pm SD. ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. C, ** P < 0.01 vs. COC1, *** P < 0.001 vs. COC1, ** P < 0.01 vs. D, *** P < 0.01 vs. D. C - kontrola, COC1 - kontrola s nízkym príjmom FOE, COC2 - kontrola s vysokým príjmom FOE, D - neošetrená diabetická podskupina, DOC1, DOC2 - diabetické podskupiny s nízkym resp. vysokým príjmom FOE. CIV - cytochróm c oxidáza

Analýza aktivity SOD2 (Obr. 3a), ktorá katalyzuje dismutáciu superoxidu odhalila zníženú aktivitu enzýmu v diabetickej kortikálnej mitochondrii o 33,2% (P < 0,01 vs. C). Suplementácia s FOE nemala benefičný efekt na aktivity SOD2 v diabetickom kortexe. Analýza proteínových hladín SOD2 potvrdila ustálenú proteínovú expresia enzýmu vo všetkých experimentálnych skupinách (Obr. 3b). Prekvapivo, v hipokampe sme nepozorovali signifikantné zmeny SOD2 aktivity v diabetickej D podskupine (Obr. 3c). Vo FOE suplementovaných diabetických podskupinách sme pozorovali mierny pokles aktivít tohto enzýmu (P < 0,05 vs. C).

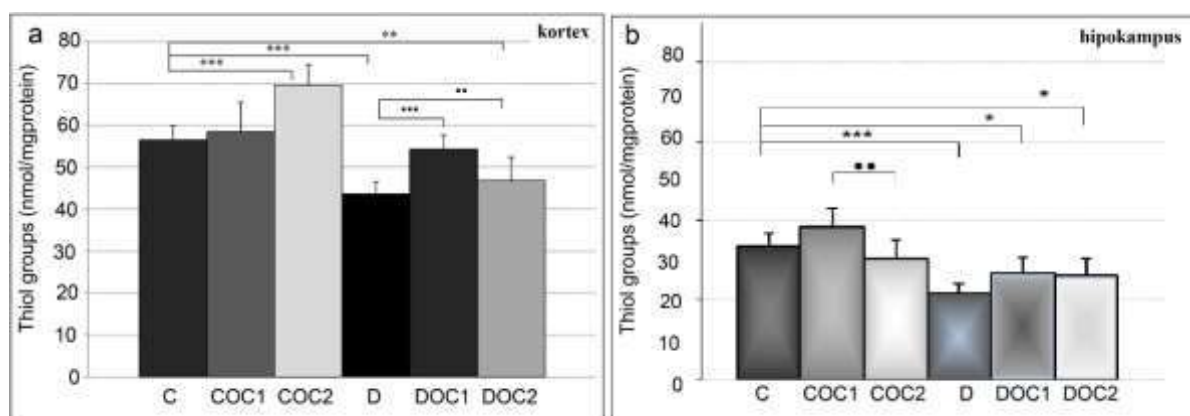


Obr. 3 Streptozotocínom-indukovaný diabetes inaktivuje SOD2 v kortikálnej (a), ale nie v hipokampálnej mitochondrii (c)

Aktivity sú prezentované ako priemer \pm SD. ** P < 0.01, * P < 0.05 vs. D. C - kontrola, COC1 - kontrola s nízkym príjmom FOE, COC2 - kontrola s vysokým príjmom FOE, D - neošetrená diabetická podskupina, DOC1, DOC2 - diabetické podskupiny s nízkym resp. vysokým príjmom FOE. SOD2 – superoxiddismutáza b) reprezentatívny blot proteínových hladín SOD2 a farbenia celkového proteínu ako kontroly nanášky proteínu

Celkový obsah tiolových skupín (- SH skupiny)

Redoxný stav celkových mitochondriálnych tiolových skupín v kortexe bol redukovaný o 22,7% ($P < 0,001$ vs C) v neovplyvnenej podskupine D (Obr. 4a). Podávanie FOE diabetickým zvieratám zachovalo tiolové skupiny na úrovni 93,3% v DOC1 a 82,8% ($P < 0,01$) kontrolnej hodnoty. Vplyv FOE na redoxný stav mitochondriálnych tiolov bol pozorovaný aj v kontrolných podskupinách, kde sme pozorovali zvýšenie o 3,5% ($P < 0,001$ vs C) a o 23,2% ($P < 0,001$ vs C) v COC2 podskupine. V diabetickom hipokampe v podskupine D (Obr. 4b) boli -SH skupiny znížené o 34,9 % ($P < 0,001$ vs C). Podávanie FOE diabetickým zvieratám zachovalo redukované tioly na 80,1% ($P < 0,05$ vs C) v DOC1 a 78,6% ($P < 0,05$ vs C) v DOC2 podskupine. Kým FOE suplementácia v kontrolnej podskupine COC1 viedla ľahkému nárastu množstva redukovaných tiolov, v skupine COC2 sme pozorovali signifikantný pokles ich hladín ($P < 0,01$ vs COC1).



Obr. 4 Vplyv DM a FOE suplementácie na redoxný stav mitochondriálnych tiolov

Mitochondrie boli izolované z kortexu a hipokampu. Údaje sú prezentované ako priemer \pm SD. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. C, •• $P < 0,01$ vs. COC1, ••• $P < 0,01$ vs. D, •••• $P < 0,01$ vs. D. C - kontrola, COC1 - kontrola s nízkym príjmom FOE, COC2 - kontrola s vysokým príjmom FOE, D - neovplyvnená diabetická podskupina, DOC1, DOC2 - diabetické podskupiny s nízkym resp. vysokým príjmom FOE.

Fluorescenčné merania

Monitorovanie prítomnosti oxidačného stresu bolo uskutočnené meraním tvorby dityrozínov a proteín-LPO konjugátov (Tab 1). V kortexe sme pozorovali signifikantný nárast fluorescence dityrozínov o 160% ($P < 0,001$ vs C) vo všetkých diabetických experimentálnych podskupinách. Podobne, tvorba proteín-LPO konjugátov bola zvýšená v kortikálnych diabetických vzorkách a FOE suplementácia nemala benefičný efekt na redukcii markerov oxidačného stresu. V diabetickom hipokampe sme prekvapivo nepozorovali nárast hladín sledovaných markerov oxidačného poškodenia. Oxidačné poškodenie proteínov a lipidov môže viesť k štruktúrnym zmenám mitochondriálnych membrán a proteínov, preto sme tieto zmeny monitorovali v ďalších experimentoch prostredníctvom fluorescenčnej próby ANS. V kortikálnej neovplyvnenej diabetickej mitochondrii sme zaznamenali zvýšenú fluorescenčnú intenzitu o 19,2 % ($P < 0,05$ vs C) a v FOE suplementovaných zvieratách o 23-25% ($P < 0,01$ vs C). V hipokampálnych vzorkách sme nepozorovali žiadne zmeny fluorescenčnej intenzity v experimentálnych podskupinách.

fluorescencia dityrozínov (Arbitrárne jednotky)						
mitochondria	C	COC1	COC2	D	DOC1	DOC2
cortex	19.5 ± 5.8	24.3 ± 6.7	25.8 ± 8.2	50.7 ± 7.8***	58.9 ± 8.7***	47.7 ± 5.3***
hippocampus	32.4 ± 3.9	32.7 ± 2.8	31.8 ± 4.3	28.8 ± 3.8	27.4 ± 2.5	28.0 ± 3.5
fluorescencia protein - LPO konjugátov (Arbitrárne jednotky)						
cortex	13.3 ± 5.8	18.8 ± 8.4	20.2 ± 6.4	48.9 ± 7.6***	56.4 ± 9.5***	46.5 ± 6.5***
hippocampus	34.9 ± 4.7	32.6 ± 2.7	30.9 ± 3.6	29.2 ± 3.5	30.1 ± 3.3	29.3 ± 3.9
fluorescencia ANS (Arbitrárne jednotky)						
cortex	372.3 ± 21	409.5 ± 16	434.6 ± 36	443.7 ± 53*	459.3 ± 48**	465.1 ± 32**
hippocampus	284.4 ± 20	293.1 ± 21	272.2 ± 29	269.2 ± 20	276.6 ± 21	288.9 ± 16

Tab. 1 DM, FOE suplementácia a markery oxidačného stresu

Dityrozíny, proteín-LPO konjugáty a väzba ANS sondy boli merané vo vzorkách mitochondrií izolovaných z kortexu a hipokampu. Údaje sú prezentované ako priemer ± SD. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. C. C - kontrola, COC1 - kontrola s nízkym príjmom FOE, COC2 - kontrola s vysokým príjmom FOE, D - neošetrená diabetická podskupina, DOC1, DOC2 - diabetické podskupiny s nízkym resp. vysokým príjmom FOE.

Diskusia

Kortex a hipokampus sú považované za vysoko senzitivne mozgové štruktúry, ktoré citlivo reagujú na patologické podnety a sú priamo zapojené v kognitívno-behaviorálnych funkciách mozgu. Ich adekvátny priebeh je podmienený fyziologickým fungovaním mitochondrií ako producentov energie a reaktívnych radikálov. V našej práci sme sa zamerali na monitorovanie odpovede mitochondrie kortexu a hipokampu na diabetické prostredie, najmä z pohľadu prítomnosti oxidačného stresu. Zároveň sme hodnotili potenciál n-3 esenciálnych mastných kyselín emulzie rybieho oleja ovplyvniť mitochondriálnu funkciu. Vzhľadom na sekvenčný charakter RR, jeho funkcia bola hodnotená meraním enzýmových aktivít prvého (CI) a posledného člena (CIV). Kým v neovplyvnených diabetických mitochondriách boli aktivity CI inhibované v oboch mozgových regiónoch, aktivity CIV boli zvýšené v diabetickom kortexe, v hipokampe však zostali na kontrolných hodnotách. Naše výsledky naznačujú, že DM vedie k deregulácii funkcie RR v oboch mozgových regiónoch. Nami pozorovaná dysfunkcia CI v diabetickej mitochondrii je konzistentná s inými štúdiami, ktoré rovnako popisujú dysfunkciu prvého respiračného člena v mozgu a v periférnych diabetických tkanivách (8). Zdá sa však, že rozdielny priebeh enzýmových aktivít CIV, ktorý je považovaný za kľúčové regulačné miesto funkcie RR (1) naznačuje odlišnú odpoveď mitochondrie kortexu a hipokampu na diabetické prostredie. Je možné, že v kortexe pozorovaná hyperaktivita CIV predstavuje adaptačnú odpoveď mitochondrie na redukovaný tok elektrónov v CI s cieľom stimulovať ho a tým predchádzať jeho zotrvaníu v redukovanom stave. Táto hypotéza je podporená výsledkami získanými v FOE suplementovaných zvieratách, kde sme pozorovali zvýšenie aktivít CIV v kontrolných i diabetických

podskupinách. Zlepšená funkcia CI bola pozorovaná aj v diabetických podskupinách suplementovaných s FOE. Je zaujímavé, že hoci v hipokampe suplementácia tiež viedla k stimulácii aktivity CIV v kontrolných i diabetických vzorkách, táto stimulácia nenašla odozvu v zlepšenej funkcii CI v diabetickom hipokampe. Aké molekulárne cesty vedú k rozdielnej odpovedi hipokampálnej mitochondrie na FOE suplementáciu sú nám nie zatiaľ známe. Môžu však naznačovať, že v diabetickom hipokampe na rozdiel od kortexu dochádza k rozdielnej regulácii funkcie RR, možno cez zmeny fosforylačného stavu respiračných komplexov (5). Ak uvažujeme kľúčovú úlohu CIV v regulácii RR a pozorovanú odpoveď kortikálnej a hipokampálnej mitochondrie na diabetické podmienky a FOE suplementáciu, je možné očakávať odlišnú odpoveď oboch mitochondrií na tvorbu ROS. V ďalších experimentoch sme preto hodnotili účinnosť antioxidantného systému detoxikovať ROS. Mitochondriálny izoenzým SOD2 predstavuje prvú obrannú líniu antioxidantného systému proti superoxidu produkovanému v RR. V kortexe sme pozorovali významnú inhibíciu tohto enzýmu v neovplyvnených aj suplementovaných diabetických zvieratách. Vzhľadom na ustálený stav proteínových hladín tohto enzýmu, pozorovaná inhibícia nie je dôsledkom straty množstva proteínu, ale pravdepodobne dôsledkom straty aktivity. Naopak, v hipokampe sme pozorovali len nesignifikantný nárast SOD2 aktivity v neovplyvnenej diabetickej skupine. Tento výsledok poukazuje na neporušenú schopnosť SOD2 detoxikovať vznikajúci superoxid v diabetickom hipokampe, aspoň počas 8 týždňov trvania nášho experimentu. Je zaujímavé, že prítomnosť n-3MK v diabetickom prostredí čiastočne redukovala aktivitu tohto enzýmu. SOD2 však nie je jediným detoxikačným systémom ROS. Do tejto obrany intenzívne vstupujú aj tiolové skupiny proteínov. Vo fyziologickom kontexte ich zmeny sú prostriedkom redoxnej regulácie bunkového metabolizmu, funkcie proteínov a ochrany senzitivných proteínov pred ireverzibilným oxidačným poškodením (4). Značný pokles voľných tiolových skupín mitochondriálnych proteínov v kortexe aj hipokampe poukazuje na ich aktívnu účasť v detoxikácii ROS v diabetickom prostredí. Je možné, že strata kritických tiolov sa môže podpisovať aj pod pozorovanú dysfunkciu CI a jeho zvýšenú senzitivitu na ROS-indukované oxidačné poškodenie. V diabetickej kortikálnej mitochondrii pozorované zníženie obsahu mitochondriálnych tiolov je v súlade s hypoaktivitou SOD2 a naznačuje existenciu prooxidačného prostredia. Tento predpoklad je podporený aj zvýšenou tvorbou dityrozínov, proteín-LPO konjugátov, štruktúrnymi zmenami proteínov a membránových povrchov detekovaných ANS sondou v diabetických kortikálnych mitochondriách. FOE suplementácia nemala benefičný vplyv na zníženie hladín markerov oxidačného stresu v tejto mozgovej oblasti. V hipokampe sme prekvapivo nezaznamenali významný nárast markerov oxidačného stresu, ani zmeny asociované so štruktúrnym poškodením proteínov a mitochondriálnych membrán. Tento nález je konzistentný s neporušenou funkciou SOD a redukciou proteínových tiolov, naznačujúc intenzívnu účasť hipokampálnych mitochondriálnych tiolov v antioxidantnej ochrane. Na základe získaných výsledkov možno usudzovať, že v experimentálnom období 8 týždňov, kortikálna mitochondria je senzitivnejšia na diabetom-indukované poškodenie ako v hipokampe. Aký je dopad na energetický metabolizmus, aktivované signálne dráhy a ďalšie bunkové funkcie bude predmetom budúcich experimentov.

Záver

DM-indukovaná mitochondriálna dysfunkcia v kortexe a hipokampe bola prezentovaná deregulovanou funkciou RR, ktorá nesie spoločné črty poškodenia prvého respiračného člena. Pozorovaná odpoveď CIV ako kľúčového regulačného miesta RR však naznačuje odlišnú adaptačnú odpoveď kortexu a hipokampu na hyperglykémiu a porušenie inzulínovú signalizáciu v horizonte 8 týždňov od indukcie DM. Odlišná odpoveď je pozorovateľná aj v kapacite antioxidantného systému účinne detoxikovať ROS a môže byť východiskovým

bodom v aktivácii rozdielnych signálnych dráh v diabetickom kortexe a hipokampe. Suplementácia FOE naznačuje úlohu n-3MK v modifikovaní proteín-lipidových interakcií v mitochondriálnej membráne a tiež v aktivácii signálnych dráh. Vzhľadom na nutrigenomickú silu n-3MK a prooxidačné diabetické prostredie, potenciál n-3MK modulovať mitochondriálnu funkciu nie je jasný a vyžaduje ďalšie štúdium.

Pod'akovanie

Štúdia bola podporená grantom VEGA 1/0349/16 MŠVVŠ SR. Pod'akovanie patrí aj firme Cultech Limited, Port Talbot, UK za poskytnutie emulzie rybieho oleja.

Literatúra

- 1. Arnold S.** The power of life--cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. *Mitochondrion.* (2012), 12(1):46-56
- 2. Biessels GJ, Deary IJ, Ryan CM.** Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *Lancet Neurol.*(2008),7(2):184-190
- 3. Bordier L, Doucet J, Boudet J3, Bauduceau B.** Update on cognitive decline and dementia in elderly patients with diabetes. *Diabetes Metab.*(2014), 40(5):331-337
- 4. Comini MA.** Measurement and meaning of cellular thiol:disulfide redox status. *Free Radic Res.* (2016), 50(2):246-271
- 5. Hüttemann M, Lee I, Samavati L, Yu H, Doan JW.** Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim Biophys Acta.* (2007),1773(12):1701-1720
- 6. Chomova M, Tatarkova Z, Dobrota D, Racay P.** Ischemia-induced inhibition of mitochondrial complex I in rat brain: effect of permeabilization method and electron acceptor. *Neurochem Res.*(2012), 37(5):965-976
- 7. Jocelyn PC.** Spectrophotometric assay of thiols.(1987), *Methods Enzymol.* 143:44-67
- 8. Kamboj SS, Sandhir R.** Protective effect of N-acetylcysteine supplementation on mitochondrial oxidative stress and mitochondrial enzymes in cerebral cortex of streptozotocin-treated diabetic rats. *Mitochondrion.* (2011), 11(1):214-22
- 9. Maklashina E, Sher Y, Zhou HZ, Gray MO, Karliner JS, Cecchini G.** Effect of anoxia/reperfusion on the reversible active/de-active transition of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in rat heart. *Biochim Biophys Acta.* (2002),1556(1):6-12
- 10. Sima AA.** Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol.* (2010), 47(4):279-293
- 11. Zhang J, Chen C, Hua S, Liao H, Wang M, Xiong Y, Cao F.** An updated meta-analysis of cohort studies: Diabetes and risk of Alzheimer's disease. *Diabetes Res Clin Pract.* (2017),124:41-47

VPLYV ETANOLOVÝCH HUBOVÝCH EXTRAKTOV *G. LUCIDUM* A *H. ERINACEUM* NA RAST MLADÝCH A STARÝCH BUNIEK

(Effect of *G. lucidum* and *H. erinaceum* ethanol mushroom extract on the growth of young and aging cells)

Mária Janubová, Ingrid Žitňanová

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave maria.janubova@fmed.uniba.sk

Súhrn

V procese starnutia významnú úlohu zohráva starnutie buniek, tzv. bunková senescencia. Hľadanie efektívneho spôsobu na odstránenie senescentných buniek z organizmu a/alebo spomalenie ich tvorby je preto dôležitým smerom výskumu. *Ganoderma (G.) lucidum* a *Hericiium (H.) erinaceum* patria medzi medicínsky významné huby. Obe sú už dlho používané v tradičnej medicíne v Číne a iných ázijských krajinách. V našej práci sme sa zamerali na sledovanie vplyvu etanolových extraktov z *G. lucidum* a *H. erinaceum* na rast mladých buniek a buniek starých, ktoré vykazujú známky senescencie. Zistili sme, že po 72 a 96 hodinovej inkubácii starých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* dochádzalo k výraznému poklesu viability starých buniek.

Kľúčové slová

Ganoderma lucidum, *Hericiium erinaceus*, MRC-5 bunková línia, starnutie, senescencia

Summary

Cellular senescence is considered to play a substantial role during aging. Thus searching for an effective method how to eliminate senescent cells and/or decelerate their formation is an important part of current research. *Ganoderma (G.) lucidum* a *Hericiium (H.) erinaceum* belong to medicinal mushrooms. Both have been used in traditional medicine in China and other countries in Asia since ancient times. We focused on the effect of ethanol extract of *G. lucidum* and *H. erinaceum* on growth of young and aging cells which exhibit hallmarks of senescence. We found out that incubation of aging cells with the ethanol extract of *H. erinaceum* for 72 and 96 hours lead to a significant decrease in cell viability.

Keywords

Ganoderma lucidum, *Hericiium erinaceus*, MRC-5 cell line, aging, senescence

Úvod

V procese starnutia významnú úlohu zohráva starnutie buniek, tzv. bunková senescencia. Senescencia je ireverzibilné zastavenie bunkového cyklu sprevádzané zmenami v bunkovej morfológii a fyziológii (1). Rozlišujeme dva typy senescencie. Prvým typom je replikatívna senescencia, ktorá vzniká v dôsledku skracovania telomér (2, 3). Druhým typom je stresom indukovaná senescencia, čo je odpoveď bunky na rôzne formy stresu ako je oxidačný stres,

poškodenie DNA, dysfunkcia mitochondrií, nadexpresia onkogénov, nukleolárny stres spôsobený inhibítormi RNA polymerázy I a porušenie epigenetickej regulácie (4-9).

Senescentné bunky sa akumulujú v rôznych tkanivách a orgánoch so zvyšujúcim sa vekom jedinca a tiež sa nachádzajú v tkanivách a orgánoch postihnutých chorobami spojenými so starnutím ako je ateroskleróza, artritída a Alzheimerova choroba (10).

Experimenty na myšiach, ktoré sledovali vplyv eliminácie senescentných buniek (buniek, ktoré exprimovali gén p16/INK4a) z organizmu viedli k potlačeniu poklesu fyziologických funkcií a tumorigenézy, k oddialeniu nástupu chorôb spojených so starnutím alebo zlepšeniu ich progresie a k predĺženiu celkovej dĺžky života (11, 12) (Baker et al., 2011; Baker et al., 2016). Hľadanie efektívneho spôsobu na odstránenie senescentných buniek z organizmu a/alebo spomalenie ich tvorby je preto dôležitým smerom výskumu.

Ganoderma (G.) lucidum a *Hericium (H.) erinaceum* patria medzi medicínsky významné huby. *G. lucidum* známa aj pod názvom reiši je už dlho používaná ako prostriedok na udržanie zdravia a dosiahnutie dlhovekosti v Číne a iných ázijských krajinách (13). Moderné analýzy preukázali prítomnosť viacerých typov bioaktívnych látok v jej plodniciach. Medzi tieto látky patria polysacharidy podporujúce imunitný systém, triterpenoidy, ktoré pôsobia protizápalovo a antialergicky a germánium zvyšujúce príjem kyslíka krvou (14). Výskumy tiež ukázali, že triterpenoidy izolované z *G. lucidum* inhibujú rast nádorových buniek a indukujú apoptózu v týchto bunkách (15). *H. erinaceum* podobne ako *G. lucidum* je používaná už mnoho storočí v tradičnej čínskej medicíne. Extrakty z *H. erinaceum* majú antioxidantné účinky, regulujú hladinu tukov v krvi a znižujú hladinu cukru v krvi (14). Z bioaktívnych látok, ktoré huba obsahuje sú najvýznamnejšie fenoly – hericenóny (A, B, C, D, E, F, G a H) a polysacharidy. Hericenóny C, D a E stimulujú tvorbu nervového rastového faktora (16), hericenóny A a B a polysacharidy vykazujú antitumorovú aktivitu (17, 18).

V našej práci sme sa zamerali na sledovanie vplyvu etanolových extraktov z *G. lucidum* a *H. erinaceum* na rast mladých buniek a buniek starých, ktoré vykazujú známky senescencie ako je zvýšená aktivita β -galaktozidázy asociovanej so senescenciou, zvýšená hladina proteínu p21 a p16 a zväčšený tvar buniek.

Materiál a metódy

Príprava 2,5% extraktu G. lucidum v 40 % etanole: Extrakt z *G. lucidum* sme pripravili zmiešaním 3 g rozdrvenej huby so 120 ml 40% etanolu a zmes sme nechali macerovať v tme 20 dní. Po ich uplynutí sme zmes centrifugovali pri 5200 g 10 minút, supernatant sme odliali do novej skúmavky, prefiltrovali v sterilnom boxe cez 0,2 μ m filter do sterilnej skúmavky a uskladnili pri 4°C.

Príprava 2,5% extraktu H. erinaceum v 40 % etanole: Pri príprave extraktu z *H. erinaceum* sme postupovali rovnako ako pri príprave extraktu z *G. lucidum*.

Kultivácia bunkovej línie MRC-5: Bunkovú líniu MRC-5 (ľudské pľúcne fetálne fibroblasty) sme kultivovali v MEM médiu, ktoré obsahovalo L-glutamín, neesenciálne aminokyseliny a 10% fetálne telacie sérum, Bunky sme pasážovali 1x týždenne pomocou 0,25% trypsín-EDTA roztoku.

Sledovanie vplyvu etanolových hubových extraktov na viabilitu MRC-5 bunkovej línie: Vplyv hubových extraktov na viabilitu MRC-5 bunkovej línie sme sledovali pomocou metyltiazol tetrazoliového (MTT) testu. Bunky sme kultivovali v 96-jamkových platničkách, pričom sme vysievali 1600 buniek na jamku v objeme 100 μ l MEM média. Po 24 hodinovej kultivácii pri 37°C a 6% CO₂ sme k bunkám pridali etanolový extrakt z *G. lucidum* alebo etanolový extrakt z *H. erinaceum* v rôznych riedeniach (20 – 2000x) v 100 μ l MEM média na jamku a bunky sme kultivovali 3 dni pri 37°C a 6% CO₂. Po uplynutí 3 dní sme k bunkám pridali 20 μ l MTT roztoku (5 mg/ml v 1 x PBS) do každej jamky a inkubovali sme 4 hodiny pri 37°C a 6% CO. Po skončení inkubácie sme odsali médium a do každej jamky sme pridali 200 μ l

DMSO a platničku sme na 5 minút umiestnili na trepačku. Absorbanciu sme merali pomocou mikroplatničkového spektrofotometra (firma, štát) pri 490 nm.

Sledovanie vplyvu etanolových hubových extraktov na rast mladých a starých buniek: Vplyv hubových extraktov na proliferáciu mladých a starých buniek sme sledovali pomocou metyltiazol tetrazoliového (MTT) testu. Modelom pre mladé bunky boli bunky v 9. pasáži a modelom pre staré bunky boli bunky v 22. pasáži. Bunky v 22. pasáži vykazujú známky senescencie ako je zvýšená aktivita β -galaktozidázy asociovanej so senescenciou, zvýšená hladina proteínu p21 a p16 a zväčšený tvar buniek. Bunky sme kultivovali v 96-jamkových platničkách, pričom v prípade pasáže 9 sme vysievali 1600 buniek na jamku v objeme 100 μ l MEM média a v prípade pasáže 22 sme vysievali 3200 buniek na jamku v objeme 100 μ l MEM média. K bunkám sme hneď pridali etanolový extrakt z *G. lucidum* alebo z *H. erinaceum* vo vybranom riedení v 100 μ l MEM média na jamku a bunky sme kultivovali 1, 2, 3 alebo 4 dni pri 37°C a 6% CO₂. Po uplynutí 1, 2, 3 alebo 4 dní sme k bunkám pridali 20 μ l MTT roztoku (5 mg/ml v 1 x PBS) do každej jamky a inkubovali sme 4 hodiny pri 37°C a 6% CO₂. Po skončení inkubácie sme odsali médium a do každej jamky sme pridali 200 μ l DMSO a platničku sme na 5 minút umiestnili na trepačku. Absorbanciu sme merali pomocou mikroplatničkového spektrofotometra pri 490 nm.

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Štatistická analýza bola uskutočnená pomocou nepárového, dvojstranného *Student t-testu*. Hodnota $p < 0,05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

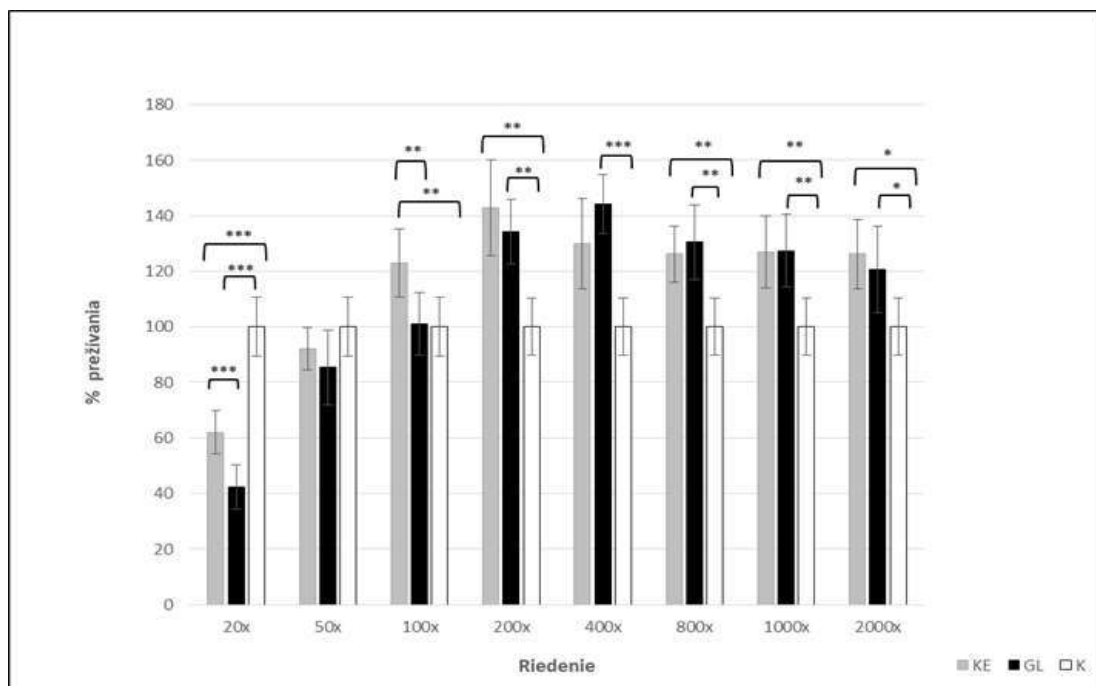
Výsledky

Sledovanie vplyvu etanolových hubových extraktov na viabilitu MRC-5 bunkovej línie

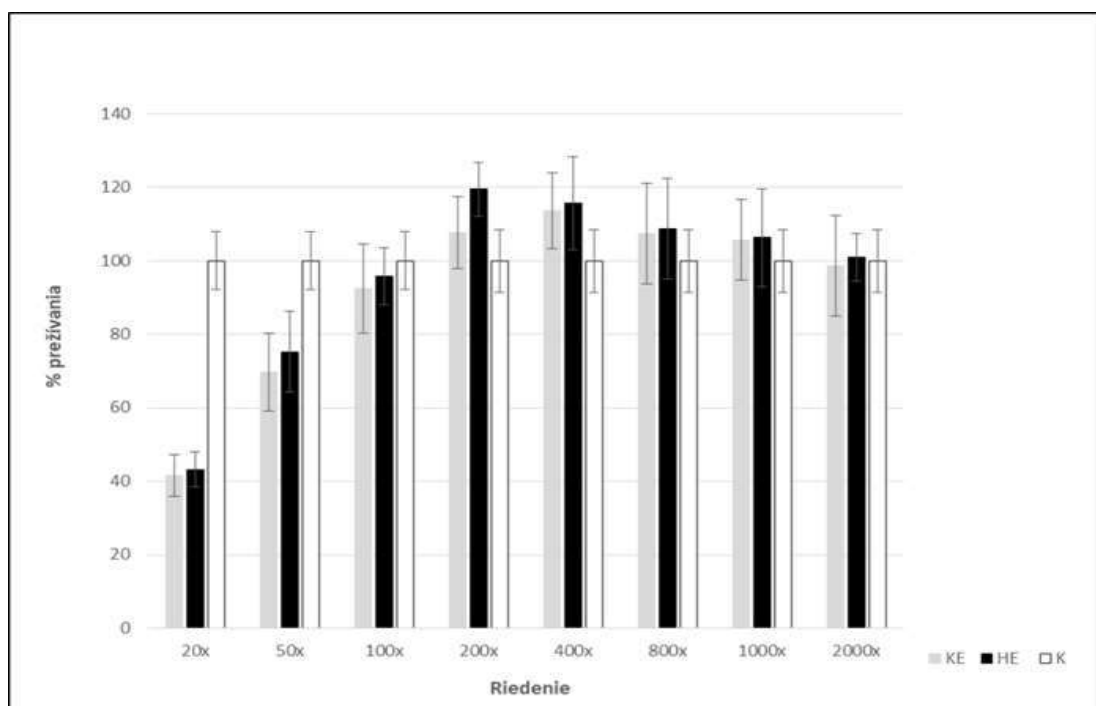
Vplyv etanolových hubových extraktov na viabilitu MRC-5 bunkovej línie sme sledovali pomocou MTT testu. V experimente sme bunky inkubovali s etanolovými hubovými extraktmi, ktoré boli riedené 20, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 alebo 2000-krát v kultivačnom médiu.

V prípade inkubácie buniek s etanolovým extraktom *G. lucidum* sme zistili, že k poklesu viability buniek oproti neovplyvnenej kontrole nedochádza pri riedení extraktu 200-krát a viac, nakoľko výsledky získané pri ovplyvnení buniek nižšími riedeniami (50-krát a 100-krát) extraktu neboli štatisticky významné a výsledky získané pri riedení extraktu 20-krát nám odhalili významný pokles viability buniek až o 58% (Obr. 1). Pridanie etanolového extraktu *G. lucidum* do kultivačného média riedeného 200-krát až 2000-krát navyše vedie k zvýšeniu celkovej viability buniek oproti neovplyvnenej kontrole. Zvýšenie viability buniek oproti neovplyvnenej kontrole bolo najvýznamnejšie pri 400-násobnom riedení etanolového extraktu *G. lucidum* (až o 44%), na základe čoho sme sa rozhodli toto riedenie použiť v ďalších experimentoch.

V prípade inkubácie buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* sme zistili, že k poklesu viability buniek oproti neovplyvnenej kontrole nedochádza iba pri riedení extraktu 200-krát. Navyše pridanie etanolového extraktu *H. erinaceum* riedeného 200-krát k bunkám vedie k zvýšeniu viability buniek o 20% oproti neovplyvnenej kontrole. Výsledky získané pri ovplyvnení buniek väčšími riedeniami etanolového extraktu *H. erinaceum* (400- 800- 1000- alebo 2000-krát) neboli štatisticky významné (Obr. 2). Bunky ovplyvnené nižšími riedeniami etanolového extraktu *H. erinaceum* (20- 50- alebo 100-krát) mali zníženú viabilitu oproti neovplyvnenej kontrole. Viabilita buniek bola tým nižšia, čím menšie bolo riedenie etanolového extraktu *H. erinaceum*. Na základe získaných výsledkov sme sa rozhodli v ďalších experimentoch pracovať s 200-násobne riedeným etanolovým extraktom *H. erinaceum*.



Obr. 1 Vplyv 2,5% extraktu *G. lucidum* v 40% etanole na viabilitu MRC-5 bunkovej línie. Bunky boli inkubované 3 dni s etanolovým extraktom *G. lucidum*, ktorý bol riedený 20, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 alebo 2000-krát v kultivačnom médiu. Výsledky sú priemer 2 experimentov \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. K – kontrola bez pridania etanolu alebo etanolového extraktu *G. lucidum*, KE – kontrola ovplyvnená 40% etanolom v uvedených riedeniach, GL – bunky ovplyvnené extraktom *G. lucidum* v uvedených riedeniach.



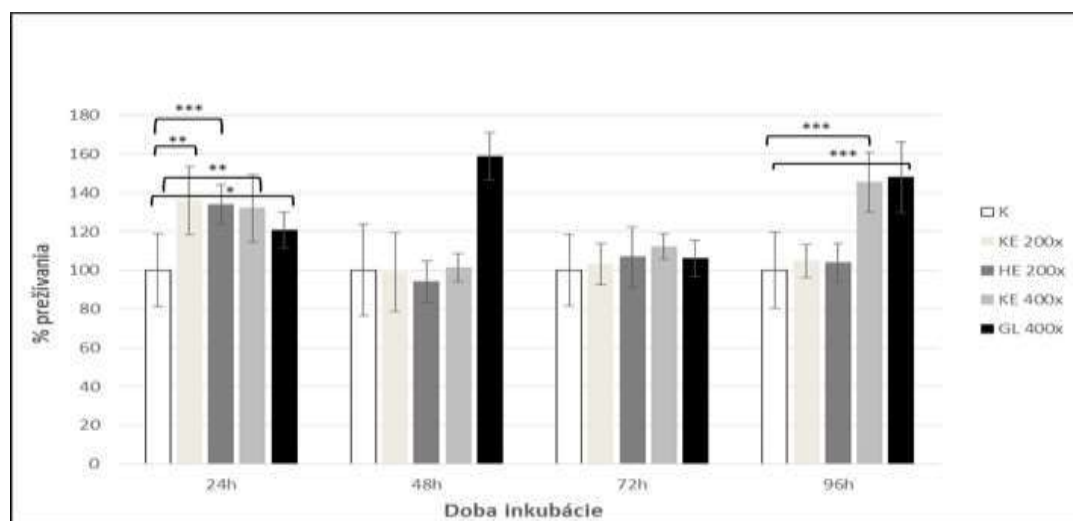
Obr. 2 Vplyv 2,5% extraktu *H. erinaceum* v 40% etanole na viabilitu MRC-5 bunkovej línie. Bunky boli inkubované 3 dni s etanolovým extraktom *H. erinaceum*, ktorý bol riedený 20, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 alebo 2000-krát v kultivačnom médiu. Výsledky sú priemer 2 experimentov \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. K – kontrola bez pridania etanolu alebo etanolového extraktu *H. erinaceum*, KE – kontrola ovplyvnená 40% etanolom v uvedených riedeniach, HE – bunky ovplyvnené extraktom *H. erinaceum* v uvedených riedeniach.

Sledovanie vplyvu etanolových hubových extraktov na rast mladých a starých buniek

Vplyv etanolových hubových extraktov na rast mladých a starých buniek sme sledovali pomocou MTT testu. Modelom pre mladé bunky boli bunky v 9. pasáži a modelom pre staré bunky boli bunky v 22. pasáži, ktoré vykazujú známky senescencie ako je zvýšená aktivita SA β -galaktozidázy asociovanej so senescenciou, zvýšená hladina proteínu p21 a p16 a zväčšený tvar buniek. V experimente sme bunky inkubovali so 400-krát riedeným etanolovým extraktom *G. lucidum* v kultivačnom médiu alebo 200-krát riedeným extraktom *H. erinaceum* v kultivačnom médiu po dobu 24, 48, 72 alebo 96 hodín.

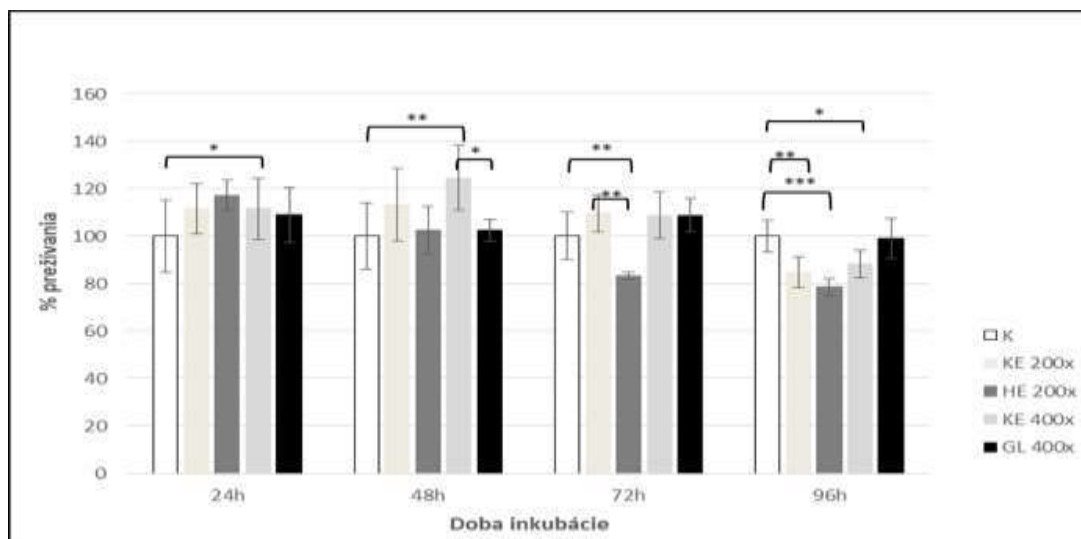
V prípade mladých buniek inkubovaných s etanolovým extraktom *G. lucidum* alebo *H. erinaceum* sme po 24 hodinách zaznamenali mierny nárast viability oproti neovplyvnenej kontrole (Obr. 3). Výsledky získané po 48 a 72 hodinovej inkubácii mladých buniek s etanolovým extraktom *G. lucidum* neboli signifikantné. Rovnako ani výsledky získané po 48 a 72 hodinovej inkubácii mladých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* neboli signifikantné. Po 96 hodinovej inkubácii buniek s etanolovým extraktom *G. lucidum* sme pozorovali výrazný nárast viability až o 48% oproti neovplyvnenej kontrole. Výsledky získané po 96 hodinovej inkubácii mladých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* neboli štatisticky významné.

V prípade starých buniek sme signifikantné výsledky po 24 hodinovej inkubácii s etanolovým extraktom *G. lucidum* alebo *H. erinaceum* získali len pri inkubácii starých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum*, kde sme pozorovali mierny nárast viability oproti neovplyvnenej kontrole. Výsledky získané po 48 hodinovej inkubácii starých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* neboli štatisticky významné, zatiaľ čo po 72 a 96 hodinovej inkubácii starých buniek s etanolovým extraktom *H. erinaceum* dochádzalo k poklesu viability starých buniek o 17% a 22% oproti neovplyvnenej kontrole. Výsledky získané po 48, 72 a aj 96 hodinovej inkubácii starých buniek s etanolovým extraktom *G. lucidum* neboli signifikantné.



Obr. 3 Vplyv 2,5% extraktu *H. erinaceum* v 40% etanole a 2,5% extraktu *G. lucidum* v 40% etanole na rast mladých buniek (pasáž 9).

Bunky boli inkubované 1, 2, 3 alebo 4 dni s etanolovým extraktom *G. lucidum* riedeným 400-krát v kultivačnom médiu alebo s etanolovým extraktom *H. erinaceum* riedeným 200-krát v kultivačnom médiu. Výsledky sú priemer 2 experimentov \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. K – kontrola bez pridania etanolu alebo etanolového extraktu *G. lucidum* alebo *H. erinaceum*, KE 200x – kontrola ovplyvnená 40% etanolom riedeným 200-krát v kultivačnom médiu, HE 200x – bunky ovplyvnené extraktom *H. erinaceum* riedenom 200-krát v kultivačnom médiu, KE 400x – kontrola ovplyvnená 40% etanolom riedeným 400-krát v kultivačnom médiu, GL 400x – bunky ovplyvnené extraktom *G. lucidum* riedenom 400-krát v kultivačnom médiu



Ob. 4 Vplyv 2,5% extraktu *H.erinaceum* v 40% etanole a 2,5% extraktu *G.lucidum* v 40% etanole na rast starých buniek (pasáž 22).

Bunky boli inkubované 1, 2, 3 alebo 4 dni s etanolovým extraktom *G. lucidum* riedeným 400-krát v kultivačnom médiu alebo s etanolovým extraktom *H. erinaceum* riedeným 200-krát v kultivačnom médiu. Výsledky sú priemer 2 experimentov \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. K – kontrola bez pridania etanolu alebo etanolového extraktu *G. lucidum* alebo *H. erinaceum*, KE 200x – kontrola ovplyvnená 40% etanolom riedeným 200-krát v kultivačnom médiu, HE 200x – bunky ovplyvnené extraktom *H. erinaceum* riedenom 200-krát v kultivačnom médiu, KE 400x - kontrola ovplyvnená 40% etanolom riedeným 400-krát v kultivačnom médiu, GL 400x – bunky ovplyvnené extraktom *G. lucidum* riedenom 400-krát v kultivačnom médiu

Záver

Bunkové starnutie tzv. senescencia hrá významnú úlohu pri starnutí organizmu (1). Dôležité je preto hľadanie efektívneho spôsobu na odstránenie senescentných buniek z organizmu a/alebo spomalenie ich tvorby. V našej práci sme sa zamerali na sledovanie vplyvu etanolových extraktov z *G. lucidum* a *H. erinaceum* na rast mladých buniek a buniek starých, ktoré vykazujú známky senescencie ako je zvýšená aktivita SA β -galaktozidázy asociovanej so senescenciou, zvýšená hladina proteínu p21 a p16 a zväčšený tvar buniek. *G. lucidum* a aj *H. erinaceum* sú zaradené medzi medicínsky významné huby. Obe sú už dlho používané ako prostriedok na udržanie zdravia a dosiahnutie dlhovekosti v Číne a iných ázijských krajinách (13).

Z našich experimentov vyplýva, že nami použitý etanolový extrakt z *G. lucidum* by nemal negatívne ovplyvňovať rast mladých buniek v závislosti od dĺžky pôsobenia. V prípade etanolového extraktu z *H. erinaceum* vieme povedať len, že po 24 hodinovej inkubácii mladých buniek s týmto extraktom dochádza k miernemu zvýšeniu rastu buniek. V prípade starých buniek sme získali signifikantné výsledky len v prípade ovplyvnenia buniek etanolovým extraktom z *H. erinaceum*. Dôležitým zistením je, že inkubácia starých buniek extraktom z *H. erinaceum* vedie po 72 hodinách k výraznému poklesu rastu buniek, ktorý sa ešte prehĺbi po 96 hodinovej inkubácii starých buniek s extraktom. Pozorovaný pokles rastu môže byť spôsobený tým, že staršie bunky v dôsledku svojej opotrebovanosti sú citlivejšie voči pôsobeniu látok obsiahnutých v etanolovom extrakte z *H.erinaceum*, čo spôsobuje poškodenie buniek a ich smrť. Na druhej strane je možné, že látky obsiahnuté v etanolovom extrakte z *H.erinaceum* selektívne zabíjajú bunky, ktoré sú už v senescentnom stave a tým spôsobujú zdanlivý pokles rastu buniek. Na zistenie skutočnej príčiny poklesu rastu starých buniek vplyvom inkubácie s etanolovým extraktom z *H.erinaceum* je však potrebné uskutočniť ďalšie experimenty. Podľa dostupných informácií podobný experiment, ktorý by

sledoval vplyv pôsobenia etanolových extraktov z húb na rast starých buniek nebol uskutočnený. Známy je len experiment, v ktorom bol pozorovaný vplyv jednotlivých vyizolovaných zložiek – hericenónov na aktivitu SA- β - galaktozidázy v ľudských umbilikálnych endotelových bunkách, v ktorých bola indukovaná senescencia pôsobením adriamycínu. Hericenóny boli pridané k bunkám pred ovplyvnením buniek adriamycínom a niektoré z nich boli schopné znížiť hladinu SA- β - galaktozidázy v bunkách (19).

Pod'akovanie

Práca je podporená z grantu EU, z programu CBC, Interreg V-A-NutriAging V-0014.

Literatúra

1. **Campisi J, d'Adda di Fagagna F.** Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8 (9): 729–740.
2. **Harley CB, Futcher AB, Greider CW.** Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, *Nature.* 1990; 345: 458–460.
3. **Tominaga K.** The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology. *Pathobiol. Aging Age-Relat. Dis.* 2015; DOI: 10.3402/pba.v5.27743.
4. **DiLeonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM.** DNA damage triggers a prolonged p53- dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 1994; 8: 2540–2551.
5. **Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN.** Molecular analysis of H₂O₂- induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J.* 1998; 332: 43–50.
6. **Ziegler DV, Wiley CD, Velarde MC.** Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell.* 2015; 14: 1–7.
7. **Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW.** Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p 53 and p16/ INK4a. *Cell.* 1997; 88: 593–602.
8. **Hein N, Sanij E, et al.** The Nucleolus and Ribosomal Genes in Aging and Senescence 172-208. In T. Nagata (Eds.) *Senescence*, InTech, 2012.
9. **Munro J, Barr NI, Ireland H, Morrison V, Parkinson EK.** Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-line state in human cells by a p16- dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp. Cell Res.* 2004; 295: 525–538.
10. **Naylor RM, Baker DJ, van Deursen JM.** Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2013; 93: 105–116.
11. **Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM.** Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011; 479: 232–236.
12. **Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben Cj, Zhong J, Saltness RA, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeshki A, Khazaie K, Miller JD, van Deursen JM.** Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.* 2016; 530: 184–189.
13. **Shiao MS, Lee KR et al.** Natural products and biological activities of the Chinese medical fungus, *Ganoderma lucidum*. 342-354. In: Ho CT, Osawa T, Huang MT, Rosen RT (Eds). *Food phytochemicals for cancer prevention II: Teas, spices and herbs.* Washington DC; American chemical society, 1994.
14. **Antonin V, Jablonský I, Šašek V, Vančuríková Z (Eds).** *Huby ako liek.* Praha; Ottovo nakladatelství, s.r.o., 2013

- 15. Yue QX, Song XY, Ma C, Feng LX, Guan SH, Wu WY, Yang M, Jiang BH, Liu X, Cui YJ, Guo DA.** Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of HeLa cells. *Phytomedicine*. 2010; 17: 606-613.
- 16. Kawagishi H, Ando M, Sakamoto H, Yashida S.** Hericenone C, D and E stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Hericiium eirnaceum*. *Tetrahedon Lett*. 1991; 32: 4561-4564.
- 17. Kawagishi H, Ando M, Mizuno T.** Hericenone A and B as cytotoxic principles from the mushroom *Hericiium erinaceum*. *Tetrahedron Lett* 1990; 31: 373–376.
- 18. Mizuno T, Wasa T, Ito H, Suzuki C, Ukai N.** Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericiium erinaceum*, an edible and medicinal mushroom called yamabushitake or houtou. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992; 6: 347–348.
- 19. Noh HJ, Yang HH, Kim GS, Lee SE, Lee DY, Choi JH, Kim SY, Lee ES, Ji SH, Kang KS, Park HJ, Kim JR, Kim KH.** Chemical constituents of *Hericiium erinaceum* associated with the inhibitory activity against cellular senescence in human umbilical vascular endothelial cells. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2015; 30 (6): 934–940.

INHIBÍCIA PROTEAZÓMU V BUNKÁCH A549

(Inhibition of the proteasome in the cells A549)

**Katarína Koňariková¹, Jana Frivaldská¹, Helena Gbelcová^{2,3}, Martin Švéda³,
Tomáš Rumř³, Lucia Andrežalová¹, Ingrid Žitňanová¹**

¹Univerzita Komenského, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Sasinkova 2, 811 08, Bratislava, Slovenská republika;
katarina.konarikova@fmed.uniba.sk

²Univerzita Komenského, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Sasinkova 4, 811 08, Bratislava, Slovenská republika

³Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 3, 166 28 Praha, Česká republika

Súhrn

V našej štúdií sme sledovali schopnosť N-salicylidénglutamáto mednatých komplexov inhibovať proteazóm v nádorovej bunkovej línii A549, HeLa a U-118MG. Na experiment sme použili IC₅₀ (μmol/L) koncentrácie mednatých komplexov po 24h pôsobení a pri transfekcii buniek plazmidový konštrukt DNA pCMV HA Ubikvitin. Metódou western blot sme pozorovali hromadenie ubikvitínu v bunkách A549.

Kľúčové slová

proteazóm, inhibícia, mednaté komplexy

Summary

In our study, we have observed the ability of N-salicylidene glutamate copper complexes to inhibit a proteasome in the cancer cell lines A549, HeLa and U-118MG. For the experiment we used IC₅₀ (μmol / L) concentration of copper complexes with 24h incubation and for transfection of cells we used DNA construct pCMV HA Ubiquitin. We observed accumulation of the ubiquitin in the A549 cells by Western blot analysis.

Keywords

proteasome, inhibition, copper complexes

Úvod

V roku 2004 získali Nobelovu cenu za chémiu Hershko, Ciechanover a Roseom za objavenie a popísanie proteazómu (1). Proteazóm reguluje niekoľko dôležitých bunkových procesov, ako proliferáciu, apoptózu, angiogénu a metastázovanie (2). Preto sa proteazóm stal dôležitým terapeutickým cieľom pri vývoji nových protinádorových liečiv. Inhibítory proteazómu indukujú zastavenie bunkového cyklu, inhibujú angiogénu, adhéziu a migráciu buniek, imunitnú a zápalovú odpoveď a reparačnú odpoveď DNA a tým zastavujú rakovinové bujnenie (3). Počas našej štúdie sme rôznymi mednatými komplexami ovplyvňovali rôzne ľudské nádorové bunkové línie s cieľom inhibovať proteazóm. Táto práca je nadväznou štúdiou, ktorú sme robili na ľudských nádorových bunkách hrubého čreva HT-29 a HEK-293T (4).

Cieľ práce

V našej práci sme študovali inhibíciu proteazómu transfekovaných buniek A549, HeLa a U-118MG med'natými komplexami. Na transfekciu sme použili konštrukt plazmidovej DNA s ubikvitínom (pCMVHAUbikvitin) a následne ovplyvnili med'natými komplexami.

Materiál a metódy

Typ použitej plazmidovej DNA

pCMVHAUbikvitin: pCMV - typ plazmidu; HA - označenie antigénu. Konštrukty pripravil Ing. Martin Švéda v laboratóriu Biochémie a mikrobiológie, VŠCHT Praha.

Bunkové línie

Ľudské nádorové bunky pľúc A549, ľudské nádorové bunky krčka maternice HeLa a ľudské nádorové bunky mozgu U-118MG (základné inokulum 80 000 buniek/ml) boli kultivované pri 37 °C, 5% CO₂ v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) obohatenom 10% fetálnym sérom a 5% antibiotikami (penicilín/streptomycín) staticky v Petriho miske. Bunky boli získané z American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA.

Študované látky

V práci sme testovali päť med'natých komplexov. Ide o N-salicylidén glutamáto med'naté komplexy s rôznymi doplnkovými ligandami (H₂O – Cu-1, izochinolín – Cu-2, metylester kyseliny glutámovej, H₂O – komplex Cu-3, imidazol – Cu-4, 2-metylimidazol – komplex Cu-5). Tieto Schiffove bázy odvodené od salicyladehydu a kyseliny glutámovej boli pripravené podľa Nakao a kol. (1967)(5), Krätsmár-Šmogrovič a kol. (1991)(6), Langer a kol. (2009)(7), Langer a kol. (2004)(8), Langer a kol. (2012)(9).

Komplexy boli rozpustné vo vode a na testovanie sme použili koncentračný rozsah 0,001-100 µmol/L.

Transfekcia

Pri štúdiu inhibície proteazómu sme použili transfekciu plazmidovej DNA do buniek A549, HeLa a U-118MG. Pripravili sme si transfekčnú zmes (100 µl média optiMEM, 1 µl DNA a 3 µl transfekčného činidla Fugene) a inkubovali 15 min pri laboratórnej teplote. K vyrastenej bunkovej kultúre v 6 jamkových platničkách o objeme 2 mL sme pridali transfekčnú zmes a po 4 hodinovej inkubácii s bunkami pri 37°C, 5% CO₂ sme médium odsali, pridali nové a ovplyvnili bunky med'natými komplexami v koncentrácii IC₅₀ (po 24 h ovplyvnení). Pre tento experiment boli použité 4 typy kontrolných buniek:

- bunky ovplyvnené komerčne dostupným inhibítorom proteazómu MG132 (0,2 mol/mL), transfekované plazmidovou DNA
- bunky ovplyvnené komerčne dostupným inhibítorom proteazómu MG132 (0,2 mol/mL), netransfekované plazmidovou DNA
- bunky, ktoré neboli ovplyvnené inhibítorom, transfekované
- bunky, ktoré neboli ovplyvnené inhibítorom, netransfekované

Western blot

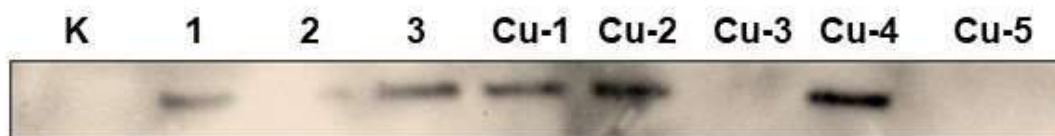
Kontrolné a látkou ovplyvnené bunky sme scentrifugovali pri 450xg, 10 min, 4 °C, dvakrát premyli v PBS (pH 7,4) a lyzovali lyzačným tlmivým roztokom s obsahom 1 mol/L Tris-HCl (pH 7,2), 10% SDS, 1% Triton X-100, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA priamo v kultivačnej platničke. Po lýze sme bunky rozsuspendovali na vortexe a centrifugovali pri 20 000xg, 30 min., 4 °C. Supernatant sme odobrali do novej skúmavky na stanovenie proteínov. Vzorky sme dávkovali do pripraveného gélu po denaturácii (var pri

100 °C vo vodnom kúpeli 3 min.) s obsahom 60 – 100 µg proteínov v maximálnom objeme 20 µL. Elektroforéza prebiehala pri napätí 100V, 80 min. Po prebehnutí elektroforézy sme proteíny oddelené elektroforézou preblotovali na nitrocelulóзовú membránu a detekovali protilátkou proti ubiquitínu a sekundárnou protilátkou značenou peroxidázou. Na detekciu sme využili chemiluminiscenčnú detekciu.

Výsledky a diskusia

Zvýšená proteozomálna aktivita bola zistená v rôznych druhoch rakoviny ako napr. prostaty, čreva a leukémie, čo naznačuje, že rakovinové bunky sú citlivejšie na inhibíciu proteazómu než bunky zdravé. Inhibícia nádorového proteazómu je spojená so „zamknutím“ bunkového cyklu a indukciou apoptózy (10) a tým sa podstatne zvyšuje citlivosť nádorových buniek na ďalšiu liečbu (11).

V rámci našej práce sme sa zaoberali štúdiom inhibície proteazómu v ľudských nádorových bunkách pľúc A546, krčka maternice HeLa a mozgu U-118MG. Ako pozitívnu kontrolu sme použili komerčne dostupný inhibítor proteazómu MG-132. Pomocou metódy western blot sme pozorovali hromadenie ubiquitínu v bunkách A549 (obr.1), čo je signálom inhibície proteazómu. Najsilnejší signál sme pozorovali pri použití meďnatých komplexov Cu-1, Cu-2 a Cu-4.



Obr. 1 Detekcia inhibície proteazómu metódou western blot po ovplyvnení ľudských nádorových buniek pľúc A549 meďnatými komplexami počas 24 h inkubácie.

K – bunky netransfekované, neovplyvnené MG132 a neovplyvnené meďnatými komplexami;
 1 - bunky netransfekované, ovplyvnené inhibítorom MG132 a neovplyvnené meďnatými komplexami;
 2 – bunky transfekované, neovplyvnené inhibítorom MG132 a neovplyvnené meďnatými komplexami;
 3 - bunky transfekované, ovplyvnené MG132 a neovplyvnené meďnatými komplexami;
 Cu-1, Cu-2, Cu-3, Cu-4 a Cu-5 – bunky transfekované, ovplyvnené koncentráciou IC₅₀ (µmol/L).

Z literatúry je známe, že meďnaté komplexy sú schopné inhibovať aktivitu proteazómu (12). Napríklad meďnaté komplexy s flavonoidovými ligandami [Cu(H₂O)₂ (HL1)(phen)](ClO₄) a [Cu(H₂O)(HL₂)(phen)](ClO₄), (HL1 = naringenín; HL2 = hesperetín, phen- 1,10- fenantrolín) vykazujú inhibíciu proteazómu v nádorovej línii pľúc A549 použitím inhibičných koncentrácií IC₅₀ = 16,42 µmol/L pre prvý a IC₅₀ = 5,82 µmol/L pre druhý komplex (13), čo je v porovnaní s nami použitým N-salicylidénglutamáto meďnatým komplexom s prídavným ligandom imidazolom (Cu-4) 300-násobne vyššia koncentrácia (tab.1).

(IC₅₀ µmol/L) počas 24h inkubácie			
	A549	HeLa	U-118MG
Cu-1	>100	>100	>100
Cu-2	>100	>100	>100
Cu-3	>100	>100	>100
Cu-4	0,055	75,5	>100
Cu-5	95	0,9	>100

Tab. 1 Hodnoty IC₅₀ (µmol/L) meďnatých komplexov po 24h ovplyvnení ľudských nádorových buniek pľúc A549, ľudských nádorových buniek krčka maternice HeLa a ľudských nádorových buniek mozgu U-118MG.

Naopak, v ľudských nádorových bunkách HeLa a U-118MG sme nepozorovali hromadenie ubiquitínu po ovplyvnení buniek medňatými komplexami a preto nepredpokladáme inhibíciu proteazómu v týchto bunkách nami zvolenými komplexmi (výsledok z western blotu neuvádzame). Hoci štúdie dokazujú na ubiquitíne závislú proteolýzu inhibovaných komplexami v závislosti od koncentrácie, bolo pozorované mierne obnovenie proteazómovej aktivity v bunkách HeLa a preto sú tieto bunky odolnejšie voči použitým medňatým komplexom (14).

Záver

Na základe našich zistení môžeme teda konštatovať, že N-salicylidén glutamát medňaté komplexy sú schopné inhibovať aktivitu proteazómu v ľudských nádorových bunkách pľúc A549 a nie sú schopné inhibovať proteozomálnu aktivitu v ľudských nádorových bunkách krčka maternice HeLa a ľudských nádorových bunkách mozgu U-118MG.

Pod'akovanie

Tento projekt bol podporený grantom VEGA 1/0752/13 a 1/0407/13.

Literatúra

1. **Neefjes J a kol.** The 2004 Nobel Prize in Chemistry for the discovery of ubiquitin-mediated protein degradation. *Ned Tijdschr Geneesk* 2004; 148(52): 2579-82.
2. **Hirosawa T a kol.** Loss of BAP1 expression is associated with genetic mutation and can predict outcomes in gallbladder cancer. *PLoS One* 2018; 13(11): 5.
3. **Kim YJ a kol.** Primate-specific miR-944 activates p53-dependent tumor suppression in human colorectal cancers. *Cancer Lett* 2018; 27(440-441): 168-179.
4. **Konarikova K a kol.** Effect of Schiff base Cu(II) complexes on signaling pathways in HT-29 cells. *Molecular Medicine Reports* 201; 14(5): 4436-4444.
5. **Nakao Y a kol.** "Copper(II) chelates of Schiff bases derived from salicylaldehyde and various α -amino acids". *Bull. Chem. Soc.* 1967; 40: 1536-1538.
6. **Krätzmár J a kol.** The crystal and molecular structure and properties of diaqua(N-salicylidene-L-glutamato)copper(II) monohydrate. *Zeitschrift für Naturforsch* 1991; 46b, 1323-1327.
7. **Langer V a kol.** Dimeric (isoquinoline)(N-salicylidene-D,L-glutamato)copper(II) ethanol solvate. *Acta Crystallographica* 2009; C65(5): 208-210.
8. **Langer V a kol.** „(N-salicylidene-D,L-glutamato)(2-methylimidazole)copper(II)”. *Acta Cryst* 2004; E60: 129-132.
9. **Langer V a kol.** „X-ray and DFT studies of a mono- and binuclear copper(II) ionic compound containing a Schiff base“. *Acta Cryst* 2012; C68: 326-328.
10. **Schmitt SM a kol.** New applications of old metal-binding drugs in the treatment of human cancer. *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; 4: 375–391.
11. **Kumar V a kol.** Computational Studies on the Inhibitor Selectivity of Human JAMM Deubiquitinylases Rpn11 and CSN5. *Front Chem* 2018; 9 (6): 480.
12. **Chen X a kol.** Inhibition of Proteasomal Deubiquitinase by Silver Complex Induces Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem* 2018; 49(2): 780-797.
13. **Tamayo LV a kol.** Copper(II) complexes with naringenin and hesperetin: cytotoxic activity against A 549 human lung adenocarcinoma cells and investigation on the mode of action. *Biometals* 2016; 29(1): 39-52.
14. **Santoro AM a kol.** Copper(II) ions affect the gating dynamics of the 20S proteasome: a molecular and in cell study. *Sci Rep* 2016; 6: 33444.

ÚČINOK OLEJA Z VLAŠSKÝCH ORECHOV NA AKTIVITU SUPEROXIDDISMUTÁZY MONOCYTOV U937 V HYPERGLYKEMICKÝCH PODMIENKACH

(Effect of walnut oil on activity of superoxide dismutase in monocytes U937 in hyperglycemic conditions)

Lucia Laubertová, Zdeňka Ďuračková, Ingrid Žitňanová

*Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovenská republika,
lucia.laubertova@fmed.uniba.sk*

Súhrn

Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie trpí niektorým z typov diabetes mellitus takmer pol miliardy pacientov na celom svete a ich prevalencia sa stále zvyšuje. Pacienti sú postihnutí najmä komplikáciami, ktoré ochorenie sprevádzajú. Zvýšená tvorba voľných radikálov pri dlhotrvajúcom diabetes mellitus spolupôsobí na vzniku týchto komplikácií, ktoré v konečnom dôsledku znižujú ako kvalitu, tak aj dĺžku života pacienta. V súčasnosti sa skúmajú rôzne alternatívne možnosti liečby a prevencie tohto ochorenia, medzi nimi aj vplyv prírodných polynenasýtených mastných kyselín. V tejto práci sme sledovali vplyv oleja z vlašských orechov na aktivitu superoxiddismutázy (SOD) monocytov U937 v hyperglykemických podmienkach. Testovaný olej z vlašských orechov signifikantne zvýšil aktivitu SOD monocytov po 48h inkubácii s bunkami. Vzhľadom na dlhší inkubačný čas potrebný na aktiváciu SOD sa domnievame sa, že olej z vlašských orechov indukoval zvýšenie expresie génov pre tento enzým.

Kľúčové slová

olej z vlašských orechov, superoxiddismutáza, hyperglykémia, monocyty U 937

Summary

According to the World Health Organization, diabetes mellitus affects almost half a billion patients worldwide and its prevalence is increasing. Patients are affected the most by complications that accompany the disease. Increased production of free radicals in long-term diabetes mellitus causes these complications, which affect the quality of life of patients in a negative way. At present, various ways of alternative treating and preventing this disease, including the effects of natural polyunsaturated fatty acids are being explored. In this study we have examined the effect of walnut oil on activity of superoxide dismutase (SOD) in monocytes U937 in hyperglycemic conditions. Tested walnut oil significantly increased activity of SOD in monocytes after 48h of its incubation with cells. Taking into account longer time if its action, we hypothesize that walnut oil increased gene expression of the enzyme under study.

Keywords

walnut oil, superoxide dismutase, hyperglycemia, monocytes U 937

Úvod

Diabetes mellitus je súbor chronických ochorení, ktorých hlavnou charakteristikou je porušená homeostáza glukózy. Hyperglykémiou indukovaná tvorba voľných radikálov nezahŕňa len samotnú oxidáciu glukózy, ale aj glykáciu proteínov a peroxidáciu lipidov, čo vedie k poškodeniu makromolekúl a narušeniu základných bunkových mechanizmov (1). Proti negatívnemu účinku voľných radikálov má organizmus vybudované ochranné antioxidantné mechanizmy. Superoxiddismutáza (SOD) zohráva dôležitú obrannú úlohu pred pôsobením voľných radikálov na bunkovej ako aj tkanivovej úrovni. Katalytický účinok SOD uľahčuje dismutáciu superoxidových radikálov na kyslík a peroxid vodíka, ktorý je pomocou ďalších antioxidantných enzýmov prevedený na kyslík a vodu (2).

Jedným zo spôsobov, ako chrániť organizmus diabetických pacientov pred vplyvom voľných radikálov je zvýšiť hladinu antioxidantov, ako aj látok, ktoré zvyšujú aktiváciu antioxidantných systémov v organizme. V súčasnosti sa veľká pozornosť venuje nutričným látkam na báze prírodných látok, ktoré by mohli znížiť výskyt diabetických komplikácií vznikajúcich v dôsledku nadmernej tvorby voľných radikálov. Jedným z nutričtov, ktorý by takto mohol zlepšiť život diabetických pacientov je olej z vlašských orechov (WO). Je bohatým zdrojom omega-6 a omega-3 polynenasýtených mastných kyselín a zlúčenín s vysokým obsahom biologicky aktívnych látok ako sú vitamíny, steroly a polyfenoly (3). Taktiež je bohatým zdrojom antioxidantov ako sú kyseliny: elagová, galová, kávová, vanilová a jablčná a mikronutričtov ako je kyselina listová, meď, horčík, jód (4).

Našou úlohou bolo sledovať vplyv oleja z vlašských orechov na aktivitu superoxiddismutázy monocytov inkubovaných v hyperglykemických podmienkach.

Materiál a metódy

Kultivácia buniek

Ľudskú bunkovú líniu monocytov U937 (ATCC, Manassas, VA, USA) sme kultivovali v kompletnom normo- resp. hyperglykemickom kultivačnom médiu RPMI 1640 doplnenom inaktivovaným hovädzím sérom (10% v/v), antibiotikami penicilínom a streptomycínom (1% v/v) v humidifikovanom inkubátore, pri 37°C a 5% CO₂ atmosfére. Viabilita buniek bola sledovaná pomocou 0,4% (w/v) roztoku trypanovej modrej použitím Bürkerovej komôrky. Na sledovanie vplyvu testovaných látok v hyperglykemických podmienkach sme použili kompletne médium doplnené o glukózu na výslednú koncentráciu 35 mmol/l.

Testovaný prírodný olej

Testovaný olej z vlašských orechov (WO) poskytol prof. K.-H. Wagner (Faculty of Life Sciences, University of Vienna, Rakúsko). Olej z vlašských orechov bol riedený pomocou dimetylsulfoxidu (DMSO) na požadované koncentrácie (19,92 - 318,50 µg/ml). Výsledná koncentrácia DMSO v médiu nepresiahla 0,5% (v/v).

Príprava bunkových homogenátov

Z vyrastenej bunkovej línie sme pripravili bunkovú suspenziu, ku ktorej sme pridali testovanú látku a kultivovali 24, 48 a 72h. Po uplynutí požadovaného kultivačného času, sme bunky premyli chladeným PBS a sonifikovali (3x5s on/ 5s off, 4°C). V bunkových homogenátoch sme stanovili koncentráciu proteínov pomocou komerčného kitu a uskladnili pri teplote -78°C.

Stanovenie aktivity superoxiddismutázy (SOD)

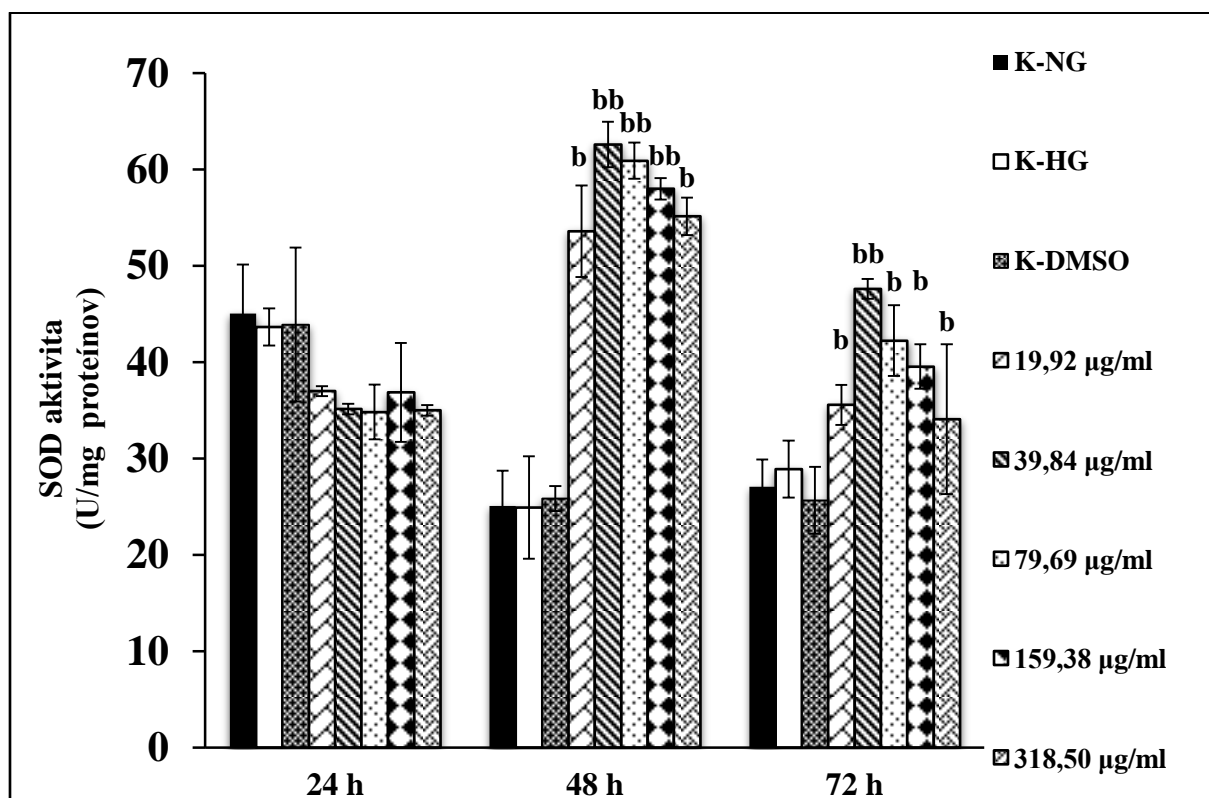
Aktivitu SOD sme stanovili použitím komerčného kitu (Superoxide dismutase determination kit, Sigma, Nemecko). Výsledky sme vyjadrili v U/mg proteínov.

Štatistika

Výsledky sú uvedené ako priemer \pm smerodajná odchýlka (SD) troch nezávislých experimentov. Štatistické testy boli vykonané pomocou štatistického programu IBM SPSS Statistic 22. Údaje boli analyzované pomocou dvojsmernej analýzy rozptylu (two-way ANOVA) s použitím Tuckey post hoc testu. Hladina významnosti bola definovaná ako $P < 0,05$.

Výsledky

Pomocou komerčného kitu sme stanovili aktivitu SOD monocytov U937 ovplyvnených vysokou koncentráciou glukózy, DMSO a rôznymi koncentraciami WO po 24 h, 48 h, a 72 h inkubácii (Obr. 1). Zistili sme, že vysoká koncentrácia glukózy (hyperglykemické podmienky) v porovnaní s kontrolou (normoglykemické podmienky) nemala žiadny vplyv na aktivitu SOD monocytov. Po 24 h inkubácii buniek s WO sme nezaznamenali signifikantné zmeny aktivity SOD buniek. Po 48 h inkubácii sme zistili, že všetky použité koncentrácie WO (19,92 – 318,50 $\mu\text{g/ml}$) signifikantne zvýšili aktivitu SOD. Podobný trend sme zaznamenali po 72 h inkubácie, pričom sa aktivita SOD mierne znížila v porovnaní s aktivitou SOD po 48 h inkubácii pri všetkých použitých koncentráciách. Toto zníženie však nebolo signifikantné.



Obr. 1 Vplyv hyperglykémie a oleja z vlašských orechov (WO) na aktivitu SOD monocytov U937. K-NG – kontrolné bunky v normoglykemických podmienkach, K-HG – kontrolné bunky v hyperglykemických podmienkach, K-DMSO – kontrolné bunky v hyperglykemických podmienkach s DMSO, WO – bunky v hyperglykemických podmienkach s WO (19,92 – 318,50 $\mu\text{g/ml}$). ^b $P < 0,05$; ^{bb} $P \leq 0,01$; - WO v porovnaní s K-DMSO.

Diskusia

Vplyvom hyperglykémie sa na jednej strane zvyšuje množstvo voľných radikálov, na druhej strane sa jej vplyvom zhoršuje endogénny antioxidantný ochranný systém, ktorý zahŕňa enzýmové ako aj neenzýmové mechanizmy (5). V mnohých klinických a experimentálnych štúdiách bolo dokázané, že hyperglykémia spôsobuje zmeny mnohých bunkových parametrov. Abnormálne vysoké hladiny voľných radikálov a súčasne pokles antioxidantných obranných systémov môže spôsobiť zvýšenie oxidačného poškodenia makromolekúl a tým aj poškodenie enzýmov a bunkových organel (6).

Naša práca poukázala na schopnosť oleja z vlašských orechov zvýšiť aktivitu SOD ľudských monocytov, pričom výsledky potvrdzujú a rozširujú výsledky predošlých štúdií. Fukuda a kol. (2003) zistili, že 14 polyfenolov nachádzajúcich sa vo vlašských orechoch má podobnú aktivitu ako superoxidodismutáza (7). My sme zistili signifikantné zvýšenie aktivity SOD až po 48 h inkubácii WO s bunkami. Predpokladáme, že ak by zvýšenie aktivity SOD bolo spôsobené danými polyfenolmi, zaznamenali by sme zvýšenie aktivity už po 24 h inkubácie. Preto sa domnievame, že olej z vlašských orechov indukoval zvýšenie expresie génu pre tento enzým. Vivancos a Moreno (2005) zistili, že prevládajúcim fytosterolom vo vlašských orechoch je β -sitosterol, ktorý indukuje expresiu génu pre antioxidantné enzýmy, ako napríklad gén kódujúci superoxidodismutázu (8). Rovnaký efekt by mohol byť pozorovaný aj v našom experimente. Na základe našich výsledkov sa domnievame, že okrem vlastností klasických antioxidantov priamo vychytávať a eliminovať voľné radikály, má olej z vlašských orechov schopnosť zvyšovať endogénnu antioxidantnú obranu.

Literatúra

1. **Martim AC, Sanders RA, Watkins III JB.** Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A Review. *J Biochem Molecular Toxicology* 2003; 17: 24-38.
2. **Wang C, Li S, Shang DJ, Wang XL, You ZL, Li HB.** Antihyperglycemic and neuroprotective effects of one novel Cu-Zn SOD mimetic. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21 (14): 4320-4324.
3. **Rahimi R, Larihani B, Abdollahi M, Nikfar S.** A review on the role of antioxidants in management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 365-373.
4. **Kaseb F, Rashidi M, Afkhami-Ardekani M, Fallhzadeh H.** Effect of olive, almond and walnut oil on cardiovascular risk factors in type 2 diabetic patients. *Int J Diabetes Dev Ctries* 2013; 33 (2): 115-119.
5. **Maquire LS, O'Sullivan SM, Galvin K, O'Connor TP, O'Brien NM.** Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J Food Sci Nutr* 2004; 55 (3): 171-178.
6. **Sheikh-Ali M, Chehade JM, Mooradian AD.** The antioxidant paradox in diabetes mellitus. *Am J Ther* 2011; 18 (3): 266-278.
7. **Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P, Visiolo F.** Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharm Res* 2008, 57: 451-455.
8. **Fukuda T, Ito H, Yoshida T.** Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* 2003; 63 (7): 795-801.
9. **Vivancos M, Moreno JJ.** beta-Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med* 2005; 39 (1): 91-97.

VZŤAH MEDZI DĹŽKOU DOJČENIA A VÝSKYTOM ALERGIE U SKUPINY DETÍ Z OKRESU MARTIN

(Relation between the breast-feeding duration and the occurrence of the allergy on the group of children from Martin region)

Magdaléna Marčeková¹, Eva Neščáková², Yvetta Mellová¹

¹ Ústav anatómie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Malá Hora 4, 036 05 Martin
e-mail: marcekova@jfmed.uniba.sk

² Katedra antropológie, Prírodovedecká fakulta, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava

Súhrn

Dojčenie predstavuje ideálnu výživu v prvých mesiacoch života. Ovplyvňuje vývoj črevného mikrobiómu a podporuje dozrievanie črevnej bariéry. Materské mlieko obsahuje unikátnu substanciu imunoaktívnych látok, ktoré vytvárajú ideálny imunomodulačný prostriedok. Súčasné teórie podporujú vzťah medzi dĺžkou dojčenia, objavením sa alergie a typom pôrodu. Cieľom našej štúdie bolo zhodnotiť výskyt alergií vzhľadom na dĺžku dojčenia a na spôsob pôrodu. Pretože deti v našej skupine boli narodené väčšinou spontánne, vplyv typu pôrodu na výskyt alergií sa nám nepodarilo potvrdiť, avšak potvrdili sme vplyv dĺžky dojčenia.

Kľúčové slová

sectio caesarea, dojčenie, atopická dermatitída, rhinitis allergica, asthma bronchiale

Summary

Exclusive breast-feeding during the first months after birth is associated with lower asthma rates during childhood. Recent researches support relation between the duration of breast-feeding and occurrence the allergy relative to the mode of delivery.

The conclusions our report do not confirm the relation between the mode of delivery and the appearance of allergy, however they confirm the influence of duration of breast-feeding.

Keywords

caesarean section, duration of breast-feeding, atopy, rhinitis, asthma

Úvod

Alergie sa v súčasnosti zaraďujú medzi civilizačné ochorenia a u detí patria medzi chronické ochorenia. Komplex environmentálnych faktorov pôsobí najvýraznejšie počas perinatálneho vývinu a v skorom perinatálnom období. Exkluzívne dojčenie v priebehu prvých mesiacov po narodení súvisí s nízkym výskytom astmy počas detstva. Tento efekt je spôsobený imunomodulačnou aktivitou materského mlieka, s absenciou alergénov..Dojčenie je veľkou výhodou, špeciálne v rodinách, s dedičnou atopiou (1).

Súbor a metódy

Počas rokov 2007a 2008 sme na novorodeneckom oddelení UNM v Martine začali pravidelné sledovanie 216 novorodencov. 84% detí bolo narodených spontánne a 16% sa narodilo sekciou. Deti sme vyšetřovali pravidelne až do veku 12 mesiacov a hodnotili sme telesný vývin vzhľadom na dĺžku dojčenia.

Po desiatich rokoch sme sa rozhodli skontrolovať telesný vývin a zdravotný stav sledovanej skupiny. Použili sme údaje získané pri pravidelnej kontrole 74 desaťročných detí – 39 chlapcov a 35 dievčat.

Výsledky

Zdravotný stav detí sme hodnotili vzhľadom na pohlavie, typ pôrodu a na dĺžku dojčenia. Spontánne bolo narodených 84% detí, 16% detí sa narodilo sekciou (SC). Všetky sledované deti absolvovali základnú vakcináciu.

Zistili sme, že 59%, z toho 33% chlapcov a 43% dievčat z nášho súboru trpí na rôzne druhy alergií. Najčastejšie sa vyskytovala alergická rinitída (10 dievčat a 9 chlapcov), a atopická dermatitída (7 dievčat a 2 chlapci) 2x astma, 1x intolerancia laktózy a 1x deficit bunkovej imunity. 3 dievčatá majú súčasne atopickú dermatitídu a alergickú rhinitídu, 1 dievča má súčasne atopickú dermatitídu a asthmu. Všetky štyri dievčatá neboli vôbec dojčené. U1 chlapca sa vyskytla súčasne atopická dermatitída a alergická rhinitída. 3 deti z alergikov boli narodené SC.

dojčenie: dievčatá: 0M 6(40%), 3M 2(16%), 6M1(6%),12M 6(40%); chlapci: 1M 2(13%), 6M 4(13%), 12M 8(47%)

Diagnóza	Typ pôrodu		Dĺžka dojčenia				
	spontánny	SC	0M	3M	6M	9M	12M
Atop. Dermatitída	7	0	5	0	0	0	2
Rhinitis alergica	8	2	4	1	1	0	4
Asthma bronchiale	3	1	2	0	0	0	1

Tab. 1 Výskyt alergií vzhľadom na typ pôrodu a dĺžku dojčenia u dievčat

V tabulke 1 vidíme, že väčšina detí sa narodila spontánne a taktiež väčšina dievčat nebola vôbec dojčená.

Diagnóza	Typ pôrodu		Dĺžka dojčenia				
	spontánny	SC	0M	3M	6M	9M	12M
Atop. Dermatitída	2	0	0	0	1	0	1
Rhinitis alergica	9	0	3	1	1	1	3
Asthma bronchiale	2	0	1	0	0	0	1

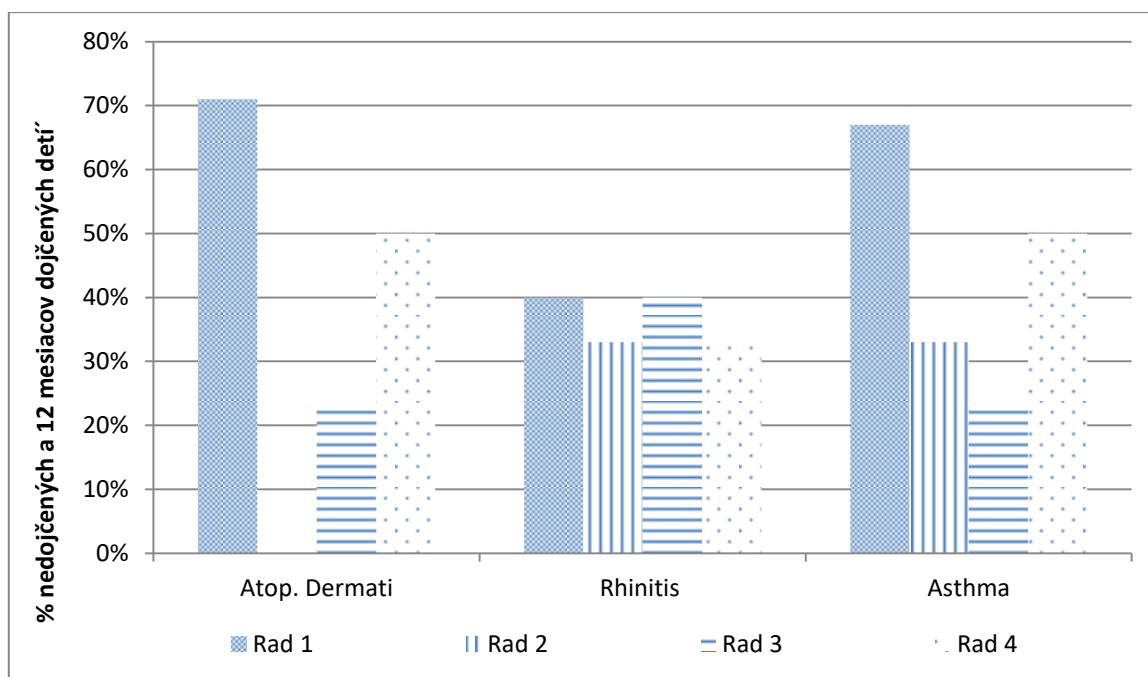
Tab. 2 Výskyt alergií vzhľadom na typ pôrodu a dĺžku dojčenia u chlapcov Chlapci v tabulke 2 boli všetci narodení spontánne, oproti dievčatám nevidno výrazný rozdiel medzi dĺžkou dojčenia pri jednotlivých diagnózach.

Diagnóza	Dĺžka dojčenia 0M		Dĺžka dojčenia 12M	
	dievčatá	chlapci	dievčatá	chlapci
Atop. Dermatitída	71%	0%	23%	50%
Rhinitis alergica	40%	33%	40%	33%
Asthma bronchiale	67%	33%	23%	50%

Tab. 3 Porovnanie chlapcov a dievčat s rovnakou diagnózou vzhľadom na dĺžku dojčenia.

V tabulke 3 sme porovnali nedojčené dievčatá s nedojčenými chlapcami a rovnako 12 mesiacov dojčené dievčatá s chlapcami vzhľadom na jednotlivé diagnózy. Zistili sme, že až 71% nedojčených dievčat trpí atopickou dermatitídou, ale žiadny chlapec. Oproti tomu touto diagnózou trpí až 50% chlapcov dojčených dvanásť mesiacov. Alergickou rinitídou trpí rovnaké množstvo dievčat nedojčených ako aj dojčených 12 mesiacov a rovnako je to i u chlapcov. Astma sa prejavila výrazne u nedojčených dievčat a u 12 mesiacov dojčených chlapcov.

U dievčat sa výrazne prejavil vplyv dĺžky dojčenia, pretože nedojčené dievčatá výrazne vyššie trpia alergickými ochoreniami ako nedojčení chlapci.



Graf 1 Porovnanie chlapcov a dievčat s rovnakou diagnózou vzhľadom na dĺžku dojčenia.

Rad 1= dievčatá nedojčené

Rad 2= chlapci nedojčení

Rad 3= dievčatá dojčené 12 mesiacov

Rad 4= chlapci dojčení 12 mesiacov

U dvoch chlapcov sa prejavil autizmus, v jednom prípade veľmi ťažká neznáma forma. Dieťa bolo narodené sekciou, pochádzalo z dvojčiat a nebolo vôbec dojčené. Ďalší autista bol dojčený 3 mesiace.

U jedného dieťaťa boli zistené poruchy pozornosti, u ďalšieho emočné poruchy. Obezita bola nájdená u dvoch detí, jedno dieťa nebolo vôbec dojčené, druhé bolo dojčené 12 mesiacov. U ďalšieho dieťa sa po treťom roku rast spomalil a badať u neho výraznú hypotrofiu. V jednom prípade dieťa trpí syndrómom lepivých doštičiek.

Diskusia

Ľudské mlieko obsahuje imunologické faktory, ktoré bránia rozvoju alergických ochorení, ako je celiakia, a dokonca aj diabetes 1. typu. Mikrobiálna flóra dojčených detí obsahuje väčší počet bifidobaktérií a oproti tomu mikrobiálna flóra detí kŕmených náhradnou výživou obsahuje väčšie množstvo enterokokov. Predpokladá sa, že tento rozdiel je spôsobený imunologickými podnetmi rôznych živín v materskom mlieku, ako sú rôzne molekuly s antimikrobiálnou aktivitou, a prítomnosťou prebiotík. Štúdia potvrdila tiež jasný súvis medzi vývojom alergie na bielkovinu kravského mlieka (CMPA) a dĺžkou dojčenia. Štatisticky

významný rozdiel bol zistený medzi skupinou s CMPA, ktorá mala priemernú dĺžku dojčenia 2,2 mesiaca a kontrolnou skupinou s priemernou dĺžkou dojčenia 5,9 mesiaca (2). Výskyt alergie na proteíny kravského mlieka v poslednom období vzrastá a súvisí s použitím antibiotík počas gravidity a perinatálneho obdobia, s nezrelosťou plodu – predčasným pôrodom a s predčasným ukončením dojčenia (3).

(4) v metanalýze zistili, že deti narodené sekciou majú zmenenú bakteriálnu črevnú mikroflóru a je u nich zvýšené riziko vzniku astmy. (5) študovali asociáciu medzi sectio caesarea, spôsobom výživy (dojčenie, náhradná výživa) a vznikom alergie na kravské mlieko. Zistili, že dĺžka dojčenia vplýva na vývoj alergie.

American academy of Pediatrics doporučuje exkluzívne dojčenie počas prvých šiestich mesiacov a nepretržité dojčenie minimálne do konca prvého roka života.

V prevencii potravinovej alergie sa neodporúča žiadna diéta tehotných a dojčiacich žien, naopak, takáto diéta oberá matku o dôležité mikronutričné látky. Zaujímavý je fakt, že dojčenie napriek mnohým jednoznačným zdravotným benefítom pre matku a dieťa pravdepodobne nie je v exkluzívnej podobe ochranným faktorom vo vývoji potravinovej alergie. Pre deti, ktoré nemôžu byť dojčené, hydrolyzované formuly sa ukazujú ako protektívne v prevencii alergických ochorení, väčšinou aj tu je však limitácia skôr na vývoj atopickej dermatitídy (6).

Záver

Pred desiatimi rokmi sme sledovali rast a vývin súboru zdravých detí do jedného roka.

Po desiatich rokoch sme sa vrátili ku 74 deťom z tohto súboru a zistil sme, že až 71% nedojčených dievčat trpí atopickou dermatitídou, oproti tomu touto diagnózou trpí až 50% chlapcov dojčených dvanásť mesiacov. Alergickou rinitídou trpí rovnaké množstvo dievčat nedojčených ako aj dojčených 12 mesiacov a rovnako je to i u chlapcov. Astma sa prejavila výrazne u nedojčených dievčat a u 12 mesiacov dojčených chlapcov. Absenciu dojčenia a jej negatívny vplyv na vývoj alergie sme pozorovali hlavne u dievčat.

Dojčenie predstavuje ideálnu výživu v prvých mesiacoch života. Ovplyvňuje vývoj črevného mikrobiómu a podporuje dozrievanie črevnej bariéry. Materské mlieko obsahuje unikátnu substanciu imunoaktívnych látok, ktoré vytvárajú ideálny imunomodulačný prostriedok. Obsah oligosacharidov a ich prebiotický efekt na črevnú flóru, redukuje TH2 bunkovú odpoveď. Imunosupresívna aktivita podporuje vývoj orálnej tolerancie na potravinové a environmentálne alergény. Na správny vývoj orálnej tolerancie výrazne vplýva súčasné dojčenie v čase zavádzania prvých príkrmov. Prolongované výlučné dojčenie, bez zavedenia inej stravy, dlhšie ako 7-9, mesiacov môže byť spojené s nárastom atopickej dermatitídy a iných alergických ochorení. Napriek mnohým jednoznačným zdravotným benefítom pre matku i dieťa, dojčenie v exkluzívnej forme pravdepodobne nie je ochranným faktorom vo vývoji potravinovej alergie.

Literatúra

- 1. Gdalevich M, Mimouni D, Mimouni M.** Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies. *Journal of Pediatrics* 2001; 139 (2): 261
- 2. Palmer C, BIK EM, Di Giulio DB, et al.** Development of the human infant intestinal microbiota. *Plos Biol.* 2007; 5: 177
- 3. Toro Monjarez EM, Ramirez Mayans JA, Cervantes Bustmante R et al.** Perinatal factors associated with the development of cows milk protein allergy. *Revista de gastroenterologica de México* 2015; 80 (1): 27-31

- 4. Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A, et al.** A meta- analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clinical and experimental allergy* 2008; 38 (4): 629 – 633
- 5. Gil F, Amezqueta A, Martínez D, et al.** Assotiation between Caesarean Delivery and Isolated Doses of Formula Feeding in Cow Milk Allergy. *Int.Arch.&allergy Immunol.*2017; 173:147-152
- 6. Abaffyová Z, Rennerová Z, Jeseňák M.** Prevencia alergických ochorení, *Pediatrics (Bratislava)* 2017; 12(51): 9-15

MOLEKULOVÉ ZÁKLADY KOGNITÍVNEJ KREHKOSTI SENIOROV, VPLYV INTERVENCIE (FYZICKÁ AKTIVITA A/ALEBO SUPLEMENTÁCIA OMEGA-3 MASTNÝMI KYSELINAMI)

(Molecular bases of cognitive frailty in seniors, effect of intervention
(physical activity and/or supplementation by omega- 3 fatty acids))

Jana Muchová, Mária Janubová, Ingrid Žitňanová

*Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta Univerzity
Komenského v Bratislave; jana.muchova@fmed.uniba.sk*

Súhrn

Starnutie populácie je závažný demografický a sociálno-ekonomický problém v celej EÚ, ale aj v iných rozvinutých krajinách. Priemerná dĺžka života v Európe je približne 78 rokov a stále rastie. Dôsledkom tejto demografickej zmeny je exponenciálny nárast výskytu chorôb. S tým súvisí aj snaha o zvýšenie priemernej zdravej dĺžky života, čo si kladú za cieľ nielen stratégie EÚ, ale aj Národný program aktívneho starnutia SR na roky 2014-2020 a Implementačná stratégia MZ SR, nakoľko obyvatelia SR dosahujú očakávanú dĺžku zdravého života 52,4/52,1 rokov (M/Ž) v porovnaní s priemerom 62 rokov v EÚ. Hlavnými faktormi, ktoré sa podieľajú na znížení kvality života, zvýšeniu výskytu náhlej smrti, či celkovej úmrtnosti u starších osôb, sú kognitívne poruchy a fyzická krehkosť, resp. sarkopénia ako predchodca fyzickej manifestácie syndrómu krehkosti. Tieto dva procesy sa ukázali byť v epidemiologických štúdiách príbuzné a na základe toho bol v roku 2013 navrhnutý pojem "kognitívna krehkosť" ako heterogénny klinický prejav charakterizovaný súčasnou prítomnosťou fyzickej krehkosti a kognitívnej poruchy. Zároveň ju však charakterizuje potenciál pre reverzibilitu. Kognitívna krehkosť je očakávaným aspektom starnutia, avšak medzi jednotlivcami existujú výrazné rozdiely. Aj keď niektoré z týchto rozdielov sú podmienené fixnými faktormi, môžu byť ovplyvnené modifikovateľnými faktormi, ako je fyzická aktivita a výživa. Lepšie chápanie súvislosti medzi syndrómom krehkosti a kognitívnou poruchou môže pomôcť pri vytváraní stratégií zameraných na ich prevenciu a liečbu.

Kľúčové slová

starnutie, kognitívna krehkosť, intervencia, fyzická aktivita, omega-3 mastné kyseliny

Summary

Aging is a serious demographic and socio-economic problem across the EU, but also in other developed countries. The average life expectancy in Europe is approximately 78 years and is still growing. As a result of this demographic change, there is an exponential increase in disease incidence. This is also related to the effort to increase the average healthy life expectancy, which is aimed not only at the EU strategy, but also in the National Program of

Active Aging of the Slovak Republic for 2014-2020 and in the Implementation Strategy of the Ministry of Health, as the Slovak population achieves the expected life expectancy 52.4 / 52.1 years (M / F) compared to an average of 62 years in the EU.

The main factors contributing to a decrease in quality of life in the elderly are cognitive impairment and physical frailty or sarcopenia as a precursor to physical manifestation of frailty syndrome. These two processes have been shown to be related in epidemiological studies and, in 2013, the term "cognitive frailty" has been proposed as a heterogeneous clinical manifestation characterized by the simultaneous presence of physical frailty and cognitive impairment. At the same time, however, it has the potential for reversibility. Cognitive frailty is the expected aspect of aging, but there are significant differences between individuals. Although some of these differences are conditioned by fixed factors, they can also be affected by modifiable factors such as physical activity and nutrition. A better understanding of the link between frailty syndrome and cognitive impairment can help to develop strategies for their prevention and treatment.

Keywords

senescence, cognitive frailty, intervention, physical activity, omega-3 fatty acids

Starnutie populácie je závažný demografický a socio-ekonomický problém v celej EÚ ale i v iných rozvinutých krajinách. Priemerná dĺžka života v Európe je približne 78 rokov (74 rokov u mužov a 81 rokov u žien) (1). Okrem toho sa predpokladá, že počet ľudí vo veku viac ako 85 rokov stúpne na 19 miliónov do roku 2020 a na 40 miliónov do roku 2050 (2). Dôsledkom tejto demografickej zmeny je exponenciálny nárast výskytu chorôb.

Preto hľadanie preventívnych stratégií na zníženie výskytu chronických ochorení by mohlo byť najväčšou zdravotnou výzvou 21. storočia. S tým súvisí aj zvýšenie priemernej zdravej dĺžky života, čo si kladú za cieľ nielen stratégie EÚ, ale aj Národný program aktívneho starnutia SR na roky 2014-2020 aj Implementačná stratégia MZ SR, nakoľko obyvatelia SR dosahujú očakávaná dĺžku zdravého života 52,4/52,1 rokov (M/Ž) v porovnaní s priemerom 62 rokov v EÚ.

Starnutie je na úrovni celého organizmu charakterizované súborom rôznych degeneratívnych procesov, ktoré prirodzene prebiehajú v živých organizmoch, pričom negatívne ovplyvňujú ich funkčnosť, čím zvyšujú riziko rozvoja chronických ochorení až predčasnú smrť. Počas života sa v organizme akumulujú poškodenia na úrovni molekulových, bunkových a tkanivových štruktúr. Rozsah poškodení spôsobených starnutím a rýchlosť, akou sa v organizme tvoria, je podmienená genetickými mechanizmami a taktiež biochemickými procesmi.

Hlavnými prispievateľmi k strate kvality života, zvýšeniu výskytu náhlej smrti, či celkovej úmrtnosti u starších osôb sú kognitívne poruchy a fyzická krehkosť, resp. predchodca fyzickej manifestácie syndrómu krehkosti - sarkopénia.

Tieto dva procesy sa ukázali byť v epidemiologických štúdiách príbuzné, avšak ich patofyziologické mechanizmy sa zvyčajne skúmali oddelene ako nezávislé procesy. Avšak nedávne štúdie a výsledky 3- a 12-ročných kohortov spochybnili tradičný pohľad a potvrdili medzi nimi úzky vzájomný vzťah (3). Na základe týchto výsledkov bol v roku 2013 navrhnutý pojem "*kognitívna krehkosť*" ako heterogénny klinický prejav charakterizovaný súčasnou prítomnosťou fyzickej krehkosti a kognitívnej poruchy (4). Kognitívna krehkosť môže predstavovať predchodcu neurodegeneratívnych procesov. Zároveň ju však charakterizuje potenciál pre reverzibilitu. Diagnostické kritériá pre tento klinický prejav navrhli Panza et al. (5).

Kognitívna krehkosť je očakávaným aspektom starnutia, avšak medzi jednotlivcami existujú výrazné rozdiely. Aj keď niektoré z týchto rozdielov sú podmienené fixnými faktormi

(pohlavie, dedičnosť) môžu byť ovplyvnené aj životným štýlom, a teda modifikovateľnými faktormi, ako je fyzická aktivita a výživa (6). Získanie lepšieho pochopenia súvislosti medzi syndrómom krehkosti a kognitívnou poruchou môže pomôcť pri vytváraní stratégií zameraných na prevenciu a liečbu).

Mierne kognitívne poruchy sú bežným javom u starších ľudí. Sú charakterizované zhoršením pamäti, pozornosti a kognitívnej funkcie, ktorá je nad rámec toho, čo sa očakáva na základe vekovej a vzdelanostnej úrovne.

V mnohých randomizovaných klinických štúdiách sa hodnotil účinok fyzickej aktivity na prevenciu kognitívnych porúch (7-10), ako aj na mentálnu výkonnosť, odolnosť voči stresu a v terapii depresie. Pravidelné cvičenie má potenciál zlepšiť funkciu mozgu a predchádzať kognitívnemu úpadku prostredníctvom niekoľkých ciest vrátane regulácie rôznych rastových a neurotrofných faktorov: (inzulín-like growth factor-1 (IGF-1)]; mozgový rastový faktor (BDNF)] a / alebo modulácie systémového zápalu (11). Zároveň zlepšuje mentálne schopnosti (12). Pohyb taktiež predstavuje účinný prostriedok prevencie neurodegeneratívnych ochorení mozgu.

Starnutie kostrového svalstva alebo sarkopénia sa prejavuje úbytkom svalovej hmoty (13). Ak tento úbytok presiahne kritickú hranicu, dochádza k narušeniu funkčnosti pohybového aparátu - k poklesu fyzickej výkonnosti a sily, poklesu vytrvalosti a schopnosti udržiavať rovnováhu (14), čo má veľký vplyv na kvalitu života starších ľudí. Avšak komplexná etiológia a základné biochemické a molekulárne mechanizmy zostávajú stále nejasné (13). Nedávne dôkazy naznačujú, že počas starnutia dochádza ku iniciácii a progresii svalovej atrofie účinkom rôznych vnútorných faktorov (zníženie syntézy proteínov, zmeny v hormonálnej regulácii, zmeny funkčnosti CNS a nervovej stimulácie, oxidačný stres, mitochondriálna dysfunkcia a chronický zápal) (13, 15), ako aj vonkajších faktorov (malnutrícia, sedavý spôsob života, poranenia, ochorenia). Jednou z najdôležitejších výziev v oblasti verejného zdravia je preto nájsť možnosti na zachovanie svalovej hmoty a s tým súvisiacich fyzických funkcií u starších ľudí (16).

Fyzická nečinnosť je jednoznačne spojená so stratami svalovej hmoty a sily, čo naznačuje, že pravidelné stimulovanie svalstva prostredníctvom cvičenia (najmä progresívny rezistentný tréning) by malo mať ochranné účinky (17).

Intervencia fyzickou aktivitou: Prospešný účinok fyzickej aktivity na syndróm krehkosti sa považuje za sľubnú intervenciu aj napriek malému počtu randomizovaných štúdií (18-20). Okrem zlepšenia fyzickej výkonnosti, zvýšenia svalovej sily a rozvoja svalovej hmoty dochádza k aktivácii antioxidantných aj protizápalových mechanizmov (21). Niektoré práce poukazujú na to, že záťažové cvičenie (22) alebo kombinované aeróbne a záťažové cvičenie (23) by mohlo byť najvhodnejšou stratégiou pri liečbe sarkopénie.

Zároveň sa objavujú prvé práce, ktorých cieľom bolo zistiť, či fyzická aktivita môže znížiť kognitívnu krehkosť. Liu et al. (3) zistili, že 24-mesačný štruktúrovaný, stredne intenzívny program fyzickej aktivity znížil kognitívnu krehkosť v porovnaní so zdravotným vzdelávacím programom u sedavých starších osôb. Ich zistenia naznačujú, že kognitívnu krehkosť je možné modifikovať a táto modifikácia môže podporiť zdravé starnutie.

Výživová intervencia: Zároveň existuje stále viac dôkazov, ktoré spájajú fyzickú krehkosť a kognitívny úpadok s nevhodnou stravou (nedostatočným príjmom bielkovín, vitamínu D, antioxidantov a omega-3 polynenasýtených mastných kyselín s dlhým reťazcom). Taktiež nízky príjem potravy a monotónna strava sú bežné v staršom veku a spôsobujú nedostatočný príjem živín. Intervencie na dosiahnutie zlepšenia stravovacích návykov seniorov môžu mať potenciál predchádzať alebo oddialiť oba procesy. Účinnosť výživovej intervencie (zmena stravovacích návykov, doplnky výživy) pri prevencii nástupu kognitívnych porúch a demencie sumarizuje Solfrizzi et al. (24). Viaceré štúdie potvrdili pozitívny vplyv výživovej intervencie na špecifické kognitívne domény aj kognitívne krvné biomarkery.

Kombinovaná intervencia: Účinok suplementácie výživovými doplnkami jednotlivo (vitamín D, keratín, aminokyseliny a proteíny) a v kombinácii s cvičením na sarkopéniu (predchodca fyzickej manifestácie syndrómu krehkosti) sumarizovali Denison et al. (25). Výsledky sumarizovaných štúdií boli nekonzistentné, avšak v niektorých z nich sa potvrdil prospešný účinok cvičenia v kombinácii s diétnymi stratégiami. Účinok multidoménovej intervencie (kognitívna stimulácia, telesná aktivita a výživa) a omega-3 polynenasýtených mastných kyselín (omega-3 PNML) sledovali Tabue-Teguo et al. (26) a aj keď nezaznamenali významný vplyv na zmeny kognitívnych funkcií u starších dospelých s pamäťovými ťažkosťami, tento prístup naznačuje určitý potenciál a sú potrebné ďalšie štúdie. Účinok *kombinovanej intervencie* (fyzická aktivita a výživová intervencia s omega-3 PNML) na kognitívnu krehkosť však ešte nebol sledovaný.

Významnú úlohu procese starnutia zohráva aj starnutie buniek, tzv. bunková senescencia. Senescencia je ireverzibilné zastavenie bunkového cyklu sprevádzané zmenami v bunkovej morfológii a fyziológii. Senescencia je odpoveď bunky na skracovanie telomér (tzv. replikatívna senescencia) (27) a na rôzne formy stresu (28).

Senescentné bunky exprimujú β -galaktozidázu asociovanú so senescenciou (SA- β -gal), negatívne regulátory bunkového cyklu ako je p21, p16 a p53, obsahujú zvýšené množstvo reaktívnych foriem kyslíka a majú zväčšený tvar a jadro. Významným znakom senescentných buniek je produkcia veľkého množstva sekreovaných proteínov, medzi ktorými sú cytokíny (Il-1 α , Il-1 β , Il-6, Il-8), chemokíny (MCPs, GRO α) a proteínázy degradujúce medzibunkovú hmotu (matrixové metaloproteinázy - MMP) (27, 29) Syntéza týchto proteínov je známa aj ako sekrečný fenotyp asociovaný so senescenciou (SASP – senescence associated secretory phenotype) (30). Predpokladá sa, že práve SASP sa vo významnej miere podieľa na negatívnych účinkoch senescentných buniek na organizmus (27). Komponenty SASP môžu indukovať senescenciu v susedných bunkách (31), degradovať kolagén, elastín a iné komponenty medzibunkovej hmoty, a v konečnom dôsledku prispievať k rozvoju chronického zápalu a ochorení spojených so starnutím (32).

Senescentné bunky sa akumulujú v rôznych tkanivách a orgánoch so zvyšujúcim sa vekom jedinca a tiež sa nachádzajú v tkanivách a orgánoch postihnutých chorobami spojenými so starnutím ako je ateroskleróza, artritída a Alzheimerova choroba (33).

Experimenty na myšiach, ktoré sledovali vplyv eliminácie senescentných buniek (buniek, ktoré exprimovali gén p16/INK4a) z organizmu, viedli k potlačeniu poklesu fyziologických funkcií a tumorigenézy, k oddialeniu nástupu chorôb spojených so starnutím alebo zlepšeniu ich progresie a k predĺženiu celkovej dĺžky života (34). Hľadanie efektívneho spôsobu na odstránenie senescentných buniek z organizmu a/alebo spomalenie ich tvorby je preto dôležitým smerom výskumu.

Pod'akovanie

Projekt EÚ, programu spolupráce Interreg V-A SK-AT, V014.

Literatúra

- 1. Statista: The Statistics Portal**, 2013; Available at: <https://www.statista.com/statistics/274514/life-expectancy-in-europe/>
- 2. World Health Organisation Europe: Demographic Trends, Statistics and Data on Ageing**, 2015; Available at: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/Life-stages/healthyageing/data-and-statistics/demographic-trends-statisticsand-data-on-ageing>
- 3. Liu Z, Hsu FCh, Trombetti A et al.** Effect of 24-month physical activity on cognitive frailty and the role of inflammation: the LIFE randomized clinical trial. *BMC Medicine*. 2018; 16:185

4. **Kelaiditi E, Cesari M, Canevelli M et al.** Cognitive frailty: rational and definition from an (I.A.N.A./I.A.G.G.) international consensus group. *J Nutr Health Aging*. 2013; 17(9):726–34
5. **Panza F, Seripa D, Solfrizzi V et al.** Targeting cognitive frailty: clinical and neurobiological roadmap for a single complex phenotype. *J Alzheimers Dis*. 2015; 47:793–813
6. **Montero-Fernández N, Serra-Rexach JA.** Role of exercise on sarcopenia in the elderly. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2013; 49(1):131–143
7. **Saez de Asteasu ML, Martínez-Velilla N, Zambom-Ferraresi F et al.** Role of physical exercise on cognitive function in healthy older adults: a systematic review of randomized clinical trials. *Ageing Res Rev*. 2017; 37:117–34
8. **Sink KM, Espeland MA, Castro CM et al.** Effect of a 24-month physical activity intervention vs health education on cognitive outcomes in sedentary older adults: the LIFE Randomized Trial. *JAMA*. 2015; 314:781–90
9. **Williamson JD, Espeland M, Kritchevsky SB et al.** Changes in cognitive function in a randomized trial of physical activity: results of the lifestyle interventions and independence for elders pilot study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009; 64:688–94
10. **Brasure M, Desai P, Davila H et al.** Physical activity interventions in preventing cognitive decline and Alzheimer-type dementia: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2018; 168:30–8
11. **Yang JL, Lin YT, Chuang PC et al.** BDNF and exercise enhance neuronal DNA repair by stimulating CREB-mediated production of apurinic/apyrimidinic endonuclease. *NeuroMolecular Med*. 2014; 16 (1), 161–174
12. **Szuhany KL, Bugatti M, Otto MW.** A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. *J Psych Res*. 2015; 60: 56–64
13. **Sakellariou GK, Pearson T, Lightfoot AP et al.** Mitochondrial ROS regulate oxidative damage and mitophagy but not age-related muscle fiber atrophy. *Sci Rep*. 2016; 29 (6), 33944
14. **Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B.** Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology. *Nutrients*. 2016, 8, 338
15. **Tromm CB, Pozzi BG, Paganini CS, et al.** Aerobic and strength training induce changes in oxidative stress parameters and elicit modifications of various cellular components in skeletal muscle of aged rats. *Aging Clin Exp Res*. 2016; 28 (5), 833–841
16. **Vinod KA, Selby DR, Rekha PP, et al.** Age-related differences in the dose–response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *J Physiol*. 2009; 587 (1), 211–217
17. **Kobayashi Y, Somoto Y, Mitsuyama E, et al.** Supplementation of protein-free diet with whey protein hydrolysates prevents skeletal muscle mass loss in rats. *J Nutr & Intermed Metab*. 2016; 4:1–5
18. **Cesari M, Vellas B, Hsu FC, et al.** A physical activity intervention to treat the frailty syndrome in older persons—results from the LIFE-P study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015; 70:216–22
19. **de Labra C, Guimaraes-Pinheiro C, Maseda A, et al.** Effects of physical exercise interventions in frail older adults: a systematic review of randomized controlled trials. *BMC Geriatr*. 2015; 15:154
20. **Trombetti A, Hars M, Hsu FC, et al.** Effect of physical activity on frailty: secondary analysis of a randomized controlled trial. *Ann Intern Med*. 2018; 168:309–16.
21. **Vilela TC, Efftingb PS, Pedrosob GS, et al.** Changes in Predictive Task Switching with Age and with Cognitive Load *Exp Geront*. 2018; 106 21–27
22. **Otsuka A, Nomura T, Rerknimitr P, et al.** The interplay between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Rev*. 2017; 278(1):246–262

23. **Xia Z, Cholewa JM, Zhao Y, et al.** A potential strategy for counteracting age-related sarcopenia: preliminary evidence of combined exercise training and leucine supplementation. *Food Funct.* 2017; 8 (12), 4528–4538
24. **Solfrizzi V, Agosti P, Lozupone M, et al.** Nutritional Interventions and Cognitive-related Outcomes in Patients with Late-life Cognitive Disorders: A Systematic Review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018; S0149-7634(18)30507–4
25. **Denison HJ, Cooper C, Syaer AA, et al.** Prevention and optimal management of sarcopenia: a review of combined exercise and nutrition interventions to improve muscle outcomes in older people. *Clin Interv Aging.* 2015; 10 859–869
26. **Tabue-Teguo M, Berreto de Souza P, Cantet C, et al.** Effect of Multidomain Intervention, Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Supplementation or their Combination on Cognitive Function in Non-Demented Older Adults According to Frail Status: Results from the MAPT Study. *J Nutr Health Aging.* 2018; 22(8):923–927.
27. **Tominaga K,** The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology. *Pathobiol Aging Age-Relat Dis.* 2015; DOI: 10.3402/pba.v5.27743
28. **Hein N, Sanij E, Quin J, et al.** The Nucleolus and Ribosomal Genes in Aging and Senescence. *InTech.* 2012; 172–208
29. **Narita M, Young AR, Arakawa S, et al.** Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science.* 2011; 332, 966–970
30. **Campisi J and d’Adda di Fagagna F,** Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(9), 729–740
31. **Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al.** A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013; 15, 978–990
32. **van Deursen J M,** Nature, The role of senescent cells in ageing. 2014; 509, 439–446
33. **Naylor RM, Baker D J and van Deursen JM,** Senescent Cells: A Novel Therapeutic Target for Aging and Age-Related Diseases. *Clin Pharmacol Ther.* 2013; 93, 105–116
34. **Baker D J, Childs B G, Durik M, et al.** Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.* 2016; 530, 184–189

VPLYV PROBIOTÍK NA LIPIDOVÝ METABOLIZMUS

(The effect of probiotics on lipid metabolism)

Zuzana Paduchová

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska Fakulta UK, Sasinkova 2, 81372 Bratislava, zuzana.paduchova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Ľudský tráviaci trakt obsahuje črevné baktérie, ktoré majú pre svojho hostiteľa významné prospešné účinky, ktoré modulujú lipidovú a glukózovú homeostázu. Abnormálne alebo patologické zmeny črevnej mikrobioty zvyšujú riziko vzniku metabolických porúch (diabetes, dyslipidémia, hypertenzia, obezita) a iných ochorení. Modulovanie črevnej mikrobioty je preto veľmi dôležité pre zachovanie alebo zlepšenie zdravotného stavu hostiteľa. Probiotiká vykazujú hypocholesterolemické účinky na rôznych úrovniach, ktorých mechanizmy sú v práci popísané. Používanie probiotík ako nutraceutík s hypocholesterolemickým účinkom, môže byť dobrou alternatívou prevencie kardiovaskulárnych ochorení. Tieto účinky závisia od formy podaného probiotika, dávky a dĺžky podávania, od počtu kmeňov v podávaných výrobkoch. V literatúre sa stretáme s kontroverznými výsledkami ohľadom hypocholesterolemického účinku probiotík, avšak väčšina prác deklaruje vplyv probiotík na hladiny celkového a LDL cholesterolu. Pre potvrdenie prospešnej hypocholesterolemickkej úlohy probiotík na zlepšovanie kardiovaskulárneho zdravia sú potrebné ďalšie štúdie, ktoré by prispeli k pochopeniu ich účinku u rôznych patologických stavov.

Kľúčové slová

mikrobiota, mikróflóra, probiotiká, lipidy, kardiovaskulárne ochorenia, obezita

Summary

The human digestive tract contains intestinal bacteria that have significant beneficial effects for their host including modulation of lipid and glucose homeostasis. Abnormal or pathological changes in intestinal microbiota increase the risk of metabolic disorders, such as diabetes, dyslipidaemia, hypertension and obesity, and other diseases. Modulation of intestinal microbiota is therefore very important for maintaining or improving the health of the host. Probiotics show hypocholesterolemic effects at various levels by mechanisms described in this work. Using probiotics as nutraceuticals with hypocholesterolemic action may be a good alternative to the prevention of cardiovascular disease. These effects depend on the form of administered probiotics, the dose and duration of administration, the number of strains in the products administered. In the literature, we are confronted with controversial results regarding the hypocholesterolemic effect of probiotics, but most papers declare the effect of probiotics on total and LDL cholesterol levels. To confirm the beneficial hypocholesterolemic role of probiotics to improve cardiovascular health, further studies are needed to understand their effect under various pathological conditions.

Keywords

microbiota, microflora, probiotics, lipids, cardiovascular diseases, obesity

Úloha črevnej mikroflóry (mikrobioty)

Ľudský gastrointestinálny trakt (GIT) je kolonizovaný komplexným ekosystémom baktérií, ktoré sú nielen komenzálne, ale podliehajú spolu s ich hositeľom aj synergickému vývoju (1). Črevnú mikrobiotu tvoria hlavne baktérie patriace do rodov *Firmicutes* a *Bacteroidetes* (2). Prospešné črevné baktérie majú veľa dôležitých funkcií, ako napríklad to, že produkujú pre svojho hositeľa rôzne živiny (organické kyseliny, aminokyseliny, B vitamíny), zabraňujú infekciám vyvolaným črevnými patogénmi a modulujú normálnu imunologickú odpoveď (1). Črevná mikrobiota fermentuje živiny, vylučuje bioaktívne látky zodpovedné za kontrolu črevnej bariéry a endokrinných funkcií, a tiež ovplyvňuje metabolizmus buniek v iných orgánoch, ako sú napr. pečeň a tukové tkanivo, a tým moduluje lipidovú a glukózovú homeostázu (3).

Abnormálne alebo patologické zmeny črevnej mikrobioty menia permeabilitu čriev, zvyšujú metabolickú endotoxémiu a zvyšujú riziko vzniku metabolických porúch, ako je napríklad obezita a diabetes (4,5,6). Obezitu často sprevádza chronický zápal nízkeho stupňa v čreve, v kombinácii so zmeneným zložením črevnej mikroflóry (7), pričom u obéznych jedincov prevláda kmeňová forma *Firmicute*, zatiaľ čo črevná mikrobiota chudého jedinca vykazuje zvýšené množstvo kmeňa *Bacteroidetes* (8). Preto pre zlepšenie zdravotného stavu hositeľa je potrebné črevnú mikroflóru modifikovať s cieľom dosiahnuť, obnoviť a zachovať priaznivú rovnováhu ekosystému a činnosti mikroorganizmov prítomných v GITe (1). Bolo dokázané, že výživa patrí k primárnym faktorom ovplyvňujúcim štruktúru mikroflóry (9).

Probiotiká

Súčasťou pravidelnej stravy človeka sú aj probiotiká, ktoré prijímame v rôznych formách a dávkach, a tak môžeme pozitívne prispieť k zdraviu jedinca (10,11). Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie pre výživu a poľnohospodárstvo (FAO/WHO) sú probiotiká definované ako "živé organizmy, ktoré pri podávaní v primeraných množstvách poskytujú hositeľovi zdravotný prospech" (12). Probiotiká majú mnoho pozitívnych účinkov na ľudské zdravie, ako napr. hypocholesterolemický účinok tým, že regulujú transport a metabolizmus cholesterolu (13,14), znižujú cholesterol lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL), zlepšujú pomer LDL/HDL, taktiež znižujú krvný tlak, hladiny zápalových mediátorov, hladiny glukózy v krvi a index telesnej hmotnosti (15). Bolo preukázané, že podávanie probiotík vo forme fermentovaných mliečnych výrobkov alebo jogurtov bolo účinnejšie pri znižovaní celkového a LDL cholesterolu v porovnaní s probiotikami podávanými v kapsulách. Avšak kapsuly s viacerými probiotickými kmeňmi vykazovali podobné vlastnosti ako fermentované výrobky, na rozdiel od kapsúl obsahujúcich jeden probiotický kmeň (16). Okrem bezpečnosti, funkčnosti a životaschopnosti probiotických kmeňov (17,18) je dostatočný príjem probiotík ďalším kľúčovým faktorom na zabezpečenie jeho účinnosti na ľudské zdravie. Hoci informácie o minimálnych účinných koncentráciách sú stále obmedzené a kontroverzné, všeobecne sa uznáva, že probiotické produkty by sa mali konzumovať v minimálnej koncentrácii 10^6 kolóniu formujúcich jednotiek (cfu) na ml alebo gram, v celkovej dávke 10^8 až 10^9 probiotických mikroorganizmov na deň, najmenej po dobu 8 týždňov, aby mali optimálny priaznivý vplyv na spotrebiteľa (16,19).

Okrem pozitívneho vplyvu probiotík na črevný systém bolo dokázané, že spomaľujú progresiu príznakov ochorenia HIV u infikovaných osôb, pozitívne vplyvajú na vulvovaginálnu kandidózu u žien (20), rakovinu (21,22,23), vysoký cholesterol v sére (24) a prejavy alergie (25). Vplyvy podávania probiotík na rôzne patologické stavy je zhrnutý v práci Rondanelli (26). Štúdie sa zameriavali na pacientov so špecifickými ochoreniami, ako

sú metabolické poruchy (diabetes, dyslipidémia, hypertenzia, obezita), gastrointestinálne poruchy (zápalové ochorenie čriev, zápcha, hnačka spojená s antibiotikami, sekundárna hnačka po eradikácii *Clostridium difficile*, *Helicobacter Pylori*, chemoterapii), atopické ochorenia (atopický syndróm a hypersenzitivita na potraviny, alergická rinitída), ochorenia pečene (cirhóza, nealkoholické tukové ochorenie pečene, hepatálna encefalopatia), pankreatické ochorenia (akútna pankreatitída), infekcie dýchacieho traktu a močových ciest, periodontitídu a depresívnu poruchu (26). V tabuľke 1 však uvádzam výsledky štúdií z metaanalýz a prehľadových prác zaoberajúce sa len vplyvom konzumácie probiotík na metabolické ochorenia.

Ochorenie	Hlavný výsledok výskumu
<i>Metabolické ochorenia</i>	
Diabetes 2.typu	Redukcia hladín glukózy a glykovaného hemoglobínu Nebol dokázaný vplyv na hladinu inzulínu
Dislipidémia	Redukcia hladín celkového cholesterolu a LDL cholesterolu Nebol dokázaný vplyv na zvyšovanie hladiny HDL cholesterolu
Hypertenzia	Zlepšenie systolického aj diastolického krvného tlaku, najmä ak sú ich bazálne hodnoty vysoké ($\geq 130/85$ mmHg) Doba podávania najmenej 8 týždňov, viac-kmeňové probiotické produkty v dennej dávke $\geq 10^{11}$ kolóniu formujúcich jednotiek (cfu)
Nadváha a obezita	Rozporuplné účinky na zmenu telesnej hmotnosti

Tab. 1 Účinky probiotík na metabolické ochorenia.

Probiotiká a hypocholesterolemický účinok

Súčasný spôsob stravovania a sedavý spôsob života má negatívny vplyv na hladiny lipidov v krvi, hlavne celkového a LDL cholesterolu, a s tým spojené zvýšené riziko rozvoja kardiovaskulárnych ochorení (KVO). KVO sú jednou z hlavných príčin úmrtí u dospelých v západnom svete (23,27). Avšak ak znížime celkový cholesterol alebo LDL cholesterol o 1% prejaví sa to znížením rizika ochorenia srdca o 2%, resp. 1% (28). Početné štúdie ukázali, že probiotiká sú schopné ovplyvniť KVO prostredníctvom zmeny zloženia črevnej mikrofóry, reguláciou inzulínovej signalizácie a tiež znížením hladín cholesterolu (29). Používanie probiotík ako nutraceutík s hypocholesterolemickým účinkom, môže byť dobrou alternatívou prevencie KVO (16).

V súčasnosti je známych niekoľko mechanizmov, ktorými môžu probiotiká znižovať hladiny cholesterolu v krvi. Medzi tieto mechanizmy patria:

1. Tvorba mastných kyselín s krátkym reťazcom (acetát, propionát a butyrát) z oligosacharidov pochádzajúcich zo stravy, ktoré blokujú syntézu pečeneového cholesterolu a/alebo presmerujú plazmatický cholesterol do pečene.
2. Asimilácia a inkorporácia cholesterolu do bunkových membrán probiotík, čím sa znižuje absorpcia cholesterolu v krvi. Začlenenie cholesterolu do bunkovej membrány prináša prospech bakteriálnemu kmeňu zvýšením jeho membránovej sily a následne vedie k vyššej bunkovej rezistencii voči lýze.
3. Enzymatická dekonjugácia žľových kyselín prostredníctvom hydrolázy solí žľových kyselín (BSH). Žľ je tvorená cholesterolom, fosfolipidmi, konjugovanými žľovými kyselinami, žľovými pigmentmi a elektrolytmi. Probiotiká znižujú hladinu cholesterolu dekonjugovaním solí žľových kyselín, čím spôsobujú ich nižšiu rozpustnosť a absorpciu v črevách, čo vedie k ich eliminácii vo výkaloch. Cholesterol sa potom používa na syntézu nových žľových kyselín, čo vedie k zníženiu hladiny sérového cholesterolu v krvi.

4. Schopnosť viazať cholesterol v tenkom čreve, pričom táto schopnosť je rastovo a druho špecifická. Bolo dokázané, že určité probiotické kmene sú schopné odstrániť cholesterol z laboratórneho média prostredníctvom väzby na bunkový povrch.

5. Premena cholesterolu na koprostanol za katalytického pôsobenia cholesterol hydrolázy/izomerázy produkovanej probiotickými baktériami, cez medziprodukt cholest-4-én-3-ón. Koprostanol sa potom priamo vylučuje vo výkaloch, čo vedie k zníženiu množstva cholesterolu.

6. Zníženie hladiny celkového cholesterolu cez znižovanie esterov cholesterolu v LDL časticiach a zvýšenie koncentrácie triacylglycerolov (TAG). Častice LDL obohatené o TAG sú náchylnejšie na hydrolýzu a strata esterov cholesterolu znižuje hustotu LDL častíc, čo vedie k ich rýchlejšiemu odbúraniu z krvi v porovnaní s väčšími časticami LDL (27,30,31).

Významné účinky probiotík na zníženie celkového a LDL cholesterolu závisia od formy podaného probiotika, dávky a dĺžky podávania a počtu kmeňov v podávaných výrobkoch. V literatúre sa stretáme s kontroverznými výsledkami ohľadom hypocholesterolemického účinku probiotík. V randomizovanej, placebom kontrolovanej štúdií preukázali kapsuly s obsahom *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) NCIMB 30242 hypocholesterolemický efekt na celkový a LDL cholesterol, zatiaľ čo hladiny TAG a HDL cholesterolu ostali nezmenené (32). Fermentované mlieko s obsahom *L. helveticus* (jogurt Cardi04) nemalo vplyv na hladiny TAG, celkového, LDL a HDL cholesterolu v sére u pacientov s Diabetes mellitus 2. typu (33). Metaanalýza randomizovaných a kontrolovaných štúdií preukázala, že probiotiká (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *L. plantarum*, *L. helveticus* alebo *Enterococcus faecium* podané v mlieku, jogurte/syroch, alebo kapsulách/nápojoch) znížili celkový a LDL cholesterol v porovnaní s kontrolou. Avšak autori nepreukázali žiadny účinok probiotík na HDL cholesterol alebo TAG (34). Bolo dokázané, že kombinácia *L. acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum* znížila celkové hladiny LDL a HDL cholesterolu v sére u hypercholesterolemických pacientov, ale nemali žiadny vplyv na hladiny TAG (35). Probiotický kmeň *L. gasseri* BNR17 (izolovaný z ľudského materského mlieka) nemal vplyv na lipidové parametre u obéznych subjektov (36). Nedávna práca však dokázala, že probiotiká majú schopnosť znížiť hladinu cholesterolu v krvi a znížiť riziko výskytu koronárnej choroby srdca, hypertenzie, aterosklerózy, srdcového infarktu a mŕtvice takmer o polovicu (31).

Záver

Pre potvrdenie prospešnej hypocholesterolemickú úlohu probiotík na zlepšovanie kardiovaskulárneho zdravia sú potrebné rozsiahlejšie štúdie, ktoré by prispeli k pochopeniu mechanizmov u rôznych patologických stavov. Nepredpokladá sa, že každý z probiotických kmeňov vykazuje všetky hypocholesterolemické účinky súčasne. Dôležitú úlohu pri pôsobení probiotík zohrávajú vlastnosti špecifické pre daný druh a kmeň, dávku a dĺžku podávania. Použitie kombinácie probiotík kmeňov demonštrujúcich rôzne mechanizmy hypocholesterolemického účinku nám môžu poskytnúť zvýšenú ochranu.

Literatúra

1. **Markowiak P, Śliżewska K.** Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* 2017;9(9):E1021.
2. **Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al.** Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011;334:105-108.
3. **Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF.** A natural solution for obesity: Bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. *Nutr Neurosci* 2015;18(2):49-65.

4. **Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, et al.** Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1720–1724.
5. **Schwartz A, Taras D, Schafer K, et al.** Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:190–195.
6. **Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al.** Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 2013;498:99–103.
7. **Delzenne NM, Neyrinck AM, Backhed F, Cani PD.** Targeting gut microbiota in obesity: Effects of prebiotics and probiotics. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:639–646.
8. **Ferrer M, Ruiz A, Lanza F, et al.** Microbiota from the distal guts of lean and obese adolescents exhibit partial functional redundancy besides clear differences in community structure. *Environmental Microbiology* 2012;2:3.
9. **Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, et al.** Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, calorie load, and nutrient absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 2011;94:58–65.
10. **Upadhyay N, Moudgal V.** Probiotics: a review. *J Clin Outcomes Manage* 2012;19:76–84.
11. **Nagpal R, Kumar A, Kumar M, et al.** Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *FEMS Microbiol Lett* 2012;334:1–15
12. **Hill C, Guarner F, Reid G et al.** Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2014;11(8):506–514.
13. **Michael DR, Moss JWE, Lama Calvente D, et al.** *Lactobacillus plantarum* CUL66 can impact cholesterol homeostasis in Caco-2 enterocytes. *Benef Microbes* 2016;7(3):443–51.
14. **Michael DR, Davies TS, Moss JWE, et al.** The anti-cholesterolaemic effect of a consortium of probiotics: An acute study in C57BL/6J mice. *Sci Rep* 2017;7(1):2883.
15. **Thushara RM, Gangadaran S, Solati Z, Moghadasian MH.** Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. *Food Funct* 2016;7(2):632–42.
16. **Sun J, Buys N.** Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Med* 2015;47:430–440.
17. **Food and Agriculture Organization (FAO).** Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; FAO: London, ON, Canada, 30 April–1 May 2002.
18. **European Food Safety Authority (EFSA).** Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.* 2005;226:1–12.
19. **Sanders M.** Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases* 2008;46(2):S58–S61.
20. **Nwosu FC, Avershina E, Wilson R, Rudi K.** Gutmicrobiota in HIV infection: Implication for disease progression and management. *Gastroenterology Research and Practice* 2014; Article ID 803185, 6 pages.
21. **Rossi M, Mirbagheri SS, Keshavarzian A, Bishehsari F.** Nutraceuticals in colorectal cancer: A mechanistic approach. *European Journal of Pharmacology* 2018;833:396–402.
22. **Ma EL, Choi YJ, Choi J, et al.** The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. *International Journal of Cancer* 2010;127(4):780–790.

23. **Verhoeven V, Renard N, Makar A et al.** Probiotics enhance the clearance of human papillomavirus-related cervical lesions: A prospective controlled pilot study. *European Journal of Cancer Prevention* 2013;22(1):46–51.
24. **Ettinger G, MacDonald K, Reid G, Burton J P.** The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut Microbes* 2015;5(6):719–728.
25. **Di Felice G, Barletta B, Butteroni C et al.** Use of probiotic bacteria for prevention and therapy of allergic diseases: studies in mouse model of allergic sensitization. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2008;42:S130–S132.
26. **Rondanelli M, Faliva MA, Perna S, et al.** Using probiotics in clinical practice: Where are we now? A review of existing meta-analyses. *Gut Microbes* 2017;8(6):521-543.
27. **Kumar M, Nagpal R, Kumar R, et al.** Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:902917.
28. **<http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3full.pdf>**
29. **Yoo YJ, Kim SS.** Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. *Nutrients* 2016;8(3):173.
30. **Ishimwe N, Daliri EB, Lee BH, Fang F, Du G.** The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics. *Mol Nutr Food Res* 2015;59(1):94-105.
31. **Nazir Y, Hussain SA, Abdul Hamid A, Song Y.** Probiotics and Their Potential Preventive and Therapeutic Role for Cancer, High Serum Cholesterol, and Allergic and HIV Diseases. *Biomed Res Int* 2018:3428437.
32. **Jones ML, Martoni CJ, Prakash S.** Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* 2012;66:1234–1241.
33. **Hove KD, Brons C, Faerch K, et al.** Effects of 12 weeks of treatment with fermented milk on blood pressure, glucose metabolism and markers of cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes: a randomised double-blind placebo-controlled study. *European journal of endocrinology/European Federation of Endocrine Societies* 2015;172(1):11-20.
34. **Cho YA, Kim J.** Effect of Probiotics on Blood Lipid Concentrations: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicine (Baltimore)* 2015;94(43):e1714.
35. **Rerksuppaphol S, Rerksuppaphol L.** A Randomized Double-blind Controlled Trial of *Lactobacillus acidophilus* Plus *Bifidobacterium bifidum* versus Placebo in Patients with Hypercholesterolemia. *J Clin Diagn Res* 2015;9(3):KC01-4.
36. **Kim J, Yun JM, Kim MK, Kwon O, Cho B.** *Lactobacillus gasseri* BNR17 Supplementation Reduces the Visceral Fat Accumulation and Waist Circumference in Obese Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Med Food* 2018;21(5):454-461.

OXIDAČNÝ STRES A ÚLOHA PRÍRODNÝCH ANTIOXIDANTOV V LIEČBE CHRONICKÉHO OCHORENIA OBLIČIEK

(Oxidative stress, the effect of natural antioxidants in the treatment of chronic kidney disease)

Zuzana Szentesiová¹, Branislav Trebatický², Jana Muchová¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave; jana.muchova@fmed.uniba.sk

²Urologické oddelenie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

Súhrn

Chronické ochorenie obličiek je dlhodobé, progresívne zhoršovanie funkcie obličiek. Ide o celosvetový zdravotný problém s rastúcou incidenciou a prevalenciou. Výsledky epidemiologických štúdií naznačujú, že v súčasnosti trpí chronickým ochorením obličiek približne 10% populácie a približne 5% má významne zníženú glomerulárnu filtráciu. V patogenéze chronickej choroby obličiek zohráva dôležitú úlohu aj oxidačný stres, nakoľko je jedným z faktorov spojených s ischemicko-reperfúznym poškodením organizmu. Cieľom klinického výskumu je využitie prírodných antioxidantov v eliminácii faktorov oxidačného stresu a minimalizácii jeho negatívneho vplyvu pri chronickom ochorení obličiek.

Kľúčové slová

chronické ochorenie obličiek, oxidačný stres, prírodné antioxidanty

Summary

Chronic kidney disease is long-standing, progressive deterioration of renal function. It is a worldwide public health problem with an increasing incidence and prevalence. The results of epidemiological studies indicate that at present, approximately 10% of the population suffers from chronic kidney disease, and about 5% have significantly reduced glomerular filtration. In the pathogenesis of chronic kidney disease, oxidative stress plays an important role because it's one of the factors associated with the ischemia–reperfusion injury of the organism. The goal of clinical research is to use natural antioxidants in elimination of oxidative stress factors and minimize its negative impact in chronic kidney disease.

Keywords

chronic kidney disease, oxidative stress, natural antioxidants

Úvod

Chronické ochorenie obličiek predstavuje progresívny stav charakterizovaný dlhotrvajúcim poškodením obličiek, ktorý môže viesť až k ich úplnému zlyhaniu (1). Ide o patofyziologické procesy spojené s abnormálnou funkciou obličky a progresívnou redukciou rýchlosti glomerulárnej filtrácie. National Kidney Foundation (2) definuje chronické ochorenie obličiek ako zníženú funkciu obličiek v priebehu najmenej 3 mesiacov s alebo bez prítomnosti

obličkového poškodenia. Glomerulárna filtrácia je nižšia ako 60 ml/min/1,73 m² a markermi obličkového poškodenia sú abnormality v krvnom zložení, v zložení moču a abnormality v zobrazovacích testoch.

V závislosti od hodnoty glomerulárnej filtrácie je na základe odporúčaní K/DOQI chronické ochorenie obličiek klasifikované do piatich štádií (tab. 1).

Štádium	Charakteristika	Glomerulárna filtrácia/1,73 m ²	
		ml/s	ml/min
1	Poškodenie obličiek s normálnou alebo zvýšenou GFR	≥ 1,5	≥ 90
2	Poškodenie obličiek s miernym poklesom GFR	1,5 – 1,0	60 – 89
3	Poškodenie obličiek so stredným poklesom GFR	1,0 – 0,5	30 – 59
4	Ťažké poškodenie obličiek s výrazným poklesom GFR	0,50 – 0,25	15 – 29
5	Zlyhanie obličiek	< 0,25 alebo dialýza	<15 alebo dialýza

Vysvetlivky: GFR – glomerulárna filtrácia

Tab. 1 Štádiá chronického ochorenia obličiek (2)

Populačné štúdie rôznych krajín udávajú prevalenciu chronického ochorenia obličiek 10 – 13 %, čo znamená, že približne jeden z desiatich dospelých ľudí rôznym stupňom obličkového ochorenia (3).

V súčasnej klinickej praxi má pacient s obličkovým zlyhaním k dispozícii liečebné metódy v podobe dialýzy a transplantácie obličky.

Klinický obraz

Vývoj chronického ochorenia obličiek trvá aj niekoľko rokov a v rámci tohto obdobia sú narušené koncentrácie látok, ktorých metabolické procesy sú regulované práve obličkami. V organizme dochádza k zmenám, ktoré sa prejavujú v zložení extracelulárnej tekutiny, ďalej sú to poruchy sekretorickej činnosti, ale aj zmeny v metabolicko-endokrinnnej činnosti obličiek. Tieto zmeny nastávajú v prípade veľkej záťaže organizmu, ako sú operácie, traumy alebo infekcie. Pacient trpí príznakmi anémie, hypertenzie, retencie dusíkatých látok a renálnej osteopatie. Jeho koža je na pohľad bledá, žltosivá a suchá. Objavuje sa malátnosť, apatia, ospalosť, bezvedomie až kóma. Z urologického hľadiska je u pacienta prítomná polyúria (2 – 4 litre moču /24 hodín), až oligúria (menej ako 300 ml moču/24 hodín) (3, 4).

Patogenéza

Normálna oblička obsahuje približne 1 milión nefrónov, pričom každý z nich sa svojou funkciou podieľa na celkovej glomerulárnej filtrácii. Nakoľko oblička má vrodenu schopnosť udržiavať glomerulárnu filtráciu, v prípade výskytu progresívnej deštrukcie určitej časti nefrónov sa zvyšné zdravé nefróny podieľajú na hyperfiltrácii, pričom dochádza ku kompenzačnej hypertrofii. Táto prispôsobivosť nefrónov zabezpečuje normálny klírens rozpustených látok. K zvýšeniu plazmatických hladín močoviny a kreatinínu tak dochádza, až pri poklese celkovej glomerulárnej filtrácie na 50 % (5).

Predpokladá sa, že glomerulárna hyperfiltrácia predstavuje prekursor intraglomerulárnej hypertenzie vedúcej k albuminúrii. Paralelne so zvyšovaním albuminúrie dochádza k poklesu glomerulárnej filtrácie, čo pri dlhodobom pretrvávaní vedie ku konečnému štádiu zlyhania obličiek (6).

Oxidačný stres v patogenéze chronického ochorenia obličiek

V patogenéze ochorenia obličiek zohráva významnú úlohu oxidačný stres, a to priamo prostredníctvom poškodenia glomerulurov a renálnej ischémie alebo nepriamo v spojení so zápalom, hypertenziou a endoteliálnou dysfunkciou (7, 8).

Jednou z príčin zlyhania obličiek je ischemicko-reperfúzne poškodenie, ktoré predstavuje obmedzenie prítoku krvi do orgánu a jeho následné obnovenie. Tento multifaktorový proces je spojený so silnou zápalovou a oxidačno-stresovou odpoveďou na hypoxiu a reperfúziu, čím dochádza k narušeniu funkcie orgánu. Počas reoxygénácie ischemickej obličky dochádza k tvorbe reaktívnych metabolitov kyslíka (RMO), čo spúšťa kaskádu škodlivých bunkových odpovedí vedúcich k zápalu, bunkovej smrti a zlyhaniu obličiek (9, 10).

Ischemicko-reperfúzne poškodenie predstavuje častú komplikáciu mnohých ochorení (akútny infarkt, mozgová príhoda) alebo chirurgických zákrokov (transplantácie orgánov) s potenciálne negatívnymi dôsledkami (9). Jassem a kol. (11) pripisujú približne 30 % oneskoreného odvrhnutia štepu práve ischemicko-reperfúznemu poškodeniu po transplantácii obličky.

V priebehu ischémie dochádza k metabolickým a intracelulárnym zmenám, v dôsledku nedostatku kyslíka dochádza k zníženiu oxidačnej fosforylácie, čo vedie k zlyhaniu resyntézy energeticky bohatých fosfátov – ATP. Do bunky vstupujú ióny Ca a Na, ako aj H₂O a zároveň sa aktivujú membránové fosfolipidové proteázy (fosfolipáza A₂ závislá od Ca, endonukleáza a proteázy), ktoré začínajú bunkovú apoptózu. V intracelulárnom priestore dochádza ku katabolizmu AMP, čo v konečnom dôsledku vedie k akumulácii hypoxantínu, ktorý sa pôsobením xantínoxidázy mení na kyselinu močovú a superoxidový aniónový radikál O₂^{•-} (12, 13, 14, 15).

Produkcia O₂^{•-} v procese reperfúzie prebieha účinkom xantínoxidázy na endotelovom povrchu. O₂^{•-} sa podieľa na inaktivácii špecifických bunkových enzýmov a zastáva úlohu prekursora H₂O₂ a vysoko reaktívneho hydroxylového radikálu. V porovnaní s O₂^{•-} je H₂O₂ slabším oxidačným činidlom, ktorý sa vďaka svojej schopnosti prechádzať bunkovými membránami, môže podieľať na inaktivovaní nukleových kyselín. V procese ischémie dochádza k nahromadeniu voľného intracelulárneho železa, s ktorým H₂O₂ interaguje a prostredníctvom Haber-Weissovej reakcie vytvára vysoko reaktívny [•]OH. [•]OH je oveľa reaktívnejší, než O₂^{•-} alebo H₂O₂ a má tendenciu napádať všetky biologické molekuly, čím iniciuje kaskádu voľnoradikálových reakcií (16).

Je pravdepodobné, že za zvýšenú náchylnosť obličky na poškodenie voľnými radikálmi sú zodpovedné dlhé reťazce polynenasýtených mastných kyselín, ktoré sa nachádzajú v renálnych lipidoch. Po obnovení prítoku krvi počas reperfúznej fázy ischemicko-reperfúzneho procesu, RMO zapríčiňujú poškodenie obličkového tkaniva peroxidáciou membránových lipidov. Zároveň oxidačné poškodenie proteínov a DNA vedie k bunkovej smrti (7, 10, 14).

Častým dôvodom zlyhania obličiek je aj diabetická nefropatia. Histologické zmeny súvisiace s diabetickou nefropatiou sú detegovateľné už 2 roky po vzniku diabetes mellitus a jej hlavnými znakmi sú albuminúria (> 300 mg/deň) a pokles glomerulárnej filtrácie (17).

Fakt, že na vývoji a progresii diabetických komplikácií sa podieľa oxidačný stres, potvrdzuje veľké množstvo dôkazov. Za zvýšenú tvorbu RMO je zodpovedných niekoľko druhov makromolekúl (18). Nakoľko sa oxidačný stres vzťahuje na zmeny v redoxnej rovnováhe, tie môžu byť vyvolané pretrvávajúcim hyperglykemickým stavom a zvýšenou koncentráciou pokročilých koncových produktov glykácie (AGEs). To ovplyvňuje renín-angiotenzínový systém a signalizáciu transformujúceho rastového faktora-beta (TGF-β). Výsledkom spomínaných procesov je vznik chronického zápalu a glomerulárnej a tubulárnej hypertrofiie. Všetky tieto redoxné zmeny potom vedú k výskytu albuminúrie, proteinúrie, glomerulosklerózy a tubulárnej intersticiálnej fibrózy. Pokles renálnych funkcií u pacientov

s diabetes mellitus 2. typu spôsobuje aj zvýšenie hladín AGEs. Preto je akumulácia AGEs pri diabetes mellitus často považovaná za užitočný neinvazívny marker miery poškodenia tkaniva (19, 20).

Čo sa týka diagnostiky a včasnej prognózy diabetickej nefropatie existuje aj niekoľko ďalších konvenčných markerov oxidačného stresu, nájdených v sére, moči a rôznych orgánoch. Sú to hlavne produkty peroxidácie lipidov (4-HNE - 4-hydroxynonenal, MDA - malondialdehyd) a karbonylové proteíny (21).

Skutočnosť, že oxidačný stres zohráva úlohu v patogeneze zlyhania obličiek potvrdilo aj niekoľko ďalších klinických štúdií. Yang a kol. (22) zistili u pacientov s chronickým ochorením obličiek zvýšené sérové hladiny produktov pokročilej oxidácie proteínov (AOPP). Tie, sa našli aj v poľskej štúdií Kuchtu a kol. (23), kde pacienti s týmto ochorením vykazovali okrem vysokých hladín AOPP, aj vysoké hladiny MDA a oxidovaných LDL častíc a nízku aktivitu antioxidantných enzýmov. Štúdia Rangel-López (24) potvrdila u pacientov s chronickým ochorením obličiek zvýšené oxidačné poškodenie DNA, pričom DNA bola výraznejšie poškodená v prípade pacientov na peritoneálnej dialýze, než u hemodialyzovaných.

Poškodenie DNA študovali Matsumoto a kol. (25), ktorí zistili zvýšenú hladinu 8-oxo-dG (marker oxidačného poškodenia DNA) po reperfúzii, ktorá po dvoch hodinách klesla. Výsledky týchto štúdií vedú k záveru, že okamžité zníženie oxidačného stresu po reperfúzii by mohlo mať potenciálne pozitívny vplyv na prognózu štepu.

Prírodné antioxidanty v liečbe chronického zlyhania obličiek

Nakoľko v ľudskom organizme môže vznikáť počas patologického procesu veľké množstvo RMO, ktoré vedú k oxidačnému stresu, uskutočnilo sa veľké množstvo štúdií zameraných na antioxidantnú liečbu s cieľom dosiahnuť redoxnú rovnováhu a minimalizovať oxidačné poškodenie DNA, lipidov aj proteínov (26). Niekoľko štúdií ukázalo, že strava bohatá na polyfenoly redukuje riziko chronických ochorení. Môže to byť spôsobené synergiou rôznych polyfenolov a iných bioaktívnych látok, nachádzajúcich sa v prírodných zdrojoch. Prírodné antioxidanty, najmä polyfenoly, karotenoidy a vitamíny disponujú množstvom biologických účinkov, vrátane protizápalových, anti-aterosklerózných a protinádorových (27, 28, 29).

Z vitamínov sú silnými antioxidantmi vitamín C a vitamín E, ktoré zabezpečujú ochranu organizmu pred negatívnymi účinkami RMO a toxínov (30). Antioxidantné vlastnosti vitamínu C sú založené na tvorbe askorbátového radikálu, ktorý predstavuje pomerne nereaktívny voľný radikál (31). Medzi najúčinnšie nízkomolekulové lipidové antioxidanty patrí α -tokoferol (vitamín E), ktorý inhibuje peroxidáciu lipidov tým, že reaguje s peroxylovým radikálom. Takto dochádza k prerušeniu radikálovej reakcie vytvorením relatívne stabilného tokoferolového radikálu, ktoré sa môže regenerovať späť na aktívnu redukovanú formu prostredníctvom iných antioxidantov (napr. askorbát, retinol alebo ubichinol) (32, 33, 34).

Vzhľadom na to, že fenolové skupiny sú možnými darcami vodíka, podieľajú sa na vychytávaní radikálov, čím tiež prerušujú oxidačné reakcie v bunke. Poskytnutím vodíka vytvára fenolová skupina stabilný fenoxylradikál, ktorý je následne stabilizovaný rezonančným efektom (27).

Z polyfenolov môžeme spomenúť extrakt z kôry francúzskej prímorskej borovice *Pinus pinaster* (Pycnogenol®), ktorého antioxidantná aktivita spočíva v zdvojnásobení intracelulárnej syntézy antioxidantných enzýmov, v inaktivácii $O_2^{\cdot-}$ a OH^{\cdot} radikálu, v inhibovaní tvorby 1O_2 , v regenerácii askorbylového radikálu a v ochrane endogénneho vitamínu E a glutatiónu pred oxidačným stresom (35, 36, 37).

Arts s Hollmanom (38) a Scalbert a kol. (39) svojimi výsledkami poukazujú práve na inverziu medzi chronickými ochoreniami a konzumáciou stravy bohatej na polyfenoly.

Vplyv vitamínov C, E a β -karoténu na renálnu insuficienciu sledovali vo svojich animálnych experimentoch Yu a Paetau-Robinson (40), ktorí štvortýždňovou suplementáciou dosiahli zníženie sérového 8-oxodG. Účinky vitamínu C na zmiernenie ischemicko-reperfúzneho poškodenia po transplantácii obličky skúmali Lee, Son a Kim (41), ktorí podávaním vitamínu C už tri dni po transplantácii obličky pozorovali zvýšenie aktivity antioxidantných enzýmov. Islam a kol. (42) študovali rezistenciu LDL cholesterolu voči oxidácii u pacientov na hemodialýze, kde dlhodobou suplementáciou vitamínom E dosiahli jej významné zvýšenie. Podobné výsledky publikovali Sato a kol. (43), ktorí súbežným denným podávaním vitamínu C (200 mg) s vitamínom E (600 mg), v priebehu šiestich mesiacov u hemodialyzovaných pacientov významne znížili oxidačné poškodenie lipidov. Biomarkery oxidačného stresu u pacientov na peritoneálnej dialýze upravila kombinovaná suplementácia vitamínov v štúdií Boudourisa a kol. (44). Pacienti vykazovali aj zvýšenú aktivitu antioxidantov, zvýšenú celkovú antioxidantnú kapacitu a zníženie koncentrácií MDA a karbonylov. Výsledky randomizovanej štúdie pod vedením Williamsa a kol. (45) poukazujú na zvýšenie odolnosti lipoproteínov pred oxidáciou u pacientov po transplantácii obličky. Tieto výsledky naznačujú prospešný účinok suplementácie antioxidantmi na oxidačný stres súvisiaci s chronickým ochorením obličiek.

Literatúra

1. **Moradi, H, Vaziri ND.** Molecular mechanisms of disorders of lipid metabolism in chronic kidney disease. *Front Biosci-Landmark*. 2018; 23:146-161.
2. https://www.kidney.org/sites/default/files/docs/12-50-0210_jag_dcp_guidelines-hd_oct06_sectiona_ofc.pdf (31.10.2018)
3. **Spustová V.** Definícia, hodnotenie a klasifikácia chronického ochorenia obličiek. *Via Pract*. 2010; 7(4): 152-154.
4. www.unlp.sk/index.php?option=com_content&%20task=%20view&id=1353&Itemid=145 (31.10.2018)
5. <https://emedicine.medscape.com/article/238798-overview#a1> (31.10.2018).
6. **Palatini P.** Glomerular hyperfiltration: a marker of early renal damage in pre-diabetes and pre-hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27: 1708-1714.
7. **Ozbek E.** Induction of oxidative stress in kidney. *Int J of Nephrol*. 2012; 2012: 465897.
8. **Putri AY, Thaha M.** Role of Oxidative Stress on Chronic Kidney Disease Progression. *Acta Med Indones*. 2014; 46(3): 244-252.
9. **Halladin NL.** Oxidative and inflammatory biomarkers of ischemia and reperfusion injuries. *Dan Med J*. 2015; 62(4): B5054.
10. **Malek M, Nematbakhsh M.** Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev*. 2015; 4(2): 20-27.
11. **Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND.** The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*. 2002; 73(4): 493-499.
12. **Maxwell SR, Lip GY.** Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol*. 1997; 58(2): 95-117.
13. **Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P.** Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4(7): 552-565.
14. **Devarajan P.** Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. *Curr Opin Pediatr*. 2005; 17: 193-199.
15. **Kosieradzki M, Rowiński W.** Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc*. 2008; 40(10): 3279-3288.
16. **Koo DDH, Fuggle SV.** Impact of Ischemia/Reperfusion Injury and Early Inflammatory Responses in Kidney Transplantation. *Transplant Rev*. 2000; 14(4): 210-224.

17. **Miranda-Díaz AG, Pazarín-Villaseñor L, Yanowsky-Escatell FG, Andrade-Sierra J.** Oxidative stress in diabetic nephropathy with early chronic kidney disease. *J Diabetes Res.* 2016; 2016: 7047238.
18. **Kashihara N, Haruna Y, Kondeti VK, Kanwar YS.** Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Curr Med Chem.* 2010; 17(34): 4256-4269.
19. **Manda G, Checherita AI, Comanescu MV, Hinescu ME.** “Redox signaling in diabetic nephropathy: hypertrophy versus death choices in mesangial cells and podocytes,” *Mediat Inflamm.* 2015; 2015: 604208.
20. **Wagner Z, Wittmann I, Mazák I, Schinzel R, Heidland A, Kientsch-Engel R, Nagy J.** N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine levels in patients with type 2 diabetes: role of renal function. *Am J Kidney Dis.* 2001; 38(4): 785-791.
21. **Cushman WC, Evans GW, Byington RP, Goff DC Jr, Grimm RH Jr, Cutler JA, Simons-Morton DG, Basile JN, Corson MA, Probstfield JL, Katz L, Peterson KA, Friedewald WT, Buse JB, Bigger JT, Gerstein HC, Ismail-Beigi F.** “Effects of intensive blood-pressure control in type 2 diabetes mellitus,” *New Engl J Med.* 2010; 362(17), 1575–1585.
22. **Yang XB, Hou FF, Wu Q, Zhou H, Liu ZR, Yang Y, Zhang X.** Increased levels of advanced oxidation protein products are associated with atherosclerosis in chronic kidney disease. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2005; 44(5): 342-346.
23. **Kuchta A, Pacanis A, Kortas-Stempak B, Ćwiklińska A, Ziętkiewicz M, Renke M, Rutkowski B.** Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 2011; 34: 12-19.
24. **Rangel-López A, Paniagua-Medina ME, Urbán-Reyes M, Cortes-Arredondo M, Álvarez-Aguilar C, López-Meza J, Ochoa-Zarzosa A, Lindholm B, García-López E, Paniagua JR.** Genetic damage in patients with chronic kidney disease, peritoneal dialysis and haemodialysis: a comparative study. *Mutagenesis.* 2013; 28(2): 219-225.
25. **Matsumoto S, Hanai T, Matsuura T, Uemura H, Nishioka T, Akiyama T.** Can monitoring of serum 8-OHdG level for 2 hours after renal transplantation predict prognosis of the graft? *Transplant Proc.* 2006; 28(7): 2014-2015.
26. **Li S, Liu Q.** Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. *Food Science and Human Wellnes.* 2014; 3(3-4) 110-116.
27. **Daenen, K, Andries, A., Mekahl, D., Schepdael, AV, Jouret, F., Bammens, B.** Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2018; <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4005-4>.
28. **Kadrabová J, Maďarič A, Németh K.** Přírodní zdroje polyfenolov a iných bioaktívnych látok. *Farmaceut Obzor.* 2005; 74: 171-180.
29. **Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang JJ, Li HB.** Natural Antioxidants in Food and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int. J Mol. Sci.* 2017; 18(1):96.
30. **Chambial S, Dwivedi S, Shukla KK, John PJ, Sharma P.** Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. *Indian J Clin Biochem.* 2013; 28(4): 314-328.
31. **Skrovánková S, Mlček J, Sochor J, Baron M, Kynický J, Juriková T.** Determination of Ascorbic Acid by Electrochemical Techniques and other Methods. *Int J Electrochem Sci.* 2015; 10: 2421-2431.
32. **Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F.** The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2014; 14(2): e157-e165.
33. **Traber MG, Atkinson J.** Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43(1): 4-15.
34. **Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010; 4(8): 118-126.

35. **Rohdewald P.** A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002; 40(4): 158-168.
36. **Gulati OP.** The nutraceutical Pycnogenol: its role in cardiovascular health and blood glucose control. *Biom Rev.* 2005; 16:49-57.
37. **Iravani S, Zolfaghari B.** Pharmaceutical and nutraceutical effects of Pinus pinaster bark extract. *Res Pharm Sci.* 2011; 6(1): 1-11.
38. **Arts IC, Hollman PC.** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1): 317S-325S.
39. **Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C.** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005; 45: 287–306.
40. **Yu S, Paetau-Robinson I.** Dietary supplements of vitamins E and C and beta-carotene reduce oxidative stress in cats with renal insufficiency. *Vet Res Commun.* 2006; 30: 403-413.
41. **Lee JI, Son HY, Kim MC.** Attenuation of ischemia-reperfusion injury by ascorbic acid in the canine renal transplantation. *J Vet Sci.* 2006; 7(4): 375-379.
42. **Islam KN, O'Byrne D, Devaraj S, Palmer B, Grundy SM, Jialal I.** Alpha-tocopherol supplementation decreases the oxidative susceptibility of LDL in renal failure patients on dialysis therapy. *Atherosclerosis.* 2000; 150: 217-224.
43. **Sato M, Matsumoto Y, Morita H, Takemura H, Shimoi K, Amano I.** Effects of vitamin supplementation on microcirculatory disturbance in hemodialysis patients without peripheral arterial disease. *Clin Nephrol.* 2003; 60: 28-34.
44. **Boudouris G, Verginadis II, Simos YV, Zouridakis A, Ragos V, Karkabounas Sch, Evangelou AM.** Oxidative stress in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and the significant role of vitamin C and E supplementation. *Int Urol Nephrol.* 2013; 45(4): 1137-44.
45. **Williams MJ, Sutherland WH, McCormick MP, de Jong SA, McDonald JR, Walker RJ.** Vitamin C improves endothelial dysfunction in renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16(6): 1251-1255.

IMUNOMODULAČNÝ VPLYV BETANÍNU PRI ISCHÉMII A REPERFÚZII TENKÉHO ČREVA

(Immunomodulatory effect of betanin in ischemia and reperfusion of small intestine)

**Štefan Tóth¹, Theodoros Kalpakidis¹, Martin Pribula¹, Matúš Kušnier¹,
Martin Urda¹, Zuzana Joncová¹, Kristína Čurgali¹, Milan Mareta²,
Eva Mechírová¹**

¹Ústav histológie a embryológie, UPJŠ LF, Trieda SNP 1, 040 11 Košice
stefan.toth1@upjs.sk

²Neurologická klinika, UPJŠ LF a UNLP, Trieda SNP 1, 040 11 Košice

Súhrn

Experimentálne ischemické prekondicionovanie je v súčasnosti predmetom intenzívneho štúdia, pričom mnoho otázok ohľadom postupu a výsledného efektu ostáva ešte nezodpovedaných. V našej predloženej histologickej štúdii sme po parenterálnej aplikácii betanínu pred ischemicko-reperfúznym poškodením (IRP) jejúna sledovali a zaznamenali aktuálny stav histologickej štruktúry parenchýmu pľúc so zameraním na celkový index tkanivového poškodenia a zápalovú odpoveď.

Kľúčové slová

jejúnium, pľúca, ishémia-reperfúzia, betanín, index poškodenia, zápalová odpoveď

Summary

Ischemic preconditioning is a phenomenon that has been extensively studied both *in vivo* and *in vitro* and yet there are still questions regarding its therapeutic usage and mechanism of action to be answered. In the present study, jejunal ischemic-reperfusion injury was induced, treated with betanin and a qualitative and quantitative investigation was conducted in the lung due to its vital importance and distant proximity to the jejunum.

Keywords

jejunum, lung, ischemia-reperfusion, betanin, injury index, inflammatory response

Úvod

Tenké črevo je považované za orgán, ktorý je veľmi často postihnutý IRP (1). Bolo uskutočnených množstvo pokusov s cieľom minimalizovať významné poškodenie sliznice čreva bežne spôsobené mnohými patologickými a terapeutickými, často chirurgickými postupmi (napr. hypovolemický šok, brušné operácie vyžadujúce ligáciu ciev, kardiovaskulárny bypass, chemoterapia). Tieto pokusy zahŕňajú ischemické prekondicionovanie, antikomplementovú a protizápalovú terapiu, ako aj použitie antioxidantných látok, znižujúcich oxidačný stres tkanív, ku ktorému dochádza počas IRP. Poškodenie vyvolané ischémiou a následnou reperfúziou môže progredovať do rozvoja

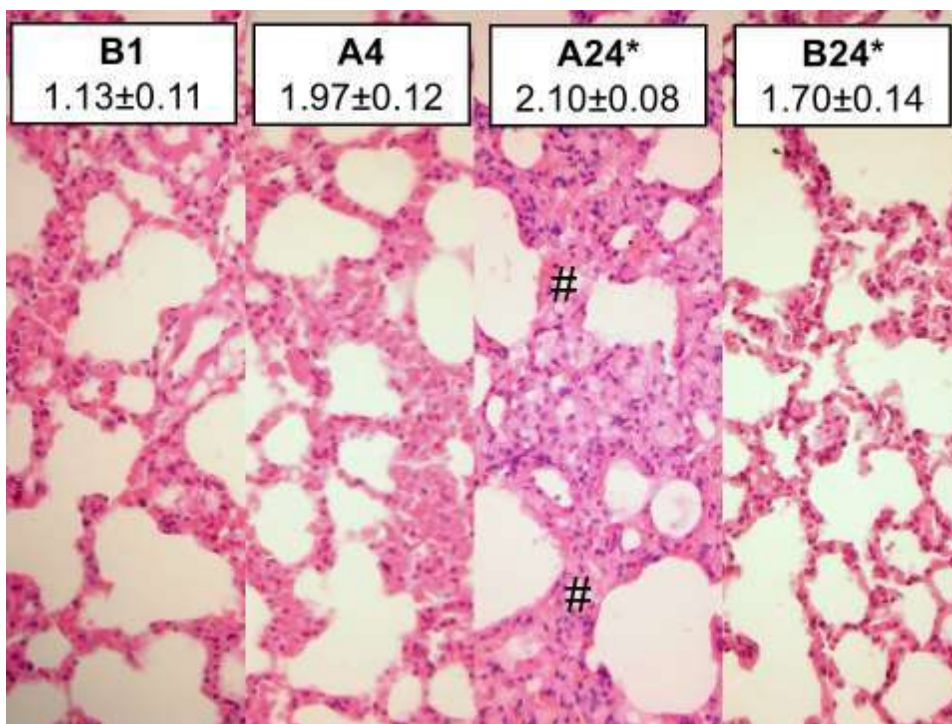
Syndrómu systémovej zápalovej odpovede – SIRS a neskôr indukovať aj Syndróm mnohoorgánového zlyhania – MODS (2). Antioxidanty ako napr. allopurinol a kvercetín majú protektívny efekt pri IRP (3,4,5,6). Cieľom predloženej histologickej štúdie je testovať vplyv ischemického prekondicionovania betanínom na vzdialený vitálny orgán ako sú pľúca so zameraním na celkový stupeň poškodenia a zápalovú odpoveď tkaniva parenchýmu pľúc.

Metriál a metódy

V experimente boli použité potkany kmeňa Wistar (n=42) s hmotnosťou 250-350 g. Ischémia bola navodená oklúziou *a. mesenterica cranialis* atraumatickou cievnu svorkou. Zvieratá boli rozdelené do dvoch skupín - skupiny, ktorej bol aplikovaný betanín (skupina B) a kontrolnou skupinou bez aplikácie betanínu (skupina A). Zvieratám v skupine B bol aplikovaný parenterálne vodný roztok betanín (50 mg/kg ž.hm. v sterilnom fyziologickom roztoku *i.p.*) 30 minút pred 1 hodinovou ischémiou. Po odstránení svorky nasledovala reperfúzna perióda v trvaní 1, 4 a 24 hodín. Rovnaký postup bol vykonaný na skupine A, s použitím sterilného fyziologického roztoku namiesto betanínu. Po uplynutí príslušnej periódy reperfúzie boli odoberaté bioptické vzorky parenchýmu pľúc (*lobus medius pulmonis dextri*). Biopsie boli fixované v 4% paraformaldehyde, zaliate do paraplastu a narezané na 4-5 μm histologické rezy. Po deparafinizácii boli rezy farbené metódou HE, histochemicky a imunohistochemicky. Poškodenie pľúcneho parenchýmu bolo semikvantitatívne hodnotené stupňami 0-4 podľa skórovacieho systému Tassiopoulos *a kol.* (7) a výsledok udáva index histopatologického poškodenia pľúc (IHPP). Populácia mastocytov (MCs) v 1 mm^2 pľúcneho parenchýmu bola detegovaná použitím metachromatického farbenia pomocou Cresyl Fast Violet. Počet MCs bol analyzovaný v 5 rôznych zorných poliach (náhodne vybrané 3 periférne a 2 centrálné miesta v parenchýme pľúc) mikroskopu s použitím zväčšenia 1000 \times . Populácia pozitívnych buniek na myeloperoxidázu (anti-MPO, Thermo Scientific, 1: 100) v 1 mm^2 parenchýmu pľúc bola detegovaná v 5 rôznych poliach parenchýmu (náhodne vybrané 3 periférne a 2 centrálné miesta v parenchýme pľúc) kolorimetrickou imunohistochemiou. Štatistická analýza bola vykonaná pomocou GraphPad In-Stat verzia 3.01 programu (GraphPad Software, San Diego, CA). Kvantitatívne výsledky boli hodnotené pomocou one-way ANOVA testu a Tukey-Kramer *post-hoc* testom. Semikvantitatívne výsledky boli hodnotené pomocou neparametrického ANOVA testu Kruskal-Wallis a neparametrickým Dunnovým *post-hoc* testom. Výsledky boli vyjadrené ako aritmetický priemer (M) \pm štandardná chyba merania (SEM). Hodnoty *p* menšie ako 0,05 sa považovali za štatisticky významné.

Výsledky

Histopatologicky IHPP potvrdil tendenciu exponenciálneho zvyšovania histopatologického poškodenia parenchýmu pľúc v kontrolnej skupine zvierat bez aplikácie betanínu (Obr.1). Pričom maximálny stupeň indexu poškodenia bol zaznamenaný v skupine po 24 hodinách reperfúzie, čo bolo signifikantné pri porovnaní so skupinou B24 s aplikáciou betanínu (A24 vs. B24; $p < 0.001$). Histologicky bola v tkanivových léziách prítomná výrazná hypercelularita s leukocytárnou infiltráciou, kongescia krvných ciev, intersticiálny edém a lokálne hemorágie. Tieto patologické zmeny sme zaznamenali predovšetkým v oblasti perivaskulárneho väziva v a bezprostrednej blízkosti ciev a malých bronchov a bronchiolov. Morfometricky bol zreteľný nárast hrúbky interalveolárneho septa, redukcia objemu pľúcnych alveol v dôsledku intersticiálneho edému a hypercelularity interalveolárnych preprážok.

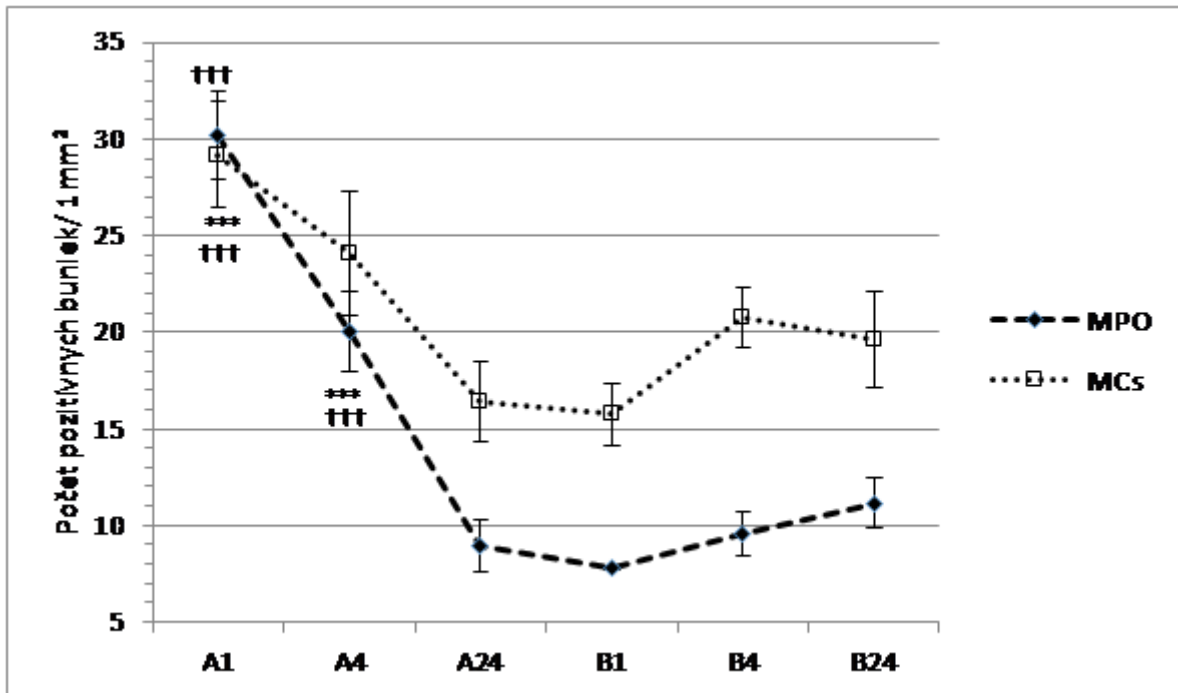


Obr. 1 Index histopatologického poškodenia pľúc

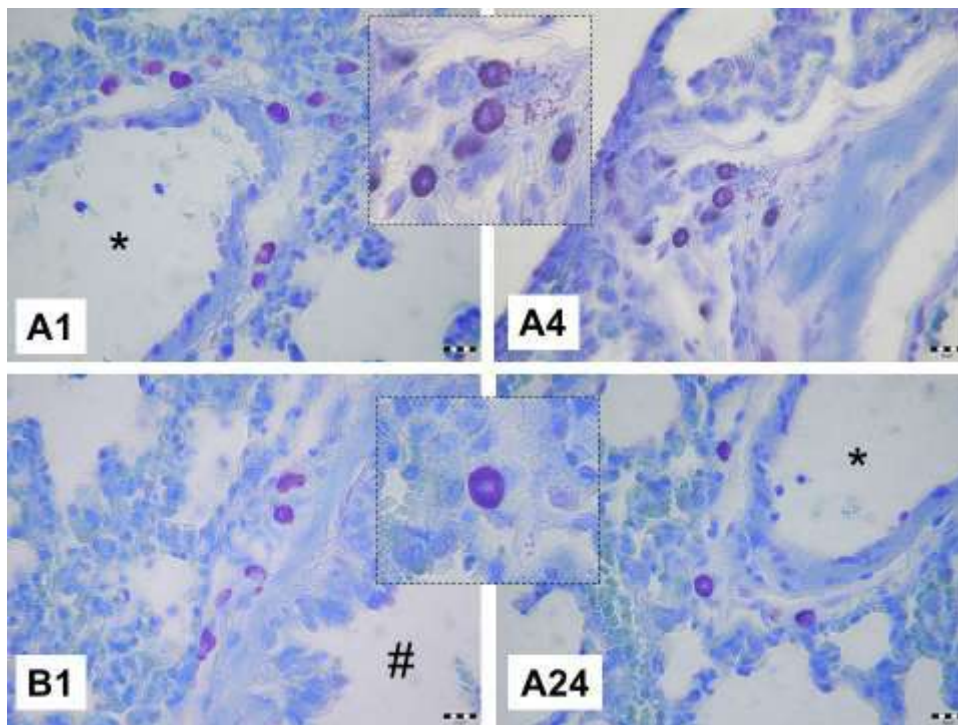
Reprezentatívne mikrofotografie parenchýmu pľúc kontrolných skupín bez aplikácie betanínu (A) a experimentálnych prekondicionovaných skupín po aplikácii betanínu (B). Uvedené číselné údaje nad mikrofotografiami udávajú hodnotu indexu poškodenia $M \pm S.E.M.$ (*A24 vs. B24, $p < 0.001$; #zreteľné hrubnutie interalveolárnych prepážok v dôsledku intersticiálneho edému a hypercelularity; x400, H&E).

Signifikantne vyšší počet metachromaticky pozitívnych mastocytov bol detekovaný už po 1. hodine reperfúzie v kontrolnej skupine A1 v porovnaní so skupinou A24 (A1 vs. A24 $p < 0.01$; Graf 1, Obr.2). Výrazne nižší počet mastocytov bol zaznamenaný v experimentálnej skupine B1 s aplikáciou betanínu pri porovnaní s kontrolnou skupinou A1 bez prekondicionovania betanínom. Na základe našej analýzy podľa cytomorfológických znakov a tkanivovej topografie pozitívnu populáciu predstavovali najmä perivaskulárne mastocyty, podiel sliznicových mastocytov bol nevýrazný.

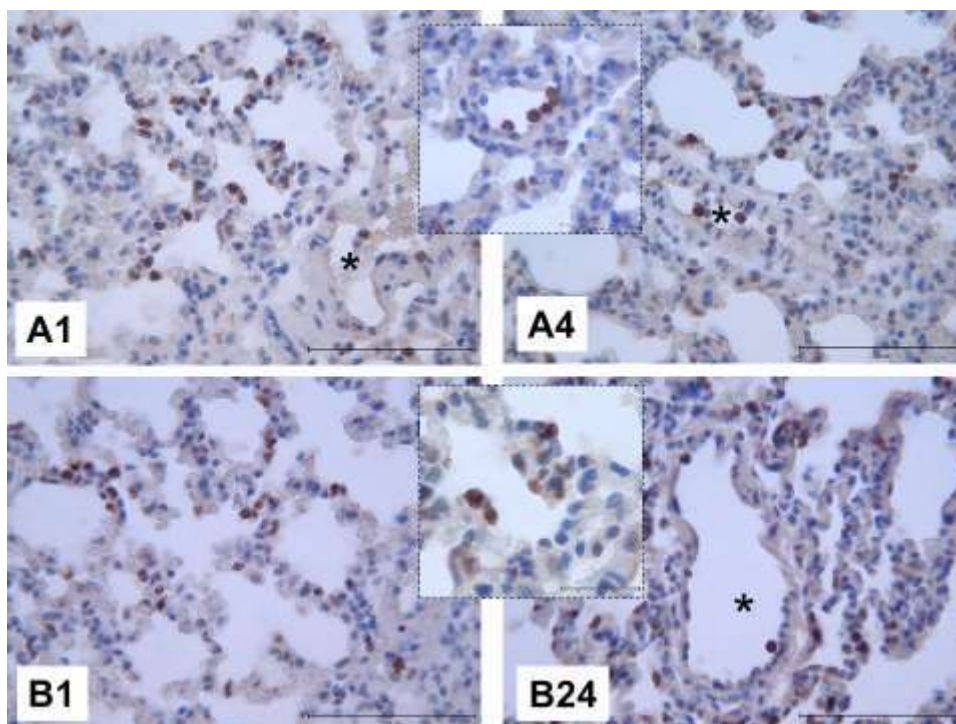
Rovnako, imunohistochemická analýza populácie MPO-pozitívnych buniek zaznamenala signifikantný nárast a najvyšší počet pozitívnych buniek už po 1. hodine reperfúzie v kontrolnej skupine bez prekondicionovania (A1) v porovnaní so skupinami A4, A24 a experimentálnou skupinou B1 s aplikáciou betanínu (A1 vs. A4 $p < 0.001$; A1 vs. B1 $p < 0.001$; A4 vs. A24 $p < 0.001$; A1 vs. A24 $p < 0.01$; Graf 1, Obr.3). Signifikantne nižší počet MPO-pozitívnych buniek pretrvával ešte v prekondicionovanej skupine B4 oproti kontrole A4 bez aplikácie antioxidantu betanínu (B4 vs. A4 $p < 0.001$).



Graf 1 Imunohistochemická analýza sledovaných populácií zápalových buniek v parenchýme pľúc so štatistickou významnosťou (MPO-myeloperoxidáza pozitívne bunky, MCs-mastocyty; ***A1vs.A4 $p<0.001$; †††A1vs.B1 $p<0.001$; ***A4vs.A24 $p<0.001$; †††A4vs.B4 $p<0.001$; **A1vs.A24 $p<0.01$).



Obr. 2 Metachromatické farbenie na dôkaz populácie mastocytov
 Reprezentatívne mikrofotografie parenchýmu pľúc kontrolných skupín bez aplikácie betanínu (A) a experimentálnych prekondicionovaných skupín s aplikáciou betanínu (B); *krvné cievy; #bronchiolus terminalis; x400, Cresyl Fast Violet farbenie).



Obr. 3 Kolorimetrická imunohistochemická analýza populácie MPO-pozitívnych buniek. Reprezentatívne mikrofotografie parenchýmu pľúc kontrolných skupín bez aplikácie betanínu (A) a experimentálnych prekondicionovaných skupín s aplikáciou betanínu (B); *krvné cievy; x400, anti-MPO protilátka).

Diskusia a záver

Výsledky našej histologickej štúdie potvrdzujú protektívny účinok betanínu v patogenéze poškodenia tkanív pri IRI tenkého čreva v parenchýme vzdialeného vitálne dôležitého orgánu ako sú pľúca. Podobný efekt sme zaznamenali v našich prechádzajúcich štúdiách s aplikáciou antioxidantu kvercetínu (5,6). Zlepšenie histologického obrazu parenchýmu pľúc a zníženie počtu aktívnych mastocytov a MPO pozitívnych buniek v experimentálnych skupinách (B), ktorým bol pred navodením ischemie a reperfúzie preventívne aplikovaný betanín, naznačujú jeho významný imunomodulačný účinok. Tento stav bol pravdepodobne spôsobený antioxidantnou schopnosťou betanínu s akumuláciou reaktívnych intermediátov kyslíka a ich následnou inaktiváciou. V priebehu prvých 4 hodín reperfúzie po betanínovom prekondicionovaní sme detegovali až 74% zníženie počtu MPO-pozitívnych buniek a takmer 46% pokles počtu pozitívnych perivaskulárnych mastocytov v skupinách s aplikáciou betanínu. Protektívny účinok aplikovaného antioxidantu bol na základe našej analýzy zaznamenaný výrazne nižším poškodením parenchýmu pľúc až v neskorších periódach reperfúzie. Na základe posúdenia histologického obrazu parenchýmu pľúc sme po 24 hodinách reperfúzie zaznamenali až 100% zlepšenie indexu poškodenia (IHPP), výraznú redukciu hrúbky interalveolárnych prepážok a zväčšenie luminálneho povrchu pľúcnych alveol. Naše histochemické výsledky kvantifikácie mastocytov, podľa ktorých bola ich populácia menej početná v prekondicionovaných skupinách (B) ako v kontrolných skupinách (A), nás vedie k 2 možným hypotézam. Buď mala aplikácia betanínu stimulujúci účinok na degranuláciu cytoplazmy mastocytov, čo spôsobilo zníženie až znemožnenie ich histochemickej detekcie, alebo antioxidant betanín suprimoval akumuláciu samotných zápalových buniek v tkanive parenchýmu pľúc. Mastocyty sa okrem alergických reakcií podieľajú na produkcii celého spektra dôležitých cytokínov, rastových faktorov a vazoaktívnych látok, čím zohrávajú dôležitú úlohu pri udržiavaní funkcií a integrity tkanív (8). Predovšetkým neutrofilné granulocyty, ktoré tvoria majoritu populáciu MPO pozitívnych

buniek sú základným markerom akútnej zápalovej odpovede tkanív a prvej obrannej línie pred poškodením (9). Ak je pokles populácie mastocytov v pozitívnej korelácii s poklesom úrovne MPO pozitívnych buniek a zároveň s nižším stupňom HPIL, druhá hypotéza je pravdepodobnejšia bez toho, aby bola vylúčená prvá hypotéza.

Výsledky našej histologickej štúdie poukazujú na pozitívny vplyv parenterálnej aplikácie betanínu pred ischémiou a reperfúziou tenkého čreva nielen na primárne poškodený orgán – tenké črevo, ale aj vzdialený vitálne dôležitý orgán akým sú pľúca.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore projektu VEGA 1/0386/17.

Literatúra

- 1. Weiwei C, Sheng L, Shanwei W, Aili Y, Lei N.** Ischemic postconditioning provides protection against ischemia-reperfusion injury in intestines of rats. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(6): 6474–6481.
- 2. Ceppa EP, Fuh KC, Bulkley GB.** Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock." *Curr Opin Crit Care.* 2003;9(2):127-32.
- 3. Mallick H, Yang W, Winslet M, Seifalian A.** Ischemia-Reperfusion Injury of the Intestine and Protective Strategies Against Injury. *Digestive Diseases and Sciences* 2004 ; 49 (9): 1359-1377.
- 4. Lakhanpal P, Rai DK.** Role of quercetin in cardiovascular diseases. *Internet Journal of Medical Update* 2008; 3(1): 31-49.
- 5. Tóth Š, Joncová Z, Čurgali K., Maretta M, Šoltés J, Švaňa M, ... & Kruzliak, P.** Quercetin attenuates the ischemia reperfusion induced COX-2 and MPO expression in the small intestine mucosa. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 95: 346-354.
- 6. Curgali K, Toth S, Joncova Z, Maretta M, Kalpakidis T, Petriskova I, Kusnier M, Soltes J, Svana M, Caprnda M, Delev D, Rodrigo L, Mechirova E, Kruzliak P.** Quercetin protects jejunal mucosa from experimental intestinal ischemia reperfusion injury by activation of CD68 positive cells. *Acta Histochem.* 2018;120(1):28-32.
- 7. Tassiopoulos AK, Carlin RE, Gao Y, Pedoto A, Finck CM, Landas SK, Tice DG, Marx W, Hakim TS, McGraw DJ.** Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities. *J Vasc Surg.* 1997;26(4):647-56.
- 8. Da Silva E, Jamur M, Oliver C.** Mast Cell Function. A New Vision of an Old Cel. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2014; 62(10): 698 –738.
- 9. Klebanoff SJ.** Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999; 11(5): 383-389.

VYUŽITIE KULTIVOVANÝCH BUNIEK PRI LIEČBE CHONDRÁLNYCH DEFEKTOV

(Application of stem cells in treatment of chondral defects)

Martin Trepáč, Boris Liščák, Milan Kokavec, Radoslav Zamborský

*Ortopedická klinika LFUK a NÚDCH, Limbová 1, 833 40 Bratislava
mtrepac@gmail.com*

Súhrn

Poškodenia chrupavky boli dodnes riešené operačnými metódami, fixáciami, vkladaniami implantátov, ktoré častokrát viedli k oslabeniu muskuloskeletálneho systému alebo k strate mobility pacienta čo znamenalo zvýšené výdavky na zdravotnú starostlivosť po celom svete. V posledných rokoch narastajú experimentálne štúdie, ktoré sa zameriavajú na poranenie kĺbnej chrupavky s možnosťami liečby pomocou implantácie autológnych chondrocytov a mezenchýmových kmeňových buniek. Využitie kmeňových buniek pri liečbe zvlášť chondrálnych defektov preto začína prinášať svoje prvé ovocie v podobe dobrých výsledkov a s nádejou lepšieho pooperačného priebehu.

Kľúčové slová

defekt, chondrocyt, kmeňová bunka, implantácia

Summary

Nowadays are chondral defects treated by operative methods, fixations, implant insertions, which many times impaired musculoskeletal system or lead in patient's mobility loss which rises helathcare cost around the world. Today we know many experimental studies which debate the application of implantation of chondral autologous and mesenchymal stem cells in treatment of chondral defects. The application of stem cells in treatment of chondral defects brings it's first results and hope of better postoperative course.

Keywords

defect, chondrocyte, stem cell, implantation

Materiál a metódy

V modernej ortopédií a traumatológii je nutné hľadať ideálne tkanivové náhrady defektov kĺbnej chrupavky, ktoré vedú k jej úplnej regenerácii so zachovaním jej funkčných a mechanických vlastností.

Pri abrazičných výkonoch na kolene je snaha o vycestovanie a aktivovanie stromálnych kmeňových buniek zo subchondrálnej kosti v defekte, ktoré majú byť základom pre nové tkanivo (návrty, mikrofraktúry, mozaikoplastika). Tieto metódy však neprinášajú plnohodnotnú náhradu v podobe hyalínnej chrupavky, a preto prichádzajú do klinickej praxe nové možnosti odberu a manipulácie s mezenchymálnymi kmeňovými bunkami, ktoré je možné pripraviť ako autogénny alebo alogénny transplantát progenitorov hyalínnej chrupavky, ktorý vieme na vhodnom nosiči dopraviť na miesto defektu. (5) Tu dokáže splniť

aj úlohu dočasného krytia defektu, dokým sa pôvodné tkanivá neobnovia. V riešení je ale aj mechanická stabilita transplantátu, ktorý má hlavne vo vodnom prostredí kolenného kĺbu sťažené podmienky, preto je ho nutné fixovať dostupnými metódami (fibrínové lepidlo, sutura).

Na vhodnom nosiči - scafolde by spomínané chondrocyty mali mať dostatočné živiny na prežitie a mali by mať tak vhodné podmienky na uchytenie a rast v defekte.

V tomto smere je nutná aj spolupráca s bunkovým inžinierstvom a s bankou s kmeňovými bunkami. (6)

Ideálny nosič – scaffold by mal obsahovať vhodné rastové faktory aby podporil moduláciu a proliferáciu buniek vedúcu k funkčnej regenerácii defektu. Mohol by rovnako slúžiť aj ako rezervoár cytokínov a biologických faktorov, ktoré by mohli byť postupne uvoľňované v mieste defektu. V súčasnej medicíne sa ponúkajú v liečbe defektov chrupavky kolena nosiče v podobe kolagénovej sieťky alebo sieťky z kyseliny hyalurónovej. Od roku 1994 je popisovaná a využívaná pri veľkých chondrálnych defektoch autológna implantácia chondrocytov na kolagénovej membráne (ACI-C) s nutnosťou fixácie sutúrou a fibrínového lepidla. Nové metódy priniesli obojstrannú tzv. matrix-asistovanú membránu (MACI) z fibróznych vlákien a chondrocytov, ktorá si sutúru nevyžaduje a na jej fixáciu postačuje iba fibrínové lepidlo. Hoci su v dnešnej dobe výsledky implantácie chondrocytov na vhodnom nosiči porovnateľné s návrtmi alebo mozaikoplastikou, majú význam v liečbe väčších chondrálnych defektov s možnosťou ich prekrytia a skrývajú veľký potenciál uplatniť ich v liečbe chondrálnych defektov u detských pacientov. Našou snahou do budúca je prekonanie súčasných vedeckých a etických limitov s využitím potenciálu kmeňových buniek aj u detských pacientov vo viere dosiahnuť dobré dlhotrvajúce výsledky. (7)

Výsledky

V súčasnosti existujú viaceré limitácie klinického použitia mezenchymálnych kmeňových buniek. Najzávažnejšou limitáciou je to, že nevieme zaručiť dlhotrvajúci efekt týchto kmeňových buniek po aplikácii. Rovnako existuje riziko možnosti zvrhnutia aplikovaných buniek v maligne procesy pod vplyvom ich možnej genetickej nestability. V štúdiách sa zatiaľ nepotvrdil ich dlhotrvajúci efekt a ich prítomnosť v defektoch v dlhodobom sledovaní bola nízka. Nie celkom preskúmané sú aj možnosti podania. V preklinických štúdiách je popisovaný nižší efekt kmeňových buniek po transfúzií kostnej drene, pravdepodobne pre supresorové endogénne alebo exogénne faktory vplyvajúce na organizmus. (1,4) Naopak väčší účinok bol dokázaný po priamom intravenóznom podaní do kostnej drene na rozdiel od bežnej konvenčnej transfúzie kostnej drene. V neposlednom rade si využívanie kmeňových buniek vyžaduje špeciálne vybavenie v nemocnici alebo v špecializovaných centrách, určené na ich množenie, skladovanie a v konečnom dôsledku aj správne použitie v terapeutickom procese.

V liečbe chondrálnych defektov je potrebné prekonať mnohé úskalía, akými sú hlavne etické aspekty použitia kultivovaných buniek a ich prenos na miesto poškodenia ideálne na vhodnom nosiči do organizmu človeka.

Diskusia

Diskutovanou metódou v súčasnosti je implantácia autológnych chondrocytov do miesta defektu (ACI). Metóda bola objavená v roku 1987 vo Švédsku a v roku 1994 Brittberg s kolektívom publikovali prvé úspešné výsledky z izolovaných lézií femorálnych kondylov. Táto metóda sa stala okamžite populárnou po celom svete. Rozvoj bioinžinierstva prinieslo viaceré vylepšenia a tak technológia priniesla aj tzv. biodegradačné nosiče – scaffoldy určené na rast buniek. Poslednú dekádu sa využívajú matrix – asistované autológne implantácie chondrocytov (MACI), ktoré prinášajú lepšie klinické výsledky ako prvá generácia ACI-C.

Technika sa skladá z artroskopického odberu zdravej chrupavky odobratej z nezáťažovej zóny na kĺbnom povrchu a vzorky sú zaslané na autológnu kultiváciu. Druhým krokom je samotná implantácia kultivovaných buniek do miesta defektu. Z tohto vyplýva, že táto metóda liečby vyžaduje dvojdobú operačnú techniku. (3)

Pri použití ACI-C techniky sa v druhom kroku sa na miesto defektu implantuje samotná kolagénová membrána z kolagénu I/III s nutnou suturou a s použitím fibrínového lepidla. Na miesto membrány sa potom implantujú nakultivované chondrocyty.

Novšia metóda za použitia MACI prináša výhody hlavne v druhom kroku samotnej implantácie chondrocytov. Existujú inštrumenty kedy je možné metódu MACi vykonať aj artroskopicky. Využíva sa dvojvrstvová matrix asociovaná membrána. Z jednej vrstvy drsná – tvorená fibrínovými vláknami a z druhej vrstvy hladká – tvorená chondrocytmi. Membrána sa dokáže implantovať na miesto defektu po jej úprave geometricky presne a vyplniť tak celý defekt. Implantuje sa drsnou stranu k defektu, ktorý je predtým ošetrovaný až na subchondrálnu kosť. Metóda si nevyžaduje suturu, iba fibrínové lepidlo. Metóda prináša priaznivé výsledky v podobe novotvorby hyalínnej chrupavky v mieste defektu.

Metóda je vhodná na použitie pre pacientov vo veku medzi 15 – 50 rokom života pri defektoch do 10 cm, je však finančne náročná.

Napriek tomu sú dnes mezenchymálne kmeňové bunky veľmi významné a sú v klinickej praxi veľkým príslubom do budúcnosti. V štúdiách boli dokázané ich jedinečné vlastnosti diferenciácie na väzivové, chrupavkové a kostné tkanivá, ako aj ich schopnosti regulovať zápalové procesy alebo imunitnú odpoveď organizmu. (2)

Predbežné predklinické výsledky vo svete ukazujú na ich široké využitie zatiaľ hlavne v dospelých ortopediách. U detí je použitie kmeňových buniek zatiaľ limitované, ale nie nemožné. Ak pochopíme diferenciáciu a správanie kmeňových buniek u dospelého pacienta, je vysoký predpoklad použitia kmeňových buniek aj u detských pacientov.

Získané nové poznatky z liečby dospelých pacientov bude možné neskôr použiť aj na liečbu ochorení u detských pacientov na ktoré dodnes liek neexistoval.

Mezenchymálne kmeňové bunky predstavujú obrovský potenciál v liečbe detských ochorení muskuloskeletálneho systému. Viaceré vrodené ochorenia kostného metabolizmu ako aj autoimunitné ochorenia na ktoré bežne dostupná terapia nezaberá spolu s defektami chrupavky dokážeme v blízkej budúcnosti liečiť práve cestou použitia mezenchymálnych kmeňových buniek. (8)

Už dnes sa využívajú kultivované chondrocyty na maticiach na liečbu veľkých chondrálnych defektov kolena so sľubnými výsledkami. Použitie týchto poznatkov v praxi je ale zatiaľ limitujúce.

Implantácia chondrocytov si vyžaduje nutnosť dvojdober operácie s veľkou reznou ranou na kolene. V porovnaní s už dnes rutinnými výkonmi akými sú návrtvy, mozaikoplastiky či mikrofraktúry, ktoré dokážeme realizovať jednorázovo sú zatiaľ výsledky porovnateľné, a preto sa v dnešnej dobe zvažuje benefit a riziko spomínanej implantácie kultivovaných chondrocytov do miesta defektu. (9)

Využitie kmeňových buniek v praxi samozrejme otvára aj mnohé etické aspekty, keďže najlepším zdrojom kmeňových buniek sú ľudské embryá. Preto existujú aj alternatívne zdroje akými sú pupočníková krv, plodová voda, tukové tkanivo, synoviálna tekutina, placenta a v neposlednom rade kostná dreň. Novodobá sa rozvíja odber kmeňových buniek z drene mliečnych zubov. (10)

Spomínané výsledky sú ale veľkým príslubom pre ich využitie v blízkej budúcnosti, a preto je našou snahou hľadať nové spôsoby ako tieto limity prekonať a využiť tak naplno už teraz známy veľký potenciál liečby kmeňovými bunkami.

Záver

Postihnutia chrupavky kĺbov u detí a adolescentov nie sú v praxi ortopéda výnimočné. Vyskytujú sa napríklad u Perthesovej choroby, koxitídach, či ako potraumatické stavy s uvoľnením fragmentu. Tieto a mnohé iné poškodenia kĺbnej chrupavky predstavujú vysoké riziko trvalých následkov s diskomfortom pre pacienta. Klinické následky týchto stavov môžu byť veľmi vážne a mnohokrát vedú k zložitým operáciám.

Okrem už zaužívaných liečebných metód hľadá súčasná medicína aj metódy liečby defektov kĺbnej chrupavky, ktoré by viedli k úplnej regenerácii tkanív so zachovaním ich funkčných vlastností. Možnosti liečby ponúka využitie kmeňových buniek, ktoré po diferenciácií vedú k novotvorbe tkanív.

Neustále sa prehlbujúce znalosti v chondrogenéze umožňujú nasmerovať diferenciáciu kmeňových buniek smerom ku chondrocytom.

Využitie týchto novodobých znalostí v praxi si vyžaduje odber auto alebo aloštetu, napríklad odber fragmentu z miesta traumy. V spolupráci s bankou kmeňových buniek by bolo možné z odbratých štepov bunky kultivovať a na základe výsledkov potom nakultivované bunky na vhodnom nosiči transplantovať na miesto lézie. Ideálny nosič by mal poskytnúť príslušné bioaktívne faktory, ktoré budú potencovať proliferáciu a špecifickú cestu diferenciácie a remodelácie tkanív podporujúce funkčnú regeneráciu.

Literatúra

- 1. Augello A. - Tasso R. - Negrini S.M. - Cancedda R. - Pennesi G.:** Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. In *Arthritis Rheum*, 56, 2007, s. 1175–86
- 2. Caplan A.I. - Elyaderani M. - Mochizuki Y. - Wakitani S. - Goldberg V.M.:** Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* ;342, 1997, s. 254–69
- 3. Dungal P. a kolektív.:** 2005: Ortopédie. 1 vyd. Praha: GRADA, 1280 s. ISBN 80-247-0550-8.
- 4. Gál P. - Nečas A. - Adler J. - Teyschl O. - Fabián P. - Bibrová Š. :** Transplantation of the Autogenous Chondrocyte Graft to Physeal Defects: An Experimental Study in Pigs. In *Acta Vet*, 71, 2002, s. 327–332
- 5. Chang C.H. - Stanton R.P. - Glutting J.:** Unicameral bone cysts treated by injection of bone marrow or methylprednisolone. *J Bone Joint Surg Br* 2002, 84, s.: 407–412
- 6. Cho H.S. - Oh J.H. - Kim H.S. - Kang H.G. - Lee S.H.:** Unicameral bone cysts: a comparison of injection of steroid and grafting with autologous bone marrow. *J Bone Joint Surg Br* 2007, 89, s.: 222–6
- 7. Kaiser L.R.:** The future of multihospital systems. In *Top Health Care Financ*, 18 (4), 1992, s. 32–45
- 8. Le Blanc K. - Gotherstrom C. - Ringden O. et al.:** Fetal mesenchymal stemcell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. In *Transplantation*, 2005, 79, s. 1607–14
- 9. Owen M. - Friedenstein A.J.:** Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988, 136, s.: 42-60
- 10. Peterson L. - Vasiliadis H.S. - Brittberg M. - Lindahl A.:** Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. In *Am J Sports Med*, 2010;38(6), s. 1117–1124

EXPRESIA HYPOXIOU-INDUKOVANÉHO FAKTORA 1 α A KARBONICKEJ ANHYDRÁZY IX V KOLOREKTÁLNYCH KARCINÓMOCH

(Expression of hypoxia-inducible factor 1 α and carbonic anhydrase IX in colorectal cancer)

Veronika Tupá¹, Slávka Drahošová², Marián Grendár³, Marian Adamkov¹

¹ Ústav histológie a embryológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4, 036 01 Martin, veronika.tupa@jfmed.uniba.sk

² Hermes LabSystems, s.r.o., Bratislava, Púchovská 12, 831 06 Bratislava

³ Oddelenie bioinformatiky BioMed Martin, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4C/4D, 036 01 Martin

Súhrn

Hypoxia predstavuje charakteristický znak solídnych nádorov, vrátane kolorektálneho karcinómu (CRC). Proteín HIF-1 α vykazuje v reakcii na hypoxiu zvýšenú expresiu, čo má za následok up-reguláciu niektorých génov (napríklad CA9). Proteín CA IX sa podieľa na prežívaní hypoxických nádorových buniek v nádorovom mikroprostredí, pričom je preukázaná jej nadmerná expresia v rôznych typoch nádorov (vrátane CRC). V predkladanej štúdii sme imunohistochemicky detegovali expresiu HIF-1 α a CA IX v súbore 111 prípadov CRC. Expresiu týchto proteínov sme korelovali s klinicko-morfologickými parametrami CRC a navzájom. HIF-1 α bol exprimovaný v 80/111 prípadoch (72,1%). Pozorovali sme jadrovú lokalizáciu a intenzita imunoreakcie bola väčšinou silná (71,2%). CA IX bola detegovaná v 84/111 prípadoch CRC (75,7%). Väčšina prípadov vykazovala membránovú pozitivitu (68,5%) a silnú intenzitu imunoreakcie (73,0%). Nezaznamenali sme žiadne štatisticky významné asociácie expresie pozorovaných proteínov s klinicko-morfologickými parametrami. Štatistická analýza potvrdila významnú koreláciu medzi expresiou HIF-1 α a CA IX. Nadmerná expresia CA IX v tkanivách CRC je regulovaná HIF-1 α , čo môže naznačovať, že CA IX je prirodzeným markerom hypoxie nádorov.

Kľúčové slová

hypoxia, hypoxiou-indukovaný faktor 1 α , karbonická anhydráza IX, kolorektálny karcinóm, imunohistochemia

Summary

Hypoxia is a characteristic feature of solid tumors, including colorectal cancer (CRC). The HIF-1 α protein shows increased expression in response to hypoxia, resulting in up-regulation of some genes (e.g. CA9). CA IX protein is involved in the survival of hypoxic tumor cells in the tumor microenvironment, with overexpression in various types of tumors (including CRC). In the present study, we immunohistochemically detected the expression of HIF-1 α and CA IX in a set of 111 cases of CRC. The expression of these proteins was correlated with the clinico-morphological parameters of CRC and each other. HIF-1 α was expressed in 80/111 cases (72.1%). We observed nuclear localization and immunoreaction intensity was

mostly strong (71.2%). CA IX was detected in 84/111 cases of CRC (75.7%). Most cases showed membrane positivity (68.5%) and strong immunoreaction intensity (73.0%). We did not record any statistically significant associations between our proteins expression and clinico-morphological parameters. Statistical analysis confirmed a significant correlation between the expression of HIF-1 α and CA IX. Overexpression of CA IX in CRC tissues is regulated by HIF-1 α , which may indicate that CA IX is a natural marker of tumor hypoxia.

Keywords

hypoxia, hypoxia-inducible factor 1 α , carbonic anhydrase IX, colorectal cancer, immunohistochemistry

Úvod

Solidné nádory často vytvárajú hypoxické oblasti v dôsledku nedostatočného prísunu kyslíka nepravidelnými a funkčne nedokonalými cievami. Hypoxia je biologicky a klinicky dôležitý jav s výraznými vplyvmi na fenotyp a progresiu nádoru. Prispieva k nej mnoho rôznych faktorov, vrátane rýchleho rastu nádorovej masy a jej nedostatočnej vaskularizácie. Je pozorovaná asi u jednej tretiny malígnych ochorení, vrátane kolorektálnych karcinómov (CRC). CRC je tretím najčastejším nádorovým ochorením s vysokým výskytom aj v Slovenskej republike (1,2).

Hypoxia predstavuje nepriaznivý faktor, ktorý môže viesť v mnohých situáciách k bunkovej smrti. Znížená dostupnosť kyslíka všeobecne stimuluje bunkové adaptačné procesy, vrátane presunu na glykolytický metabolizmus, spomalenia proliferácie buniek, straty bunkovej adhézie, zvýšenia migrácie, invázie, angiogenézy a ďalších zmien, ktoré umožňujú metastázovanie a sú energeticky úsporné (3). K týmto zmenám dochádza v dôsledku masívnej remodelácie transkripčného programu, ktorý je aktivovaný heterodimérnym transkripčným faktorom nazývaným hypoxiou-indukovaný faktor (HIF), ktorý koordinuje zmenu v génovej expresii ako odpoveď na hypoxiu (4,5). HIF-1 sa podieľa na adaptácii na hypoxiu a je zložený z dvoch podjednotiek, HIF-1 α a HIF-1 β (1).

Korelácia medzi hypoxiou a zlou prognózou, rovnako ako odolnosť na bežné spôsoby liečby, viedli k zavedeniu upravených liečebných postupov a nových prognostických a prediktívnych markerov do klinickej praxe. Ako jeden z najperspektívnejších markerov hypoxie sa javí expresia karbonickej anhydrázy IX (CA IX) (6,7). CA IX je zvyčajne silno exprimovaná v nádorových tkanivách v hypoxických podmienkach. Jej expresia je v prvom rade regulovaná na úrovni transkripčnej aktívácie. Primárnu molekulovú odpoveď na nedostatok kyslíka predstavuje stabilizácia a aktivácia podjednotky HIF-1 α (1).

V podmienkach hypoxie sa zvýši akumulácia HIF-1 α v cytoplazme, ktorá je následne translokovaná do bunkového jadra, kde interaguje s neustále tvorenou HIF-1 β podjednotkou a tak dochádza k vytvoreniu aktívneho HIF-1 transkripčného faktora. Promótor génu *CA9* obsahuje hypoxia rezponzívny element (HRE), ktorý sa viaže na HIF-1 v mieste promótoru a indukuje transkripciu génu *CA9* ako reakciu na hypoxiu mikroprostredia (1,4).

Materiál a metódy

V našej práci bol analyzovaný archívny materiál, uskladnený vo forme parafínových bločkov. Skúmaný súbor tvorilo 111 vzoriek CRC, ktoré pochádzali z diagnosticky uzavretých prípadov. V analyzovanom súbore CRC boli hodnotené nasledovné klinicko-morfologické charakteristiky: vek pacientov, pohlavie, grade, stage, lokalizácia lézie, stav lymfatických uzlín a vaskulárna invázia.

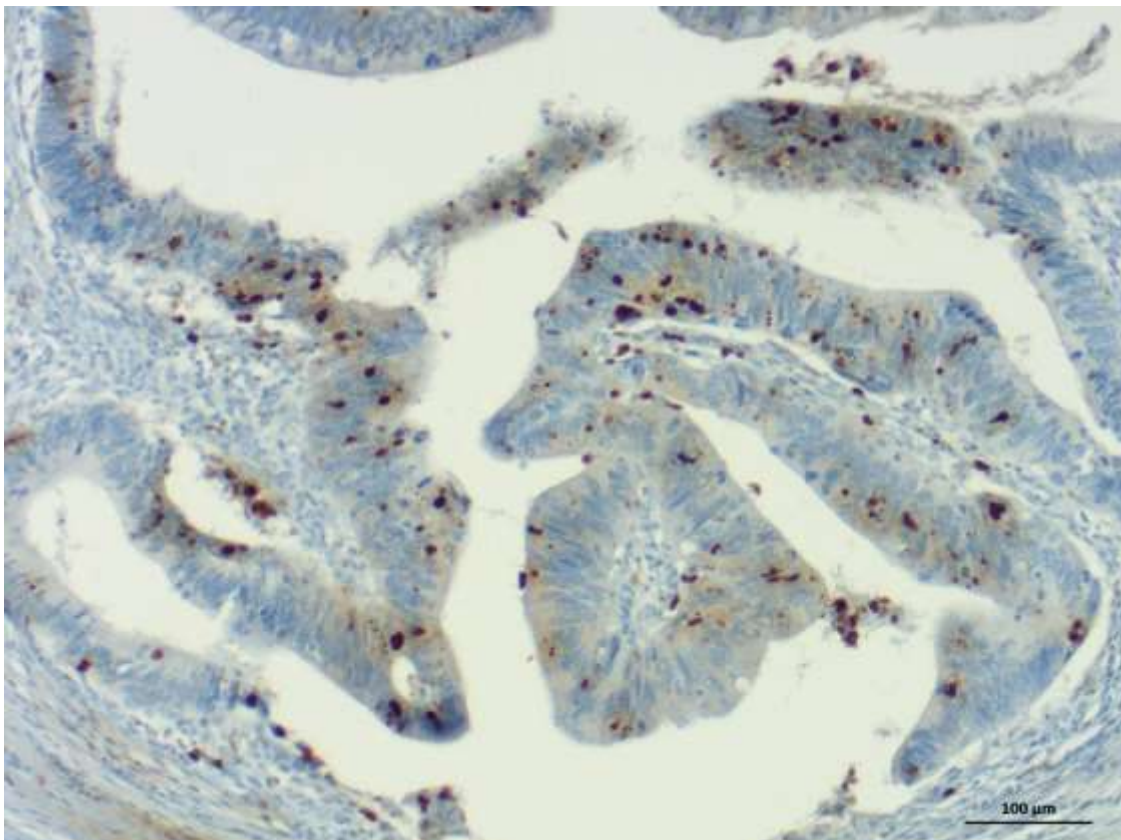
Z každého parafínového bločku boli pomocou rotačného mikrotómu (Leica Biosystems, Nemecko) narezané dva 4 μ m hrubé rezy na dôkaz HIF-1 α a CA IX. Preparáty pre imunohistochemickú analýzu boli farbené v autostaineri Ventana BenchMark® ULTRA

(Roche, USA). Monoklonálna protilátka proti HIF-1 α (klon EP118; Epitomics, USA) bola riedená v pomere 1:200 a proti CA IX (klon: H-11; Zeta corporation, USA) v pomere 1:300. Reakcia bola pri CA IX vizualizovaná Fast Red chromogénom (Roche) a pri HIF-1 α DAB chromogénom (Roche).

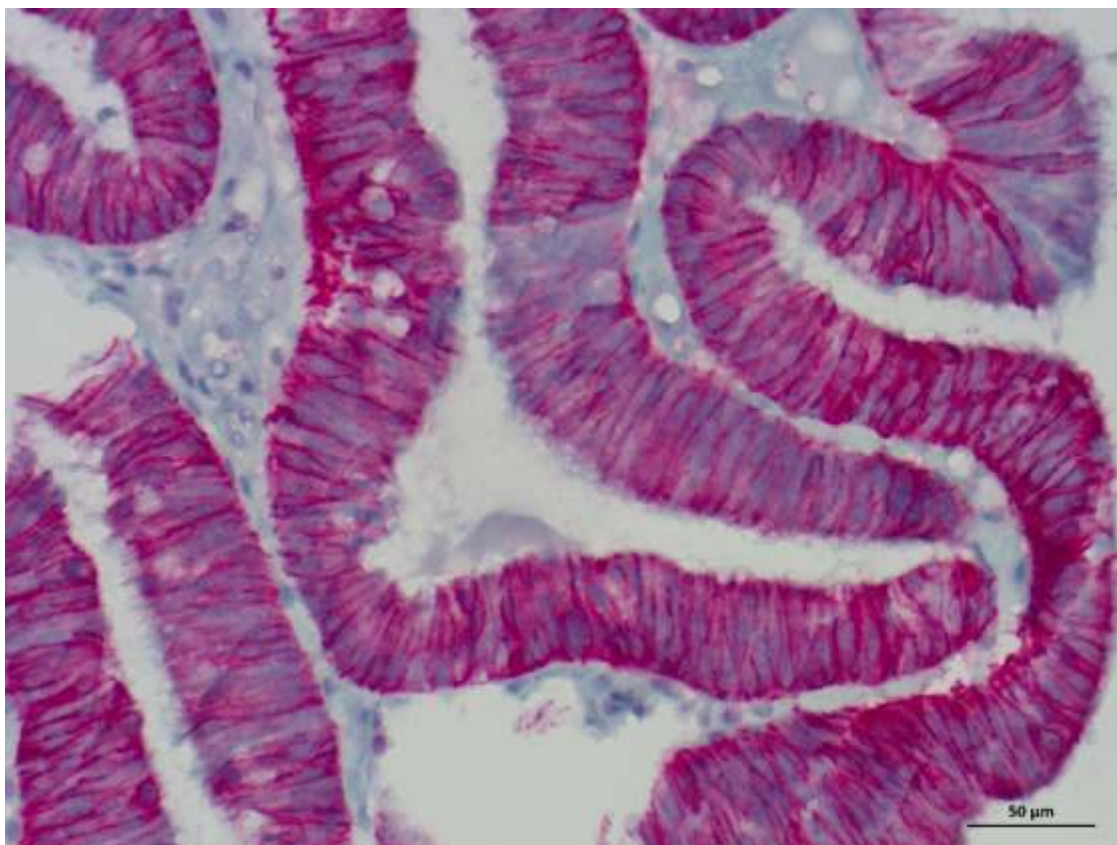
Pri interpretácii získaných imunohistochemických vyšetrení sme semikvantitatívne hodnotili subcelulárnu lokalizáciu, intenzitu imunoreakcie a percento pozitívnych buniek. Štatistické hodnotenie sa realizovalo pomocou programu R software (version 3.2.3) (8). V predkladanej práci boli použité Chi-kvadrát test (χ^2) a Spearmanov korelačný koeficient. Za štatisticky významnú sme považovali hodnotu $p < 0,05$.

Výsledky

HIF-1 α bol exprimovaný v 80/111 (72,1%) prípadoch. Vo všetkých prípadoch sme detegovali jadrovú lokalizáciu imunoreakcie, pričom väčšina vykazovala silnú intenzitu (71,2%) (Obr. 1). Chi kvadrát testom neboli potvrdené žiadne významné asociácie medzi klinicko-morfologickými charakteristikami CRC (vek pacientov, pohlavie, grade, stage, lokalizácia lézie, stav lymfatických uzlín a vaskulárna invázia) a parametrami expresie HIF-1 α ($p > 0,05$). Expresiu CA IX sme pozorovali v 84/111 (75,7%) prípadoch CRC. Pozitívne prípady vykazovali prevažne membránovú lokalizáciu imunoreakcie (68,5%) a silnú intenzitu (73%) (Obr. 2). Chi kvadrát test nepotvrdil žiadne významné asociácie medzi klinicko-morfologickými charakteristikami CRC (vek pacientov, pohlavie, grade, stage, lokalizácia lézie, stav lymfatických uzlín a vaskulárna invázia) a parametrami expresie CA IX ($p > 0,05$).



Obr. 1 Silná jadrová pozitivita nádorových buniek CRC na dôkaz HIF-1 α .



Obr. 2 Silná membránová pozitivita nádorových buniek CRC na dôkaz CA IX.

Chi kvadrát test preukázal signifikantnú koreláciu medzi expresiou HIF-1 α a CA IX ($p < 0,05$). Spearmanovým korelačným koeficientom (r) bola zistená stredná pozitívna korelácia medzi pozitívnymi a negatívnymi prípadmi, stredná pozitívna korelácia pri intenzite a slabá pozitívna korelácia pri percente pozitívnych buniek. Sumarizáciu získaných výsledkov znázorňuje Tab. 1.

	HIF-1α	CA IX
Negatívne prípady	31 (27,9%)	27 (24,3%)
Pozitívne prípady	80 (72,1%)	84 (75,7%)
Hodnota p	9.06E-07 ($r=0,6$)	
Intenzita imunoreakcie		
+	0	0
++	1 (0,9%)	3 (2,7%)
+++	79 (71,2%)	81 (73%)
Hodnota p	2.65E-06 ($r=0,5$)	
Percento pozitívnych buniek		
11 – 25%	62 (55,9%)	28 (25,2%)
26 – 50%	13 (11,7%)	24 (21,6%)
>50%	5 (4,5%)	32 (28,8%)
Hodnota p	3.09E-06 ($r=0,3$)	

Tab.1 Korelácia expresie HIF-1 α a CA IX v CRC.

Diskusia

V našej sérii 111 prípadov CRC bol HIF-1 α exprimovaný v 72,1%. Pozitívne prípady vykazovali jadrovú lokalizáciu expresie s prevažne silnou intenzitou imunoreakcie (71,2%).

Kuwai et al. (9) vo svojej práci pozorovali expresiu HIF-1 α v 58,3% prípadov CRC, pričom išlo o silnú jadrovú lokalizáciu imunoreakcie. Greijer et al. (10) detegovali HIF-1 α v 78% prípadov CRC a Saka et al. (11) v 94% prípadov, v oboch štúdiách s jadrovou lokalizáciou expresie. Furlan et al. zaznamenali expresiu HIF-1 α v 77% prípadov CRC, pričom pozitívne bunky vykazovali strednú alebo silnú intenzitu imunoreakcie. Podľa našich výsledkov a údajov z literatúry je HIF-1 α vysoko exprimovaný v CRC a jeho expresia sa prejavuje prevažne silnou imunoreakciou, čo môže súvisieť s vysokou akumuláciou tohto proteínu v bunkách CRC.

Štatistickou analýzou sme nepotvrdili žiadne významné asociácie medzi expresiou HIF-1 α a klinicko-morfologickými parametrami (vek, pohlavie, grade, stage, lokalizácia lézie, stav LU, vaskulárna invázia). Podobne aj Yoshimura et al. (12) a Furlan et al. (13) nepotvrdili významné korelácie medzi HIF-1 a klinicko-morfologickými parametrami CRC. Naproti tomu, Kuwai et al. (9) a Wu et al. (14) zistili, že expresia HIF-1 α významne koreluje s nádorovou inváziou, vysokým stagingom a stavom LU.

V našej skupine 111 CRC sme zaznamenali expresiu CA IX v 75,7% prípadov s prevažne silnou imunoreakciou (73%). Saarnio et al. (15) ako prví študovali expresiu CA IX v CRC a zistili, že 76% prípadov bolo pozitívnych, pričom pozorovali slabú intenzitu imunoreakcie CA IX v 29% prípadov CRC a strednú až silnú v 47% vzoriek. Ďalší autori tiež zaznamenali nadmernú expresiu tohto proteínu v CRC (16,17,18). Z nich Hong et al. (17) detegovali strednú až silnú intenzitu v 77,4% prípadov. Expresia CA IX je vo všeobecnosti, rovnako ako pri HIF-1 α , vo väčšine prípadov vysoká a silná, čo môže súvisieť s vysokým nahromadením proteínu v bunkách CRC.

CA IX je transmembránový proteín a jej krátky úsek zasahuje aj do cytoplazmy buniek. V našom súbore CRC sme detegovali okrem membránovej lokalizácie (68,5%) aj kombinovanú membránovu a cytoplazmovú pozitivitu (7,2%). Goethals et al. (19) vo svojej štúdií pozorovali membránovú lokalizáciu imunoreakcie, ale aj miernu cytoplazmovú pozitivitu. Saka et al. (11) tiež zaznamenali membránovú imunoreakciu, pričom len v niektorých prípadoch ju sprevádzala aj cytoplazmová pozitivita.

V predloženej práci sme nezaznamenali žiadne významné vzťahy medzi expresiou CA IX a klinicko-morfologickými parametrami CRC. Naše výsledky sa zhodujú s ďalšími štúdiami (11,20), v ktorých tiež nepozorovali významné korelácie medzi CA IX a klinicko-morfologickými charakteristikami pacientov s CRC. V práci Clevana et al. (16) bola preukázaná významná korelácia medzi expresiou CA IX a TNM stagingom. Ho a Coomber (21) pozorovali, že vek je významne asociovaný s vysokou expresiou CA IX. Rasheed et al. (18) vo svojej štúdií pozorovali významnú koreláciu medzi pozitivitou CA IX a stavom LU. Výsledky z literatúry sú značne heterogénne, čo môže súvisieť s použitím odlišnej metodiky a klasifikačných systémov v štúdiách.

HIF-1 α podľa niektorých autorov (22,23,24) významne koreluje s CA IX v mnohých typoch nádorov (napr. malobunkový karcinóm pľúc, krčka maternice, prsníka). Pri CRC sú štúdie nejednoznačné, preto sme v našej práci korelovali tiež expresiu HIF-1 α s expresiou CA IX. Medzi sledovanými proteínmi sme zaznamenali významne pozitívnu koreláciu. Vo väčšine prípadov sme pozorovali koincidenciu, teda pozitivitu na proteín CA IX aj HIF-1 α v tom istom prípade. Greijer et al. (10) tiež pozorovali kolokalizáciu CA IX a HIF-1 α v CRC. V niektorých prípadoch sme zaznamenali expresiu HIF-1 α , kým expresiu CA IX sme v týchto prípadoch nedetegovali. Kaluz et al. (25) prezentuje vysvetlenie, že trvá určitý čas, kým je proteín CA IX detegovateľný po transkripčnej aktivácii vyvolanej HIF-1. Clevan et al. (16) a rovnako aj Saka et al. (11) vo svojich štúdiách nepotvrdili významnú koreláciu medzi CA IX a HIF-1 α . Ich zistenia naznačujú, že expresia HIF-1 α nie je primárne zodpovedná za indukciu expresie CA IX, ktorá je pravdepodobne regulovaná aj inými faktormi a/alebo signálnymi dráhami funkčnými v rámci nádorového mikroprostredia.

Záver

Pri analýze HIF-1 α a CA IX sme pri obidvoch proteínoch zaznamenali vysokú expresiu v CRC. Ich štatistickým porovnaním sme zistili pozitívnu signifikantnú koreláciu. Z našich výsledkov vyplýva, že medzi HIF-1 α a CA IX existuje vzájomná asociácia a hypoxia je jedným z hlavných regulátorov CA IX. Prítomnosť hypoxie má nepriaznivý vplyv na prognózu ochorenia, pričom hypoxické nádory odolávajú chemoterapii a rádioterapii. Eliminovanie hypoxických nádorových buniek môže poskytnúť významný terapeutický prínos. Jedným z prístupov k takejto stratégii je aj ovplyvnenie CA IX ako prirodzeného markera hypoxie.

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0129/16 a UK/98/2016.

Literatúra

1. **Pastorekova S, Ratcliffe PJ, Pastorek J.** Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia. *BJU International* 2008; 101: 8-15.
2. **Vavrečka A.** Epidemiológia, etiológia, klinický obraz a prevencia kolorektálneho karcinómu. *Via pract* 2010; 7 (1): 10-13.
3. **Semenza GL.** Hypoxia – inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 207-214.
4. **McIntyre A, Patiar S et al.** Carbonic Anhydrase IX Promotes Tumor Growth and Necrosis In Vivo and Inhibition Enhances Anti-VEGF Therapy. *Clin. Cancer Res* 2012; 18 (11): 3100-3111.
5. **Takáčová M, Pastoreková S.** Nádorová hypoxia – molekulárne mechanizmy a klinický význam. *Klin Onkol* 2015; 28 (3): 183-190.
6. **Pastoreková S (Ed).** Molekulárna biológia rakoviny. Bratislava; VEDA & CVTI, 2009: 29-60.
7. **Chitneni SK, Palmer GM et al.** Molecular imaging of hypoxia. *J. Nucl. Med* 2011; 52: 165-168.
8. <https://www.R-project.org/> (2. 11. 2018)
9. **Kuwai T, Kitadai Y et al.** Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105 (2): 17681.
10. **Greijer AE, Delis-van Diemen PM et al.** Presence of HIF-1 and related genes in normal mucosa, adenomas and carcinomas of the colorectum. *Virchows Arch* 2008; 452 (5): 53-44.
11. **Saka B, Ekinci O et al.** Clinicopathologic and prognostic significance of immunohistochemical expression of HIF-1 α , CXCR4 and CA9 in colorectal carcinoma. *Pathology – Research and Practice* 2017; 213: 783-792.
12. **Yoshimura H, Dhar DK et al.** Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (24): 8554-60.
13. **Furlan D, Sahnane N et al.** Up-regulation and stabilization of HIF-1alpha in colorectal carcinomas. *Surgical Oncology* 2007; 16: 25-27.
14. **Wu Y, Jin M et al.** Clinicopathologic Significance of HIF-1 α , CXCR4, and VEGF Expression in Colon Cancer. *Clinical and Developmental Immunology* 2010; 10.
15. **Saarnio J, Parkkila S et al.** Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol* 1998; 153: 279-285.
16. **Cleven AH, van Engeland M et al.** Stromal expression of hypoxia regulated proteins is an adverse prognostic factor in colorectal carcinomas. *Cellular Oncology* 2007; 29: 229-240.

- 17. Hong YS, Cho HJ et al.** Carbonic anhydrase 9 is a predictive marker of survival benefit from lower dose of bevacizumab in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 1-9.
- 18. Rasheed S, Harris AL et al.** Assessment of microvessel density and carbonic anhydrase-9 (CA-9) expression in rectal cancer. *Pathol Res Pract* 2009; 205: 1-9.
- 19. Goethals L, Debucquoy A et al.** Hypoxia in human colorectal adenocarcinoma: comparison between extrinsic and potential intrinsic hypoxia markers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 246-254.
- 20. Viikilä P, Kivelä AJ et al.** Carbonic anhydrase enzymes II, VII, IX and XII in colorectal carcinomas. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 8168-8177.
- 21. Ho N, Coomber BL.** Hexokinase II expression is correlated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Treatment Communications* 2016; 6: 11-16.
- 22. Swinson DE, Jones JL et al.** Hypoxia-inducible factor-1 alpha in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *Int J Cancer* 2004; 111 (1): 43-50.
- 23. Vleugel MM, Greijer AE et al.** Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1alpha expression in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58 (2): 172-7.
- 24. Iwasaki K, Yabushita H et al.** Role of hypoxia-inducible factor-1 α , carbonic anhydrase-IX, glucose transporter-1 and vascular endothelial growth factor associated with lymph node metastasis and recurrence in patients with locally advanced cervical cancer. *Oncol Lett* 2015; 10 (4): 1970-1978.
- 25. Kaluz S, Kaluzová M et al.** Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim Biophys Acta* 2009; 1795 (2): 162-72.

NIEKTORÉ ANTIPROTEINÁZY V SÉRE PACIENTOV S CROHNOVOU CHOROBOU

(Some antiproteases in sera of patients with Crohn's disease)

*Ladislav Turecký¹, Viera Kupčová², Monika Ďurfinová¹, Milada Laššánová¹,
Eva Uhlíková¹*

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK, 81108 Bratislava,
ladislav.turecky@fmed.uniba.sk

²III.interná klinika LFUK, Bratislava

Súhrn

Crohnova choroba je chronické zápalové ochorenie s multifaktoriálnou etiologiou. Jedným z dôležitých faktorov v patogenéze Crohnovej choroby je zvýšená hladina prozápalového cytokínu - tumor nekrotizujúceho faktora alfa (TNF α). Zápalová reakcia, aktivácia imunokompetentných buniek ako aj nekróza buniek čreva sú sprevádzané uvoľnením väčšieho množstva proteináz do cirkulácie. Dôležitou súčasťou liečby pacientov s Crohnovou chorobou je aj imunomodulačná liečba. Cieľom našej práce bolo študovať účinky anti-TNF α protilátok na hladiny antiproteáz – alfa-2-makroglobulínu a alfa-1-antitrypsínu u pacientov s aktívnou Crohnovou chorobou.

Vyšetrovaný súbor tvorilo 14 pacientov s aktívnou Crohnovou chorobou. Všetci pacienti dostali 5 mg anti-TNF α na kg telesnej hmotnosti.

Biochemické parametre boli vyšetované pred začatím liečby a jeden a štyri mesiace po podaní anti-TNF α . Hladiny antiproteáz (α -1-antitrypsín a alfa-2-makroglobulín) ako aj α -1-kyslého glykoproteínu boli vyšetované imunochemicky.

Liečba bola pacientmi dobre tolerovaná a nevyskytli sa žiadne nežiaduce účinky lieku počas celého sledovaného obdobia. Liečba zlepšovala klinický stav našich pacientov, o čom svedčí aj signifikantný pokles indexu CDAI (236 vs. 132). Proteíny akútnej fázy boli pred zahájením liečby zvýšené a po mesiaci od podania anti-TNF α sa signifikantne znížili. Sérová hladina alfa-2-makroglobulínu bola pred začatím liečby významne znížená a po podaní anti-TNF α sa zvyšovala.

Zníženie hladiny alfa-2-makroglobulínu v sére pacientov v akútnej fáze Crohnovej choroby pravdepodobne podmieňuje jeho zvýšená spotreba. Zvyšovanie jeho hladiny v priebehu liečby je zrejme dôsledkom zníženia aktivity zápalového procesu a jeho zníženej spotreby.

Kľúčové slová

Crohnova choroba, antiproteázy, alfa-2-makroglobulín, alfa-1-antitrypsín, infliximab

Summary

Crohn's disease is a chronic inflammatory disease with a multifactorial aetiology. One important factor in the pathogenesis of Crohn's disease is an increased level of pro-inflammatory cytokine-tumor necrosis factor-alpha (TNF α). Inflammatory reactions, activation of immunocompetent cells as well as necrosis of enterocytes are accompanied by the release of more proteinases into the circulation. An immunomodulatory treatment is also an important part of the treatment of patients with Crohn's disease. The aim of our work was

to study the effects of anti-TNF α antibodies on antiprotease levels - alpha-2-macroglobulin and alpha-1-antitrypsin in patients with active Crohn's disease.

Fourteen patients with active, moderate to severe Crohn's disease were included. Patients received 5 mg per kg body weight of anti-TNF α antibody (infliximab) in intravenous infusion. Serum levels of alpha-2-macroglobulin, alpha-1-acid glycoprotein and alpha-1-antitrypsin were assessed in all patients before therapy and in month 1 and 4 after therapy. Concentrations of proteins were determined immunochemically.

The treatment was well tolerated, no side effects related to treatment with infliximab were observed during the whole follow-up. Significant drop in Crohn's disease activity index was observed one month after application of infliximab (236 vs. 132). Acute phase proteins were significantly increased before therapy with significant decrease after one month of therapy. Serum level of alpha-2-macroglobulin before beginning of therapy with anti TNF α was significantly decreased. After administration of infliximab the macroglobulin level gradually increased.

Decreasing the alpha-2-macroglobulin level in the serum of patients in the acute phase of the Crohn's disease is likely due to its increased consumption. Increasing its level during treatment is probably due to a decrease in the activity of the inflammatory process and its decreased consumption.

Keywords

Crohn's disease, antiproteases, alpha-2-macroglobulin, alpha-1-antitrypsin, infliximab

Úvod

Zápalové ochorenia čreva (IBD) sú multifaktoriálnou poruchou imunity charakterizovanou chronickým relapsujúcim zápalom čreva. Crohnova choroba (CD) je spolu s ulceróznou kolitídou jednou z dvoch najčastejších foriem IBD. Zatiaľ čo ulcerózna kolitída sa obmedzuje len na hrubé črevo, CD je charakterizovaná transmurálnym a diskontinuálnym zápalom postihujúcim tráviaci trakt, s najčastejším postihnutím terminálneho ilea a proximálnej časti hrubého čreva (21,22). Aj keď presná etiológia CD ostáva stále nejasná, predpokladá sa, že rozhodujúcu úlohu v narušení intestinálnej homeostázy vedúcej ku dysregulačnej zápalovej reakcii v čreve zohráva interakcia medzi imunitným systémom a mikrobiálnymi faktormi po aktivácii niektorými environmentálnymi faktormi u geneticky predisponovaných osôb. Zápalové poškodenie črevnej steny je tak dôsledkom aberantnej expzie prozápalových a protizápalových molekúl zúčastňujúcich sa procesov ako vrodenej tak aj získanej imunity (4). Významným patobiochemickým mechanizmom podieľajúcim sa na patogenéze zápalového poškodenia steny čreva je aj zvýšenie oxidačného stresu. Je známe, že kľúčovú úlohu v patogenéze CD zohráva tumor-nekrotizujúci faktor alfa (TNF- α)(8,14), čo viedlo aj k vývoju liekov modifikujúcich priebeh choroby (2,14,23). V porovnaní s konvenčnou terapiou vykazujú anti-TNF preparáty vyššiu frekvenciu výskytu remisí ako aj ich dlhšie trvanie.

Proteinázy sú enzýmy štiepiace peptidové väzby v iných bielkovinách. Podľa katalytického mechanizmu sa proteolytické enzýmy rozdeľujú do štyroch skupín: a) serínové proteázy, b) cysteínové proteázy, c) aspartylóvé proteázy a d) metaloproteinázy. Prírodné inhibítory proteináz môžeme rozdeliť na dve skupiny na základe spektra ich aktivity na inhibítory skupinovo špecifické a inhibítory skupinovo nešpecifické. Najrozsiahlejšou je kategória skupinovo špecifických antiproteáz. Skupinovo nešpecifické antiproteinázy sú schopné inhibovať enzýmy všetkých štyroch typov proteolytických enzýmov. Patria sem napr. alfa-makroglobulíny, z ktorých u človeka je najvýznamnejší alfa-2-makroglobulín (A2MG).

Alfa-1-antitrypsín (A1AT) je relatívne malý glykoproteín s m.h. 52 kDa, zložený z 394 aminokyselín, patriaci do skupiny inhibítorov serínových proteináz, ktorého hlavným zdrojom

je pečeň. A1AT patrí aj medzi proteíny akútnej fázy. Malé množstvá A1AT sa syntetizujú aj v extrahepatálnych tkanivách, avšak A1AT nachádzajúci sa v sére pochádza prakticky len z pečene. A1AT je typickým predstaviteľom veľkorodiny inhibítorov serínových proteáz, ktoré sú si veľmi podobné ako štruktúrou tak aj funkciou. Jednou z hlavných úloh inhibítorov serínových proteáz je regulácia aktivity enzýmov zapojených do proteolytických kaskád. Reakčné centrum inhibítora serínových proteáz pozostáva z 20 aminokyselinových zvyškov a funguje ako pseudosubstrát pre cieľové proteinázy (8,9,10). Naviazanie proteinázy do reakčného centra A1AT má za následok výrazné konformačné zmeny charakterizované prechodom z tenznej do relaxovanej konformácie s presunom naviazaného enzýmu z horného pólu na dolný pól A1AT (11,12). Výsledkom týchto konformačných zmien je katalytická inaktivita proteázy a stabilizácia štruktúry A1AT (13). Komplexy proteáza-antiproteáza sa potom naväzujú na membránové receptory, čo umožňuje ich vychytenie z cirkulácie (14). Cieľom našej práce bolo zhodnotiť hladiny antiproteináz v sére pacientov s Crohnovou chorobou a študovať vplyv liečby pomocou anti-TNF α protilátky (infiximab) na ich hladiny.

Súbor a metódy

Vyšetrovaný súbor tvorilo 14 pacientov (9 žien a 5 mužov, priemerný vek 36 rokov, v rozmedzí 21 až 42 rokov) s aktívnou Crohnovou chorobou, so stredne ťažkou až ťažkou formou (priemerné trvanie choroby 10,7 rokov). Kontrolný súbor tvorilo 31 klinicky zdravých jedincov (darcovia krvi, preventívne prehliadky) s priemerným vekom 38,4 rokov. 13 pacientov bolo v poslednom roku pred zaradením do štúdie liečených preparátmi obsahujúcimi 5-aminosalicylovú kyselinu a traja užívali kortikoidy. Všetci pacienti dostali anti-TNF α (infiximab, Remicade, Schering-Plough) v dávke 5 mg/kg telesnej hmotnosti v jednej intravenózne infúzii. Ostatná sprievodná terapia (5-aminosalicylová kyselina, kortikoidy) ostala nezmenená. Pred podaním anti-TNF α protilátky bolo u všetkých pacientov urobené základné hematologické (krvný obraz, hemokoagulácia) a biochemické vyšetrenie (urea, kreatinín, ALT, AST, ALP a kaliémia) ako aj rtg vyšetrenie hrudníka za účelom vylúčenia prípadnej kontraindikácie liečby pomocou infiximabu.

U pacientov bola zhodnotená klinická aktivita choroby (CDAI-Crohn's disease activity index) a vyšetrené hladiny alfa-1-antitrypsínu a alfa-2-makroglobulínu.

CDAI zohľadňuje počet stolíc za týždeň, abdominálnu bolesť, celkový pocit nedobrého stavu, výskyt extraintestinálnych prejavov, hematokrit a telesnú hmotnosť (15). Hladiny oboch antiproteináz sme stanovovali imunochemicky elektroimunodifúziou (16) s použitím monošpecifických protilátok (SwAHuA1AT/IDP, USOL Praha, Q-SwAHu-A2M, SEVAC, Praha). Pre porovnanie sme vyšetrovali aj hladinu alfa-1-kyslého glykoproteínu (A1KG) ako predstaviteľa skupiny proteínov akútnej fázy. Tieto parametre sme vyšetřili pred podaním a potom jeden a štyri mesiace po podaní anti TNF α . V tom istom čase boli vyšetrované aj základné rutínne biochemické a hematologické parametre.

Pre štatistické vyhodnotenie boli použité neparametrické metódy. Výsledky vyjadrujeme ako aritmetický priemer \pm stredná chyba priemeru (SEM). Rozdiel medzi súbormi bol vyhodnotený Wilcoxonovým testom s použitím limitu významnosti $P < 0,05$.

Výsledky

Liečba infiximabom bola u všetkých sledovaných pacientov dobre tolerovaná a ani u jedného z nich sme počas sledovania nezaregistrovali žiadne nežiadúce vedľajšie účinky. Základné hematologické a biochemické parametre sa v priebehu liečby nemenili a ostávali v rámci referenčných hodnôt, s výnimkou dvoch pacientov, u ktorých sme zistili miernu anémiu spôsobenú deficitom železa.

Zhodnotenie klinického stavu pacientov ukázalo, že liečba pomocou anti-TNF α (infiximab) zlepšovala klinický stav našich pacientov, čo sa prejavilo signifikantným poklesom indexu

CDAI z 236±34 pred liečbou na 132±26 prvý mesiac po podaní anti-TNF α . V ďalšom priebehu došlo ku miernemu vzostupu CDAI na hodnotu 145±19 vo štvrtom mesiaci po podaní anti-TNF α (tab.1).

	pred začatím liečby	1 mesiac po podaní infliximabu	4 mesiace po podaní infliximabu
CDAI	236 ± 34	132 ± 26	145 ± 19

Tab. 1 Hodnoty indexu CDAI a konjugovaných diénov u pacientov s Crohnovou chorobou v priebehu liečby infliximabom

Porovnanie hladín vyšetovaných proteínov pred začatím liečby s hodnotami v kontrolnom súbore zdravých jedincov ukázalo signifikantne vyššie hodnoty A1AT a A1KG (A1AT: 2,29 g/l vs. 2,76 g/l, A1KG: 750 mg/l vs. 1128 mg/l)(obr.1). Hladina alfa-2-makroglobulínu bola pred liečbou signifikantne nižšia ako v kontrolnom súbore (1980 mg/l vs. 1418 mg/l).

Liečba pacientov pomocou antiTNF α protilátky znižovalo hladinu A1AG aj A1AT (obr.2,3). Tento pokles bol štatisticky významný. V ďalších mesiacoch sme pozorovali opätovné zvyšovanie hladín oboch vyšetovaných proteínov, takže po štyroch mesiacoch od podania antiTNF α sa hladiny A1AG a A1AT signifikantne nelíšili od hodnôt pred zahájením liečby.

Koncentrácia antiproteázy A2MG sa správala odlišne od A1AT a A1KG. Jej hodnota pred začatím liečby bola signifikantne znížená oproti kontrolnému súbore zdravých jedincov a v priebehu liečby sa jej hladina postupne zvyšovala (1418 ± 290 mg/l – 1592 ± 350 mg/l – 1658 ± 318 mg/l)(obr.4).

Regresná analýza závislosti zmien A2MG od zmien hladín A1AT (korelačný koeficient 0,44, P > 0,1)(obr.5) a A1KG (korelačný koeficient 0,27, P > 0,34)(obr.6) neukázala žiadnu signifikantnú koreláciu medzi vyšetovanými parametrami. Regresná analýza závislosti zmien hladín A1AT od zmien A1KG ukázala štatisticky významnú pozitívnu koreláciu týchto dvoch parametrov (korelačný koeficient 0,64, P < 0,015)(obr.7).

Diskusia

V našej práci sme pozorovali pozitívny účinok podania infliximabu na pacientov s Crohnovou chorobou, ktorý je v zhode s viacerými publikovanými prácami o priaznivom účinku anti-TNF α na stav pacientov s Crohnovou chorobou (17,18,19). Index aktivity Crohbovej choroby aj hladiny zápalových markerov sa signifikantne znižovali mesiac po aplikácii anti-TNF α . Syntézu proteínov akútnej fázy stimuluje zvýšená hladina prozápalových cytokínov (IL-1, TNF α), o ktorých sa predpokladá, že sú hlavnými mediátormi zápalového procesu pri Crohbovej chorobe. Dá sa teda očakávať, že liečba s anti-TNF α , ktorá je zameraná na kľúčový prozápalový cytokín v patogenéze Crohbovej choroby, bude spôsobovať zmeny v hladinách alfa-1-kyslého glykoproteínu a alfa-1-antitrypsínu, ktoré sme pozorovali v našej štúdii. Avšak v ďalšom sledovaní sa ukázalo len slabé nesignifikantné zvýšenie klinickej aktivity (CDAI) chorobného procesu, zatiaľ čo hladiny troch vyšetovaných proteínov akútnej fázy sa signifikantne zvyšovali. Ako ukázali výsledky prác niektorých autorov (20,21,22), zvýšenie hladiny alfa-1-kyslého glykoproteínu predchádzalo klinickému relapsu Crohbovej choroby, čo by mohlo vysvetliť diskrepanciu medzi hladinami AAG a AAT na jednej strane a klinickým stavom našich pacientov s Crohnovou chorobou štyri mesiace po podaní anti-TNF α na strane druhej.

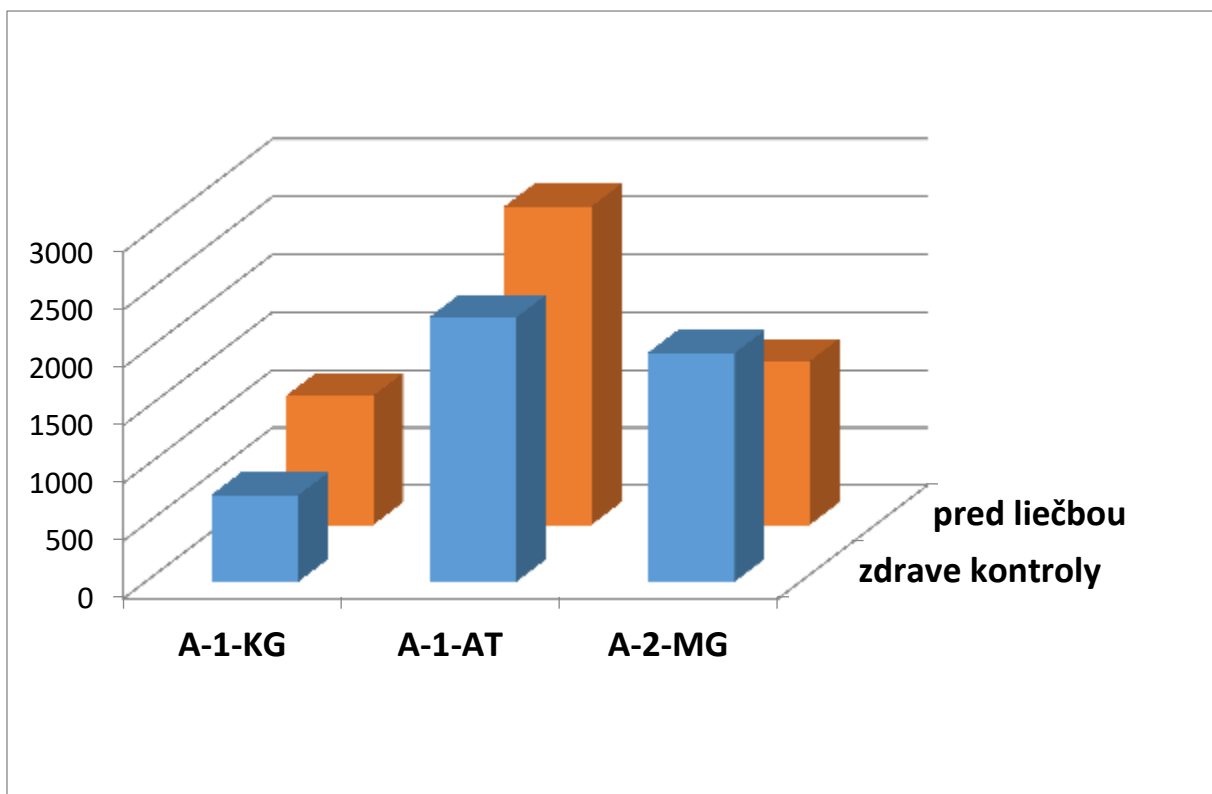
Alfa-2-makroglobulín je predstaviteľom skupinovo nešpecifických inhibítorov proteínáz. A2MG sa líši od ostatných inhibítorov proteínáz tým, že nepôsobí na aktívne miesta proteolytických enzýmov, ale funguje ako „molekulová pasca“. V jeho molekule sa nachádza zvláštny úsek o dĺžke niekoľko desiatok aminokyselín, obsahujúci väzby ľahko štiepiteľné

celým radom proteínáz. Po rozštiepení tohto „návnadového úseku“ sa rýchlo mení konformácia A2MG. Molekula proteínázy je zovretá preskupenými doménami A2MG a navyše ešte kovalentne naviazaná. Súčasne sa na povrchu molekuly A2MG exponujú miesta špecificky rozpoznávané receptormi na bunkových membránach hepatocytov, ktoré vzniknuté ireverzibilné komplexy pohlcujú a tak odstraňujú z cirkulácie. Toto odstraňovanie je veľmi špecifické a účinné, takže ich polčas v cirkulácii je len 2-5 minút.

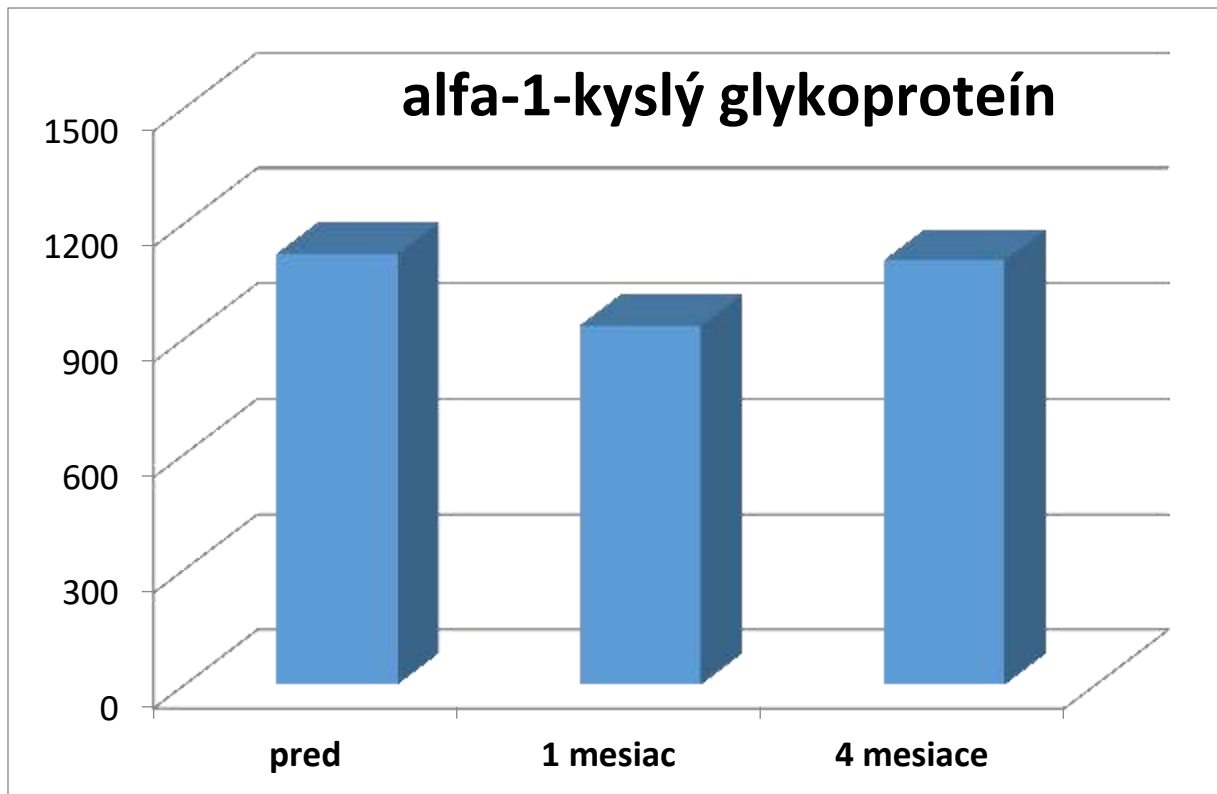
V aktívnej fáze Crohnovej choroby je zrejme v krvi pacienta značné množstvo proteínáz pochádzajúcich z aktivovaných granulocytov ako aj z poškodených buniek sliznice tenkého čreva a ktoré sa viažu na molekuly A2MG. Vytvorené komplexy sú rýchlo odstraňované z cirkulácie a hladina A2MG sa takto v dôsledku zvýšenej konzumpcie znižuje. Zníženie aktivity zápalového procesu po podaní protilátky proti TNF α znižuje spotrebu A2MG a tým podmieňuje postupné zvyšovanie jeho hladiny.

Je známe, že A2MG viaže v sére aj TNF α a tak inhibuje jeho účinok (23). Znížená hladina alfa-2-makroglobulínu v sére pacientov s aktívnou Crohnovou chorobou môže takto znižovať elimináciu TNF α z cirkulácie a tak potencovať jeho prozápalový účinok.

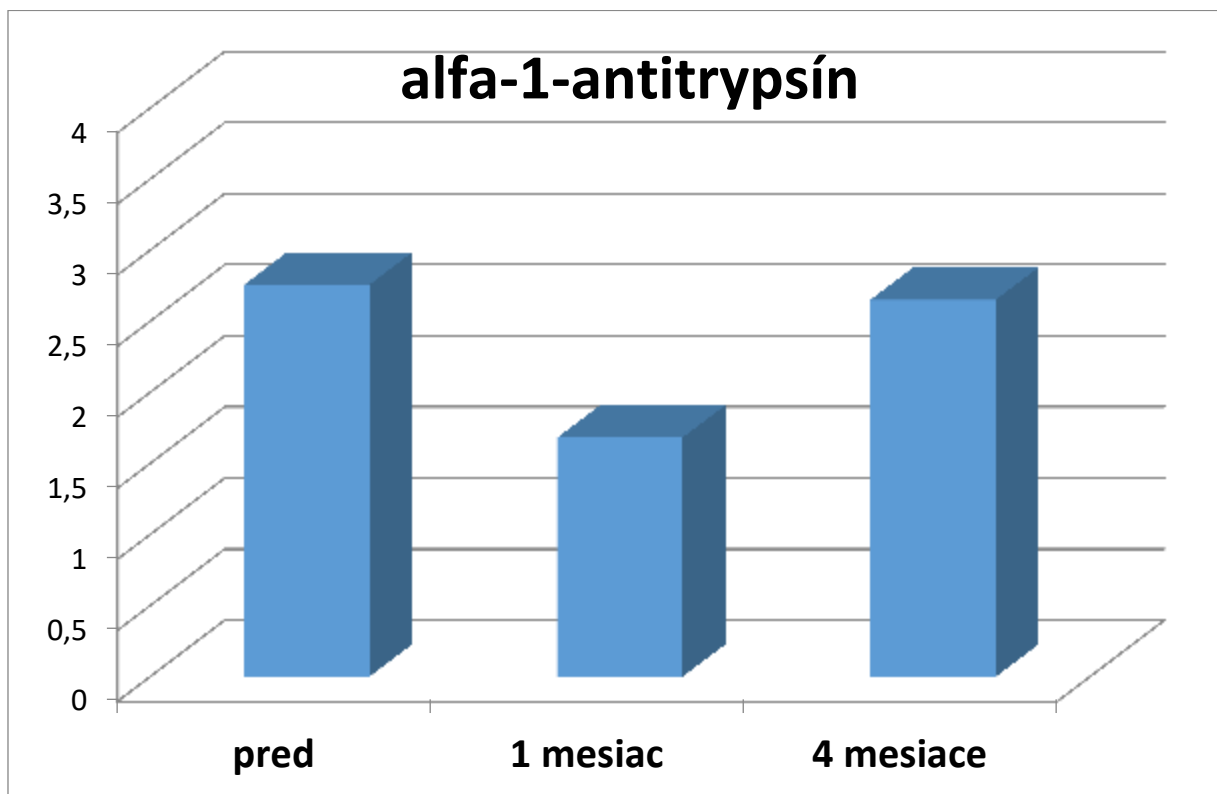
Chýbanie korelácie medzi hladinami oboch vyšetovaných antiproteáz (A2MG a A1AT) svedčí o tom, že ide o antiproteázy s rozdielnymi mechanizmami účinku. A1AT ako proteín akútnej fázy podlieha na rozdiel od A2MG aj ďalším regulačným faktorom, ako sú napr. prozápalové cytokíny. Tomu by nasvedčovala dobrá korelácia A1AT s hladinou A1KG, ktorý je tiež proteínom akútnej fázy.



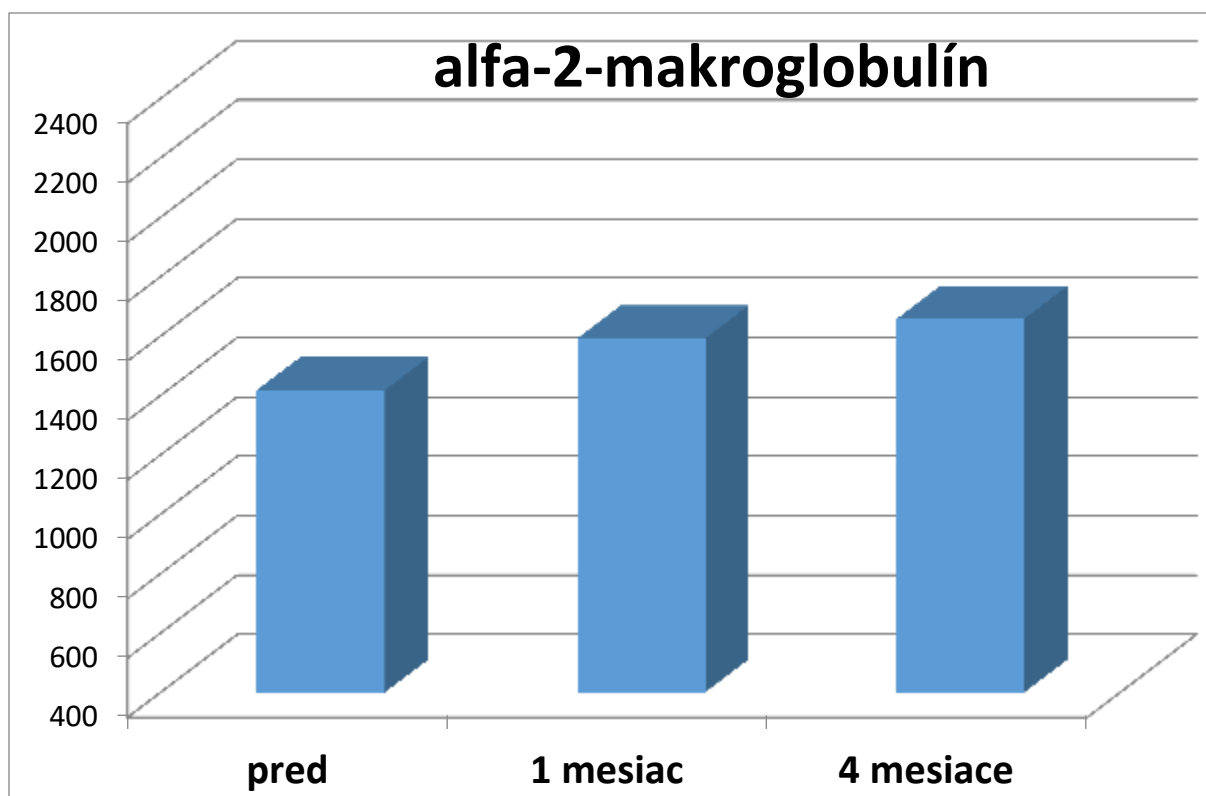
Obr. 1 Hladiny vyšetovaných proteínov v súbore zdravých kontrol a pacientov s Crohnovou chorobou pred začiatkom liečby



Obr. 2 Hladiny alfa-1-kyslého glykoproteínu v sére pacientov s Crohnovou chorobou pred začiatkom liečby a 1 a 4 mesiace po podaní antiTNF α

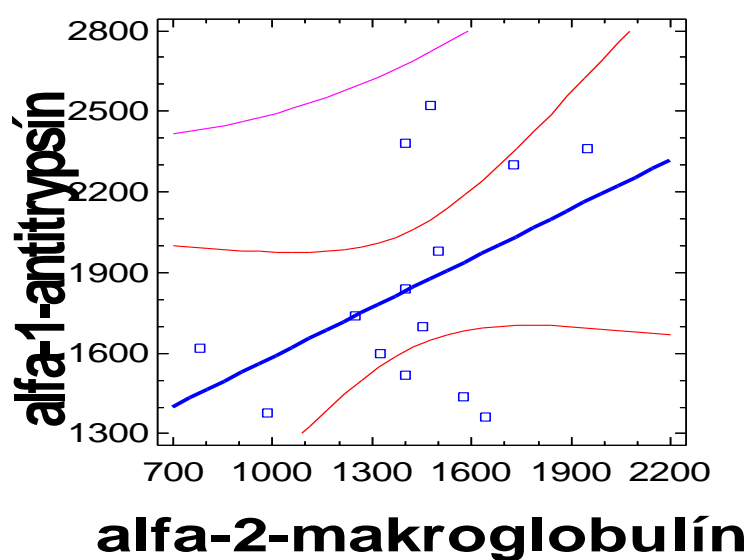


Obr. 3 Hladiny alfa-1-antitrypsínu v sére pacientov s Crohnovou chorobou pred začiatkom liečby a 1 a 4 mesiace po podaní antiTNF α



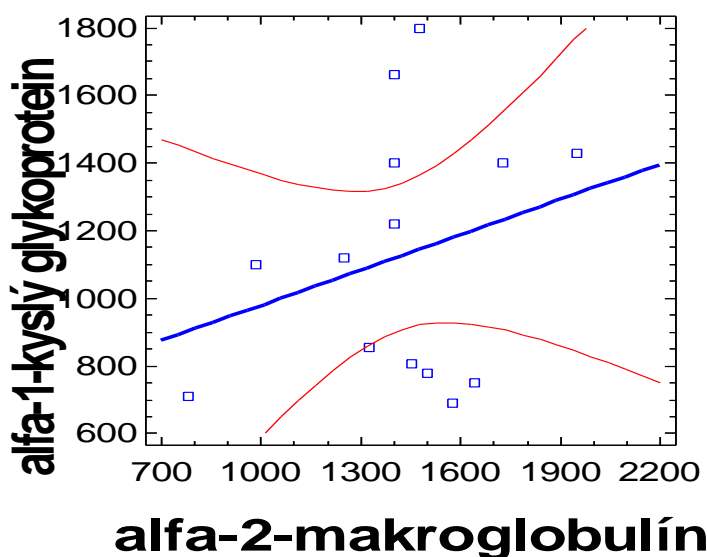
Obr. 4 Hladiny alfa-2-makroglobulínu v sére pacientov s Crohnovou chorobou pred začiatkom liečby a 1 a 4 mesiace po podaní antiTNF α

Korelácia A-1-AT a A-2-MG



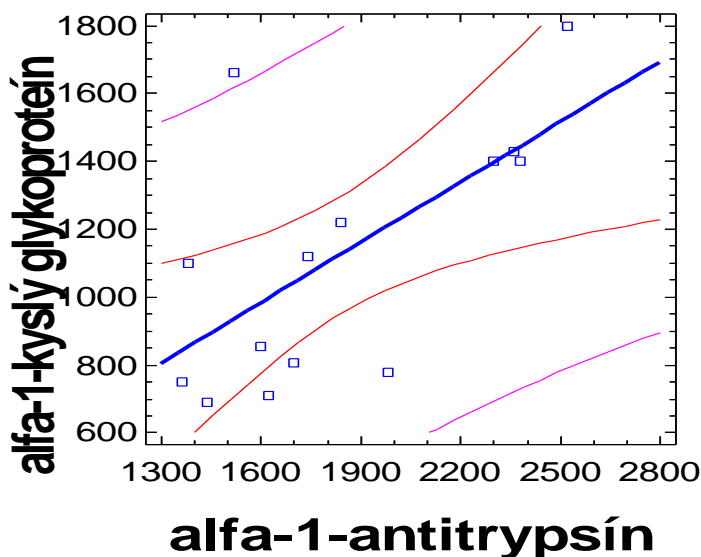
Obr. 5 Korelácia zmien koncentrácie alfa-2-makroglobulínu so zmenami v hladinách alfa-1-antitrypsínu ($P > 0,1$)

Korelácia A-1-KG a A-2-MG



Obr. 6 Korelácia zmien koncentrácie alfa-2-makroglobulínu so zmenami v hladinách alfa-1-m kyslého glykoproteínu ($P > 0,34$)

Korelácia A-1-AT a A-1-KG



Obr. 7 Korelácia zmien koncentrácie alfa-1-antitrypsínu so zmenami v hladinách alfa-1- kyslého glykoproteínu ($P < 0,015$)

Záver

V našej štúdií sme sledovali vplyv terapie infliximabom na sérové hladiny antiproteáz – alfa-1-antitrypsínu a alfa-2-makroglobulínu. Liečba bola pacientami dobre tolerovaná a nevyskytli sa žiadne nežiadúce účinky liečby počas celého sledovaného obdobia. Liečba zlepšovala klinický stav našich pacientov, o čom svedčí signifikantný pokles indexu CDAI. Plazmatická hladina A2MG, ktorá bola signifikantne znížená pred začatím liečby, sa zvyšovala po

aplikácii anti-TNF α . Je pravdepodobné, že znížená hladina A2MG u pacientov s Crohnovou chorobou môže byť dôsledkom jeho zvýšenej spotreby v dôsledku zvýšenej hladiny proteináz v sére pochádzajúcich z aktivovaných imunokompetentných buniek a poškodených buniek čreva. Postupný nárast hladiny A2MG v priebehu liečby je zrejme odrazom zníženia aktivity zápalového procesu a zníženia konzumpcie A2MG. Chýbanie korelácie medzi hladinami A1AT a A2MG je zrejme podmienené odlišným mechanizmom účinku oboch antiproteáz.

Literatúra

1. **Sands BE.** From symptoms to diagnosis: Clinical distinction among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2004; 126 (6): 1518-1532.
2. **Satsangi J, Silverberg S, Vermeire S., Colombel JF.** The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus and implications. *Gut* 2006; 55 (6): 749-753.
3. **Di Sabatino A., Lenti MV, Giuffrida P, Vanoli A, Corazza GR.** New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract. *Autoimmune Rev* 2015; 14 (12): 1161-1169.
4. **Kim DH, Cheon JH.** Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. *Immune Network* 2017; 17 (1): 25-40.
5. **Papadakis KA, Targan SR.** Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000; 51: 289-298.
6. **Cheon JH.** Understanding the complications of anti-TNF therapy in east Asian patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2017; 32 (4): 769-777.
7. **Scholmerich J.** Therapeutische innovationen bei chronisch-entzündlichen darmerkrankungen durch „biologische therapie“ – anti-TNF und andere. *Internist* 2002; 43: 1386-1399.
8. **Elliott PR, Lomas DA, Carrell RW, Abrahams JP.** Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha-1-antitrypsin. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 676-681.
9. **Elliott PR, Abrahams JP, Lomas DA.** Wild-type alpha-1-antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation. *J Mol Biol* 1998; 275: 419-425.
10. **Ryu SE, Choi HJ, Kwon KS, Lee KN, Yu MH.** The native strains in the hydrophobic core and flexible reactive loop of a serine protease inhibitor: crystal structure of an uncleaved alpha-1-antitrypsin at 2,7 Å. *Structure* 1996; 4: 1181-1192.
11. **Huntington JA, Read RJ, Carrell RW.** Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 2000; 407(6806): 923-926.
12. **Stratikos E, Gettins PGW.** Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4808-4813.
13. **Dementiev A, Dobo J, Gettins PG.** Active site distortion is sufficient for proteinase inhibition by serpins: structure of the covalent complex of alpha-1-proteinase inhibitor with porcine pancreatic elastase. *J Biol Chem* 2006; 281: 3452-3457.
14. **Mast AE, Enghild JJ, Pizzo SV, Salvesen G.** Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed, and reactive site cleaved serpins: comparison of alpha-1-proteinase inhibitor, alpha-1-antichymotrypsin, antithrombin III, alpha-2-antiplasmin, angiotensinogen and ovalbumin. *Biochemistry* 1991; 30: 1723-1730.
15. **Best WR, Bechtel JM, Singleton JW.** Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's disease activity index (CDAI). *Gastroenterology* 1979; 77: 843-846.
16. **Laurell CB.** Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal.Biochem* 1966; 15: 45-52.

- 17. Peyrin-Biroulet L.** Anti-TNF therapy in inflammatory bowel diseases: a huge review. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2010; 56 (2): 233-249.
- 18. D'Haens G.** Anti-TNF-alpha treatment strategies: a result and clinical perspectives. *Gastroenterol Clin Biol* 2009; 33: Suppl.3, S209-S216.
- 19. Sultan KS, Berkowitz JC, Khan S.** Combination therapy for inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2017; 8 (2): 103-113.
- 20. Kjeldsen J, Lauritsen K, De Muckadell OB.** Serum concentrations of orosomucoid: improved decision-making for tapering prednisolone therapy in patients with active inflammatory bowel disease? *Scand J Gastroenterol* 1997; 32 (9): 933-941.
- 21. Louis E, Belaiche J, VAN Kemseke C, Franchimont D, De Groote D, Gueenen V, Mary JY.** A high serum concentration of interleukin-6 is predictive of relapse in quiescent Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9 (10): 939-944.
- 22. Lubega J, Davies TJ.** A comparison of serum mucoprotein with serum alpha 1 acid glycoprotein, haptoglobin, and alpha 1 antitrypsin assays in monitoring inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* 1990; 188 (1): 59-69.
- 23. Rehman AA, Haseeb A, Khan FH.** Alpha-2-macroglobulin: A physiological guardian. *J Cell Physiol* 2013; 228: 1665-1675.

VYBRANÉ MARKERY OXIDAČNÉHO STRESU A LIPIDOVÉ RIZIKOVÉ FAKTORY KARDIOVASKULÁRNYCH CHORÔB U ZDRAVÝCH DOBROVOLNÍKOV STREDNÉHO VEKU

(Selected oxidative stress markers and lipid risk factors
for cardiovascular disease in the healthy middle-aged volunteers)

*Alena Viktorínová¹, Klára Svitekóvá², Sawkat Choudhury²,
Monika Ďurfínová¹*

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2,
811 08 Bratislava, alena.viktorinova@fmed.uniba.sk

²Národná transfúzna služba SR, Ružinovská 6, 821 02 Bratislava

Súhrn

Lipidové parametre, lipidové rizikové indexy a lipidové markery oxidačného stresu (paraoxonáza 1 (PON1) a lipoperoxidy (LPO)) odrážajú aktuálny stav metabolizmu lipidov a ovplyvňujú vznik a rozvoj aterosklerózy. Predpokladali sme, že znížená aktivita PON1, zvýšené hladiny LPO a abnormálny lipidový profil môžu predpovedať vznik a progresiu aterosklerózy u zdravých jedincov stredného veku.

Arylesterázová aktivita PON1, LPO, lipidový profil (celkový cholesterol, HDL-, LDL-, non-HDL-cholesterol, triglyceridy (TG), apolipoproteíny (Apo) A1 a B) a lipidové rizikové indexy boli stanovené v sére 46 dobrovoľníkov (priemerný vek 43,1 ± 6,8 rokov): 24 normolipidecká skupina (NL) a 22 hyperlipidemická skupina (HL).

Zvýšené hladiny aterogénneho cholesterolu (LDL, non-HDL), lipidových rizikových indexov ($p < 0,0001$), LPO ($p < 0,001$) a znížená aktivita PON1 ($p < 0,05$) boli zistené v HL skupine. Pozorovali sme silné korelácie medzi aktivitou PON1 a HDL ($r = 0,635$, $p = 0,0005$), ApoA1 ($r = 0,703$, $p < 0,0001$), pomerom ApoA1/ApoB ($r = 0,536$, $p = 0,004$), a pomerom non-HDL/HDL ($r = -0,445$, $p = 0,013$) v NL skupine. Naopak, v HL skupine neboli zistené podobné korelácie medzi aktivitou PON1 a týmito parametrami.

Významné abnormality v lipidových parametroch, oslabená aktivita PON1, zvýšená peroxidácia lipidov a zmenené vzťahy medzi PON1, HDL a ApoA1 môžu ovplyvňovať antioxidantné a anti-aterogénne funkcie HDL a mať za následok vyššiu náchylnosť lipoproteínov k oxidačnej modifikácii. Sledovanie lipidových rizikových parametrov spolu s markermi oxidačného stresu u asymptomatickej populácie môže byť prínosom pre včasnú identifikáciu ochorení súvisiacich s aterosklerózou.

Kľúčové slová

ateroskleróza, lipidové rizikové indexy, lipoperoxidy, paraoxonáza 1

Summary

Lipid parameters, lipid risk indexes and lipid-related oxidative stress markers (paraoxonase 1 (PON1) and lipid peroxides (LPO)) reflect the actual status of lipid metabolism and influence the onset and progression of atherosclerosis. We hypothesized that decreased activity of PON1, elevated levels of LPO and abnormal lipid profile may predict the onset and progression of atherosclerosis in the healthy middle-aged subjects.

Arylesterase activity of PON1, LPO, lipid profile (total cholesterol; HDL-, LDL-, non-HDL-cholesterol; triglycerides (TG); apolipoproteins (Apo) A1 and B) and lipid risk indexes were determined in the serum obtained from 46 volunteers (mean age 43.1 ± 6.8 years): 24 normolipidemic group (NL) and 22 hyperlipidemic group (HL).

Elevated levels of atherogenic cholesterol (LDL, non-HDL), lipid risk indexes ($p < 0.0001$), LPO ($p < 0.001$), and decreased activity of PON1 ($p < 0.05$) were found in HL group. Strong correlations between PON1 activity and HDL ($r = 0.635$, $p = 0.0005$), ApoA1 ($r = 0.703$, $p < 0.0001$), ApoA1/ApoB ratio ($r = 0.536$, $p = 0.004$), and non-HDL/HDL ratio ($r = -0.445$, $p = 0.013$) were observed in NL group. To the contrary, it has not been detected similar correlations between PON1 activity and these parameters in the HL group.

Significant abnormalities in lipid parameters, weakened PON1 activity, increased lipid peroxidation and altered associations between PON1, HDL and ApoA1 may influence antioxidant and anti-atherogenic functions of HDL and result in higher susceptibility of lipoproteins to oxidative modification. Monitoring of lipid risk parameters together with oxidative stress markers in an asymptomatic population may be beneficial for the early identification of atherosclerosis-related diseases.

Keywords

atherosclerosis, lipid risk indexes, lipoperoxides, paraoxonase 1

Úvod

Abnormality v metabolizme lipidov a lipoproteínov sa považujú za významné rizikové faktory aterosklerózy, ktoré sa začali častejšie objavovať u mladších a stredných vekových skupín a pokladajú sa za vhodné prediktory predčasnej kardiovaskulárnej (CV) chorobnosti a úmrtnosti (1). Riziko CV ochorenia sa môže meniť v závislosti od typu lipidových abnormalít a cieľovej populácie (2). Je dobre známe, že progresia aterosklerózy závisí nielen od prítomnosti a počtu rizikových faktorov, ale tiež od doby trvania asymptomatického štádia. Ochorenia súvisiace s aterosklerózou sa vyvíjajú počas celého života, začínajúc výskytom rizikových faktorov (rozvoj subklinickej aterosklerózy) a končiac náhlými CV príhodami (3). Epidemiologické údaje ukazujú, že CV ochorenia sú najčastejšou príčinou úmrtí v Európe (viac ako 4 milióny ročne), aj keď v posledných rokoch úmrtnosť u týchto chorôb významne poklesla v mnohých krajinách (4).

Všeobecne akceptovaná oxidačná hypotéza aterogenézy podporuje antioxidačnú úlohu HDL v procesoch oxidácie lipidov, najmä enzýmu PON 1, ktorý je priamo spojený s funkciou HDL. Tento enzým katalyzuje hydrolýzu lipidových peroxidov, ktoré sú viazané na LDL a HDL (5,6). Preto je aktivita PON1 kľúčovým prispievateľom k antioxidačnej schopnosti HDL. Paraoxonáza 1 sa viaže na HDL prostredníctvom ApoA1, ktorý stabilizuje jej aktivitu (7). Nedávna štúdia skúmala vzťah medzi HDL a ApoA1 u pacientov s deficienciou ApoA1 a zistila, že PON1 zostáva naďalej viazaná na HDL aj za týchto podmienok (8). Autori však pozorovali nižšiu stabilitu komplexu PON1-HDL a zníženú aktivitu PON1 u týchto pacientov v porovnaní s kontrolou. Pri zvýšenom oxidačnom strese môže byť molekula ApoA1 modifikovaná niektorými produktmi oxidačného stresu ako je myeloperoxidáza, malondialdehyd a iné (9). Tieto molekuly menia štruktúru a funkciu ApoA1, inaktivujú funkciu PON1 a tým zhoršujú atero-protéktívne vlastnosti HDL (10).

V klinickej praxi je dobre známe, že abnormálny metabolizmus lipidov je jedným z najdôležitejších rizikových faktorov rozvoja aterosklerózy, najmä u mladšej a strednej populácie (11). Uvažovali sme, či možné zmeny v aktivite PON1 a v hladinách LPO za podmienok abnormálneho lipidového profilu môžu byť vo vzťahu s lipidovými rizikovými faktormi u asymptomatickej populácie. Preto bolo hlavným cieľom našej štúdie vyhodnotiť hladiny lipidových parametrov v náhodne vybranej vzorke zdravých jedincov v strednom veku a identifikovať rizikové lipidové faktory. Okrem toho nás zaujímali aj vzťahy medzi antioxidačnou aktivitou PON1, oxidačným poškodením lipidov, lipidovým profilom a lipidovými rizikovými indexmi.

Materiál a metódy

Do štúdie bolo zaradených 75 dobrovoľníkov (priemerný vek $41,7 \pm 8,2$ rokov) z Národnej transfúznej služby SR v Bratislave. Z tejto skupiny 29 dobrovoľníkov nespĺňalo kritéria a boli vyradení zo štúdie. Definitívne sa zúčastnilo v tejto štúdiu 45 dobrovoľníkov (31 mužov a 15 žien), priemerný vek $43,1 \pm 6,8$ rokov). Kritériá pre zaradenia do štúdie boli nasledovné: bez klinických alebo laboratórnych dôkazov metabolických rizikových faktorov ako je obezita, hypertenzia, hyperglykémia a diabetes mellitus; sérová hladina ALT v rozsahu fyziologických hodnôt a krvný tlak nižší ako 140/90 mmHg. Pred odberom krvi bola zaznamenaná výška a váha a vypočítaný index telesnej hmotnosti (BMI). Dobrovoľníci boli rozdelení do dvoch skupín podľa nameraných hodnôt lipidových parametrov: 24 normolipidemická skupina (NL) s hladinami lipidov v referenčnom rozsahu a 22 hyperlipidemická skupina (HL) s hladinou celkového cholesterolu (CHOL-T), LDL-c a HDL-c nad horný limit referenčných hodnôt. Všetci dobrovoľníci vyplnili dotazník pre darcovstvo krvi a podpísali informovaný súhlas na zaradenie do štúdie.

Odber krvi a spracovanie vzoriek

Vzorky venóznej krvi sa odoberali do komerčných injekčných striekačiek bez antikoagulancií. Prvá časť striekačiek na stanovenie základných biochemických parametrov bola transportovaná do laboratória OKB. Druhá časť striekačiek na stanovenie PON1 aktivity a koncentrácie LPO bola transportovaná na Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK. Sérum bolo izolované centrifugáciou za štandardných podmienok, presunuté do polystyrénových skúmaviek, zmrazené a skladované pri -80°C až do analýzy.

Stanovenie biochemických parametrov

Základný lipidový profil v sére bol stanovený štandardizovanými metódami pre automatický analyzátor (ADVIA 2400 Chemistry System, Siemens, USA) pomocou súprav Erba Lachema, Brno, Česká republika v akreditovanom laboratóriu OKB.

Arylesterázová aktivita PON1 (aryPON1) v sére bola stanovená podľa metódy Gan a kol. (12) spektrofotometricky (UV-1800 Spektrofotometer, Shimadzu Corporation, Japonsko) s fenyacetátom ako substrátom (Sigma-Aldrich, MO, USA). Produkcia fenolu bola kontinuálne monitorovaná 3 minúty pri 270 nm a 37°C . Arylesterázová aktivita PON1 bola vypočítaná pomocou molárneho extinkčného koeficientu pre fenol ($1310\text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$) a vyjadrená ako $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ séra.

Koncentrácia celkových lipoperoxidov v sére bola stanovená podľa metódy El-Saadani a kol. (13) spektrofotometricky (UV-1800 Spektrofotometer, Shimadzu Corporation, Japonsko). Koncentrácia LPO bola vypočítaná pomocou molárneho extinkčného koeficientu pre I_3 ($24600\text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$) a vyjadrená ako nmol/ml séra.

Štatistická analýza

Na vyhodnotenie výsledkov boli použité nasledovné testy: Shapiro-Wilk's *W*-test na posúdenie normálnej alebo neštandardnej distribúcie údajov; Student's *t*-test na údaje s normálnou distribúciou (priemer ± štandardná odchýlka); Mann-Whitney's *U*-test na údaje s neštandardnou distribúciou (medián (1. kvartil; 3. kvartil). Spearmanový korelačný test bol použitý na vyhodnotenie vzťahov medzi nameranými parametrami v každej skupine a vyjadrený pomocou korelačného koeficientu (*r*). Štatistická významnosť pre všetky stanovenia bola na úrovni $p < 0,05$ (two-sided). Použitý bol štatistický program StatsDirect[®] 2.3.7 (StatsDirect Sale, Cheshire M33 3UY, UK) a program Excel 2010 (Microsoft Office Excel Corporation, USA) na grafické znázornenie výsledkov.

Výsledky

Základné charakteristiky účastníkov štúdie, biochemické parametre, vypočítané lipidové rizikové indexy a markery oxidačného stresu sú uvedené v Tabuľke 1. Zistili sme, že väčší počet mužov (82%) bol zastúpený v HL skupine ($p < 0,05$) než v NL skupine (54%). Z celej skupiny malo 41% účastníkov hodnoty BMI $> 25,0$ (15 mužov a 4 žien). Nenašli sme významný rozdiel vo veku a BMI medzi oboma skupinami ($p > 0,05$).

Parameter	NL skupina	HL skupina	p
n/muži (%)	24 (54)	22 (82)	$< 0,05$
vek (roky)	41,4 ± 5,0	44,9 ± 8,1	0,082
BMI (kg/m ²)	25,8 ± 4,5	26,5 (25,4; 28,0)	0,298
CHOL-T (mmol/l)	4,83 ± 0,39	6,58 ± 1,02	$< 0,0001$
HDL-c (mmol/l)	1,38 ± 0,35	1,20 ± 0,23	$< 0,05$
non-HDL-c (mmol/l)	3,45 ± 0,41	5,36 ± 0,93	$< 0,0001$
LDL-c (mmol/l)	3,03 ± 0,38	4,32 ± 0,90	$< 0,0001$
TG (mmol/l)	0,83 (0,75; 1,04)	1,64 ± 0,37	$< 0,0001$
ApoA 1 (g/l)	1,83 ± 0,42	1,77 ± 0,27	0,574
ApoB (g/l)	0,79 ± 0,09	1,16 ± 0,23	$< 0,0001$
non-HDL/HDL	2,66 ± 0,79	4,38 (3,9; 4,8)	$< 0,0001$
HDL/LDL	0,46 ± 0,13	0,28 ± 0,06	$< 0,0001$
ApoA 1/ApoB	2,34 ± 0,61	1,57 ± 0,34	$< 0,001$
aryPON1 aktivita	135,8 ± 31,5	119,6 ± 21,2	$< 0,05$
Lipoperoxidy	54,5 (47,7; 63,5)	81,7 (62,5; 108,1)	$< 0,001$

Tab. 1 Základné charakteristiky účastníkov štúdie, lipidový profil a markery oxidačného stresu
Legenda k tabuľke:

Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± štandardná odchýlka pre parametrické premenné alebo ako medián (25. percentil; 75. percentil) pre neparametrické premenné.

P hodnota predstavuje štatisticky významný rozdiel medzi nameranými parametrami v NL a HL skupine.

U dobrovoľníkov zaradených do HL skupiny, hladiny CHOL-T, LDL-c a non-HDL-c prekročovali horný referenčný limit. Zistili sme rozdiely v týchto hladinách medzi HL a NL skupinou ($p < 0,0001$). Celá skupina dobrovoľníkov mala koncentrácie HDL-c v referenčnom rozsahu. Avšak 86% dobrovoľníkov z HL skupiny (11 mužov a 8 žien) malo hladiny HDL-c na dolnej hranici tohto rozmedzia. Tieto výsledky naznačujú tendenciu k nižším hodnotám

HDL-c u hyperlipidemických jedincov v porovnaní s referenčným rozsahom a tiež s NL skupinou ($p < 0,05$). Hladiny TG sa približovali k fyziologickým hodnotám. Zaznamenali sme významný rozdiel v TG hladinách medzi NL a HL skupinou ($p < 0,0001$). 28% dobrovoľníkov z HL skupiny malo koncentrácie TG nad hornou hranicou referenčného rozsahu ale tieto hodnoty neprekročili 3,0 mmol/l. Významné rozdiely v pomeroch HDL/LDL a non-HDL/HDL boli zistené medzi oboma skupinami ($p < 0,0001$). Hladiny markerov oxidačného stresu u účastníkov štúdie sú uvedené v Tabuľke 1. Existujú určité rozdiely v hladinách skúmaných markerov medzi oboma skupinami. Nižšia aryPON1 aktivita ($p < 0,05$) a vyššia hladina LPO ($p < 0,001$) bola nameraná v HL skupine ako v NL skupine.

Korelované parametre		NL skupina		HL skupina	
		r	p	r	p
aryPON1	HDL-c	0,635	0,0005	- 0,422	0,026
	ApoA 1	0,703	< 0,0001	- 0,320	0,073
	non-HDL-c	- 0,455	0,013	0,238	0,142
	ApoA 1/ApoB	0,536	0,004	- 0,061	0,394
ApoA 1	HDL-c	0,935	< 0,0001	0,940	< 0,0001
	non-HDL/HDL	- 0,801	< 0,0001	- 0,535	0,006
	HDL/LDL	0,820	< 0,0001	0,401	0,032
non-HDL-c	LDL-c	0,917	< 0,0001	0,857	< 0,0001
	ApoB	0,925	< 0,0001	0,916	< 0,0001
	ApoA 1/ApoB	- 0,415	0,022	- 0,555	0,004
	CHOL-T	0,687	< 0,0001	0,978	< 0,0001
	HDL/LDL	- 0,549	0,003	- 0,622	0,001
ApoB	LDL-c	0,807	< 0,0001	0,812	< 0,0001
	CHOL-T	0,610	0,001	0,875	< 0,0001
	HDL/LDL	- 0,499	0,007	- 0,738	< 0,0001
	non-HDL/HDL	0,555	0,003	0,614	0,001
ApoA 1/ApoB	HDL-c	0,906	< 0,0001	0,444	0,019
	LDL-c	- 0,342	0,051	- 0,513	0,008
	HDL/LDL	0,907	< 0,0001	0,947	< 0,0001
	non-HDL/HDL	- 0,913	< 0,0001	- 0,889	< 0,0001
LDL-c	non-HDL/HDL	0,482	0,009	0,351	0,054
	CHOL-T	0,701	< 0,0001	0,870	< 0,0001
Lipoperoxid	TG	0,517	0,015	0,877	< 0,0001

Tab. 2 Korelačná analýza medzi lipidovými rizikovými faktormi kardiovaskulárnych ochorení a markermi oxidačného stresu

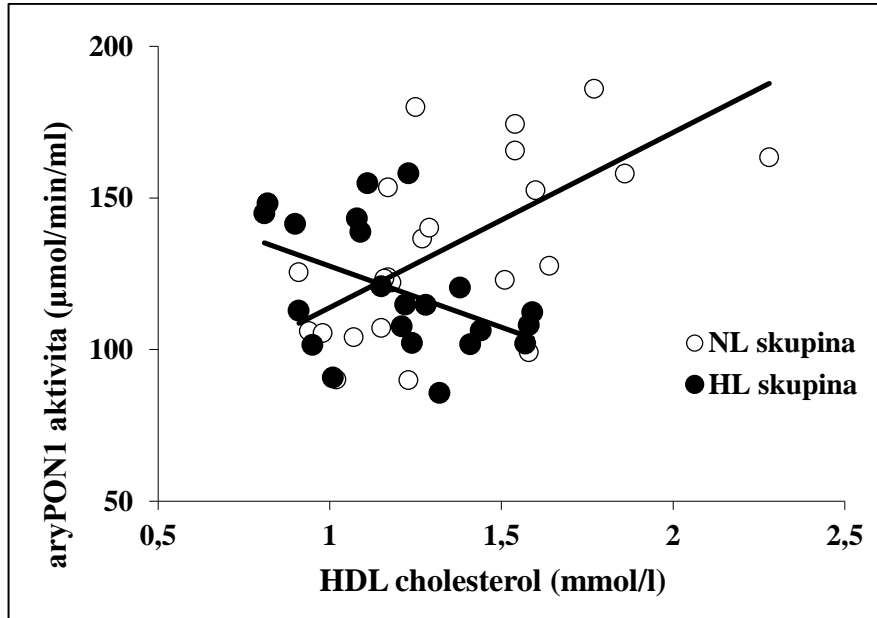
Legenda k tabuľke:

r- Spearmanov korelačný koeficient

P hodnota predstavuje štatisticky významný rozdiel medzi nameranými parametrami v NL a HL skupine.

Výsledky korelačnej analýzy medzi lipidovými rizikovými faktormi a markermi oxidačného stresu sú uvedené v Tabuľke 2. Ako je zobrazené na obrázkoch 1 a 2, aktivita aryPON1 silne koreluje s HDL-c ($p = 0,0005$) a ApoA1 ($p < 0,0001$) v NL skupine. Okrem toho, aryPON1

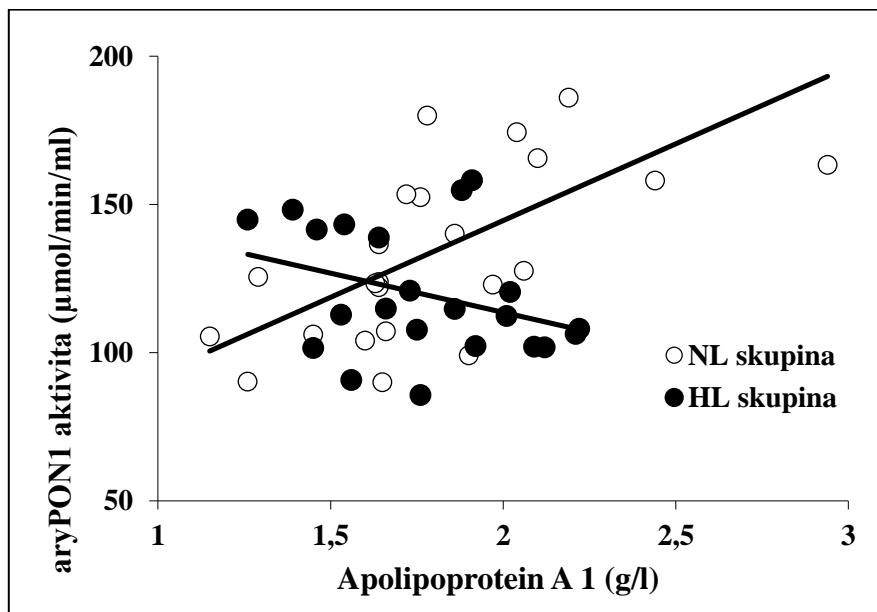
aktivita pozitívne korelovala aj s pomerom ApoA1/ApoB ($p = 0,004$) a negatívne korelovala s non-HDL ($p = 0,013$) v tejto skupine. Na rozdiel od týchto výsledkov, podobné vzťahy medzi aryPON1 a týmito parametrami v HL skupine sme nepozorovali. Napriek zisteným hladinám TG u účastníkov štúdie, pozorovali sme silnejšiu koreláciu medzi TG a LPO ($r = 0,877$, $p < 0,0001$) v HL skupine ako v NL skupine ($r = 0,517$, $p = 0,015$).



Obr. 1 Korelácie medzi arylesterázovou aktivitou PON1 and HDL cholesterolom v NL skupine ($r = 0,635$, $p = 0,0005$) a HL skupine ($r = -0,422$, $p = 0,026$)

r - Spearmanov korelačný koeficient

p - hodnota štatisticky významného rozdielu medzi korelovanými parametrami v jednotlivých skupinách



Obr. 2 Korelácie medzi arylesterázovou aktivitou PON1 a apolipoproteínom A 1 v NL skupine ($r = 0,703$, $p < 0,0001$) a HL skupine ($r = -0,320$, $p = 0,073$)

r - Spearmanov korelačný koeficient

p - hodnota štatisticky významného rozdielu medzi korelovanými parametrami v jednotlivých skupinách

Diskusia

V štúdiu sme skúmali vybrané markery oxidačného stresu, lipidové parametre a lipidové rizikové indexy kardiovaskulárnych chorôb u zdravých dobrovoľníkov stredného veku. Identifikovali sme jedincov so zvýšenými hladinami CHOL-T, LDL-c a HDL-c ako aj rizikových indexov. Dobrovoľníci tejto skupiny nemali žiadne klinické alebo laboratórne dôkazy CV ochorenia pred zaradením do štúdie. Do HL skupiny boli zaradení vtedy ak mali zmenené najmenej tri rizikové lipidové faktory. Výskyt viacerých rizikových faktorov naznačuje nielen narušený metabolizmus lipidov ale aj potenciálne riziko rozvoja aterosklerózy.

Ako bolo publikované, hyperlipidémia predstavuje dobre definovaný rizikový faktor aterosklerózy spojený so zvýšenou morbiditou a mortalitou (3,14). Okrem toho, non-HDL-c je silnejším markerom CV rizika než LDL-c. Konkrétne, non-HDL-c poskytuje odhad množstva cholesterolu, ktorý je naviazaný na aterogénne častice, vrátane LDL, IDL, VLDL a lipoproteínu(a) (15). Preto zvýšené hladiny aterogénneho cholesterolu (LDL-c a non-HDL-c) významne prispievajú k patogenéze aterosklerózy a CV ochorení. Tento stav sa môže vyskytovať u jedincov s hypertriglyceridémiou ale aj bez nej (16). V súlade s týmito štúdiami dobrovoľníci v HL skupine mali zvýšené hladiny aterogénneho cholesterolu bez významnej hypertriglyceridémie (Tabuľka 1).

Je všeobecne známe, že nízke hladiny HDL-c sú významným prediktorom CV ochorení a zvyčajne sú úzko spojené (nepriamo) s hladinami TG. Populačná štúdia (4) však ukázala, že zvýšené CV riziko s nízkymi hladinami HDL-c je nezávislé od hladín TG. V súlade s týmto zistením, naša štúdia identifikovala jedincov so zvýšeným CV rizikom pri fyziologických hladinách (resp. na spodnej hranici rozsahu) HDL-c a TG.

Publikované práce uvádzajú, že hladiny HDL-c nie vždy odrážajú funkčnosť HDL. Antioxidačný systém HDL reprezentovaný aktivitou PON1 má podstatný vplyv na procesy lipidovej peroxidácie. Všeobecne sa uznáva, že sérová hladina LPO je dobrým indikátorom oxidačného poškodenia lipidov (5,6). Na základe týchto skutočností môžeme konštatovať, že čím intenzívnejší je oxidačný stres a produkcia LPO, tým intenzívnejšia je inaktivácia mnohých proteínov viazaných na HDL, ako je PON1, ApoA1 a pod. V podmienkach zvýšeného oxidačného stresu môže inaktivácia týchto proteínov ovplyvňovať antioxidačné, anti-aterogénne a ďalšie funkcie častíc HDL (10,17).

Naša štúdia pozorovala rozdiely v hladinách markerov oxidačného stresu medzi oboma skupinami (Tabuľka 1). Významne znížená aktivita PON1 a zvýšená koncentrácia LPO bola nameraná v HL skupine v porovnaní s NL skupinou. Tieto výsledky zreteľne naznačujú, že existujú procesy zvýšeného oxidačného poškodenia lipoproteínov a ich zníženej antioxidačnej ochrany medzi dobrovoľníkmi v HL skupine. Vzhľadom na toto zistenie konštatujeme, že zmenená funkcia PON1 môže ovplyvňovať úlohu HDL a LDL v procesoch aterogenézy. Výsledky našej štúdie ukazujú, že aj napriek fyziologickým hodnotám HDL-c a ApoA1 je znížená aktivita tohto enzýmu. Okrem toho, zmenené vzťahy medzi aktivitou PON1 a týmito parametrami (obrázky 1 a 2) spolu so zvýšenou hladinou LPO v HL skupine môžu byť dôkazom zníženej schopnosti HDL inhibovať oxidačné poškodenie lipidov. Naše zistenia sú v súlade s hypotézou o HDL dysfunkčnosti (10,18) a môžu prispieť k doterajším informáciám o špecifických zmenách v metabolizme HDL. Presné mechanizmy zodpovedné za dysfunkčnosť HDL nie sú zatiaľ objasnené.

Záverom môžeme konštatovať, že monitorovanie rizikových markerov metabolizmu lipidov, najmä v asymptomatických štádiách aterosklerózy, môže byť prínosom nielen pre skorú identifikáciu zvýšeného kardiovaskulárneho rizika ale aj pre zníženie predčasnej morbidity a mortality u jedincov v strednom veku.

Literatúra

1. **World Health Organization:** The World Health Report 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneva; WHO, 2002.
2. **Nichols M, Townsend N et al.** European cardiovascular disease statistics, 2012 edition. European Heart Network (Brussels, Belgium 2012), ISBN 978-2-9537898-1-2.
3. **Navar-Boggan AM, Peterson ED et al.** Hyperlipidemia in Early Adulthood Increases Long-Term Risk of Coronary Heart Disease. *Circulation* 2015; 131 (5): 451-458.
4. **Assman G, Schulte H.** Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol* 1992; 70: 733-737.
5. **Fisher EA, Feig JE et al.** High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 2813-2820.
6. **Mertens A, Hobvoet P.** Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 2001; 15: 2073-2084.
7. **James RW, Deakin SP.** The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase1 secretion, stability, and activity. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1986-1994.
8. **Noto H, Hashimoto Y et al.** Exclusive association of paraoxonase1 with high-density lipoprotein particles in apolipoprotein A-I deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 395-401.
9. **Sorenson RC, Bisgaer CL et al.** Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: Apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2214-2225.
10. **Rozenberg O, Rosenblat M et al.** Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with the increased macrophage oxidative stress: studies on PON1-knockout mice. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34: 774-84.
11. **European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice** (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J* 2012; 33: 1635-1701.
12. **Gan KN, Smolen A et al.** Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 1991; 19: 100-106.
13. **El-Saadani M, Esterbauer H et al.** A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J Lipid Res* 1989; 30: 627-630.
14. **Soran H, Adam S, Durrington PN.** Optimising treatment of hyperlipidaemia: quantitative evaluation of UK, USA and European guidelines taking account of both LDL cholesterol levels and cardiovascular disease risk. *Atherosclerosis* 2018; 278: 135-142.
15. **Liu J, Sempos CT et al.** Non-high-density lipoprotein and very-low-density lipoprotein cholesterol and their risk predictive values in coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2006; 98: 1363-1368.
16. **Chapman MJ, Caslake M.** Non-high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor: addressing risk associated with apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Eur Heart J* 2004; Suppl 6: A43-8.
17. **Rohatgi A, Khera A et al.** HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Eng J Med.* 2014;371:2383-2393.
18. **Navab M, Reddy ST et al.** The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009; 50: S145-149.

PNEUMOKOKOVÉ INVÁZNE INFEKČIE U DOSPELÝCH A PREVENCIA

(Pneumococcal invasive infections in seniors and prevention)

Magdaléna Záborská

*Mikrobiologický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice
Bratislava, Sasinkova 4/11, 811 08 Bratislava; magda.zaborska@fmed.uniba.sk*

Súhrn

Neopúzdrená forma *Streptococcus pneumoniae* je v dnešnej dobe pomerne častou súčasťou fyziologickej flóry horných dýchacích ciest. Nosičstvo pneumokoka, morbidita, invazivita a mortalita je ovplyvnená jeho sérotypom. Rizikovou skupinou sú nielen deti do 5 rokov veku ale aj seniori, hlavne vo veku nad 65 rokov.

Podľa štatistiky WHO sú pneumokokové pneumónie a následné infekcie s nimi spojené, treťou najčastejšou príčinou úmrtnosti, kde zomiera ročne 3 – 5 miliónov ľudí.

Práve pre vysokú nebezpečnosť ochorenia a následne aj vysokú úmrtnosť je táto problematika považovaná, aj z pohľadu Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO), Európskeho centra pre kontrolu chorôb (ECDC) a ostatných relevantných štruktúr za závažnú a treba ju dôsledne sledovať.

Za najúčinnnejšiu prevenciu sa považuje očkovanie. Veľká pozornosť sa venuje, tzv. „plošnej vakcinácii“ a jej efektu na očkovanú populáciu.

Kľúčové slová

invázne pneumokokové infekcie, Slovenské národné referenčné centrum pre pneumokokové nákazy (NRC), plošná vakcinácia, vakcína, prevencia, rizikové faktory

Summary

Nonencapsulated *Streptococcus Pneumoniae* nowadays is quite commonly a part of the physiological flora of the upper respiratory tract. State carrier, morbidity, invasiveness and mortality are defined by the serotype. Risk group contains merely not only the children aged under 5 years old, but includes also the seniors predominantly over 65 years of age.

WHO statistics reveal that pneumococcus pneumoniae and thus resulting infections are the third common cause of death with the annual mortality in population being 3-5 million of people.

Due to the seriousness of the illnesses and the correlating high mortality rates this issue is being taken into consideration as substantial with the need for monitoring by the World Health Organization (WHO) and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and their relevant structures. The most effective prevention is vaccination.

Considerable attention is being given to “areal immunization programmes“ and its effects on the vaccinated population.

Keywords

invasive pneumococcal infections, Slovak National Reference Center for Pneumococcal Diseases, area vaccination, vaccine, prevention, risk factors

Úvod

Infekčné ochorenia spôsobujú mnohým ľuďom obrovské utrpenie, zamestnávajú veľkú časť zdravotníctva a značne odčerpávajú finančné zdroje. Pre jednotlivca, zdravotnícke zariadenie a pre zachovanie finančných zdrojov je vždy výhodnejšie ochoreniu predchádzať ako ho liečiť. K častým pôvodcom infekcií nielen dýchacích ciest ale aj rôznych invázných ochorení, ako napríklad ochorenie intravaskulárneho systému, bakteriémia, meningitída, patrí aj bakteriálny druh *Streptococcus pneumoniae*. Rizikovou skupinou sú nielen deti do 5 rokov veku ale aj seniori, hlavne vo veku nad 65 rokov.

Podľa štatistiky WHO sú pneumokokové pneumónie a následné infekcie s nimi spojené, treťou najčastejšou príčinou úmrtnosti, kde zomiera ročne 3 – 5 miliónov ľudí. Bolo zistené, že riziko výskytu pneumokokových infekcií u seniorov spojených s mortalitou stúpa už vo veku nad 50 rokov. Výrazný úspech pri liečbe invázných pneumokokových infekcií bol zaznamenaný v polovici 20. storočia objavením niektorých novších antibiotík, ktoré rozšírili spektrum antibakteriálnych látok v terapii pneumokokových infekcií.

V ostatných rokoch bolo však zaznamenané vážne ohrozenie účinnosti antibiotík z dôvodov narastajúcej, rýchlo sa šíriacej rezistencie a to nielen na Slovensku, ale aj vo väčšine európskych krajín. Dost' nelichotivé je, že na Slovensku je úroveň rezistencie u pneumokokov na bežne ordinované antibiotiká v porovnaní so susednými krajinami (napr. Rakúsko, Česká republika) vyššia. Príčinou je pravdepodobne často zbytočné a nesprávne používanie antibiotík. Najúčinnější zbraňou v boji proti šíreniu infekcie je prevencia. V značnej miere k tomu prispieva hlavne zaradenie očkovania proti inváznym pneumokokovým infekciám do národného imunizačného programu. Aktívnu imunizáciou sa znižuje tiež počet komplikácií a miera nazofaryngeálneho nosičstva v populácii.

Pri invázných pneumokokových ochoreniach (IPO) dochádza k prieniku baktérií do pôvodne sterilných miest v ľudskom organizme, ako je napríklad krv, likvor, pleurálna tekutina, perikardiálna tekutina a pod. Tieto ochorenia sú jednou z hlavných príčin morbidít a mortality nielen u detí ale aj dospelých. Faktory asociované s horšou prognózou sú vek viac ako 65 rokov, šok, potreba mechanickej ventilácie, chronické ochorenie srdca alebo pľúc, renálne zlyhanie, imunosupresívna terapia a iné. Vyšší vek (nad 50 rokov) v závislosti od pridružených ochorení môže zvyšovať mortalitu, prípadne riziko pneumokokovej pneumónie aj pri infekcii menej virulentnými sérotypmi. Osobitne ťažký priebeh bol zaznamenaný u asplenických pacientov s poruchou imunity, príp. malnutríciami. V týchto prípadoch môže mať ochorenie rýchly priebeh s letálnym koncom (do 24 – 48 hodín). V súvislosti so stúpajúcim vekom

zaznamenalo *Národné referenčné centrum pre pneumokokové infekcie* v posledných 10 rokoch zjavný exponenciálny vzostup incidencie invázných pneumokokových infekcií.

Rizikom sú tzv. invázne pneumokokové ochorenia spôsobujúce bakteriémiu vedúcu ku vzniku pneumónie, sepsy, meningitídy alebo artritídy. Jedná sa o opúzdrenú (vysoko virulentnú) formu baktérií spôsobujúcich infekciu prevažne endogénneho pôvodu.

Na základe doterajších štúdií možno konštatovať, že viac ako 90% ochorení u starších osôb predstavuje bakteriémia. Približne u 5-10 % pacientov to je meningitída (Solovič, Audičová 2013). Len u malého percenta pacientov (1-2%) bola zaznamenaná septická artritída, purulentná perikarditída a peritonitída. Bolo zistené, že 60-87% spomínaných infekcií je asociovaných s pneumóniou. Najvyššia zaznamenaná incidencia bakteriémie/sepsy na 100 000 pacientov bola zaznamenaná vo vekovej skupine 75 - 84 rokov, čo činilo 2,75 %. Je tu teda zjavný exponenciálny vzostup incidencie pneumokokovej infekcie s rastúcim vekom.

Meningitída je väčšinou sekundárna – otogénneho alebo poúrazového pôvodu.

Zaznamenaná letalita, zapríčinená pneumokokmi, je ale omnoho vyššia u staršej populácie s viacerými komorbiditami. Napríklad u pneumónie sa pohybuje od 10 do 30%, u meningitídy od 16 do 37% .

Súčasný stav riešenej problematiky na Slovensku a v zahraničí

Invázne pneumokokové ochorenia patria do skupiny nákaz podliehajúcich v zmysle zákona NR SR č. 355/2007 o ochrane, podpore a rozvoji verejného zdravia. Za náказы s vysokou dôležitosťou sú považované invázne pneumokokové infekcie aj v iných krajinách EU. Preto boli tieto náказы zaradené v zmysle rozhodnutia Európskej komisie medzi 50 nákaz, ktoré sú hlásené do Európskeho systému surveillance (The European Surveillance System – TESS-y) v rámci ECDC.

Pre hlásenie pneumokokových inváznych ochorení platí nasledovná štandardná definícia:

Klinické kritériá - nie sú relevantné pre účely epidemiologického sledovania

Laboratórne kritériá – aspoň jedno z týchto troch kritérií:

- Izolácia pneumokokov z prirodzene sterilného miesta
- Dôkaz nukleovej kyseliny pneumokokov z prirodzene sterilného miesta
- Izolácia antigénu z prirodzene sterilného miesta

Epidemiologické kritériá - neuplatňujú sa

Klasifikácia prípadu ochorenia :

- A. Možný prípad ochorenia – neuplatňuje sa
- B. Pravdepodobný prípad ochorenia - neuplatňuje sa
- C. Potvrdený prípad ochorenia – každá osoba, ktorá spĺňa laboratórne kritériá

Pri hlásení pneumokokových infekcií treba postupovať podľa formulára vypracovaného Slovenským Národným Referenčným Centrom pre pneumokokové náказы (NRC) .

Materiál a metódy

Diagnostika sa opiera o (podľa štatútu NRC pre pneumokokové infekcie):

- diagnostické postupy uvedené v štatúte NRC pre pneumokokové infekcie
- sérotypizáciu kmeňov *S. pneumoniae*
- molekulárno-biologický dôkaz *S. pneumoniae*
- pulznú elektroforézu verifikovaných kmeňov s následným zaradením do pulzotypov
- úlohy vyplývajúce z Odborného usmernenia pre surveillance pneumokokových infekcií

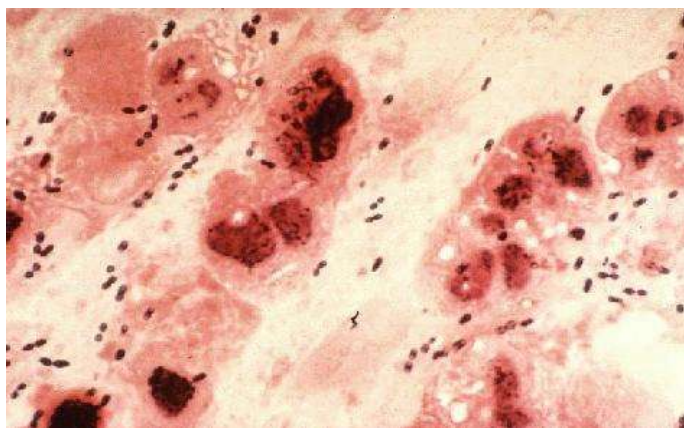
Klinický obraz pneumokokovej infekcie môže byť veľmi menlivý. Diferenciálna diagnostika sa robí na základe posúdenia anamnézy , klinického obrazu a RTG výsledkov. Diferenciálno-diagnosticky je potrebné odlišiť veľmi pestrú paletu ochorení inej genézy. Diagnózu treba potvrdiť mikrobiologicky.

Odber materiálu

Odber materiálu závisí od klinického obrazu pacienta. Odoberá sa napríklad spútum, punktát, aspirát, bronchoalveolárna laváž (BAL), výtery z hnisavých ložísk (ucho, spojivkový vak), atď.

Mikroskopický dôkaz

Realizuje sa farbením mikroskopického preparátu podľa Grama. (Obr. 1)



Obr. 1 Mikroskopický preparát - *S.pneumonie* v spúte *Kultivačný dôkaz* (19)
Streptococcus pneumoniae môžu rásť v hlienovitých, bezfarebných kolóniách nepravidelného tvaru pripomínajúci kvapôčky oleja (Obr. 2). Pri zníženej tvorbe kapsulového polysacharidu sú kolónie lesklé, α - hemolytické veľké asi 1 mm, charakteristického miskovitého tvaru (Obr.3).



Obr. 2 Mikroskopický preparát - *S.pneumonie* v spúte (41)



Obr. 3 Typický miskovitý tvar kolónií - *S.pneumoniae* (S-fáza) (42)

Pre identifikáciu sa používa niekoľko testov.

- najjednoduchšie je stanovenie pomocou optochínového testu
- v prípade problémov, či nejasností možno využiť aj ďalšie identifikačné metódy, akými sú napríklad latexová aglutinácia, biochemická identifikácia pomocou Streptotestu (Lachema) alebo molekulárno-biologické metódy (PCR, Génové sondy).
- sérotypizácia – ide o identifikáciu baktérií na základe ich antigénnej štruktúry.

Problémy antimikrobiálnej terapie a prevencie.

Súčasný stav účinnosti antibiotík na Slovensku a ich vysokej, často neodôvodnenej spotreby, vyžaduje neodkladné riešenie niektorých efektívnych opatrení, hlavne na úrovni regionálnej a lokálnej. Rezistencia, ako bolo opakované v mnohých štúdiách potvrdené,

(Mikromed, Slovenský medicínsky dialóg, GRACE), má totiž výrazný regionálny charakter. Boli zistené výrazné odlišnosti, ktoré súvisia s pravidelným monitoringom výskytu pneumokokových infekcií a ich terapii v rámci jednotlivých regiónov Slovenska. (14,17).

Na liečbu infekcií DC v ambulantnej praxi sa používa približne 60 – 80 % všetkých antibiotík. Z toho je približne 50 – 60 % antibiotík predpísaných zbytočne a sú nevhodne indikované. Často neodôvodnené a nadmerné užívanie antibiotík (ATB) urýchľuje vznik a šírenie rezistencie a z toho dôvodu stratégie ciele sú obmedzené na obmedzenie spotreby ATB patria medzi najúčinnejšie. Rezistencia baktérií ohrozuje ako účinnosť ATB, tak aj výsledok liečby infekčných ochorení. (7,8,9)

Perspektívne riešenie tohto medicínskeho problému sa vidí v prevencii pneumokokových ochorení a to hlavne v povinnej vakcinácii rizikových vekových skupín (deti a seniori) a indikovaných imunodeficientných pacientov (23,31). Problémom tu ale môžu byť odlišnosti v rámci imunitného systému každého človeka a jeho reakciou na podanú vakcínu.

Odporúčané očkovanie u seniorov:

1. Pacienti s rizikovými faktormi (chronické ochorenia): bronchiálna astma, diabetes, chronických srdcovo-cievnych ochorení, pľúc, obličiek, atď. (polysacharidová vakcína *Pneumo23*)

2. Pacienti s vysokorizikovými faktormi = závažné poruchy imunity, absencia sleziny, malígne ochorenia. (konjugovaná vakcína *Prevenar13* i polysacharidová vakcína *Pneumo23*)

3. Seniori nad 65 rokov (konjugovaná vakcína *Prevenar13* i polysacharidová vakcína *Pneumo23*)

Konjugované vakcíny (*Prevenar 13* sa v dnešnej dobe uprednostňujú pred polysacharidovými (*Pneumo23*), pretože poskytujú „komplexnú“ imunitnú odpoveď so špecifickými protilátkami (IgG1 a IgG3) – ukázalo sa, že sú účinnejšie, ako tie, ktoré sú indukované i polysacharidovou vakcínou *Pneumo23* (IgG2). Vďaka tomu je ochrana po očkovaní spoľahlivejšia a s vysokou pravdepodobnosťou tiež dlhodobejšia. (2,3,4,40).

Kvalita imunitnej odpovede ovplyvňuje nielen prevenciu pneumokokových ochorení, ale tiež bacilonosičstvo.

V ostatnej dobe sa ale v rámci celosvetového meradla u seniorov odporúča očkovanie obidvoma vakcínami. Podmienkou je zachovanie 8-týždňového intervalu – lepšie 1 roka. Ako dôvod sa uvádza, že ak je tento interval dlhší, strata imunitnej odpovede je menšia.

Ako prvé sa odporúča očkovanie konjugovanou vakcínou *Prevenar13*

Podľa Regionálneho úradu verejného zdravotníctva SR sa pre prax odporúča:

1. Dôsledné presadzovanie očkovania u rizikových vekových skupín

2. Vykonávanie včasnej mikrobiologickej diagnostiky hlavne u otitíd a sínusitíd

3. Pravidelné zisťovanie sérovarov izolovaných kmeňov a regionálne sledovanie ich výskytu

4. V rámci posilnenej surveillance IPN sledovať aj neskoré následky po prekonaní infekcie. (24,25,26)

Záver

Záverom možno skonštatovať, že hoci sa celosvetovo uvádza viac ako 91 sérotypov *Streptococcus pneumoniae*, ich prevalencia sa obmedzuje na cca 30 sérotypov. Rizikom sú invázne pneumokokové ochorenia ako napríklad artritída, sepsa, meningitída. Tieto dominujú

u niektorých rizikových skupín ako sú deti do 5 rokov veku, seniori starší ako 60 rokov a pacienti s chronickými infekciami. Zdrojom je výhradne chorý človek alebo bacilonosič. Nosičstvo, morbidita, invazivita a mortalita sú určujúce pri pohľade na dôležitosť prevencie PI v populácii (7,8,9). Podľa medzinárodných epidemiologických štúdií invázne pneumokokové ochorenia predstavujú celosvetový problém sprevádzaný vysokou morbiditou a mortalitou (4,18,22). Vzhľadom na to, že súčasné pneumokokové vakcíny sú sérotypovo špecifické, je mimoriadne dôležité monitorovanie výskytu kauzálnych sérotypov a dôsledkov vysokej genetickej plasticity pneumokokov, čo predstavuje i jeden z cieľov Európske siete pre invázne pneumokokové ochorenia.

Slovenské Národné referenčné centrum pre pneumokokové nákazy - na základe výsledkov hlásení prichádzajúcich z jednotlivých regiónov Slovenska upozorňuje na to, že aj pri významnom zlepšení v hlásenosti je incidencia pneumokokových infekcií na Slovensku 1,86/100000 obyvateľov (údaj za rok 2017) ešte stále ovplyvnená významnou podhlášenosťou, prípadne poddiagnostikovanosťou.

Táto situácia preto nabáda, aby bola regionálnemu šíreniu pneumokokových infekcií a ich kauzálnych sérotypov venovaná dostatočná pozornosť.

Literatúra

- 1. Avdičová, M., Francisciová, K., Klement, C., Donovalová, A.:** Epidemiologické aspekty výskytu invazívnych pneumokokových infekcií a dopad celoplošného očkovania detí proti pneumokokom na Slovensku, *Pediatrica pre prax – Supplement*1, 2012; 13(S1).
- 2. Beran, J., Havlík, J.:** Pneumokokové nákazy a možnosti očkování proti nim, Praha: Maxdorf, s.r.o., 2006, 136 s. ISBN 80-7345-091-7.
- 3. Beran, J., Havlík, J., Vonka, V.:** 2005. Očkování - Minulost, přítomnost, budoucnost. 1. vyd. Praha: Galén. 348 s. ISBN 80-7262-361-3.
- 4. Black, S., Shinefield, H., Fireman, B., et al.:** Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children, *Pediatr Infect Dis J.* 19, s. 187–195.
- 5. Blechová, Z., Marešová, V., Horová, B.:** Diagnostika *Streptococcus pneumoniae* v praxi, *Antibiotiká a rezist.*, 2007, 1-2(6), s.15-17
- 6. Bottková E., Maďarová L., Klement C., Čamajová J., Avdičová M., Hudečková H.:** Aktuálny stav vo výskyte invazívnych infekcií spôsobených *Streptococcus pneumoniae* na Slovensku, ich sérotypy a možnosti diagnostiky, VI. Slovenský vakcinologický kongres Štrbské Pleso 15.-17. Jan. 2015, Prednáška.
- 7. Bottková, E., Klement, C., Maďarová, L., Čamajová, J., Avdičová, M., Hupková H., Hudečková, H.:** Sérotypy invazívnych pneumokokových infekcií v rokoch 2011-2013 na Slovensku, *Pediatrica* 2014, 9(Supplement), s. 14-17.
- 8. Čamajová, J., Bottková, E., Klement, C., Maďarová, L., Hupková, H., Avdičová, M., H. Hudečková, H.:** Invazívne pneumokokové ochorenia a monitoring zámeny kauzálnych sérotypov *Streptococcus pneumoniae*. Podľa hlásení- Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici, Banská Bystrica 2012.
- 9. Gondová, I., Takáč, B.:** Výskyt pneumokokových pneumónií u hospitalizovaných pacientov v súčasnosti, *Pediatr. prax*, 2015, 16(4), s. 168–170.
- 10. Guevara, M., Barricarte, A., Pérez B., et al.:** Heptavalent-pneumococcal conjugate vaccine (Prevenar). Differences in effectiveness between populations, 2008 May-Aug. 31(2), s.171-192. Review. Spanish.
- 11. Hanquet, G., Perrocheau, A., Kissling E., et al.:** Surveillance of invasive pneumococcal disease in 30 EU countries: Towards a European system? ECDC Country Experts for Pneumococcal Disease. *Vaccine*. 2010 May 21; 28(23) s. 3920-8.

- 12. Hausdorff WP., Siber G., Paradiso PR.:** Geographic differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001; 357: 950–952.
- 13. Hope, J.:** Pneumonia jabs for pensioners to be scrapped 'as they don't work', Updated: for the Daily Mail, 31 May 2011.
- 14. Hupková, H., Trupl, J., et al.:** Antibiotická rezistencia a distribúcia sérotypov kmeňov *S. pneumoniae* pri akútnom zápale stredného ucha u detí do 5 rokov (predbežné výsledky), *Antibiotiká a rezistencia*, 2007, 5(1–2), s. 21–23.
- 15. Hupková, H., Jakubíková, J., Bazárová, K., et al.:** Two Case of Severe Invasive Infections in Children Caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14- case report, *Folia Microbiol.*, 2009, 54 (6), s. 563 – 565.
- 16. Hupková, H., Urbančíková, I., Trupl, J., et al.:** Mikrobiologické aspekty otitis media acuta v detskom veku v Slovenskej republike, *Pediatr. Prax*, 2010, Supl.3, s. 8 – 11.
- 17. Hupková, H., Jakubíková, J., Stankovič, I., et al.:** Rezistencia pneumokokov na antibiotiká v Slovenskej republike, *Antibiotiká a rezistencia*, 2007, 6, (1-2), s. 6 – 11.
- 18. Huss A, Scott P, Stuck AE, Trotter C, Egger M.:** Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis. *CMAJ*. 2009 Jan 6;180(1):48-58., *CMAJ*. 2009 May 12;180(10), s.1038.
- 19. <http://textbookofbacteriology.net/>**
- 20. Kajtár, P.:** Súčasné odporúčania na diagnostiku a liečbu komunitných pneumónií, *Via pract.*, 2015, 12(2), s. 64–70.
- 21. Konradsen HB, Kalsoft MS.:** Invasive pneumococcal infections in Denmark from 1995 to 1999: Epidemiology, Serotypes, and Resistance. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2002; 9(2): 358–365.
- 22. Laššán, Š., Laššánová, M.:** Vakcinácia a prevencia pneumokokovej komunitnej pneumónie, *Klin. Farmakol. Farm.*, 2014, 28(4), s. 147–151.
- 23. Lepoutre, A., Varon, E., Georges, S., et al.:** Impact of infant pneumococcal vaccination on invasive pneumococcal diseases in France, 2001–2006. *Euro Surveill*. 2008 Aug 28;13(35), s. 18962.
- 24. Lišková, A., Lengyelová, L.:** Antibiotická rezistencia u *Streptococcus pneumoniae* v rokoch 2010–2013. *Pediatrica (Bratisl.)*, 2014, s. 18–19.
- 25. Maďarová, L., Bottková, E., Oravkinová, M., Avdičová, M., Feiková, S., Klement, C.:** National surveillance system of invasive pneumococcal diseases in Slovakia, 2011–2017. *ESPID* 2018. Poster. Malmö 28.05.2018–02.06.2018.
- 26. Maďarová, L., Bottková, E., Oravkinová, M., Avdičová, M., Feiková, S., Klement, C.:** Multidisciplinárny prístup k poskytovaniu zdravotne starostlivosti. Konferencia SZU. Banská Bystrica. ISBN: 978-80-89702-51-0.
- 27. Maďarová, L., Bottková, E., Oravkinová, M., Avdičová, M., Feiková, S., Klement, C.:** Invazívne pneumokokové a hemofilové ochorenia na Slovensku, IX. Vakcinologický kongres 2018. 26–28.04.2018. ISBN 978-80-89797-31-8. Zborník abstraktov, str. 29. **Surveillance invazívnych pneumokokových ochorení na Slovensku**
- 28. Marchetti F, Ronfani L, Nibali SC, Tamburlini G.:** Delayed prescription may reduce the use of antibiotics for acute otitis media: a prospective observational study in primary care. *Personal. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 2005, 159(7): 679–684.
- 29. Motlová, J., Beneš, Č., Křížová, P.:** Invazivní pneumokokové onemocnění v České republice v letech 2000–2006. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2008, 57, s. 14–21.
- 30. Motlová, J., Beneš, Č., Křížová, P.:** Invazivní pneumokokové onemocnění v České republice v letech 2000. *Zprávy EM (SZÚ, Praha)*, 2009, 18, s. 203–209.

31. **Motlová J.** :Distribuce sérotypů a séroskupin *Streptococcus pneumoniae* u pacientů s invazivními pneumokokovými onemocněními v České republice v letech 1996–2003: podklady pro vakcinační strategii. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2005; 1(54): 3–10.
32. **Petráš, M., Lesná, I.K.**: Očkování proti pneumokokovým nákazám, Manuál očkování 2010.
33. **Pleško, M., Hupková, H., Šimurka, P.**: Analýza pneumokokových infekcí u pacientov hospitalizovaných na pediatrickej klinike FN Trenčín v rokoch 2000 – 2010, *Antibiotiká a rezistencia*, 2011,(1), s. 49–52.
34. **Prymula R.** : Invazivní pneumokoková onemocnění – incidence ve světě a implikace pro ČR. *Pediatr pro Praxi*, 2006; 7(6): 334–337.
35. **Ruckinger, S., et al.**: Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Germany. *Vaccine* 2009; 27, s. 4136–41.
36. **Solovič I., Avdičová M., Szilágyová M., Švihrová V., Gembula I., Tichopád A.**: Pneumokokové ochorenia a ich zdravotná a ekonomická záťaž u staršej populácie na Slovensku, *Revue medicíny v praxi* 2013,11(4), s. 8-12.
37. **Sirági, P., Klement, C., Mezencev, R., Mad'arová, L., Kissová, R., Strhársky, J., Trenkler, J., Solovič, I., Avdičová, M., Szilágyiová, M., et al .:** Zdravotná a ekonomická záťaž pneumokokových ochorení u staršej populácie na Slovensku, In: *Časopis pre kontinuálne vzdelávanie v pneumológii a ftizeológii* 2013.
38. **Urbášková, P., Jakubů, V., Žemličková, H., a C Z-EAR SS*:** Trendy antibiotické rezistence invazivních kmenů *Streptococcus pneumoniae* sledované v rámci EARSS v České republice, *Antibiotiká a rezistencia*, 2007,1 – 2,(6),s. 12-14.
39. **Vacková, Z., Klímová, M., Kozáková, J.**: Nová metoda a schéma typizace *Streptococcus pneumoniae*, *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 2013, č. 2, s. 62.
40. **Welte T., Torres A., Nathwani D.**: Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe ,*Thorax* 2012;67(1), s.71-79.
41. **Wikimedia Commons**
42. **www.bacterianphotos.com**
43. **Žemličková, H.**: *Streptococcus pneumoniae* – vliv pneumokokových konjugovaných vakcín na výskyt antibiotické rezistence, *Pediatr. praxi* 2012; 13(6): 424–426.

PROSTACYKLÍN A ATEROSKLERÓZA

(Prostacyclin and atherosclerosis)

*Ingrid Žitňanová¹, Stanislav Oravec², Monika Dvořáková¹,
Lucia Laubertová¹, Mária Janubová¹, Katarína Koňariková¹, Jana Muchová¹*

¹ Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, ingrid.zitnanova@fmed.uniba.sk

² I. interná klinika, Lekárska fakulta UK, UNB, Mickiewiczova 13, Bratislava

Súhrn

Významná úloha pri udržiavaní cievnej homeostázy prináleží prostanoïdom s ich vazodilátčným pôsobením na hladkú svalovinu ciev. Je to predovšetkým prostacyklín (PGI₂) s vazodilátčným účinkom a tromboxán A₂, ktorý v porovnaní s PGI₂ má antagonistické účinky. Cieľom našej práce bolo zistiť, ako sa menia hladiny prostacyklínu v závislosti od rôznej predispozície jedincov k ateroskleróze, ako aj v závislosti od pohlavia. Vzorky krvnej plazmy sme získali od 142 dobrovoľníkov, z ktorých bolo 91 žien a 51 mužov, ktorých sme na základe celkového cholesterolu a LDL subfrakcií rozdelili do 6 fenotypových skupín, z ktorých skupiny 1–4 mali neaterogénny lipidový profil a skupiny 5–6 aterogénny. Zistili sme, že jedinci v skupinách 1–4 mali signifikantne zvýšené hladiny prostacyklínu v porovnaní s jedincami v skupinách 5–6. Pokles PGI₂ sa signifikantne prejavil len u žien. V skupinách 5–6 sme zistili signifikantne vyššiu produkciu PGI₂ u mužov oproti. U žien v skupinách 5–6 sme zistili signifikantnú pozitívnu koreláciu medzi hladinami malých denzných LDL₃₋₇ subfrakcií a hladinami PGI₂ v plazme. Avšak táto korelácia sa nezistila u neaterogénnych jedincov vo fenotypových skupinách 1–4. Z lipoproteínových subfrakcií v aterogénnych skupinách 5–6 boli signifikantne znížené len antiaterogénne subfrakcie LDL₁ a large HDL oproti neaterogénnym skupinám 1–4.

Kľúčové slová

prostacyklín, ateroskleróza, LDL a HDL subfrakcie

Summary

An important role in the maintenance of vascular homeostasis belongs to prostanoids with their vasoactive effect on the smooth muscle of the blood-vessels. It is primarily prostacyclin (PGI₂) with a vasodilating effect and thromboxane A₂, which has antagonistic effects compared to PGI₂. The aim of our work was to find out how prostacyclin levels change depending on the different predisposition of individuals to atherosclerosis as well as on gender. Samples of blood plasma we obtained from 142 volunteers (91 females and 51 males), which we divided into six phenotypic groups based on total cholesterol and LDL subfractions. Groups 1–4 had non-atherogenic lipid profile and groups 5–6 atherogenic. We found that individuals in groups 1–4 had significantly elevated prostacyclin levels compared to individuals in groups 5–6. PGI₂ decline was significantly manifested in females only. In groups 5–6 we found significantly higher PGI₂ production in males compared to females. In females in groups 5–6, we found a significant positive correlation between levels of small dense LDL₃₋₇ subfractions and PGI₂ levels in plasma. However, this correlation was not found in non-atherogenic individuals in phenotypic groups 1–4. From lipoprotein subfractions

in atherogenic groups 5-6, only anti-atherogenic subfractions of LDL1 and large HDL were significantly reduced compared with non-atherogenic groups 1-4.

Keywords

prostacyclin, atherosclerosis, LDL and HDL subfractions

Úvod

K udržaniu normálnej funkcie cievnej steny je potrebné zachovať integritu cievneho endotelu. Jeho poškodenie vedie k poruchám cievy, vyúsťujúcim do aterosklerózy. Sekréciou biologicky aktívnych mediátorov zasahujú endotelové bunky do funkcie cievy, homeostázy cievneho systému a tým nepriamo ovplyvňujú funkciu ostatných orgánov a organizmu ako celku (1). Významná úloha pri udržiavaní cievnej homeostázy prináleží prostanoïdom s ich vazodilátčným pôsobením na hladkú svalovinu ciev. Je to predovšetkým prostacyklín (PGI₂) s vazodilátčným účinkom (2) a tromboxán A₂, ktorý v porovnaní s PGI₂ má antagonistické účinky (1). Neporušená sekrécia PGI₂ a účinná kontrola sekrécie TxA₂ je dôležitá pre udržanie vaskulárnej homeostázy. Pri ateroskleróze sa vyskytujú poruchy arteriálnej produkcie PGI₂.

V roku 1976 sa zistilo, že prostaglandínové endoperoxidy sú transformované arteriálnymi mikrozómami na nestabilnú látku s antiagregačnými a vazodilátčnými vlastnosťami (3 - 5) Tento nový lipidový faktor bol nazvaný PGX, a keď bol neskôr syntetizovaný, jeho názov bol zmenený na prostacyklín (PGI₂) (6). Prostacyklín je biologicky aktívny lipid so silnými antiagregačnými a vazodilátčnými vlastnosťami.

Prostacyklín (PGI₂), nestabilný metabolit kyseliny arachidónovej, syntetizovaný vaskulárnymi endoteliálnymi bunkami a bunkami hladkého svalstva, je silným vazodilátčným a endogénnym inhibítorom agregácie doštičiek. Prostacyklín je členom prostanoïdnej skupiny eikanoïdov, ktoré regulujú homeostázu, hemostázu, funkciu hladkého svalstva a zápal. Prostanoidy sú odvodené z kyseliny arachidónovej účinkami fosfolipázy A, cyklooxygenázy (COX) a špecifických prostaglandínových syntáz. Prostacyklín zabraňuje aktivácii krvných doštičiek. Interakcie prostacyklínu na rozdiel od tromboxánu (TXA₂), silne naznačujú mechanizmus kardiovaskulárnej homeostázy medzi týmito dvomi hormónmi v súvislosti s poškodením ciev.

Prostacyklín PGI₂ je neenzýmovo hydratovaný na 6-keto prostaglandín F_{1α} (počas rozpadu – 2-3 min) a potom sa rýchlo premení na hlavný metabolit 2,3-dinor-6-keto PGF_{1α} (t_{1/2} = 30 minút) (7). Prostacyklín bol kedysi považovaný za cirkulujúci hormón, ktorý reguloval interakcie doštičiek a ciev, ale rýchlosť sekrécie do obehu spolu s krátkym polčasom naznačujú, že prostacyklín pôsobí lokálne (8).

Cieľom našej práce bolo zistiť, ako sa menia hladiny prostacyklínu v závislosti od rôznej predispozície jedincov k ateroskleróze, ako aj v závislosti od pohlavia.

Materiál a metódy

Vzorky krvnej plazmy sme získali od 142 dobrovoľníkov (priemerný vek 53,66 ± 14,92 rokov), z ktorých bolo 91 žien (priemerný vek 54,14 ± 1,531 rokov) a 51 mužov (priemerný vek 53,41 ± 2,23 rokov). Na základe celkového cholesterolu a LDL subfrakcií sme dobrovoľníkov rozdelili do 6 fenotypových skupín (tab. 1)

		mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
Trieda	Aterogenicita	celkový chol	celkové LDL	LDL1,2	LDL3-7
1a	N	< 200	< 130	norma	0
1b	N	> 200	> 130	vysoké	0
2a	N	> 200	< 130	norma	stopy
2b	N	> 200	> 130	norma	stopy
3	N	> 200	< 130	norma	zvýšené
4	N	> 200	> 130	norma	zvýšené
5	A	< 200	< 130	norma	vysoké
6	A	> 200	> 130	norma	vysoké

Tab. 1 Fenotypové skupiny jedincov podľa celkového cholesterolu a LDL subfrakcií
N – neaterogénna skupina, A – aterogénna skupina

Plazma: Vzorky krvi s antikoagulantom EDTA (etyléndiamíntetraoctová kyselina) boli centrifugované po dobu 5 min. pri 1200 x g, pri 4°C. Plazma bola uskladnená pri -80°C a použitá na stanovenie hladín prostacyklínu PGI₂.

Izolácia prostanoidov z krvnej plazmy

Prostacyklín sme izolovali z krvnej plazmy pomocou C-18 chromatografických kolón Sep-Pak (Waters). Kolónky sme aktivovali premytím 99.6% etanolom (20 ml), následne 15% etanolom (20 ml) a nakoniec vodou (20 ml). Jeden ml plazmy sme zmiešali s 1 ml fosfátového tlmivého roztoku (pH 3,3) a naniesli na kolónu. Následne sme kolónu premyli redestilovanou vodou (20 ml), 15% etanolom (20 ml) a petroléterom (20 ml), pomocou ktorého sme odstránili lipidy z plazmy. Na elúciu prostanoidov sme použili metylformiát (10 ml). Vyeluované prostanoidy sme zamrazili na -70 °C.

Odparovanie vzoriek

Prostanoidy v metylformiáte sme odparovali pod dusíkom vo vodnom kúpeli pri teplote 40 – 50°C. Po odparení metylformiátu sme k prostanoidom pridali 0,5 ml EIA tlmivého roztoku z Elisa kitu Prostaglandin F_{1α} (Cayman Chemical, MI, USA).

Stanovenie koncentrácie prostacyklínu v krvnej plazme

Koncentrácia prostacyklínu PGI₂ v krvnej plazme u dobrovoľníkov bola stanovená pomocou Elisa kitu 6-keto Prostaglandin F_{1α} (Cayman Chemical, MI, USA).

Stanovované parametre

Celkový cholesterol (TC), LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triacylglyceroly (TAG) v plazme boli stanovené v certifikovanom laboratóriu. Na analýzu subfrakcií plazmatických lipoproteínov sme použili elektroforézu na polyakrylamidovom géli - systém Lipoprint (Quantimetrix corp., CA, USA).

Štatistická analýza

Štatistická analýza bola uskutočnená pomocou SPSS verzie 18 (SPSS Inc., USA). Výsledky sú prezentované ako priemer ± SEM. Porovnanie dvoch skupín sa analyzovalo Študentovým t testom. Na porovnanie viac ako dvoch skupín s porovnateľnými odchýlkami sa vykonala jednosmerná analýza ANOVA, po ktorej nasledoval Tukey test. Hladina významnosti bola nastavená na hodnotu P < 0,05.

Výsledky

V našej práci sme sledovali, či sa menia hladiny prostacyklínu v závislosti od rôznej predispozície jedincov k ateroskleróze, ako aj v závislosti od pohlavia.

Jedinci v neaterogénnych skupinách (1-4) majú signifikantne zvýšené hladiny prostacyklínu ($p=0,045$) v porovnaní s jedincami v aterogénnych fenotypových skupinách 5-6 (tab. 3).

Pokles PGI sa signifikantne prejavil len u žien (1532 ± 35 pg/ml v skupine 1a – 4 vs 1362 ± 40 pg/ml v skupine 5-6, $p=0,03$), pričom u mužov v aterogénnych skupinách 5-6 bol nesignifikantne znížený v porovnaní s neaterogénnymi skupinami 1a-4. V našom projekte sme tiež zistili signifikantne vyššiu produkciu PGI u mužov oproti ženám v aterogénnych skupinách 5-6 (ženy $1362,12 \pm 40,30$ pg/ml vs muži $1506,95 \pm 319,7$ pg/ml; $p=0,03$).

U žien s aterogénnou hypercholesterolémiou vo fenotypových skupinách 5-6 sme zistili signifikantnú pozitívnu koreláciu medzi hladinami malých denzných LDL3-7 subfrakcií a hladinami PGI v plazme ($p<0,01$). U mužov v aterogénnych skupinách 5-6 bola daná korelácia negatívna, avšak nesignifikantne. Korelácia medzi malými denznými LDL3-7 subfrakciami a PGI sa však nezistila u neaterogénnych jedincov vo fenotypových skupinách 1a-4. Z LDL cholesterolových subfrakcií len LDL1 bola signifikantne znížená v aterogénnych skupinách 5-6 ($p<0,001$) (tab.2). Ostatné subfrakcie boli signifikantne zvýšené. Podobný výsledok sme zistili aj u HDL subfrakcií, kde iba large HDL boli signifikantne znížené v aterogénnych skupinách 5-6 oproti neaterogénnym skupinám 1 – 4 ($p<0,001$) (tab.3).

			mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
Fenotypové skupiny		Vek (roky)	total chol	LDL	LDL1	LDL2	LDL3-7
1a-4	PRIEMER	54,13	214,69	134,40	57,29	21,63	1,47
	sem	1,53	4,77	3,87	1,74	1,22	0,22
	N	104	104	104	104	104	104
5-6	PRIEMER	52,91	242,74	157,97	39,89	42,03	20,03
	sem	2,23	11,13	6,14	2,55	2,47	2,62
	N	35	35	35	35	35	35
p	T-test	0,6094	0,0100	0,0027	0,000	0,000	0,000

Tab. 2 LDL lipoproteínové subfrakcie

		mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	pg/ml
Fenotypové skupiny		large HDL	imHDL	Small HDL	HDL	PGI
1a-4	PRIEMER	21,89	25,89	7,21	55,11	1545,3
	sem	1,26	0,70	0,42	1,71	29,114
	N	66	66	66	66	95
5-6	PRIEMER	11,74	23,37	7,06	42,58	1426,4
	sem	1,50	2,06	0,48	2,71	41,802
	N	19	19	18	19	32
p	T-test	0,000	0,146	0,855	0,0007	0,045

Tab. 3 HDL lipoproteínové subfrakcie

Diskusia

Cieľom našej práce bolo zistiť, ako sa menia hladiny prostacyklínu v závislosti od rôznej predispozície jedincov k ateroskleróze, ako aj v závislosti od pohlavia. V skupine našich dobrovoľníkov boli fenotypové skupiny 5-6 skupiny s aterogénnym lipidovým profilom a skupiny 1a – 4 s neaterogénnym.

LDL-cholesterol sa považuje za jeden z najdôležitejších faktorov vzniku a rozvoja aterosklerózy. Podľa veľkosti častíc sa delí na 5 skupín, z ktorých tzv. malé denzné častice sú vysoko aterogénne, pretože, vzhľadom k svojej veľkosti, ľahšie prenikajú do arteriálnej steny. Majú tiež nižšiu afinitu k LDL-receptoru, rýchlo sa oxidujú, majú dlhší polčas života a v porovnaní s väčšími časticami LDL, vyšší obsah cholesterolu.

Existuje niekoľko štúdií, ktoré dokazujú významný vplyv malých denzných LDL na rozvoj aterosklerózy, a to aj nezávisle na ostatných známych lipidových a iných faktoroch. Zistilo sa, že u pacientov s kardiovaskulárnym ochorením sú koncentrácie týchto subfrakcií signifikantne vyššie ako u zdravých ľudí (9).

V našej práci sme zistili, že jedinci s vyššou predispozíciou k ateroskleróze (skupina 5-6), s vysokými hladinami malých denzných LDL3-7 subfrakcií mali signifikantne znížené hladiny prostacyklínu. Rastúci počet dôkazov z rôznych štúdií ukázal, že PGI₂ môže mať ochranný účinok voči riziku aterosklerózy (10). Zároveň protektívny účinok na vaskulárny endotelový systém môžu mať aj veľké subfrakcie HDL (large HDL) a LDL1 subfrakcie, ktoré boli signifikantne znížené u jedincov v aterogénnej skupine 5-6.

Ateroskleróza je zápal v intime veľkých artérií, ktorý je vyvolaný vysokými hladinami sérového cholesterolu, a v ktorom rôzne typy buniek vrátane monocytov / makrofágov, endotelových buniek (ECs), buniek hladkého svalstva (SMC), T buniek, a krvné doštičky komplexne interagujú (1). Aké sú teda základné mechanizmy účinkov TXA₂ a PGI₂ pri aterogenéze? Ross a Gloenset (11) veria, že intravaskulárna aktivácia krvných doštičiek je kľúčový proces pre tvorbu ateromatózneho plaku. Prečo ale krvné doštičky nie sú aktivované v artériách zdravých jedincov? U zdravých jedincov prostacyklín zabraňuje aktivácii krvných doštičiek, potláča ich prirodzenú tendenciu k adhézii a agregácii. Moncada (5) predpokladá, že ateroskleróza sa vyvinie, keď je obmedzené vylučovanie prostacyklínu. Inými slovami, ateroskleróza je choroba z nedostatku prostacyklínu (5). V našom projekte sme potvrdili signifikantne znížené hladiny prostacyklínu u pacientov s aterogénnym lipidovým profilom v porovnaní s jedincami s neaterogénnym lipidovým profilom. Zaujímavé je naše zistenie pozitívnej korelácie hladiny prostacyklínu s hladinami malých denzných LDL3-7 subfrakcií v aterogénnych skupinách 5-6, ale nie v neaterogénnych skupinách 1-4. Táto korelácia sa prejavila len u žien, u ktorých sme zistili signifikantné zníženie hladiny PGI oproti skupine 1-4. Pohlavné rozdiely v produkcii PGI boli popísané v in vitro experimente použitím ľudských endotelových buniek izolovaných zo žily pupočníkovej šnúry. Výsledky vykazujú vyššiu odozvu samčích buniek na stimuláciu trombínom ako bunky samíc (12). V našom projekte sme tiež zistili signifikantne vyššiu produkciu PGI u mužov oproti ženám v aterogénnych skupinách 5-6. Muži v aterogénnych skupinách mali signifikantne vyššie hladiny PGI oproti ženám, čo mohlo byť odpoveďou na signifikantne zvýšené LDL3-7 subfrakcie u mužov.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená grantom VEGA 1/0109/16. Vďaka patrí pani Oľge Reinoldovej z I. internej kliniky LF UK, UNB, Bratislava, za technickú spoluprácu pri stanovovaní lipoproteínových subfrakcií v plazme.

Literatúra

1. **Majed BH, Khalil RA.** Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. *Pharmacol Rev.* 2012; 64 (3): 540-82.
2. **Whorton AR, Smigel M, Oates JA, Frölich JC.** Regional differences in prostacyclin formation by the kidney. Prostacyclin is a major prostaglandin of renal cortex. *Biochim Biophys Acta* 1978; 529 (1): 176-80.
3. **Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane J R.** Prostaglandins 1976; 12: 897–913.
4. **Gryglewski R, Bunting S, Moncada S, Flower R, Vane J R.** Prostaglandins 1976; 12: 685–713.
5. **Moncada S, Vane JR.** Interrelationships between prostacyclin and thromboxane A₂. *Ciba Found Symp* 1980; 78: 165-83.
6. **Johnson R A, Morton DR, Kinner JH.** Prostaglandins 1976; 12, 915–928.
7. **Rosenkranz B, Fischer C, Reimann I, Weimer KE, Beck G, Frölich JC.** Identification of the major metabolite of prostacyclin and 6-ketoprostaglandin F_{1α} in man. *Biochimica et Biophysica Acta* 1980; **619**: 207-213.
8. **Frölich J.C.** Measurement of eicosanoids. *Prostaglandins* 1984; 27: 349-369.
9. **Toft-Petersen AP, Tilsted HH, Aarøe J, Rasmussen K, Christensen T, Griffin BA, Aardestrup IV, Andreassen A, Schmidt EB.** Small dense LDL particles – a predictor of coronary artery disease evaluated by invasive and CT-based techniques: a case control study. *Lipids in Health and Disease* 2011; 10, 21: 1-7.
10. **Stitham J, Hwa J.** Prostacyclin, Atherothrombosis and Diabetes Mellitus: Physiologic and Clinical Considerations. *Curr Mol Med* 2016; 16(4): 328-42.
11. **Ross R, Glomset JA.** The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med* 1976; 295(8): 420-5.
12. **Batres RO, Dupont J.** Gender differences in prostacyclin and prostaglandin E₂ synthesis by human endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Med* 1986; 22(2): 159-71.



Anatomický ústav LF UK v Bratislave
Slovenská anatomická spoločnosť
Dekan LF UK v Bratislave