

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
LEKÁRSKA FAKULTA

Eliška Kubíková, Peter Weismann
Dominika Rusnáková, Radoslav Zamborský

**ČERPAME Z MINULOSTI,
KTORÁ NÁS NAVEDIE
NA BUDÚCNOSŤ**

2015
UNIVERZITA KOMENSKÉHO BRATISLAVA

© Vydavateľstvo PROPRINT s.r.o., Bratislava, 2015

Editori: doc. MUDr. Eliška Kubíková, PhD.
doc. RNDr. Peter Weismann, PhD.
MUDr. Dominika Rusnáková
MUDr. Radoslav Zamborský, PhD., MPH

Recenzenti: prof. MUDr. Štefan Polák, CSc.
prof. MUDr. Ján Jakubovský, DrSc.

ISBN: 978-80-89747-06-1

EAN: 9788089747061

Vážení autori, milí kolegovia!

A opäť prešiel nielen akademický školský rok, ale aj rok skutočný, so svojimi 365 dňami, kedy človek v hoci ktorom povolani i v živote bilancuje čo spravil, čo ešte spraví, resp. aké úlohy či už životné alebo profesionálne na neho čakajú.

Ďalší Ladzianskeho zborník (v poradí 9.) je zameraný tak trochu na retrospektívu. Čo sme urobili od vtedy, ako sme tento pamätný zborník obnovili. Veľa? Málo? Dá sa ešte viac? Odpoveď... ?

Čerpajme z toho, čo už bolo vytvorené a vytvárajme dokonalejšie.

doc. MUDr. Eliška Kubíková, PhD.

Bratislava, 7. 12. 2015

OBSAH

PREDSLOV	3
KAPITOLA I. ANATÓMIA	
E. Kubíková: Čerpajme z minulosti ktorá nás navedie na budúcnosť.	9
L. Guller, E. Kubíková, J. Jakubovský: Mimobunkový matrix červenej pulpy.	11
Z. Haviarová, P. Malovec, B. Bezák: Niektoré skúsenosti s darcovskými programami vo svete.	17
Z. Haviarová, V. Matejčík, P. Malovec, B. Bezák: Variácie vzniku vretenného nervu.	23
G. Hešková, D. Výbohová, Y. Mellová: Zmeny pozície nervus opticus v dôsledku variácií sinus sphenoidalis.	27
D. Kúkel'ová, D. Pacáková, F. Horváthová: Fenotypové aspekty vzniku rázštepov pery a podnebia.	33
L. Kunertová, Y. Mellová: Morfológické variácie krčných stavcov a ich funkčný význam.	36
M. Marčeková, E. Neščáková, Y. Mellová, J. Marček: Vplyv výživy na hlavové rozmery dojčiat.	39
M. Rozprávková, J. Ohlasová, K. Lovášová, A. Boleková, D. Kluchová: Anatómia temporomandibulárneho kĺbu v ortodontickej ambulancii.	44
R. Váhovský, P. Lukáčiková, E. Radzo: Vplyv fyzického zaťaženia na telesné zloženie hráčov ľadového hokeja.	51
KAPITOLA II. NEUROLÓGIA	
K. Bevízová, D. Rusnáková: Mechanizmy nervového systému koordinujúce fyziológiu vyprázdňovania močového mechúra.	58
M. Danková, E. Mechírová, I. Domoráková, Z. Fagová: Postkondicionovanie - možnosť využitia ischemickej tolerance v klinickej praxi.	62
M. Ďurfinová, R. Bartová, E. Procházková, M. Balco, D. Petrleničová, B. Líška, L. Turecký: Hypercholesterolémia a hypovitaminóza vitamínu D ako rizikové faktory pri skleróze multiplex.	66

Z. Fagová, M. Danková, I. Domoráková: Ubikvitín-proteazómový systém a neurodegeneratívne ochorenia.	73
M. Chomová: Diabetes mellitus a jeho vplyv na centrálnu nervovú sústavu.	76
P. Pazderová, P. Šiarnik, B. Kollár, P. Turčáni, K. Koňariková, I. Žitňanová: Oxidačný stres u pacientov s nahlou cievnu mozgovou príhodou.	84
KAPITOLA III. ONKOLÓGIA	
J. Frivaldská, I. Žitňanová, K. Koňariková: Ubikvitín-proteazómový systém a jeho inhibícia v liečbe rakoviny.	90
G.M. Girašková, I. Žitňanová, E. Rollerová, S. Scsuková, M. Dvořáková, K. Koňariková: Vplyv PEG-b-PLA nanočastice na nádorové a nenádorové bunkové línie.	94
O. Hamidová, L. Dolešová, V. Repiská: Hereditárny karcinóm ovária.	98
M. Jedličková, I. Žitňanová, K. Koňariková: Účinok extraktu z camellia sinensis na gliomové bunky.	101
A. Perželová, I. Siváková, P. Mráz, E. Kubíková: Naše glioblastómové bunkové línie 8-MG-BA a 42-MG-BA dosiahli svetový referenčný status.	106
I. Siváková, A. Perželová, P. Mráz, E. Kubíková: Komparatívna analýza klonovaných a neklonovaných glioblastómových bunkových línií.	109
KAPITOLA IV. VARIA	
Z. Deáková: Stanovenie tiolov v biologických vzorkách metódou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie.	113
M. Dvořáková, S. Scsuková, E. Rollerová, I. Žitňanová: Vplyv nanočastíc PEG-b-PLA a TiO ₂ na oxidačný stres potkanov.	120
H. Gbelcová, V. Repiská, D. Böhmer, T. Ruml, Z. Knejzlík: Úloha hypervariabilnej oblasti RAS proteínov v ich vnútrobunkovom transporte.	126
M. Horváthová, Z. Ďuračková, O. Uličná, O. Vančová, J. Muchová: Účinok rastlinného oleja na adipokíny u diabetických potkanov.	135
M. Horváthová, Z. Ďuračková, O. Uličná, O. Vančová, J. Muchová: Vplyv emulzie rybieho oleja na biochemické parametre diabetických potkanov.	141
Z. Jonecová, Š. Tóth, K. Čurgali, M. Mareta: Vplyv kvercetínu na imunoexpresiu COX-2 a MPO v bunkách jejunálnej sliznice po ischemicko-reperfúznom poškodení.	148

J. Kalninová, V. Jakuš: Mechanizmy obezity.	152
E. Krajčíová, K. Čorejová, P. Pričšáková, L. Oravcová, I. Gašparová, V. Repiská: Farmakogenetika fingolimodu.	156
L. Laubertová, Z. Ďuračková, I. Žitňanová: Účinok oleja z vlašských orechov na aktivitu glutatiónperoxidázy monocytov v hyperglykemických podmienkach.	160
M. Miko, I. Varga, E. Danišovič, Š. Polák: Ultraštruktúrna štúdia mezenchýmových kmeňových buniek izolovaných z kostrového svalu s ohľadom na ich využitie v regenerácii srdca.	164
J. Muchová, Koláček, M. Dvořáková, Z. Paduchová, I. Žitňanová, I. Čierna, Z. Országhová, D. Székyová, L. Kovács, Z. Ďuračková: Zápalové ochorenia čreva a oxidačný stres.	172
O. Otrubová, O. Uličná, P. Janega, Z. Ďuračková, J. Muchová: Regenerácia pečene po poškodení s ccl4 - môžu byť polyfenoly nápomocné.	179
Z. Padúchová, M. Horváthová, M. Chomová, B. Trebatický, J. Muchová: Úloha oxidačného stresu u dialyzovaných pacientov s chronickým ochorením obličiek.	185
L. Turecký, V. Kupčová, P. Ščigulinský: Ferooxidázová a polyfenoloxidázová aktivita ceruloplazmínu v sére pacientov po transplantácii pečene - predbežná informácia.	192
L. Turecký, J. Muchová, O. Otrubová, M. Ďurfinová, E. Uhlíková: Sérová cholinesteráza a obsah triacylglycerolov v pečeni pri steatóze.	198
L. Turecký, J. Muchová, O. Otrubová, E. Uhlíková: Vplyv flavonoidov na biotransformačný systém cytochrómu P-450 v pečeni potkanov.	205
J. Barinka, R. Zamborský, D. Rusnáková, M. Takácsová: Využitie podtlakového odsávania z rany jednorázovým prenosným systémom PICO (Smith and Nephew) na liečbu rán po zlomeninách.	210
M. Ždímalová, T. Bohumel, K. Plachá, H. El Falougy, P. Weismann: Grafové algoritmy a ich aplikácia pri hodnotení apoptózy.	215
KAPITOLA V. REVIEW	
P. Lukáčiková: Biomedicínske využitie probiotík.	220
D. Pacáková, D. Kúkeľová: Analógie vo fúzii vybraných orgánov.	223
P. Prišćáková, H. Gbelcová, E. Krajčíová, L. Oravcová, I. Gašparová, G. Minárik, D. Böhmer, V. Repiská: Úloha vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru v rozvoji diabetickej retinopatie.	226

J. Rodáková, Z. Paduchová, Z. Ďuračková, J. Muchová: Môžu rastlinné polyfenoly zlepšiť kvalitu života pacientov so psoriázou.

232

ČERPAJME Z MINULOSTI, KTORÁ NÁS NAVEDIE NA BUDÚCNOSŤ

Eliška Kubíková

*Anatomický ústav, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovensko,
eliska.kubikova@fmed.uniba.sk*

Anatómia je nepochybne veľmi stará disciplína. Ako vznikala? Nemáme celkom určité vedomosti, ale predsa ich vieme zdokumentovať nálezmi paleontológov či antropológov. História nás prevádza starým Egyptom a jej hieroglyfickými odkazmi, či starou Čínou alebo anatomickými vedomosťami v Mezopotámii, v Palestíne.

Vďaka však gréckej medicíne, Alkmeónovi, ktorý sa pokúsil o anatomickú pitvu, alebo Hippokratesovi, podľa ktorého dnešní absolventi lekárskeho štúdia skladajú sľub na promócií, pokročila medicína tam, kde je teraz. Takisto je to aj s anatómiou. Ale teraz nechajme dávnu históriu a poďme do dávnej, ale predsa nie tak dávnej súčasnosti.

Výučba anatómie na prvej historickej univerzite v Bratislave nie je presne v písomníctve zdokumentovaná. Veľkým medzníkom však bolo založenie Lekárskej fakulty v Budapešti, kde pôsobil napr. Václav Trnka (profesor anatómie), rytier z Křovic, ktorému v tom čase pripadla ťažká úloha vyučovať a prednášať anatómiu na univerzitnej úrovni. Musel však najprv založiť Anatomický ústav a zabezpečiť najmä jeho prevádzku. Pedagogická práca v anatómii bola rozdelená na teoretické prednášky a praktické cvičenia, ako je to aj doposiaľ. Základom bola učebnica anatómie dánskeho pôvodu Winslowa „Expositio anatomica structurae corporis humani...“. Nepomerne väčšie ťažkosti však nastali s praktickým vyučovaním anatómie. Pre anatomické pitvy mali Bratislavská a Nitrianska stolica dodávať telá popravených zločincov. Na anatomickom ústave mali v roku 1777 iba jednu ľudskú mŕtvolu, preto boli anatomické pitvy zriedkavé. V súčasnej dobe vďaka šľachetným darcom anatomické pitvy má Anatomický ústav LFUK zabezpečený na niekoľko rokov (v databáze je takmer 1000 darcov).

Ďalšie obdobie súviselo so zriadením Lekárskej fakulty Alžbetínskej univerzity v Bratislave, ktorej profesori začali odovzdávať svoje nové skúsenosti novým profesorom, ktorí prišli do Bratislavy z Prahy (Kristián Hynek, Jiří Brdlík, Zdeňek Mysliveček, Gustáv Muller či Stanislav Kostlivý). Rok 1922- vybudovaním Ústavu anatomického bol poverený MUDr. Antonín Frank. Anatomický ústav začal plniť svoju úlohu v školskom roku 1923/1924 a ústav predstavovala jedna kancelária, ale potreboval aj ďalšie infraštruktúry, takže budovanie anatomického ústavu bolo ťažké vrátane personálneho vybudovania. Stálym problémom bol aj nedostatok priestorov. Čiastočne sa problém vyriešil tým, že prednosta Ústavu pre patologickú anatómiu, histológiu a bakteriológiu profesor Antonín Spilka zapožičal prednáškovú miestnosť v starej budove na Sasinkovej ulici 2. Táto miestnosť však nemohla pojsť všetkých poslucháčov prvého semestra, navyše sa profesorovi Spilkovi po čase podnájomníci prestali páčiť a zaujal voči nim odmietavý postoj. Navyše bola pre výučbu anatómie potrebná aj pitevňa, ktorou bola miestnosť v komplexe štátnej nemocnice na dnešnej Miczkiewiczovej ulici. Táto pitevňa však tiež patrila pod ústav patológie, kde bol prednostom už spomínaný a negatívne naladený prof. Spilka. Ako ultimum refundum sa ukázala možnosť konať pitevné cvičenia v nepoužíwanej márnici detskej nemocnice na Lazaretskej ulici, ale po krátkom čase sa táto miestnosť z hygienického hľadiska stala úplne

nevhodná. Ďalším miestom, kde sa etablovala anatomická pitevňa boli suterénne miestnosti v jednej z budov Štátnej nemocnice, ktoré pôvodne slúžili ako operačný trakt experimentálnej chirurgie pre operáciu pokusných zvierat, ktoré patrili do kompetencie chirurgickej kliniky Alžbetínskej nemocnice. Ďalším hendikepom v tom období bol chronický nedostatok učebníc a takisto vedecká práca bola takmer nemožná. Prvým prednostom Ústavu anatomického Lekárskej fakulty bol profesor Antonín Frank, ktorého treba považovať za priekopníka budovania anatómie na Slovensku. Profesor Frank tak dôkladne ovládal anatómiu, že napríklad so zavretými očami dokázal presne určiť aj fragment ľubovoľnej kosti lebky. Nástupcom prof. Franka sa stal prof. Frankerberger, ktorý sa však venoval viac histológii a embryológii, preto Lekárska fakulta požiadala profesora L. Borovanského, asistenta anatomického ústavu Lekárskej fakulty Karlovej univerzity, aby prevzal prázdne miesto prednostu. Profesor Borovanský však oznámil, že do Bratislavy za žiadnych okolností nepríde. Preto profesor Frankerberger musel prednášať biológiu, histológiu i anatómiu. V tom čase si vytvoril okolo seba skupinu mladých spolupracovníkov, medzi ktorých patril aj nestor slovenskej anatómie MUDr. Július Ledényi Ladziarsky, ktorý sa stal prvým slovenským prednostom Anatomického ústavu Lekárskej fakulty Univerzity Komenského. Významným počínom Ledényiho bolo vytvorenie slovenskej anatomickej nomenklatúry. V roku 1935 vydal dielo *Nomina anatomica*, kde uvádza latinskú, slovenskú terminológiu anatomických a medicínskych výrazov. V priebehu histórie je potrebné spomenúť i najbližšiu spolupracovníčku prof. Ledényiho a neskôr asistentku na Anatomickom ústave MUDr. Eugéniu Štekláčovú, ktorá sa stala prvou ženou v histórii vedenia Anatomického ústavu. Po nej prevzal vedenie ústavu prof. Kratochvíl, ktorý sa stal neskôr dekanom Lekárskej fakulty a potom prednostom Kliniky detskej chirurgie. Ďalšími prednostami boli profesori Čierny, Remiš, Beňuška a Mráz. Vďaka profesorovi Mrázovi sa zrealizovala kompletná rekonštrukcia pitevne Anatomického ústavu, vyšla prvá učebnica Anatómie ľudského tela a rozvinula sa neuroanatómia. V roku 1993-1998 boli vykultivované dve ľudské glioblastómové stabilizované bunkové línie 8-MG-BA a 42-MG-BA, ktoré dosiahli svetový referenčný status - vyše 6 miliónov citačných odkazov. Tieto bunky sa dodnes používajú na popredných prácach v genetickom a onkologickom výskume (Leibnitz – Istitut DSMZ, Nemecko). Keď spomíname históriu, nesmieme zabudnúť ani na významných lekárov, ktorí pracovali ako demonštrátori, neskôr asistenti Anatomického ústavu a stali sa významnými chirurgami, či pokračovali na teoretických ústavoch ako profesori Kapeller, Zlatoš, neskorší prednostovia Ústavu histológie a embryológie a významní chirurgovia ako Černý, Payer, Paškan, Šiman, Holomáň a ďalší. Od roku 2009 je prednostkou Anatomického ústavu Lekárskej fakulty doc. MUDr. Eliška Kubíková. Po profesorovi Kratochvílovi, ktorý bol aj prednostom Detskej chirurgickej kliniky na Duklianskej ulici je druhou prednostkou ako bývalá klinička, ktorá pracovala takisto na Klinike detskej chirurgie a druhou ženou, ktorá vedie Anatomický ústav. No a ako dnes pokračuje anatómia? Ktorou cestou? V súčasnej dobe nastáva mierny odklon od klasickej anatómie. Nie však v tom zmysle, že by sa mala anatómia učiť kratšie alebo nie do hĺbky, predsa anatómia bude vždy základom medicínskeho vzdelania, avšak sa prikláňa vo výučbe od prvého dotyku s anatómiou ku klinickému mysleniu. Z týchto dôvodov sme pristúpili aj k zavedeniu povinnej voliteľnej predmetu Klinicko – topografická anatómia. V rámci tohto predmetu v pregraduálnom ale aj v postgraduálnom štúdiu okrem teoretických prednášok, ktoré popri zopakovaní základnej anatómie nadviažu na takmer všetky klinické odbory s možnosťou vykonávania rôznych lekárskeho zákrokov na flexibilných kadáveroch a tým sa lepšie pripraviť na budúce lekárske povolanie a klinickej praxe. Takisto veľké využitie Anatomického ústavu je vo forme workshopov, ktoré organizujú najmä kliniky chirurgického zamerania. Toto je však možné iba vďaka rekonštruovaným priestorom Anatomického ústavu, nadšeniu k tomuto predmetu a obrovskej snahe budovať Anatomický ústav tak, aby naozaj anatómia sa stala miestom, kde mŕtvi učia živých.

MIMOBUNKOVÝ MATRIX ČERVENEJ PULPY

(Extracellular matrix of the red pulp)

Ladislav Guller¹, Eliška Kubíková¹, Ján Jakubovský²

¹ Anatomický ústav, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 24, 813 72 Bratislava

² Ústav histológie a embryológie Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, 813 72 Bratislava
ladislav.guller@fmed.uniba.sk

Súhrn

Ľudskú slezinu tvorí bohatá mimobunková vláknitá sieť, zložená z retikulových vlákien bielej a červenej pulpy, aj z prstencových vlákien žilových sinusov. Táto sieť realizuje hlavné úlohy sleziny – fagocytózu zmenených erytrocytov a cudzích látok makrofágmi, aj imunitnú reakciu lymfocytov na vnútrocievne antigény. Technikami svetelnej, aj elektrónovej mikroskopie sme opísali mimobunkový matrix červenej pulpy sleziny ľudí a zvierat. Fibronektín je vo vláknach retikulových povrazcov červenej pulpy, v cirkumferentnom retikule PALP, aj v prstencových vláknach sinusov.

Kľúčové slová

červená pulpa, slezina, fibronektín, retikulové vlákna

Summary

The human spleen, composed of abundant extracellular fibrous network, consisting from reticular fiber of the white and red pulp of the spleen and from annular fibers of venous sinuses. In this network, are realized the core functions of the spleen and phagocytosis of foreign particles and from macrophages altered red blood cells, by as well as lymphocyte immune response to endovascular antigens. We watched by light and electron microscopic techniques the extracellular matrix in the red pulp of the human spleen. We observed fibronectin, both in reticular fiber strands of red pulp and in the annular fibers sinuses.

Key words

Red pulp, spleen, fibronectin, reticular fibers

Úvod

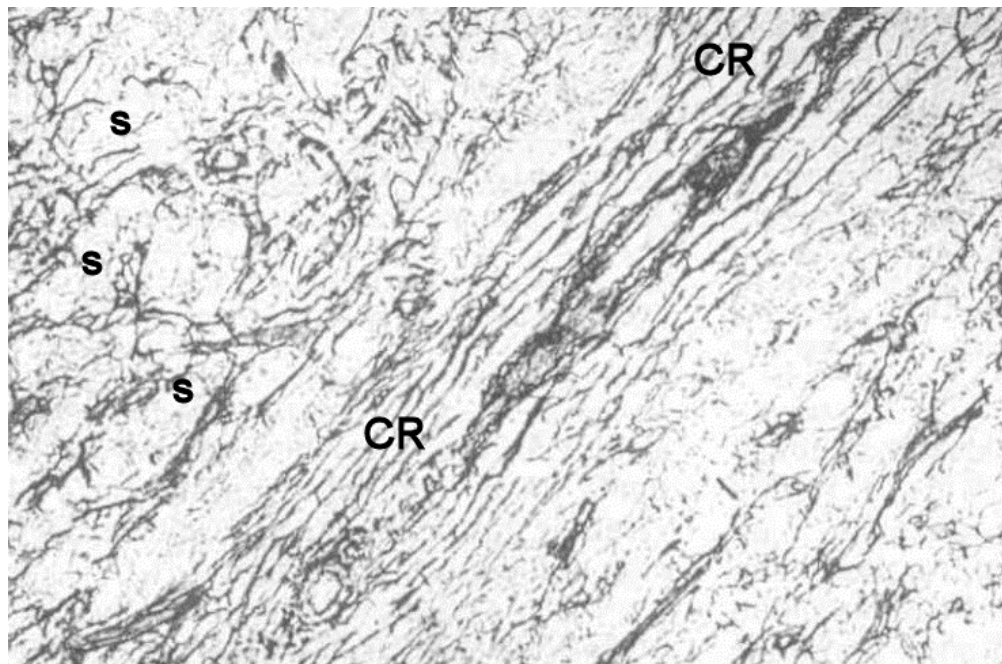
Slezina (*splen, lien*) je najväčším sekundárnym lymfoidným orgánom. Nachádza sa v nej asi štvrtina lymfocytov v tele. Iniciuje imunitnú reakciu na antigény nesené krvou. Napriek tomu, hoci sa stavbou podobá lymfovým uzlinám, nie je obojstranne spojená s lymfovým systémom. Všetky rozpustné a korpuskulárne antigény, patogény, červené krvinky, apoptózou a nekrotizujú zmenené nádorové bunky vstúpia do sleziny a opustia ju krvným obehom (1, 2, 3). Povrch sleziny pokrýva *peritoneum viscerale (tunica serosa)*. To pevne nasadá na puzdro sleziny – na *capsula (tunica) fibrosa*. Z puzdra odstupujú do parenchýmu sleziny hojné trámčové výbežky (*trabeculae splenicae*). Na trámcoch lipne sieť tvorená jemnými vláknami kolagénu (retikula) s fibroblastovými retikulovými bunkami a makrofágmi (4). Takto sa vnútro sleziny rozdeľuje na veľké množstvo dutiniek s výplňou, ktorú nazývame dreň – *pulpa splenica*. Pulpu sleziny tvorí červená a biela pulpa, ktoré fungujú ako 2 orgány – biela pulpa je súčasťou imunitného

systému a červená pulpa odstraňuje odpadový materiál (napr. poškodené erytrocyty z krvi) (4).

Dutinky vyplnené pulpou vzájomne komunikujú. Bunky fibroblastového retikula sú veľké, majú svetlé jadro a početné výbežky cytoplazmy, ktoré sa navzájom spájajú. Vlákna retikula tvorí zrnitá zložka a vlákna kolagénu. Zrnitá zložka má prevahu, vlákna kolagénu v mnohých miestach chýbajú. Vlákniť zložku označujú ako (mimobunkové, fibrilové) retikulum. Vlákna retikula sleziny obsahujú proteíny typu III pN-kolagénu, kolagén typu IV, laminín a tenascín. Všetky spomenuté proteíny sa vyskytujú v slezine počas jej vývinu. Ich množstvo sa v behom ontogenézy sleziny mení (5). V retikulových vláknach periartériovej lymfovej pošvy je známy kolagén typu I (6). Obraz retikula sa mení v závislosti od miesta výskytu v slezine. Vo väčšej časti bielej pulpy a povrazcov červenej pulpy retikulum tvorí veľké priestorové oká. Smerom k okrajom bielej pulpy sa priestorové oká retikulovej siete formujú do kruhov, a zmenšujú sa. Fibrilové retikulum možno zreteľne vidieť v striebrom impregnovaných histologických rezoch, zatiaľ čo v rezoch zafarbených s hematoxilínom-eozínom retikulum prekrýva veľá buniek parenchýmu sleziny (7).

Materiál a metódy

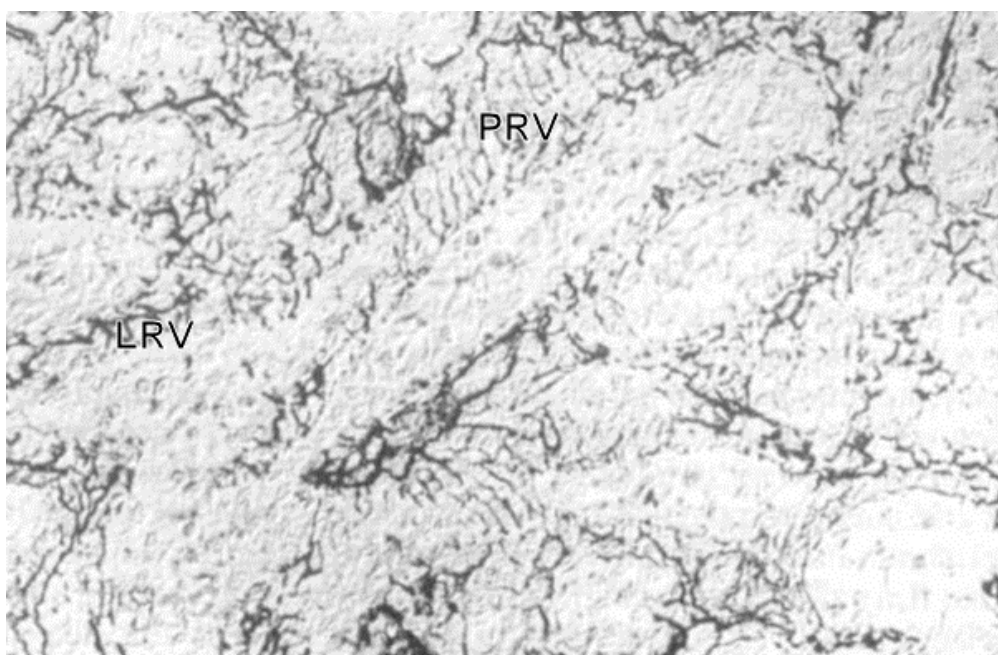
Sleziny ľudí aj pokusných zvierat sme spracovali formol-parafínovou technikou. Histologické rezy sme farbili s hematoxylínom a eozínom. Vo vybraných prípadoch sme vyšetrili aj vzorky tkaniva zo sleziny histo- a imunohistochemicky, s technikou kryostatových rezov, z chemicky nefixovaného tkaniva. Pre elektrónovú mikroskopiu sme použili fixáciu s glutaraldehydom a s OsO₄. Vzorky tkaniva sme zaliali do Durcupanu ACM (Fluka). Tenké rezy sme kontrastovali octanom uranylu a citrátom olova. Podrobné informácie o použitých metódach a o postupoch pozri v (4, 8, 9).



Obr. 1 Periartériová lymfocytová pošva a jej cirkumferentné retikulum (CR) PALP. V ľavej hornej tretine obrázku sínusy (s) červenej pulpy. Autoimunitná trombocytopenia (AITP). Gomori. x 200.

Výsledky

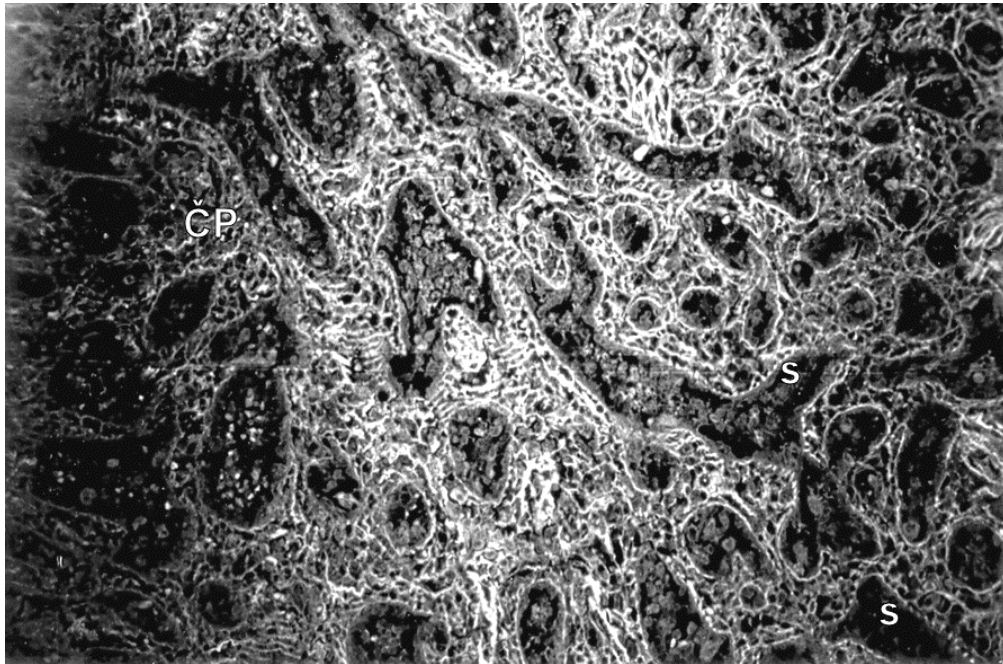
Histologické rezy, zafarbené s hematoxylínom a s eozínom neinformovanému oku poskytujú v červenej pulpe na prvý pohľad fádny obraz. Poznatky získané s transmisnou elektrónovou mikroskopiou, aj z výsledkov imuno- a enzýmovo- histochemických analýz spätne umožňujú lepšiu interpretáciu rezov zafarbených s hematoxylínom a eozínom. Veľkým prínosom sú pre analýzu červenej pulpy nedofarbované rezy, impregnované striebrom (Gomori), analyzované v diferenčnom interferenčnom mikroskope (DIC). Umožňujú znázorniť presnú topografickú orientáciu rozloženia prstencových, aj pozdĺžnych retikulových vlákien (Obr. 1, 2) s ohľadom na iné štruktúry. Také vlákna okrem iného obsahujú aj fibronektín (Obr. 3). Na steny sínusov sa nadväzujú viaceré lektíny (aglutiníny). Tak napr. s aglutinínom (lektínom) z *Helix pomatia* (HPA) reagujú tak mimobunkové štruktúry v stenách sínusov ako je glykokalyx na povrchoch buniek, ktoré lemujú sínusy (Obr. 4, 5).



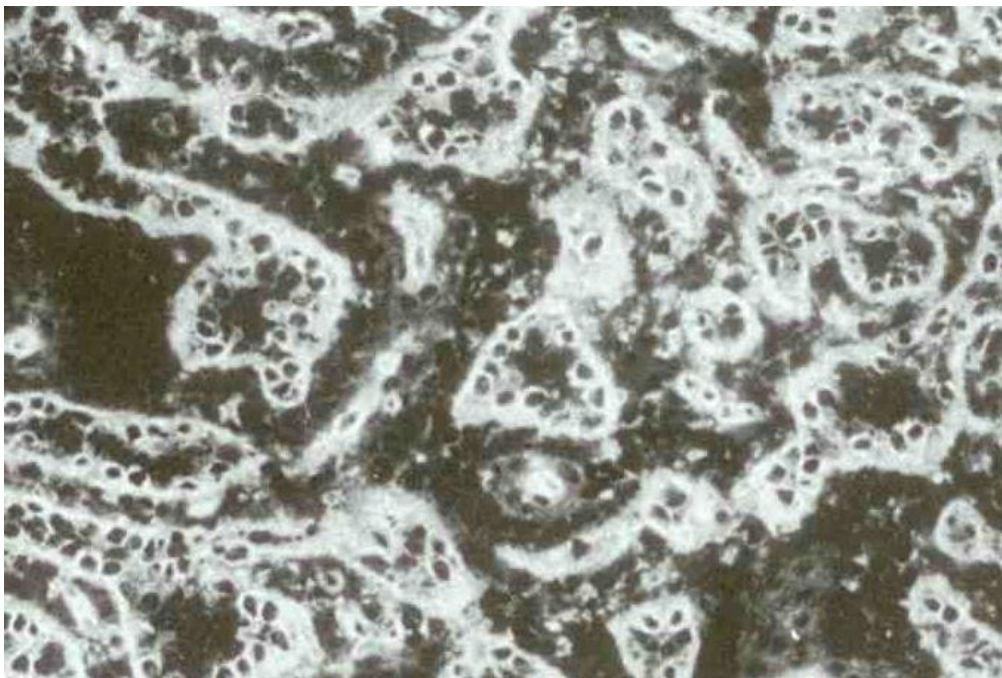
Obr. 2 AITP. Prstencové (PRV) aj pozdĺžne (LRV) retikulové vlákna v stenách sínusov. Nefarbený rez. DIC (Nomarski). x 400.

Diskusia

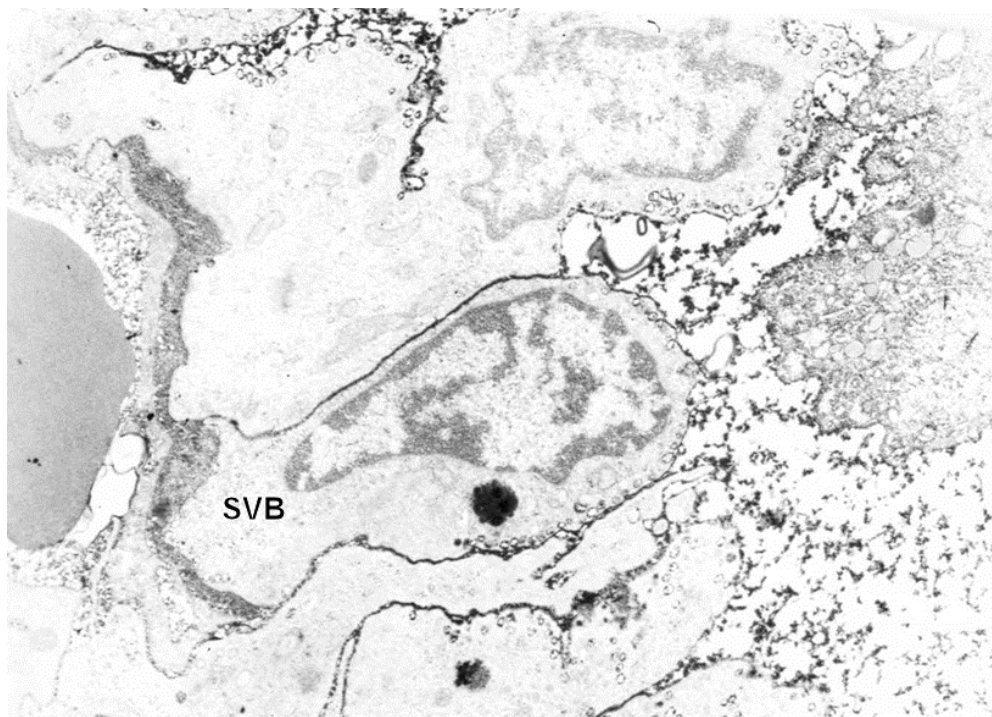
Opisujeme fibronektín v retikulových vláknach povrazcov červenej pulpy v cirkumferentnom retikule PALP a v prstencových vláknach sínusov, tak ako D'Ardenne et al (10). V protiklade s našimi nálezmi, aj nálezmi D'Ardenneho je opis Liakku a Autio-Harmainena (11), ktorí v stene sínusov fibronektín nenašli. Debata o tomto nesúlade presahuje možnosti predkladanej práce. Retikulové vlákna sú bohaté na glykoproteíny extracelulárneho matrixu. Vlákna tvoria priestorovú kostru, ktorou migrujú, a na ktorú sa pripájajú rôzne bunky. Pripájanie buniek na mimobunkový matrix sprostredkujú integríny. Distribúcia integrínov sa zhoduje s rozličnými proteínmi mimobunkového matrixu ako sú kolagény typu III a IV, aj nekolagénové proteíny vitronektín, laminín, tenascín a fibronektín. O nich je známe, že sa vyskytujú v retikulových vláknach sleziny (12, 13, 14). Mnohé z proteínov mimobunkového matrixu pôsobia ako dôležité mediátory bunkového rastu, diferencovania sa a migrácie (15). Fibronektín aj laminín sú glykoproteíny s lepiacimi vlastnosťami. Majú dôležitú úlohu v pripojení buniek k podkladu



Obr. 3 Králičie protilátky proti ľudskému fibronektínu (anti-FN) vo vláknových štruktúrach povrazcov a v prstencových vláknach sinusov S červenej pulpy (ČP) ľudskej sleziny. Anti-FN a SwaR-FITC. x 200



Obr. 4 AITP. Ohraničenie sínusov reaguje intenzívne s aglutinínom z *Helix pomatia* (HPA), slabšie s bunkami povrazcov červenej pulpy. Králičie protilátky (KP) proti HPA a SwaR-FITC. x 400.



Obr. 5 Sínus vystielajúca bunka (SVB). Fixácia za prítomnosti ruténiovej červenej. Glykokalyx čierny. Pod povrchom SVB miestami vakuoly pinocytózy. Zväčš. X 16.000

(16). Glykoproteínové zložky retikulových vlákien sú miesta pripájania fagocytujúcich buniek ako sú makrofágy a neutrofily (17, 18, 11). V sieti retikula sa realizujú hlavné funkcie sleziny a to fagocytóza cudzích látok a zmenených erytrocytov makrofágmi, ako tiež imunitná reakcia lymfocytov na antigény v cievach (13). Fibronektín je kľúčovým proteínom mimobunkového matrixu, zapojeným do týchto procesov (19). V slezine ľudí opisujú Šidlo et al. (20) nápadný vzťah fibronektínu k vláknam prstencov, vytváraných s typom IV kolagénu. Toto sa zhoduje s našimi nálezmi. Vizualizácia štruktúr červenej pulpy prostredníctvom lektínov poukazuje na prítomnosť oligosacharidov v mimobunkových štruktúrach, čo opisujú Hromec a Jakubovský (21, 22, 9). Lektíny sú glykoproteíny neimunitnej povahy. Špecificky sa nadväzujú na cukry buniek, aj medzibunkovej hmoty. Sú úvahy o ich úlohe v rozpoznávaní molekúl a buniek, aj o ich význame v sociálnom správaní buniek. Ich zistenie má kľúčový význam v interakciách medzi bunkami.

Záver:

Mimobunkový matrix sleziny je zriedkavejším predmetom záujmu splenológov. Podieľa sa však na udržovaní štruktúry a tvaru orgánu a hrá oveľa významnejšiu rolu vo funkcii sleziny ako si doposiaľ záujemcovia o splenológiu predstavovali.

Literatúra:

- 1. Brozman M, Jakubovský J.** The red pulp of the human spleen. Structural basis of blood filtration. Z. mikrosk.-anat. Forsch. 1989; 103 (2): 316-328.
- 2. Cesta MF.** Normal structure, function, and histology of the spleen. Toxicol Pathol. 2006; 34 (5): 455-465.

3. **Ogembo JG, Milner DA Jr, Mansfield KG, Rodig SJ, Murphy GF, Kutok JL, Pinkus GS, Fingerth JD.** SIRP α /CD172a and FHOD1 are unique markers of littoral cells, a recently evolved major cell population of red pulp of human spleen. *J Immunol.* 2012; 188 (9): 4496-4505.
4. **Brozman M, Jakubovský J.** Slezina. Štruktúrne základy funkcie. Bratislava; Veda, Vydavateľstvo SAV, 1988, 248 p.
5. **Liakka A, Karjalainen H, Virtanen I, Autio-Harmainen H.** Immuno-electron-microscopic localization of types III pn-collagen and IV collagen, laminin and tenascin in developing and adult human spleen. *Cell Tissue Res.* 1995; 282 (1): 117-127.
6. **van den Berg TK, van der Ende M, Döpp EA, Kraal G, Dijkstra CD.** Localization of β 1 integrins and their extracellular ligands in human lymphoid tissues. *Am J Pathol.* 1993, 143 (4): 1098-1110.
7. **Jakubovský J, Guller L, Černá M, Balážová K, Polák Š, Jakubovská V, Babál P.** Fluorescence of hematoxylin and eosin-stained sections of the human spleen. *Acta histochem.* 2002; 104 (4): 353-356.
8. **Belko I, Jakubovský J, Hromec M, Brozman M, Holeczy P.** Slezina. Martin; Vydavateľstvo Osveta, 1992, 248 p.
9. **Jakubovský J.** Patológia ľudskej sleziny. Bratislava; Bonus, 1993, 156 p.
10. **D'Ardenne AJ, Burns J, Sykes BC, Kirkpatrick P.** Comparative distribution of fibronectin and type III collagen in normal human tissues. *J Pathol.* 1983; 141 (1): 55-69.
11. **Liakka KA, Autio-Harmainen HI.** Distribution of the extracellular matrix proteins tenascin, fibronectin, and vitronectin in fetal, infant, and adult human spleens. *J Histochem Cytochem.* 1992; 40 (8): 1203-1210.
12. **Liakka A, Apaja-Sarkkinen M, Karttunen T, Autio-Harmainen H.** Distribution of laminin and types IV and III collagen in fetal, infant and adult human spleens. *Cell Tissue Res.* 1991; 263 (2): 245-252.
13. **Liakka KA.** The integrin subunits alpha 2, alpha 3, alpha 4, alpha 5, alpha 6, alpha V, beta 1 and beta 3 in fetal, infant and adult human spleen as detected by immunohistochemistry. *Differentiation.* 1994; 56 (3): 183-190.
14. **Lokmic Z, Lämmermann T, Sixt M, Cardell S, Hallmann R, Sorokin L.** The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. *Seminars in Immunology.* 2008; 20 (1): 4-13.
15. **Bourdon MA, Ruoslahti E.** Tenascin mediates cell attachment through an RGD-dependent receptor. *J Cell Biol.* 1989; 108 (3): 1149-1155.
16. **Ruoslahti E, Pierschbacher M.D.** New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 1987; 238 (4826): 491-497.
17. **Brown DL, Phillips DR, Damsky CH, Charo IF.** Synthesis and expression of the fibroblast fibronectin receptor in human monocytes. *J Clin Invest.* 1989; 84 (1): 366-370.
18. **Nathan C, Srimal S, Farber C, Sanchez E, Kabbash L, Asch A, Gailit J, Wright SD.** Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol.* 1989; 109 (3): 1341-1349.
19. **Coito AJ, Onodera K, Kato H, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW.** Fibronectin-mononuclear cell interactions regulate type 1 helper T cell cytokine network in tolerant transplant recipients. *Am J Pathol.* 2000; 157 (4): 1207-1218.
20. **Šidlo j, Jakubovský J, Porubský J, Danihel Ľ, Holeczy P, Papinčák J, Mistrík M, Holeša S, Trnka J, Durdík Š.** Fibronektín a ľudská slezina. *Čs Patol.* 1996; 32 (1): 14-18.
21. **Hromec A, Jakubovský J.** Ultraštruktúra sleziny a jej vzťah k deštrukcii erytrocytov. *Bratisl lek listy.* 1977; 67 (2): 145-157.
22. **Hromec A, Jakubovský J.** Úloha sleziny pri deštrukcii erytrocytov. *Čs fysiolog.* 1983; 32 (5): 438-442.

NIEKTORÉ SKÚSENOSTI S DARCOVSKÝMI PROGRAMAMI VO SVETE

(Some experiences with the donor programmes in the world)

Zora Haviarová¹, Peter Malovec¹, Branislav Bezák¹

¹Anatomický ústav LFUK, Sasinkova 2, 81372 Bratislava, SR, email: zora.haviarova@fmed.uniba.sk

Súhrn

V rámci 1. Medzinárodného Kongresu Klinickej Anatómie, 4. Argentínskeho Kongresu Klinickej Anatómie a 12. Kongresu Argentínskych Spoločností Morfológických Vied, ktorý sa konal v dňoch 24.-26. 9.2015 v Buenos Aires (Argentína) a ktorého som sa aktívne zúčastnila sa (okrem iného) konala aj diskusia okolo okrúhleho stola na tému: "Obstarávanie kadaverózneho materiálu pre anatomickú výučbu a výskum, medzinárodné skúsenosti." Aj keď v Bratislave existuje fungujúci a dostačujúci darcovský program, bolo zaujímavé vypočuť si aj skúsenosti z iných častí sveta.

Kľúčové slová

Kadaverózny materiál, výučba anatómie, skúsenosti

Summary

During 1st International Congress of Clinical Anatomy, 4th Argentinian Congress of Clinical Anatomy and 12th Congress of Argentinian Societies of Morphological Sciences, which was held 24th -26th Sept. in Buenos Aires (Argentina) and of which I also took an active part (besides other lectures) was also held a round table debate with the main topic: "Procurement of cadavers for Anatomical teaching and research, international experience." Although we in Bratislava have quite functional and sufficient Donor Programme, it was interesting to hear also about the experiences from other parts of the world.

Key words

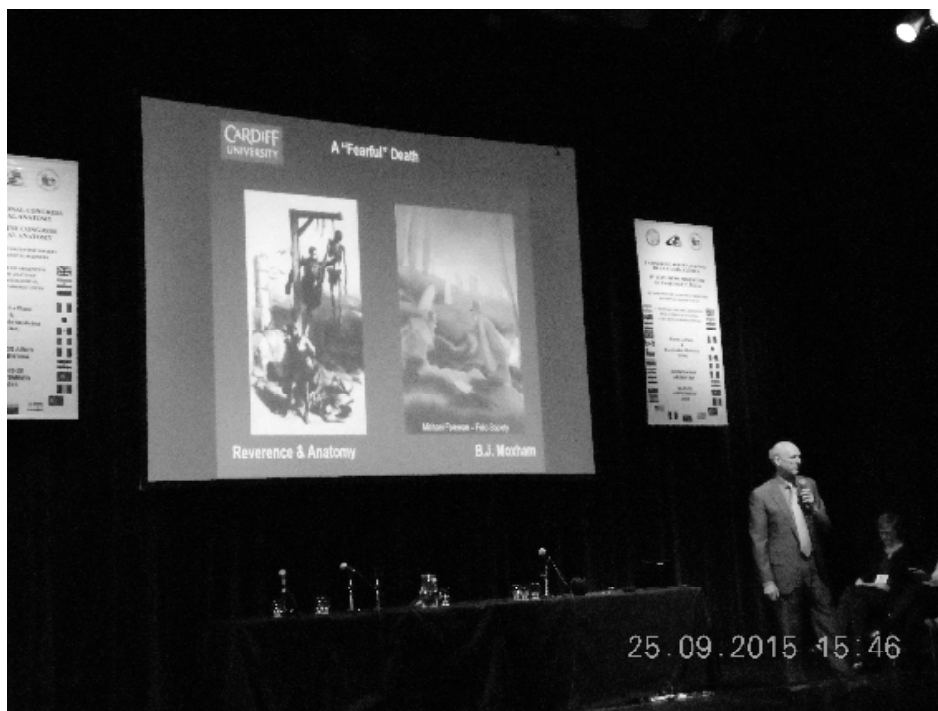
Cadaveric material, anatomy education, experiences

Úvod

Aj keď dnes už existuje množstvo technických vymožeností, ktoré pomáhajú aj výučbe anatómie ľudského tela (plastické modely, videokurzy, on-line kurzy, interaktívne atlasy a programy, mobilné aplikácie a mnoho iných) ľudský kadaverózny materiál ostáva stále nenahradiiteľnou a jedinečnou súčasťou výučby tohto predmetu. Jeho zaobstarávanie sa v minulosti (a niekedy aj dnes) ešte stretáva s rôznymi ťažkosťami právneho, religiózneho, sociálneho, ale aj finančného charakteru. Aj keď na Anatomickom ústave LFUK v Bratislave našťastie máme dostatočne fungujúci „Darcovský Program“, zvládajúci pokryť nároky výučby predmetu počas celého roka, nie je to ešte stále všade vo svete rovnako. Bolo preto poučné sa podeliť (vypočuť si) skúsenosti s Darcovskými Programami aj z iných krajín: niektoré z nich majú už dlhu históriu darcovského programu, iné si ju len začínajú budovať, snažiac sa pritom čerpať zo skúseností iných.

Materiál, metodika, výsledky

Prof. Bernard J. Moxham (Cardiff University, Wales, Veľká Británia, prezident International Federation of Association of Anatomists) zdôraznil prepotrebnosť ľudského kadaverózneho materiálu pre výučbu anatómie, aj keď spomenul, že v ost. častiach krajiny je jeho využitie akoby na ústupe. V rámci vlastného darcovského programu (s dlhou históriou) prijímajú ročne asi 50 tiel pre približne 1000 ročne odučených študentov medicíny. Darcovský program sa riadi zákonnou úpravou- tzv. „The Human Tissue Act“, kt. okrem klasického anatomickeho darcovského programu upravuje aj darovanie rôznych tkanív pre potreby transplantácie. Jeho nevyhnutnou súčasťou je osvedčený, podpísaný „Informovaný súhlas“, kt. zahŕňa aj súhlas s povolením fotografovania častí tela (v prípade zaujímavého nálezu) a aj súhlas s povolením uskladnenia takýchto anatomicke zaujímavých nálezov (= výroba anatomicke preparátov). Ľudské pozostatky jedného darcu sa starostlivo označujú a uchovávajú pokope, aby sa mohli samostatne (pre darcu) pochovať/skremovať. Na dodržiavanie uvedených pravidiel je na Univerzite vyčlenená samostatná zodpovedná osoba. Študentov vedú k vďačnosti za takto prejavenu službu darcom, čo je zdôraznené mosadznou pamätnou tabuľou pri vstupe do veľkej pitevne, kde sa v 10ročných intervaloch dopĺňajú mená darcov a veľkou mramorovou tabuľou významného britského umelca Toma Phillippsa vo vnútri pitevne. Z pozície prezidenta IFAA odsúdil propagované expozície plastinovaných ľudských tiel a upozornil na vypracované odporúčané pravidlá riadenie darcovského programu prístupne na web stránke IFAA (1).



Obr.1 Prof. Bernard J. Moxham počas svojej prezentácie.

Prof. Mirna Duarte Barros (Sao Paulo University, Brazília) tiež spomenula, že vo výučbe anatomicke predmetov preferujú ľudský kadaverózný materiál a plastické modely, on-line kurzy a pod. považujú len za doplnkový materiál. Pri výučbe používajú prevažne kadaverózný materiál tzv. „nevyzdvihnutých tiel“ (až cca 80%), pričom niekoľko oficiálnych výučbových

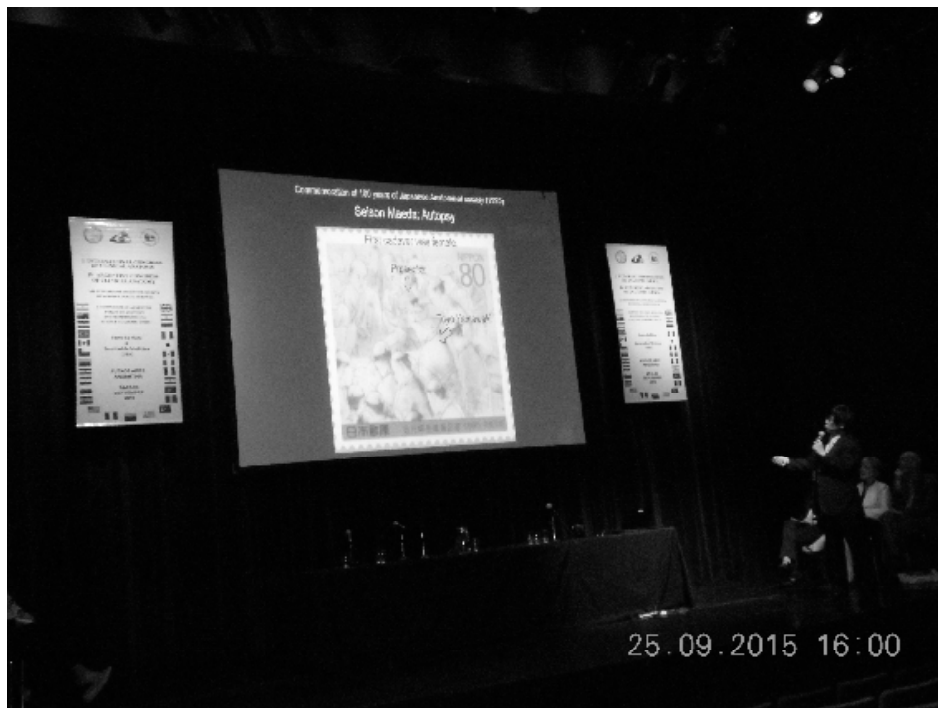
základní je napojených na Univerzitné a Fakultné nemocnice, kt. ich zásobujú dostatočným počtom takýchto tiel. Len približne 20% materiálu pochádza z darcovských programov. Úprava ich pravidiel sa riadi Zákonom č. 010.406-2002 (článok 14) od r. 2008 (kedy začali fungovať), zahŕňajúc podpísanie dokumentov: „Vyhlásenie o Darovaní Orgánov a Pozostatkov.“, „Informovaný súhlas“, „Vyhlásenie o svedectve Darovania“ a e-formulár „Registrovaného Darcu“. Darcovi musia dosvedčiť jeho vôľu až 3 jeho rodinní príslušníci. Všetky dokumenty sú prístupné na stiahnutie z Webportálu University, sú formulované tak, aby zároveň umožňovali (v prípade potreby) uchovania časti tela pre potreby Anatomického Múzea. Dôležité inštrukcie a informácie o potrebe darcovského programu pre potenciálnych darcov a iných laikov sú prístupné aj na webe Brazílskej Anatomickej Spoločnosti (2).



Obr. 2 Prof. Mirna Duarte Barros (Univerzita Sao Paolo, Brazília).

Dr. Jennifer M. McBride PhD. (Cleveland Clinic Lerner College of Medicine, Case Western Reserve University, U.S.A.) hovorila o tom, že pri výučbe anatómie používajú pestrý repertoár výukových pomôcok- medzi iným aj nefixovaný kadaverózny materiál z vlastného darcovského programu. Na takomto materiáli anatomicke demonštrácie sú realizované postgraduálnymi študentami rôznych špecializácií. V rámci darcovského programu so značnou históriou ročne prijímajú asi 150-200 darovaných tiel, čo je hlboko postačujúce potrebám výuky. Vylučovacie kritériá sú: známa HIV infekcia, hepatitídy, Jacob-Creutzfeldova choroba, MRSA, vek mladší ako 18rokov, morbidna obezita, prítomnosť klostridiovej infekcie, už známe darcovstvo iných častí tela, vzdialenosť bydliska darcu od Univerzity vyše 100míl, príp. rozsiahla trauma. Kompletne zužitkovanie tela darcu trvá približne 1 rok, následne sú jeho pozostatky vrátené rodine alebo pochované v mauzóleu cintorína Cleveland Lake View Cemetery. Tu sa nachádza aj krypta urien darcov, v roku 2009 bol natočený dokumentárny film „Darovaní Vede“ o príbehoch ľudí-darcov a študentoch

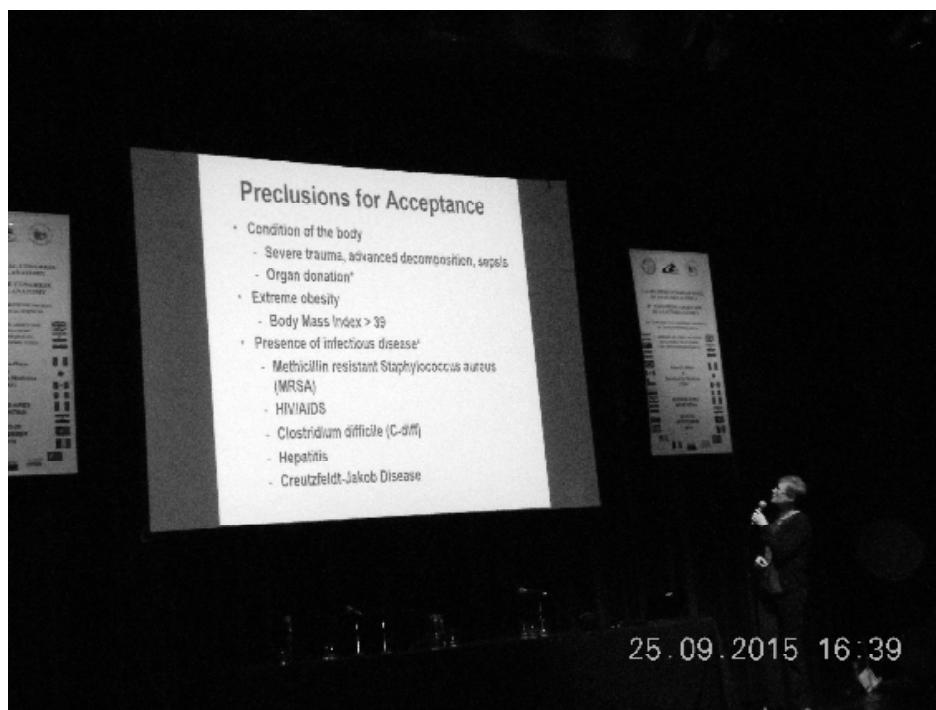
využívajúcich tento materiál. Každoročne sa koná ceremónia „vd'akyvzdania“, kde sú prítomní: akademický zbor, študenti aj príbuzní darcov.



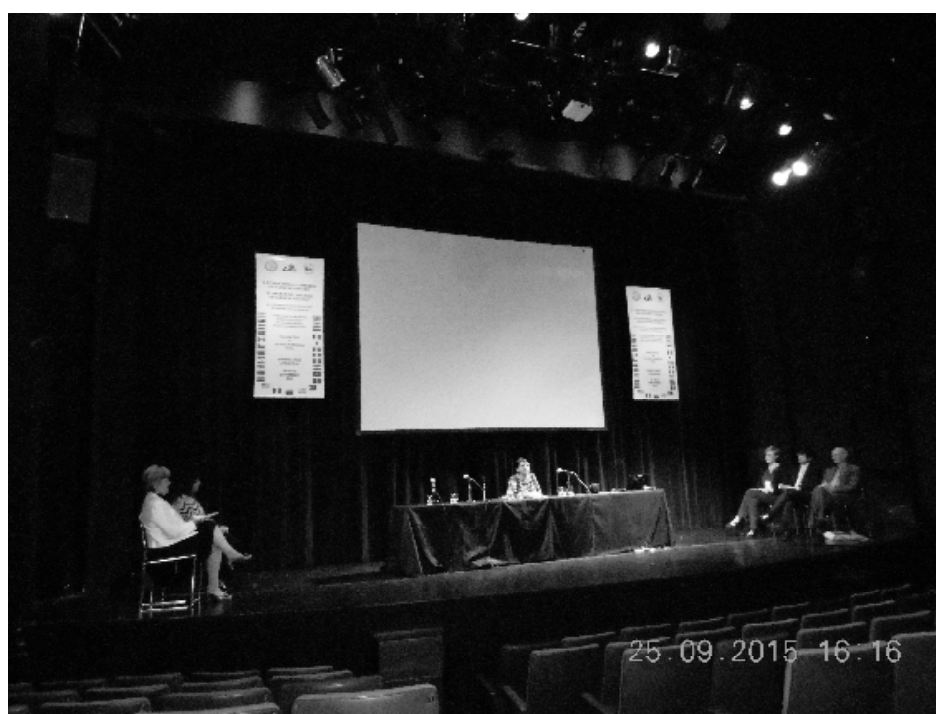
Obr. 3 Dr. Jenifer M. McBride PhD.

Dr. Keiichi Akita PhD. (Tokyo Medical and Dental University, Japonsko) rovnako zreferoval o vcelku už dlhšej histórii darcovského programu na Univerzite, ktorej pravidlá sú dnes už regulované upraveným zákonom. Do implementácie darcovského programu sa na výučbu anatómie používali „neznáme (neprevzaté) telá“, často pochádzajúce od napr. samovrahov, popravených zločincov z väzníc a iných odsúdencov spoločnosti. Neustálou aktivitou zodpovedných osôb sa stala táto služba viac spoločensky oceňovanou a historicky prvou osobou- darcom bola 80ročná žena prostitútka v roku 1895. Pri výučbe sa spotrebujú všetky tkanivá darcu, okrem kostí, ktoré sú vrátené príbuzným. Za účelom vd'ačnosti za takúto poslednú službu darcov študentom medicíny sa každoročne koná pompéžna slávnosť na miestnom cintoríne za prítomnosti miestnych autorít.

Dr. Namita Sharma (Bharati Vidyapeeth Deemed University, Dental College and Hospital, Pune, India) zreferovala o niektorých lokálnych zaujímavostiach darcovských programov na Indických Univerzitách, ktoré sú prídavným zdrojom ľudského kadaverózneho materiálu pre výučbu anatómie- väčšina totiž pochádza z tzv. „neprevzatých tiel“. Jediným vylučovacím kritériom prijatia tela je známa HIV infekcia, avšak toto sa prísne nekontroluje, čo ohrozuje pitvajúcich študentov a učiteľov, obzvlášť tých, ktorí trvajú na pitve holými rukami (bez rukavíc). Darcovské programy naberajú v Indii na popularite, hlavne u toho staršieho obyvateľstva, ktorého blízki príbuzní emigrovali preč z krajiny. Proces darcovstva je jednoduchý: darca vyplní a odovzdá formulár (podpísaný 2 svedkami-zvyčajne príbuzní) prijímajúcej inštitúcii, ktorá mu odovzdá „Informačný dopis“ a/alebo identifikačnú kartu darcu.



Obr. 4 Dr. Keiichi Akita PhD. počas svojej prezentácie.

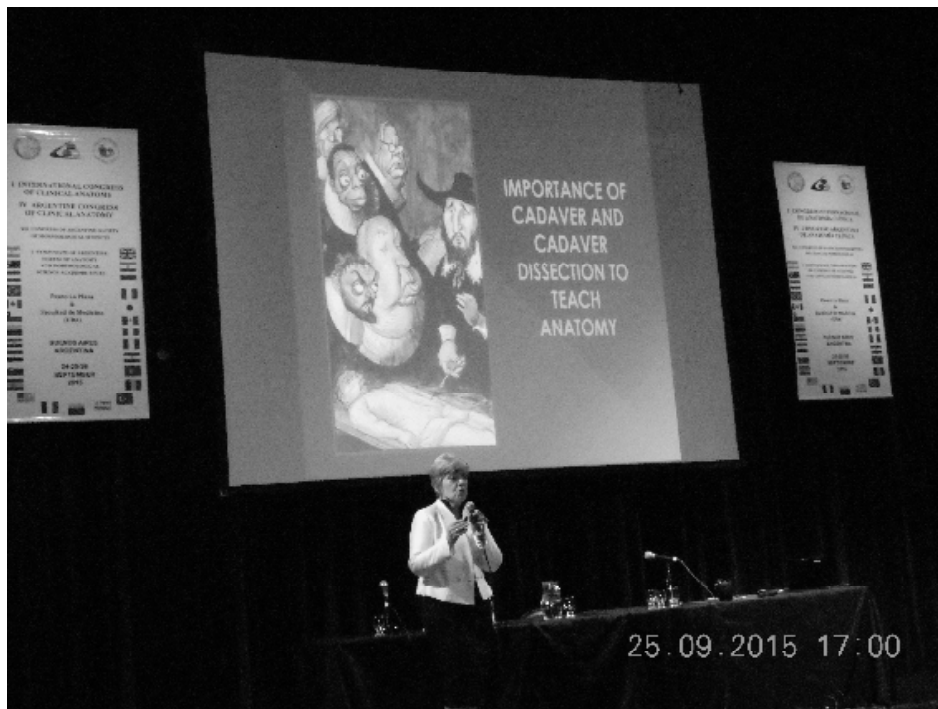


Obr. 5 Dr. Namita Sharma (India).

Je potom na príbuzných, aby splnili túto darcovu vôľu- ak si napriek darcovej vôli takýto spôsob pohrebu neželajú, zvyčajne prijímajúca inštitúcia takéto negatívne stanovisko akceptuje. Väčšina darovaných tiel je od darcov hinduistického vierovyznania, ktorých zvykom je požadovať krátku modlitbu za darcu pri odovzdávaní jeho tela prijímajúcej inštitúcii, ponechanie si aspoň maličkého kúska darcu (zvyčajne terminálny článok prsta) pre vykonania záverečného cirkevného obradu alebo v prípade úmrtia vydatej ženy navrátenie jej zlatého ornamentu a pohrebných šiat.

Diskusia a záver

Záverom **Prof. Dr. Susana Biasutto** zhrnula závery diskusie okrúhleho stola a podelila sa so svojimi (argentínskymi) skúsenosťami s príjmom ľudských tiel na výučbu anatómie. Anatómia sa na argentínskych fakultách vyučuje v 1.- a 2.ročníku štúdia a zdôrazňuje sa jej klinická orientácia. Takže používanie ľudského kadaverózneho materiálu je nevyhnutnosťou. V Argentíne neexistuje oficiálny darcovský program, takže väčšina tiel sú tzv. “nevyzdvihnuté telá“, ktorých je však nedostatok na uspokojivé pokrytie výučby a výskumu. Jedinec môže však darovať svoje telo na vedecko-pedagogické účely (jednoducho o tom informuje želajú prijímajúcu inštitúciu, avšak všetky následné náklady znášajú príbuzní darcu), jediným vylučovacím kritériom je aktívne infekčné ochorenie. Zákon upravujúci takéto darovanie v Argentíne nie je (Zákon o darovaní orgánov na transplantáciu nie je na tieto účely použiteľný). Aj preto sa uskutočnila spomínaná debata okolo okrúhleho stola, aby sa argentínski kolegovia-anatómovia poučili zo skúseností s darcovskými programami s kolegami z iných kontinentov.



Obr.6 Prof. Susana Biasutto.

Literatúra:

- 1., <http://ifaa.net/index.php/plexus/finish/3-plexus/3-plexus-2012>.
- 2., <http://www.sbanatomia.org.br/docao.php>.

VARIÁCIE VZNIKU VRETENNÉHO NERVU

(Variabilities of the radial nerve formation)

Zora Haviarová¹, Viktor Matejčík², Peter Malovec¹, Branislav Bezák¹

¹Anatomický ústav LFUK, Sasinkova 2, 81372 Bratislava, Slovakia, email: zora.haviarova@fmed.uniba.sk

²Neurochirurgická klinika LFUK a UNB, Limbová 5, 83305 Bratislava, Slovakia

Súhrn

Vretenný nerv je koncovou a najväčšou vetvou zadného zväzku ramennej splete. Inervuje väčšinu vystieračov a kože zadnej časti ramena a predlaktia. V dostupnej literatúre nie je veľa informácií o variáciách jeho vzniku v oblasti pazuchy. Naša práca bola realizovaná na 50 ľudských kadáveroch, pričom sme ramennú spleť ozrejmili na oboch stranách kadáveru. Z celkového počtu 100 ramenných spleťí sme našli 2 odchýlky vzniku vretenného nervu (2%)- spojka s laktovým nervom (1 vpravo a 1 vľavo). Distálny priebeh vretenného nervu sme nesledovali. Naše pozorovanie sme konfrontovali s výsledkami podobných prác a predkladáme aj možnú embryologickú príčinu variácií. Údaje o anatomických variabilitách periférnych nervov (hlavne v pazuchovej oblasti) by mohli zaujímať lekárske odborníkov viacerých špecializácií: obzvlášť ortopédov, traumatológov, neurológov, neurochirurgov, fyzioterapeutov, rádiológov, anesteziológov, anatómov a príp. i iných.

Kľúčové slová

Ramenná spleť, vretenný nerv, vznik, variácia

Summary

The radial nerve is the terminal and largest branch of the posterior cord of the brachial plexus. It supplies the majority of the posterior and extensor components of the arm and forearm. There are few information about its possible variable formation in the axilla in the available literature. After the dissection of 50 human bodies and revealing the brachial plexuses on their both sides (we analysed totally 100 brachial plexuses). We have observed the communication of the radial nerve with the ulnar nerve in 2 cases (2%)- 1 case on the right side, 1 case on the left side. We did not follow the further distal courses of the brachial plexus terminal branches. We confront our findings with the similar works from the literature and give a possible embryological basis for the explanation of the variation presence. Reports of the peripheral nerves anatomical variations are important to the medical personnel: especially to orthopaedist, traumatologists, neurophysicians, physiotherapist, radiologists and also to the anaesthesiologists.

Key words

Brachial plexus, radial nerve, formation, variation

Úvod

Vretenný nerv (nervus radialis, C5-8, T1) je najväčšou vetvou ramennej splete (plexus brachialis), zvyčajne je pokračovaním jeho zadného zväzku (fasciculus posterior). Inervuje väčšinu extenzorov a kože zadnej časti ramena predlaktia: ako sú musculus (m.) triceps

brachii, m. anconeus, m. brachioradialis, musculi (mm.) extensores carpi radialis longus et brevis a vysiela kožné vetvy: nervus (n.) cutaneus brachii posterior, n. cutaneus brachii lateralis inferior, n. cutaneus antebrachii posterior (4, 6). Variability v senzitivnej (kožnej) inervácii vretenného nervu sú v literatúre vcelku dobre zdokumentované, obzvlášť pre oblasť predlaktia a ruky. Avšak dôležitá je aj vedomosť o jeho variabilitách v pazuchovej (axilárnej) oblasti, hlavne pre niektoré chirurgické (traumatológia, ortopédia) a anesteziologické (blokády periférnych nervov) prístupy.

Materiál a metodika

Práca bola realizovaná na 50 ľudských telách (kadáveroch, bez predošlej fixácie) Ústavu súdneho lekárstva (Univerzitná nemocnica Bratislava), po predchádzajúcom odsúhlasení miestom prislúchajúcou Etickou komisiou UNB.

Na každom tele bola ramenná spleť ozrejmená a preštudovaná obojstranne, t.j. celkovo sme pozorovali 100 ramenných spleť. Ramennú spleť študovali v ležiacej polohe tela, s mierne abdukovanými hornými končatinami.

Kožný rez sme viedli od laterálneho okraja m. sternocleidomastoideus (jeho hornej tretiny) k mediálnej tretine kľúčnej kosti a potom sme pokračovali k laterálnemu okraju kľúčnej kosti a cez delto-pektoralnú ryhu na vnútornú plochu ramena po jeho dolnú tretinu.

Koža a podkožie boli odpreparované nabok a najpr bola preštudovaná supraklavikulárna časť ramennej splete. Resekciou processus transversus sme obnažili spinálne nervy až na intraforaminálnu úroveň (k okraju dura mater spinalis). V prípade potreby izolácie dolnej časti splete sme odstránili úpon m. scalenus anterior alebo prerezali jeho časť.

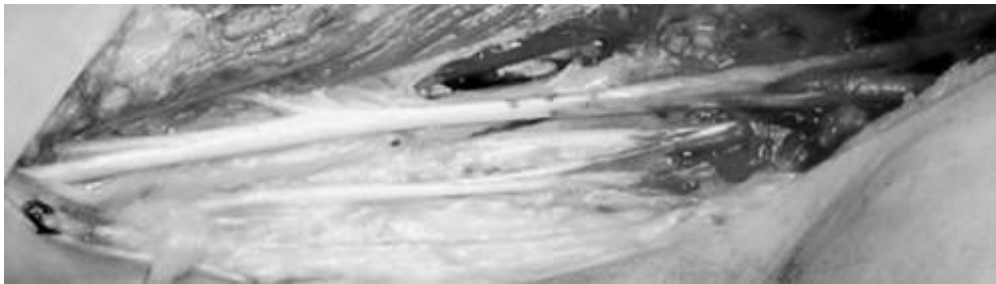
Po vypreparovaní kmeňov (trunci) a ich vetvenia, sme oddelili m. pectoralis major v rozsahu 2-3cm od kľúčnej kosti a kľúčnu kosť samotnú (od mediálnej tretiny až po laterálnu). V tejto fáze bola odhalená klavi-pektoralná aponeuróza, m. subclavius a m. pectoralis minor, čo umožnilo sprístupniť dolný kmeň (truncus inferior) a mediálny zväzok (fasciculus medialis).

V úseku spredu zakrytom m. pectoralis minor sa nervové kmene splete nachádzali vzájomne blízko a okolo tepny. Narezanie svalov mm. pectorales minor et major nám umožnilo štúdium infraklavikulárnej časti splete, pektorálne nervy (nn. pectorales med. et lat.), ako aj terminálne vetvy v ich celistvosti. Vznik zväzkov (fasciculi) sme zvyčajne pozorovali nie vyššie ako úroveň projekcie dolného okraja kľúčnej kosti.

Pri pozorovanej odchýlke sme pokračovali v práci s pomocou lupy. Distálne priebehy jednotlivých koncových vetiev sme už nesledovali.

Výsledky

V supraklavikulárnej aj infraklavikulárnej oblasti sme pozorovali zložité nervové spojenia. Variácie (supraklavikulárne či infraklavikulárne) sa vyskytovali častejšie vľavo. Súčasnú účasť koreňov C4 a T2 na tvorbe ramennej splete sme nezaznamenali. Dispozícia splete nebola na oboch stranách tela rovnaká, nejestvovala dokonalá symetria. U starších tiel bola výrazne znížená elasticita a pevnosť nervu, pri preparácii sa ľahšie poškodili a boli akoby „chabé“, „mľandavé“. U vretenného nervu sme v 2 prípadoch (2%) pozorovali anastomotickú vetvu k lakt'ovému nervu (nervus ulnaris); 1x vpravo=1% (Obr.1) a 1x vľavo=1% (Obr. 2).



Obr. 1 Ramenná spleť v pravej pazuchovej oblasti: anastomotická spojka vretenného nervu k lakt'ovému nervu.



Obr. 2 Ramenná spleť v ľavej pazuchovej oblasti: anastomotická spojka ľavého vretenného nervu k ľavému lakt'ovému nervu.

Diskusia a záver

Väčšina literárnych prameňov sa zaoberá variabilitami kožnej (senzitívnej) inervácie vretenného nervu predlaktia a ruky (1- 3, 7). Len niekoľko prác rozoberá variability formovania sa nervus radialis, ktoré sú rovnako dôležité (obzvlášť pre traumatológov a ortopédov riešiacich napr. fraktúry humeru) (5, 7). Dokonca aj Bergmannova Ilustrovaná Encyklopédia Humánnych Anatomických variácií popisuje skôr variabilitu distálnej senzitívnej inervácie nervu, aj keď v texte sú spomenuté možné spojenia s n. ulnaris (avšak bez štatistického vyjadrenia a opisu) (1). Keďže sme preskúmali 100 spleťí (na 50tich kadáveroch), štatistické vyjadrenie variácií je vcelku jednoduché. Marathe et al. (2010) spomenul vo svojej práci nezvyčajnú spojku medzi vretenným nervom a n. cutaneus antebračii medialis v pazuchovej oblasti. Namking et al. (2013) v 1 prípade pozoroval rozvetvenie a opätovné spojenie n. radialis v axile – vytvoriac slučku okolo ektopického svalu (čo bola pravdepodobne časť m. latissimus dorsi). Marathe (2010) a aj Yogesh (2011) rovnako predkladajú pravdepodobné embryologické vysvetlenie nálezov variabilit periférnych nervov: svaly horných končatín sa vyvíjajú z mezenchýmu paraxiálneho mezodermu v 5tom týždni intrauterinného vývoja. Radiálne extensory predlaktia majú odlišný pôvod od ostatných extensorov predlaktia. Za vývoj hornej končatiny je zodpovedná oblastná expresia 5tich Hox D (Hox D 1 to Hox D 5) génov. Motorické axóny vrastú do základov končatinových hrbolčiek, zmiešajú sa vytvoriac ramennú spleť hornej končatiny. Rastové kužele axónov pokračujú aj v zárodku končatiny. Postup rozvíjajúcich sa axónov je regulovaný expresiou chemo-atraktantov a chemo-repulsantov vo vysoko koordinovanom vzorci špecifického štiepenia. Tropné substancie priťahujú správne rastové kužele a podporujú ich životaschopnosť v zabezpečení ich správnej cesty. Tropné látky (substancie) zahŕňajú z mozgu odvodený neurotropný rastový faktor, c-kit ligand, neutrin-1, neutrin-2 a pod. Variabilita v priebehu nervu môže byť výsledkom zmeneného signálneho procesu medzi mezenchymálnymi bunkami a neuronálnymi rastovými kuželmi alebo cirkulačnými faktormi v čase štiepenia zväzkov ramennej splete.

Klinický význam: znalosť možných variácií vetvenia ramennej splete v pazuchovej oblasti môže byť nápomocná v riešení traumatologických a ortopedických výkonov v oblasti ramenného kĺbu a ramena (prevencia možných iatrogénnych poškodení počas rekonštrukčných výkonov) (8). Uvedený prehľad môže byť užitočný pri procese neuronálnych štepov a pri neurofyziologickom diagnostickom hodnotení periférnych neuropatií (4).

Literatúra

- 1. Bergman RA, Afifi AK, Miyauchi R.** Illustrated Encyclopedia of Human Anatomic Variation: Opus III: Nervous System: Plexuses. Radial nerve (<http://www.anatomyatlases.org/AnatomicVariants/NervousSystem/Text/RadialNerve.shtml>)
- 2. Davidovich ER, Nascimento OJM.** Superficial radial nerve–lateral antebrachial cutaneous nerve anatomic variation. Brain and Behavior 2014; 4 (1): 70–74 (doi: 10.1002/brb3.195).
- 3. Cherchel A, Zirak C, De Mey A:** The humeral origin of the brachioradialis muscle: An unusual site of high radial nerve compression. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery 2013; 66, e325- e327.
- 4. Marathe RR, Mankar SR, Joshi M, Sontakke YA:** Communication between radial nerve and medial cutaneous nerve of forearm. Journal of Neurosciences in Rural Practice 2010; 1 (1), 49-50.
- 5. Namking M, Mo-thong W, Chaijaroonkhanarak W, Khamanarong K, Woraputtaporn W:** A rare variation of posterior cord brachial plexus branching coexisting with the intercalated ectopic muscle. Anat Sci Int 2013; 88, 115–117 (doi 10.1007/s12565-012-0157-7).
- 6. Standring S et al.:** Gray's Anatomy (The Anatomical Basis of Clinical Practice) (40th Edition). UK Churchill Livingstone Elsevier 2008.
- 7. Yogesh AS, Marathe RR, Pandit SV:** Musculocutaneous nerve substituting for the distal part of radial nerve: A case report and its embryological basis. Journal of Neurosciences in Rural Practice 2011; 2 (1), 74-76.
- 8. Zamborský R, Šimko P, Braunsteiner T.** Taktika ošetrenia zlomenín distálneho humeru u dospelých. In: Lekársky obzor, 56, (7-8), 2007, s.295-299. ISSN 0457-4214.

ZMENY POZÍCIE NERVUS OPTICUS V DÔSLEDKU VARIÁCIÍ SINUS SPHENOIDALIS

(Modifications of position of optic nerve as a result of variations of sphenoid sinus)

Gabriela Hešková¹, Desanka Výbohová¹, Yvetta Mellová¹

¹ Ústav anatómie, Jesseniova lekárska fakulta Martin, UK Bratislava, Malá Hora 4, 037 54 Martin, heskova@jfmed.uniba.sk

Súhrn

V predkladanej práci sme sledovali zmeny priebehu a pozície nervus opticus pri variáciách pneumatizácie sinus sphenoidalis, osobitne koreláciu medzi pneumatizáciou processus clinoides anterior a protrúziou nervus opticus. Hodnotili sme incidenciu protrúzie nervus opticus do sinus sphenoidalis, dehiscenciu steny sínusu a syntopický vzťah nervus opticus ku septum sinuum sphenoidalium. Výsledky boli získané retrospektívnou analýzou CT obrazov 46 pacientov starších ako 18 rokov v koronárnej a axiálnej rovine.

Kľúčové slová

Sinus sphenoidalis, nervus opticus, rinochirurgia

Summary

In the present work we investigated modifications of course and position of optic nerve as a result of variations of pneumatization of sphenoid sinus, particularly correlation between pneumatization of anterior clinoid process and protrusion of optic nerve. We evaluated incidence of protrusion of optic nerve into sphenoid sinus, bony dehiscence of the wall of sinus and relation of optic nerve into sphenoid septum. Retrospective analysis of CT scans of 46 patients older than 18 years in coronal and axial planes was performed.

Key words

sphenoid sinus, optic nerve, rhinosurgery

Úvod

Nervus opticus (NO) prebieha v úzkom syntopickom vzťahu k superolaterálnej stene sinus sphenoidalis. Tento vzťah ovplyvňujú a menia variácie pneumatizácie klinovej dutiny, pri ktorých sa nervus opticus môže diskretné vyklenovať až dokonca môže prebiehať cez sinus sphenoidalis. Poloha nervu v sínuse zvyšuje možnosť kontaktu nervu s priehradkou dutiny klinovej kosti, pretože intersinózne septum je často lateralizované. Zmeny priebehu a polohy nervu zvyšujú riziko jeho poškodenia pri endoskopických chirurgických intervenciách, zvlášť pri dehiscencii kostenej steny sínusu nad nervus opticus a pri úzkom kontakte nervu s asymetricky uloženou priehradkou dutiny.

Materiál a metódy

V štúdiu sme skúmali a hodnotili CT snímky v koronárnej aj axiálnej rovine 46 pacientov, avšak celkovo bolo hodnotených 87 zrakových nervov, pretože sme nehodnotili priebeh

spomínaného nervu na strane, kde boli identifikované cellulae sphenothmoidales.

Technické parametre CT obrazu: slice thickness – 1 mm, increment – 1 mm, 120 kilovoltov, 150 miliampér/sec, kostné okno (center 800, width 2000 HU).

Zo štúdie boli vyradení pacienti mladší ako 18 rokov, pacienti s chronickými a nádorovými ochoreniami, ktoré zatieňujú sinus sphenoidalis pri CT vyšetrení a pacienti s konchálnym a preselárnym typom pneumatizácie sinus sphenoidalis. Nehodnotili sme tiež CT snímky pacientov s cellulae sphenothmoidales.

Protrúzia NO bola hodnotená v prípade, ak 50% a viac priemeru NO prebiehalo cez dutinu, pričom nerv sa vyklenoval do sinusu s alebo bez chýbania kostenej steny oddelujúcej dutinu od nervu. Chýbanie kostenej steny bolo hodnotené ako dehiscencia. Kritéria sme prebrali od autorov – Dessi et al. (1994), Sirikci et al. (2000), Bademci et Ünal (2005), Ünal et al. (2006). Hodnotili sme aj syntopický vzťah NO k septum sinuum sphenoidalium. Sledovali sme syntopický vzťah priehradky a nervu v zmysle inzercie septa (priehradka bola pripojená k stene sinusu v mieste jeho kontaktu s NO), alebo kontakt septa (priehradka sa dotýkala NO, ale inzerovala na inom mieste dutiny).

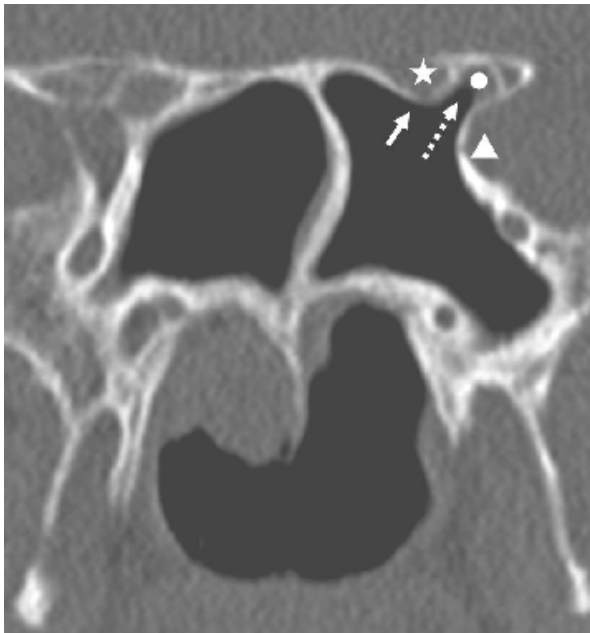
Výsledky

V našej štúdii sme z celkového počtu 46 hodnotených CT snímkov pacientov identifikovali 21 pacientov (45,7%) s protrúziou NO. Z toho vpravo u 3 (6,5%), vľavo u 6 (13%) a bilaterálne u 12 (26,1%) pacientov. Dehiscenciu steny sme zistili u 15 (32,6%) pacientov. Z toho vpravo u 4 (8,7%), vľavo u 2 (4,3%) a bilaterálne u 9 (19,6%) pacientov.

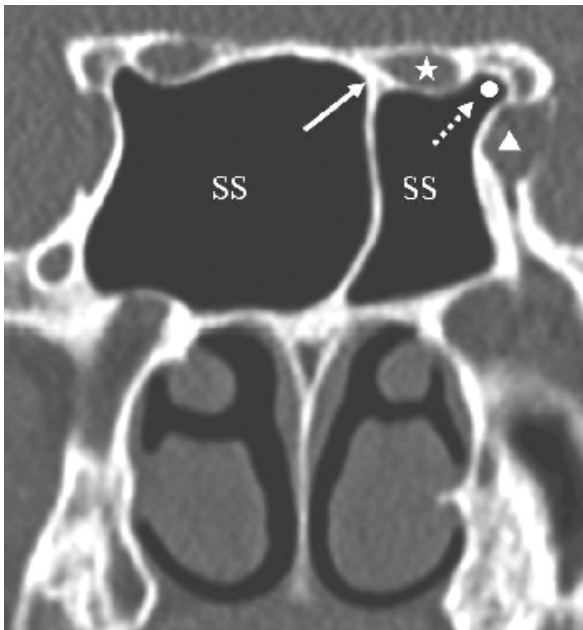


Obr. 1 Bilaterálne **protrúzia n. opticus** (hviezdičky) s **dehiscenciou** steny. Bilaterálne protrúzia a. carotis interna v mieste jej predného ohnutia (trojuholník), bilaterálne pneumatizácia processus clinoideus anterior (bodka). CT v axiálnej rovine.

Z celkového počtu 87 hodnotených nervov sme protrúziu NO a dehiscenciu steny oddelujúcej nerv od dutiny zistili nasledovne: protrúzia 33 (37,9%) nervov, z toho vpravo 15 (17,2%), vľavo 18 (20,7%) a dehiscencia steny v 24 prípadoch (27,6%), z toho vpravo 13 (14,9%), vľavo 11 (12,6%).



Obr. 2 Protrúzia **n. opticus** (hviezdička) s dehiscenciou (šípka) vľavo. Recessus lateralis superior (prerušovaná šípka), pneumatizácia processus clinoideus anterior (bodka), a. carotis interna (trojuholník). CT v koronárnej rovine.



Obr. 3 Inzercia kompletného kosteného septa (šípka) ku **n. opticus** (hviezdička) vľavo. A. carotis interna (trojuholník), recessus lateralis superior (prerušovaná šípka), pneumatizovaný processus clinoideus anterior (bodka), sinus sphenoidalis (SS). CT v koronárnej rovine.

Protrúzia NO a zároveň prítomnosť pneumatizácie processus clinoideus anterior bola zistená spolu v 16 prípadoch (18,4%) a to zhodne v 8 prípadoch (9,2%) vpravo aj vľavo. Súčasný výskyt protrúzie n. opticus a homolaterálnej pneumatizácie processus clinoideus anterior je štatisticky vysoko signifikantný ($p < 0,001$).

Pri hodnotení syntopických vzťahov NO ku septum sinuum sphenoidale sme zistili že, z celkového počtu 46 sledovaných CT snímok bolo septum pripojené ku NO spolu u 7 (15,2%) pacientov, vpravo u 4 (8,7%) pacientov a vľavo u 3 (6,5%) pacientov. Bilaterálne pripojenie septa k nervu sme nezaznamenali.

Pri vyjadrení podľa polohy vpravo alebo vľavo, zo sledovaných 87 polôh, bolo identifikovaná inzercia septa k NO spolu v 7 prípadoch (8%), z toho vpravo v 4 (4,6%) a vľavo v 3 prípadoch (3,4%). Vo všetkých prípadoch išlo o inzerciu kompletného kosteného septa.

Diskusia

Incidencia protrúzie a dehiscencie steny je uvádzaná v literatúre v širokom percentuálnom rozpätí – pri hodnotení celkového počtu pacientov bez ohľadu na polohu sledovanej variácie (údaje uvádzame v poradí: autori - protrúzia nervu a dehiscencia steny sinusu): (5) - 36,6% a 36,8%; (6) - 35,7% a 30,7%; (2) - 31,5% a 22,8%; (7) - 17,8% a nehodnotili; (1) - 8% a 8%; (8) - 7% a 13,5%. Pri hodnotení počtu nervov s ohľadom na jeho umiestnenie vpravo alebo vľavo: (3) - 34,4% a 7,7%; (4) - 31,3% a 8%; (9) - 29% a nehodnotili; (10) - 18,2% a 18,2%; (11) - 6% a 24%; (12) - 5,5% a 40%; (13) - 1,8% a 2,1%. Naše výsledky ukazujú vyššiu incidenciu protrúzie nervu, ale výsledky dehiscencie sú v rozpätí uvádzanom ostatnými autormi. Rozdiely vo výsledkoch vidíme v odlišných parametroch hodnotenia protrúzie a v obtiažnosti vizuálneho posúdenia hodnotených štruktúr v hraničných hodnotách. Sirikci et al. (2000), Bademci et Únal (2005) hodnotia protrúziu keď viac ako 50% priemeru nervu je v dutine, Hewaidi et Omami (2008) označujú akékoľvek vykľutie nervu ako protrúziu rôzneho stupňa. Davoodi et al. (2009), DeLano et al. (1996), Fasunla et al. (2012), Lakshmi et al. (2015) do výsledkov zaradili všetky nervy prebiehajúce cez sínus v rôznom rozsahu jeho priemeru a nedefinujú to ako protrúziu.

Ďalšie rozdiely vo výsledkoch sú podľa nás ovplyvnené technickými parametrami - hrúbka rezov od 1 mm (naša štúdia) až po 5 mm (10), odlišné vyšetrovacie metódy – CT snímky, endoskopia (9). Niektorí autori porovnávali spolu počet pacientov so sledovanou variáciou bez ohľadu na jej jednostranné alebo bilaterálne umiestnenie a počet prípadov variácie zohľadňujúcej jej polohu vpravo alebo vľavo. Aj naša štúdia potvrdila, že tieto výsledky sú odlišné a stoja za povšimnutie. Je to dané tým, že určité % pacientov má bilaterálny výskyt variácie. Pochopiteľne, vyšší počet bilaterálnych variácií zväčšuje rozdiel medzi % celkového výskytu u pacientov oproti % výskytu na jednotlivých stranách. Pri hodnotení dehiscencie Únal et al. (2006) odlišujú dehiscenciu a extrémne tenkú stenu a Desii et al. (1994) neuvádzajú dehiscenciu, ale extrémne tenkú kostenú lamelu ohraničujúcu všetky nervy s protrúziou. My sme sa pri extrémne tenkej stene oddeľujúcej štruktúru od dutiny priklonili k záveru – dehiscenčná.

Súvislosť medzi protrúziou NO a súčasne prítomnou homolaterálnou pneumatizáciou processus clinoideus anterior je z klinického hľadiska veľmi dôležitá. Podľa našich výsledkov je tento vzťah štatisticky signifikantný. Potvrdzujú to aj Sirikci et al. (2000) a Hewaidi et Omami (2008). Sapci et al. (2004) uvádzajú až 86% strán so súčasnou protrúziou NO a pneumatizáciou processus clinoideus anterior. Ostatní autori väčšinou uvádzajú len incidenciu pneumatizácie processus clinoideus anterior a nehodnotia štatistickú koreláciu.

V našej štúdii sme zaznamenali inzerciu alebo kontakt medzi septom a NO u 15,2% pacientov. V tomto hodnotení syntopického vzťahu sa nám zdá presnejšie vyjadrenie podľa konkrétnej polohy len vpravo alebo len vľavo. Incidencia zohľadňujúca takéto umiestnenie variácie v našej štúdii predstavuje 8% prípadov. Nižšiu incidenciu ako my uvádzajú Elwany

et al. (1999) – 5,9%. Bademci et Únal (2005) a Únal et al. (2006) zistili vyššiu incidenciu - 20% a 19,6%. Ako však uvádzajú, anatomické orientačné body, ako aj variácie v anatómii sinus sphenoidalis sú veľmi rôznorodé od pacienta ku pacientovi. Príčinou rozdielov sú aj malé súbory pacientov (od 45 po 93 pacientov).

Záver

Pri hodnotení syntopického vzťahu nervus opticus k sinus sphenoidalis sme zistili vysokú incidenciu protrúzie nervu do dutiny a dehiscencie steny oddeľujúcej nerv od sinusu. Ide o variácie, ktoré treba predvídať a identifikovať ich v predoperačnej príprave, pretože predstavujú zvýšené riziko nečakaných komplikácií počas chirurgických intervencií. Toto riziko sa ešte zvyšuje pri dehiscencii steny oddeľujúcej sinus od NO.

Naša štúdia potvrdila štatisticky vysoko významný vzťah medzi protrúziou nervus opticus a homolaterálnou pneumatizáciou processus clinoideus anterior. Hodnotenie týchto vzťahov má podľa nás praktický význam - prítomná pneumatizácia processus clinoideus anterior upozorňuje na možnú protrúziu NO v sinusoch, ktoré sú z dôvodu patologického procesu zatienené a na CT snímkach zle čitateľné, takže nie je možná presná identifikácia polohy nervu.

Pri hodnotení septácie sinus sphenoidalis sme si všímali kompletne, inkompletne septá, alebo trné v sinus sphenoidalis. Považujeme za potrebné hodnotiť aj tieto inkompletne septá a trné, pretože aj tie môžu byť v kontakte s nervom. Pri hodnotení syntopického vzťahu NO k septum sinuum sphenoidalium sme však zistili inzerciu len kompletneho septa k nervu. Inzercia, alebo kontakt priehradky s NO predstavuje riziko možnej fraktúry priehradky a následného neúmyselného poranenia nervu s vážnymi dôsledkami.

Literatúra

- 1. Dessi P, Moulin G, Castro F et al.** Protrusion of the optic nerve into the ethmoid and sphenoid sinus: prospective study of 150 CT studies. *Neuroradiology*. 1994; 36(7), p.515-516.
- 2. Sirikci A, Bayazit YA, Bayram M et al.** Variations of sphenoid and related structures. *Eur. Radiol*. 2000; 10, p. 844-848.
- 3. Bademci G, Únal B.** Surgical Importance of Neurovascular Relationships of Paranasal Sinus Region. *Turkish Neurosurgery*. 2005; Vol. 15, 2, p. 93-96.
- 4. Únal B, Bademci G, Bilgili YK et al.** Risky anatomic variations of sphenoid sinus for surgery. *Surg Radiol Anat*. 2006; 28, p. 195-201.
- 5. Davoodi M, Saki N., Saki G. et al.** Anatomical Variations of Neurovascular Structures Adjacent Sphenoid Sinus by using CT Scan. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2009; 12, 6, p. 522-525.
- 6. Hewaidi GH, Omami GM.** Anatomic Variation of Sphenoid sinus and Related Structures in Libyan population: CT Scan Study. *Libyan J Med*. 2008; AOP: 080307, Vol. 3(3), p.128 - 133.
- 7. Dündar R, Kulduk E, Soy FK et al.** Radiological evaluation of septal bone variations in the sphenoid sinus. *J Med Updates*. 2014; 4 (1):6-10.
- 8. Sapci T, Derin E, Almac S. et al.** The relationship between the sphenoid and the posterior ethmoid sinuses and the optic nerves in Turkish patients. *Rhinology*. 2004; 42 (1), p. 30-34.
- 9. Elwany S, Elsaied I, Thabet H.** Endoscopic anatomy of the sphenoid sinus. In *Journal of Laryngology and Otology*, 1999, 113, 2, p. 122-126.
- 10. Nitinavakarn B, Thanaviratananich S, Sangsilp N.** Anatomical variations of the Lateral Nasal Wall and Paranasal Sinuses: A CT Study for Endoscopic Sinus Surgery (ESS) in Thai Patients. *J Med Assoc Thai*. 2005; 88 (6), p. 763-768.
- 11. DeLano MC, Fun FY, Zinreich SJ.** Relationship of the optic nerve to the posterior paranasal sinuses: a CT anatomic study. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996;17:669-675

- 12. Fasunla AJ, Ameye SA, Adebola OS et al.** Anatomical variation of the sphenoid sinus and nearby neurovascular structures seen on computed tomography of black africans. East Cent. Afr. J. Surg. 2012; vol. 17 (1)
- 13. Lakshmi RS, Gugapriya TS, Kumar NV et al.** Positional variation of optic nerve in relation to sphenoid sinus and its association with pneumatisation of anterior clinoid process: A radiological study. J of Evidence based Medicine and Healthcare. 2015; 2 (32), p. 4719-4728

FENOTYPOVÉ ASPEKTY VZNIKU RÁZŠTEPOV PERY A PODNEBIA

(Phenotypic aspects of cleft lip and palate)

Diana Kúkel'ová¹, Diana Pacáková¹, Františka Horváthová²

¹Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ Moyzesova 11, Košice, 040 11, email: diana.kukelova@gmail.com

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

Súhrn

V mnohých prípadoch rázštepových syndrómov je často jasná korelácia medzi genetickou mutáciou a fenotypom rázštepu. Aj keď existuje veľké množstvo potenciálnych klinických a subklinických čŕt súvisiacich s tzv. rozšíreným fenotypom rázštepu, sila dôkazov sa líši. Patria sem subepiteliálne chyby *musculus orbicularis oris* a dentálne anomálie.

Kľúčové slová

Rázštep pery, rázštep podnebia, subepiteliálne defekty, zubné anomálie

Summary

In many cases of clefts syndromes is often a clear correlation between genetic mutations and the phenotype of the cleft. Although there are a large number of potential clinical and subclinical traits related to the so-called extended phenotype of the cleft, the strength of the evidence is variable. These include subepithelial defects of the orbicularis oris muscle and dental anomalies.

Key words

Cleft lip, cleft palate, subepithelial defects, dental anomalies

Úvod

Orálne rázštepy sú heterogénnou a významnou skupinou vrodených chýb. Obsahujú syndrémový a nesyndrémový rázštep pery (CL - *Cleft Lip*), rázštep podnebia (CP - *Cleft Palate*) a rázštep pery a podnebia (CLP - *Cleft Lip and Palate*). Približne 70% prípadov sú izolované rázštepy (ne-syndrémové) s etiologickou zložitou, zahŕňajúce niekoľko genetických a environmentálnych rizikových faktorov, sledujúci multifaktoriálny prahový model dedičnosti (1). Väčšina rizikových faktorov je rozpoznaná počas plánovania rodičovstva a perinatálnej konzultácie.

OO svalové defekty

Subepiteliálne defekty *musculus orbicularis oris superior* (OO svalové defekty) pravdepodobne vyplývajú z neúplného vývoja OO zvierača, čo môže predstavovať najmiernejšiu fenotypovú expresiu rázštepového spektra (2, 3). Tieto chyby boli identifikované významne častejšie u príbuzných jedincov s izolovaným CL/P ako u ľudí bez rodinnej anamnézy výskytu tejto chyby (4, 5). Okrem toho bez ohľadu na to, že výskyt CL/P je etiologicky odlišný od CP, defekty OO svalov boli zaznamenané u osôb s výskytom

izolovaného CP (6). To samo o sebe naznačuje, že v niektorých prípadoch diagnóza izolovaných CP nemusí byť úplne presná a ďalej podporuje hypotézu o „zmiešanom rázštepe“ (7).

Zubné anomálie

Zubné anomálie najmä hypodoncia, mikrodancia a nadpočetné zuby sa vyskytujú častejšie u jedincov s CL/P. V skutočnosti bolo navrhnuté, rovnako ako u subepiteliálnych chýb OO svalov, že prítomnosť alebo neprítomnosť zubných anomálií by mali byť zahrnuté do celkového hodnotenia rázštepového fenotypu (8). Vzhľadom k časovému a priestorovému vývoju úst, podnebia a zubov je najčastejšie sa vyskytujúcou anomáliou vrodene chýbanie laterálnych rezákov. Je dobre známe, že u jedincov s CL/P bočné rezáky v línii rázštepú často chýbajú (9). Rovnako tak u týchto pacientov je zvýšený výskyt chýbajúcich zubov mimo rázštepovej oblasti, najmä premoláre a laterálny rezák (10). Avšak hypodoncia sa častejšie vyskytuje u nepostihnutých súrodencov jedinca s rázštepom (11,1%) ako u nepríbuzných (3,4%) (11). Vzhľadom k tomu, že existuje celý rad génov spojených s výskytom rázštepú napr. *Msx1*, *Tgfa*, *Pax9*, *Tgfb3*, *Fgfr1* a *IRF6* (12, 13, 14) ako aj s výskytom agenézy zúgov sa podporuje hypotéza, že zubné anomálie prispievajú k rázštepovému fenotypu. Avšak overenie etiológie chýbajúceho zuba môže byť náročné. Väčšina štúdií využíva retrospektívnu prehliadku zubných röntgenových snímok, ktoré však pri skríningu hypodoncie neumožňujú potvrdenie príčiny chýbania zuba (napr. či je chýbanie spôsobené extrakciou alebo je od narodenia). Okrem toho je možné, že zákrok na opravu rázštepú môže narušiť vyvíjajúce sa zubné lôžko, čo má za následok vznik agenézy prípadne vznik miernej malformácie. Preto detailné dlhodobé klinické aj rádiologické údaje o vývoji zubov a zubnej intervencie by sa mali zbierať prospektívne od postihnutých rodín pre ľahšie a presnejšie určenie subfenotypu (7). Lucas a kol. uvádza vyšší výskyt straty zafarbenia skloviny u detí s výskytom CLP v porovnaní s deťmi bez CLP a tento defekt prisudzuje traume počas operácie CLP (15). Ribeiro a kol. zistili vysokú prevalenciu hypodoncie trvalého laterálneho rezáka na strane rázštepú (49,8% pacientov) ako aj oneskorený vývoj koreňa v porovnaní s kontralaterálnym zubom (9,16). Väčšina štúdií skúmajúcich zubné deformácie medzi jedincami s rázštepom zahŕňa rôzne typy rázštepových prípadov a nie sú rozlíšené ich výsledky na základe typu rázštepú. V dôsledku toho je k dispozícii v literatúre málo informácií ohľadom výskytu zubných anomálií v rôznych skupinách rázštepov. Vzhľadom k tomu rázštep môže byť výsledkom kombinácie genetických a environmentálnych faktorov a môže dôjsť k jeho vzniku v rôznom čase počas tehotenstva a tým ovplyvňovať vznik kraniofaciálnych a dentofaciálnych štruktúr (17, 18). Pretože zubné anomálie môžu byť komplikujúcim faktorom v zubnej ako aj ortodontickej liečbe, pred zahájením ortodontickej korekcie je potrebné vykonať vyšetrenia na určenie existencie anomálií (19).

Záver

Heterogénna etiológia rázštepových defektov a ich asociácia s menšími a väčšími defektmi zdôrazňuje nutné genetické vyšetrenie a poradenstvo pre všetkých pacientov s výskytom orálnych rázštepov.

Literatúra

1. **Gil-da-Silva-Lopes V L, Lopes Monlleó I.** Risk factors and the prevention of oral clefts. *Brazilian Oral Research* 2014; 28: 1-5.
2. **Martin RA, Jones KL, Benirschke K.** Extension of the cleft lip phenotype: the subepithelial cleft. *American Journal of Medical Genetics* 1993; 47: 744–747.
3. **Suzuki S et al.** Mutations in BMP4 are associated with subepithelial, microform, and overt cleft lip. *American Journal of Human Genetics* 2009; 84: 406–411.

4. **Martinez-Alvarez C et al.** Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Developmental Biology* 2000; 220: 343–357.
5. **Neiswanger K et al.** Orbicularis oris muscle defects as an expanded phenotypic feature in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2007; 143: 1143–1149.
6. **Weinberg SM et al.** Rethinking isolated cleft palate: evidence of occult lip defects in a subset of cases. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2008; 146A: 1670–1675.
7. **Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N.** The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Diseases* 2009; 15: 437–453.
8. **Letra A et al.** Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *Journal of Dental Research* 2007; 86: 986–991.
9. **Ribeiro LL et al.** Dental anomalies of the permanent lateral incisors and prevalence of hypodontia outside the cleft area in complete unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 2003; 40: 172–175.
10. **Menezes R, Vieira AR.** Dental anomalies as part of the cleft spectrum. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 2008; 45: 414–419.
11. **Eerens K et al.** Hypodontia and tooth formation in groups of children with cleft, siblings without cleft, and nonrelated controls. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 2001; 38: 374–378.
12. **Slayton RL et al.** Genetic association studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 2003; 40: 274–279.
13. **Vieira AR et al.** MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *Journal of Dental Research* 2004; 83: 723–727.
14. **Vieira AR et al.** Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2007; 143: 538–545.
15. **Lucas VS et al.** Dental health indices and caries associated microflora in children with unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 2000; 37: 447–452.
16. **Ribeiro LL et al.** Dental development of permanent lateral incisor in complete unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 2002; 39: 193–196.
17. **Ranta R, Rintala A.** Tooth anomalies associated with congenital sinuses of the lower lip and cleft lip/palate. *Angle Orthodontist* 1982; 52: 212–221.
18. **Trotman CA et al.** Analyses of craniofacial and dental morphology in monozygotic twins discordant for cleft lip and unilateral cleft lip and palate. *Angle Orthodontist* 1993; 63: 135–140.
19. **Akcam MO et al.** 2010. Dental anomalies in individuals with cleft lip and/or palate. *European Journal of Orthodontics* 2010; 32: 207–213.

MORFOLOGICKÉ VARIÁCIE KRČNÝCH STAVCOV A ICH FUNKČNÝ VÝZNAM

(Morphological variation cervical vertebrae and their functional implication)

Lenka Kunertová¹, Yvetta Mellová¹

¹Ústav anatómie, Univerzita Komenského Bratislava, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Malá hora 4, 036 01 Martin, kunertova@lefa.sk

Súhrn

U ľudí existuje sedem krčných stavcov, ktoré sú označené C1 až C7. Charakteristickým rysom stavcov C2 až C6 je rozdvojený processus spinosus, výnimku tvorí C1, ktorý ho nemá a C7, ktorý ho nemá rozdvojený ale ukončený výrazným tuberkulom, hmatateľným cez kožu v krčnej oblasti. Processus transversus je perforovaný foramen transversarium, ktorý pri horných šiestich stavcoch poskytuje priechod pre vasa vertebralia. Medzi anatomické varianty krčných stavcov, ktoré boli uvedené vo väčšine klasických anatomických učebníc patria najmä: tvz. krčné rebrá, defekty arcus posterior, prítomnosť kĺbových plôšok nad okrajmi arcus anterior atlantis, prítomnosť tretieho okcipitálneho kondylu a podobne.

Kľúčové slová

Atlas, arcus anterior, arcus posterior, massae laterales

Summary

In humans, there are seven cervical vertebrae, which are labeled C1 to C7. A characteristic feature of the vertebrae C2 to C6 is a projection known as the bifid spinous process only the C7 vertebra has a prominent non bifid spinous process that can be felt at the base of the neck. The transverse processes are each pierced by the foramen transversarium, which, in the upper six vertebrae, gives passage to the vertebral artery and vein. The anatomical variations of the cervical vertebrae as reported in most classical anatomical textbooks mainly include: cervical ribs, non fusion of the halves of the posterior arch of the atlas, presence of articular facets on the superior margin of the anterior arch of the atlas in case of presence of a third occipital condyle and similarly.

Key words

Atlas, anterior arch, posterior arch, lateral masse

Úvod

Atlas je prvý krčný stavec. Je spojený s os occipitale a 2. krčným stavcom – axis. Má významné postavenie v pohyboch hlavy a krku. Atlas nemá telo ako ostatné krčné stavce, má tvar kruhu s predným a zadným oblúkom – arcus anterior a posterior, spájajúcich sa v bočných oblastiach – massae laterales, na hornej a dolnej ploche majú kĺbové plôšky – facies articularis superior a inferior, pre spojenie s lebkou a susedným krčným stavcom, laterálne z nich vybiehajú bočné výbežky – processus transversus spolu s otvorom – foramen transversarium. Za nimi, na zadnom oblúku, sa nachádza žliabok pre cievu zásobujúcu

mozog arteria vertebralis – sulcus arteriae vertebralis. Poznatky o možných variáciach tohto stavca majú veľký význam pre lekárov pracujúcich v rôznych oblastiach medicíny. V tejto práci sme sa zamerali na variácie horných artikulačných plôch.

Materiál a metodika:

Materiál sme získali z kostených preparátov, ktoré využívame na našom ústave pri výučbe študentov prvého ročníka všeobecného lekárstva. Jednotlivé stavce boli získané podľa bežných preparačných algoritmov pre konzerváciu kadaverov a následne vypreparované počas pitevných cvičení a ďalej spracované overenými postupmi.

Výsledky:

Facies articularis superior atlantis predstavuje podstatnú časť hornej plochy oboch massae laterales prvého krčného stavca. Pravostranná a ľavostranná artikulačná plocha je orientovaná šikmo, pričom predná časť je natočená bližšie k sagitálnej rovine ako zadná, má konkávny tvar, v priečnom aj pozdĺžnom smere. Plochy sú naklonené smerom nadol a dovnútra, vonkajší okraj je vyššie ako vnútorný a obyčajne sa líši vo veľkosti, tvare a hĺbke. Všeobecne sa opisuje oválny, pretiahnutý, obličkový tvar artikulačných plôch. Ich obrysy sú nepravidelné, po stranách sa nachádzajú zárezy rôznej veľkosti a tvaru, ktoré im dodávajú charakteristický tvar. Vyplýva z toho veľká variabilita stavcov, neexistuje ani jeden rovnaký stavec, každý má charakteristický tvar facies articularis superior atlantis a aj na samotnom stavci sa pravá a ľavá strana nezhodujú úplne.) V ďalšej fáze sme sa zamerali na morfometrické rozmery artikulačných plôch. Merali sme horizontálny vonkajší predozadný, horizontálny vnútorný predozadný, vonkajší transversálny a vnútorný transversálny priemer. Pri stanovení priemerov sme vychádzali z práce Siengul G. a jeho kolegov (2006).

Diskusia

Náš súbor obsahoval 20 stavcov, to znamená 40 artikulačných plôch, 6 z nich malo oválny tvar bez výraznejších bočných zárezov, predstavuje to 15% z celkového počtu sledovaných stavcov. 24 plôch (60%) malo obličkový tvar s výrazným zárezom na vnútornej strane a viac alebo menej výrazným na vonkajšej strane a zvyšných 10 (25%) bolo úplne rozdelených priečnou ryhou na dve časti s rôznou veľkosťou a tvarom. Horizontálny vonkajší predozadný priemer bol 26,47 mm, hodnoty sa pohybovali v intervale 23,9 – 28,6 mm, horizontálny vnútorný priemer bol 26,32 mm, v intervale 23,5 – 28,1 mm, transversálny vonkajší priemer bol 10,64 mm, v intervale 8,7 – 12,6 mm, transversálny vnútorný priemer bol 9,72 mm, v intervale 7,9 – 11,8 mm. Z výsledkov vyplýva veľká variabilita v tvare facies articularis superior atlantis, ale rozdiely medzi vonkajšími a vnútornými priermi, v horizontálnom aj transversálnom smere, nie sú významné. Nami namerané hodnoty sme porovnali s podobnými meraniami, ktoré boli publikované v zahraničnej literatúre (Siengul G., et al., 2006, Singh S., 1965, Watanabe M., et al., 2010) a zistili sme, že sú porovnateľné.

Záver

Existuje celý rad variácií stavcov. Na našom ústave sme ich začali študovať a vytvárať súbor zahŕňajúci veľký počet stavcov, z rôznych častí chrbtice a väčší počet presne zadefinovaných parametrov. Výsledky tohto súboru budeme využívať pri výučbe na našom ústave a zároveň podrobné vedomosti o tejto problematike sú veľmi cenné pre mnohých odborníkov, ako sú napríklad neurológovia, ortopédi, otorinolaryngológovia, ale aj iní lekári, ktorí sa vo svojej praxi denne stretávajú s ochoreniami prípadne poraneniami v oblasti chrbtice. Jedným z príkladov klinického významu tejto problematiky je vertebrogénny syndróm. Je to názov pre celú radu klinických prejavov, ako sú bolesti, vegetatívne prejavy, poruchy hybnosti. Rozdelíme ho na primárny, ktorý vzniká na základe morfologických a funkčných zmien.

V niektorých prípadoch prvotnou príčinou sú funkčné zmeny, ktoré vedú ku zmenám morfológickým, v iných prípadoch je to presne naopak, morfológické zmeny vedú k funkčným poruchám. Druhú skupinu vertebrogénneho syndrómu tvorí sekundárny syndróm, ktorý vzniká na základe iných základných ochorení, ako sú napríklad nádorové ochorenia, zápalové procesy, traumy a podobne. Vertebrogénny syndróm patrí k najčastejším ochoreniam postihujúcich širokú populáciu ľudí, ktoré sú príčinou práceneschopnosti alebo invalidity, hneď po ochoreniach dýchacích ciest

.

Literatúra

- 1. Siengul G., Kadioglu HH.** Morphometric Anatomy of the Atlas and Axis Vertebrae, Turkish Neurosurgery 2006, Vol: 16, No: 2, 69-76
- 2. Singh Shamier.** Variations of the superior articular facets of atlas vertebrae, J. Anat., 1965, 99, 3, pp. 565-571
- 3. Watanabe M., Yamaguchi T., et al.** Cervical vertebra morphology in different skeletal classes, Angle Orthodontist, 2010, Vol 80, No 4

VPLYV VÝŽIVY NA HLAVOVÉ ROZMERY DOJČIAT

(The influence of nutrition on the infant head measurements)

Magdaléna Marčeková¹, Eva Neščáková², Yvetta Mellová¹, Juraj Marček³

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta, Ústav anatómie, Malá Hora 4, 036 05 Martin, Slovensko: marcekova@jfmed.uniba.sk

² Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovensko

³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta, Očná klinika, Kollárova 2, 036 59 Martin, Slovensko

Súhrn

Hlavové rozmery u novorodencov a dojčiat korešpondujú s rozmermi mozgu (1). Na posúdenie postnatálneho rastu mozgu sa často používa obvod hlavy, ktorý s objemom mozgu pozitívne koreluje (1,10). Rast mozgu počas novorodeneckého a dojčeneckého obdobia je pre vývoj kognitívnych funkcií dôležitejší ako počas fetálneho vývoja (4).

U sledovaného súboru dojčiat sme v trojmesačných intervaloch, až do veku jedného roka, hodnotili tri rozmery hlavy: obvod, najväčšiu dĺžku a najväčšiu šírku hlavy. Získané výsledky potvrdili pozitívny vplyv dojčenia na vývoj sledovaných rozmerov. Vzhľadom na referenčné hodnoty bol obvod hlavy u nášho súboru nižší, rovnako aj najväčšia dĺžka hlavy bola vo väčšine prípadov nižšia a vyššie hodnoty dosahovala len najväčšia šírka hlavy.

Kľúčové slová

Antropometria, hlavové rozmery, vplyv výživy, dojčenie, novorodenec, dojča

Summary

The overhead dimensions in newborns and infants correlate with the size of the brain.

The head circumference, which is positively correlated with brain volume (1), has been frequently used to assess postnatal growth of the brain (1,10). These results suggest that brain growth during infancy and early childhood is more important than growth during foetal life in determining cognitive function (4). In the reporting file infants we are in three-month intervals, up to one year of age, evaluated the three dimensions of the head: the circumference, the greatest length and the greatest width of the head. The obtained results confirmed the positive impact of breastfeeding on the development of the monitored dimensions. With respect to the reference values was the girth of the head in with our file lower, the greatest length of the head was in most cases lower and higher values, reached only to the largest width of the head.

Key words

Anthropometry, the dimensions of the head, the influence of nutrition, breastfeeding, newborn, infant

Úvod

Stav rastu a výživy sú od narodenia až po ukončenie rastu mimoriadne citlivými ukazovateľmi zdravia a prosperity každého jednotlivca a ich sledovanie patrí k základom hodnotenia celkového somatického stavu. Hodnoty telesných charakteristík sú veľmi dôležité pre posúdenie telesného rastu a súčasne aj zdravotného stavu detí a mládeže (12). Hlavové rozmery u novorodencov a dojčiat korešpondujú s rozmermi mozgu (2). Na posúdenie postnatálneho rastu mozgu sa často používa obvod hlavy, ktorý s objemom mozgu pozitívne koreluje (1,10). Rast mozgu počas novorodeneckého a dojčeneckého obdobia je pre vývoj kognitívnych funkcií dôležitejší ako počas fetálneho vývoja (4).

Materiál a metodika

Sledovaný súbor pozostával z 216 detí (105 dievčat a 111 chlapcov), ktoré pochádzali z okresu Martin a Žilina. Všetky deti boli vyšetrované v pravidelných trojmesačných intervaloch. U každého dieťaťa sme hodnotili tri rozmery hlavy: obvod, najväčšiu dĺžku a najväčšiu šírku. Z nameraných hodnôt sme vypočítali index cephalicus. Získané údaje sme na záver štatisticky vyhodnotili.

Na meranie, ktoré bolo prevádzkané podľa metodiky Martina a Sallera (9) sme používali štandardné antropometrické nástroje.

Výsledky

	Dievčatá				Chlapci			
Dĺžka dojčenia	N	x	s _d	i	N	x	s _d	i
0M	27	45,39	1,76	+ 0,19	15	46,17	1,70	- 0,37
3M	12	44,83	1,03	- 0,41	27	46,27	2,57	-0,28
6M	20	45,28	1,88	-0,09	10	46,00	1,45	- 0,51
9M	3	46,17	1,04	+ 0,05	8	46,10	1,29	- 0,42
12M	43	45,33	1,34	+ 0,94	51	46,43	1,71	- 0,15

Tab. 1 Obvod hlavy (cm)

Najnižšie priemerované hodnoty obvodu hlavy sme zaznamenali u dievčat, ktoré boli dojčené do veku 3 mesiacov a u chlapcov dojčených do 6 mesiacov. Najvyššie hodnoty dosahovali dievčatá dojčené do 9 mesiacov a chlapci, ktorí boli dojčení do veku 12 mesiacov. Obvod hlavy u chlapcov aj u dievčat bol vo väčšine prípadov menší ako referenčné hodnoty zdravej populácie. Hodnoty z-skóre sa pohybovali v rozpätí medzi -0,51 u chlapcov dojčených do 6 mesiacov do +0,94 u dievčat dojčených do 12 mesiacov.

	Dievčatá				Chlapci			
Dĺžka dojčenia	N	x	s _d	i	N	x	s _d	i
0M	27	14,93	0,70	- 1,05	15	15,73	1,19	- 0,54
3M	12	14,83	0,72	- 1,23	27	15,59	0,69	- 0,75
6M	20	14,98	0,83	-0,96	10	15,15	1,00	- 1,41
9M	3	15,00	1,00	- 0,91	8	15,13	0,64	- 1,45
12M	43	15,14	0,68	- 0,64	51	15,32	0,80	-1,15

Tab. 2. Najväčšia dĺžka hlavy (cm)

Najväčšia dĺžka hlavy sa u väčšiny našich kategórií nelíšila od štandardných hodnôt zdravej populácie. Nižšie hodnoty sme zaznamenali len u dievčat nedojčených a u dievčat dojených do 3 mesiacov života. a taktiež u chlapcov dojených do 6., 9. a do 12. mesiacov. Hodnoty z-skóre sa pohybujú od - 0,54 u nedojčených chlapcov do -1,45 u chlapcov dojených do 9 mesiacov.

	Dievčatá				Chlapci			
Dĺžka dojčenia	N	x	s _d	i	N	x	s _d	i
0M	27	12,59	0,81	+ 0,23	15	12,70	0,70	+ 0,37
3M	12	12,63	0,48	+ 0,28	27	12,93	1,06	+ 0,94
6M	20	12,58	0,85	+ 0,20	10	12,55	0,69	- 0,01
9M	3	12,67	0,58	+ 0,34	8	12,81	0,80	+ 0,65
12M	43	12,42	0,61	- 0,02	51	12,77	0,66	+ 0,53

Tab. 3. Najväčšia šírka hlavy (cm)

Najnižšie priemerné hodnoty šírky hlavy dosiahli dievčatá, ktoré boli dojené do veku 12 mesiacov a chlapci dojené do 6 mesiacov. Najvyššie priemerné hodnoty dosiahli dievčatá dojené do veku 9 mesiacov a chlapci dojené do 3 mesiacov. Hodnota najväčšej šírky hlavy, u našej vzorky, bola vo väčšine prípadov vyššia ako referenčné hodnoty zdravej populácie. Hodnoty z-skóre sa pohybovali v rozpätí medzi -0,02 u dievčat dojených do veku 12 mesiacov do +0,94 u chlapcov dojených do 3 mesiacov

	Dievčatá				Chlapci			
Dĺžka dojčenia	N	x	s _d	i	N	x	s _d	i
0M	27	84,55	6,68	+ 0,80	15	81,14	7,48	+ 0,60
3M	12	85,25	4,44	+ 0,94	27	83,07	7,85	+ 1,00
6M	20	84,02	4,18	+ 0,70	10	83,19	7,51	+ 1,02
9M	3	84,70	7,09	+ 0,83	8	79,37	6,65	+ 0,24
12M	43	82,14	4,55	+ 0,33	51	83,52	6,05	+ 1,09

Tab. 4 Index cephalicus

Najnižšie priemerné hodnoty sme zaznamenali u dievčat dojených do 12 mesiacov a u chlapcov dojených do 9 mesiacov. Najvyššie hodnoty boli nájdené u dievčat dojených do 3 mesiacov a u chlapcov dojených do 12 mesiacov. Hodnoty index cephalicus u väčšiny kategórií boli väčšie ako referenčné hodnoty zdravej populácie. Hodnoty z-skóre sa pohybovali v rozmedzí medzi +0,24 u chlapcov dojených do 9 mesiacov do +1,09 u chlapcov dojených do 12 mesiacov.

V porovnaní s normou boli v našom súbore hlavové rozmery menšie. Chlapci dosiahli vyššie hodnoty, signifikantné rozdiely sme pozorovali u detí dojených do 12 mesiacov.

Hodnoty Index cephalicus boli vyššie u dievčat vo všetkých skupinách mimo dievčat dojených do 12 mesiacov.

Diskusia a záver

De Onis (3) uvádza, že štandardné hodnoty WHO sú dobrou pomôckou pre lepší monitoring náhlych zmien rýchleho rastu dojčiat.

V porovnaní s deťmi z Bratislavy, ktoré sledovali Neščáková et al. (9) deti z nášho sledovaného súboru dosiahli nižšie hodnoty obvodu hlavy a najväčšej dĺžky hlavy., avšak hodnoty naväčšej šírky hlavy boli u nášho súboru väčšie. Štatisticky významné rozdiely sme pozorovali pri obvode hlavy u detí dojčených do 12 mesiacov a pri najväčšej dĺžke hlavy u nedojčených detí. Neščáková et al. (10) pozorovali väčší obvod hlavy u chlapcov vo všetkých vekových skupinách, v 3. v 6. a v 9. mesiaci boli rozdiely štatisticky významné. Dojčené dievčatá mali štatisticky významne väčší obvod hlavy v 3. mesiaci, v 9. a 12. mesiaci mali obvod hlavy menší.

Hrušková a Bláha (6) sledovali české deti dojčené do veku 12 mesiacov a zistili, že u novorodencov bol priemerný obvod hlavy: u chlapcov 35,00 cm a u dievčat 34,00 cm.

U trojmesačných detí bol obvod hlavy: u chlapcov 41,00 cm a u dievčat 40,00 cm.

Exkluzívne dojčenie minimálne do štyroch mesiacov ovplyvňuje zväčšovanie obvodu hlavy u detí zo sociálne slabších vrstiev (5). Toto zrýchlenie rastu hlavy súvisí s nižším výskytom oneskoreného psychomotorického vývoja (4), detskej mozgovej obrny (8) a demencie dospelých (9).

Postnatálny rast hlavy je signifikantne väčší u detí, ktorých matky dosiahli vyššiu úroveň vzdelania, alebo sú z vyšších socioekonomických vrstiev. (5).

Nebola zistená súvislosť medzi hodnotou IQ a rozmermi hlavy v 18 gestačnom týždni vývoja alebo po narodení, čo dokazuje, že rast mozgu počas dojčenského veku a počas včasného detstva je pre vývoj kognitívnych funkcií oveľa dôležitejší, ako rast mozgu počas fetálneho vývoja. (4).

Získané výsledky potvrdili hypotézu, že prirodzená výživa pozitívne vplyva na telesný rast a vývin detí. Telesný rast dojčených detí je proporcionálny a najviac sa približuje telesnému rastu zdravých detí.

Literatúra

1. **Baker J, Workman M, Bedrick E, et al.** Brains versus brawn: An empirical test of Barker's brain sparing model. *Am J Human Biol.*2010; 22:206–215.
2. **Bartholomeusz HH, Courchesne E, Karns CM.** Relationship between head circumference and brain volume in healthy normal toddlers, children and adults. *Neuropediatrics.*2002; 33: 239–241.
3. **De Onis M, Garza C, Onyango AW, Rolland-Cachera MF.** WHO growth standards for infants and young children Le Comité de nutrition de la Société française de pédiatrie.. *Arch. Pediatr.*2009, Jan, 16(1): 47 - 53
4. **Gale CR, O'Callaghan FJ, Godfrey KM, et al.** Critical periods of brain growth and cognitive function in children. *Brain.*2004;127:321–329.
5. **Haroldo da Silva Ferreira, Antonio Fernando Silva Xavier Júnior, Monica Lopes de Assunção, Ewerton Amorim dos Santos, Bernardo Lessa Horta.** Effect of Breastfeeding on Head Circumference of Children from Impoverished Communities. *Breastfeed Med.* 2013, Jun; 8(3): 294–301
6. **Hrušková M, Bláha P.** Základní hlavové rozměry českých dětí ve věku od narození do tří let. *Slovenská antropológia.* 10(1):69-74.
7. **Cheong JLY, Hunt RW, Andreson PJ, et al.** Head growth in pre-term infants: Correlation with magnetic resonance imaging and neurodevelopmental outcome. *Pediatrics.*2008; 121: e1534–e1540.

- 8. Ivanovic D, Del.P.Rodríguez, M. Pérez H, et al.** Twelve - year. follow-up study of the impact of nutritional status at the onset of elementary school on later educational situation of Chilean school-age children. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2008, 62: 18-31.
- 9. Martin R, Saller J.** Lehrbuch der Anthropologie in systematischer Darstellung. Stuttgart G. Fischer Verlag, 1957: p. 10
- 10. Neščáková E, Luptáková L, Kardošová H, Drobná H, Katina S, Varga I, Džupinková Z.** Telesný rast a vývin detí Bratislavského kraja do jedného roku života. *Slovenská antropológia*, 2005, 8(1):123-128.
- 11. Risnes KR, Nilsen TIL, Romundstad PR, et al.** Head size at birth and long-term mortality from coronary heart disease. *Int J Epidemiol.* 2009; 38:955–962.

ANATÓMIA TEMPOROMANDIBULÁRNEHO KÍBU V ORTODONTICKEJ AMBULANCII

(Temporomandibular joint anatomy in daily orthodontic practise)

Mirela Rozprávková¹, Janka Ohlasová², Květuše Lovásová³, Adriana Boleková³, Darina Kluchová³

¹Ortodontické odd.Klinika zubního lékařství UP v Olomouci, Palackého 12, 779 00 Olomouc

²Súkromná ambulancia Ohlasdent, Krivá 23, 04001 Košice

³Ústav anatómie LF UPJŠ v Košiciach, Šrobárova 2, 04001 Košice

Súhrn

Temporomandibulárny kĺb je najdôležitejší kĺb pre zubného lekára. Každý lekár zaoberajúci sa ortodonciou využíva anatómiu v diagnostike, terapii a zavádzaní miniimplantátov. Zamerali sme sa na kvalitu orálneho zdravia u starších pacientov a mapovanie anatomických a fyziologických zmien orofaciálneho skeletu v prirodzenom procese starnutia. Štúdia pojednáva o základných topograficko-anatomických vedomostiach nevyhnutných v ortopedickej stomatológii. Patologické anatomické pomery nasomaxilárneho komplexu často spojené s ortodontickou anomáliou a obštrukčným spánkovým apnoe znižujú kvalitu života. Poukážeme na vplyv chronického stresu na orálne zdravie pacientov.

Kľúčové slová

Starnutie, temporomandibulárny kĺb, *canalis mandibulae*, ortodoncia, kefalogram, spánkové apnoe

Summary

Temporomandibular joint is the most important joint for a dentist. Each orthodontist uses anatomy in diagnosis, therapy and application of mini-implants. We focused on the quality of oral health of older patients and mapping of physiological changes of orofacial skeleton in the aging process. The study discusses the basic anatomic knowledge necessary in orthopaedic dentistry. Pathological anatomic conditions of nasomaxillary complex often associated with orthodontic anomalies and obstructive sleep apnea reduce quality of life. We show effect of chronic stress on oral health of patients.

Keywords

Aging, temporomandibular joint, mandibular canal, orthodontics, cephalometrics, obstructive sleep apnea

Úvod

Articulatio temporomandibularis (ATM, TMK) patrí medzi najzložitejšie a najvyťaženejšie kĺby ľudského tela. Preto aj výskyt ochorení tohto malého kĺbu je dosť častý. Podľa niektorých štúdií trpí poruchou funkcie kĺbu až 40%-75% populácie (Buescher, J., 2007; Machoň a kol., 2008). Zložitosť kĺbu spočíva aj v jeho stavbe. Kĺb je tvorený kĺbovou jamou (*fossa mandibularis*) spánkovej kosti a kĺbovým výbežkom sánky (*processus condylaris*), ktorý do nej zapadá pomocou hlavice sánky (*caput mandibulae*) tvaru elipsoidu. Kĺbová jama

a hlavica sú pokryté väzivovou chrupkou, čo umožňuje adaptáciu kĺbu na nové oklúzne pomery. ATM kryje *capsula articularis*, ktorú priamo spevňujú *ligamentum mediale et laterale*, (Dauber, 2007). Inkongruencie kĺbových plôch vyrovnáva kĺbový disk (*discus articularis*), ktorý má oválny a bikonkávny tvar s centrálnou stenčenou intermediálnou zónou a rozdeľuje kĺb na dve samostatné dutiny: hornú diskotemporálnu a dolnú diskomandibulárnu. CT and MRI výskumy poukazujú na veľké množstvo fyziologických variácií morfológie a topografie disku. Z topografického hľadiska leží kĺb v *regio parotideomasseterica*. Laterálne od kĺbu prebieha *a. temporalis superficialis* a asi 1,5 cm kaudálne od *caput mandibulae a. maxillaris*. Obe uvedené koncové vetvy *a. carotis externa* zabezpečujú krvné zásobenie kĺbových štruktúr vytvárajúc cievnu sieť okolo puzdra kĺbu. V blízkosti kĺbu prebieha mediokaudálne *n. auriculotemporalis*; vetva *n. mandibularis* zabezpečujúca inerváciu kĺbu (Asaki a kol., 2006; Khan a kol., 2008) a laterálne *plexus parotideus*. Dorzálne uložený venózný *plexus pterygoideus* tvorí s tukovým tkanivom Zenkerov retroartikulárny vankúš (Selma a kol., 2004). Ventrálna sa do *discus articularis* upína časť *m. pterygoideus lateralis*. Na ľudskej lebke v 7., 8. a 9. decéniu dochádza k zníženiu hrúbky kosti najmä v mechanicky menej namáhaných oblastiach. Alveolárny výbežok a časť bezzubej čeľuste a sánky podliehajú regresii. Dochádza k remodelácii TMK. V niektorých prípadoch vzniká defekt artikulárneho disku. Atrofia sánky je najvýraznejšia v strednej tretine *corpus mandibulae*. *Foramen mentale* sa relokuje do blízkosti alveolárneho hrebeňa (Schumacher, 1984).

Práca nadväzuje na doteraz odprezentované štúdie topografie orofaciálnej oblasti, ktorej sa intenzívne venujeme niekoľko posledných rokov. Cieľom našej štúdie bolo autenticky zobraziť anatomicke pomery TMK a štruktúr v jeho okolí v závislosti od veku a stavu chrupu, a zároveň poukázať na aplikáciu znalostí v ortodontickej ambulancii.

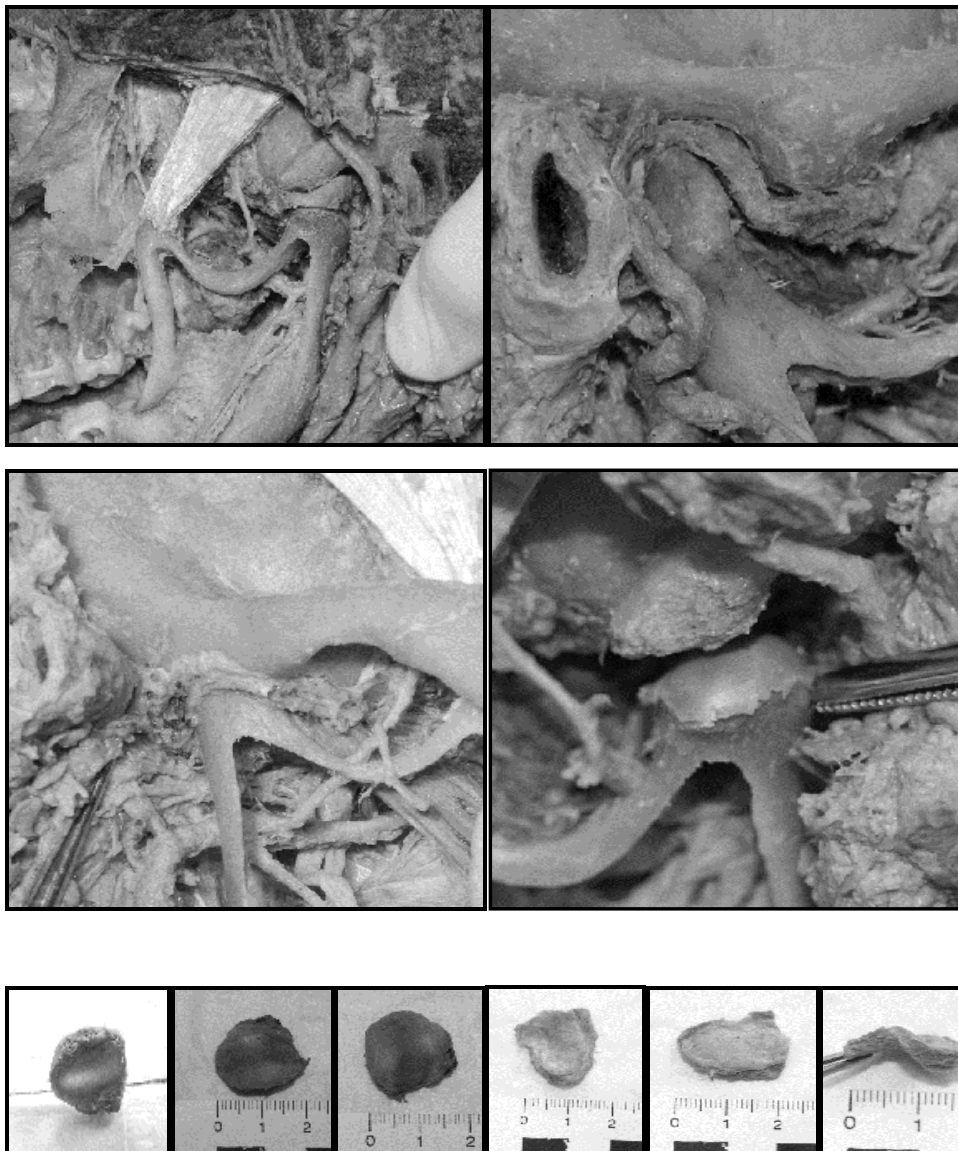
Materiál a metódy

V štúdiu bolo použitých 8 preparátov hláv oboch pohlaví, rôzneho veku (3.-8. decénium) a stavu chrupu. Preparát č. 1 v 3. decéniu charakterizovala prítomnosť zachovalého chrupu v celom rozsahu. Čiastočne ozubené preparáty č. 2 a 3 v 5. decéniu obsahovali samostatne stojace zuby (č. 2 – frontálny úsek a č. 3 – distálny úsek). Bezzubý sagitálny rez č. 4 (6. decénium), ktorý nevykazoval známky resorpcie a preparáty č. 5 a 6 (6. decénium), č. 7 (7. decénium) a č. 8 (8. decénium) –vysoký stupeň resorpcie alveolárneho výbežku bezzubej čeľuste a sánky. Na preparáciu boli použité štandardné preparačné nástroje. Morfometrické parametre sa hodnotili meradlom na meranie hrúbky koruniek, digitálnym posuvným a papierovým meradlom. Tvrdé tkanivá sa zbrusovali vrtáčikmi kužeľovitého a guľčkového tvaru ručnej vŕtačky. Postupnosť práce bola rovnaká pri všetkých preparátoch; zahŕňala odpreparovanie mäkkých tkanív v *regio parotideomasseterica*, odklopenie *glandula parotis* a *plexus parotideus* až po *m. masseter*, ktorého odstránením bola obnažená predná stena sánky. Sprístupnená bola *fossa temporalis* (s ponechaním časti *m. temporalis*) a zbrúsená predná a zadná kompaktná stena sánky (so zachovaním kosteného lemu *ramus mandibulae* z dôvodu autentickej topograficko-anatomickej pomerov). Vo *fossa infratemporalis* boli sprístupnené svaly, nervové a cievne štruktúry. Morfometrické hodnoty, ako aj vzťahy nervovocievnych štruktúr ku TMK vo *fossa infratemporalis* boli zaznamenané do tabuliek. Postupnosť preparácie sme zachytili fotoaparátom Olympus E-420 a Nikon D-80 v supermakro režime a ďalej spracovali počítačovou technikou.

Výsledky

V predkladanej štúdiu sme zaznamenali morfometrické parametre TMK a vyhotovili unikátnu fotodokumentáciu (obr.1). Kraniálnu kĺbovú plochu tvorí *fossa mandibularis*, jej hĺbka je od 2 - 4mm. Naše nálezy potvrdzujú variabilitu *discus articularis* nezávislú od veku preparátu. Veľkosť disku sa pohybuje v rozsahu 21 - 22mm x 15 - 18mm. Hrúbka je po obvode 3 - 4mm

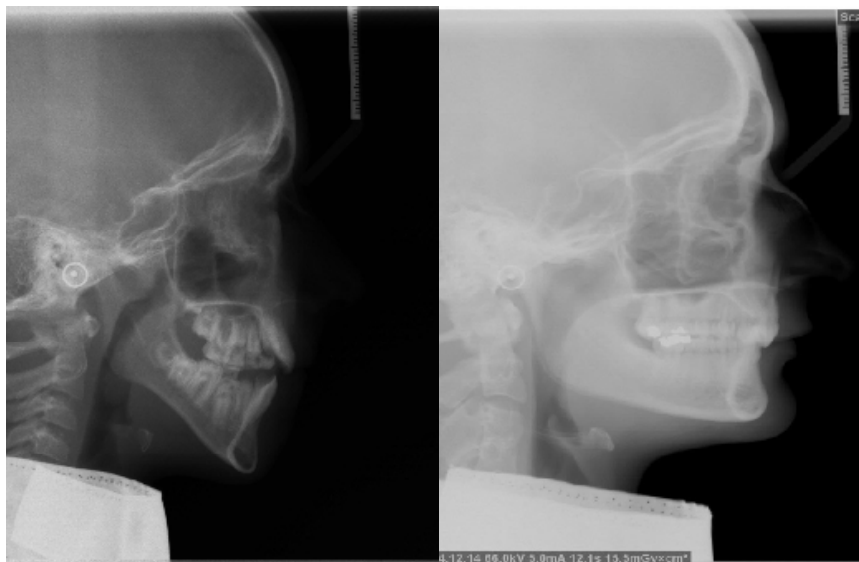
a v strede 1 - 2mm. V tejto fáze nášho výskumu môžeme potvrdiť psychofyzologický koncept bolestivého syndrómu TMK s primárnym vplyvom stresu. V liečbe sme použili náhryzovú dlahu s dočasným zvýšením zhryzu o 1-8mm podľa stupňa klinických ťažkostí pomocou tvrdej akrylovej náhryzovej dlahy. Pacienti nosili túto ortopedickú pomôcku každú noc 7-8 mesiacov doplnenú termoterapiou. Výsledky liečby sme monitorovali každé 4 týždne.



Obr. 1. Vizualizácia anatómie temporomandibulárneho kĺbu a artikulárneho disku

Lokalizácia a priebeh *a. maxillaris* a *n. auriculotemporalis* môže byť individuálna. *A. maxillaris* môže byť lokalizovaná mediálne od *m. pterygoideus lateralis* (MPL), ale aj laterálne, smeruje do *fossa infratemporalis* takmer kolmo na sagitálnu rovinu. V našom výskume vo všetkých prípadoch prebieha *a. maxillaris* laterálne od *n. lingualis* a *chorda*

tympani. Vzďalenosť odstopu artérie z hlavného kmeňa *a. carotis externa* k vrcholu *caput mandibulae* je v rozsahu od 14 -21mm. *N. auriculotemporalis* prebieha mediokaudálne od *ATM* cca 8 mm, poza *collum mandibulae* približne rovnako u všetkých preparátov.



Obr. 2. Kefalometrický snímok – diagnostika v ortodoncii – pravdepodobný rastový trend sánky

N. alveolaris inferior vytvára slučku okolo *a. maxillaris*. Počas fyziologického procesu starnutia dochádza k atrofii alveolárnej kosti vo vertikálnom smere. Vzďalenosť alveolárneho hrebeňa od horného okraja *CM* sme zaznamenali v rovine prechádzajúcej predpokladanou lokalizáciou M1. Zmena tejto vzďalenessi nastáva v prirodzenom procese starnutia. Zaznamenané parametre mandibulárneho kanála zodpovedajú hodnotám uvedeným v literatúre. *CM* bol tvorený kompaktnou kosťou u všetkých našich preparátov.



Obr. 3. Vzťah externej morfológie sánky k priebehu manbibulárneho kanála (Upravené podľa: Pálsson a Kjaer, 2009)

Lokalizáciu *CM* sme pozorovali vo vertikálnej a v horizontálnej rovine. V majorite prípadov bol kanál lokalizovaný lingválne a inferiórne. Kanál prebieha v *ramus mandibulae* šikmo ventrokaudálne, kým v *corpus mandibulae* smeruje horizontálne, stáča sa smerom k *foramen mentale*. Nervovocievny zväzok sa v oblasti M2 rozdeľuje. Jedna časť vystupuje z *foramen mentale* posterokraniálne, kým druhá časť pokračuje v kostenej lamele pod pravým uhlom

smerom nadol ku koreňom rezákov. Góniový uhol s priemernou hodnotou 123° zviaza zadný okraj *ramus mandibulae* a spodný okraj *corpus mandibulae*. Mandibulárny uhol s priemernou hodnotou 143° bol meraný v mieste priesečníka dotýčnice k vertikálnemu a horizontálnemu priebehu CM. Mentálny uhol s priemernou hodnotou 39° sme zaznamenali v priesečníku dotýčnice k horizontálnemu priebehu kanála a dotýčnice jeho kraniálneho priebehu pred vstupom do *foramen mentale* (obr. 3).

V našej štúdii sme použili kefalogramy na demonštráciu prítomnosti kraniofaciálnych abnormalít (retropozícia sánky, plytké zadné dýchacie cesty, zväčšené mäkké podnebie, retropozícia čeľuste) u pacientov s poruchami spánku. Kefalogramy sme využili aj na demonštráciu individuálneho rastového trendu sánky. K analýze a biologickej interpretácii snímky je nevyhnutná výborná znalosť anatómie orofaciálnej oblasti (obr. 2).

Diskusia

Naše nálezy potvrdzujú variabilitu *discus articularis*. Klepáček a Mazánek (2001) uvádzajú, že po 5. dekáde dochádza k perforácii disku v jeho stenčenej centrálnej časti. Toto konštatovanie len čiastočne korešponduje s našimi nálezmi, nakoľko na preparátoch 3. a 7. decénia disk predstavovala pomerne hrubá bikonkávna platnička, kým na hlave 5. decénia bol disk tvorený iba tenkou väzivovou, perforovanou vrstvou. Kĺb podlieha degeneratívnym a proliferatívnym zmenám v prirodzenom procese starnutia (Tvrdoň a kol., 2006). Mikrotraumatizácia kĺbu v dôsledku zmien zhryzových pomerov spôsobuje patologické zmeny chrupky kĺbu a môže viesť k tvorbe osteoartrotických zmien. *A. maxillaris* je lokalizovaná vo väčšine prípadov (55,4%) laterálne od *m. pterygoideus lateralis* (Pretterklieber a kol., 1991), čo nezodpovedá našim nálezom, nakoľko v 75% artéria prebieha mediálne od *m. pterygoideus lateralis*. Zaujímavosťou je odlišnosť priebehu artérie u preparátov, ktoré tvoria jeden celok. *A. maxillaris* prebieha ľavostranne laterálne a pravostranne mediálne. Variácie jej povrchového aj hlbkového priebehu opisujú aj Harn a Durham (2003). Priemerná vzdialenosť vrcholu hlavy mandibuly od miesta odstupe *a. maxillaris* z kmeňa *a. carotis externa* je 22,4 mm (Orbay a kol., 2007). Podľa našich meraní sa táto vzdialenosť pohybuje v rozsahu 14 - 21mm. Priemerná vzdialenosť kanála od spodného okraja sánky je 6.54 mm (10.52), priemer kanála je 2.69 mm (2.52), *n. alveolaris inferior* 1.53 mm (1.84), *a. alveolaris inferior* 0.57 mm (0.42), *v. alveolaris inferior* 0.43 mm (0.52), (Kilic et al., 2010). V bezzubej sánke sú steny mandibulárneho kanála tvorené spogióznou kosťou, čo zvyšuje riziko poškodenia nervovocievneho zväzku počas chirurgického zákroku (Polland, 2001). Góniový uhol podľa našich nálezov zodpovedá poznatkom uvedeným v literatúre (Andrik et al., 1981). Zmeny externej morfológie sánky v závislosti od individuálnych okluzálnych pomerov korešpondujú s rôznou lokalizáciou CM (Jung - Nah - Cho, 2007; Pálsson and Kjær, 2009). Dysfunkciou TMK trpí 40-75% populácie (Buescher, J., 2007; Machoň a kol., 2008). Anatomické predispozície, napr. patologická anatómia horných dýchacích ciest sú kompenzované nervovou aktivitou, ktorá je vo fáze spánku znížená. Ortodontický pozicionátor sánky zabezpečuje zmenu pozície sánky počas spánku, čím dochádza k rozšíreniu nestabilných horných dýchacích ciest, ktoré sa počas spánku zužujú (obštruktívne chrápanie) alebo až kolabujú (spánkové apnoe), (Tomori a kol., 1999; Proffit et al., 2013). Kefalometrický snímok a jeho analýza je základnou súčasťou ortodontického vyšetrenia a predpokladom stanovenia legitímneho liečebného plánu. K správnej biologickej interpretácii snímku je nevyhnutná znalosť anatómie orofaciálnej oblasti, čomu môže pomôcť naša jedinečná fotodokumentácia. Dôležité je stanovenie pravdepodobného rastového trendu sánky (Kamínek, 2014).

Záver

Definovali sme anatomické vedomosti o TMK potrebné pre úspešnú prax zubára so zameraním na ortopedickú stomatológiu. Upozornili sme na nevyhnutnosť analýzy kefalometrickej snímky pred prípravou liečebného plánu pred liečbou fixným ortodontickým aparátom. V majoritnej skupine našich pacientov bolestivý syndróm TMK vyvoláva stres zvyšujúci neuromuskulárnu aktivitu svalov orofaciálnej oblasti. TMK podlieha degeneratívnym a proliferatívnym zmenám v procese starnutia, ale má významnú schopnosť adaptácie a regenerácie v dôsledku prítomnosti väzivovej chrupky. Obštruktívne spánkové apnoe môže byť považované za anatomický problém. V prirodzenom procese starnutia dochádza k postupnej strate zubov, čím dochádza k úbytku alveolárnej kosti vo vertikálnom smere. Vizualizácia *canalis mandibulae* v rôznych vekových skupinách pomáha zvýšiť bezpečnosť počas zubného ošetrovania.

Literatúra

1. **Andřík, P. a kol., 1981:** Čeľustná ortopédia. Učebnica pre lekárske fakulty. Osveta Martin. 223 s.
2. **Asaki, S., Sekikawa, M., Kim, Y.T., 2006:** Sensory innervation of temporomandibular joint disk. *J. Orth. Surg.*, 14 (1), s. 3-8.
3. **Buescher, J., 2007:** *Temporomandibular Joint Disorders*. *Am. Family Phys.*, 76, 10, s. 1480. A
4. **Bogdán, S. a kol.** Atypical courses of the mandibular canal: comparative examination of dry mandibles and X-rays. In *J Craniofac Surg.* 2006, vol. 17, no. 3, p. 487-4.
5. **Dauber, W., 2007:** *Feneisuv obrazový slovník anatomie*. Grada Publ., Praha, s. 536.
6. **Gonzales, M., March, P., 2005:** Skull base tumors: A comprehensive review of transfacial swing osteotomy approaches. *Plast. Reconstr. Surg.*, 115 (3), s. 711-720.
7. **Harn, S., Durham, T., 2003:** Anatomical variations and clinical implications of the artery to the lingual nerve. *Clin. Anat.*, 16, (4), s. 294-299.
8. **Isolan, G.R., Rowe, R., Al-Mefty, O., 2007:** Microanatomy and surgical approaches to the infratemporal fossa: an anaglyphic three-dimensional stereoscopic printing study. *Skull Base*, 17 (5), s. 285-02.
9. **Jung, Y.-H. – Nah, K.-S. – Cho, B.-H.** The location of the mandibular canal in prognathic patients compared to subjects with normal occlusion. In *Korean J Oral Maxillofac Radiol.* 2007, vol. 37, p. 217-220.
10. **Kamínek et al., 2014,** Ortodoncie, Galén spol s.r.o, str. 20-35.
11. **Khan, A.N., Hague, S.U., MacDonald, S., Saeed, S, Bibi, N., Ribeiro, N.F.F., 2008:** Temporomandibular joint, meniscus abnormalities. *E medicine, Radiology, Head and Neck* s.12.
12. **Kilic, C. a kol.** The position of the mandibular canal and histologic feature of the inferior alveolar nerve. In *Clin Anat.* 2010, vol. 23, no. 1, p. 34-42.
13. **Köpf-Mayer, P., 2000:** *Atlas of Human Anatomy* (Wolf-Heidegger's Atlas 2. Head and Neck, Thorax, Abdomen, Pelvis, CNS, Eye, Ear), (5-th ed.), Karger, Berlin, s. 40-41, 86.
14. **Klepáček, I., Mazánek, J., 2001:** Klinická anatomie ve stomatologii. Avicenum, Grada Publ., Praha, s. 90-91.
15. **Kwak, H.H., Park, H.D., Yoon, H.R.Y., Kang, M.K., Koh, K.S., Kim, H.J.K., 2004:** Topography anatomy of the inferior wall of the maxillary sinus in Koreans. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 33, 382-388.
16. **Machoň, V. a kol., 2008:** *Léčba onemocnění čelistního kloubu*. Grada Publ., Praha, s. 88.
17. **Orbay, H., Kerem, M., Unlü, E., Comert, A., 2007:** Maxillary artery: anatomical landmarks and relationship with the mandibular subcondyle. *Plast. Reconstr. Surg.*, 120 (7), s. 1865-1870.

18. Pálsson, S. R.. – Kjaer, I. Morphology of the mandibular canal and the angulation between the mandibular and mental canals in dry skulls. In *Eur J Orthod.* 2009, vol. 31, no. 1, p. 59-63.
19. Polland, K. E. The mandibular canal of the edentulous jaw. In *Clin Anat.* 2001, vol. 14, no. 6, p. 445-452.
20. Pretterklieber, M.L., Skopakoff, C., Mayr, R., 1991: Tuhe human artery reinvestigated: Topographical relations in the infratemporal fossa. *Acta Anat.*, 142 (4), s. 281-287. 16.
21. Proffit, W. R., 2013: Contemporary Orthodontics, fifth edition, Elsevier..s141.
22. Selma, S., Mathias, V., de Sousa, L., Semprini, M., Regalo, S., 2004: Bilaminar zone: anatomical aspects, irrigation, and innervation. *Brazil J. Morphol. Sci*, 2004 ; 21(4), s. 217-220.
23. Schumacher, G.-H., 1984: *Anatómia pre stomatológov*, Vydavateľstvo Osveta, s.158-159.
24. 18. Tomori, Z. a kol., 1999: *Základy spánkovej medicíny*, Vojenská letecká akadémia ge.M.R.Štefánika v Košiciach, str.333-338.
25. Tvrdoň, M. a kol., 2006: *Protetická stomatológia, liečba a prevencia*. Science, Bratislava, s. 421-435.
26. Yoon, H.R., Han, S.H., Park, C.S., Kim, K.D., Kang, M.K., Hu, K.S., et al., 2001: Morphometries of the maxillary sinus in Koreans. *Korean J. Phys. Antropol.*, 14, 127-135.

VPLYV FYZICKÉHO ZATÁŽENIA NA TELESNÉ ZLOŽENIE HRÁČOV ĽADOVÉHO HOKEJA

(Impact of physical activity on body composition of ice-hockey players)

Roman Váhovský¹, Petra Lukáčiková², Edward Radzo¹

¹ED-Corporation s.r.o., Račianska 62, 831 02 Bratislava, publication@ed-corporation.com

²Anatomický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava

Súhrn

Zmeny v zložení ľudského organizmu sú používané ako ukazovatele, ktorými hodnotíme adaptáciu športovca na rôzne fyzické zaťaženie, prípadne zmenu zaťaženia, pri relatívne konštantných výživových a psycho-sociálnych faktoroch. Súbor probandov sme vybrali z tímu ľadového hokeja HK Ružinov 99 Bratislava. Všetkých probandov sme podrobili antropometrickému vyšetreniu v rovnakom období. Výsledky našej štúdie ukazujú potrebu zmien vo fyzickom zaťažení športovcov, ktoré by malo byť cielenejšie pre daný ročník narodenia v kontexte našich odporúčaní.

Kľúčové slová

Aktívna telesná hmota, antropometrické vyšetrenie, ľadový hokej, aeróbna záťaž, anaeróbna záťaž

Summary

Changes of human body composition are used as indicators that evaluate the athlete's adaptation to various physical load or the load-changes at a relatively constant nutrition and psycho-social factors. We chose a set of probands of ice hockey team HK Ružinov 99 Bratislava. All probands underwent anthropometric examination in the same season. The results of our study indicate the necessity to change the physical load of athletes' training and it should be more targeted to age group in the context of our recommendations.

Key words

lean body mass, anthropometric examination, ice hockey, aerobic endurance, anaerobic endurance

Úvod

Profesionálny šport sa vyznačuje stúpajúcou požiadavkou na vysoký výkon športovcov a platí to aj pri kolektívnych športoch, ku ktorým zaraďujeme ľadový hokej. Zmeny v zložení ľudského organizmu sú používané ako ukazovatele, ktorými hodnotíme adaptáciu športovca na rôzne fyzické zaťaženie, prípadne zmenu zaťaženia, pri relatívne konštantných výživových a psycho-sociálnych faktoroch. Nárast aktívnej telesnej hmoty je spojený s nárastom fyzickej výkonnosti, sily, akcelerácie a so zvýšeným metabolizmom a energetickým výdajom. Nárast tukovej zložky ľudského organizmu vedie ku opačným prejavom (1). Počas fyzickej záťaže organizmu je zásobovanie krvou pre bunky, ktoré majú väčší energetický výdaj (teda najmä

svalové bunky), omnoho intenzívnejšie (srdce prečerpá až 30 litrov krvi za minútu počas maximálnej záťaže). Počas záťaže stúpa zásobovanie svalov z 20% až na 80%. Profesionálni hráči ľadového hokeja sa vyznačujú zvýšeným objemom ventriculus sinister, zväčšenou hrúbkou steny komory a zníženou pokojovou pulzovou frekvenciou (2). Svalové tkanivo je veľmi citlivé na dodávku kyslíka. Vo všeobecnosti je sval krvou bohato zásobený. Prietok krvi sa mení v závislosti od aktivity svalu. Pri maximálnej záťaži sa priesvit ciev zväčšuje až deväť-násobne. Trénovaný sval je lepšie prekrvovaný a celkovo odolnejší (3).

Svalové vlákna možno rozdeliť na pomalé vlákna (typ I) a rýchle vlákna (typ IIa a IIb). Pomalé vlákna sú efektívnejšie vo využívaní kyslíka pre rovnomernú svalovú kontrakciu počas dlhšieho časového úseku. Rýchle vlákna využívajú anaeróbný metabolizmus a sú vhodné na generovanie vysokého výkonu v pomerne krátkom čase. V priemere je pomer spomínaných vlákien v tele 1:1. Hokejisti majú v celkovom zastúpení svalových vlákien prevahu rýchlych vlákien (4). Medzi najviac namáhané svaly hráčov ľadového hokeja patria: m. pectoralis, m. biceps brachii, flexory zápästia a prstov ruky, mm. profundus thoracis, m. rectus abdominis, m. rectus femoris / m. quadriceps femoris, m. sartorius, adduktory stehna, extenzory predkolenia a prstov nohy. Ďalej sú to m. triceps brachii, extenzory predlaktia a prstov na rukách, m. deltoideus, m. trapezius, m. latissimus dorsi, gluteálne svalstvo, m. gastrocnemius, flexory stupaje (2).

Ľadový hokej patrí k športom s vysokou intenzitou, ktorá nie je kontinuálna počas hry, avšak je potrebná vysoká fyzická pripravenosť hráčov pre zvládnutie takejto záťaže (5). V našej štúdii sme hodnotili vplyv fyzického zaťaženia na zmenu telesných parametrov hráčov ľadového hokeja vo zvolených ročníkoch narodenia (1995, 1996, 1997, 2000, 2001, 2002), ktoré môžu byť prínosom pri úprave tréningových jednotiek.

Metodológia a súbor probandov

Súbor probandov sme vybrali z tímu ľadového hokeja HK Ružinov 99 Bratislava. Pracovali sme s vekovou skupinou hráčov Mladší žiaci. Túto kategóriu tvoria hráči vo veku od 10 do 12 rokov (ročník narodenia 2000 - 2002). Ďalšou vekovou skupinou boli hráči Dorastu. Túto kategóriu tvoria hráči vo veku od 15 do 18 rokov (ročník narodenia 1995 - 1997). Kategórie sú určené Slovenským zväzom ľadového hokeja. Celkovo bolo v súbore meraných 60 probandov. Probandov sme rozdelili do 6 skupín po 10 hráčov podľa ročníka narodenia. Všetci probandi boli dlhodobo zaťažovaní intenzívnym tréningovým procesom. Týždenný tréningový mikrociklus pozostával zo 4 tréningov na ľade a jedného alebo dvoch tréningových cyklov mimo ľadu a minimálne jedného súťažného zápasu.

Probandov sme podrobili antropometrickému vyšetreniu. Pri antropometrických meraniach boli hodnotené viaceré parametre. Hmotnosť sme merali pomocou mechanickej váhy značky Transporta N.P. Chruším s presnosťou na desatinu kilogramu. Telesnú výšku sme merali pomocou antropometra GPM - Swiss Made s presnosťou na 1 mm. Vyšetrovaný stál s chodidlami pri sebe a pozeral priamo pred seba. Boli merané miery šírkové (rozmer ramien, vzdialenosť medzi crista iliaca dx. et sin., tranzverzálny obvod hrudníka, sagitálny obvod hrudníka, šírka laktia, šírka členka), obvodové (obvod hrudníka, obvod ramena, predlaktia, zápästia, gluteálny obvod stehna, lýtka, členka). Hrúbka kožných rias (tvár, podbradok, hrudník I, hrudník II, triceps, chrbát, brucho, bok, stehno I, lýtko I) bola meraná pomocou kalipera typu Somet – štandardný tlak 10g/mm s presnosťou na jednu desatinu milimetra). Somatotypy boli určované podľa metodiky Heath - Carter. Na vyhodnotenie údajov sme použili program MS Excel.

SOMATOMETRIA		
Vstupné data		
>> Osobné údaje <<		
1	Meno	Peter
2	Priezvisko	Jurčík
3	Datum narodenia	30.1.1999
4	Datum merania	5.12.2013
5	Šport	Futbal
>> Telesné miery <<		
1	Telesná výška	165,4
2	Tel.hmotnosť	56,40
>> TUKY <<		
3	Rameno	7,0
4	Chrbát	5,4
5	Lýtka1	4,0
6	Bok	3,4
>> OBVODY <<		
7	Rameno (max)	26,0
8	Lýtka	35,0
9	Bi-ep.humer	5,8
10	Bi-ep.femur	9,0
11	Pás	83,0
12	Boky	91,0

ED-Corporation

Obr. 1 vstupné údaje pri počítaní somatotypu

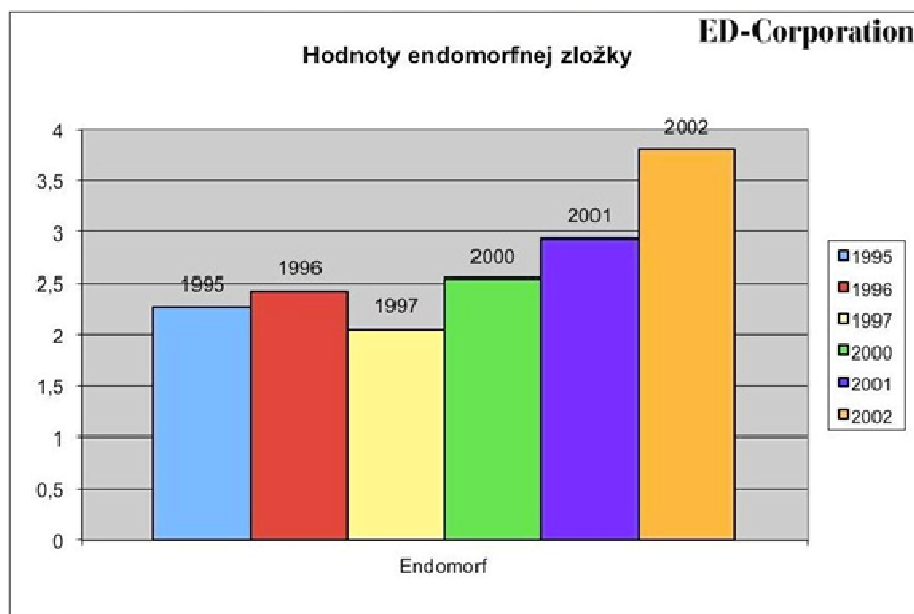
SOMATOMETRIA						
					D.vek	14,85
Meno:		Peter	Priezvisko:		Jurčík	
Telesná výška:		165,4	cm	Tel.hmotnosť:		56,4 kg
Somatické znaky		Index		Tuky		
Endo	0,000	BMI	20,62	% tuku	7,85	
Mezo	-17,167	Rohrer.	1,246	% ATH	0,00	
Ekto	-28,580	Ponder.	43,13	ATH(kg)	56,40	
Sx	-28,58	Q - B	3,410	WHR	0,912	
Sy	-5,75	Pov.tela	1,618			
Somatotypy						
(-)						
		Endo	Mezo	Ekto		
■ somat		1,543320449	3,545	2,990980613		

ED-Corporation

Obr. 2 výstupné údaje pri počítaní somatotypu

Výsledky

Probandov sme podrobili komplexnému somatotypologickému vyšetreniu, z ktorého sme získali hodnoty endomorfnej, mezomorfnej a ektomorfnej zložky somatotypu a následne sme tieto hodnoty porovnávali vzhľadom na ročník narodenia (1995, 1996, 1997, 2000, 2001, 2002). Endomorfná zložka vyjadruje zastúpenie tukovej zložky. Najvyššia hodnota tukovej zložky je u probandov narodených v roku 2002. U hráčov narodených 1995 - 1997 má tuková zložka výrazne menší podiel na celkovej stavbe tela, aj napriek podobnému tréningovému zaťaženiu. Najvýraznejšia endomorfná zložka je u hráčov v pred-adolescentnom veku - 2000 - 2002. Ročníky 2000, 2001 a 2002 majú teda výraznejšie zastúpenie tukovej zložky.



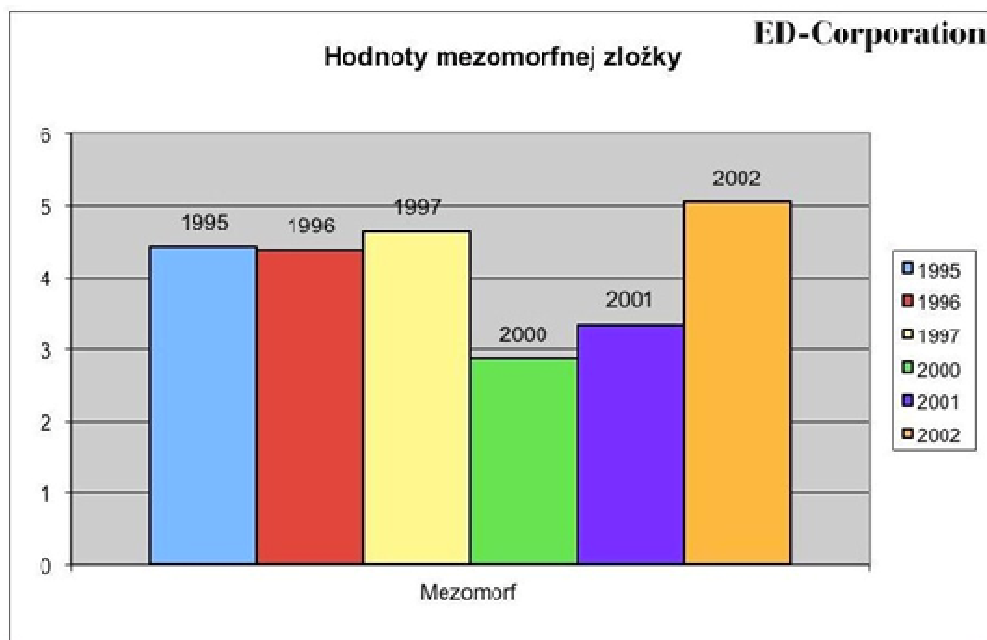
Graf 1 Hodnoty endomorfnej zložky

Hodnota mezomorfnej zložky vyjadruje stupeň muskularity každého probanda. Hráči ročníka narodenia 1995, 1996 a 1997 dosahujú hodnotu okolo 4,5. Je to viac ako mladší probandi u ktorých je vyššia diskrepancia hodnôt.

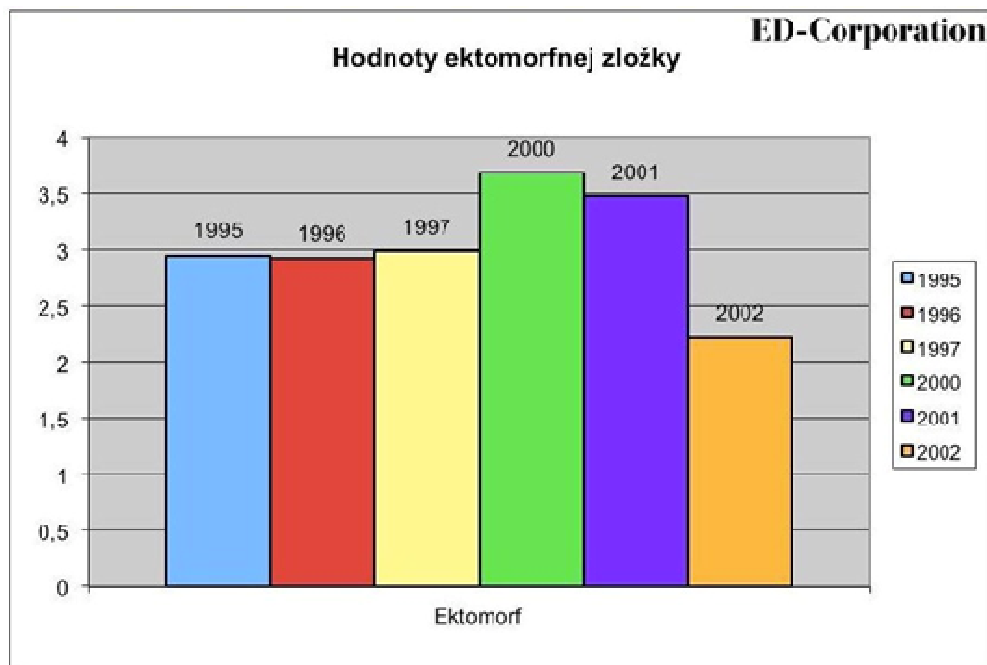
Hodnota ektomorfnej zložky vyjadruje stupeň pozdĺžneho rozloženia telesnej masy. Zaujímavosťou je, že graf indexu štíhlosti má protikladný vzhľad ako graf svalovej zložky. Hráči narodení v roku 2002 majú najväčšiu diskrepanciu medzi indexom štíhlosti a tukovou zložkou. Tuková zložka je u nich najvyššia a index štíhlosti najnižší. Dá sa ale predpokladať, že kým mladšie ročníky - 2000 - 2002 - majú výraznejšiu tukovú zložku, tak pri rovnakom zaťažení a pravidelnom cvičení môžu v adolescentnom veku dosiahnuť hodnoty starších - 1995 - 1997. Z toho vyplýva, že aj napriek rovnakému zaťaženiu a frekvencii tréningov vplyvajú na celkový somatotyp aj ďalšie faktory, ako sú enviromentálne a endokrinné faktory.

Celkové hodnotenie somatotypu je znázornené na grafe č. 4. U hráčov ročníka narodenia 1995 - 1997 vidíme výrazne dominujúcu mezomorfnú, teda muskulárnu zložku somatotypu. Druhú najvyššiu hodnotu u týchto ročníkov dosahuje ektomorfná zložka, teda zložka linearitu. Najnižšiu hodnotu dosahuje zložka tuková. Situácia sa mení pri prechode do ročníka narodenia 2000, kedy začína dominovať zložka linearitu (ektomorfná zložka), svalová zložka

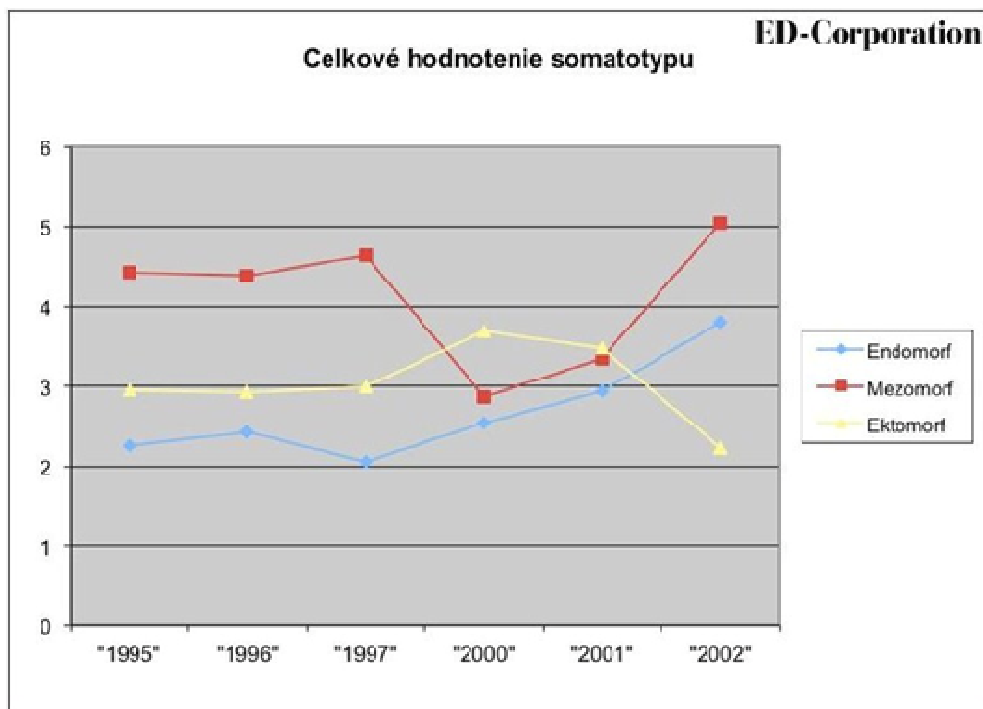
výrazne klesá. Pri ročníku narodenia 2001 sa vyrovnáva muskulárna zložka a zložka linearity. Pri najmladších probandoch - ročník narodenia 2002 - dochádza k opätovnému vzostupu svalovej zložky, ktorá sa stáva dominantnou.



Graf 2 Hodnoty mezomorfnej zložky



Graf č. 3 - Hodnoty ektomorfnej zložky



Graf č. 4 - Celkové hodnotenie somatotypu a zobrazenie všetkých zložiek somatotypu

Diskusia

Pri správnom populačnom výbere dochádza so stúpajúcim vekom detských športovcov a s príslušnými morfológickými zmenami k nárastu ich fyzickej výkonnosti (6). Výsledkami našej štúdie sme poukázali na morfológické nedostatky pri vybraných ročníkoch narodenia hráčov ľadového hokeja. Zároveň, nižšie uvedené odporúčania môžu pomôcť odstrániť jednotlivé diskrepancie, a tým aj zlepšiť výkonnosť týchto hráčov.

Zvýšenie anaeróbnej záťaže vo vybraných ročníkoch

Hráči narodení v roku 2000 a 2001 mali najnižšiu svalovú zložku spomedzi všetkých meraných skupín probandov. Tréneri by sa preto mali zamerať na zvýšenie svalovej ich zložky, z tréningového pohľadu ide o anaeróbnú záťaž. Štúdie ukázali aj iné významné benefity pri zvyšovaní anaeróbnej zložky záťaže. Významné bolo zníženie LDL frakcie lipoproteínov, zníženie celkového cholesterolu, zníženie hodnoty triacylglycerolov (TAG) a zvýšenie HDL frakcie lipoproteínov. Jedným z možných riešení by mohol byť tzv. High-intensity interval training (HIIT). Naimo a kol. (7) porovnávali efekt HIIT tréningu s tradičným tréningom vytrvalosti. 24 hráčov ľadového hokeja bolo náhodne pridelených k jednej z metód počas 4-týždňového tréningového cyklu. Kompozícia tela, hrúbka svalov a anaeróbná sila boli vždy merané pred tréningom a po tréningu. Výsledky ukázali, že je možné využiť HIIT na zvýšenie svalovej hrúbky, sily a výkonu na ľade.

Zvýšenie aeróbnej záťaže vo vybraných ročníkoch

Vo vekovej skupine hráčov narodených v roku 2002 bola výrazne zvýšená tuková zložka. Tuková zložka je výrazne vyššia, ako u ostatných meraných ročníkov narodenia. Z toho dôvodu by sa tréneri mali zamerať na zvýšenie aeróbnej aktivity u týchto hráčov. Rovnako boli zaznamenané ďalšie výrazné benefity. Významné zlepšenie metabolizmu v oblasti lipidového spektra – zníženie LDL frakcie, celkového cholesterolu, TAG, zvýšenie HDL

frakcie. Neustále stúpajúca prevalencia obezity v detskom a adolescentnom veku stále získava čoraz viac vedeckej pozornosti (8).

Sledovanie špecifických kriviek

Pri vyšetrení rozoznávame krivky špecifické a nešpecifické. Špecifickými krivkami sú hodnota svalovej zložky a tukovej zložky, pretože ich priamo meriame. Index štíhlosti je daný matematicky, zložkou svalovou a tukovou – ide teda o krivku nešpecifickú. Ako ukazovatele diagnostického prínosu meracích metód slúži hodnota špecificity a senzitivity.

Špecificita vyjadruje schopnosť testu vybrať prípady, u ktorých skúmaný znak nenastáva - to znamená, aby nám test dal čo najmenej falošne pozitívnych výsledkov. Senzitivita vyjadruje úspešnosť testu s akou zachytí daný znak/ochorenie – test má vysokú senzitivitu, ak dostaneme minimum falošne negatívnych výsledkov (hodnoty sa pohybujú od 0,0 do 1,0) (9).

Záver

Pri snahe dosahovať stúpajúcu výkonnosť hráčov ľadového hokeja s ich stúpajúcim vekom je potrebné, aby morfológické charakteristiky týchto hráčov boli zodpovedajúce výkonnostným očakávaniam. Nami realizovaná štúdia ukazuje potrebu zmien vo fyzickom zaťažení športovcov. Malo by byť cielenejšie pre daný ročník narodenia. Kontrola efektivity týchto zmien môže byť vykonávaná vhodnými opakovanými meraniami.

PodĎakovanie

Vedecko-výskumná práca bola spolu-realizovaná a podporená konzultačnou spoločnosťou ED-Corporation s.r.o.

Literatúra

1. **Andreoli A, Melchiorri G.** Effect of different sports on body cell mass in highly trained athletes. *Acta Diabetol* 2003, 40:S122-125
2. https://www.flexxcoach.com/learningcenter/resources/cc_IHF_CoachDevelopment_Physiology.pdf
3. **Mráz P, et al.** *Anatómia ľudského tela 1*, 2004, Slovak academic press, ISBN 80-89104-57-6
4. **Thayer R, Collins J, Noble EG** A decade of aerobic endurance training: histological evidence for fibre type transformation. *Journal of Sports Medicine & Physical Fitness*, December 2000, 40:284-9
5. **Aziz AR, Chia M.** The relationship between maximal oxygen uptake and repeated sprint performance indices in field hockey and soccer players. *J Sports Med Phys Fitness* 2000;40:195–200
6. **Musch J, Grondin S.** Unequal competition as an impediment to personal development: A review of the relative age effect in sport. *Dev Rev* 2001;21:147–67
7. **Naimo MA, et al.** High-intensity interval training has positive effects on performance in ice hockey players. *International Journal of Sports Medicine*, Volume 36, Issue 1, January 2015, Str. 61-66
8. **Zorba E, Cengiz T.** Exercise training improves body composition, blood lipid profile, and serum insulin levels in obese children, *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, Volume 51, Issue 4, December 2011, Str. 664-669
9. **Bencko V, et al.** *Epidemiologie, výukové texty pro studenty 1*. LFUK, Praha. 2. vydání. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0383-7, Str. 35-40

MECHANIZMY NERVOVÉHO SYSTÉMU KOORDINUJÚCE FYZIOLOGIU VYPRÁZDŇOVANIA MOČOVÉHO MECHÚRA

(The mechanisms of the nervous system coordinating the physiology of the micturition)

Katarína Bevízová¹, Dominika Rusnáková¹

¹ *Anatomický ústav, Lekárska Fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovenská Republika, katarina.bevizova@fmed.uniba.sk*

Súhrn

Predložená publikácia je zameraná na podrobný popis mechanizmov inervácie močového mechúra vo vzťahu k jeho fyziologickému vyprázdňovaniu.

Kľúčové slová

Inervácia močového mechúra, fyziológia vyprázdňovania močového mechúra

Summary

The goal of this article is the detail description of the urinary bladder innervation in relationship with the physiology of micturition.

Key words

Innervation of the urinary bladder, physiology of micturition

Úvod

Močový mechúr (vesica urinaria) je dutý svalový orgán uložený za symfýzou v malej panve. Spolu s párovými obličkami (renes), močovodmi (ureter) a močovou rúrou (urethra) vytvára u človeka močový systém. Fyziológia vyprázdňovania močového mechúra je podmienená mechanizmami nervového systému. Dolná časť močového traktu umožňuje uschovanie a vylúčenie moču. Plnenie jeho normálnej funkcie je výsledkom koordinácie kontrakcie a uvoľnenia svalov močového mechúra, sťahovačov močovej rúry a svalov panvového dna. Poruchy týchto aktivít, alebo ich interakcií vedú k rozvoju porúch funkcie dolného močového traktu. V ich riadení má nervový systém základnú úlohu (1).

Nervy močového mechúra pochádzajú z plexus vesicalis, ktorý prebieha po stranách fundus vesicae. Obsahuje sympatické vlákna z plexus hypogastricus inferior (segmenty L1 - L3), parasympatické vlákna z panvového parasympatiku (segmenty S2 - S4), pochádzajúce rovnako z plexus hypogastricus inferior, senzitivné vlákna miechových nervov (L2 - S2) a somatomotorické vlákna pre m. sphincter urethrae externus (2). Najviac senzitivných nervových zakončení sa nachádza v trigone, pri ústiach močovodov a vo vnútornom vyústení močovej rúry. V nervovom pletenci a v svalovine mechúra sú mnohé gangliá mikroskopických rozmerov. Senzitivné nervové zakončenie ovplyvňuje kapsaicin (3,4,5).

Sympatické vlákna zvyšujú u mužov napätie m. sphincter vesicae a uzatvárajú vstup do močovej rúry. Vlákna parasympatiku aktivujú otvárací mechanizmus uretry a vyvolávajú

kontrakciu m. detrusor. Spinálne nervy vedú do miechy podnety napätia steny a vnemy nutkania na močenie a bolesť (6).

Informácie z mechúra prenášajú senzorové nervové vlákna do CNS. Signalizujú zvýšený tlak v mechúre a zvýšené napätie močového mechúra. Vedomé močenie sa začína stiahnutím brušných svalov a bránice, vzostupom vnútro brušného tlaku, ochabnutím zvierača a svaloviny panvového dna. Spodina mechúra klesá, močovod sa skracuje a otvára spoločne s hrdlom močového mechúra. Zvierač sa stiahne. Tým sa zvýši tlak v mechúre. V močodoch sa zníži uzáverový tlak, prebehne močenie. Ukončenie močenia umožňuje voľný uzáver vonkajšieho zvierača. Dôjde k stiahnutiu dna panvy a vnútorného zvierača. Prúd moču sa preruší v druhej tretine močovodu a moč z hornej tretiny sa vypudzuje späť do močového mechúra (7,8,9,1,10). Riadenie močenia koordinujú viaceré časti centrálného nervového systému. Aferentný a eferentný periférny nervový systém prenášajú signály z dolnej časti močového systému. Reflexný systém tvorí päť zložiek:

1. eferentné neuróny miechy
2. periférne eferentné neuróny
3. primárne aferentné neuróny
4. interneuróny miechy
5. neuróny v mozgu

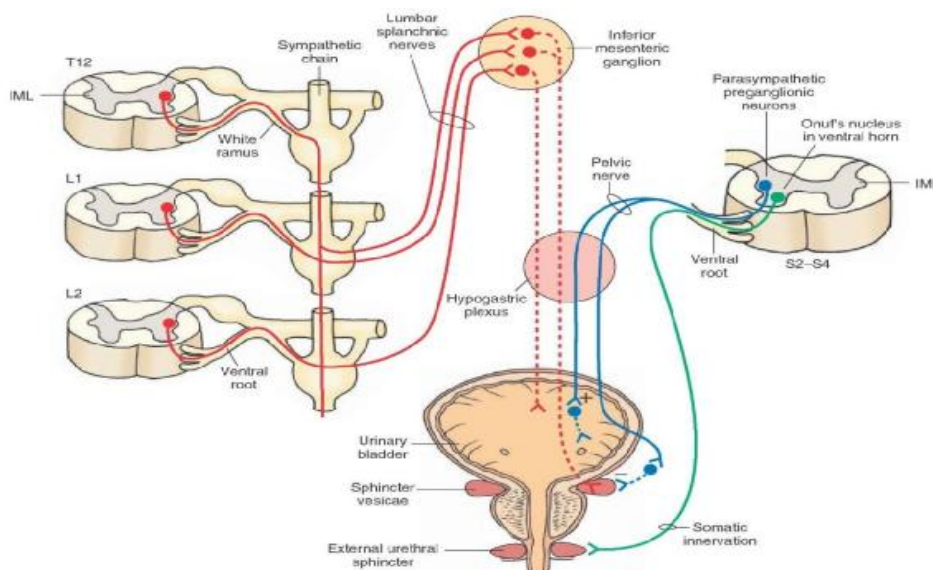
Pregangliové neuróny, lokalizované v sakrálnom parasimpatikovom jadre a v miechovom sympatikovom jadre excitujú periférne eferentné neuróny, inervujúce hladký sval močového mechúra a močovej rúry. Motorické neuróny sakrálného Onufovho jadra excitujú priečne pruhovaný sval vonkajších sfinkterov močovej rúry. Myelínové a nemyelínové aferentné axóny prenášajú informácie z dolného močového traktu do lumbosakrálnych povrazcov miechy. V dolnom močovom trakte sú tri typy receptorov:

1. tlakové receptory
2. objemové receptory
3. „silent“ (tiché) receptory, ktoré sa stanú „nociceptormi“ (receptory reagujúce na neprimeranú bolesť)

Aferentná cesta sa končí v miechových interneurónoch. Miechové interneuróny odovzdávajú informácie do mozgu, alebo do iných častí miechy. Nakoľko reflexy močenia obstarávajú disynapsové, alebo polysynapsové cesty majú interneurónové mechanizmy rozhodujúcu rolu v riadení dolného močového traktu. Centrálna cesta, podieľajúca sa na reflexoch močenia, je v mieche a v supraspinálnych oblastiach. Reflexy močenia môžu byť modulované na úrovni miechy viscero-mechúrovými a somato-mechúrovými reflexami. Supraspinálne oblasti majú veľmi komplikovanú organizáciu: Rozhodujúcou zložkou močových reflexov je močové centrum v pons a periaqueduktová šedá hmota. Inhibičné a excitačné oblasti v pontomedulárnom, aj v hypotalamovom systéme majú pri regulovaní močových reflexov významnú rolu (10,1).

Kontinencia je schopnosť zhromažďovať moč a zadržiavať ho v mechúre (11). Môže byť aktívna, vtedy je potrebné vôľové úsilie, alebo je pasívna keď je moč zadržiavaný pri normálne relaxovanom detruzore. Pri poruchách tejto funkcie vzniká močová inkontinencia, nekontrolovateľný únik moču (12,13,14). Vyprázdnenie mechúra zabezpečuje trojvrstvový súbor hladkej svaloviny v apex, fundus a v corpus vesicae až po cervix vesicae, známy ako musculus detrusor (15,16).

Otváranie ostium urethrae internum – aktívne mimovoľné otváranie spôsobuje m. retractor uvulae. Aktívne voľné otváranie spôsobí relaxovanie priečne pruhovanej svaloviny m. sphincter urethrae externus. Parasymphatikus privodí stiahnutie m. detrusor a uvoľnenie vnútorného zvierača (16).



Zatváranie ostium urethrae internum – aktívne mimovoľné zatváranie spôsobuje m. sphincter vesicae. Aktívne voľné zatváranie spôsobuje m. sphincter urethrae externus. Okrem svalstva mechúra sa na regulovaní jeho zatvárania zúčastňuje aj tlak naplnených žíl. Tieto zvýšia krvnú náplň v uvula vesicae. Sympatikus obstaráva najmä inervovanie vnútorného zvierača a jeho kontrahovanie. Môže znižovať tonus m. detrusor (16).

Záver

Iniciácia a potlačenie reflexu močenia sa uskutočňuje vôľovo v mozgovej kôre. Cyklus močenia so striedaním fázy uskladňovania a vyprázdňovania močového mechúra vyžaduje súhru medzi svalmi močového mechúra, močovej rúry a svalmi panvového dna. Základným predpokladom koordinácie tohto mechanizmu je správne fungovanie nervového systému.

Literatúra

1. Zachoval R, Záleský M, Lukeš M, Mareš J, Urban M, Palaščík P. Lower urinary tract function and its disorders *Cesk Fysiol.* 49, 2000, 3, 134-144.
2. Mráz P. (Ed). *Anatómia ľudského tela 2.* Bratislava: SAP, 2006, 526s.
3. Artim DE, Bazely F, Daugherty SL, Sculptoreanu A, Koronowski KB, Schopfer FJ, Woodcock SR, Freeman BA, de Groat WC. Nitro-oleic acid targets transient receptor potential (TRP) channels in capsaicin sensitive afferent nerves of rat urinary bladder. *Exp Neurol.* 232, 2011, 1, 90-99.
4. Abelli L, Ferri GL, Astolfi M, Conte B, Parlani M, Somma V, Geppetti P, Dahl D, Polak JM, Maggi CA. Involvement of capsaicin-sensitive nerves of the rat urinary bladder in acrylamide neuropathy. *J Auton Nerv Syst.* 30, 1990, Suppl:S3-4.
5. Lecci A, Giuliani S, Tramontana M, Santicioli P, Criscuoli M, Dion S, Maggi CA. Bladder distension and activation of the efferent function of sensory fibres: similarities with the effect of capsaicin. *Br J Pharmacol.* 124, 1998, 2, 259-266.
6. Čihák R. *Anatomie* Vydavateľstvo: Grada, 1576s. 2002.
7. Lukacz ES, Sampsel C, Gray M, Macdiarmid S, Rosenberg M, Ellsworth P, Palmer MH. A healthy bladder: a consensus statement. *Int J Clin Pract.* 65, 2011 10, 1026-1036.
8. Agostiniani R, Mariotti P. The natural history of vesicoureteral reflux. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011, Suppl 1:2-3. Review.

9. **Lindsey I, Guy RJ, Warren BF, Mortensen NJ.** Anatomy of denonvilliers' fascia and pelvic nerves, impotence, and implications for the colorectal surgery. *Br. J. Surg* 87, 2000, 10, 1288-1299.
10. **Beckel JM, Holstege G.** Neurophysiology of the lower urinary tract. *Handb Exp Pharmacol.* 2011, 202, 149-169.
11. **Chapple C.** Overview on the lower urinary tract. *Handb Exp Pharmacol.* 202, 2011, 1-14.
12. **Breza J, Alemayehu HM, Hoe M, Zvara V.** Advantages of converting incontinent to continent urinary diversion. *Int Urol Nephrol.* 26, 1994, 4, 447-453.
13. **Alemayehu HM, Breza J, Dzurný O.** Complications of continent urinary diversion. *Rozhl Chir.* 71, 1992, 11, 593-597.
14. **Hornák M, Bárdoš A, Galbavý S.** Urinary bladder carcinoma: the lesson taken from the past and the future prospect. *Bratisl Lek Listy.* 106, 2005, 11, 378.
15. **Gray M.** Traces: making sense of urodynamics testing--Part 6: Evaluation of bladder filling/storage: bladder wall compliance and the detrusor leak point pressure. *Urol Nurs.* 31, 2011, 4, 215-221, 235.
16. **Sadananda P, Vahabi B, Drake MJ.** Bladder outlet physiology in the context of lower urinary tract dysfunction. *Neurourol Urodyn.* 30, 2011, 5, 708-713.
17. **<http://what-when-how.com/neuroscience/the-autonomic-nervous-system-integrative-systems-part-3/>**

POSTKONDICIONOVANIE - MOŽNOSŤ VYUŽITIA ISCHEMICKEJ TOLERANCIE V KLINICKEJ PRAXI

(Postconditioning - possibility to use ischemic tolerance in clinical practice)

Marianna Danková¹, Eva Mechírová¹, Iveta Domoráková¹, Zuzana Fagová¹

¹Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta, Ústav histológie a embryológie, Šrobárova 2, 040 01 Košice, marianna.dankova@upjs.sk

Súhrn

Fenomén ischemickej tolerancie bol potvrdený na viacerých zvieracích modeloch ischemie mozgu a miechy po fokálnej a globálnej ischemii. Mechanizmy indukcie ischemickej tolerancie sú neustále študované od doby, keď bolo po prvý krát zistené, že ischemická tolerancia prináša so sebou ochranu nervového tkaniva. Indukovanie ischemickej tolerancie chráni neuróny a zároveň umožňuje zachovanie funkčnosti mozgu a miechy.

Cieľom našej práce je získavanie teoretických poznatkov, týkajúcich sa ischemickej tolerancie a ich aplikácia do klinickej praxe.

Kľúčové slová

Neurón, postkondicionovanie, ischemická tolerancia

Summary

The phenomenon of ischemic tolerance has been confirmed in various animal models of brain and spinal cord ischemia, after focal and global ischemia. Since the ischemic tolerance afforded by preceding ischemia can bring about robust protection of the brain and spinal cord, the mechanism of tolerance induction has been extensively studied. It has been elucidated that ischemic tolerance protects neurons, and at the same time, it preserves brain and spinal cord function.

The main purpose of this study is to summarize and discuss the existence of ischemic tolerance and its application in clinical practice.

Key words

Neuron, postconditioning, ischemic tolerance

Úvod

Dostatočné prekrvenie zabezpečuje dostatočný prísun živín a kyslíka do tkanív, čo je bezpodmienečne nutné pre správnu funkciu ktoréhokoľvek orgánu. Pokiaľ sa porucha prekrvenia dotýka významného a dôležitého orgánu, dochádza k priamemu ohrozeniu života. Ischémia je proces, pri ktorom dochádza k nedostatočnému prekrveniu aj nervového tkaniva a zároveň nedostatku kyslíka, glukózy a ostatných živín. Nervové bunky nachádzajúce sa v sivej hmote miechy majú rôzne funkcie a aj ich reakcia na stresovú situáciu je rôzna.

Poškodenia miechy v dôsledku ischémie sú častou komplikáciou chirurgických zákrokov na brušnej aorte, zákrokov v hrudnej oblasti, alebo sa popisujú ako zriedkavejšia neurologická komplikácia systémových ochorení (1, 3).

Ischemická tolerancia - prekondicionovanie

Fenomén ischemickej tolerancie je známy posledných 25 rokov najmä zo štúdií robených na srdcovom svaľe (10). Ischemická tolerancia spočíva v schopnosti buniek reagovať na subletálny podnet vybudovaním mimoriadne silnej ochrany, umožňujúcej následne prežiť za iných okolností letálny ischemický zásah. Tento mechanizmus bol doteraz zistený u všetkých študovaných orgánov a druhov zvierat (16). Ide o mimoriadne silný endogénny obranný mechanizmus, umožňujúci bunkám prežiť násobky smrteľných dávok. Tento obranný mechanizmus bol navodený v dvoch podobách, ako ischemické prekondicionovanie a ischemické postkondicionovanie. Podstatou prekondicionovania je, že krátke subletálne ischemické epizódy sú schopné aktivovať v organizme dostatočnú ochranu, ktorá dáva možnosť prežitia aj tým najvulnerabilnejším nervovým bunkám.

Takto získaná tolerancia chráni aj pred stresmi iného pôvodu ide o tzv. skríženú toleranciu - cross tolerance. Platí to aj opačne, že rezistencia na ischemické poškodenie môže byť navodená nielen samotnou ischémiou, ale aj inými stresovými stimulmi napr. krátkodobou hypoxiou (6), hypertermiou (8), hypotermiou (11), depolarizáciou mozgovej kôry, oxidatívnym stresom (12), hyperbarickou oxygenáciou (19), ale aj chemicky - podaním norepinefrínu (9,14), 3-nitropropiónovej kyseliny (15,17), lipopolysacharidu (13), TNF- α (7), polyenasýtených mastných kyselín (2) a opakovanou magnetickou stimuláciou (5).

Nevýhodou tohto spôsobu navodenia ischemickej tolerancie je, že prekondicionovanie musí predchádzať letálnej ischémií a to je v klinickej praxi aplikovateľné len pri plánovaných operáciách. V klinickej praxi je jednoduchší predpoklad aplikácie postkondicionovania.

Postkondicionovanie

Aplikácia kondicionovania počas ischémie, bezprostredne po ischémií, pri nástupe reperfúzie alebo v jej neskorších fázach, je označovaná ako ischemické postkondicionovanie. Vďaka tejto časovej aplikovateľnosti je postkondicionovanie pre klinickú prax výhodnejšie ako samotné prekondicionovanie. Skoré postkondicionovanie uplatnil vo svojej práci Zhao (18). Opakoval 3 cykly 30 sekundovej perfúzie a reperfúzie ľavej prednej descendentnej koronárnej artérie. Zistil, že postkondicionovanie je rovnako účinné ako prekondicionovanie. Redukuje rozsah infarktu v myokarde a chráni endotelové bunky. Postkondicionovanie je na základe jeho pozorovaní pravdepodobne uplatniteľné pri koronárnych intervenciách, aorto-koronárnych bypasoch, orgánových transplantáciách, kde je nutné rátať s reperfúznym poškodením.

Vzdialené ischemické postkondicionovanie (**RIP**) predstavuje rýchlu aplikáciu ischémie na vzdialené orgány v čase počiatočnej fázy reperfúzie ischemizovaného cieľového orgánu. Tento spôsob postkondicionovania má ochranný efekt na ischemicko - reperfúzne poškodenie buniek ischemizovaného cieľového orgánu. Priaznivý efekt RIP bol popísaný aj v prípade priečne pruhovaného svalového tkaniva (4).

Z hľadiska možného použitia v klinickej praxi, do úvahy prichádza využitie tzv. neskorého postkondicionovania (**delayed postconditioning**). Použitie neskorého postkondicionovania na rozdiel od bezprostredne po ischémií používaného postkondicionovania, ktorého aplikácia nie je vždy možná, spočíva v použití subletálneho stresu niekoľko hodín až 48 hodín po potenciálnom letálnom strese. Toto časové ohraničenie je dané časom, keď reálne dochádza k oneskorenej smrti buniek. Platí však, že čím je ischemický, traumatický alebo toxický zásah ťažší, tým kratšie je terapeutické okno pre aplikáciu postkondicionovania. Je dokázané, že

účinnosť neskorého postkondicionovania pri silnejších atakoch klesá, ale otvára sa tu možnosť využitia kombinovania s inou liečbou.

Záver

Vyvolanie ischemickej tolerancie je možné nielen prekondicionovaním ale aj poskondicionovaním. V klinickej praxi sa na ischémiu nedá pripraviť vopred. Pacientov so vzniknutým ischemickým poškodením, je nutné riešiť ihneď, a tak vhodnejším spôsobom na vyvolanie ischemickej tolerancie, môže byť neskoré postkondicionovanie.

Literatúra

1. **Arai C, Furutani R, Ushiyama MA.** Case of Sjogren's syndrome with subacute transverse myelitis as the initial manifestation. *Rinsho Shinkeigaku* 2002 ; 42(7): 613–618.
2. **Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C.** Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neurosci* 2002, 109:231-241.
3. **Doita M, Marui T, Nishida K, Kurosaka M, Yoshiya S, Sha N.** Anterior spinal artery syndrome after total spondylectomy of T10, T11, and T12. *Clin Orthop Relat Res* 2002 ; (405): 175–181.
4. **Eberlin KR, McKormack MC, Nguyen JT, Tatlidede HS, Randolph MA, Austen WG.** Sequential limb ischemia demonstrates remote postconditioning protection of murine skeletal muscle. *Plastic and reconstructive surgery* 2009; 123(2):8-16.
5. **Fujiki M, Kobayashi H, Abe T, Kamida T.** Repetitive transcranial magnetic stimulation for protection against delayed neuronal death induced by transient ischemia. *J Neurosurg* 2003; 99: 1063-1069.
6. **Gage AT and Stanton PK.** Repetitive transcranial magnetic stimulation for protection against delayed neuronal death induced by transient ischemia *Brain Res* 1996; 719: 172-178.
7. **Chen S, Xiong L, Wang Q, Sang H, Zhu Z, Dong H, Lu Z.** Tetramethylpyrazine attenuates spinal cord ischemic injury due to aortic cross-clamping in rabbits. *B M C Neurology* 2002; 2(1):1471- 1482.
8. **Chopp M.** Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic damage in the rat. *Neurology* 1989; 39: 1396-1398.
9. **Meng X, Cleveland JC Jr, Rowland RT, Mitchell MB, Brown JM, Banerjee A, Harken AH.** Norepinephrine-induced sustained myocardial adaptation to ischemia is dependent on alpha 1-adrenoceptors and protein synthesis. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 2017-2025.
10. **Murry CE, Jennings RB, Reimer KA.** Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986; 74:1124-1136.
11. **Nishio S, Yunoki M, Chen ZF, Anzivino MJ, Lee KS.** Ischemic tolerance in the rat neocortex following hypothermic preconditioning. *J Neurosurg* 2000; 93: 845-851.
12. **Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, Kamada T.** Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Brain Res* 1992; 599: 1992, 246-52.
13. **Puisieux F, Deplanque D, Pu Q, Soui IE, Bastide M, Bordet R.** Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *Eur J Pharmacol* 2000; 389: 71-78.
14. **Ravingerova T, Pancza D, Ziegelhoffer A, Styk J.** Preconditioning modulates susceptibility to ischemia-induced arrhythmias in the rat heart: the role of alpha-adrenergic stimulation and K(ATP) channels. *Physiol. Res* 2002; 51: 109-119.
15. **Riepe MW, Esclaire F, Kasischke K, Schreiber S, Nakase H, Kempfski O, Ludolph AC, Dirnagl U, Hugon J.** Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative

phosphorylation: "chemical preconditioning". *J. Cereb. Blood Flow Metab* 1997; 17: 257-264.

16. Riksen NP, Smits P, Rongen GA, Ischaemic preconditioning: from molecular characterisation to clinical application--part I. *Neth J Med* 2004; 62: 353-363.

17. Sugino T, Nozaki K, Takagi Y, Hashimoto N. 3-Nitropropionic acid induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus in vivo. *Neurosci Lett* 1999; 259: 9-12.

18. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(2):579-588.

19. Wada K, Ito M, Miyazawa T, Katoh H, Nawashiro H, Shima K, Chigasaki H, Repeated hyperbaric oxygen induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus. *Brain Res* 1996; 740: 15-20.

HYPERCHOLESTEROLÉMIA A HYPOVITAMINÓZA VITAMÍNU D AKO RIZIKOVÉ FAKTORY PRI SKLERÓZE MULTIPLEX

(Hypercholesterolemia and hypovitaminosis of vitamin D as a risk factors of multiple sclerosis)

**Monika Ďurfinová¹, Radka Bartová¹, Ľubica Procházková², Michal Balco²,
Darina Petrleňičová², Branislav Líška¹, Ladislav Turecký¹**

¹ Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, monika.durfinova@fmed.uniba.sk

² II. neurologická klinika LF UK a UN, Limbová 5, 833 05 Bratislava

Súhrn

U pacientov so sklerózou multiplex (SM) sa popisuje vyššie riziko infarktu myokardu a ischemickej cievnej mozgovej príhody ako u ľudí bez SM. Príčina tohto zvýšeného rizika zatiaľ nie je známa, ale predpokladá sa endoteliálna dysfunkcia vedúca k ateroskleróze. Medzi rizikové faktory aterogenézy patria zvýšené hladiny cholesterolu, hlavne LDL frakcie pri súčasne zníženej HDL frakcii v sére. I keď sa v našom súbore hladiny cholesterolu u skupiny pacientov s SM nelíšili od kontrolnej skupiny, pacienti so sekundárne progresívnou formou choroby mali v sére signifikantne vyššie hladiny celkového cholesterolu, LDL a TAG a signifikantne nižšiu hladinu HDL v porovnaní s pacientmi s relaps remitujúcou formou SM. Uvedené pozorovanie by mohlo poukazovať na vyššiu mieru kardiovaskulárneho rizika s progresiou choroby. Hypovitaminóza vitamínu D sa zdá byť ďalším environmentálnym faktorom ovplyvňujúcim priebeh sklerózy multiplex. Vitamín D je imunomodulátorom, ale stále nemožno s istotou povedať, či je aj modulátorom priebehu SM. Predpokladá sa, že vitamín D nemá vplyv na reguláciu aktivity samotnej choroby, ale iba na riziko rozvoja sklerózy multiplex. U nesuplementovaných pacientov týmto vitamínom sme pozorovali nižšiu hladinu vitamínu D v sére v porovnaní so skupinou pacientov s tou istou formou SM, ktorí vitamín D užívali. Zistili sme však signifikantne nižšiu hodnotu vitamínu D v sére u pacientov, ktorí boli počas odberu vo fáze relapsu v porovnaní s pacientmi vo fáze remisie. Z uvedených výsledkov možno predpokladať, že vitamín D by mohol vplývať na klinickú aktivitu choroby. Odporúčaná fyziologická hladina vitamínu D potrebná pre mineralizáciu kostí je 20-29 µg/l, nemožno však vylúčiť, že na podporu imunitnej reakcie organizmu sú potrebné jeho vyššie hladiny.

Kľúčové slová

Skleróza multiplex, hypercholesterolémia, vitamín D

Summary

There has been reported a higher risk of stroke and cardiovascular ischemic disease in multiple sclerosis (MS) patients than in people without MS. The main cause of this phenomenon is not yet known, but endothelial dysfunction leading to atherosclerosis has been supposed to play part in it. Elevated levels of total cholesterol, mainly LDL fraction together

with decreased HDL in blood serum, belong to the risk factors of atherogenesis. However, total cholesterol levels were not significantly different in MS patients and control group in our conditions; in secondary progressive course of the disease were determined significantly increased serum cholesterol levels, LDL and TAG, and significantly decreased HDL in comparison to relapsing-remitting MS patients. These results might have pointed to a trend towards elevation of cardiovascular risk with disease progression.

Vitamin D hypovitaminosis appears to be another environmental factor affecting the disease progression. Vitamin D is an immunomodulator, but still it is not clear if it might be considered also as a modulator of the disease course. It has been suggested not to have an influence on regulation of disease activity itself, but only on probability of development of MS. Decreased levels of vitamin D were observed in serum of MS patients who were not supplemented by this vitamin compared to those supplemented. We found significantly lower vitamin D values in serum of patients in relapse during the withdrawal than in clinically stable (remission) patients. From the results shown it can be assumed that vitamin D may affect the clinical disease activity. Recommended physiological dose of vitamin D necessary for bone mineralization is 20-29 µg/l, though it cannot be excluded that higher doses are needed to support immunological reactions of organism.

Key words

Multiple sclerosis, hypercholesterolemia, vitamin D

Úvod

Skleróza multiplex (SM) je chronické degeneratívne autoimunitné ochorenie centrálneho nervového systému, charakterizované zápalom, ložiskami demyelinizácie a gliózou. Postihuje predovšetkým bielu hmotu CNS. Prevalencia ochorenia v populácii je 0,05 - 0,15 %. Najčastejšie sa vyskytuje vo vekovej skupine 15 - 35 rokov, postihuje približne dvakrát častejšie ženy ako mužov. Aj keď presná príčina poruchy imunitného systému nie je známa, ukazuje sa, že vplyv na rozvoj ochorenia majú aj environmentálne faktory.

V súčasnom období pribúda prác, ktoré považujú obezitu a dyslipidémiu za významné komorbidity pri SM (1). Nízka hladina HDL a zvýšená hladina LDL sú známe ako prozápalové mediátory iniciujúce a prehlbujúce zápalové ochorenia ako ateroskleróza, kardiovaskulárne choroby, metabolický syndróm (1). Z viacerých epidemiologických štúdií vyplýva, že pacienti s SM majú vyššie riziko infarktu myokardu a ischemickej cievej mozgovej príhody ako ľudia bez SM. Príčina tohto zvýšeného rizika zatiaľ nie je známa, ale predpokladá sa endotelálna dysfunkcia vedúca k ateroskleróze. Ďalším faktorom, ktorý môže podporiť rozvoj ischemických lézií v mozgu pacientov s SM je znížená cerebrálna perfúzia (2). Patobiochemickým podkladom progresie SM je deštrukcia myelínu a zlyhávanie remyelinizácie. U pacientov s SM bol paradoxne v miestach lézií zistený zvýšený výskyt prekursorových buniek oligodendroglie. Pravdepodobne u SM zlyháva regulácia procesu ich diferenciácie a dozrievania na oligodendrocyty produkujúce myelín. Rýchlosť-limitujúcim krokom pri syntéze myelínu je biosyntéza cholesterolu a teda zmeny v syntéze cholesterolu môžu byť faktorom inhibujúcim remyelinizáciu (3). Za fyziologických podmienok je cholesterol syntetizovaný *de novo* v CNS a nedopĺňa sa z krvného obehu. Endotelové bunky mozgových kapilár však dokážu vycytávať LDL cez lumenálne receptory (4), dokonca za patologických podmienok je prísun cholesterolu z krvného obehu do CNS zvýšený (5; 6).

Hypovitaminóza vitamínu D sa zdá byť ďalším environmentálnym faktorom ovplyvňujúcim priebeh sklerózy multiplex (7; 8). Hlavná spojitosť medzi vitamínom D a týmto ochorením je v imunitnej odpovedi organizmu, ktorá je regulovaná vitamínom D a je narušená pri skleróze multiplex. Aj keď je isté, že vitamín D je imunomodulátorom, aj napriek početným štúdiám ešte stále nemožno s istotou povedať, či je aj modulátorom priebehu SM. Predpokladá sa, že

vitamín D nemá vplyv na reguláciu aktivity samotnej choroby, ale iba na riziko rozvoja sklerózy multiplex (9). Jeho využitie v terapii je spojené s možným predávkovaním vitamínom D a nežiadúcimi prejavmi spojenými s hyperkalcémiou. Na experimentálnom modeli sklerózy multiplex (EAE – experimentálna autoimunitná encefalomyelitída) boli už testované analógy vitamínu D, ktoré úspešne zmiernili priebeh choroby bez vplyvu na kalcémiu (10), avšak takéto štúdie ešte neboli realizované v klinickej praxi.

Materiál a metódy

V práci boli sledované zvolené parametre u dvoch experimentálnych skupín: 1) skupina pacientov II. Neurologickej kliniky LF UK a UN Bratislava s diagnostikovaným ochorením skleróza multiplex a 2) kontrolná skupina zdravých dobrovoľníkov. Pacienti s SM boli do súboru zaradení na základe splnenia inklúzných kritérií, ktoré predstavuje revízia McDonaldových kritérií z roku 2010. U oboch experimentálnych skupín bolo odobratých 10 ml venózne krvi štandardným spôsobom z v. cubiti a získané sérum bolo použité na stanovenie biochemických parametrov rutinnými biochemickými metódami. Z chorobopisov pacientov zaradených do štúdie boli následne vyhodnocované biochemické parametre: celkový cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triacylglyceroly a hladina vitamínu D. Pri spracovaní výsledkov sa bral do úvahy aj vek pacientov pri odbere biologického materiálu; EDSS skóre; typ sklerózy multiplex – relaps-remitujúca forma, sekundárne progresívna forma, primárne progresívna forma; dĺžka trvania choroby v čase odberu séra; pri relaps-remitujúcej forme SM v akom štádiu choroby bol pacient v čase odberu – relaps vs. remisia.

Na štatistické spracovanie výsledkov bol použitý Stats Direct[®], výsledky sú udávané ako medián a interkvartilové rozpätie. Významnosti boli vypočítané pomocou neparametrického Mann-Whitney testu. Za signifikantnú bola považovaná hodnota $p < 0.05$.

Výsledky

V súbore pacientov s SM bolo 139 pacientov, 111 pacientom bola diagnostikovaná relaps - remitujúca forma sklerózy multiplex (RR-SM) a 28 pacientom bola diagnostikovaná sekundárne progresívna forma SM (SP-SM). Do kontrolnej skupiny bolo zaradených 10 členov. Dĺžka trvania choroby v skupine pacientov s RR-formou aj SP-formou bola v čase odberov biologického materiálu 6 rokov. EDSS skóre pacientov s RR-SM bolo štatisticky významne nižšie ako v skupine pacientov s SP-SM (2 vz.4). Prevládajúcim medikamentóznym preparátom používaným v terapii oboch foriem choroby je interferón β .

Pri porovnaní hladín štandardných lipidových parametrov (celkový cholesterol, HDL, LDL, triacylglyceroly -TAG) v sére neboli zistené signifikantné rozdiely v hladinách u pacientov so SM v porovnaní s kontrolnou skupinou (Tab. 1). Rovnako neboli signifikantné rozdiely v sledovaných parametroch medzi pacientmi s RR-SM a kontrolnou skupinou.

Parameter	kontrola (n = 10)	SM (n = 139)	p
vek (roky)	51 (27.0-57.0)	39 (35.0-49.3)	n.s.
pohlavie (muži/ženy)	2/8	46/94	-
celkový CHOL (mmol/l)	4.88 (4.20 – 6.17)	4.94 (4.28 – 5.58)	n.s.
HDL cholesterol (mmol/l)	1.65 (1.29 – 2.39)	1.41 (1.19 – 1.76)	n.s.
LDL cholesterol (mmol/l)	2.44 (1.97 – 3.70)	3.09 (2.61 – 3.85)	n.s.
TAG (mmol/l)	1.04 (0.62 – 1.08)	1.21 (0.82 – 1.72)	n.s.
EDSS	-	3 (2-4)	-
trvanie ochorenia (roky)	6	6	-

Tab.1 Veková charakteristika a lipidové parametre pacientov s SM a kontrolnej skupiny

Pacienti so sekundárne progresívnou formou choroby však mali v sére signifikantne vyššie hladiny celkového cholesterolu, LDL a TAG a signifikantne nižšiu hladinu HDL v porovnaní s pacientmi s RR- formou ochorenia (Tab. 2).

Parameter	SP - SM (n = 28)	RR - SM (n = 111)	p
vek (roky)	54 (48 – 57) ⁺⁺⁺	37 (33 – 44)	<0.0001
pohlavie (muži/ženy)	12/16	34/77	-
celkový CHOL (mmol/l)	5.54 (4.98 – 6.33) ⁺⁺⁺	4.75 (4.12 – 5.41)	<0.0001
HDL cholesterol (mmol/l)	1.27 (1.01 – 1.48) ⁺⁺	1.48 (1.24 – 1.78)	0.0079
LDL cholesterol (mmol/l)	4.04 (3.59 – 4.80) ⁺⁺⁺	2.89 (2.51 – 3.43)	<0.0001
TAG (mmol/l)	1.68 (1.36 – 2.58) ⁺⁺⁺	1.05 (0.79 – 1.53)	<0.0001
EDSS	4 (3-5.5) ⁺⁺⁺	2 (2-3)	<0.0001
trvanie ochorenia (roky)	6	6	-

Tab.2 Veková charakteristika a lipidové parametre pacientov s RR-formou a SP-formou SM

Rozdelením experimentálnych skupín podľa pohlavia boli u žien s SP- formou ochorenia v porovnaní s RR- formou zistené signifikantne vyššie hladiny celkového cholesterolu, LDL ako aj TAG (Tab. 3). V skupine mužov bola u SP- formy navyše signifikantne nižšia hladina HDL (Tab. 4).

Parameter	SP - MS (n = 16)	RR - MS (n = 77)	p
vek (roky)	53 (46 – 56.5) ⁺⁺	36 (32 – 44)	0.0001
celkový CHOL (mmol/l)	5.72 (5.08 – 6.38) ⁺⁺	4.68 (4.05 – 5.34)	0.0003
HDL cholesterol (mmol/l)	1.36 (1.20 – 1.90)	1.60 (1.30 – 1.91)	0.2331
LDL cholesterol (mmol/l)	3.77 (3.31 – 4.79) ⁺	2.80 (2.35 – 3.24)	0.0001
TAG (mmol/l)	1.60 (1.33 – 2.49) ⁺⁺	0.98 (0.75 – 1.47)	0.0007
EDSS	4 (3 – 4.5) ⁺⁺	2 (2 – 3)	0.0005

Tab.3 Veková charakteristika a lipidové parametre u **žien** s RR a SP-formou SM

Parameter	SP - MS (n = 12)	RR - MS (n = 34)	p
vek (roky)	56 (48.5 – 60.5)	37 (34 – 42)	0.0001
celkový CHOL (mmol/l)	5.57 (5.38 – 6.48) ⁺	4.81 (4.29 – 5.56)	0.0036
HDL cholesterol (mmol/l)	1.01 (0.90 – 1.27) ⁺	1.29 (1.08 – 1.48)	0.0112
LDL cholesterol (mmol/l)	4.11 (3.85 – 4.90) ⁺⁺	3.13 (2.72 – 3.83)	0.0002
TAG (mmol/l)	1.68 (1.53 – 2.98) ⁺	1.21 (0.88 – 1.96)	0.0012
EDSS	5 (3.25 – 5.5) ⁺	2.7 (2 – 3)	0.0012

Tab.4 Veková charakteristika a lipidové parametre u **mužov** s RR a SP-formou SM

Hladiny vitamínu D v sére sa u pacientov s SM nelíšili od kontrolných vzoriek (24.8 µg/l vs. 21.5 µg/l), čo pravdepodobne súvisí s tým, že väčšina pacientov bola suplementovaná aj vitamínmi rozpustnými v tukoch. Rovnako nebol signifikantný rozdiel v hladine vitamínu D pri porovnaní medzi jednotlivými formami choroby a kontrolnou skupinou, ani pri vzájomnom porovnaní medzi pacientmi s RR (25.4 µg/l) a SP formou SM (22.4 µg/l).

Porovnaním hladiny vitamínu D u skupiny s RR-SM (v tejto skupine bol dostatočný počet členov súboru) bola zistená nižšia hladina u pacientov bez suplementácie v porovnaní so skupinou, ktorá tento vitamín užívala (Tab. 5). Podávaním vitamínu D sa jeho koncentrácia v sére pacientov upravila na hodnotu zodpovedajúcu zdravým kontrolám. U pacientov nesuplementovaných vitamínom D bola jeho hladina signifikantne nižšia ak počas odberu bol pacient v stave relapsu v porovnaní s tými, ktorí boli počas odberu v remisii (Tabuľka 5).

RR-SM	vitamín D v sére (µg/l)	p
suplementácia	28.25 (15 – 34.9)	-
bez suplementácie	17.0 (9.8 – 29.4)	0.3
bez suplementácie v remisii	35.75 (24.5 – 42.2)	-
bez suplementácie v relapse	21.15 (14 – 29) ⁺	0.01

Tab.5 Vplyv užívania vitamínu D a fázy choroby v čase odberu vzorky na hladinu vitamínu D v sére pacientov s RR- SM

Diskusia

Viacere epidemiologické údaje potvrdzujú, že pacienti s SM by mohli mať zvýšené riziko rozvoja náhlej cievnej mozgovej príhody ako aj zvýšenú incidenciu akútneho infarktu myokardu (11). Na uvedenú skutočnosť by mohli poukazovať aj zvýšené rizikové parametre aterogenézy v sére pacientov s SM v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých jedincov.

V našom sledovanom súbore bola veková charakteristika pacientov špecifická pre dve najčastejšie sa vyskytujúce formy choroby, relaps - remitujúcu (RR) a sekundárne progresívnu (SP) formu. Priemerný vek pacientov s RR formou bol signifikantne nižší (37 rokov) ako priemerný vek pacientov s SP formou (57 rokov), čo platilo aj pre obe pohlavia pacientov. V súlade s klinickou štúdiou Ge a kol. (12), bola hodnota EDSS v podskupine pacientov s SP formou signifikantne vyššia ako v podskupine pacientov s RR formou. Toto zistenie má zásadný význam v klinickej praxi pre určovanie individuálnej prognózy choroby u pacientov so sklerózou multiplex.

Dôležitým parametrom, ktorý sa rovnako dáva do súvisu s prognózou ochorenia, je hladina lipidov a lipoproteínov v sére. Cholesterol je jednou zo základných súčastí myelínu. HDL a LDL lipoproteínové častice zohrávajú kľúčovú rolu v transporte cholesterolu a lipidov v ľudskom organizme. Ukázalo sa, že HDL plní aj špecifickú funkciu: pôsobí antioxidantne na endotelové bunky a znižuje produkciu prozápalových cytokínov (13). Z našich sledovaných parametrov vyplýva, že pacienti s SP formou ochorenia mali signifikantne zvýšené hladiny celkového cholesterolu, LDL a TAG a signifikantne zníženú hladinu HDL v porovnaní s pacientmi s RR formou choroby (Tabuľka 2), čo by mohlo poukazovať na vyššiu mieru kardiovaskulárneho rizika s progresiou choroby. Zvýšená hladina celkového cholesterolu v sére u pacientov so sklerózou multiplex koreluje s nárastom počtu lézií v mozgu, preukázaných MRI vyšetrením (13). Okrem toho, dyslipidémia predstavuje dôležitý faktor pre vývoj kardiovaskulárnych komorbidít, ktoré prispievajú k zvýšeniu EDSS u pacientov s SM (13). Napriek tomu, že v našej práci sa korelácia medzi hladinami jednotlivých foriem cholesterolu v sére a EDSS skóre nepreukázala, nárast hodnoty EDSS sa spája so vzostupom sérovej hladiny celkového cholesterolu, LDL a TAG (13).

Základom terapie sklerózy multiplex je medikamentózna liečba. V prípade pacientov zaradených do našej štúdie bol dominantným farmakologickým prostriedkom pri oboch formách SM interferón β , ktorý u pacientov so sklerózou multiplex potláča zápalové a demyelinizačné procesy v mozgu. Výsledky štúdií ukazujú, že interferón β znižuje počet relapsov pri RR forme,

znižuje hodnotu EDSS u pacientov s ochorením a prispieva k regresii demyelinizačných ložísk v CNS, ako bolo potvrdené MRI vyšetrením (14). Dôležitou súčasťou liečby je aj suplementácia vitamínmi. Ich pozitívny význam pri liečbe tejto choroby spočíva predovšetkým v tom, že niektoré z nich majú preukázanú antioxidačnú aktivitu (vitamín A, vitamín E, vitamín C). V našej sledovanej skupine pacientov je podiel suplementácie vitamínmi u RR-formy ochorenia pomerne vysoký (50%), zatiaľ čo u pacientov s SP-formou prevažuje tendencia neužívania týchto preparátov. Skleróza multiplex sa vzhľadom na geografickú distribúciu prevalencie spája s hypovitaminózou vitamínu D ako rizikovým faktorom SM (15). Z uvedeného dôvodu je väčšine pacientov odporučená suplementácia týmto vitamínom. Za optimálnu hladinu 25-OH-D v sére sa považuje 30–80 µg/l, čo je hodnota, ktorú nedosahujú ani jedinci zaradení do kontrolnej skupiny (21.5 µg/l). Dostačujúca hladina je pritom 20–29 µg/l sére, pod 20 µg/l je to hodnota vysoko riziková pre rozvoj ochorenia (7; 8). V prípade pacientov nesuplementovaných vitamínom D bola u RR-formy hladina tohto vitamínu v sére pod 20 µg/l. V súlade s literárnymi údajmi (16) sme zistili signifikantne nižšiu hodnotu vitamínu D v sére u pacientov, ktorí boli počas odberu krvi vo fáze relapsu (Tabuľka 5) v porovnaní s pacientmi vo fáze remisie. Z uvedených výsledkov možno predpokladať, že vitamín D by mohol vplyvať na klinickú aktivitu choroby. I keď sa udáva fyziologická hladina vitamínu D potrebná pre mineralizáciu kostí, nemožno vylúčiť, že na podporu imunitnej reakcie organizmu sú potrebné jeho vyššie hladiny.

Záver

Z uvedených zistení možno vyvodiť závery, že udržiavanie sérových hladín lipidov a lipoproteínov vo fyziologickom rozpätí ako aj dostatočná hladina vitamínu D môžu mať význam ako faktor ovplyvňujúci aktuálny klinický stav pacientov so sklerózou multiplex a predikujúci ďalší priebeh choroby. Z anamnézy pacientov pozorovaný súvis medzi nižším vystavovaním sa slnečnému žiareniu v mladšom veku a náchylnosťou sklerózy multiplex nasvedčuje tomu, že nízke hladiny vitamínu D počas detstva a adolescencie majú za následok vyššiu náchylnosť voči tejto chorobe. Zvyšovanie hladiny vitamínu D suplementáciou, alebo dlhším trávením času vonku, na slnku počas mladého veku, preto môže byť účinnou prevenciou u jedincov, ktorí v rodinnej anamnéze majú sklerózu multiplex.

PodĎakovanie

Práca bola finančne podporená projektom MZ SR č. 2012/2-UKBA-2. Autori ďakujú M. Čičmancovej za technickú spoluprácu.

Literatúra

- 1. Raddatz BB, Sun W, Brogden G, Sun Y, Kammeyer P, Kalkuhl A, Colbatzky F, Deschl U, Naim HY, Baumgärtner W, Ulrich R.** Central Nervous System Demyelination and Remyelination is Independent from Systemic Cholesterol Level in Theiler's Murine Encephalomyelitis. *Brain Pathology* 2015; early view: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bpa.12266/supinfo>
- 2. Koch MW, de Keyser J, Tremlett H.** Timing of birth and disease progression in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2008; 14(6): 793–798.
- 3. Ulrich R, Kalkuhl A, Deschl U, Baumgärtner W.** Machine learning approach identifies new pathways associated with demyelination in a viral model of multiple sclerosis. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 434–448.
- 4. Björkhem I, Meaney S.** Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 806–815.
- 5. Leoni V, Caccia C.** 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. *Biochimie* 2013; 95: 595–612.

- 6. Saher G, Brugger B, Lappe-Siefke C, Mobius W, Tozawa R, Wehr MC et al.** High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* 2005; 8: 468–475.
- 7. Dudani S, Kalhan S, Sharma S.** Vitamin D and multiple sclerosis: Potential pathophysiological role and clinical implications. *International Journal of Applied & Basic Medical Research* 2011; 1(2): 71-74.
- 8. Ascherio A, Munger K, Simon K.** Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurology* 2010; 9 (6): 599-612.
- 9. James E, Dobson R, Kuhle J, Baker D, Giovannoni G, Ramagopalan S.** The effect of vitamin D-related interventions on multiple sclerosis relapses: a meta-analysis. *Multiple Sclerosis Journal* 2013; 19 (12): 1571-1579.
- 10. Van Etten E, Branisteanu D, Overbergh L, Bouillon R, Verstuyf A, Mathieu C.** Combination of a 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analog and a bisphosphonate prevents experimental autoimmune encephalomyelitis and preserves bone. *Bone* 2002; 32: 397–404.
- 11. D'haeseleer M, Cambron M, Vanopdenbosch L, De Keyser J.** Vascular aspects of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2011; 10 (7): 657-666.
- 12. Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, Wei L, Mannon LJ, Polansky M, Kolson DL.** Brain Atrophy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis and Secondary Progressive Multiple Sclerosis: Longitudinal Quantitative Analysis. *Radiology* 2000; 214: 665-670.
- 13. Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Mahfooz N, Naeem M; Carl E, Drake A, et al.** Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation* 2011; 8 (127): 1-7.
- 14. Forbes RB, Lees A, Waugh N, Swingler RJ.** Population based cost utility study of interferon beta-1b in secondary progressive multiple sclerosis. *British Medical Journal* 1999; 319: 1529-1533.
- 15. Smolders J, Peelen E, Thewissen M, Menheere P, Cohen TJ, Hupperts R, Damoiseaux J.** The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews* 2009; 8 (7): 621-626.
- 16. Soilu-Hänninen M, Airas L, Mononen I, Heikkilä A, Viljanen M, Hänninen A.** 25-hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2005; 11 (3): 266–271.

UBIKVITÍN-PROTEAZÓMOVÝ SYSTÉM A NEURODEGENERATÍVNE OCHORENIA

(The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases)

Zuzana Fagová¹, Marianna Danková¹, Iveta Domoráková¹

¹ *Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta, Ústav histológie a embryológie, Košice*

Súhrn

Ubikvitín-proteazómový systém patrí medzi hlavné proteolytické systémy a je dôležitý pre priebeh viacerých fyziologických procesov v bunke. Jeho úlohou je degradácia poškodených a chybné zvinutých proteínov. Poškodenie ubikvitín-proteazómového komplexu môže viesť ku vzniku mnohých závažných ochorení, medzi ktoré patria neurodegeneratívne ochorenia ako Parkinsonova, Alzheimerova, Huntingtonova choroba alebo amyotrofická laterálna skleróza. Pre tieto ochorenia je jedným z typických znakov nahromadenie ubikvitín-pozitívnych proteínových agregátov v neurónoch, ale aj v gliových bunkách.

Kľúčové slová

Ubikvitín, proteazóm, neurodegeneratívne ochorenia, proteínové agregáty

Summary

The ubiquitin-proteasome system is a major proteolytic system in cells. It plays essential role in broad array of physiological cellular processes. The main role of this system is degradation of abnormal proteins. Dysfunction of this system is implicated in the pathogenesis of several diseases. The most important are neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis. In summary, all of these diseases are characterized by presence of protein aggregates containing ubiquitin, detected both in neurons and glial cells.

Key words

Ubiquitin, proteasome, neurodegenerative diseases, protein aggregates

Úvod

Jednou zo základných podmienok pre správne fungovanie buniek je udržiavanie rovnováhy medzi syntézou a degradovaním proteínov, preto sú tieto procesy prísne regulované (6). Hlavným proteolytickým systémom v eukaryotických bunkách je ubikvitín-proteazómový systém, ktorý zohráva dôležitú úlohu vo viacerých fyziologických procesoch v bunke (3, 5). Zabezpečuje degradáciu poškodených a chybné zvinutých proteínov, ktoré sú výsledkom oxidatívneho stresu, mutácií alebo neurotoxicity (1, 5). Keďže sa ubikvitín-proteazómový systém podieľa na degradácii veľkého množstva rôznych substrátov, následkom jeho dysfunkcie je vznik mnohých závažných typov ochorení. Medzi tieto ochorenia patria poruchy imunitnej a zápalovej odpovede, malígne ochorenia a viaceré neurodegeneratívne ochorenia (2).

Proteolýza pomocou ubikvitín-proteazómového komplexu

Proteolýza sprostredkovaná týmto komplexom prebieha v dvoch neoddeliteľných a na seba nadväzujúcich krokoch. Prvým krokom je kovalentné naviazanie molekúl ubikvitínu (ubikvitinácia) na cieľový proteín za prítomnosti viacerých špecifických enzýmov, ktoré sa rozdeľujú na E1 ubikvitín-aktivujúci enzým, E2 ubikvitín-konjugujúce enzýmy (ubikvitín-prenášajúce enzýmy) a E3 ubikvitínové ligázy. Proteíny sú po ubikvitinácii označené polyubikvitínovým reťazcom, ktorého vznik je katalyzovaný iným typom ligázy, často pomenovanej ako E4 enzým. Druhým krokom je rozpoznanie a degradácia polyubikvitinovaného proteínu proteazómom na krátke peptidy a zároveň prebehne „recyklácia“ molekúl ubikvitínu pomocou deubikvitinujúcich enzýmov (2, 6).

Vzťah neurodegeneratívnych ochorení a ubikvitín-proteazómového systému

Záujem o štúdium úlohy ubikvitín-proteazómového komplexu v mozgu sa zvýšil po zistení, že ubikvitín je súčasťou proteínových agregátov pri mnohých neurodegeneratívnych ochoreniach (7). Pre každé ochorenie je typický určitý špecifický proteín alebo aj viaceré špecifické proteíny, ktoré sú súčasťou takýchto agregátov (2). Do skupiny týchto ochorení patria ochorenia ako Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba alebo amyotrofická laterálna skleróza, ktoré sú charakteristické práve prítomnosťou proteínových agregátov v intraneurónových inklúziách v postihnutých oblastiach centrálného nervového systému (5). Agregáty sa väčšinou nachádzajú v cytoplazme, no taktiež v lyzozómoch alebo aj v jadre nervovej bunky. V agregátoch môže byť prítomný nielen ubikvitín ale aj proteazómové subjednotky, alebo ďalšie komponenty ubikvitín-proteazómového systému (1, 4). Podľa Ciechanovera, agregované proteíny sú schopné tiež inhibovať funkciu ubikvitín-proteazómového komplexu (2). Je známe, že neuróny sú citlivejšie na agregovanie proteínov a následnú bunkovú degeneráciu avšak proteínové agregáty boli dokázané aj v gliových bunkách, no sú menšie a aj menej početné. Najviac reagujúcimi gliovými bunkami sú astrocyty a mikroglia, ktorých funkcia je následkom proteínovej agregácie alterovaná a prispieva ku neurónovej dysfunkcii (6).

Alzheimerova choroba

Charakteristickým neuropatologickým znakom Alzheimerovej choroby sú dva typy proteínových agregátov a to senilné plaky a neurónové kľbká, pričom ubikvitín sa akumuluje v obidvoch týchto patologických štruktúrach. Senilné plaky sa nachádzajú extracelulárne a pozostávajú z agregátov peptidu β -amyloidu. Na rozdiel od senilných plakov, neurónové kľbká sa nachádzajú intracelulárne a sú zložené z modifikovaného hyperfosforylovaného proteínu tau, ktorý je za fyziologických podmienok štruktúrnym proteínom spojeným s mikrotubulmi (2, 6). Úloha gliových buniek, konkrétne astrocytov a mikroglie je odstraňovanie senilných plakov. Keďže sa aktivita astrocytov postupne znižuje, dochádza neskôr k vyššiemu ukladaniu extracelulárnych agregátov β -amyloidu a ako kompenzačný mechanizmus pravdepodobne slúži zvýšenie aktivity mikroglie (6).

Parkinsonova choroba

Toto ochorenie je typické odumieraním dopaminergických neurónov v substantia nigra pars compacta. Degenerácia nervových buniek je doprevádzaná tvorbou eozinofilných intracytoplazmatických inklúzií nazývaných Lewyho telieska, ktoré sú zložené z α -synukleínu, cytoskeletálnych proteínov, proteínom parkínom, ktorý slúži ako ubikvitínová ligáza ale aj samotným ubikvitínom (6, 7). Najnovšie štúdie potvrdili prítomnosť proteazómov v Lewyho telieskach (4). Pri Parkinsonovej chorobe sú α -synukleínom ovplyvnené aj astrocyty, ktoré sú schopné ho odstraňovať, následne vylučovať prozápalové

cytokíny a tým aktivovať mikroglia. Práve mikroglióza je pri Parkinsonovej chorobe výraznejšia oproti astroglióze, ktorá nie je dobre pozorovateľná (6).

Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba je charakterizovaná neurónovými aj gliovými agregátmi, dysfunkciou neurónov a neurodegeneráciou, ktorá začína v striatum a v mozgovej kôre. Agregáciu iniciujú fragmenty huntingtínu s predĺženým polyglutamínovým reťazcom, ktoré vytvárajú inklúzne telieska obsahujúce aj ubikvitín, proteazómy a dokonca aj ubikvitín-konjugujúce enzýmy (2). Pri tomto ochorení je dokázaná expresia huntingtínu aj v gliových bunkách, no jeho agregáty sú len veľmi ťažko pozorovateľné (6).

Amyotrofická laterálna skleróza

Pri tomto ochorení dochádza ku degenerácii motoneurónov v mozgu a v mieche. Pred degeneráciou dochádza ku tvorbe intranukleárných inklúzií, ktoré sú tvorené viacerými väčšinou ubikvitín-pozitívnymi proteínmi (6). Vytvárajú sa aj cytoplazmatické agregáty pozostávajúce z ubikvitinovanej superoxiddizmutázy 1, ktoré sa nazývajú „Bunina“ telieska (2). Ako pri ostatných neurodegeneratívnych ochoreniach aj pri amyotrofickej laterálnej skleróze sú ovplyvnené gliové bunky. Astrocyty aj mikroglia sú aktivované a produkujú prozápalové cytokíny. Taktiež je poškodená funkcia astrocytov, čo môže neskôr zapríčiniť excitotoxicitu (6).

Záver

Štúdium ubikvitín-proteazómového komplexu v súvislosti s neurodegeneratívnymi ochoreniami umožňuje nielen komplexne pochopiť patogenézu týchto ochorení, ale tieto poznatky je možné využiť aj v budúcnosti na vývoj novej cielej terapie. Táto terapia by mala byť zameraná práve na ovplyvnenie konkrétnych mechanizmov, ktorých sa zúčastňuje ubikvitín-proteazómový systém (2). Taktiež je potrebné sledovať aj zmeny v gliových bunkách, pretože aj tie podliehajú patologickým zmenám počas týchto ochorení a poškodenie ich ubikvitín-proteazómového systému ovplyvňuje nielen gliové bunky, ale má nepriamy vplyv aj na funkciu neurónov (6).

Literatúra

1. **Alves-Rodrigues A, Gregori L, Figueiredo-Pereira ME.** Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends in Neurosciences* 1998; 21 (12): 516-520.
2. **Ciechanover A, Brundin P.** The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: Sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 2003; 40: 427-446.
3. **Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL.** Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays* 2000; 22: 442-451.
4. **Dantuma NP, Bott LC.** The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2014; 2: 1-18.
5. **Huang Q, Figueiredo-Pereira ME.** Ubiquitin/proteasome pathway impairment in neurodegeneration: therapeutic implications. *Apoptosis* 2010; 15(11): 1292-1311.
6. **Jansen AHP, Reits EAJ, Hol EM.** The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2014; 7: 1-14.
7. **Yi JJ, Ehlers MD.** Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacological Reviews* 2007; 59 (1): 14-39.

DIABETES MELLITUS A JEHO VPLYV NA CENTRÁLNU NERVOVÚ SÚSTAVU

(Diabetes Mellitus and its impact on the CNS)

Mária Chomová¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárskej fakulty UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava; maria.chomova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Diabetická encefalopatia, charakterizovaná najmä poruchou kognitívnych funkcií mozgu, predstavuje v súčasnosti akceptovanú komplikáciu diabetes mellitus (DM). Početné humánne a animálne štúdie dokazujú, že už jednotlivci s obezitou a zmenami v inzulínovej homeostáze majú zvýšené riziko vzniku kognitívnych porúch a demencie. Hoci chronická hyperglykémia prostredníctvom glykácie proteínov a zvýšeného oxidačného stresu prispieva k mozgovej dysfunkcii, patológia DM v CNS zahŕňa predovšetkým progresívne a koordinované porušenie inzulínovej signalizácie. Pretože mnohé diabetom indukované neurodegeneratívne zmeny sú podobné zmenám pozorovaným pri fyziologickom starnutí CNS, bola navrhnutá hypotéza zrýchleného starnutia mozgu počas DM. Cieľom tejto práce je ponúknuť súčasný pohľad do základných mechanizmov vzniku diabetetickej encefalopatie, najmä z pohľadu vplyvu hyperglykémie a porušenej inzulínovej signalizácie na kognitívne a mozgové funkcie.

Kľúčové slová

Diabetes mellitus, centrálna nervová sústava, mitochondria, hyperglykémia, inzulín

Summary

Diabetic encephalopathy associated with cognitive dysfunction and dementia have recently been proven to be a common complication of diabetes mellitus. Several studies have already evidenced that individuals with obesity and alterations in insulin homeostasis are at increased risk for development of cognitive decline and dementia. Although chronic hyperglycemia through protein glycation and increased oxidative stress contributes to brain dysfunction, the pathology of DM in the brain mainly involves a progressive and coordinated disruption of insulin signaling. Because many of the CNS changes observed in diabetes are reminiscent of the changes seen in aging, the hypothesis of advanced brain aging in DM has been proposed. This article reviews the current understanding of diabetic encephalopathy in the terms of hyperglycemia and impaired insulin signaling on brain functions and cognition.

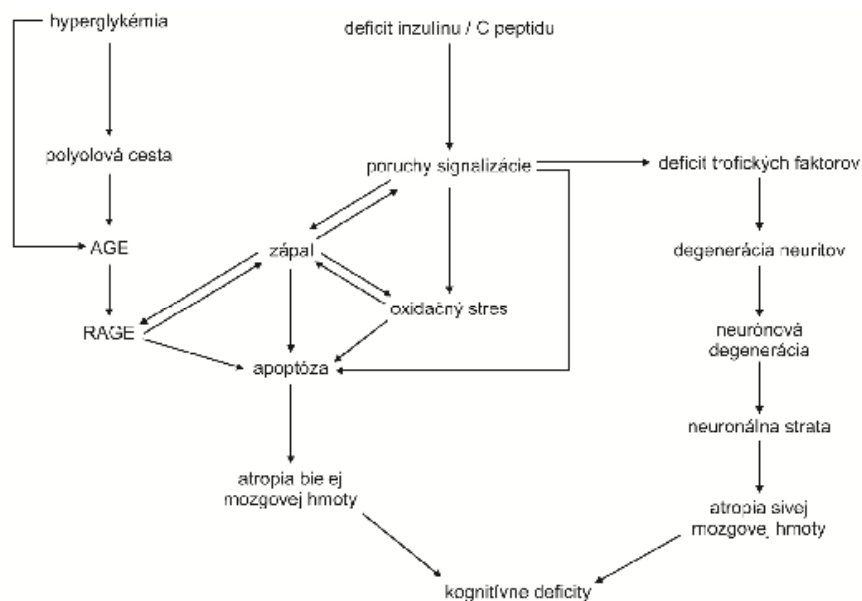
Key words

Diabetes mellitus, central nervous system, mitochondria, hyperglycemia, insulin

Úvod

Diabetes mellitus, chronické endokrinné ochorenie charakterizované absolútnym resp. relatívnym nedostatkom inzulínu je spojené so vznikom a rozvojom sekundárneho poškodenia orgánov akými sú obličky, periférne nervy, cievny systém či zrkové ústrojenstvo. Kým periférne komplikácie DM sú pomerne dobre preštudované, CNS donedávna nebola

považovaná za orgán, ktorý je postihnutý dereguláciou glukózovej a inzulínovej homeostázy. Narastajúca incidencia tohto ochorenia v populácii však priniesla pozorovania a úvahy o dopade DM aj na CNS. Tieto pozorovania pochádzajú z neurozobrazovacích štúdií, ktoré zaznamenali u pacientov s 1 typom DM (T1DM) špecifické štrukturálne zmeny postihujúce najmä sivú mozgovú hmotu (1). Štrukturálne zmeny korelovali so zmenami v hladinách mozgových metabolitov N-acetylaspartátu, myoinozitolu a cholínu a rozsah zmien vykazoval podobné diferencie, aké boli pozorované u pacientov s demenciou, epilepsiou či Parkinsonovou chorobou. Poznatky z neurozobrazovacích vyšetrení boli podopreté postmortem štúdiami, ktoré rovnako dokumentovali značnú stratu neurónov vo frontálnom kortexe a hipokampe, atrofiu bielej mozgovej hmoty vo frontálnej a temporálnej oblasti či zmoženie receptorov pre koncové produkty pokročilej glykácie (2). Neuroštrukturálne zmeny boli asociované s neurobehaviorálnymi zmenami, kde psychologické testy demonštrovali poruchy pozornosti a vnímania, pamäte, rýchlosti spracovania informácie, zníženej inteligencie a zhoršenej pracovnej a školskej výkonnosti (3). Podobne, aj u pacientov s 2 typom DM (T2DM) špecifické a globálne kognitívne deficity v psychomotorickej rýchlosti, verbálnej plynulosti, pozornosti, exekutívnych, vizuálno-priestorových a pamäťových schopnostiach potvrdzujú dopad DM na mozgové funkcie (4). Dlhodobé a rozsiahle štúdie, ktoré už identifikovali signifikantne vyššie riziko vzniku demencie a kognitívnych porúch u diabetických pacientov navyše poukazujú na existenciu prepojenia medzi diabetom a rizikom vzniku Alzheimerovej choroby (AD) (5). Je zaujímavé, že už prediabetickí pacienti s poruchami glukózovej tolerancie vykazujú pokles kognitívnej výkonnosti, pravdepodobne v dôsledku existencie abnormálne vysokých hladín inzulínu v dlhšom časovom horizonte (6). Pretože tieto zmeny sú v mnohom podobné zmenám pozorovaným v procese fyziologického starnutia, bola navrhnutá hypotéza zrýchleného starnutia mozgu u diabetických jedincov (7). Hoci detailné poznanie molekulárnych procesov spúšťaných DM v CNS je ešte ďaleko od úplného dešifrovania, intenzívny výskum za posledné obdobie začína poodhaľovať kľúčové aspekty mozgového metabolizmu a narušenej inzulínovej signalizácie v tomto ochorení (obr.1)



Obr.1 Schéma potenciálnych mechanizmov vedúcich k vzniku diabetickej encefalopatie, RAGE - receptor pre koncové produkty pokročilej glykácie

Patofyziologické mechanizmy diabetickej encefalopatie

I keď príčiny vzniku diabetickej encefalopatie sú multifaktoriálne a zložité, medzi hlavné mediátory podieľajúce sa na vzniku a progresii tohto ochorenia patrí narušená sekrécia inzulínu, inzulínová rezistencia, hyperglykémia, hypoglykémia a vaskulárne poškodenie.

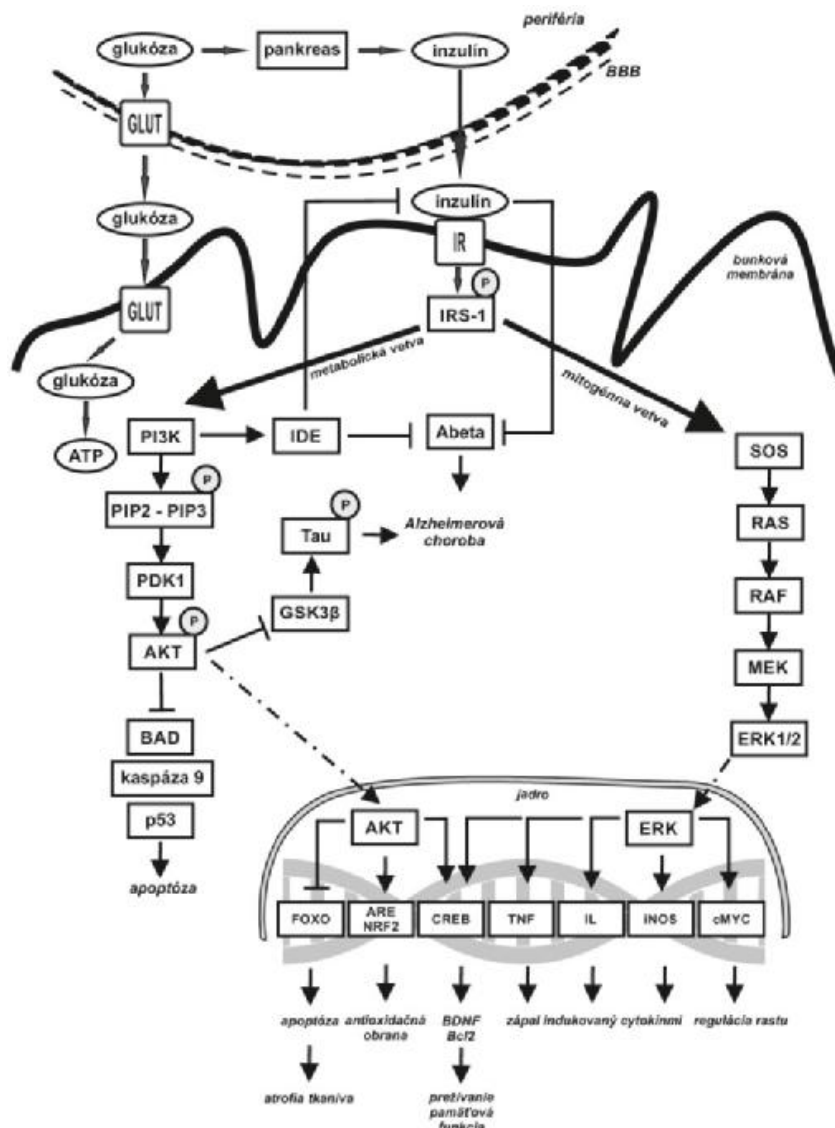
Neuróny sú odkázané na neustály prísun glukózy, ktorý nie je pod vplyvom inzulínu. Vstup glukózy do mozgu sa uskutočňuje uľahčenou difúziou pomocou glukózových transportérov (GLUT) v závislosti od extracelulárnej koncentrácie glukózy a exprese týchto transportérov v hematoencefalickej bariére. Expresia GLUT1 transportérov, kľúčových regulátorov transportu glukózy cez hematoencefalickú bariéru, je regulovaná cirkulujúcou hladinou glukózy a predpokladá sa, že je pod transkripčnou a posttranskripčnou kontrolou (8). Po vstupe glukózy do mozgu, je glukóza opäť vychytávaná mozgovými bunkami cez skupinu rôznych GLUT transportérov. Neuróny vychytávajú glukózu cez vysoko afinitný a kapacitný GLUT3 transportér, ktorého densita a distribúcia koreluje s funkciou a aktivitou neurónov (9). Regulácia exprese tohto transportéra za fyziologických i patologických podmienok nie je celkom jasná, i keď niekoľko štúdií poukazuje na účasť niektorých transkripčných faktorov (HIF1, Sp1, Sp2, CREB). Rovnako nie je jasný ani vplyv DM na expresiu a funkciu GLUT transportérov, nakoľko výsledky z početných štúdií sú značne rozporuplné a mnohé štúdie zlyhali korelovať glukózový transport s expresiou transportérov (10). Napriek nejasnostiam v transporte glukózy, hyperglykémia ako aj hypoglykémia môžu vážne poškodiť mozgové tkanivo a obidve patologické podmienky vedú ku kumulatívne efektu nepriaznivých dopadov na funkciu mozgového tkaniva. Veľké množstvo štúdií považuje za hlavných spúšťačov hyperglykémiou-indukovaného poškodenia bunky niekoľko kľúčových metabolických ciest: 1) zvýšený flux glukózy cez polyolovú cestu, 2) zvýšenú tvorbu produktov pokročilej glykácie (AGE), 3) aktiváciu proteín kinázy C a 4) stimuláciu hexozamínovej metabolickej dráhy a 5) oslabenie signálnej dráhy inzulínu (11). Zvýšená enzýmová konverzia glukózy na polyalkohol sorbitol vedie k zníženiu tvorby redukovaných ekvivalentov NADPH, poklesu hladín glutatiónu a zníženiu redoxnej sily bunky. Strata redoxnej sily vedie k oslabeniu obranného potenciálu voči ROS, mitochondriálnej dysfunkcii a zvýšenej senzitivite bunky na oxidačný stress. ROS-indukovaná dysfunkcia mitochondrií a posun z hyperaktívneho do dysfunkčného hypoaktívneho stavu boli pozorované vo viacerých štúdiách (12). Hypoaktívny metabolický stav odkláňa neuronálnu bioenergetiku z energeticky výkonnej oxidačnej fosforylácie na menej efektívny anaeróbny metabolizmus. Situácia je skomplikovaná aj skutočnosťou, že neuróny majú fyziologicky nízku aktivitu fosfofruktokinázy 2, enzýmu produkujúceho alosterický aktivátor fosfofruktokinázy 1, ktorá je kľúčovým regulátorom glykolýzy. Dôvodom takéhoto metabolického programu je nízka expresia glutamátcysteínligázy, rýchlosť-limitujúceho enzýmu v syntéze glutatiónu. Týmto spôsobom je za fyziologických podmienok smerovaná glukóza do pentózofosfátového cyklu, s cieľom produkovať potrebné množstvo NADPH a glutatiónu (13). V prípade hypoaktívneho stavu, metabolické preprogramovanie v dôsledku nedostatku energie odkláňa glukózu do glykolýzy, čo vedie ešte k výraznejšiemu poklesu tvorby redukovaných ekvivalentov a glutatiónu. Okrem toho, metabolické preprogramovanie vedie k poklesu exprese komponentov respiračného reťazca, matrixových enzýmov a nerovnováhe v mitochondriálnej biogenéze. Časovo-priestorový charakter diabetickej kaskády nakoniec produkuje homogénnu populáciu mitochondrií s podobným fenotypom, v ktorom porucha normálnej funkcie mitochondrií a suboptimálna kapacita produkovať ATP vedú v konečnom dôsledku k neurodegenerácii (14). Hypoglykémia, ako vedľajší efekt liečby DM, tiež prispieva k progresii ochorenia. Hypoglykémiou-indukované signály cez aktiváciu sympatikového nervového systému spúšťajú tvorbu autonómnych reakcií ako potenie, tremor, pocit hladu, úzkosť či búšenie srdca. Vnímanie týchto signálov je u diabetickej pacientov porušené

a redukované sympatoadrenálne odozvy vedú k vzniku syndrómu hypoglykemickej tolerancie, rekurentným hypoglykemickým epizódam a ďalšiemu znefunkčneniu regulácie metabolizmu glukózy (15). Animálne experimenty ukázali, že dlhotrvajúca hyperglykémia a inzulínom-indukované rekurentné hypoglykemické epizódy vyvolali odlišné mitochondriálne odozvy v kortexe a hipokampe, pričom hipokampálna mitochondria vykazovala vyššiu citlivosť k poškodeniu (16). Sledovanie exprese génov apoptózy v bunkách vystavených fluktujúcim hladinám glukózy ukázalo, že zmeny v koncentrácii glukózy modulovali obidve intra- aj extracelulárne apoptotické cesty. Kým glukózou indukovaný metabolický stres aktivoval najmä gény mitochondriálnej cesty apoptózy vrátane Bcl-2, kaspáz a exekútorov apoptózy, glukózou indukovaný osmotický stres moduloval extracelulárne cesty, zahŕňajúce TNF receptory, ich ligandy a efektory apoptózy (17).

Inzulín ovplyvňuje početné mozgové funkcie, akým je uvoľnenie neurotransmiterov, synaptická plasticita, pamäť, poznávanie, rast a funkcia neurónov. Periférne syntetizovaný inzulín prechádza cez hematoencefalickú bariéru saturovateľným transportom, pričom transport sa líši medzi jednotlivými mozgovými regiónmi a nie všetky regióny transportujú inzulín. Predpokladá sa aj de novo syntéza inzulínu priamo v mozgu (18). Hormón participuje v signálnych cestách a regulácii rozličných vitálnych procesov v mozgu prostredníctvom väzby na špecifické inzulínové receptory (IR). IR vykazujú vysokú homológiu s receptorom pre IGF1 a každý receptor môže viazať a reagovať na oba hormóny. Obidva receptory môžu tiež tvoriť hybridné formy receptora, ktorý viac odpovedá na väzbu IGF1 než na inzulín (19). Dysfunkčná inzulín/IGF1 signalizácia asociovaná s progresívnym zhoršením kognitívnych funkcií a neuronálnou apoptózou v hipokampe bola pozorovaná v animálnom modeli T1DM. Periférne podaný IGF1 v nízkej dávke síce nemal vplyv na hyperglykémiu, ale čiastočne bránil neurologickým poruchám a strate proteínov v mozgu diabetických potkanov (20). Inzulín po vstupe do mozgu a väzbe na IR aktivuje dve dôležité signálne cesty (Obr.2).

Metabolickú PI3K/AKT/GSK3 cestu, ktorá reguluje rast bunky, proliferáciu, syntézu proteínov a prežitie, kým mitogénna RAS/RAF/ERK1/2 vetva aktivuje diferenciáciu, proliferáciu a bunkovú smrť (21, 22). Metabolická veta cez aktiváciu AKT chráni bunky pred apoptotickými stimulmi inaktíváciou proteínov apoptotickej kaskády ako BAD, kaspáza 9, proteínkináza GSK3, p53 alebo transkripčných faktorov FOXO skupiny (23). V myšiach s T2 DM redukovaná aktivita AKT viedla k jej translokácii do jadra, zníženej fosforylácii FOXO a aktivácii niekoľkých transkripčných faktorov spojených s apoptózou (24). Je zaujímavé, že FOXO transkripčné faktory vykazujú špecifickú expresiu v niektorých mozgových regiónoch ako napr. hipokampus a pravdepodobne tvoria špecifické koncové body inzulínovej signalizácie ovplyvňujúce pamäťové a synaptické funkcie. Ďalším cieľom inzulínovej signalizácie je CREB. Jeho fosforylácia zlepšila funkciu mitochondrií s následným zvýšením intracelulárnych hladín ATP, hladín NAD(P)H, aktivity hexokinázy a viedla k aktivácii neuronálneho metabolizmu glukózy. Aktivovaná mitochondriálna funkcia korelovala so zvýšenou GLUT1 a Bcl-2 expresiou, zvýšenou odolnosťou mitochondriálnej membrány voči otvoreniu permeabilného póru a rezistenciou voči úniku cytochrómu c (25). Okrem toho, PI3K/AKT aktivácia podporila antioxidačnú obranu stimuláciou ARE/NRF2/Keap1 antioxidačnej cesty (26).

ERK1/2 cesta tvorí paralelnú vetvu signalizácie inzulínu a je zodpovedná za početné formy synaptickej plasticity a tiež bunkovú smrť. Štúdie na bunkových kultúrach ukázali, že aktivácia tejto cesty viedla k expresii iNOS, TNF, IL-1 génov a zvýšenej produkcii cytokínov (27). Dopad inzulínu na CNS zahŕňa aj jeho schopnosť modulovať metabolizmus β amyloidu (Ab) a fosforyláciu Tau proteínu cez AKT, GSK3 a ERK1/2 cesty. Zvýšená produkcia a extracelulárna agregácia Ab a intracelulárna akumulácia hyperfosforylovaného Tau proteínu sú považované za hlavné patologické znaky Alzheimerovej choroby.



Obr.2 Zjednodušená schéma inzulínovej signalizácie v mozgu. Inzulín po vyplavení z pankreasu prechádza cez hematoencefalickú bariéru a vstupuje do CNS. V CNS aktivuje po väzbe na inzulínový receptor (IR) dve cesty: metabolickú vetvu, vedúcu k aktivácii PI3K/AKT a mitogénnu RAS/ERK vetvu. Hyperglykémia, chronická periférna hyperinzulinémia a inzulínová rezistencia vedú k redukovanému transportu inzulínu do mozgu a redukovanej aktivite IR. Porušená inzulínová signalizácia ovplyvňuje aktivitu niekoľkých transkripčných faktorov, čo má za následok abnormálnu funkciu bunky, iniciáciu zápalových procesov a apoptózy, neuronálnu stratu a tkanivovú atrofiu. Abnormality v inzulínovom metabolizme spúšťajú a urýchľujú výskyt neuropatologických znakov podobných Alzheimerovej chorobe.

Animálne experimenty demonštrovali, že redukovaná inzulínová signalizácia znížila fosforyláciu AKT a GSK3β a súčasne zvýšila fosforyláciu Tau proteínu a Ab v mozgu (28).

Administrácia inzulínu bola čiastočne schopná redukovať hladiny fosforylovaného Tau proteínu a zlepšiť pamäťové a poznávacie schopnosti (29). Situácia je skomplikovaná aj skutočnosťou, že inzulín súperí s Ab o inzulín degradujúci enzým (IDE) a redukované množstvo IDE môže viesť k väčšej kumulácii amyloidu a neurotoxicite. Štúdium PI3K/AKT signálizačnej cesty v postmortem kortikálnych vzorkách u jedincov s AD, T2DM a obidvoma ochoreniami T2DM+AD potvrdilo zmeny v tejto signálizačnej ceste. Tieto zmeny boli závažnejšie u jedincov s T2DM a T2DM+AD a negatívne korelovali s hladinou fosforylovaného Tau proteínu (30). Na základe týchto výskumov sa preto predpokladá, že molekulárne defekty asociované s vývojom DM prispievajú k zvýšenému riziku vzniku všetkých typov demencie vrátane Alzheimerovej choroby.

Záver

Diabetická encefalopatia je v súčasnosti akceptovanou komplikáciou DM, nakoľko ochorenie je asociované s početnými zmenami vo fyziologickej činnosti mozgu. Neurologické komplikácie diabetu v CNS zahŕňajú zvýšené riziko vzniku demencie a kognitívnych porúch, či už vaskulárneho alebo AD typu. Hoci molekulárne mechanizmy diabetickej encefalopatie sú zložité a nejasné, intenzívny výskum naznačuje, že poruchy inzulínovej signalizácie, abnormálny glukózový metabolizmus, amyloidogenéza a oxidačný stres sú spoločnými menovateľmi vo vývoji a progresii tejto komplikácie DM. Pretože inzulínová rezistencia je považovaná za hlavný mechanizmus implikovaný v neurodegenerácii, mnohé štúdie už testovali dostupné antidiabetické liečivá ako metformín a tiazolidíndióny (glitazóny), s cieľom zistiť ich potenciál znižovať riziko kognitívnych porúch. Zatiaľ však neexistuje žiaden relevantný dôkaz, že tieto liečivá sú schopné ovplyvniť riziko vzniku neurodegeneratívnych zmien. Nové liečebné metódy, ako intranazálna aplikácia inzulínu využívajúca rýchly prienik inzulínu do mozgu ponúka určité sľubné perspektívy (31), avšak výsledky sú zatiaľ stále kontroverzné. Preto intenzívny výskum s cieľom poznať detailne molekulárne vzťahy medzi porušenou inzulínovou signalizáciou, kognitívnymi poruchami a AD otvorí nové terapeutické možnosti liečby diabetickej encefalopatie.

Literatúra

- 1.Jongen C, Biessels GJ.** Structural brain imaging in diabetes: a methodological perspective, *Eur J Pharmacol.* 2008 May 6;585(1):208-18, vol. 585, no. 1, pp. 208-18, 2008.
- 2.Hoffman WH, Artlett CM, Zhang W, Kreipke CW, Passmore GG, Rafols JA, Sima AA.** Receptor for advanced glycation end products and neuronal deficit in the fatal brain edema of diabetic ketoacidosis. *Brain Res.* 2008; 1238: 154-162
- 3.Lin A, Northam EA, Rankins D, Werther GA, Cameron FJ.** Neuropsychological profiles of young people with type 1 diabetes 12 yr after disease onset. *Pediatr Diabetes.* 2010; 11(4): 235-243
- 4.Williamson JD, Launer LJ, Bryan RN, Coker LH et al.,** Cognitive function and brain structure in persons with type 2 diabetes mellitus after intensive lowering of blood pressure and lipid levels: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med.* 2014; 174(3): 324-333
- 5.Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM.** Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology.* 1999; 53(9): 1937-1942
- 6.Yaffe K, Blackwell T, Kanaya AM, Davidowitz N, Barrett-Connor E, Krueger K.** Diabetes, impaired fasting glucose, and development of cognitive impairment in older women. *Neurology.* 2004; 63(4): 658-663
- 7.Biessels GJ, Gispen WH.** The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? *Neurobiol Aging.* 2005; 26 Suppl 1: 36-41

- 8.Šoltésová D, Veselá A, Mravec B, Herichová I.** Daily profile of glut1 and glut4 expression in tissues inside and outside the blood-brain barrier in control and streptozotocin-treated rats. *Physiol Res.* 2013; 62 Suppl 1: S115-124
- 9.Benarroch EE.** Brain glucose transporters: implications for neurologic disease. *Neurology.* 2014; 82:1374-1379
- 10.Shah K, Desilva S, Abbruscato T.** The Role of Glucose Transporters in Brain Disease: Diabetes and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(10): 12629-12655
- 11.Rolo AP, Palmeira CM.** Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212(2):167-78
- 12.Mastrocola R, Restivo F, Vercellinato I, Danni O, Brignardello E, Aragno M, Boccuzzi G.** Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J Endocrinol.* 2005; 187: 37-44
- 13.Bolaños JP, Almeida A, Moncada S.** Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway?. *Trends Biochem Sci* 2010; 35: 145-149
- 14.Chowdhury SK, Dobrowsky RT, Fernyhough P.** Nutrient excess and altered mitochondrial proteome and function contribute to neurodegeneration in diabetes. *Mitochondrion.* 2011; 11(6): 845-854
- 15.Cryer PE, Davis SN, Shamooh H.** Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care.* 2003; 26(6): 1902-1912
- 16.Cardoso S, Santos RX, Correia SC, Carvalho C. et al.** Insulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. *Neurobiol Dis.* 2012; 49C: 1-12
- 17.Russo VC, Higgins S, Werther GA, Cameron FJ.** Effects of fluctuating glucose levels on neuronal cells in vitro. *Neurochem Res.* 2012; 37(8): 1768-1778
- 18.Clarke DW, Mudd L, Boyd FT Jr, Fields M, Raizada MK.** Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture. *J Neurochem.* 1986; 47(3): 831-836
- 19.Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R.** Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev.* 2009; 30(6): 586-623
- 20.Lupien SB, Bluhm EJ, Ishii DN.** Effect of IGF-I on DNA, RNA, and protein loss associated with brain atrophy and impaired learning in diabetic rats. *Neurobiol Dis.* 2006; 21(3): 487-495
- 21.Plum L, Schubert M, Brüning JC.** The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab.* 2005; 16(2): 59-65
- 22.van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP.** Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol.* 2006; 79(4): 205-221
- 23.Mackenzie RW, Elliott BT.** Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014; 7: 55-64
- 24.Zemva J, Schilbach K, Stöhr O, Moll L, Franko A, Krone W, Wiesner RJ, Schubert M.** Central FoxO3a and FoxO6 expression is down-regulated in obesity induced diabetes but not in aging. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012; 120(6): 340-350
- 25.Huang TJ, Verkhatsky A, Fernyhough P.** Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2005; 28(1): 42-54
- 26.Chandiramani N, Wang X, Margeta M.** Molecular basis for vulnerability to mitochondrial and oxidative stress in a neuroendocrine CRI-G1 cell line. *PLoS One.* 2011; 6(1): e14485
- 27.Kim SH, Smith CJ, Van Eldik LJ.** Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production. *Neurobiol Aging.* 2004; 25(4): 431-439

- 28.Jolivald CG, Lee CA, Beiswenger KK, Smith JL, Orlov M, Torrance MA, Masliah E.** Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J Neurosci Res.* 2008; 86(15): 3265-3274
- 29.Planel E, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Liu L et al.** Insulin dysfunction induces in vivo tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. *J Neurosci.* 2007; 27(50): 13635-13648
- 30.Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX.** Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J Pathol.* 2011; 225(1): 54-62
- 31.Reger MA, Watson GS, Green PS et al.,** Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology.* 2008;70(6):440-8

OXIDAČNÝ STRES U PACIENTOV S NÁHLOU CIEVNOU MOZGOVOU PRÍHODOU

(Oxidative stress in patients after the acute ischemic stroke)

Petra Pazderová¹, Pavol Šiarnik², Branislav Kollár², Peter Turčáni², Katarína Koňariková¹, Ingrid Žitňanová¹

¹ Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72, Bratislava. petra@gmail.com

² I. neurologická klinika LF UK a UN, Mickiewiczova 13, Bratislava

Súhrn

Náhla cievna mozgová príhoda (NCMP) je po kardiovaskulárnych a nádorových ochoreniach treťou najčastejšou príčinou smrti v priemyselne vyspelých krajinách. V patogenéze NCMP hrajú dôležitú úlohu predovšetkým voľné radikály odvodené od kyslíka a dusíka. Tieto spôsobujú poškodenie biologicky významných makromolekúl v organizme ako sú proteíny, lipidy a nukleové kyseliny. Cieľom našej štúdie bolo stanoviť hladiny lipoperoxidov (markerov oxidačného poškodenia lipidov) v plazme pacientov po NCMP v troch časových intervaloch – do 24h po NCMP, týždeň a tri mesiace po NCMP a tieto porovnať s hladinami lipoperoxidov zdravých dobrovoľníkov. Zistili sme, že pacienti do 24 hodín po NCMP majú signifikantne zvýšenú hladinu lipoperoxidov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Hladina lipoperoxidov sa u pacientov s NCMP znižovala s časom, čo môže byť ovplyvnené snahou endogénnych antioxidantov eliminovať voľné radikály, ktoré sa vytvorili v organizme počas ischémie a reperfúzie.

Kľúčové slová

Náhla cievna mozgová príhoda, oxidačný stres, marker, ichémia, reperfúzia

Summary

Stroke is after cardiovascular diseases and cancer the third leading cause of death in industrialized countries. In pathogenesis of cancer mainly oxygen and nitrogen radicals play important role. These radicals cause the damage to biologically important molecules such as proteins, lipids and nucleic acids. The aim of our work was to determine lipoperoxide levels (markers of lipid oxidation damage) in plasma of patients after stroke at three time intervals – within 24h after stroke (A), a week (B) and three months (C) after stroke and to compare them with lipoperoxide levels of healthy volunteers. We found out, that samples A had significantly increased level of lipoperoxides in comparison with the control group. The level of lipoperoxides was decreasing with time in patients after the stroke, which can be caused by the action of antioxidants trying to eliminate free radicals created during ischemia and reperfusion accompanying the stroke.

Keywords

Stroke, oxidative stress, marker, ischemia, reperfusion

Úvod

Ischemická náhla cievna mozgová príhoda (NCMP) je akútna neurologická dysfunkcia cievneho pôvodu spôsobená znížením až zastavením prívodu zdrojov energie do mozgu. Pri ischémii dochádza k poklesu perfúzie nervového tkaniva na také nízke hodnoty, že nie je možné mozgu zabezpečiť jeho metabolické požiadavky (1).

Mozog, ako orgán s vysokou spotrebou kyslíka a metabolickou aktivitou je na oxidačný stres obzvlášť citlivý, čo sa prejavuje zvýšenou tvorbou reaktívnych metabolitov kyslíka (RMK) spolu s nízkou hladinou endogénnych antioxidačných enzýmov. Navyše, vysoký obsah lipidov v nervovom tkanive mozgu má tendenciu reagovať s RMK za vzniku peroxylových radikálov, čoho dôsledkom je oxidácia lipidov v membránach nervových buniek (2).

Napriek vysokej citlivosti mozgu na poškodenie, má tento orgán bez ohľadu na vek určitú schopnosť regenerácie. V tomto procese dochádza k zvýšeniu plasticity synaptických spojení v blízkosti zasiahnutého tkaniva, čím sa dosiahne opätovné prekrvenie tkaniva. Existujú viaceré mechanizmy zabezpečujúce opätovnú aktiváciu tkaniva mozgu, najmä jeho nervovú vzrušivosť a plasticosť. Ide predovšetkým o metabolicky aktívne neuróny zodpovedné za zvýšenie tvorby a uvoľňovania reaktívnych metabolitov kyslíka a dusíka. Štúdie funkčných neurologických zobrazení taktiež dokazujú, že aj rehabilitačné zásahy môžu prispieť k reorganizácii, pretože majú pozitívny vplyv na plasticosť nervového systému umožňujúcu nervovú komunikáciu v ostatných častiach mozgu ako aj zvýšenie nervovej aktivity predtým poškodených nervových spojení. Intenzívna rehabilitácia nervového systému by však mala začať čo najskôr po mozgovej porážke (3).

Cieľom našej práce bolo vyšetriť dynamiku zmien hladín lipoperoxidov plazmy u pacientov s ischemickou NCMP v 3 rôznych časových intervaloch a porovnať ich s hladinami lipoperoxidov v krvi kontrolných jedincov.

Materiál a metódy

Pacienti a kontroly

Vzorky krvnej plazmy s etyléndiamíntetraoctovou kyselinou (EDTA) sme získali od 76 zdravých dobrovoľníkov (priemerný vek $65,38 \pm 1,00$). Medzi zdravými dobrovoľníkmi sme mali 41 žien (priemerný vek $64,98 \pm 1,28$) a 35 mužov (priemerný vek $65,86 \pm 1,60$). Výsledky kontrol sme porovnávali s 82 pacientmi po NCMP (priemerný vek $68,36 \pm 1,82$). Medzi pacientmi po NCMP sme mali 35 žien (priemerný vek $75,61 \pm 2,30$) a 47 mužov (priemerný vek $63,26 \pm 2,39$). Vzorky plazmy sme odobrali pacientom v troch časových intervaloch: v prvom dni po NCMP (82 vzoriek), týždeň po NCMP (53 vzoriek) a tri mesiace po NCMP (17 vzoriek). V odbere vykonanom týždeň po NCMP sme mali 23 žien a 30 mužov. V odbere vykonanom tri mesiace po NCMP sme mali 5 žien a 12 mužov. Plazmu sme pripravili centrifugáciou krvi s antikoagulantom EDTA a uskladnili pri -70°C . V kontrolnej skupine sme získali krv ráno po nočnom hladovaní. Všetci dobrovoľníci v štúdiu podpísali informovaný súhlas so zaradením do projektu. Pacienti po NCMP sa podrobili neurologickým vyšetreniam, pričom sa zaznamenávali cievne rizikové faktory vrátane hypertenzie a diabetu.

Stanovenie hladín lipoperoxidov

Pri stanovovaní hladín lipoperoxidov v plazme sme použili metódu založenú na schopnosti peroxidov premieňať jodid (I^-) na jód (I_2). Nadbytok jodidu v reakčnej zmesi má tendenciu ďalej reagovať s I_2 za vzniku I_3 s absorbným maximom pri 365 nm (4). Spektrofotometrické meranie sme realizovali pomocou mikrotitračnej platničky. Každú vzorku sme merali trojmo. Pripravenú platničku sme inkubovali v chlade po dobu 30. minút. Po uplynutí doby inkubácie sme odmerali absorbancie pri vlnovej dĺžke 365 nm na prístroji Epoch Microplate

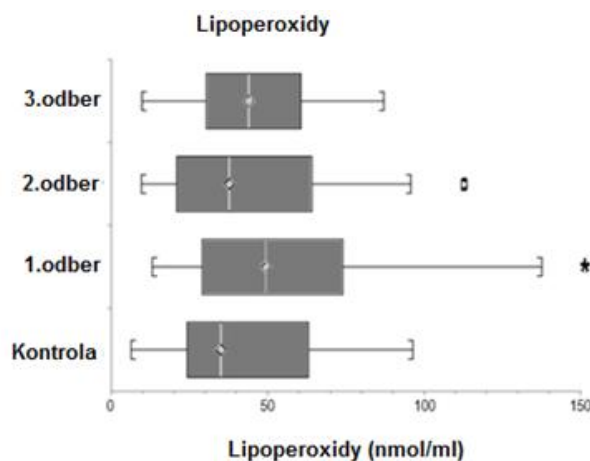
Spectrophotometer model Bio-Tek. Koncentrácie lipoperoxidov sme určili z rozdielu absorbancií vzoriek a porovnávacieho roztoku.

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Namerané hodnoty sme vyjadrili ako medián a interquartilové rozmedzie (IQR) pre dáta s odchýlkou od normality. Na posúdenie normality dát sme použili Shapiro-Wilkov test. Neparametrický Mann-Whitney test sme použili pre analýzu dát dvoch rozdielnych skupín (kontrola a NCMP) s nenormálnym rozdelením a neparametrický Wilcoxonov test pre analýzu viacerých odberov v rámci jednej skupiny s nenormálnou distribúciou. Na posúdenie štatistickej významnosti korelácií v dátach s nenormálnym rozdelením sme použili Spearmanov korelačný test. Hladinu signifikancie sme definovali ako $p \leq 0,05$.

Výsledky

Stanovili sme hladiny lipoperoxidov plazmy (obr. 1) zdravých jedincov (kontrola) a pacientov po NCMP v troch časových intervaloch: do 24h po NCMP (1. odber), po 7 dňoch (2. odber) a po 3 mesiacoch od NCMP (3. odber). Výsledky sú uvedené na obr.1.

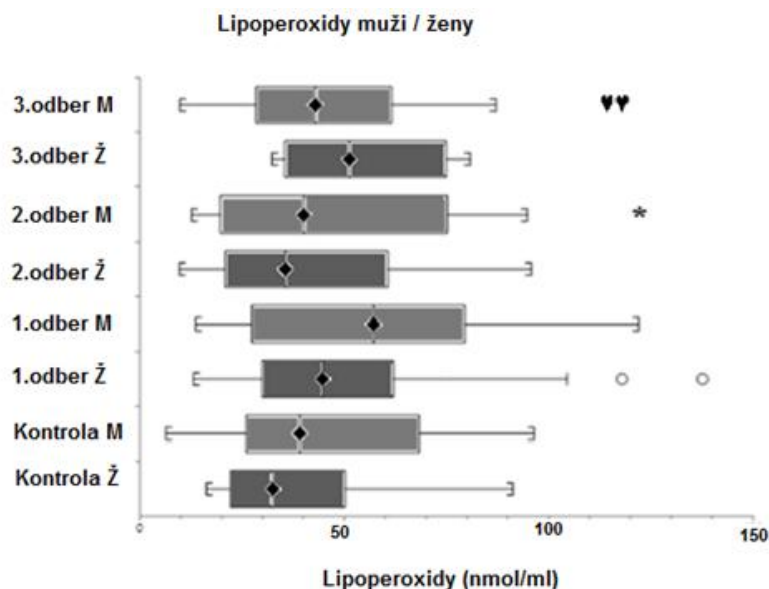


Obr. 1 Hladiny lipoperoxidov plazmy zdravých kontrol a pacientov do 24 hodín od NCMP (1. odber), po 7 dňoch (2. odber) a po 3 mesiacoch (3. odber) od NCMP. Výsledky sú uvedené ako medián a IQR (1.kvartil – 3.kvartil). * $P < 0,05$ – porovnanie hladín lipoperoxidov u pacientov s NCMP voči zdravým jedincom (kontrola). ° $P < 0,05$ – porovnanie hladín lipoperoxidov pacientov s NCMP (2. odber) voči pacientom s NCMP (1.odber).

Hladiny lipoperoxidov krvnej plazmy boli u pacientov v prvom dni po NCMP signifikantne vyššie v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,05$). Zároveň sme zaznamenali signifikantne zníženie hladiny lipoperoxidov ($p < 0,05$) po 7 dňoch od NCMP v porovnaní s hladinou lipoperoxidov nameranou do 24 hodín od NCMP. Avšak hladiny lipoperoxidov po 7 dňoch a po 3 mesiacoch po NCMP boli na úrovni zdravých kontrol.

Porovnaním lipoperoxidov medzi pohlaviami sme lipoperoxidov u mužov než u žien s výnimkou odberu po 3 mesiacoch po NCMP. Najvýraznejšie zvýšenie tohto markera oxidačného poškodenia lipidov sme stanovili v skupine pacientov do 24 h po NCMP v porovnaní s kontrolnou skupinou jedincov (obr. 2). Tieto rozdiely však boli pod hladinou významnosti ($p > 0,05$). V druhom odbere sme u mužov zaznamenali signifikantný pokles hladín lipoperoxidov v porovnaní s odberom vykonaným do 24 h ($p < 0,05$). Rovnaký trend

sme u mužov zaznamenali aj pri porovnaní hladín lipoperoxidov v treťom odbere s odberom do 24 h po NCMP ($p < 0,01$). Medzi ženami sme významné rozdiely v odberoch nenašli.



Obr. 2 Hladiny lipoperoxidov plazmy zdravých kontrol a pacientov s NCMP do 24 hodín od NCMP (1. odber), po 7 dňoch (2. odber) a po 3 mesiacoch od NCMP (3. odber) v závislosti od pohlavia, muži (M), ženy (Ž). Výsledky sú uvedené ako medián a IQR (1.kvartil – 3.kvartil). * $P < 0,05$ – porovnanie hladín lipoperoxidov mužov po NCMP (2. odber) voči mužom po NCMP (1.odber). ** $P < 0,01$ – porovnanie hladín lipoperoxidov mužov po NCMP (3. odber) voči mužom po NCMP (1.odber).

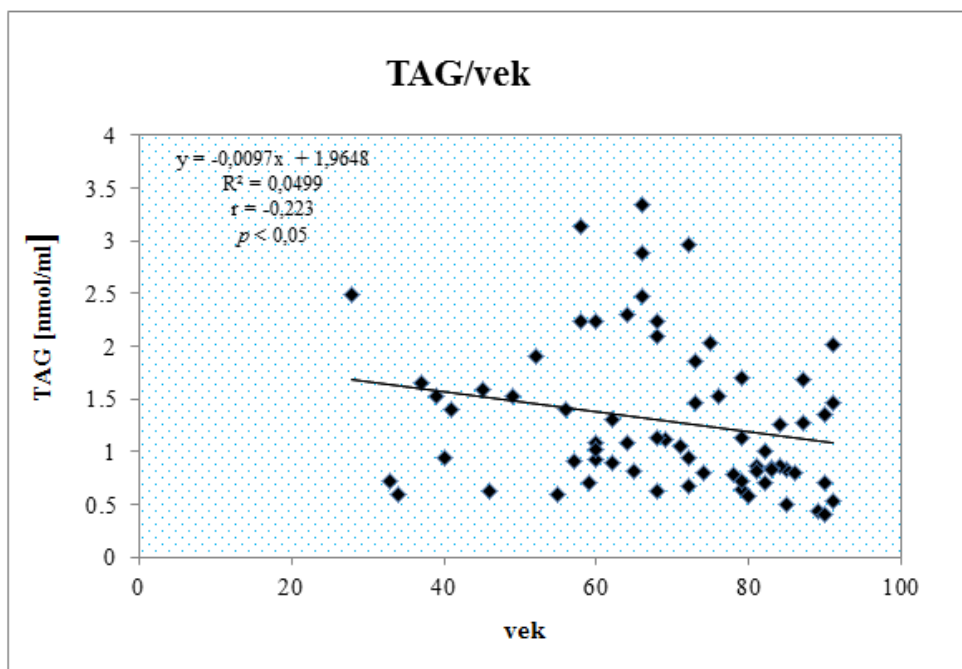
Korelovaním hladín lipoperoxidov s lipidovými parametrami (cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triacylglyceroly (TAG), lipoperoxidy) a vekom sme u pacientov do 24 hodín po NCMP zaznamenali negatívnu koreláciu medzi lipoperoxidmi a vekom ($p < 0,01$) (tabuľka 1). Za nižšie hladiny lipoperoxidov vo vyššom veku je pravdepodobne zodpovedná s vekom sa znižujúca hladina TAG ($p < 0,05$), hlavného substrátu pre tvorbu lipoperoxidov (obr. 3).

U kontrolnej skupiny pacientov sme zaznamenali pozitívnu koreláciu medzi lipoperoxidmi ($p < 0,05$) a TAG (tabuľka 2).

Parametre	r	p
Lipoperoxidy/vek	-0,097	NS
Celkový cholesterol/lipoperoxidy	0,004	NS
HDL-cholesterol/lipoperoxidy	-0,352	$p < 0,05$
LDL-cholesterol/lipoperoxidy	0,068	NS
TAG/lipoperoxidy	0,022	NS

NS – nesignifikantné

Tab.1 Korelačné koeficienty r a p medzi lipoperoxidmi (NCMP 1. odber) a inými parametrami a ich potenciálna signifikancia



Obr. 3 Korelácia lipoperoxidov s vekom u pacientov do 24 h po NCMP.

Korelácie	r	p
Lipoperoxidy/vek	-0,092	NS
Celkový cholesterol/lipoperoxidy	0,063	NS
HDL-cholesterol/lipoperoxidy	-0,068	NS
LDL-cholesterol/lipoperoxidy	-0,037	NS
TAG/lipoperoxidy	0,294	$p < 0,05$

NS – nesignifikantné

Tab.2 Korelačné koeficienty r medzi lipoperoxidmi (**Kontroly**) a inými parametrami a ich potenciálna signifikancia

Diskusia a záver

Oxidačný stres zohráva kľúčovú úlohu pri vzniku mnohých ochorení, medzi nimi aj NCMP, ktorej incidencia sa v posledných rokoch stále zvyšuje. Pretože sa s ňou spája zvýšenie koncentrácie kyslíkových, ako aj dusíkových radikálov v krvi, zamerali sme sa v tejto štúdii na porovnanie hladín lipoperoxidov (produktov oxidačného poškodenia lipidov) krvnej plazmy zdravých jedincov s pacientmi po NCMP v troch časových intervaloch.

Zistili sme signifikantne vyššie hodnoty lipoperoxidov v prvom dni po NCMP. Tento výsledok potvrdzujú aj iní zahraniční autori (5,6). Signifikantne zvýšené hladiny lipoperoxidov boli navyše zistené aj u pacientov s hemoragickou NCMP (7). Po 7 dňoch od NCMP sme zaznamenali znížené hladiny lipoperoxidov v porovnaní s odberom vykonaným do 24 hodín po NCMP, čo potvrdzujú aj autori, ktorí sledovali hladiny malondialdehydu (marker poškodenia lipidov). Jeho hodnoty boli u pacientov do 24 hodín po NCMP zvýšené.

Po siedmich dňoch po NCMP sa ale vyrovnali hodnotám nameraným v kontrolnej skupine jedincov (8). Po troch mesiacoch od NCMP sa hodnoty lipoperoxidov v našej štúdii už významne nezmenili. Porovnaním lipoperoxidov v rámci pohlavia, sme zaznamenali významný pokles lipoperoxidov u mužov v skupine 7 dní po NCMP v porovnaní so skupinou mužov do 24h po NCMP. U žien sme takýto výrazný trend nezaznamenali, navyše ženám v odbere vykonanom 3 mesiace po NCMP lipoperoxidy opäť mierne stúpili, čo ale mohlo byť spôsobené nízkym počtom vzoriek (5) v danom odbere. Tento výsledok však ovplyvnil výsledný nesignifikantný pokles lipoperoxidov celej analyzovanej skupiny v treťom odbere v porovnaní s odberom vykonaným do 24 hodín po NCMP. Koncentrácia lipoperoxidov sa teda pri NCMP výrazne zvyšuje, čo je odrazom zvýšeného oxidačného stresu počas ischemickej a reperfúznej fázy NCMP. Následnou rýchlou aktiváciou antioxidačných mechanizmov v tele ale dochádza k vytvoreniu rovnováhy medzi tvorbou a degradáciou prooxidantov, čoho dôsledkom je výrazný pokles lipoperoxidov už týždeň po NCMP. Tieto hodnoty sa už v priebehu dlhšieho časového obdobia výrazne nemenia. Významná bola dynamika zmien lipoperoxidov najmä u mužov. Výrazne lepší lipidový profil poukazuje na vyššiu snahu eliminovať voľné radikály v ich tele.

Záver

Starostlivosť o zdravie sprostredkovaná konzumáciou dostatočného množstva vitamínov, antioxidantov a zdravým životným štýlom s dostatkom pohybu je dôležitá nielen pre elimináciu radikálov v tele, ale aj na prevenciu pred ďalšími ochoreniami.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená grantom MZ 2012/10-UKBA-10.

Literatúra

- Hickey, J. V.:** The clinical practice of neurological and neurosurgical nursing. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 2003.
- Bretón, R. R., Rodríguez, J. C. G.:** Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke. Department of Physiology & Immunology, University of Barcelona. CENPALAB. Spain. Cuba. 2012. 30-51.
- Ciancarelli, L., Pistarini, C., Carolei, A., Ciancarelli, M.G.T.:** Oxidative Stress in Post-Acute Ischemic Stroke Patients: Relevance of Early Intensive Neurorehabilitation. J Neurol Neurophysiol 4, 2010. s. 154.
- El-Saadani, M., Eatenbauer, H., Sayed, M., Goher, M., Nassar, A.Y., Jurgens, G.:** A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. Journal of Lipid Research, 30. 1989. s. 627-630.
- Alexandrova, M.L., Bochev, P.G., Markova, V.I., Bechev, B.G., Popova, M.A., Danovska, M.P., Simeonova, V.K.:** Oxidative stress in the chronic phase after stroke. Redox Rep. 2003. 8 (3). 169-76.
- Nanetti, L., Raffaelli, F., Viginini, A., Perozzi, C., Silvestrini, M., Bartolini M., Provinciali, L., Mazzanti, L.:** Oxidative stress in ischaemic stroke. Department of Biology., Università Politecnica delle Marche. 2011. 41 (12).
- Chen, H.H., Zhou, J.F.:** Low cholesterol in erythrocyte membranes and high lipoperoxides in erythrocytes are the potential risk factors for cerebral hemorrhagic stroke in human. Biomed Environ Sci. 2001. 14 (3). s. 189-98.
- Demirkaya, S., Topcuoglu, M.A., Aydin, A., Ulas, U.H., Isimer, A.I., Vural, O.:** Malondialdehyde, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in peripheral blood erythrocytes of patients with acute cerebral ischemia. Eur J Neurol. 2001. 8 (1). 43-51.

UBIKVITÍN PROTEAZÓMOVÝ SYSTÉM A JEHO INHIBÍCIA V LIEČBE RAKOVINY

(Ubiquitin-Proteasome system and its inhibition in cancer therapy)

Jana Frivaldská¹, Ingrid Žitňanová¹, Katarína Koňariková¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Špitálska 24, 813 72 Bratislava, Slovensko, katarina.konarikova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Ubikvitín- proteazómový systém hrá dôležitú úlohu v osude proteínov, ktoré sa podieľajú na bunkových procesoch vrátane bunkovej proliferácie, bunkovej smrti, prenosu signálu, génovej expresie, bunkového cyklu a imunitnej odpovede. Proteazómy sú vysoko selektívne komplexy degradujúce iba tie proteíny, ktoré sú označené ubikvitínom. Mnoho ochorení vrátane rakoviny je úzko spojených s aktivitou proteazómu, čo z neho urobilo dôležitý farmakologický cieľ. V súčasnosti je väčšina inhibítorov proteazómu zameraná na regulovanie proteolytickej aktivity, hoci so stále lepšou znalosťou štruktúry proteazómov vzniká snaha navrhnúť molekuly, ktoré sa zamerajú na iné fyziologicky dôležité enzymatické aktivity proteazómu vrátane de-ubikvitinizačnej (1).

Kľúčové slová

Proteazóm, inhibítory proteazómu, deubikvitinázy

Summary

Proteasome plays a critical role in the fate of proteins that are involved in cellular processes including signal transduction, gene expression, cell cycle and immune response. Proteasomes are highly selective complexes destroying only the proteins that are labelled with ubiquitins. Many diseases including cancer are closely associated with the activity of proteasome making him an important pharmacological target. Currently, majority of inhibitors are aimed at regulation the proteolytical activity of proteasomes, though better knowledge of the structure of proteasomes provides opportunities to design new small molecules that target other physiologically important enzymatic activities of proteasome including de-ubiquitinating one (1).

Key words

Proteasome, proteasome inhibitors, deubiquitinases

Úvod

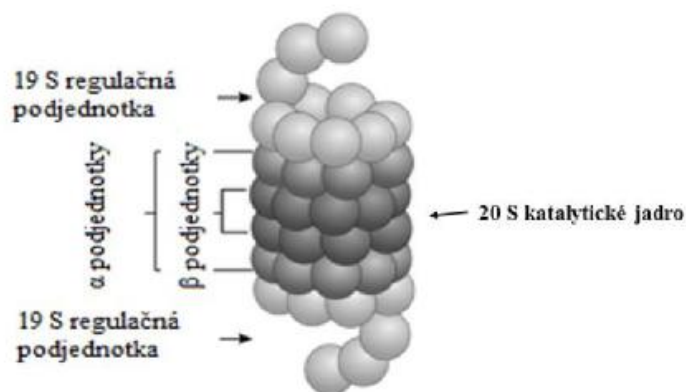
Kontrolovaný obrat proteínov je nevyhnutný pre väčšinu bunkových procesov vrátane bunkovej proliferácie a bunkovej smrti. Rýchlosť tohto obratu je riadené 26S proteazómom, vysoko konzervovaným proteázovým komplexom s nezastupiteľnou úlohou v regulácii hladiny proteínov v cytoplazme a jadre eukaryotických buniek (2).

Jedným z hlavných znakov rakovinových buniek je strata regulačných bodov v bunkovom cykle, čo ústí do mutácií pri replikácii DNA, následkom ktorých sa v transformovaných bunkách hromadí veľa defektných proteínov. Viaceré štúdie dokázali, že farmakologická

inhibícia proteazómu spôsobí zmenu rovnováhy medzi pro- a proti- apoptickými proteínmi v prospech nahromadenia tumor supresorových proteínov, čo vedie k apoptóze (3).

Štruktúra proteazómu

26S proteazóm sa skladá z 20S katalytického jadra, ktoré je obklopené dvoma 19S regulačnými časticami (obr.1). 20S proteazóm je dutá cylindrická častica pozostávajúca zo štyroch kruhovito usporiadaných prstencov. Každý vonkajší prstenec pozostáva zo siedmich rôznych α podjednotiek, zatiaľ čo každý vnútorný prstenec obsahuje sedem β podjednotiek (4). Miesto štiepenia označeného proteínu je v β prstencoch. Podjednotka $\beta 5$ má aktivitu podobnú chymotrypsínu, $\beta 2$ aktivitu podobnú trypsínu a $\beta 1$ aktivitu podobnú kaspázam (1). Na rozdiel od väčšiny proteáz, ktoré majú ľahko dostupné aktívne miesta, proteazóm má aktívne miesta smerujúce do vnútornej dutiny katalytického jadra 20S čím zabráňuje nekontrolovanej deštrukcii bunkových proteínov (4). Hlavnou úlohou 19S komplexu je pripraviť substrát na degradáciu v katalytickom jadre. Pripájajú teda ubiquitínovaný substrát, odstraňujú skupiny ubiquitínu z proteínov, uvoľňujú proteín a smerujú ho do katalytického jadra na následnú proteolytickú degradáciu. Biochemické štúdie rozdelili regulačné častice na dve časti: „základňu“, ktorá je zložená zo šiestich ATP-ázových podjednotiek Rpt 1-6 (regulatory particle triple A 1-6) tvoriacich heterohexamérny kruh tvorený tromi párami dimérov. Prvé dva sú zviazané s dvoma najväčšími podjednotkami Rpn1 a 2 (regulatory particle non-ATPase 1 a 2). Hlavnou úlohou všetkých podjednotiek je priviesť ubiquitínované proteíny do proteazómu. Druhou časťou je „vrchnák“, ktorý sa skladá z deviatich podjednotiek Rpn3 a Rpn5-12, ktorého hlavnou úlohou je „deubikvitinovať“ cieľový proteín počas premiestňovania na 20S časticu (1).

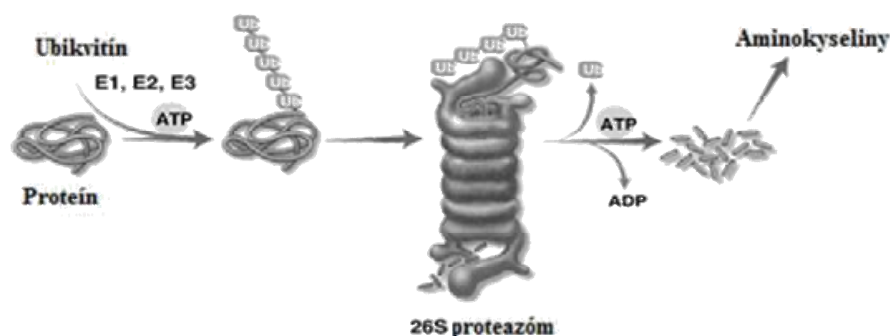


Obr.1 Štruktúra proteazómu (5)

Degradácia proteínov je umožnená konjugáciou s viacerými jednotkami ubiquitínu (obr.2). Ubikvitín sa kovalentne viaže na proteíny enzymatickou reakciou vyžadujúcou Ub-aktivujúci (E1), Ub -konjugujúci (E2) a Ub-ligujúci enzým(E3) (4). Jeho pripájaním môžu vzniknúť až ubiquitínové „reťaze“ na jednom alebo viacerých lyzínových zvyškoch substrátu. Proteíny modifikované ubiquitínovou „reťazou“ sa viažu na ubiquitínové receptory, čím sa pripoja k 26S proteazómu (6).

Okrem vyššie popísaného konštitutívneho 20S proteazómu existuje tiež tzv. imunoproteazóm 20Si, ktorý obsahuje odlišné katalytické podjednotky nazvané $\beta 1i$, $\beta 2i$ a $\beta 5i$. Pod vplyvom stimulácie cyklínmi napr. interferónom γ a TNF- α sa dramaticky zvýši expresia $\beta 1i$, $\beta 2i$, a $\beta 5i$

a začlenia sa do tvoriacej sa častice 20S vytvorením 20Si imunoproteazómu. Katalytické jadro 20Si je z každej strany obklopené jednotkami 11S a nie 19S. Imunoproteazóm má zvýšenú aktivitu podobnú chymotrypsínu a aktivitu podobnú trypsínu a zníženú aktivitu podobnú kaspázam (3).



Obr. 2 Schéma ubikvitín-proteazómového systému (3)

Inhibítory proteazómu

Inhibítory majú vyše dvadsať ročnú históriu v liečbe rakoviny. Blokujú aktivitu proteazómu a v bunkách sa hromadia ubikvitínované proteíny (7).

Bortezomib: prvý proteazómový inhibítor v liečbe rakoviny

Ide o reverzibilný inhibítor 20S proteazómu. Vytvára komplex s $\beta 5$ podjednotkou, blokuje jej aktivitu podobnú chymotrypsínu (3). Bol zároveň prvým inhibítorom proteazómu schváleným pre liečbu mnohopočetného myelómu. Napriek pozitívnym výsledkom sa vyskytovali pacienti, ktorí buď vôbec alebo iba na určitý čas reagovali na liečbu. Mutácie a/lebo overexpresia β podjednotiek je častou príčinou rezistencie (7).

Carfilzomib: druhá generácia inhibítorov proteazómu

Carfilzomib je ireverzibilný inhibítor proteazómu z triedy epoxyketónov. Na opätovné obnovenie aktivity proteazómu je potrebná nová syntéza podjednotiek (3). Od bortezomibu sa líši vyššou selektivitou k $\beta 5$ podjednotke a jej chymotrypsínu podobnej aktivite (7).

Okrem hematologických malignít sa v klinických štúdiách hodnotí jeho pôsobenie na solídne tumory vrátane malobunkového a nemalobunkového karcinómu pľúc a metastázujúceho karcinómu prostaty (8).

Ďalšími inhibítormi druhej generácie vo fázach klinického skúšania sú Ixazomib, Delanzomib, Oprozomib a Marizomib.

Nové ciele inhibície ubikvitín-proteazómového komplexu

Inhibítory imunoproteazómu

Dokázalo sa, že imunoproteazómový komplex hrá úlohu v relapse mnohopočetného myelómu a rezistencie na bortezomib. Špecifický inhibítor imunoproteazómu (Immunoproteasome Specific Inhibitor-001-IPSI-001) prednostne inhibuje imunoproteazómovú aktivitu 20Si (zväčša naviazaním sa na $\beta 1i$ podjednotku) oproti aktivite konštitutívneho 20 S proteazómu.

Inhibítory proteazómu označené ako ONX-0914 a PR-924 selektívne a ireverzibilne blokuju $\beta 5i$ podjednotku.

Táto schopnosť prekonať rezistenciu na bortezomib v pre- klinickom skúšaní naznačuje možnosť alternatív pre pacientov s rakovinou rezistentnou na bortezomib (6).

Inhibítory ubikvitínových enzýmov E3

Ubikvitín E3 ligázy sú veľkou skupinou ligáz, ktoré uľahčujú transfer ubikvitínu z E2 ubikvitín-konjugujúceho enzýmu na substrátové proteíny. Zároveň regulujú takmer všetky bunkové procesy vrátane bunkového cyklu, transkripcie, opravy DNA, prenosu signálu, endocytózy, bunkového transportu a ich inhibícia by mohla viesť k potlačeniu rastu a apoptóze rakovinových buniek. Substrátová špecifickosť danej E3 ligázy určuje, ktorý proteín bude ubikvitinovaný. Malé molekuly liečiv smerované voči E3 ligázam by mohli poskytnúť výhody oproti blokade celého proteazómu (6).

Inhibítory rozpoznania proteazómu

Ubistatin A a B sú malé molekuly, ktoré narúšajú rozpoznanie substrátu 19S regulačnej častice proteazómu. Blokujú naviazanie ubikvitinovaných substrátov na proteazóm, čo robí zo samotnej ubikvitinovej „reťaze“ ďalší možný cieľ farmakologickej intervencie (6).

Deubikvitinázy

Deubikvitinázy sú súčasťou ubikvitín-proteazómového systému a zahŕňajú rôznorodú skupinu ubikvitínových izopeptidáz, ktoré katalyzujú odstránenie zvyškov ubikvitínu z cieľových proteínov alebo ubikvitínových „reťazí“. Zmenený vzorec expzie deubikvitináz bol pozorovaný v mnohých tumoroch a môže slúžiť aj ako klinický ukazovateľ prognózy ochorenia a odpovede na liečbu. Zároveň môže slúžiť ako nový cieľ pre vývoj protirakovinových liečiv (9).

Záver

Rakovinové bunky sú senzitivnejšie na inhibíciu proteazómu než zdravé bunky kvôli svojej zvýšenej proliferácii. Farmakologické ovplyvnenie aktivity proteazómu sa stalo sľubným cieľom v liečbe niektorých hemalogických malignít. Úspech prvého inhibítora bortezomibu, ako aj rezistencia naň, podnietil ďalší výskum, ktorý vyústil do skúšania inhibítorov druhej generácie. Ukázalo sa, že ďalšou stratégiou môže byť zameranie sa na nové ciele v ubikvitín-proteazómovom systéme v rakovinových bunkách, ako je imunoproteazóm, E3 ligázy, 19S proteazóm a deubikvitinázy (6).

Literatúra

1. Grigoreva TA, Tribulovich VG, Garabadzhiu AV, Melino G, Barlev NA. The 26S proteasome is a multifaceted target for anti-cancer therapies. *Oncotarget* 2015; 6 (28): 24733-24749.
2. Nayak S, Fiaschi M, King D, Tabakin ER, Wood L, Hunt DA. Development of Small Molecular Proteasome Inhibitors Using a Caenorhabditis elegans Screen. *International Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 2014: 14.
3. Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal* 2011; 5 (2): 101–110.
4. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology* 2001; 8 (2001): 739-758.
5. http://www.nature.com/ki/journal/v81/n11/fig_tab/ki2011502f1.html
6. Deshaies RJ. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *Deshaies BMC Biology* 2014; 12: 94.
7. Teicher BA, Tomaszewski JE. Proteasome inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 2015; 96 (2015): 1–9.
8. Bo H, Weilong Y, You-Take O, Jing-Shan T, Shaohua L, Jiusheng D, Ping Y, Fadlo KR, Shi-Yong S. The novel proteasome inhibitor carfilzomib activates and enhances extrinsic apoptosis involving stabilization of death receptor. *Oncotarget* 2015; 6 (19): 17532-17542.
9. Pádraig D, Stig L. Molecular Pathways: Translational Potential of Deubiquitinases as Drug Targets. *Clin Cancer Res* 2014; 20 (15): 3908-3914.

VPLYV PEG-b-PLA NANOČASTICE NA NÁDOROVÉ A NENÁDOROVÉ BUNKOVÉ LÍNIE

(Effect of PEG-b-PLA nanoparticle on cancer and healthy cell lines)

Gabriela Mária Girašková¹, Ingrid Žitňanová¹, Eva Rollerová², Soňa Scsuková³, Monika Dvořáková¹, Katarína Koňariková¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárska fakulta UK, Špitálska 24, 813 72 Bratislava, Slovensko, katarina.konarikova@fmed.uniba.sk

²Slovenská Zdravotná Univerzita, Limbová 12, 831 01, Bratislava, Slovensko

³Ústav experimentálnej endokrinológie SAV, Vlárská 3, 831 01, Bratislava, Slovensko

Súhrn

Nanočastice sa využívajú vo veľkej miere v protinádorovej terapii a diagnostike. V našej práci sme testovali vplyv polyetylén glykolovej nanočastice (PEG-b-PLA) na nádorové a nenádorové bunkové línie. PEG-b-PLA je široko používaná na farmaceutické a lekárske aplikácie, vzhľadom na jej vlastnosti – nepodlieha interakcii s proteínmi (1), biologická účinnosť sa nemení počas procesu takzvaného zapuzdrenia a je netoxická (2).

Kľúčové slová

Nanočastice, nádorové bunky, cytotoxicita

Summary

Nanoparticles are used extensively in cancer therapy and diagnosis. In our work we tested the effect of polyethylene glycol nanoparticle against cancer and healthy cell lines. PEG-b-PLA is widely used for pharmaceutical and medical applications, due to its properties – it is inert to interactions with proteins (1), biological activity is not changed during the encapsulation and it is nontoxic. (2).

Key words

Nanoparticles, tumor cell lines, cytotoxicity

Úvod

Rozhodujúca úloha nanočastíc v liečbe rakoviny je založená na rozoznávaní malígnych a zdravých buniek, a taktiež na prítomnosti fenestrovaných kapilár v rakovinových tkanivách. Nanočastica môže byť nosičom látky, ktorá je schopná zvýšiť citlivosť nádoru na liečivo (3). Schopnosť zamerania sa na nádorové bunky je v tom, že nádorové bunky so zvýšenou expresiou vytvárajú konkrétne antigény na ich povrchu. Nanočastica s naviazanou protilátkou tak môže špecificky vyhľadať nádorovú bunku. To z nich robí ideálne ciele pre podávanie liečiv (4). Nanomedicina sa využíva aj v diagnostike. Nanosenzory sa dajú využiť ako citlivé čidlá, napríklad na biočipoch, ktoré analyzujú širokú škálu analytov, prípadne DNA, RNA sekvenčnej analýzy. Taktiež sa nanočastice dajú využiť ako kontrastné látky v zobrazovacích metódach pri určovaní rozsahu nádorového ochorenia (5).

Ciele práce

Cieľom práce bolo sledovať antiproliferačný/cytotoxický vplyv nanočastice PEG-b-PLA na nádorové bunkové línie HT-29, MCF-7, U-118MG a nenádorovú líniu HEK-293T kultivovaných vo forme sféroidov (3D kultivácia).

Materiál

Bunkové línie

HT-29 - nádorové epiteliálne bunky hrubého čreva, izolované z primárneho nádoru 44-ročnej ženy, rastú prichytené na dne kultivačnej nádoby, kde vytvárajú jednovrstvu, bunkové inokulum je 1×10^5 buniek na 1 ml.

MCF-7 - nádorové bunky prsníka, boli izolované z primárneho nádoru 69-ročnej ženy, rastú prichytené na dne kultivačnej nádoby, kde vytvárajú jednovrstvu, bunkové inokulum je 8×10^4 buniek na 1 ml.

U-118MG - mozgové gliomové bunky, izolované z muža pred 50 rokmi, rastú prichytené na dne kultivačnej nádoby, kde vytvárajú jednovrstvu, bunkové inokulum je 8×10^4 buniek na 1 ml.

HEK-293 T - ľudské embryonálne bunky, izolované z obličky embrya v roku 1970 v Nemecku, rastú prichytené na dne kultivačnej nádoby, bunkové inokulum je 6×10^4 buniek na 1 ml.

Na kultiváciu bunkových línií sa použilo médium DMEM obohatené penicilínom (100 µg/ml), streptomycínom (100 µg/mL) a 10 % fetálneho séra. Všetky bunkové línie sa kultivovali v Petriho miskách v termostate pri 37 °C a vlhčenej atmosfére obsahujúcej 5 % CO₂.

Bunky boli získané z American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA.

Študovaná nanočastica

PEG-b-PLA nanočastica

- PEG-b-PLA (poly (etylenglykol) - blok-polylaktid metyléterom)
- poskytnutie materiálu: Slovenská zdravotnícka univerzita, Mgr. Eva Rollerová, PhD.
- riedenie v destilovanej vode
- použité koncentrácie: 0,01; 0,1; 1; 10; 50; 100 µg/mL

Metódy

3D kultivácia bunkových línií

Na prípravu sféroidov sme použili 96-jamkové platničky opracované 0,8% agarózou, aby sa zabránilo adherencii buniek. Bunky boli nasadené v počte 1000 buniek/jamka a kultivované 2 týždne. Médium sme vymieňali 2-3-krát/týždeň. Na experimenty sme použili 24-jamkové platničky (opracované 0,8% agarózou), do ktorých sme preniesli 4 sféroidy z 96-jamkovej platničky. Sféroidy vytvorené z ľudských nádorových buniek hrubého čreva HT-29, ľudských nádorových buniek prsníka MCF-7, ľudských nádorových mozgových buniek U-118MG a zdravých ľudských embryonálnych buniek HEK-293T sme inkubovali s nanočasticou PEG-b-PLA 24, 48 a 72 h v koncentráciách 0,01; 0,1; 1; 10; 50; 100 µg/mL pri 37°C, 5% CO₂. Po inkubácii sme pomocou špeciálneho mriežkového okulára merali polomery sféroidov, vyjadrené ako arbitrážne jednotky (6).

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Namerané údaje sme vyjadrili ako priemer $\pm$ SD (smerodajná odchýlka).

Výsledky

Bunky, resp. sferoidy sme kultivovali s nanočasticou 72 h v koncentračnom rozsahu 0,01 – 100 $\mu\text{g/mL}$.

Zistili sme, že nanočastica PEG-b-PLA:

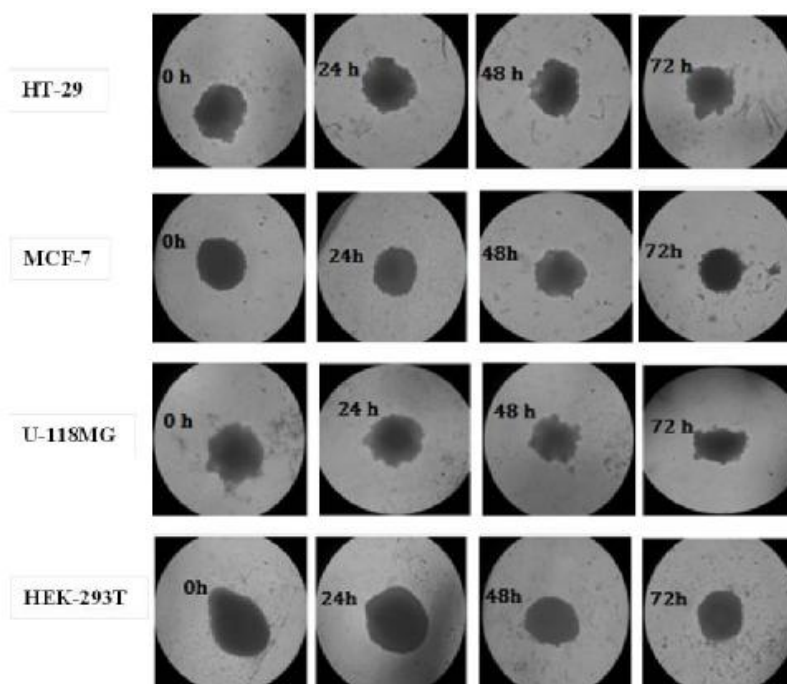
1. mala najvýraznejší cytotoxický účinok na nádorové bunky pri 72 h kultivácii (Tab.1)
2. dosiahla hodnotu IC_{50} pre ľudské nádorové bunky hrubého čreva HT-29 71 $\mu\text{g/mL}$ a pre ľudské nádorové bunky mozgu U-118MG 40 $\mu\text{g/mL}$ (Tab.1)
3. nemala cytotoxický efekt na ľudské nádorové bunky prsníka MCF-7 (Tab.1)

Pri porovnaní účinku nanočastíc na ľudskú nenádorovú líniu HEK-293T vo forme sferoidov sme zistili, že:

1. nanočastica PEG-b-PLA spôsobila cytotoxický efekt po 72 h pôsobenia, hodnota IC_{50} bola 45 $\mu\text{g/mL}$ (Tab.1)

IC_{50} [$\mu\text{g/mL}$]	HT-29	MCF-7	U-118MG	HEK-293T
24 h	>100	>100	>100	>100
48 h	>100	>100	>100	>100
72 h	71 $\pm$ 0,4	>100	40 $\pm$ 0,8	45 $\pm$ 0,02

Tab.1 Hodnoty IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) vypočítané z kriviek toxicity pre ľudské nádorové bunky hrubého čreva HT-29, ľudské nádorové bunky prsníka MCF-7, ľudské nádorové bunky mozgu U-118MG a zdravé ľudské embryonálne bunky HEK-293T vo forme sferoidov, ovplyvnené nanočasticou PEG-b-PLA počas 24, 48 a 72 h pôsobenia.



Obr.1 Morfológia sferoidov buniek HT-29, MCF-7, U-118MG a HEK-293T po ovplyvnení nanočasticou PEG-b-PLA počas 0, 24, 48 a 72 h pôsobenia.

Diskusia

V rámci sledovania biologického účinku študovanej nanočastice nás zaujímal jej vplyv na bunkové línie nádorové (HT-29, MCF-7, U-118MG) a nenádorovú bunkovú líniu (HEK-293T) kultivovaných vo forme sferoidov (3D kultivácia). 3D kultivácia buniek z časti simuluje usporiadanie buniek v nádore, kde bunky nie sú zhromaždené v jednovrstve ako pri 2D kultivácii, ale jedná sa o zhluk buniek v rôznych vrstvách. Z hodnôt IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) uvedených v kapitole výsledky (Tab.1) sme pozorovali inhibičné koncentrácie nanočastice PEG-b-PLA na bunky HT-29 ($71 \mu\text{g/mL}$), U-118MG ($40 \mu\text{g/mL}$) a HEK-293T ($45 \mu\text{g/mL}$). Keďže pri kultivácii sferoidov ide o celkom iné priestorové usporiadanie buniek, najmä čo sa týka počtu buniek a taktiež o inú komunikáciu medzi bunkami, predpokladáme, že nanočastice inhibovali rast buniek po vrstvách sferoidu, a teda bunky boli citlivejšie práve pri tejto forme kultivácie. Na potvrdenie našich domnienok je však potrebné študovať aj bunkovú smrť, resp. prítomnosť proteínov signálnych dráh ako aj zistiť, či daná nanočastica je schopná prejsť vrstvami sferoidu.

Záver

Z našich výsledkov vyplýva dôležitosť sledovania vplyvu samotných nanočastíc, ale aj nanočastíc s inkorporovanými liečivami na nádorové bunkové línie, pretože môžu predstavovať kľúčovú stratégiu pri liečení onkologických ochorení, či už metastázujúcich nádorov alebo nádorov, ktoré sú veľmi ťažko prístupné bežne využívaným chemoterapeutikám resp. chirurgickým zákrokom.

Pod'akovanie

Táto práca bola finančne podporená grantom APVV - 0404 – 11, VEGA 1/0752/13.

Literatúra

1. **Kanapathipillai M, Brock A, Ingber DE.** Nanoparticle targeting of anti-cancer drugs that alter intracellular signaling or influence the tumor microenvironment. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2014; 79-78: 107-118.
2. **Brannon-Peppas L, Blanchette JO.** Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64: 206–212.
3. **Howes PD, Chandrawati R, Stevens MM.** Bionanotechnology. Colloidal nanoparticles as advanced biological sensors. *Science* 2014; 346(6205): 1247390.
4. **Kwong GA, Maltzahn G.** Mass –encoded synthetic biomarkers for multiplexed urinary monitoring of disease. *Nature Biotechnology* 2012; 31: 63–70.
5. **Ali ME, Lamprecht A.** Polyethylene glycol as an alternative polymer solvent for nanoparticle preparation. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 456(1):135–142.
6. **Salmenperä P, Kankuri E, Bizik J, Sirén V, Virtanen I, Takahashi S, Leiss M, Fässler R, Vaheri A.** Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin–integrin interaction. *Experimental Cell Research* 2008; 314(19): 3444-3452.

HEREDITÁRNY KARCINÓM OVÁRIA

(Hereditary carcinoma ovarii)

Olivia Hamidová¹, Lenka Dolešová², Vanda Repiská²

¹ Oddelenie lekárskej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety, Heydukova 10, 812 50, Bratislava, olivia.hamidova@ousa.sk

² Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LFUK a UN Bratislava, Sasinkova 4, 811 08, Bratislava

Summary

Hereditary ovarian cancers exhibit distinct clinicopathologic features compared with sporadic cancers. About 10-15% of all ovarian cancers are hereditary, most of them associated with germ line mutations in the BRCA1, BRCA2 tumor suppressor genes and germ line mutations in the DNA mismatch repair (MMR) genes, primarily hMLH1 and hMSH2. Family history is the strongest risk factor for ovarian cancer. The availability of genetic testing for inherited mutations provides potentially valuable information to women at elevated risk of breast or ovarian cancer.

Key Words

Carcinoma ovarii, hereditary, genetic counseling

Genetická charakteristika hereditárneho karcinómu ovária

Hereditárny karcinóm ovária predstavuje genotypovo a fenotypovo heterogénnu skupinu nádorového ochorenia ovárií, ktorých základnou črtou je prenos mutácie DNA a tým aj predispozície vzniku ochorenia z generácie rodičov na generáciu potomkov prostredníctvom zárodočných buniek. Poznanie asociácie mutácií niektorých vysokopenetrantných génov s nádorovým ochorením a ich prenos podľa autozómovo-dominantného vzoru dedičnosti dalo základ možnosti identifikácie jedincov bez zdedenej predispozície a osôb so zvýšeným rizikom vzniku nádorového ochorenia v rodinách so známou patologickou mutáciou.

Podľa súčasných poznatkov sa odhaduje, že hereditárne podmienený karcinóm ovária predstavuje asi 5-15% z celkového počtu prípadov ovariálnych karcinómov (1).

Najvýznamnejšiu časť hereditárnych nádorových syndrémov, v rámci ktorých sa vyskytuje karcinóm ovária, predstavujú syndrómy hereditárneho karcinómu prsníka a ovárií (HBOC) a Lynchov syndróm, resp. syndróm hereditárneho nepolypózneho karcinómu kolorekta (HNPCC).

Syndróm dedičného nádoru prsníka a ovária (HBOC syndróm) je spojený s mutáciami v génoch *BRCA1* a *BRCA2* a je charakterizovaný predispozíciou na vznik nádorov prsníkov a ovárií s včasným nástupom ochorenia. U nositeliek mutácií je odhadované riziko vzniku nádoru prsníka na 35-85% a nádoru ovária na 15-60%. U nositeliek BRCA mutácií prevažuje histologický typ high-grade seróznych epiteliálnych karcinómov, primárna lézia sa predpokladá v oblasti fimbrií falopovej trubice. Lynchov syndróm (HNPCC) je spojený s mutáciami tzv. mismatch opravných génov (MMR gény) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. Ochorenie je charakterizované vznikom kolorektálneho karcinómu s včasným nástupom ochorenia. U nositeľov mutácií je zvýšené riziko výskytu viacerých nádorových ochorení. Ide

hlavne o karcinóm endometria, ovária (najčastejším histologickým nálezom sú endometroidné karcinómy), obličiek, pečene, žalúdka a tenkého čreva. Pravdepodobnosť, že sa v priebehu života vyvinie u nositeľov mutácie v MMR génoch kolorektálny karcinóm sa odhaduje na približne 80 %. Riziko vzniku karcinómu ovária sa pri Lynchovom syndróme odhaduje na 12% (2, 3) .

Karcinóm ovária sa môže vyskytnúť aj ako súčasť niektorých zriedkavých nádorových syndrómov ako sú Peutz-Jeghersov syndróm (1:25 000-1:300 000) alebo Gorlinov syndróm (1:57 000). Napriek úžasnému rozvoju poznatkov a stále lepšiemu poznaniu súvislostí v oblasti molekulárnej genetiky časť prípadov rodín so zjavne familiárnym výskytom ochorenia stále ostáva bez objasnenia dedičnej predispozície (v týchto prípadoch sa predpokladá účasť doteraz neidentifikovaného génu, prípadne viacerých génov s nízkou penetranciou) (4, 5) .

Význam poznania molekulárnej podstaty ochorenia sa dostáva do popredia aj v rámci využitia možností terapie hereditárnych nádorov ovária. Podľa literárnych údajov ovariálny karcinóm, ktorý sa vyvinul u nositeľiek mutácií *BRCA1/2* má niektoré molekulárne, patologické ako aj klinické zvláštnosti. Ukazuje sa, že *BRCA* mutačný status by mohol v blízkej budúcnosti byť nápomocným pri voľbe vhodnej personalizovanej terapie. Tumory u nositeľiek mutácií *BRCA* génov prejavujú vyššiu citlivosť na liečbu platinovými preparátmi. Je to vysvetľované poruchou možnosti reparácie DNA v *BRCA* deficitných bunkách a súčasnou interferenciou platinových solí s možnosťou opravy dvojreťazcových DNA zlomov. Viaceré klinické štúdie poukazujú na dlhšiu dobu prežívania pri liečbe platinovými derivátmi u pacientok s hereditárnym karcinómom ovária v porovnaní s pacientkami so sporadickými karcinómami ovária. V posledných rokoch sa sľubnou terapeutickou možnosťou ukazujú PARP inhibítory. Poly ADP ribózový komplex (PARP) predstavuje skupinu proteínov, ktoré sú začlenené v procesoch regulácie transkripcie, DNA replikácie a opráv DNA poškodení. Prostredníctvom účasti v reťazci bázevej excíznej reparácie sa PARP proteíny podieľajú na udržiavaní genómovej integrity. Inhibícia PARP zapríčiňuje akumuláciu DNA jednovláknových poškodení, ktoré v normálnych bunkách môžu byť opravené prostredníctvom homologickej rekombinácie. *BRCA* deficitné tumorové bunky sú ideálnymi cieľmi syntetickej letality prostredníctvom PARP inhibitorov pre súčasnú neschopnosť opráv DNA poškodení prostredníctvom homologickej reparácie aj bázevej excíznej reparácie. Nahromadenie poškodení v takýchto bunkách vedie následne ku zníženiu chromozómovej stability, poruchám bunkového cyklu a bunkovej smrti. Bolo preukázané, že bunky s úplnou stratou funkcie *BRCA* proteínu sú 1000-krát citlivejšie na účinok PARP inhibitorov v porovnaní s heterozygotnými bunkami a bunkami bez mutácie. Klony tumorových buniek u pacientok s *BRCA* mutáciou strácajú heterozygoty na rozdiel od ostatných heterozygotných buniek organizmu a pri liečbe PARP inhibítormi sa preto môže uplatniť vysoká selektivita účinku lieku práve na nádorové bunky s úplnou stratou funkcie *BRCA* proteínu (6, 7, 8, 9) .

Klinická charakteristika hereditárneho karcinómu ovária

Charakteristickými črtami hereditárnej formy ochorenia sú familiárny výskyt (viacnásobný výskyt v jednej príbuzenskej línii), nízky vek nástupu nádorového ochorenia, bilateralita ochorenia a výskyt asociovaných typov karcinómov v rodine. Pre prevenciu hereditárneho karcinómu ovária zohráva významnú úlohu selekcia rizikovej skupiny žien a ich nasmerovanie na genetickú konzultáciu ku klinickému genetikovi. Genetickú konzultáciu a v prípade indikácie aj molekulárno genetické vyšetrenie asociovaných génov by mali absolvovať všetky pacientky, pochádzajúce z rodiny, kde sa vyskytli tri a viac prípadov príbuzných s karcinómom prsníka/ovária v jednej príbuzenskej línii (bilaterálny karcinóm je považovaný za dva nádory) alebo dvaja príbuzní prvého stupňa (z paternálnej línie aj druhého stupňa) s karcinómom prsníka/ovária, ak aspoň jeden bol diagnostikovaný do 50. roku života alebo jeden príbuzný s karcinómom prsníka/ovária a ďalší prvostupňový príbuzný

s asociovaným tumorom (karcinómy kolorekta, pankreasu, prostaty, maternice, malígnym melanóm), pričom aspoň jedno nádorové ochorenie bolo diagnostikované do 50. roku života. Významným údajom je výskyt karcinómu prsníka u muža v príbuzenstve. Rizikové pacientky z pohľadu možnosti hereditárneho karcinómu ovária sú aj pacientky bez rodinnej anamnézy, ale s diagnostikovaným bilaterálnym karcinómom prsníka/ovária, ak sa prvé ochorenie manifestovalo do 50. roku a jednoznačne všetky ženy s diagnostikovaným nádorom prsníka/ovária pred 40. rokom života, pacientky s histologickým nálezom medulárneho karcinómu prsníka a všetky prípady výskytu karcinómu prsníka s triple negativitou (10, 11).

U jedincov s verifikovanou patologickou mutáciou v génoch *BRCA1/2* je odporúčané zaradenie do špeciálnych dispenzarizačných programov, ktoré zvyšujú možnosť včasného zachytu karcinómu prsníka/ovárií a ich následnej liečby. Nositeľky mutácie v génoch *BRCA1/2* by mali byť informované o možnostiach vykonania profylaktickej adnexektómie. Je odporúčaná vo veku 35-40 rokov (znižuje riziko vzniku karcinómu ovária o 97% , riziko vzniku karcinómu prsníka sa po výkone zníži o 50%).

Cieľom preventívneho manažmentu je v prvom rade včasné zachytenie ochorenia v najrannejších štádiách, čo pri ustavičnom zvyšovaní efektivity liečby umožňuje znižovať úmrtnosť a zlepšovať kvalitu života pacientok (12).

Podporené: Dobudovanie technickej infraštruktúry v oblasti výskumu diagnostických postupov a metód v rámci včasnej diagnostiky najčastejších gynekologických ochorení u žien ITMS 26210120026, Operačný program výskum a vývoj 2013/1.1/02-SORO.

Literatúra

1. Bolton K.L., Chenevix-Trench G. et al. Association Between BRCA1 and BRCA2 Mutations and Survival in Women with Invasive Epithelial Ovarian Cancer; JAMA, 2012, jan 307(4), pp. 382–390.
2. Li A.J., Karlan B., Y. Genetic factors in ovarian carcinoma 2001 CurrOncolRep
3. Ilenčíková D., Bartošová Z., Babál P. Lynchov syndróm- novinky v diagnostike a liečbe Onkológia 2010;5 (2) str. 70-75
4. Hearle N., Schumacher V., Menko F.H. Frequency and spectrum of cancers in Peutz-Jeghers syndrome; Clinical Cancer Research 2006, Vol 12, No 10 pp3209-3215
5. Garber J. E., Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes; Journal of Clinical Oncology, 2005, vol 23, No2 pp.276-292
6. Paraskevi A., Fostira F. Hereditary breast cancer: The Era of New Susceptibility Genes BioMedResearch International 2013;
7. Razis E. BRCAness: Finding the Achilles heel in ovarian cancer; The Oncologist 2012, No17 pp. 956-962
8. Girolimetti G., Perrone A.M., Santini D., Barbieri E., Guera F., Ferrari S., Zamagni C., De Iaco P., Gaspere G., Turchetti D. BRCA asociated ovarian cancer: from molecular genetics to risk management; BioMed Research Int 2014 july pp. 1-7
9. Meindl A., Ditsch N., Kast K., Rhein K., Schmutzier R.K. Hereditary breast and ovarian cancer; Dtsch Arztebl Int. May 2011, 108(19), pp. 323–330
10. MackaiJ., Szecsei M. Genetic counseling for hereditary predisposition to ovarian and breast cancer; Annals of Onkology 2010, supplement 7, pp.334-338
11. Allain D.C. Genetic Counseling and Testing for Common hereditary breast cancer syndromes; Journal of Molecular Diagnostics 2008, vol 10, No5, pp.383-395
12. Nelson H.D., Pappas M., Zakher B., Mitchell J.P., Okinaka-Hu, Fu R. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: a systematic review to update the U.S. Preventive Services Task Force recommendation; Ann.InternMed 2014 Feb 18;160(4)pp.255-66

ÚČINOK EXTRAKTU Z CAMELLIA SINENSIS NA GLIOMOVÉ BUNKY

(Effect of extract from *Camellia sinensis* against glioma cells)

Martina Jedličková¹, Ingrid Žitňanová¹, Katarína Koňariková¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Špitálska 24, 813 72 Bratislava, katarina.konarikova@fmed.uniba.sk

Súhrn

S nárastom štúdií zaoberajúcich sa pozitívnym vplyvom látok z rastlinných a živočíšnych zdrojov na náš organizmus sa upriamuje pozornosť na ich využitie pri liečbe závažnejších ochorení akým je aj rakovina. V našej práci sme sa zamerali na antiproliferačný/cytotoxický účinok extraktu z čierneho čaju *Camellia sinensis* na gliomové bunky a určenie typu bunkovej smrti nádorových buniek.

Kľúčové slová

Rakovina, prírodné látky, bunková smrť

Summary

Increasing number of studies claiming beneficial effects of natural compounds on our health focus our attention on their application in the treatment of severe diseases such as cancer. In our study we tested the antiproliferative/cytotoxic effect of an extract from black tea *Camellia sinensis* on glioma cells and type of cell death.

Key words

Cancer, natural substances, cell death

Úvod

Prírodné látky obsahujú biologicky aktívne zlúčeniny a predstavujú najvyužívanejší zdroj liečiv vôbec (1,2). Mnohé z nich vykazujú antimikrobiálny, antioxidačný a protinádorový účinok (3). V ostatných rokoch sa venuje pozornosť najmä antioxidačnej aktivite rastlín v súvislosti s ich prospešnosťou pre zdravie.

Cieľom našej práce bolo sledovať cytotoxický účinok extraktu z čierneho čaju *Camellia sinensis* na gliomové bunky U-118MG a zistiť typ bunkovej smrti týchto buniek.

Materiál a metódy

Extrakt z čierneho čaju

Ide o zmes katechínov (40%) a antokyanidínov (60%) izolovaných vodnoetanolovým roztokom v pomere voda : etanol 60% : 40%. Extrakt nám poskytla firma Molecule of life spol. s r. o., Senec, Slovensko. V rámci nášho štúdia sme použili koncentračný rozsah 0,00256 – 40 µmol/l. Extrakt bol rozpustený vo vode. Pracovný názov extraktu je F100.

Bunková línia U-118MG

Bunky U-118MG boli izolované v roku 1960 z malígneho mozgového tumoru 50 ročného muža. Bunky rastú prichytené na dne kultivačnej nádoby a generačná doba je 20 h. Bunkové

inokulum je 1×10^6 buniek na 1 ml, pasážujú sa 2-krát týždenne.

Bunky sme kultivovali v Petriho miskách v termostate pri 37 °C a vlhčenej atmosfére obsahujúcej 5 % CO₂. Na kultiváciu sme použili médium DMEM (Dulbeccom modifikované Eaglovo médium), obohatené fetálnym sérom (FS, 10 %), antibiotikami penicilínom (100 µg/ml) a streptomycínom (100 µg/ml). Bunky boli získané z American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA.

MTT test

Cytotoxický účinok sme sledovali MTT testom. Kontrolné a látkou ovplyvnené bunky sme nasadili do 96 jamkovej sterilnej platničky a kultivovali pri 37 °C vo zvlhčenej atmosfére s 5% CO₂ po dobu 24, 48 a 72 h. Po skončení kultivácie sme odstránili kultivačné médium prevrátením platničky a do každej jamky pipetovali 0,1 ml média obsahujúceho MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenylnitroimidazolium bromidu) (5 mg/1 ml PBS). Prikryté platničky sme kultivovali v termostate 3,5 h pri 37 °C a 5% CO₂. Po tejto dobe sme médium opäť odstránili a pridali extrakčný roztok (100% DMSO) v objeme 0,1 ml na jamku. Po 10 min. inkubácie pri laboratórnej teplote sme merali absorbanciu pri 490 nm.

Analýza bunkového cyklu Muse™ bunkovým analyzátorom

Typ bunkovej smrti sme detegovali analýzou bunkového cyklu. Kontrolné a ovplyvnené bunky ($0,2 \times 10^6$ b/ml) sme dvakrát premyli PBS a centrifugovali pri 300g/5 min., 4 °C. Bunky sme nechali v ľade hydratovať s PBS 30 min. Po opätovnej centrifugácii sme PBS odstránili a skúmavky vložili do ľadu. Následne sme pelet rozsuspenderovali v 200 µl reakčného činidla Muse™ Cell Cycle Reagent. Bunky s reakčným činidlom sme inkubovali 30 min. za tmy. Priebeh bunkového cyklu sme analyzovali na prietokovom cytometri Muse™ Cell Analyzer. Merania sme uskutočnili na Ústave lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava pod vedením Ing. Heleny Gbelcovej, PhD.

Western blot

Autofagickú bunkovú smrť sme detegovali western blot analýzou. Kontrolné a látkou ovplyvnené bunky sme centrifugovali pri 450xg, 10 min., 4 °C, dvakrát premyli v PBS (pH 7,4) a lyzovali lyzačným 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 rozsuspenderovali na vortexe a centrifugovali pri 20000xg, 30 min., 4 °C. V supernatante sme stanovili koncentráciu 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 objeme 20 µl. Elektroforéza prebiehala pri napätí 100 V, 80 min. Po prebehnutí elektroforézy sme proteíny oddelené elektroforézou preblotovali na nitrocelulózovú membránu a detegovali králičou primárnou protilátkou proti proteínu LC3, ktorý sa považuje za marker autofágie a králičou sekundárnou protilátkou značenou peroxidázou. Na vyhodnotenie sme využili chemiluminiscenčnú detekciu.

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Namerané údaje sme vyjadrili ako priemer ± SD (smerodajná odchýlka).

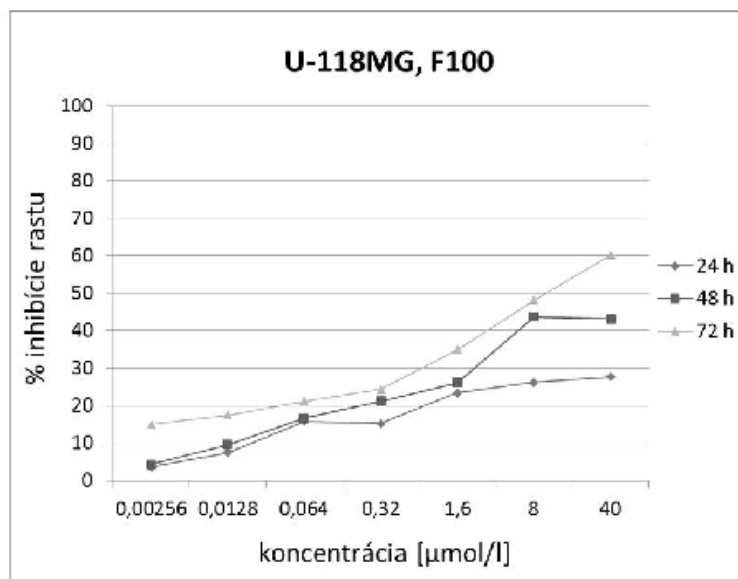
Výsledky

Cytotoxický účinok

Na obrázku 1 je znázornený priebeh proliferácie nádorovej bunkovej línie U-118MG. Počas 24 a 48 h sme zaznamenali postupné zvyšovanie inhibície rastu bunkovej populácie, avšak bez dosiahnutia hodnoty IC₅₀. Po 72 h inkubácii pozorujeme, že extrakt z čierneho čaju F100 mal na bunkovú líniu U-118MG cytotoxický vplyv s hodnotou IC₅₀ = 14 µmol/l.

Analýza bunkového cyklu

Bunky U-118MG sme inkubovali s extraktom F100 počas 72 h s koncentráciami 1,6; 8 a 40 µmol/l.



Obr.1 Antiproliferačný/cytotoxický vplyv látky F100 na delenie nádorových buniek U-118MG počas 72 h pôsobenia v koncentračnom rozsahu 0,00256 - 40 μmol/l.

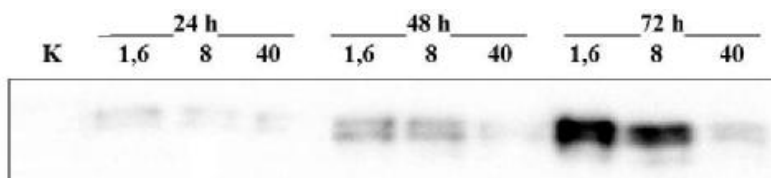
V tabuľke 1 sú uvedené percentá buniek nachádzajúcich sa v jednotlivých fázach bunkového cyklu. Po 72 h inkubácie sme nepozorovali indukciu apoptózy, v subG₀ fáze nárast populácie buniek nepresiahol 10 %. Kontrolné bunky po 72 h inkubácii, neovplyvnené látkou F100 mali 0,6 % zastúpenie v subG₀ fáze.

Koncentrácia F100	24 h	48 h	72 h
1,6 μmol/l	0,4	1,8	0,9
8 μmol/l	0,3	0,4	1,3
40 μmol/l	0,2	2,3	0,4

Tab.1 Percentuálne zastúpenie buniek U-118MG v sub G₀ fáze po ovplyvnení extraktom F100 počas 72 h inkubácie.

Western blot analýza

Pri bunkovej línii U-118MG (Obr. 2) sme pozorovali prítomnosť proteínu LC3 (marker autofágie). Hladiny proteínu LC3 stúpali počas 24 a 48 h inkubácie v koncentračnej závislosti, avšak v 72 h inkubácii sme pozorovali najintenzívnejší signál pri najnižšej použitej koncentrácii extraktu F100 (1,6 μmol/l) a tento signál klesal so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktu. Z vyhodnotenia western blotovej analýzy predpokladáme autofagickú bunkovú smrť buniek U-118MG indukovanú látkou F100.



Obr.2 Detekcia proteínu LC3 v bunkách U-118MG po 72 h ovplyvnení látkou F100. K – kontrolné bunky. Koncentrácie extraktu F100 sú uvedené v μmol/l.

Diskusia

Vplyvu viacerých typov čaju Čajovníka čínskeho (*Camellia sinensis*) na bunkovú smrť rôznych rakovinových bunkových línií sa venuje mnoho štúdií. Podľa metódy spracovania a stupňa oxidácie rozlišujeme biely, žltý, zelený, čierny čaj, oolong a pu-erh (4). Hajiaghaalipour a kol. (2014) sledovali vplyv extraktu z **bieleho čaju** *Camellia sinensis* na ľudské nádorové bunky hrubého čreva (HT-29) ($IC_{50} = 86,68 \mu\text{g/ml}$) a dokázali apoptózu aktiváciou kaspázy 3, 8, 9 (5).

Ahmad a kol. (1997) sledovali pôsobenie extraktu zo **zeleného čaju** na bunky karcinómu kože A431 ($IC_{50} = 40 \mu\text{g/ml}$) (6), Yokoyama a kol. (2001) na nádorové bunky mozgu U-373 ($IC_{50} = 50 \mu\text{g/ml}$) (7). Bunky taktiež podliehali apoptickej bunkovej smrti.

Spôsob spracovania listov *Camellia sinensis* teda ovplyvňuje zloženie výsledného čaju a tým aj mechanizmus ich účinku.

Po 72 h inkubácii extraktu F100 (**čierny čaj**) s nádorovými bunkami mozgu U-118MG sme zistili, že dochádza k aktivácii proteínu LC-3. Prítomnosť tohto proteínu potvrdzuje, že v bunkách nedochádza k apoptóze (Tab.1, Obr.2), ale je aktivovaná autofágia. Predĺžená doba fermentácie listov (ako v prípade čierneho čaju) spôsobuje strácanie niektorých aktívnych látok s potenciálom indukcie apoptózy.

Na druhej strane však Halder a kol. (2008) zistili, že pôsobením čierneho čaju na kožné bunky A431 a A375 je možné dosiahnuť redukciu bunkovej viability pôsobením $99,66 \mu\text{g/ml}$, resp. $50,02 \mu\text{g/ml}$. Následným testovaním inhibičnej koncentrácie látky na A375 dosiahli aktiváciu apoptózy u 50 % testovaných buniek (8).

Zaujímavé jej aj zistenie Koňarikovej a kol. (2014), že počas opakovaného pridávania extraktu z čierneho čaju *Camellia sinensis* k nádorovým bunkám hrubého čreva HT-29 je možné indukovať apoptózu už v nízkych koncentráciách ($5 \mu\text{g/ml}$). Avšak pri pridaní k bunkám MCF-7, apoptóza pozorovaná nebola ani pri jednorazovom ani pri opakovanom ovplyvnení extraktom (9).

Záver

V bunkách U-118MG sme dokázali prítomnosť proteínu LC3 a teda predpokladáme, že bunky U-118MG podliehajú autofagickej, nie apoptickej bunkovej smrti po ovplyvnení extraktom F100. Naše výsledky vytvorili priestor pre ďalšie zaujímavé štúdie molekulového mechanizmu rôznych typov bunkových smrteí, ktorým môžu nádorové bunky podliehať po ovplyvnení extraktom z čierneho čaju. Prírodné látky vo všeobecnosti môžeme považovať za potenciálny doplnok protinádorovej liečby.

PodĎakovanie

Tento projekt bol podporený grantom VEGA 1/0752/13 a firmou firma Molecule of life spol. s r. o., Senec, Slovensko.

Literatúra

1. **Harvey A.** Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Discov Today 2000; 5: 294 – 300.
2. **Newman DJ, Cragg GM, Kenneth MS.** Natural products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. J Nat Prod 2003; 66: 1022–1037.
3. **Kalimuthu A, Rajeshi P, Rajesh KV, Balamurugan B, Chandrasekar T M.** Antiulcer activity of methanolic extract of *Acalypha indica* Linn. (Euphorbiaceae) by pylorus ligation and swim stress induced ulceration. Journal of Pharmacy Research 2010; 3: 2779-2783.
4. **Duke JA.** *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Handbook of Energy Crops, 1983
5. **Hajiaghaalipour F, Kanthimathi MS, Sanusi J, Rajarajeswaran J.** White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and

protects DNA of normal cells against oxidative damage. *Food Chem* 2014; 169: 401 – 410.

6. Ahmed S, Wang N, Lalonde M, Goldberg V M, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1 beta-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 767 – 773.

7. Yokoyama S, Hirano H, Wakimaru N, Sarker KP, Kuratsu J. Inhibitory effect of epigallocatechin-gallate on brain tumor cell lines in vitro. *Neuro Oncol* 2001; 3: 22 – 28.

8. Halder B, Bhattacharya U, Mukhopadhyay S, Giri AK. Molecular mechanism of black tea polyphenols induced apoptosis in human skin cancer cells: involvement of Bax translocation and mitochondria mediated death cascade. *Carcinogenesis* 2008; 23: 129 – 138.

9. Koňariková K, Ježovičová M, Keresteš J, Gbelcová H, Ďuračková Z, Žitňanová I. Anticancer effect of black tea extract in human cancer cell lines. *Springerplus* 2015; 4: 127.

NAŠE GLIOBLASTÓMOVÉ BUNKOVÉ LÍNIE 8-MG-BA a 42-MG-BA DOSIAHLI SVETOVÝ REFERENČNÝ STATUS

(Our glioblastoma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA have achieved a reference status worldwide)

Anna Perželová¹, Ivana Siváková¹, Peter Mráz¹, Eliška Kubíková¹

¹ *Anatomický ústav, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, Slovensko, Anna.perzelova@fmed.uniba.sk*

Súhrn

V rokoch 1993-1998 sme na Anatomickom ústave etablovali dve gliómové línie. Obidve boli derivované z multiformného glioblastómu, kultivované 200 pasáží. Naše línie označené ako 8-MG-BA a 42-MG-BA sme poskytli bunkovej banke Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig v Nemecku. V súčasnosti obidve bunkové línie získali svetový referenčný status a sú vysoko citované v DSMZ. Používajú sa vo viacerých genómových centrách ako sú Broad v USA a Sanger v UK a v mnohých ďalších výskumných ústavoch na štúdium nových terapeutických prístupov v neuroonkológii. V tejto práci upozorňujeme na problémy spojené s kultiváciou bunkových línií, ktoré sa najčastejšie týkajú mykoplazmových kontaminácií a krížových kontaminácií bunkových línií s inými bunkami.

Kľúčové slová

Gliómy, glioblastómové bunkové línie, 8-MG-BA, 42-MG-BA

Summary

During the years 1993-1998 we established two permanent glioma cell lines at the department of Anatomy. Both cell lines were derived from the human glioblastoma multiforme and cultured up to passage number 200. Our cell lines marked as 8-MG-BA and 42-MG-BA were provided to Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig in Germany. Currently both cell lines have achieved a reference status worldwide and are highly cited in DSMZ. They are used in several genome centres such as Broad in USA and Sanger in UK and in many other research institutes for the studies of new therapeutic approaches in neurooncology. In this report we call attention to the problems associated with cell lines culturing, the most common concern the mycoplasma contamination and cross-contamination of cell lines with unrelated cells.

Key words

Glioma, glioblastoma cell lines, 8-MG-BA, 42-MG-BA

Úvod

Názvom bunková línia označujeme kultivované bunky, ktoré dosiahli permanentný rast v in vitro podmienkach. Tkanivové kultúry z nádorového tkaniva opakovaným pasážovaním budú

končia svoj rast v priebehu niekoľkých mesiacov, alebo prechádzajú do permanentnej kultúry v priebehu 40-50 pasáží. Z primárnych mozgových nádorov je možné získať bunkovú líniu len z nádorov s vysokým stupňom malignity, najčastejšie z multiformného glioblastómu. Úspešnosť vzniku novej línie je 6-15%. V rokoch 1993-1998 sme v spolupráci s Neurochirurgickou klinikou v Bratislave vykultivovali dve gliómové bunkové línie: 8-MG-BA a 42-MG-BA. Hoci obidve línie sme získali z histologicky rovnakého typu nádoru z multiformného glioblastómu, zistili sme heterogénne vlastnosti línií v expresii cytoskeletárnych proteínov a v rýchlosti rastu buniek (1). Najzávažnejším problémom v kultivácii bunkových línií je kontaminácia mikroorganizmami, najčastejšie sú to rôzne kmene mykoplaziem. Posledné dve dekády boli identifikované krížové bunkové kontaminácie. Nesprávne identifikované, teda falošné bunkové línie boli použité na mnohé experimenty a výsledkom sú stovky až tisíce publikácií, ktoré často porovnávajú domnelé normálne línie s nádorovými.

Krížová kontaminácia bunkových línií (Cell line cross contamination)

Krížová kontaminácia bunkových línií znamená, že bunkové kultúry boli zamenené alebo do línií boli inokulované iné bunky. V bunkovej banke DSMZ na základe molekulárno-cytogenetických vyšetrení identifikovali kontaminované línie a uverejnili zoznam viac ako 200 falošných bunkových línií. Rozlišujú dva typy kontaminácií. Označenie *virtual* znamená, že línie boli kontaminované už pri ich vzniku a nikdy v podstate neexistovali. Jedná sa hlavne o spontánne immortalizované línie z normálnych ľudských tkanív. Najznámejším prípadom je ľudská línia ECV 304 z edotelu umbilikálnej vény (2). V DSMZ zistili, že ECV 304 línia je nádorová línia T 24, ktorá bola získaná z karcinómu močového mechúra (3). Bunkové línie označené ako *extant* boli kontaminované inými líniami v priebehu kultivácie, najčastejšie dobre známou a často používanou karcinómovou HeLa líniou.

Mykoplazmové kontaminácie bunkových línií

Najzávažnejším problémom v kultivácii buniek sú mykoplazmové infekcie. Mykoplazmy sú považované za najmenšie baktérie, pre ktoré je charakteristická neprítomnosť pevnej bunkovej steny. Môžu mať rôzny tvar, ich veľkosť sa pohybuje od 0,3 – 0,8 μm . Pri filtrácii kultivačných roztokov dokážu vďaka svojej membránovej štruktúre prejsť cez filtre používané na odstraňovanie baktérií. Kontaminácia bunkových kultúr je často ťažko detekovateľná, pretože mykoplazmy rastú pomaly, nemenia pH kultivačných roztokov a nemajú výrazný cytopatický efekt. Ich rozmnoženie pri dlhodobej kultivácii bunkových línií však výrazne ovplyvňuje rast a vlastnosti kultivovaných buniek. Do kultivačných médií sa zvyčajne pridávajú aj trojkombinácie antibiotík, ktoré majú tiež výrazný efekt na rast buniek a často len maskujú mykoplazmové infekcie (4). Viaceré štúdie popisujú kontamináciu bunkových línií až v 65-85% (5,6). V kultúrach sa vyskytujú najčastejšie bovinné, prasačie a ľudské kmene. Bovinné kmene súvisia s kontamináciou bovinných sér, ktoré sa pridávajú do kultivačných roztokov. Prasačími kmeňmi môže byť infikované aj bovinné sérum na bitúnku, jedná sa o *Mycoplasma hyorhinitis*, ktorá sa nachádza v nosnej dutine prasiat. Pri pasážovaní kultúr sa používa trypsín, ktorý sa vyrába z prasačích pankreasov. Je však pozoruhodné, že pravdepodobne trypsín je deštruktívny pre mykoplazmy, ktoré neboli spoľahlivo detekované v trypsínových vzorkách. Incidencia *Mycoplasma hyorhinitis* je v bunkových líniách 10-40%, bovinné kmene sú prítomné v 20-40% a ľudské v 20-40% (7). Efekt mykoplazmových kontaminácií na kultivované bunky je veľký. Zasahujú do zmien bunkovej morfológie a proliferácie, indukujú chromozomálne aberácie a zmeny v zložení bunkovej membrány čím ovplyvňujú membránové antigény a receptory (7).

Záver

Permanentné bunkové línie derivované z malígnych nádorov sú v súčasnosti obľúbeným modelom pre štúdium biológie nádorov a hlavne nových terapeutických metód. V mnohých laboratóriách sa bunkové línie vymieňajú a pri súčasnom veľkom publikačnom tlaku mnohým výskumníkom stačí len citovať zdroj buniek a málo sa oboznamujú s vlastnosťami bunkových línií. Na základe rozsiahlych bunkových krížových kontaminácií máme dnes k dispozícii množstvo falošných zavádzajúcich publikovaných výsledkov, ktoré vystavujú pacientov nevhodnej až škodlivej liečbe (3). Naše bunkové línie získali referenčný status a vysokú citovanosť v DSMZ. Sú relatívne mladé bunkové línie, ktoré neboli kontaminované inými bunkami. V súčasnosti sa používajú na výskumné účely na ÚEO a Virologickom ústave SAV, INSERM Paríž, Broad USA, Sanger UK a na ďalších výskumných pracoviskách.

Literatúra

- 1. 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.
- 2. Takahashi KI, Sawasaki Y, Hata J, Mukai K, Goto T.** Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990; 26: 265-74.
- 3. MacLeod RAF, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H, Drexler HG.** Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer* 1999; 83: 555-63.
- 4. Uphoff CC, Drexler HG.** Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2002; 38: 86-9.
- 5. Barile MF and Rottem S.** (1993) Mycoplasmas in Cell Culture. In: Kahane I and Adoni A (eds) *Rapid Diagnosis of Mycoplasmas* (pp. 155–193) Plenum Press, New York.
- 6. Hay RJ, Macy ML and Chen TR.** Mycoplasma infection of cultured cells. *Nature* 1989; 339: 487–488.
- 7. Drexler HG and Uphoff CC.** Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 2002; 39: 75–90.

KOMPARATÍVNA ANALÝZA KLONOVANÝCH A NEKLONOVANÝCH GLIOBLASTÓMOVÝCH BUNKOVÝCH LÍNIÍ

(Comparative analysis of clonal and non-clonal glioblastoma cell lines)

Ivana Siváková¹, Anna Perželová¹, Peter Mráz¹, Eliška Kubíková¹

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

Súhrn

Glioblastómy sú agresívne primárne mozgové nádory so zlou prognózou. Bunkové línie sú vhodným modelom na štúdium heterogenity gliómov, ktorá je považovaná za jednu z hlavných príčin neúspešnej terapie gliómov. Cieľom tejto štúdie je morfológická a imunocytochemická komparatívna analýza ľudských glioblastómových línií: klonovanej GL-15 a neklonovaných 8-MG-BA a 42-MG-BA. Cytoskeletárne vlastnosti buniek boli vyšetrované imunofluorescenčnými metódami s protilátkami vhodnými na detekciu troch typov intermediárnych filamentov (IF): gliálny fibrilárny acidický proteín (GFAP), vimentín (Vi) a cytokeratíny (CK). Imunofarbením sme detekovali rôzne percento GFAP a CK pozitívnych buniek, zatiaľčo vimentín bol prítomný vo všetkých kultivovaných bunkách. Pozorovali sme subpopuláciu buniek, kde bol koexprimovaný gliový (GFAP) a epitelový (CK) markerový proteín. Komparatívna analýza klonovanej línie GL-15 s našimi nedávno etablovanými a charakterizovanými glioblastómovými líniami (8-MG-BA, 42-MG-BA) odhalila väčšiu morfológickú a cytoskeletárnu heterogenitu v klonovanej bunkovej línii.

Kľúčové slová

GFAP, vimentin, cytokeratíny, glioblastóm

Summary

Glioblastomas are aggressive primary brain tumors with poor prognosis. The cell lines are available model for the studies of gliomas heterogeneity which is consider to be the main reason of unsuccessful glioma treatment. The aim of this study is morphological and immunocytochemical comparative analysis of human glioblastoma cell lines: clonal GL-15 and non-clonal 8-MG-BA and 42-MG-BA. Cytoskeletal cell properties were examined by immunofluorescence methods using appropriate antibodies to three types of intermediate filament (IF): glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin (Vi) and cytokeratins (CK). By immunostaining we detected different percentage of GFAP and CK positive cells, whereas vimentin was present in all cultured cells. We observed a subpopulation of glioblastoma cells with co-expression of glial (GFAP) and epithelial (CK) marker protein. The comparative analysis of clonal GL-15 with our recently established and characterized non-clonal glioblastoma cell lines (8-MG-BA and 42-MG-BA) revealed higher morphological and cytoskeletal heterogeneity in clonal cell line.

Key words

GFAP, vimentin, cytokeratins, glioblastoma

Úvod

Gliómy s vysokým stupňom malignity sú v súčasnosti najagresívnejšie primárne mozgové nádory. Prežívanie pacientov, aj napriek intenzívnej kombinovanej terapii, je len niekoľko mesiacov. Najväčším problémom v liečbe aj diagnostike gliómov je výrazná heterogenita gliómových bunkových populácií (Bigner a i., 1981, Máčiková a i., 1999, Aum a i., 2014). Vhodným modelom na štúdium biológie gliómov sú bunkové línie. Najčastejšie používanými markerovými proteínmi na určenie heterogenity a dediferenciácie buniek sú cytoskeletárne proteíny. Hlavnými komponentami cytoskeletu sú mikrotubuly, intermediárne filamenty (IF) a mikrofilamenty. IF majú dôležitú funkciu v regulácii bunkových procesov spojených s diferenciáciou buniek. V neuroonkológii sa používajú ako markerové proteíny v diagnostike nádorových ochorení a na určovanie stupňa malignity. Gliový fibrilárny acidický proteín (GFAP) je charakteristický pre bunky astrogliového pôvodu, vimentín (Vi) pre bunky mezenchymálneho pôvodu a cytokeratíny (CK) sú špecifické pre normálne a neoplastické epitelové bunky. Cieľom našej štúdie je porovnanie morfológických a cytoskeletárnych vlastností klonovanej glioblastómovej línie GL-15 s neklonovanými glioblastómovými líniami 8-MG-BA a 42-MG-BA.

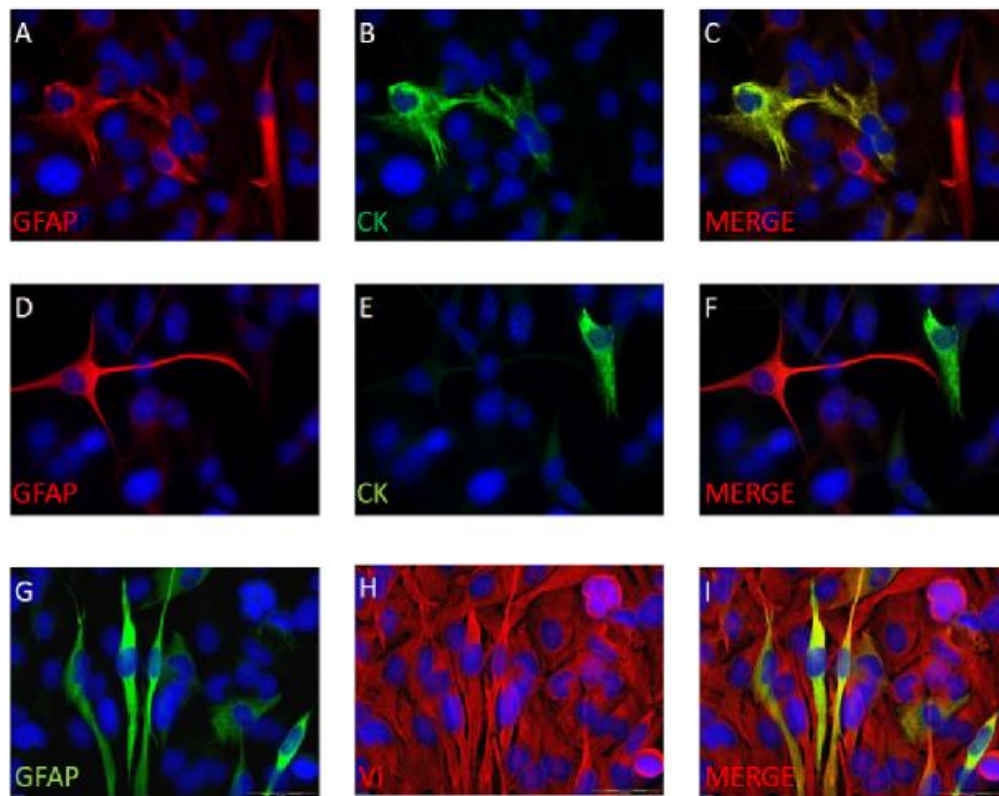
Materiál a metódy

Klonovanú glioblastómovú líniu GL-15 sme získali v rámci spolupráce s INSERM U-421 Paríž (Bocchini a i., 1991). V rokoch 1993-1998 sme v našom laboratóriu etablovali dve permanentné glioblastómové línie 8-MG-BA a 42-MG-BA (Perželová a i., 1998). Bunkové línie boli kultivované v médiu MEM, ktoré obsahovalo 10% fetálne teľacie sérum, glutamín a neesenciálne aminokyseliny, pasážované boli dvakrát týždenne pomocou 0,2% EDTA a 0,25% trypsínu. Kultúry pre imunofluorescenčné vyšetrenia rástli ako adherentná vrstva na krycích sklíčkach, ktoré sme fixovali metanol/acetónom (1:1) 15 min. Pri nepriamej imunofluorescencii boli fixované bunky inkubované s primárnou protilátkou 1 hod. a s vhodnou sekundárnou protilátkou 30 min. Pri dvojitej imunofluorescencii boli bunky inkubované 1 hod. s primárnou protilátkou, 30 min. s vhodnou sekundárnou protilátkou a 30 min. s GF-Cy3, alebo Vi-Cy3. Primárne protilátky boli riedené 1:100, sekundárne 1:50. Použili sme monoklonálne protilátky GF-01, Vi-V9, anti pan-CK, monoklonálna protilátka G-A-5 konjugovaná s Cy3 a Vi-V9 konjugovaná s Cy3. Primárne protilátky boli od firmy Sigma a sekundárne konjugované s fluorescenínom od firmy Biocom. Jadrá boli značené Hoechstom 33342 od firmy Sigma 1 min (5µm/ml v PBS).

Výsledky

Morfologické vlastnosti bunkových línii sme sledovali na nefixovaných bunkách pomocou fázového kontrastu na inverznom mikroskope Olympus IMT 2. V klonovanej línii GL-15 sme pozorovali heterogénny morfológický fenotyp, ktorý tvorili vretenovité a ploché bunky s rôzne vyvinutými výbežkami. Neklonované línie mali viac homogénny charakter s prevahou plochých buniek. Nepriamou imunofluorescenciou sme detekovali GFAP, Vi a CK v troch glioblastómových líniiach. V GL-15 kultúrach približne 20% buniek bolo intenzívne a 50% menej intenzívne sfarbených s protilátkami proti GFAP, zatiaľčo CK bol prítomný v rôznej intenzite v 3% buniek. Neklonované línie exprimovali menej intenzívne GFAP avšak CK bol výrazne pozitívny v 8-MG-BA (7%). Ojedinele sme pozorovali expresiu CK v 42-MG-BA línii. Všetky bunky v klonovanej a neklonovaných líniiach intenzívne exprimovali vimentín. Imunofluorescenčnými farbeniami sa znázornila fibrilárna štruktúra IF. V klonovanej GL-15

línii sme dvojitém značením zistili variabilné bunkové imunofenotypy: Vim+/GFAP+/CK+ , Vim+/ GFAP+/CK-, Vim+/GFAP-/ CK- (Obr.1 A-I).



Obr. 1 Klonovaná glioblastómová línia GL-15. Dvojité imunofluorescencia GFAP /CK (A-F), GFAP/Vi (G-I).

Diskusia a záver

V tejto štúdii sme zistili heterogénne morfológické vlastnosti v GL-15 klonovanej glioblastómovej línii, ktorú tvorili subpopulácie buniek s rôznymi cytoskeletárnymi vlastnosťami. Dvojitém značením sme potvrdili koexpresiu negliových (CK) a gliových (GFAP) markerových proteínov v glioblastómových bunkách.

Porovnávali sme morfológické a cytoskeletárne vlastnosti glioblastómových bunkových línii: klonovanej GL-15 s neklonovanými 8-MG-BA a 42-MG-BA. Bunky v neklonovaných líniiach boli morfológicky viac homogénne, zatiaľčo klonovaná línia bola charakteristická heterogénnou morfológiou buniek s rôzne vyvinutými výbežkami. Pre všetky línie bola charakteristická prítomnosť vimentínu vo všetkých bunkách a rôzne percento GFAP a CK pozitívnych buniek.

Z uvedených výsledkov je pozoruhodné, že klonovaná glioblastómová línia je morfológicky a cytoskeletárne viac heterogénna než neklonované glioblastómové línie.

Literatúra

- 1. Aum DJ, Kim DH, Beaumont TL, Leuthardt EC, Dunn GP, Kim AH, Albert H.** Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma. *Neurosurgical Focus* 2014; 37 (6), E11.
- 2. Bigner DD, Bigner SH, Ponten J, Westermark B, Mahaley MS, Ruoslahti E, Hershman H, Eng LF, Wikstrand CJ.** Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1981; 40, 201-229.
- 3. Bocchini V, Casalone R, Collini P, Rebel G, Curto LF.** Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell Tissue Res* 1991; 265, 73-81.
- 4. Mačíkova I, Peželova A, Mraz P, Steno J, Bizik I.** Heterogeneity of keratin intermediate filaments in human glioma cell lines. *Neoplasma* 1999; 46 (6), 390-393.
- 5. Perželova A, Mačíkova I, Mraz P, Bizik I, Steno J.** Charakterization of new permanent glioma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA. *Neoplasma* 1998; 45 (1): 25-29.

STANOVENIE TIOLOV V BIOLOGICKÝCH VZORKÁCH METÓDOU VYSOKO-ÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE

(HPLC determination of thiols in biological samples)

Zuzana Deáková

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, zuzana.deakova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Tioly majú okrem antioxidačnej schopnosti aj dôležitú úlohu napr. v detoxikácii organizmu, prenose bunkového signálu a apoptóze (1). Pri fyziologickom pH sa ľahko oxidujú molekulovým kyslíkom a vytvárajú disulfidy. Vedľajšími produktmi reakcie sú reaktívne formy kyslíka (2). Tieto regulujú priebeh niektorých procesov látkového metabolizmu, ale ich zvýšená koncentrácia spôsobuje narušenie vnútornej rovnováhy, čo sa môže prejaviť ako patologický efekt (3, 4). Zmena koncentrácie tiolov, resp. ich disulfidov je preto často považovaná za indikátor ochorenia resp. bunkovej dysfunkcie (5). Predložená práca obsahuje informácie o často používaných redukčných a derivatizačných činidlách potrebných na stanovenie tiolov metódou vysoko-účinnnej kvapalinovej chromatografie.

Kľúčové slová

Tioly, kvapalinová chromatografia

Summary

Apart from thiols role in defense against free radicals, they have significant role in detoxification of an organism, signal transduction, apoptosis and so on (1). They are easily oxidized into disulfides. Reactive oxygen species are intermediates of the oxidation reaction (2). Reactive oxygen species concentration is tightly regulated by a variety of proteins involved in the redox (reduction/oxidation) mechanism but their accumulation may signalize the pathological effects (3, 4). Thiol (resp. disulfides) concentration changes can be considered as an indicator of diseases or cell dysfunction (5). This article presents information about the reducing and derivatizing agents for thiols determination by using high-performance liquid chromatography.

Keywords

Thiols, liquid chromatography

Úvod

Charakteristika biologicky významných tiolov

Glutatión, tripeptid zložený z kyseliny glutámovej, cysteínu a glycínu, priamo detoxikuje reaktívne formy kyslíka a zlepšuje funkčnú schopnosť iných kľúčových antioxidantov - vitamínu E a C (6). Spolu s jeho oxidovanou formou sú najviac zastúpeným intracelulárnym tiol/disulfidovým párom a ich pomer (redukovaná/oxidovaná forma) sa často používa na indikáciu zdravia bunky a oxidatívneho stresu. Tento pomer je často redukovaný napr. pri

neurologických ochoreniach (7). Významnými medziproduktami zahrnutými v metabolizme glutatiónu sú *cysteinylglycín*, ktorý sa vyznačuje antiaterogenickými vlastnosťami (8) a *cysteín*. Cysteín je jednou z aminokyselín, ktorá obsahuje síru vo forme, ktorá napomáha inaktivovať voľné radikály, a tak chrániť tkanivá (6). Je najviac zastúpeným plazmatickým tiolom a jeho celková koncentrácia sa pohybuje v rozmedzí od 200 do 300 $\mu\text{mol/L}$. Oveľa častejšie sa stanovuje v plazme, pretože v prípade jeho stanovenia v moči je potrebné túto koncentráciu prepočítať na množstvo kreatinínu (9). Zvýšenú koncentráciu cysteínu v plazme, prípadne v moči možno označiť aj za dôležitý indikátor niektorých ochorení, napr. cystinózy a cystinúrie (10). Ďalšie práce ukazujú jeho spojenie s vaskulárnymi ochoreniami (11, 12). Niektorí autori však úplne nesúhlasia s jeho vzťahom ku kardiovaskulárnym ochoreniam (9). V súčasnosti často uznávaným rizikovým faktorom mnohých kardiovaskulárných a cerebrovaskulárných ochorení je *homocysteín* (13, 14). Homocysteín je medziproduktom metabolizmu metionínu, a teda jediným zdrojom tejto aminokyseliny je metionín. U zdravých ľudí sa koncentrácia celkového homocysteínu v plazme pohybuje v rozmedzí od 5 do 15 $\mu\text{mol/L}$ (15, 16). Homocysteín podporuje rast a tvorbu kostí i tkanív, avšak pri poruche metabolizmu metionínu nadbytočné množstvo difunduje do extracelulárneho priestoru a dostáva sa do krvi. Pri oxidácii homocysteínu vznikajú reaktívne formy kyslíka (superoxid a peroxid vodíka), ktoré môžu spôsobiť peroxidáciu lipidov a poškodenie buniek. Predpokladá sa teda, že centrálny nervový systém je citlivý najmä na extracelulárny homocysteín, pretože podporuje excytotoxicitu bunky cez stimuláciu NMDA (N-metyl-D-aspartát) receptorov a poškodzuje DNA neurónov (narušením transmetylácie DNA), a tým indukuje apoptózu (15-17).

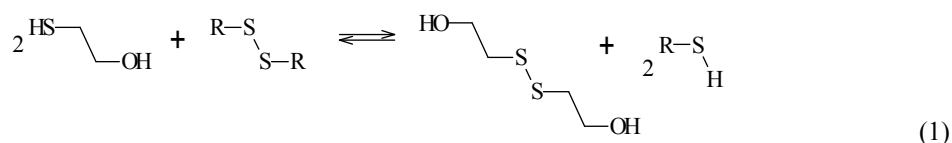
Redukčné činidlá používané na stanovenie tiolov

V organizme sa tioly nachádzajú buď voľne (oxidovaná a redukovaná forma) alebo naviazané na proteíny (1). Stanovenie celkového obsahu tiolov vo vzorke je teda možné až po redukcii ich oxidovaných foriem. Na redukcii disulfidových väzieb sa používa niekoľko redukčných činidiel. Medzi najznámejšie patria redukčné činidlá obsahujúce sulfydrylovú skupinu, fosfín a tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4).

Redukčné činidlá obsahujúce sulfydrylovú skupinu

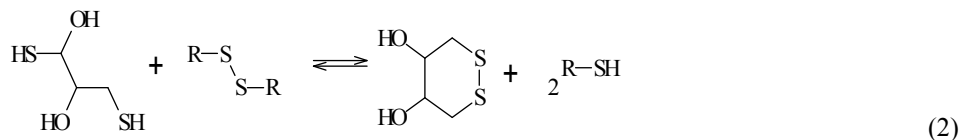
Najčastejšie používané reduktanty disulfidov sú tioly. Výhodou je najmä ich vysoká špecifickosť, pretože redukujú len disulfidy. Nevýhodou je ich reakcia s derivatizačným činidlom a oxidácia vzdušným kyslíkom (ak reakcia prebieha pri $\text{pH} > 7$). Preto tieto činidlá treba skladovať tak, aby sa zabránilo prístupu kyslíka k činidlu, prípadne by malo obsahovať aj chelátotvorné činidlo.

a) β -merkaptóetanol (ME) je prchavý a vo vode rozpustný tiol so zápachom. Používa sa na redukcii disulfidov v proteínoch a táto reakcia je rýchlejšia pri $\text{pH} > 7$. ME patrí medzi slabé redukčné činidlá, a preto sa používa pri vysokých koncentráciách, čím sa zabráni tvorbe tzv. zmiešaných disulfidov.



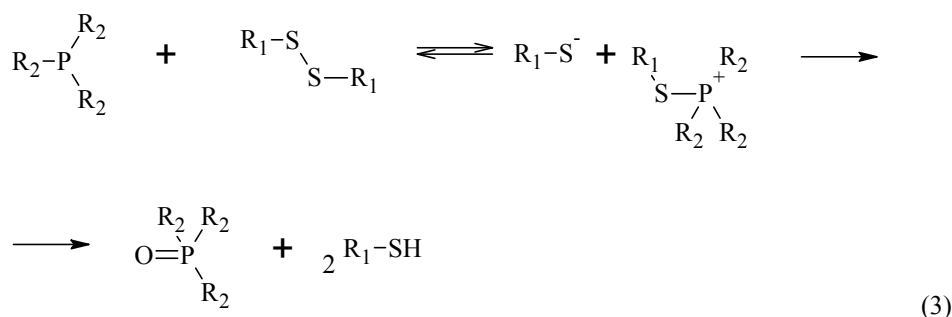
b) Ditiol (DTT) je silnejšie redukčné činidlo ako ME. Pri redukcii proteínových disulfidov je konvertovaný na stabilný intramolekulárny cyklický disulfid. Zvyčajne nie je potrebná vysoká

koncentrácia DTT (5-10 mmol/L) a kompletná redukcia disulfidov nastane v priebehu 5-10 min. pri pH > 8 (18).



Fosfíny

Fosfíny (trialkylfosfíny) kvantitatívne redukujú disulfidy na tioly. Oxidovaný fosfín sa už nemôže zúčastniť ďalšej tiol-disulfidovej reakcie na rozdiel od ME a DTT. Trialkylfosfíny reagujú špecificky s disulfidmi a nereagujú s inými funkčnými skupinami bežne prítomnými v proteínoch. Fosfíny nereagujú ani s niektorými derivatizačnými činidlami.



a) Tris(2-karboxyetyl)fosfín (TCEP) je vo vode rozpustný fosfín. Redukuje nízkomolekulové a proteínové disulfidy. Je účinnejší ako DTT najmä pri pH < 7. Je nestabilný vo fosfátovom tlmivom roztoku (pH = 7-8).

b) Tris(hydroxypropyl)fosfín je reaktívnejší ako TCEP. Redukuje nízkomolekulové aj proteínové disulfidy (18).

Tetrahydridoboritan sodný (NaBH₄)

Tetrahydridoboritan sodný je extrémne reaktívne a silné redukčné činidlo. Pripravuje sa tesne pred použitím, aby sa zabránilo jeho rozkladu. Niektoré štúdie ukázali, že NaBH₄ kvantitatívne redukuje proteínové disulfidy (18-22). Vo všeobecnosti nastáva úplná redukcia disulfidov pri použití 1 mol/L NaBH₄ (pH = 12) v priebehu 30 min. pri 50 °C. Počas reakcie sa tvorí vodík a bielkoviny penia. Tomuto neželanému javu sa dá predísť napr. prídavkom oktanolu alebo hexanolu do odmernej banky. Hlavnou výhodou použitia NaBH₄ je ľahké odstránenie jeho nadbytku prídavkom kyseliny alebo acetónu. V prípade použitia kyseliny sú voľné tiolové skupiny chránené pred oxidáciou aj v prípade, že redukčné činidlo bolo odstránené (18, 23).



Alternatívne redukčné činidlá

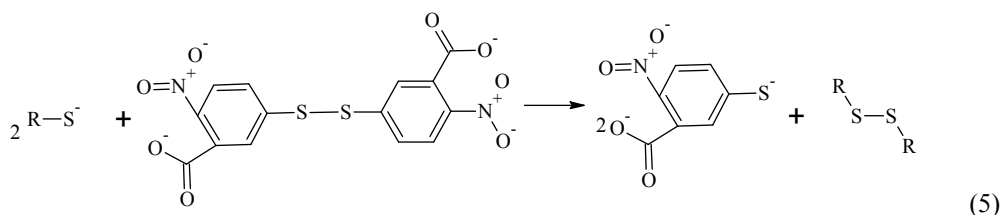
Disulfidové väzby možno redukovať aj *siričitanmi* (SO_3^-) alebo *kyanidmi* (CN^-). Avšak, redukcia týmito činidlami nie je kvantitatívna, pokiaľ sa nepoužije katalyzátor.

Nadbytok redukčného činidla je často nutné odstrániť (napr. gélovou filtráciou alebo kyselinou). Nevýhodou gélovej filtrácie je možná regenerácia disulfidov počas filtrácie a nevýhodou použitia kyseliny je neúplná eliminácia redukčného činidla. Všetky vyššie spomenuté činidlá by sa mali pripravovať tesne pred použitím, pretože ľahko podliehajú oxidácii (18).

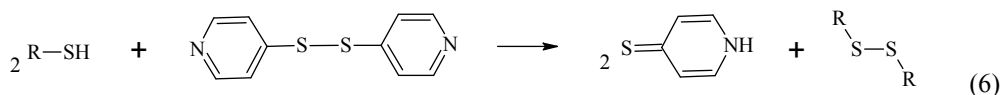
Derivatizačné činidlá používané na stanovenie tiolov

Keďže tioly neobsahujú chromofór ani fluorofór, často ich možno detegovať až po inkubácii s vhodným derivatizačným činidlom. Najbežnejšími derivatizačnými činidlami v prípade použitia UV detektora sú 5,5-Ditiobis-(2-nitrobenzoová kyselina) a 4,4-ditiodipyridín. Medzi najznámejšie fluoreskujúce činidlá (pri použití fluorescenčného detektora) patrí monobromobiman.

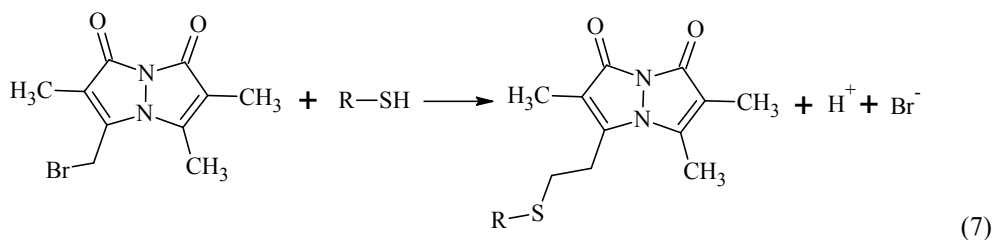
5,5-Ditiobis-(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB alebo Ellmanovo činidlo) je jedným z najčastejšie používaných činidiel na stanovenie tiolov (hlavne nízkomolekulových tiolov). DTNB reaguje s tiolátovým aniónom a tvorí žltý nitrotiobenzoát (NTB), ktorý absorbuje žiarenie v UV/VIS oblasti pri vlnovej dĺžke 412 nm (reakcia je nevratná). NTB je stabilný pri pH 6-9,5 a pri pH < 6 nastáva jeho protonizácia, čo ruší absorpciu žiarenia. Zvyčajne sa používa 1 mmol/L roztok a reakcia prebehne v priebehu 1 min. pri pH = 7,3. Vysoká polarita a negatívny náboj však môžu rušiť reakciu DTNB so sulfydrylovými skupinami nachádzajúcimi sa v proteínoch.



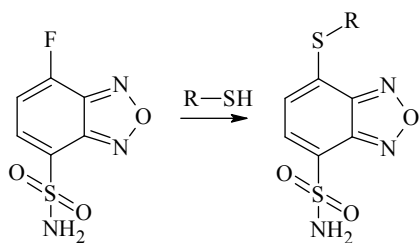
4,4-ditiodipyridín (4-DPS) tvorí s tiolmi 4-tiopyridon (4-TP), ktorý absorbuje žiarenie v UV oblasti pri vlnovej dĺžke 324 nm. Možno ho použiť na kvantifikáciu tiolov v proteínoch, resp. na stanovenie tiolov aj pri nízkom pH. Rovnako ako v prípade DTNB, aj pri 4-DPS musí byť redukčné činidlo najprv úplne odstránené.



Monobromobiman (mBBr) je činidlo citlivé na svetlo, a preto by reakcia s tiolmi mala prebiehať v tme. Nevýhodou je jeho slabá fluorescencia, ako aj reakcia s fosfinmi a redukčnými činidlami obsahujúcimi sulfydrylovú skupinu.

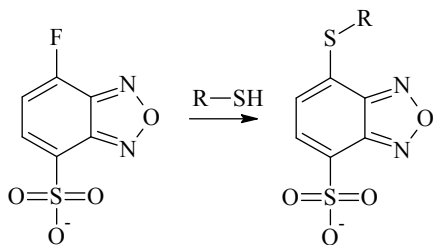


Ďalšími, často používanými derivatizačnými činidlami na kvantifikáciu nízkomolekulových tiolov sú 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol (ABD-F) a 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-4-siričitan (SBD-F). Tieto činidlá nevykazujú fluorescenciu, až pokým nevytvoria deriváty s tiolmi. Nereagujú s fosfinmi, a preto sa redukcia disulfidov a derivatizácia tiolov môže uskutočniť v jednom kroku. Derivatizácia tiolov s SBD-F vyžaduje zásadité pH (pH = 8,5), vysokú teplotu (60 °C) a dlhý inkubačný čas (1 hod.), zatiaľ čo derivatizácia tiolov s ABD-F prebehne pri pH = 8 a 60 °C v priebehu 10 min. (18).



ABD-F

(8)



SBD-F

(9)

Záver

Kvapalinová chromatografia je často používanou metódou na stanovenie tiolov v rôznych biologických vzorkách. Pre ich správne stanovenie je úprava vzorky kritickým krokom. Keďže tioly neobsahujú chromofór ani fluorofór možno ich detegovať až po inkubácii s vhodným derivatizačným činidlom. Vhodnou alternatívou môže byť napr. použitie elektrochemickej detekcie, kedy sa oxidácia (resp. redukcia) tiolov uskutočňuje priamo na povrchu elektródy detektora, a teda predkolónová derivatizácia vzorky nie je nutná.

Literatúra

1. **Prakash M.** Total thiols: Biomedical Importance And Their Alteration In Various Disorders. *OJHAS* 2009; 8 (2): 1-9.
2. **Jacobsen DW.** Hyperhomocysteinemia and Oxidative Stress Time for a Reality Check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1182-1184.
3. http://www.slpk.sk/eldo/2009/zborniky/008_09/michalik.pdf
4. **Ray PD, Huang BW, Tsuji Y.** Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012; 24(5): 981–990.
5. **Stipanuk MH.** Sulfur amino acid metabolism: Pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 539-577.
6. **Glowacki R., Bald E.** Fully automated method for simultaneous determination of total cysteine, cysteinylglycine, glutathione and homocysteine in plasma by HPLC with UV absorbance detection. *J Chromatogr B* 2009; 877: 3400-3404.
7. **Owen JB, Butterfiel DA.** Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. *Methods Mol Biol* 2010; 648: 269-77.
8. **Pinna A, Zinellu A, Franconi F, Solinas G, Carru C.** Decreased Plasma Cysteinylglycine and Taurine Levels in Branch Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmic Res* 2010; 43: 26–32.
9. **Rafii M, Elango R, Courtney-Martin G, House JD, Fisher L, Pencharz PB.** High-throughput and simultaneous measurement of homocysteine and cysteine in human plasma and urine by liquid chromatography–electrospray tandem mass spektrometry. *Anal Biochem* 2007; 371 (1): 71–81.
10. **Toyo'oka T.** Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples. *J Chromatogr B* 2009; 877 (28): 3318-3330.
11. **El-Khairi L, Ueland PM, Refsum H, Graham IM, Vollset SE; European Concerted Action Project.** Plasma total cysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. *Circulation* 2001; 103 (21): 2544-2549.
12. **Özkan Y, Özkan E, Simsek B.** Plasma total homocysteine and cysteine levels as cardiovascular risk factors in coronary heart disease. *Int J Cardiol* 2002; 82 (3): 269-277.
13. **Cook JW, Taylor LM, Orloff SL, Landry GJ, Moneta GL, Porter JM.** Homocysteine and arterial disease Experimental mechanism. *Vasc Pharmacol* 2002; 38 (5): 293-300.
14. **Isobe C, Murata T, Sato C, Terayama Y.** Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci* 2005; (77) 15: 1836-1843.
15. **Nekrassova O, Lawrence NS, Compton RG.** Analytical determination of homocysteine: a review. *Talanta* 2003; 60 (6): 1085-1095.
16. **Carmel R., Jacobsen DW (Eds).** Homocysteine in Health and Disease. United Kingdom; Cambridge University Press, 2001.
17. **Mattson MP., Shea TB.** Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *TRENDS Neurosci* 2003; (26) 3: 137-146.
18. **Hansen RE, Winther JR.** An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations: Review. *Anal Biochem* 2009; (394) 2: 147-158.
19. **Hansen RE, Østergaard H, Nørgaard P, Winther JR.** Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4, 40-dithiodipyridine. *Anal Biochem* 2007; 363 (1): 77–82.
- 17.
20. **Brown WD.** Reduction of protein disulfide bonds by sodium borohydride. *Biochim Biophys Acta* 1960; 44 (1): 365–367.
21. **Calvallini D, Graziani MT, Dupré S.** Determination of disulphide groups in proteins. *Nature* 1996; 212 (5059): 294–295.

- 22. Habeeb AFSA.** Sensitive method for localization of disulfide containing peptides in column effluents. *Anal Biochemi* 1973; 56 (1): 60–65.
- 23. Singh R, Kats L.** Catalysis of reduction of disulfide by selenol. *Anal Biochem* 1995; 232 (1): 86-91.

VPLYV NANOČASTÍC PEG-*b*-PLA A TiO₂ NA OXIDAČNÝ STRES POTKANOV

(PEG-*b*-PLA and TiO₂ nanoparticles effect in oxidative stress in rats)

Monika Dvořáková¹, Soňa Scsuková², Eva Rollerová³, Ingrid Žitňanová¹

¹ Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava

² Ústav experimentálnej endokrinológie, Slovenská akadémia vied, Vlárská 3, 833 06 Bratislava

³ Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 12, 833 03 Bratislava

Súhrn

Nanomateriály so svojimi unikátnymi fyzikálno – chemickými vlastnosťami (relatívne veľký pomer povrch/objem nanočastice, jej reaktivita) umožňujú ich široké využitie v rôznych priemyselných odvetviach. V dnešnej dobe sú nanočastice často používané v nanomedicíne ako nástroj pre doručenie liečiv. Napriek vzrastajúcej popularite nanočastíc, ich plnohodnotné využívanie je limitované potenciálnou toxicitou. Viacero štúdií (Singh a Nalwa, 2007, Khanna a kol., 2015, Tee a kol., 2015) potvrdilo, že indukujú tvorbu reaktívnych metabolitov kyslíka, ktoré môžu viesť až k oxidačnému stresu a následnému poškodeniu biologicky významných molekúl (nukleových kyselín, proteínov a lipidov).

Cieľom našej štúdie bolo zistiť vplyv komerčne využívaných nanočastíc s rozdielnymi fyzikálno – chemickými vlastnosťami [poly(etylén)glykol-*block*-polylaktidmetyléter (PEG-*b*-PLA) a TiO₂] na oxidačný stav plazmy potkanov reprezentovaný celkovou antioxidačnou kapacitou (TEAC) *in vivo*.

Kľúčové slová

Oxidačný stres, nanočastice, celková antioxidačná kapacita

Summary

Nanomaterials have unique physicochemical properties due to their relatively big surface/volume ratio and their reactivity, favoring their usage in various industries. Nowadays, nanoparticles are frequently used as a tool for drug delivery in nanomedicine. Despite the increasing popularity of nanotechnology, its application has been limited due to their potential toxicity. It is known they can induce production of reactive oxygen species (ROS) (Singh and Nalwa, 2007, Khanna et al., 2015, Tee et al., 2015), leading to an oxidative stress followed by the damage of biologically important molecules (nucleic acids, proteins and lipids).

The aim of our study was to monitor the effect of commercially used nanoparticles with different physico - chemical properties [poly(ethylene)glycol-*block*-polylactide methyl ether (PEG-*b*-PLA) or TiO₂] on the oxidative status of rats represented by total antioxidant capacity (TEAC) *in vivo*.

Studies on nanotoxicity associated to oxidative stress are of great importance in further development of drugs in medicine.

Key words

Oxidative stress, nanoparticles, total antioxidant status

Úvod

Nanočastice sú považované za technológiu budúcnosti s využitím v biomedicíne. Ich veľkosť (1 - 100 nm) umožňuje ich prienik cez biologické membrány a tým získavame ideálny prostriedok pre transport liečiv v ľudskom organizme. Napriek tomu, práve ich veľkosť, relatívne veľký pomer povrch/objem a reaktivita predstavujú potenciálne riziko. Nedostatok informácií o účinku expozície PEG – *b* – PLA a TiO₂ na oxidačný stav organizmu potkanov nás viedol k sledovaniu vplyvu nanočastíc na celkovú antioxidačnú schopnosť (TEAC) v plazme v podmienkach *in vivo*.

Materiál a metódy

Micely nanočastice PEG – *b* – PLA boli pripravené podľa Du a kol. (2009) a Shin a kol. (2009) a ocharakterizované transmisnou elektrónovou mikroskopiou (Rollerová a kol., 2015).

Suspenzia TiO₂ bola pripravená sonifikáciou nanoprášku TiO₂ (<100 nm) pomocou sonikátora so sondou (MSE Ultrasonic Disintegrator), 15 min, 150W. Prítomnosť nanočastíc v suspenzii bola potvrdená pomocou elektrónovej mikroskopie. Suspenzia bola pripravená vždy čerstvá v deň intraperitoneálneho podávania.

Samiciam potkanov z rodu Wistar boli denne na postnatálny deň (PND) 4 - 7 intraperitoneálne podávané dve rozdielne dávky PEG-*b*-PLA (20 mg/kg a 40 mg/kg telesnej hmotnosti, n = 31), v prípade kontrolnej skupiny bol podávaný len nosič tetrahydrofurán (n = 16), alebo im boli podané dve rozdielne dávky TiO₂ (1%LD₅₀TiO₂ alebo 10%LD₅₀TiO₂ vo fyziologickom roztoku, n = 57), v prípade kontrolnej skupiny nosič (fyziologický roztok, 10 ml/kg telesnej hmotnosti, n = 31). Zvieratá boli usmrtené dekapitáciou po ketamín/xylazínovej anestézii (60/10 mg/kg telesnej hmotnosti) na PND17 (PEG-*b*-PLA), PND15 (TiO₂), alebo po PND176 u oboch použitých nanočastíc.

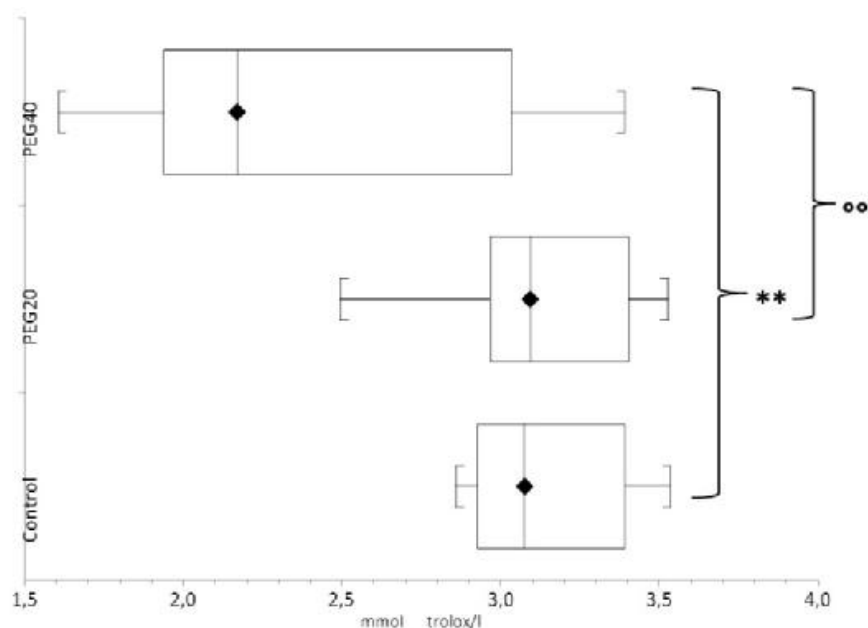
Celkový antioxidačný status (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) bol stanovený podľa Re a kol. (1999) v podmienkach *in vivo*.

Výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou programu StatsDirect3, hodnoty sú uvedené ako medián s interkvartilovým rozmedzím (Q1-Q3, 25-75%).

Výsledky

U potkanov usmrtených na PND17 v porovnaní s kontrolnou skupinou [3,046 (2,882-3,313) mmol troloxu/l] sme po podaní PEG – *b* – PLA nezaznamenali zmenu antioxidačnej kapacity (TEAC) po podaní dávky 20 mg/kg hmotnosti (PEG20) [3,071 (2,952-3,39) mmol troloxu/l], pri dávke 40 mg/kg hmotnosti (PEG40) však bolo zistené signifikantné zníženie TEAC [2,124 (1,826-2,87) mmol troloxu/l, p < 0,01] (Obr. 1).

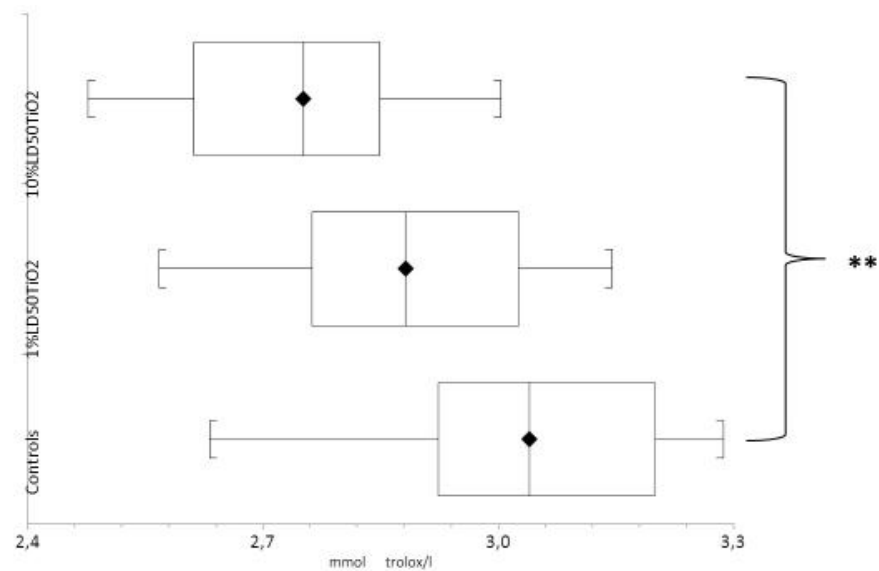
U potkanov usmrtených po PND176 v porovnaní s kontrolnou skupinou [2,842 (2,758-3,004) mmol troloxu/l] sme po podaní žiadnej z dávok PEG – *b* – PLA nepozorovali signifikantnú zmenu antioxidačnej kapacity (TEAC) [2,586 (2,518-2,89) mmol troloxu/l u PEG20, resp. 2,951 (2,925-2,955) mmol troloxu/l u PEG40, p > 0,05].



Obr. 1 Celková antioxidačná kapacita (TEAC) plazmy potkanov usmrtených v PND17 po podaní PEG – b – PLA v dávke 20 mg/kg hmotnosti (PEG20) alebo 40 mg/kg hmotnosti (PEG40). Hodnoty sú uvedené ako medián s interkvartilovým rozmedzím (Q1-Q3, 25-75%)

** signifikancia medzi kontrolou a PEG40 (** - $p < 0,01$)

°° signifikancia medzi PEG20 a PEG40 (°° - $p < 0,01$)

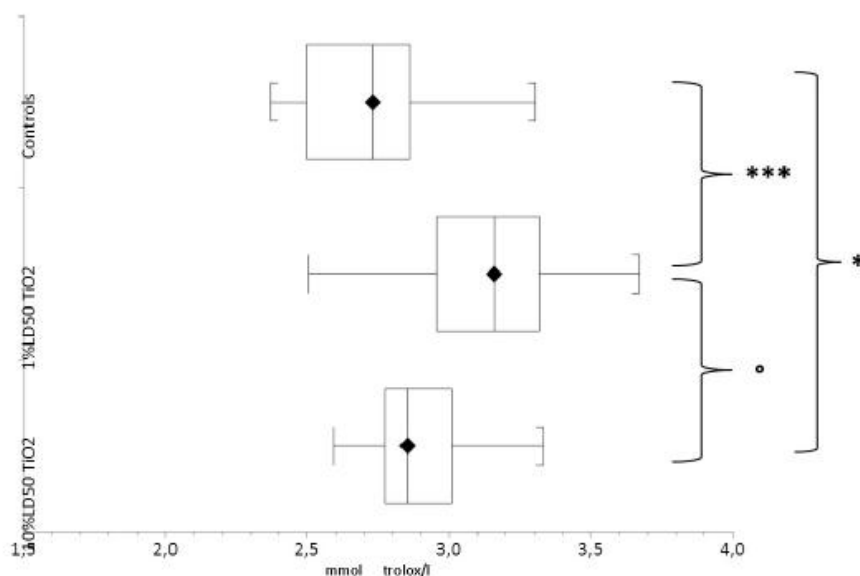


Obr. 2 Celková antioxidačná kapacita (TEAC) plazmy potkanov usmrtených v PND15 po podaní 1%LD₅₀TiO₂, alebo 10%LD₅₀TiO₂. Hodnoty sú uvedené ako medián s interkvartilovým rozmedzím (Q1-Q3, 25-75%)

** signifikancia medzi kontrolou a 10%LD₅₀TiO₂ (** - $p < 0,01$)

V prípade TiO_2 , u potkanov usmrtených na PND15, sme zistili signifikantné zníženie celkovej antioxidačnej kapacity v porovnaní s kontrolnou skupinou [2,942 (2,899-3,195) mmol troloxu/l] len po podaní 10%LD₅₀TiO₂ [2,724 (2,586-2,843) mmol troloxu/l, $p < 0,01$]. Po podaní 1%LD₅₀TiO₂ zmena TEAC nebola signifikantne významná [2,881 (2,727-2,93) mmol troloxu/l, $p > 0,05$] (Obr. 2).

Už podanie 1%LD₅₀TiO₂ u potkanov usmrtených po PND176 spôsobilo signifikantné zvýšenie TEAC v porovnaní s kontrolami [3,124 (2,935-3,298) mmol troloxu/l v prípade TiO₂, resp. 2,721 (2,479-2,835) mmol troloxu/l u kontrol, $p < 0,001$]. Podanie 10%LD₅₀TiO₂ signifikantné zvýšenie TEAC [2,850 (2,76-3,004) mmol troloxu/l, $p < 0,01$] potvrdilo (Obr. 3).



Obr. 3 Celková antioxidačná kapacita (TEAC) plazmy potkanov usmrtených po PND176 po podaní 1%LD₅₀TiO₂, alebo 10%LD₅₀TiO₂. Hodnoty sú uvedené ako medián s interkvartilovým rozmedzím (Q1-Q3, 25-75%)

*, *** signifikancia medzi kontrolou a použitou nanočasticou (* - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$)

° signifikancia medzi 1%LD₅₀TiO₂, a 10%LD₅₀TiO₂ (° - $p < 0,05$)

Diskusia a záver

V ostatných rokoch sa venuje veľká pozornosť systémom založeným na malej veľkosti častíc, ktoré sú schopné doručiť a uvoľniť liečivo priamo na miesto určenia. V bunkách prítomné nanočastice sú úzko prepojené so zvýšením vnútrobunkových reaktívnych metabolitov kyslíka a/alebo prozápalových faktorov (Hussain a kol., 2005, Kim a kol., 2009, Khana a kol., 2015).

PEG – *b* – PLA nanočastice dokážu vo vnútri micely solubilizovať vo vode nerozpustné liečivá ako paclitaxel alebo doxorubicín, ktoré sa využívajú pri liečbe nádorov (Xiao a kol., 2011), ich úloha je teda nevyvrátiteľná. Okrem toho predlžujú polčas rozpadu daného lieku z niekoľkých minút až na hodiny, čím umožňujú jeho pôsobenie priamo v mieste nádoru. Napriek tomu naše výsledky dokazujú, že podanie 40 mg PEG – *b* – PLA /kg hmotnosti (PEG40) potkana môže spôsobiť zníženie celkovej antioxidačnej schopnosti plazmy, ale len u jedincov usmrtených v PND17 (Obr.1).

O TiO₂, ktorý bol v minulosti považovaný za inertnú časticu (Lindenschmidt a kol., 1990), je dnes už známe, že je schopný transportu cez biologické membrány do tkanív a orgánov, čím dokáže indukovať ich poškodenie (Wang a kol., 2007). Po podaní 1%LD₅₀TiO₂ aj 10%LD₅₀TiO₂ sme zistili signifikantné zníženie antioxidačnej kapacity plazmy PND15 jedincov v porovnaní s kontrolami. Toto zistenie je v súlade so štúdiami, ktoré hovoria o súvisi medzi oxidom titaničitým a zvýšenou hladinou hydroxylového radikálu a teda aj zvýšeným poškodením lipidov a nukleových kyselín (Trouiller a kol., 2009).

Türkez a Geyikoglu (2007) zistili znižovanie aktivity antioxidačných enzýmov s rastúcou koncentráciou TiO₂. Tieto výsledky sú v rozpore s našimi meraniami, podľa ktorých celková antioxidačná kapacita u jedincov usmrtených po PND176 (Obr.2, 3) vzrastá, najmä po podaní 1%LD₅₀TiO₂. Tento výsledok si dnes nevieme vysvetliť a jeho objasnenie si vyžaduje ďalšie merania.

Mechanizmus pôsobenia nanočastíc na oxidačný stav organizmu nie je dostatočne objasnený. Na to, aby sme dokázali popísať mechanizmus oxidačného stresu, ktorý vyvolávajú, je potrebné vykonať ďalšie stanovenia vybraných parametrov oxidačného stresu, napr. stanovenie markerov oxidačného poškodenia proteínov, lipidov a nukleových kyselín.

PodĎakovanie

Projekt vznikol na základe finančnej podpory grantu APVV-0404-11.

Literatúra

- 1. Du JZ., Tang LY., W.-J. Song, Y. Shi, J. Wang.** Evaluation of polymeric micelles from brush polymer with poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(ethylene glycol) side chains as drug carrier, *Biomacromolecules* 10 (2009) 2169–2174.
- 2. Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager, J.J.** In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 975 – 983, 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. Kim S., Choi J.E., Choi J., Chung K-H., Park K., Yi J., Ryu D-Y.** Oxidative stress – dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in vitro*, 1076 – 1084. 2009.
- 5. Lindenschmidt R.C., Driscoll K.E., Perkins, M.A., Higgins, J.M., Mourer J.K., Belfiore K.A.,** The comparison of a fibrogenic and two non – fibrogenic dusts by bronchoalveolar lavage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 102, 268 – 281, 1990.
- 6. 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;26:1231-1237
- 7. 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.
- 8. 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.
- 9. Singh S., Nalwa HS.** *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 7(9):3048-3070, 2007.
- 10. Tee JK., Ong CN., Bay BH., Ho HK., Leong DT.** Oxidative stress by inorganic nanoparticles. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wnan.1374>, 2015.

- 11. Trouiller B., Reliene R., Westbrook A., Solaimani P., Schiestl RH.** Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability In vivo in Mice. *Cancer Res*; 69: (22). November 15, 2009.
- 12. Türkez H., Geykoglu F.** An *in vitro* blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: the responses of antioxidant enzymes. *Toxicology and Industrial Health*; 23: 19–23. 2007.
- 13. Wang J.X., Zhou G.Q., Chen C.Y., Yu, H.W., Wang T.C., Ma Y.M., Jia G., Gao Y.X., Li B., Sun J., Li Y.F., Jiao F., Zhao Y.L., Chai, Z.F.** Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Letters*. 168, 176 – 185, 2007.
- 14. Xiao L., Xiong X., Sun X., Zhu Y., Yang H., Chen H., Gan L., Xu H., Yang X.** Role of cellular uptake in the reversal of multidrug resistance by PEG-b-PLA polymeric micelles. *Biomaterial* 32, 5148 – 5157, 2011.

ÚLOHA HYPERVARIABILNEJ OBLASTI RAS PROTEÍNOV V ICH VNÚTROBUNKOVOM TRANSPORTE

(The role of hypervariable region of Ras proteins for their targeting)

Helena Gbelcová¹, Vanda Repiská¹, Daniel Böhmer¹, Tomáš Ruml², Zdeněk Knejzlík²

¹ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR, helena.gbelcova@fmed.uniba.sk

² Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie VŠChT, Technická 5, 166 28 Praha 6, ČR

Súhrn

Ras proteíny sú malé s membránou viazané GTPázy dôležité pre prenos signálov regulujúcich rast, prežitie a diferenciáciu buniek. Rôzne Ras izoformy (H-ras, N-ras, K-ras) sprostredkujú rôzne signály. Za tieto biologické rozdiely je zodpovedný krátky úsek na C-konci Ras proteínov označovaný ako hypervariabilná oblasť. Pre ukotvenie Ras proteínov v bunkových membránach a následnú signalizáciu Ras proteínov je potrebná správna posttranslačná modifikácia hypervariabilnej domény. Procesy súvisiace s posttranslačnou modifikáciou Ras proteínov sa dostali na vrchol záujmu pri dizajnovaní nových liekov použiteľných pri liečbe nádorových ochorení spájaných s mutovanými Ras proteínmi. Aj z tohto dôvodu je nutné poznať presný význam jednotlivých krokov posttranslačných úprav hypervariabilnej oblasti Ras proteínov.

Kľúčové slová

Ras, farnezylácia, palmitoylácia, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum

Summary

Ras proteins are small membrane bound GTPases essential in transducing of the signals that regulate cell growth, survival and differentiation. Different Ras isoforms (H-ras, N-ras, K-ras) generate distinct signal outputs. These biological differences are accounted for the short carboxy-terminal hypervariable domain. The correct posttranslational processing of hypervariable domain is required for Ras association with the cell membranes and signaling. Posttranslational modifications of Ras proteins dominate in designing of new drugs useful in the treatment of cancer diseases caused by mutated Ras proteins. For this reason it is necessary to know the exact role of each step of posttranslational modifications of the hypervariable region of Ras proteins.

Key Words

Ras, farnesylation, palmitoylation, Golgi, Endoplasmic reticulum

Úvod

Ras proteíny v netransformovaných bunkách cirkulujú medzi aktívnym a neaktívnym stavom a tak regulujú bunkový rast, delenie, diferenciáciu, prežívanie a bunkovú smrť (1). Od objavenia takzvanej aktivačnej mutácie *ras* génu v nádorových bunkách ľudí, ktoré odštartovalo intenzívny výskum zameraný na pochopenie štruktúry, kinetiky a signalizácie Ras proteínov, ubehlo už viac ako 30 rokov. Všetky nadobudnuté poznatky viedli k vývoju terapií cielených na Ras proteíny založených na zabránení aktivácie, prípadne správnej posttranslačnej modifikácie Ras proteínov a tým znemožneniu plnenia ich funkcie, alebo na priamej inhibícii transportu signálu nimi bežne sprostredkovaného. Pokroky v technológii sekvenovania umožnili masívne mapovanie kompletného genómu rôznych tkanív, vrátane jednotlivých typov nádorov. *Ras* izoformy sa okamžite dostali do centra pozornosti, nakoľko boli najčastejšie mutovanými génmi v nádorových tkanivách.

Tri *ras* gény (*K-ras*, *N-ras* and *H-ras*) kódujú štyri Ras proteíny (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A and K-Ras4B), nízkomolekulové guanozíntrifosfatázy (GTPázy). Okrem K-Ras4B, ktorý pozostáva zo 188 aminokyselín, všetky Ras proteíny sú tvorené zo 189 aminokyselín (2). Ras proteíny majú mimoriadne podobnú sekvenciu v oblasti domén viažucich efektoary, výmenné faktory a guanínukleotidy (Obr. 1). Jediná oblasť Ras izoformiem, ktorá vykazuje významné rozdiely v sekvenciách báz, je tzv. hypervariabilný región (HVR) na C-konci proteínov pozostávajúci z 24 aminokyselín (Obr. 1). Ten obsahuje dve signálne sekvencie spolupracujúce na ciele Ras proteínov k plazmatickej membráne (PM). Prvou z nich je CAAX motív (C – cysteín, A – alifatická aminokyselina, X – serín alebo metionín) (3,4), druhú tvorí polybázický úsek šiestich lyzínových zvyškov (175-180) v K-Ras4B, alebo cysteín 180 v K-Ras4A, 181 v N-Ras, a 181 a 184 v H-Ras (2,3,5)(Obr. 1).

	hypervariabilná oblasť	lipidová modifikácia
H-Ras	HKLRKLNPPDESGP GCMSCCKVLS	farnezylácia, palmitoylácia
N-Ras	YRMKKLNSSDDGTQG CMGLPCVLM	farnezylácia, palmitoylácia
K-Ras4A	YRLKKISKEEKTTPG CVKIKKCIIM	farnezylácia, palmitoylácia
K-Ras4B	HKEKMSKDGG KKKKKSKTKCMIM	farnezylácia

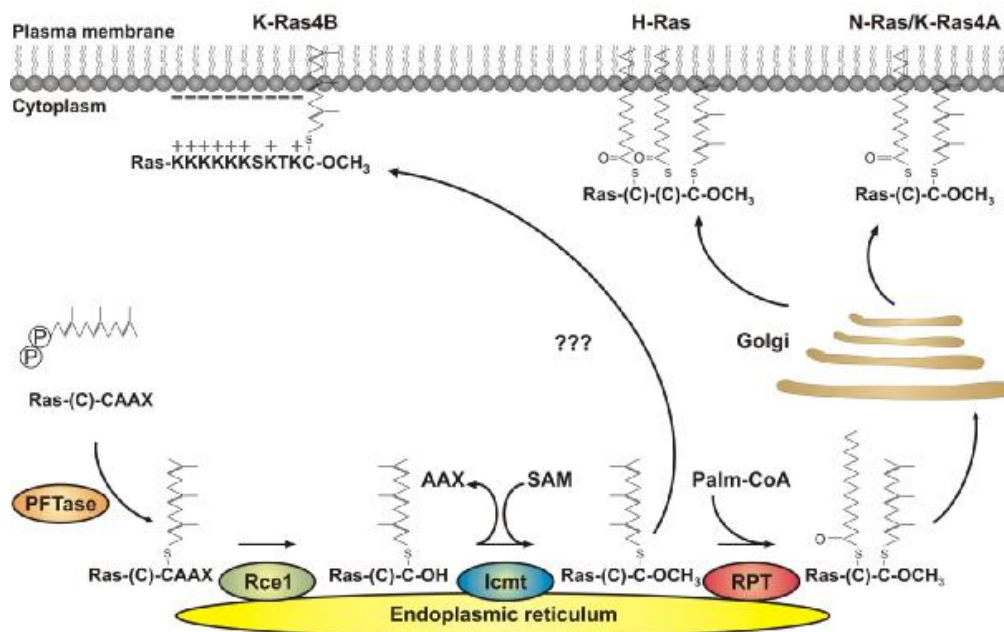
CAAX motív

Obr. 1 Štruktúra Ras hypervariabilnej oblasti (upravené podľa (6,7)).

Procesovanie a vnútrobunkový transport Ras proteínov k PM je znázornený na Obr. 2. Farnezylácia Ras proteínov je nevyhnutná pre ich transport k PM a ukotvenie v nej. Novo syntetizované prekursor Ras proteínov po farnezyláci v cytoplazme smerujú k ER, kde prebiehajú ďalšie modifikačné kroky, ktoré sú pre jednotlivé Ras izoformy rôzne. Zatiaľ čo H-Ras, N-Ras a K-Ras4A vyžadujú palmitoyláciu pre transport na ER a Golgiho aparát (GA) a následný vezikulárny transport k PM, nepalmitoylovaný K-Ras4B nepodstupuje konvenčnú sekrečnú dráhu, ale smeruje z ER priamo na PM doteraz presne neopísaným, GA nezávislým spôsobom (8,9) (Obr. 2). Úsek šiestich susediacich lyzínov a päť ďalších lyzínových zvyškov v HVR spájajú K-Ras4B prostredníctvom iónových interakcií s negatívnym nábojom hláv fosfolipidových skupín v PM. Palmitát palmitoylovaných Ras proteínov tiež prispieva k membránovej interakcii jeho schopnosťou vložiť sa hlboko do lipidovej dvojvrstvy (10,11).

Procesovanie CAAX motívu začína v cytoplazme FTázou, ktorá na cysteín v motíve pridáva farnezylovú skupinu. Dokončenie procesovania prebieha na ER pomocou Rce1 (odstránenie AAX tripeptidu) a Icmt (metylácia použitím SAM ako substrátu) enzýmov. K-Ras je následne

translokovaný z ER na PM GA nezávislým spôsobom. H-Ras a N-Ras, sú palmitoylované RPTázou (vyžíva Palm-CoA ako substrát), a translokované klasickou sekrečnou cestou cez GA na PM. C - cysteín, A – alifatická aminokyselina, X – serín alebo metionín, FTáza - farnezyltransferáza, ER – endoplazmatické retikulum, GA – Golgiho aparát, Icmt – izoprenylcysteínkarboxymetyltransferáza, Rce1 - Ras meniaci enzým, Palm-CoA - palmitoyl koenzým A, SAM - S-adenozylmetionín, RPT - ER-lokalizovaná palmitoyltransferáza, PM – plazmatická membrána (upravené podľa (12).



Obr. 2 Posttranslačná modifikácia a konvenčný vnútrobunkový transport Ras proteínov.

Vďaka tomu, že farnezylácia predstavuje kľúčový krok v správnej posttranslačnej modifikácii a následnej signalizácii Ras proteínov, enzýmy katalyzujúce tieto deje sa dostali na vrchol záujmu pri dizajnovaní nových liekov použiteľných pri liečbe nádorových ochorení s výskytom mutovaných Ras proteínov (12). Nemalá pozornosť je v súvislosti s inhibíciou farnezylácie Ras proteínov venovaná aj statínom, v súčasnosti svetovo najpoužívanejšej skupine látok na zníženie hladiny cholesterolu v krvi. Statíny inhibujú tzv. mevalonátovú dráhu v jej rýchlosť limitujúcom kroku, ktorej medziproduktom je práve farnezylpyrofosfát potrebný pre správnu modifikáciu Ras proteínov. Kanceroprotektívne účinky statínov proti vzniku pľúcnych nádorov a nádorov prostaty v dávkach používaných na liečbu hypercholesterolémie boli popísané v retrospektívnej štúdii vykonanej na skupine bez mála 500 000 amerických vojnových veteránov (13). V klinickej praxi v úlohe protinádorových látok zatiaľ statíny nevystupujú v dôsledku nepresne definovaného veľkého množstva nežiaducich vedľajších účinkov, ktoré by mohli mať v dávkach s terapeutickým účinkom. Z tohto dôvodu sme pripravili konštrukty kódujúce GFP značené N-Ras proteíny (celý a aj jeho C-koniec) simulujúce inhibíciu farnezylácie alebo palmitoylácie a sledovali vplyv týchto mutácií na vnútrobunkovú lokalizáciu daných proteínov.

Materiál a metódy

Bunky

HEK 293T – ľudské primárne embryonálne bunky obličky transformované adenovírusom (ATCC, Manassas, VA, USA)

HeLa – ľudské epitelové bunky izolované z nádoru krčka maternice (ATCC, Manassas, VA, USA)

Plazmidy

pEGFP-C1 (Clontech, CA, USA)

pDsRed2-ER (Clontech, CA, USA) – umožňuje fluorescenčné značenie endoplazmatického retikula v cicavčích bunkách

pDsRed-Monomer-Golgi (Clontech, CA, USA) – umožňuje fluorescenčné značenie Golgiho aparátu v cicavčích bunkách

Oligonukleotidy

+BglII_Nras	5'- GCAAGATCTATGACTGAGTACAAACTGGTGGTGGTTGG
-Pst_Nras	5'- TTTCTGCAGTTACATCACCACACATGGCAATCCCATACA
+NrasC181S	5'- GATGATGGGACTCAGGGTAGTATGGGATTGCCATGTGTG
-NrasC181S	5'- CACACATGGCAATCCCATACTACCCTGAGTCCCATCATC
-Nras(C186S)Pst	5'- TGCACCTGCAGTTACATCACCACACTTGGCAATCCCATACAA
+HVR-NRAS-BglII	5'- GAAGATCTCAGTACCGAATGAAAAAACTCAACAG
-HVR-NRAS-PstI	5'- ATGCACTGCAGTTACATCACCACACATGGCAATCCCAT

Kultivácia buniek

Bunkové línie HEK 293T a HeLa boli kultivované v termostate pri 37 °C a vlhčenej atmosfére obsahujúcej 5% CO₂. Na kultiváciu bolo použité médium DMEM (Dulbeccom modifikované Eaglovo médium, Sigma, USA) obohatené fetálnym sérom (10%, Sigma, USA).

Príprava DNA konštruktov

Konštrukt	Primery	Templát	Vektor	Metóda
pEGFPNrasWT	+BglII_Nras -Pst_Nras	HeLa total RNA	pEGFP-C1	RT-PCR
pEGFPNrasC181S	+NrasC181S -NrasC181S	pEGFPNrasWT	-	PCR mutagenesis
pEGFPNrasC186S	+BglII_Nras -Nras(C186S)Pst	pEGFPNrasWT	-	PCR mutagenesis
pEGFPNrasCendWT	+HVR-NRAS-BglII -HVR-NRAS-PstI	pEGFPNrasWT	pEGFP-C1	PCR
pEGFPNrasCendC181S	+HVR-NRAS-BglII -HVR-NRAS-PstI	pEGFPNrasC181S	pEGFP-C1	PCR
pEGFPNrasCendC186S	+HVR-NRAS-BglII -Nras(C186S)Pst	pEGFPNrasC186S	pEGFP-C1	PCR

Tab. 1 Príprava DNA konštruktov

Konštrukty kódujúce proteíny Ras boli vytvorené ligáciou fragmentov DNA (vytvorené pomocou RT-PCR alebo PCR) a vhodných vektorov alebo cielenou PCR mutagenézou z vopred pripravených konštruktov (tab.1). Správnosť pripravených konštruktov bola overená sekvenovaním DNA. Expresné produkty všetkých konštruktov boli analyzované metódou Western blot.

Celková RNA bola izolovaná z bunkovej línie HeLa pomocou komerčnej súpravy RNeasy Kit (Qiagen, USA). *N-ras* onkogén bol izolovaný metódou RT-PCR pomocou komerčnej súpravy Enhanced Avian HS RT-PCR Kit (Sigma, USA). Zloženie reakčnej zmesi RT-PCR a teplotné a časové parametre zodpovedali odporúčaniam výrobcu komerčnej súpravy. Primery pre amplifikáciu 570-bp dlhých *N-ras* cDNA fragmentov sú uvedené vyššie. Produkty boli prečistené pomocou komerčnej súpravy QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA).

Lepivé konce plazmidov a DNA fragmentov boli produkované reštrikčnými endonukleázami *BglII* a *PstI* (New England Biolabs, USA). Linearizované molekuly DNA plazmidu boli defosforylované alkalickou fosfatázou CIP (New England Biolabs, USA).

Ligačná reakčná zmes obsahovala DNA (plazmid a fragmenty), T4-DNA ligázu (New England Biolabs, USA) a tlmivý roztok pre T4-DNA ligázu (New England Biolabs, USA). Ligovanou DNA boli transformované kompetentné bunky *E. coli* kmeňa DH5α (Clontech, USA).

Jednotlivé kolónie transformovaných *E. coli* DH5α boli prenesené do 3 ml LB (Luria-Bertani) média (10 g/l tryptón, 5 g/l kvasničný extrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0) a inkubovali sa cez noc pod kanamycínovým selektívnym tlakom. Bakteriálne pelety vytvorené z 1,5 ml suspenzie boli resuspendované v 200 µl tlmivého roztoku STETL (50 mM Tris, pH 8; 50 mM EDTA; 5% Triton X-100, 8% glukóza; 0,5 mg/ml lyzozým) a inkubované vo vriacom vodnom kúpeli po dobu 30 sekúnd. Lyzáty boli odstredené pri 24000 g počas 15 minút pri laboratórnej teplote. Sedimenty sa odstránili a supernatanty boli inkubované po dobu 30 minút pri 37 °C s 1 µl RNázy A (10 mg / ml, Roche, Nemecko). Pridalo sa 200 µl izopropanolu a inkubovalo ďalších 15-30 minút pri teplote -20 °C. Vyzrážané DNA boli peletované odstredovaním pri 24000 g počas 5 minút pri teplote 4 °C. DNA pelety boli premyté 200 µl 70% etanolu a resuspendované v 20 µl vody bez nukleázy.

Konštrukty majúce mutáciu v hypervariabilnej oblasti boli pripravené cielenou PCR mutagenézou pripraveného konštruktu pEGFPNrasWT (tab. I). Páry oligonukleotidových primérov boli navrhnuté tak, aby obsahovali požadovanú mutáciu približne vo svojom strede. PCR reakcia obsahovala 5-50 ng DNA templátu, 250 ng zmesi oligonukleotidových primérov, 1 µl zmesi dNTP, 5 µl 10 x reakčného tlmivého roztoku a 1 µl PFU DNA polymerázy (Promega, UK) Reakčná zmes bola doplnená vodou bez nukleáz na konečný objem 50 µl. Parametre cielenej PCR mutagenézy PCR boli nasledovné: 1 x (95 °C - 4 minúty), 16 x (55 °C - 1 minúta, 68 °C - 10 minút, 95 °C - 1 minúta).

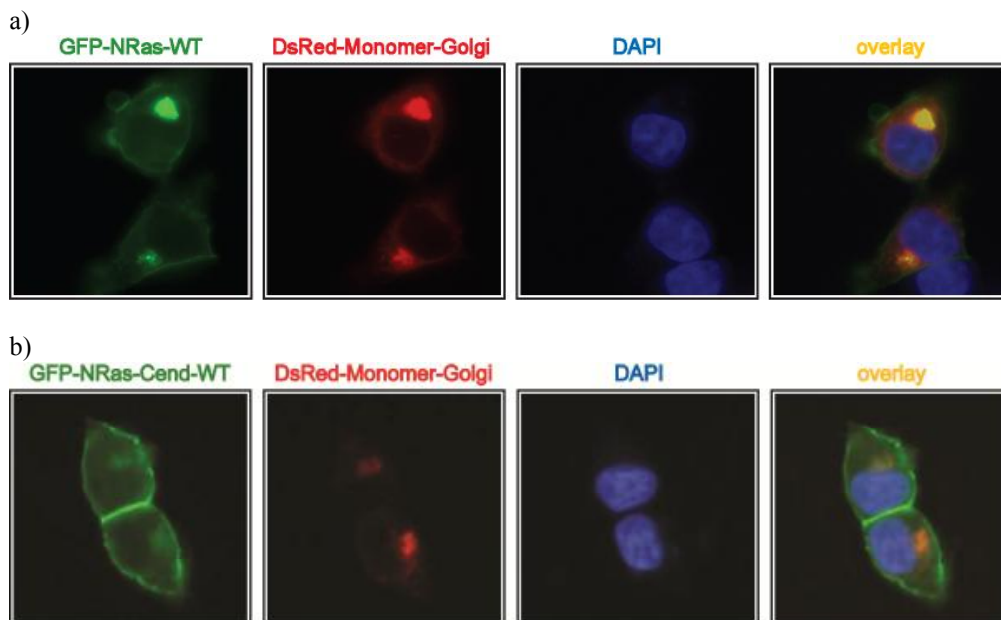
Nereplikované molekuly DNA sa štiepili enzýmom *DpnI* (New England Biolabs, USA). Pripravené konštrukty boli prečistené pomocou komerčnej súpravy MiniElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen, USA). Následne nimi boli transformované bunky *E. coli* kmeňa DH5α.

Transfekcia tkanivových buniek a fluorescenčná mikroskopia.

Bunky boli inokulované na sterilné krycie sklíčka umiestnené na dne 6-jamkovej doštičky pre kultiváciu buniek 5 hodín pred transfekciou. Transfekcia bola vykonaná pomocou transfekčného činidla Fugen 6 (Roche, nemecko) v súlade s pokynmi výrobcu. Po 24 hodinách boli bunky premyté fosfátovým tlmivým roztokom a fixované po dobu 20 minút so 4% formaldehydom vo fosfátovom tlmivom roztoku. Po fixácii boli jadrá buniek zafarbené DAPI (Sigma, USA). Intracelulárnu lokalizáciu proteínov bola vizualizovaná fluorescenčným mikroskopom pomocou softvéru QuickPHOTO CAMERA 2.1 (Olympus, Japan).

Výsledky a diskusia

Pre detekciu rozdielov v lokalizácii N-Ras proteínu značeného pomocou GFP (zelený fluorescenčný proteín) a jeho variantov modifikovaných na C-konci boli použité Fluorescenčné markery Golgiho aparátu a endoplasmatického retikula.

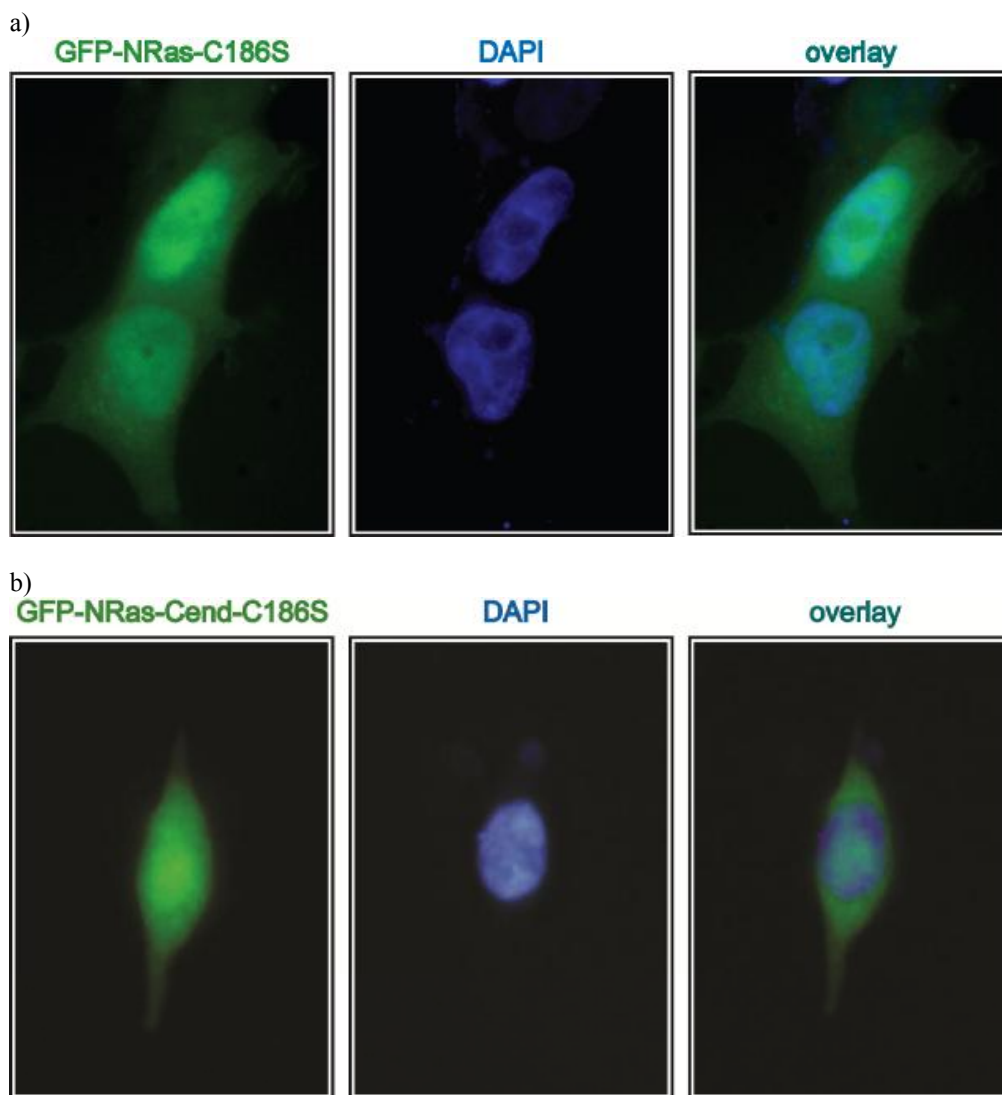


Obr. 3 Lokalizácia GFP-N-Ras-WT proteínu a jeho C-konca v bunke.

HEK 293T bunky tranzientne kotransfekované a) pEGFPNrasWT konštruktom a pDsRed-Monomer-Golgi plazmidom (marker Golgiho aparátu), b) pEGFPNrasCendWT konštruktom (produktom je hypervariabilná oblasť N-Ras proteínu značená zeleným fluorescenčným proteínom) a pDsRed-Monomer-Golgi plazmidom (Golgi marker). Jadrá sú farbené s DAPI.

Prítomnosť proteínu GFP-N-Ras-WT (obr. 3a) na plazmatickej membráne je v súlade s ďalšími publikovanými údajmi (9) plazmidu, avšak Golgi je jediná intracelulárna membrána, kde bola akumulácia GFP-N-Ras-WT proteínu pozorovaná. V prípade GFP-N-Ras-Cend-WT proteínu (obr. 1b), je nahromadených viac proteínov na PM ako v Golgiho aparáte. To naznačuje, že hypervariabilná oblasť nie je jediná doména proteínu GFP-N-Ras, ktorá je zodpovedná za jeho intracelulárne cielenie, ale nie je jasné, či tento jav je výsledkom akumulácie GFP-N-Ras-Cend-WT na plazmatickej membráne alebo skôr výsledkom jeho uľahčeného uvoľnenia z Golgiho aparátu.

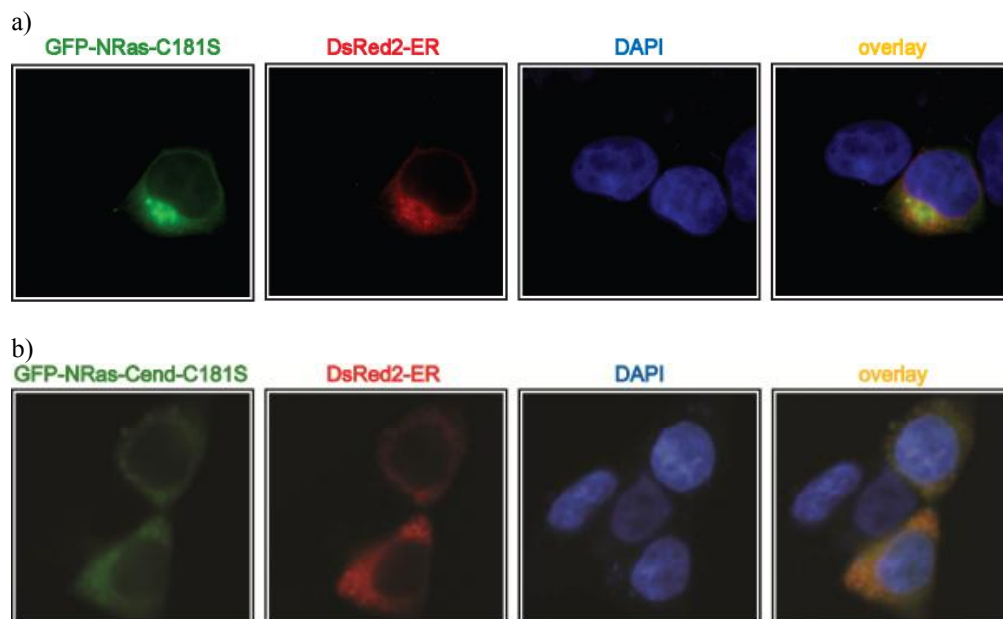
Ako vyplýva z obrázkov 3 a 4, farnezylácia je nevyhnutná pre cielenie na plazmatickú membránu alebo intracelulárne membrány oboch proteínov GFP-N-Ras aj GFP-N-Ras-C-end. Okrem toho je lokalizácia oboch proteínov s mutáciou simulujúcou inhibíciu farnezylácie (GFP-N-Ras-C186S a GFP-N-Ras-Cendo-C186S) rovnaká a je v súlade s lokalizáciou značeného GFP K-Ras proteínu v bunkách ošetrovaných statínmi, ktoré inhibujú mevalonátovú dráhu (14) a teda aj syntézu farnezylopyrofosfátu potrebného pre farnezyláciu nie len Ras proteínov, tj v cytoplazme (obr. 4).



Obr. 4 Lokalizácia GFP-NRas-C186S proteínu a jeho C-konca v bunke – simulácia inhibície farnesylácie.

HEK 293T bunky tranzientne transfekované a) pEGFPNrasC186S konštruktom (simulácia inhibície farnesylácie) b) pEGFPNrasCendC186S konštruktom (produktom je hypervariabilná oblasť N-Ras proteínu s mutáciou simulujúcou inhibíciu farnesylácie značená zeleným fluorescenčným proteínom). Jadrá sú farbené s DAPI.

Obrázok 5 naznačuje, že palmitoylácia cysteínu v pozícii 181 je potrebná predovšetkým ako signál pre odchod proteínu GFP-N-Ras z endoplazmatického retikula. Lokalizácia proteínov GFP-N-Ras-C181S a GFP-N-Ras-Cend-C181S v bunke je rovnaká, nie sú lokalizované na plazmatickej membráne a hromadia sa na ER.



Obr. 5 Lokalizácia GFP-NRas-C181S proteínu a jeho C-konca v bunke – simulácia inhibície palmitoylácie.

HEK 293T bunky tranzientne kotransfekované a) pEGFPNrasC181S konštruktom (simulácia inhibície palmitoylácie) a pDsRed2-ER plazmidom (marker endoplazmatického retikula), b) pEGFPNrasC181S konštruktom (produktom je hypervariabilná oblasť N-Ras proteínu s mutáciou simulujúcou inhibíciu palmitoylácie značená zeleným fluorescenčným proteínom) a pDsRed2-ER plazmidom (marker endoplazmatického retikula). Jadrá sú farbené s DAPI.

Záver

Zdá sa, že okrem hypervariabilnej oblasti existuje v Ras proteíne ešte ďalšia doména zodpovedná za jeho intracelulárnu lokalizáciu. Avšak úloha tejto hypotetickej ďalšej domény je závislá na predchádzajúcej farnezylácii a palmitoylácii hypervariabilnej oblasti.

PodĎakovanie

Publikácia bola pripravená vďaka podpore grantovej komisie VEGA pre lekárske a farmaceutické vedy - číslo projektu 1/0051/16.

Literatúra

1. **Boguski MS, McCormick F.** Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993, 366: 643-654.
2. **Lowy DR, Willumsen BM.** Function and regulation of *ras*. *Annu Rev Biochem* 1993, 62: 851-891.
3. **Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ.** All Ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 1989, 57: 1167-1177.
4. **Willumsen BM, Christensen A, Hubert NL, Papageorge AG, Lowy D.** The p21 ras C terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 1984, 310: 583-586
5. **Hancock JF, Cadwallader K, Marshall CJ.** Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras (B) *EMBO J* 1991, 10: 641-646.
6. **Prior IA, Hancock JF.** Compartmentalization of Ras proteins. *Cell Sci* 2001, 114: 1603-1608.

7. **Midgley RS, Kerr DJ.** Ras as a target in cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002, 44: 109-120.
8. **Apolloni A, Prior IA, Lindsay M, Parton RG, Hancock JG.** H-Ras but not K-Ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* 2000, 20: 2475-2487.
9. **Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, Ivanov IE, Philips MR.** Endomembrane trafficking of Ras: CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 1999, 98: 69-80.
10. **Murray D, Ben-Tal N, Honig B, McLaughlin S.** Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure* 1997, 5: 985-989.
11. **Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG.** Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1999, 1: 98-105.
12. **Cox AD, Der CJ, Philips MR.** Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clin Cancer Res.* 2015, 21(8): 1819-1827.
13. **Khurana V, Sheth A, Caldito G, Barkin JS.** Statins reduce the risk of pancreatic cancer in humans: a case-control study of half a million veterans. *Pancreas* 2007, 34: 260-265.
14. **Gbelcová H, Leníček M, Zelenka J, Knejzlík Z, Dvořáková G, Zadinová M, Poučková P, Kudla M, Balaž P, Ruml T, Víték L.** Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer, *Int J Cancer* 2008, 122: 1214-1221.

ÚČINOK RASTLINNÉHO OLEJA NA ADIPOKÍNY U DIABETICKÝCH POTKANOV.

(Effect of plant oil on adipokines in diabetic rats)

Martina Horváthová¹, Zdeňka Ďuračková¹, Oľga Uličná², Oľga Vančová², Jana Muchová¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava; martina.horvathova@fmed.uniba.sk

²Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava

Súhrn

Kardiovaskulárne ochorenia (KVO) sú najčastejšou príčinou zvýšenej chorobnosti a úmrtnosti vo vyspelých krajinách. Hlavnou príčinou KVO je ateroskleróza, na ktorej vzniku a rozvoji sa veľkou mierou podieľa oxidačný stres (OS) a aktivácia zápalových procesov. Diabetes mellitus (DM) je ochorenie sprevádzané OS a zápalovými procesmi, preto pacienti s týmto ochorením majú zvýšené riziko vzniku aterosklerózy a KVO. Jednou z možností, ako znížiť toto riziko je popri klasickej liečbe aj podávanie rôznych prírodných látok. Medzi takéto látky patrí aj rastlinný olej s vysokým obsahom n-6 polynenasýtených mastných kyselín (n-6 PUFA). Sledovali sme účinok rastlinného oleja (RO) bohatého na n-6 PUFA na adipokíny (adiponektín a leptín) u zdravých a diabetických potkanov. Samčie potkany rodu Wistar boli rozdelené na kontrolné (K) a diabetické (D) potkany. DM bol indukovaný jednorazovým podaním streptozotocínu (STZ) do chvostovej žily v množstve 45 mg/kg hmotnosti. Týždeň po vyvolaní DM boli kontrolné a diabetické potkany rozdelené na tri skupiny: 1. potkany bez intervencie (K, D), 2. potkany kŕmené rastlinným olejom v dávke 100 mg/kg hmotnosti (KRO1, DRO1), 3. potkany kŕmené rastlinným olejom v dávke 500 mg/kg hmotnosti (KRO2, DRO2). Olej bol podávaný sondou do žalúdka po dobu 7 týždňov. Adipokíny boli merané v plazme potkanov metódou ELISA. Hladina adiponektínu sa významne nezmenila u žiadnej z diabetických skupín v porovnaní s K a rastlinný olej významne neovplyvnil hladinu adiponektínu v plazme kontrolných ako aj diabetických potkanov. Všetky diabetické skupiny (D, DRO1 a DRO2) mali významne nižšiu hladinu leptínu v porovnaní s K ($p < 0,001$). Vplyv rastlinného oleja sa prejavil iba u kontrolných potkanov, keď rastlinný olej v dávke 500 mg/kg (KRO2) významne znížil hladinu leptínu o 40,97 % ($p = 0,0251$).

Kľúčové slová

Diabetes mellitus, rastlinný olej, n-6 polynenasýtené mastné kyseliny, adiponektín, leptín

Summary

Cardiovascular diseases (CVD) are the most frequent cause of increased morbidity and mortality in developing countries. The main cause of CVD is atherosclerosis, in the development of which oxidative stress (OS) and activation of inflammatory processes participate by great portion. Diabetes mellitus (DM) is a disease accompanied by OS and inflammatory processes and patients suffering from this disease have increased risk of development of atherosclerosis and CVD. Besides the classic therapy one of the possibilities

to decrease this risk is also administration of different natural compounds. Plant oil with high content of n-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA) is also included among these compounds. We have studied the effect of plant oil (PO) rich in n-6 PUFA on adipokines (adiponectin and leptin) in healthy control rats and diabetic rats. Male Wistar rats were divided into control (C) and diabetic (D) rats. DM was induced by one dose of streptozotocin (STZ) at the dose 45 mg/kg of weight. One week after inducing DM control and diabetic rats were divided into three groups: 1. rats without intervention (C, D), 2. rats fed with plant oil at the dose 100 mg/kg of weight (CPO1, DPO1), 3. rats fed with plant oil at the dose 500 mg/kg of weight (CPO2, DPO2). Oil was administered by probe into the stomach for 7 weeks. Adipokines were measured in the plasma of rats by ELISA method. The level of adiponectin was not significantly changed in every diabetic group in comparison to C and plant oil did not significantly influence the level of adiponectin in the plasma of control as well as diabetic rats. All diabetic rats (D, DPO1 and DPO2) had significantly lower level of leptin in comparison to C ($p < 0,001$). The effect of plant oil was showed only in control rats when plant oil at the dose 500 mg/kg of weight significantly decreased the level of leptin by 40,97 % ($p = 0,0251$).

Key words

Diabetes mellitus, plant oil, n-6 polyunsaturated fatty acids, adiponectin, leptin

Úvod

V patogenéze diabetes mellitus (DM) zohrávajú významnú úlohu zvýšený oxidačný stres (OS) a zápalové procesy, ktoré vznikajú v dôsledku hyperglykémie a podieľajú sa na vzniku a rozvoji chronických diabetických komplikácií (1). Najčastejšou príčinou smrti diabetikov sú predovšetkým kardiovaskulárne ochorenia (KVO), ktoré vznikajú v dôsledku endotelovej dysfunkcie a aterosklerózy (2). Na vzniku KVO sa popri OS podieľajú aj zápalové procesy, ktoré sú regulované aj adipokínmi tukového tkaniva – adiponektín, leptín a rôzne cytokíny (3-4).

Adiponektín je adipokín, ktorý je syntetizovaný v tukovom tkanive, pečeni, kostrovom svalstve, kardiomyocytoch, slezine a obličke. Vyznačuje sa rôznorodými účinkami, predovšetkým však reguluje metabolizmus glukózy, má protizápalové a anti-aterogénne účinky (5). Hladina adiponektínu v plazme je regulovaná rôznymi mechanizmami. Na jednej strane je to hmotnosť organizmu a množstvo tukového tkaniva, keď nižšia telesná hmotnosť indukuje zvýšenú expresiu a sekréciu adiponektínu, a obezita naopak znižuje tvorbu adiponektínu. Expresia je výrazne inhibovaná aj účinkom prozápalových cytokínov, ktoré sú tvorené aj tukovým tkanivom. Keďže adiponektín má predovšetkým protizápalové a anti-aterogénne účinky, jeho znížená hladina je rizikovým faktorom aterosklerózy a poukazuje na zvýšené riziko vzniku aterosklerózy a KVO, predovšetkým u ľudí s obezitou, inzulínovou rezistenciou a DM 2. typu (5-7).

Leptín je adipokín, ktorý je syntetizovaný predovšetkým v tukovom tkanive, ale v malom množstve sa tvorí aj v placentе, žalúdku, kostrovom svalstve a kostnej dreni. Leptín reguluje telesnú hmotnosť prostredníctvom modulácie metabolických procesov a príjmu potravy, ale podieľa sa tiež na regulácii imunitných a zápalových procesov. Hladina leptínu v plazme pozitívne koreluje s množstvom tukového tkaniva. Na rozdiel od adiponektínu sa leptín vyznačuje prozápalovými účinkami. Expresia leptínu nie je regulovaná iba príjmom potravy, ale aj rôznymi hormónmi a zápalovými mediátormi. Inzulín zvyšuje expresiu a sekréciu leptínu, glukokortikoidy naopak znižujú jeho hladinu v plazme. Expresia je stimulovaná aj viacerými prozápalovými cytokínmi, ktoré spôsobujú pozitívnu spätnú väzbu a podporujú vznik chronického zápalu (7-9).

Viacere štúdie naznačujú, že zdravá strava, v ktorej sa nasýtené mastné kyseliny nahradia polynenasýtenými mastnými kyselinami (PUFA), môže zlepšiť lipidový profil, znížiť progresiu DM a riziko vzniku KVO (10-12). Rastlinné oleje (kukuričný, slnečnicový, orechový olej) a semená sú bohatým zdrojom n-6 PUFA – kyseliny linolovej (LA) (13). Viaceré štúdie poukazujú na zlepšenie lipidového profilu a inzulínovej citlivosti účinkom n-6 PUFA (LA). Niektorí autori pozorovali protizápalové a anti-aterogénne účinky LA (14-16). Na druhej strane, LA môže byť viac citlivá na oxidačné poškodenie a môže mať pro-oxidačné účinky (17). Navyše, LA môže byť metabolizovaná na kyselinu arachidónovú, ktorá je substrátom pre syntézu prozápalových a proaterogénnych eikozanoidov (13). V štúdiu sme sledovali účinky rastlinného oleja (RO) bohatého na n-6 PUFA na adipokíny tukového tkaniva (adiponektín a leptín) u zdravých potkanov a u potkanov s experimentálnym diabetom.

Materiál a metódy

Modelovým organizmom boli samčie potkany rodu Wistar (staré 6-7 týždňov), ktoré boli rozdelené na kontrolné (K) a diabetické (D) potkany. DM bol indukovaný jednorazovým podaním streptozotocínu (STZ) do chvostovej žily v množstve 45 mg/kg hmotnosti. Týždeň po vyvolaní DM boli kontrolné a diabetické potkany rozdelené na tri skupiny: 1. potkany bez intervencie (K, D), 2. potkany kŕmené rastlinným olejom v dávke 100 mg/kg hmotnosti (KRO1, DRO1), 3. potkany kŕmené rastlinným olejom v dávke 500 mg/kg hmotnosti (KRO2, DRO2). Olej bol podávaný sondou do žalúdka po dobu 7 týždňov. Zloženie oleja: kyselina palmitová (7,0%; C16:0), kyselina stearová (2,5%; C18:0), kyselina olejová (15,6%; C18:1), kyselina linolová (64,5%; C18:2, n-6), kyselina linolénová (10,4%; C18:3, n-3).

V plazme potkanov sme merali hladinu adiponektínu a leptínu ELISA metódou pomocou komerčných setov od firmy Biovendor (Česká republika) a Cayman Chemicals Company (USA). Výsledky udávame ako medián a medzikvartilové rozpätie (IQR). Na posúdenie normality dát sme použili Shapiro-Wilkov test. Na štatistickú analýzu sme použili neparametrický Kruskal-Wallisov a Conover-Inmanov post-hoc test. Hodnoty $p < 0,05$ sú považované za štatisticky významné. Na štatistickú analýzu sme použili program StatsDirect® 2.7.8 (StatsDirect, Cheshire, UK).

Výsledky

Hladina adiponektínu sa významne nezmenila u žiadnej z diabetických skupín v porovnaní s K a rastlinný olej významne neovplyvnil hladinu adiponektínu v plazme kontrolných ani diabetických potkanov.

Všetky diabetické skupiny (D, DRO1, DRO2) mali významne nižšiu hladinu leptínu v porovnaní s K ($p < 0,001$). Vplyv rastlinného oleja sa prejavil iba u kontrolných potkanov, keď rastlinný olej v dávke 500 mg/kg (KRO2) významne znížil hladinu leptínu o 40,97 % ($p = 0,0251$) (Tab. 1).

parameter	K	KRO1	KRO2	D	DRO1	DRO2
Adiponektín (µg/ml)	5,76 (3,64 - 6,21) n = 7	3,97 (3,38 - 5,31) n = 8	4,14 (3,65 - 4,64) n = 8	4,17 (3,64 - 4,93) n = 8	4,35 (4,00 - 4,88) n = 8	3,60 (3,11 - 4,65) n = 8
Leptín (ng/ml)	3,98 (3,15 - 4,72) n = 6	3,87 (3,26 - 4,41) n = 8	2,35* (2,19 - 3,13) n = 8	0,54** (0,52 - 0,56) n = 10	0,52** (0,51 - 0,60) n = 9	0,54** (0,52 - 0,59) n = 9

Tab. 1 Vplyv rastlinného oleja na adipokíny

Dáta sú prezentované ako medián a IQR (1. kvartil – 3. kvartil). K – kontrolné potkany bez intervencie; KRO1 – kontrolné potkany + rastlinný olej v dávke 100 mg/kg; KRO2 – kontrolné potkany + rastlinný olej v dávke 500 mg/kg; D – diabetické potkany bez intervencie; DRO1 – diabetické potkany + rastlinný olej v dávke 100 mg/kg; DRO2 – diabetické potkany + rastlinný olej v dávke 500 mg/kg; ** $p < 0,001$ vs. K; * $p < 0,05$ vs. K

Diskusia

Hladina adiponektínu nebola u diabetických potkanov významne zmenená. Viacerí autori skúmali koncentráciu adiponektínu v plazme pacientov s DM 1. typu, DM 2. typu, ako aj v animálnych modeloch. Pacienti s DM 2. typu, ale aj potkany so STZ vyvolaným diabetes mali väčšinou zníženú hladinu adiponektínu (18-20). Naproti tomu pacienti s DM 1. typu mali zvýšenú alebo nezmenenú hladinu adiponektínu (21-22). Naše výsledky sú v súlade s výsledkami Palomba a kol. (21), ktorí nezistili zmenenú hladinu adiponektínu u pacientov s DM 1. typu.

Všetky diabetické skupiny v našom experimente mali veľmi nízku koncentráciu leptínu v porovnaní s kontrolnými potkanmi. Viacerí autori pozorovali, že hladina leptínu v plazme pozitívne koreluje s obezitou a hladinou inzulínu. Preto sa u pacientov s DM 2. typu väčšinou pozoruje zvýšená hladina leptínu (8, 23) a u pacientov s DM 1. typu znížená hladina leptínu (22). Toto zistenie podporuje aj náš experiment, pretože u diabetických potkanov sme pozorovali významný pokles hmotnosti počas experimentu a významnú pozitívnu koreláciu medzi hladinou leptínu a hmotnosťou. Je to pravdepodobne spôsobené tým, že leptín je produkovaný predovšetkým tukovým tkanivom a u diabetických potkanov v dôsledku hyperglykémie a deficitu inzulínu dochádzalo k odbúraniu tukového tkaniva. Viaceré štúdie uvádzajú, že koncentráciu leptínu v plazme reguluje aj inzulín, ktorý zvyšuje expresiu a sekréciu leptínu (8, 24). Deficit inzulínu u diabetických potkanov mohol pravdepodobne spôsobiť nízku hladinu leptínu v plazme.

Hladina leptínu bola znížená u kontrolných potkanov, ktorí dostávali rastlinný olej v dávke 500 mg/kg (KRO2). Náš výsledok je v protiklade s výsledkami Dziedzica a kol. (25) a Magdeldina a kol. (26), ktorí zistili zvýšenú hladinu leptínu u hlodavcov kŕmených n-6 PUFA. Na druhej strane Taouis a kol. (27) zistili zníženú expresiu leptínu u potkanov, ktorým sa podávala diéta bohatá na n-6 PUFA. Tento výsledok zatiaľ nevieme vysvetliť. Mechanizmus účinku n-6 PUFA na expresiu a koncentráciu leptínu nie je ešte veľmi dobre preskúmaný a sú potrebné ďalšie štúdie, ktoré by odhalili príčiny zníženej expresie leptínu u kontrolných potkanov vplyvom podávania rastlinného oleja s vysokým obsahom n-6 PUFA.

Záver

Niektoré naše výsledky sú v súlade a niektoré v protiklade s publikovanými výsledkami ostatných autorov. Môže to byť spôsobené tým, že protokoly experimentov v projektoch nie sú rovnaké a výsledky sú niekedy ťažko porovnateľné. Môžu byť ovplyvnené odlišným zložením zmesí olejov obsahujúcich n-6 PUFA, dĺžkou intervencie, ako aj celkovou dávkou podávaných olejov. Z našich výsledkov vyplýva, že podávanie rastlinného oleja s vysokým podielom n-6 PUFA diabetickým potkanom významne neovplyvňuje hladiny adipokínov v plazme.

PodĎakovanie

Práca bola podporená projektom Diaplant – EÚ N00039 Programu cezhraničnej spolupráce SK-AT.

Literatúra

1. **Rahimi R, Shekoufeh N, Larijani B a kol.** A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 365-373.
2. **Yamagishi S, Ueda S, Okuda S.** A possible involvement of crosstalk between advanced glycation end products (AGEs) and asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase inhibitor in accelerated atherosclerosis in diabetes. *Med Hypotheses* 2007; 69: 922-924.

3. **Hong SJ, Jin JP, Buck DW, Galiano RD, Mustoe TA.** Impaired response of mature adipocytes of diabetic mice to hypoxia. *Exp Cell Res* 2011; 317: 2299-2307.
4. **Carbone F, La Rocca C, Matares G.** Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* 2012; 94: 2082-2088.
5. **Padilha HG, Crispim CA, Zimberg IZ.** A link between sleep loss, glucose metabolism and adipokines. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 992-999.
6. **Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt CH, Blouin R, Bordignon V, Murphy BD, Palin MF.** Adiponectin action from head to toe. *Endocr* 2010; 37: 11-32.
7. **Moreno-Aliaga MJ, Lorente-Cebrián S, Martínez JA.** Regulation of adipokines secretion by n-3 fatty acids. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 324-332.
8. **Baban RS, Kasar KAK, Al-Karawi IN.** Fasting glucose to leptin ratio as a new diagnostic marker in patients with diabetes mellitus. *Oman Med J* 2010; 25: 269-275.
9. **Miehle K, Stepan H, Fasshauer M.** Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin Endocrinol* 2012; 76: 2-11.
10. **Müllner E, Brath H, Pleifer S, Schiermayr C, Baierl A a kol.** Vegetables and PUFA-rich plant oil reduce DNA strand breaks in individuals with type 2 diabetes. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57: 328-38
11. **Heine RJ, Mulder C, Popp-Snijders C, van der Meer J, van der Meen Ed A.** Linoleic-acid-enriched diet: long-term effects on serum lipoprotein and apolipoprotein concentrations and insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 448-56.
12. **Houtsmuller AJ, van Hal-Ferwerda J, Zahn KJ, Henkes KE.** Favourable influences of linoleic acid on the progression of diabetic micro- and macroangiopathy. *Nutr Metab* 1980; 24: 105-18.
13. **Allayee H, Roth N, Hodis HN.** Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases: Implications for Nutrigenetics. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2009; 2: 140-148.
14. **Harris WS.** N-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1645S-54S.
15. **Riserus U, Willet WC, Hu FB.** Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res* 2009; 48: 44-51.
16. **Calder PC, Dangour AD, Diekman C, Eilander A, Koletzko B a kol.** Essential fats for future health. Proceedings of the 9th unilever nutrition symposium, 26-27 May 2010. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64: S1-S13.
17. **Kopál M, Ondrejovičová I, Deáková Z, Uličná O, Vančová O, Ďuračková Z, Muchová J.** Effect of PUFA-rich plant oil on risk factors of STZ-induced diabetes in Wistar rats. *Redox Rep* 2014; 19: 161-9
18. **Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF.** Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003; 361: 226-8.
19. **de Lemos ET, Pinto R, Oliveira J, Garrido P, Sereno J a kol.** Differential effects of acute (extenuating) and chronic (training) exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 diabetes mellitus. *Mediators Inflamm* 2011; 2011: 253061
20. **Saleh S, El-Maraghy N, Reda E, Barakat W.** Modulation of diabetes and dyslipidemia in diabetic insulin-resistant rats by mangiferin: Role of adiponectin and TNF- α . *An Acad Bras Cienc* 2014; 86: 1935-48.
21. **Palombo C, Kozakova m, Morizzo C a kol.** Circulating endothelial progenitor cells and large artery structure and function in young subjects with uncomplicated Type 1 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2011; 10:
22. **Yazici D, Yavuz D, Ogunc AV, Sirikci O, Toprak A, Deyneli O, Akalm S.** Serum adipokine levels in type 1 diabetic patients: association with carotid intima media thickness. *Metab Syndr Relat Disord* 2012; 10: 26-31.

- 23. Hamed EA, Zakary MM, Ahmed NS, Gamal RM.** Circulating leptin and insulin in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus: relation to ghrelin and oxidative stress. *Diabet Res Clin Pract* 2011; 94: 434-441.
- 24. Ahima RS, Flier JS.** Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-332.
- 25. Dziedzic B, Szemraj J, Bartkowiak J, Walczewska A.** Various dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats. *J Neuroendocrinol* 2007; 19: 364-73.
- 26. Magdeldin S, Elewa Y, Ikeda T, Ikei J, Zhang Y, Xu B, Narneta M a kol.** Dietary supplementation with arachidonic acid but not eicosapentaenoic or docosahexaenoic acids alter lipid metabolism in C57BL/6J mice. *Gen Physiol Biophys* 2009; 28: 266-75.
- 27. Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M, Delarue J.** n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E664-E671.

VPLYV EMULZIE RYBIEHO OLEJA NA BIOCHEMICKÉ PARAMETRE DIABETICKÝCH POTKANOV

(Effect of fish oil emulsion on biochemical parameters of diabetic rats)

**Martina Horváthová¹, Zdeňka Ďuračková¹, Oľga Uličná², Oľga Vančová²,
Jana Muchová¹**

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava; martina.horvathova@fmed.uniba.sk

²Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava

Súhrn

V štúdií sme sledovali účinok 45% emulzie rybieho oleja (FO) bohatej na n-3 polynenasýtené mastné kyseliny (n-3 PUFA) na biochemické parametre - glukózu, celkový cholesterol (TCh), triacylglyceroly (TAG), LDL-cholesterol (LDL-Ch), HDL-cholesterol (HDL-Ch), kreatinín a kyselinu močovú u zdravých a diabetických potkanov. Samčie potkany rodu Wistar boli rozdelené na kontrolné (K) a diabetické (D) potkany. Diabetes mellitus (DM) bol indukovaný jednorazovou dávkou streptozotocínu (STZ) v množstve 45 mg/kg hmotnosti. Týždeň po vyvolaní DM boli kontrolné a diabetické potkany rozdelené na tri skupiny: 1. potkany bez intervencie (K, D), 2. potkany kŕmené 45% emulziou FO v dávke 160 mg/kg hmotnosti (KFO1, DFO1), 3. potkany kŕmené 45% emulziou FO v dávke 800 mg/kg hmotnosti (KFO2, DFO2). Emulzia bola podávaná sondou do žalúdka po dobu 7 týždňov. Všetky diabetické potkany (D, DFO1, DFO2) mali významne vyššiu hladinu glukózy ($p < 0,0001$), TCh, HDL-Ch ($p < 0,05$) a významne nižšiu hladinu kreatinínu a kyseliny močovej ($p < 0,05$) v porovnaní s K. Podávanie emulzie FO v dávke 800 mg/kg kontrolným potkanom (KFO2) významne znížilo hladinu TCh o 19,35 % ($p = 0,0402$) a TAG o 33,62 % ($p = 0,0197$). Podávanie emulzie FO v dávke 160 mg/kg diabetickým potkanom (DFO1) významne znížilo hladinu glukózy o 10,45 % ($p = 0,05$). 45% emulzia FO zlepšila lipidový profil u kontrolných potkanov a znížila hladinu glukózy u diabetických potkanov.

Kľúčové slová

Diabetes mellitus, emulzia rybieho oleja, n-3 polynenasýtené mastné kyseliny, biochemické parametre

Summary

In the study we have studied the effect of 45% fish oil emulsion (FO) rich in n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) on biochemical parameters – glucose, total cholesterol (TCh), triacylglycerols (TAG), LDL-cholesterol (LDL-Ch), HDL-cholesterol (HDL-Ch), creatinin and uric acid in healthy control rats and diabetic rats. Male Wistar rats were divided into control (C) and diabetic (D) rats. DM was induced by one dose of streptozotocin (STZ) at the dose 45 mg/kg of weight. One week after inducing DM control

and diabetic rats were divided into three groups: 1. rats without intervention (C, D), 2. rats fed with 45% FO emulsion at the dose 160 mg/kg of weight (CFO1, DFO1), 3. rats fed with 45% FO emulsion at the dose 800 mg/kg of weight (CFO2, DFO2). Emulsion was administered by probe into the stomach for 7 weeks. All diabetic rats (D, DFO1, DFO2) had significantly higher the level of glucose ($p < 0,0001$), TCh, HDL-Ch ($p < 0,05$) and significantly lower the level of creatinin and uric acid ($p < 0,05$) in comparison to C. The administration of FO emulsion at the dose 800 mg/kg to control rats (CFO2) significantly decreased the level of TCh by 19,35 % ($p = 0,0402$) and TAG by 33,62 % ($p = 0,0197$). The administration of FO emulsion at the dose 160 mg/kg to diabetic rats (DFO1) significantly decreased the level of glucose by 10,45 % ($p = 0,05$). 45% FO emulsion improved the lipid profile in control rats and decreased the level of glucose in diabetic rats.

Key words

Diabetes mellitus, fish oil emulsion, n-3 polyunsaturated fatty acids, biochemical parameters

Úvod

V patogenéze diabetes mellitus (DM) zohrávajú významnú úlohu zvýšený oxidačný stres (OS) a zápalové procesy, ktoré vznikajú v dôsledku hyperglykémie a podieľajú sa na vzniku a rozvoji chronických diabetických komplikácií (1). Najčastejšou príčinou smrti diabetikov sú predovšetkým kardiovaskulárne ochorenia (KVO), ktoré vznikajú v dôsledku endotelovej dysfunkcie a aterosklerózy (2). Veľký podiel na vzniku aterosklerózy u DM má okrem hyperglykémie aj dyslipidémia. Je charakterizovaná zvýšenými hladinami triacylglycerolov (TAG) a malých denzných častíc LDL-cholesterolu (LDL-Ch), a nízkou hladinou HDL-cholesterolu (HDL-Ch) (3).

Nedávne štúdie dokazujú, že zdravá strava predstavuje jeden z významných faktorov podmieňujúcich znížený výskyt aterosklerózy a KVO (4). Zdravá strava predstavuje znížený príjem nasýtených mastných kyselín, zvýšený príjem mononenasýtených a polynenasýtených mastných kyselín (PUFA), a zvýšený príjem ovocia a zeleniny bohatých na antioxidanty a polyfenolové látky (5).

Účinky n-3 PUFA na riziko vzniku KVO sa skúmali vo viacerých klinických a animálnych štúdiách. Viaceré štúdie potvrdili anti-aterogénne účinky n-3 PUFA – kyseliny eikozapentaénovej (EPA) a kyseliny dokozahexaénovej (DHA) (6). Garaiová a kol. (7) zistili, že podávanie prípravku s obsahom n-3 PUFA významne zlepšilo lipidový profil u hypercholesterolemických detí. Ďalšie štúdie tiež potvrdili, že podávanie n-3 PUFA (EPA a DHA) významne zlepšilo lipidový profil nielen u ľudí, ale aj u zvierat, predovšetkým znižovali hladinu TAG v plazme (6). Popri pozitívnych účinkoch na lipidový profil sa EPA a DHA vyznačujú aj anti-trombotickými, anti-agregačnými a protizápalovými účinkami (8). Predpokladá sa, že n-3 PUFA by mohli navyše zlepšovať inzulínovú citlivosť, znižovať hyperglykémiu, a tým významne eliminovať riziko vzniku KVO u diabetických pacientov. Výsledky doterajších štúdií sú však rozporuplné a nepodávajú jednoznačné stanovisko, či zvýšený príjem EPA a DHA zlepšuje glukózovú toleranciu (9-11).

V našej štúdii sme sledovali účinky 45% emulzie rybieho oleja (FO) bohatej na n-3 PUFA na biochemické parametre u zdravých potkanov a u potkanov s experimentálnym diabetom.

Materiál a metódy

Modelovým organizmom boli samčie potkany rodu Wistar (staré 6-7 týždňov), ktoré boli rozdelené na kontrolné (K) a diabetické (D) potkany. DM bol indukovaný jednorazovým podaním streptozotocínu (STZ) do chvostovej žily v množstve 45 mg/kg hmotnosti. Týždeň po vyvolaní DM boli kontrolné a diabetické potkany rozdelené na tri skupiny: 1. potkany bez intervencie (K, D), 2. potkany kŕmené 45% emulziou FO v dávke 160 mg/kg hmotnosti

(KFO1, DFO1), 3. potkany kŕmené 45% emulziou FO v dávke 800 mg/kg hmotnosti (KFO2, DFO2). Emulzia bola podávaná sondou do žalúdka denne po dobu 7 týždňov. Zloženie 45% emulzie rybieho oleja: 8,1% (kyselina eikozapentaénová, n-3) a 5,9% (kyselina dokozahexaénová, n-3).

Základné biochemické parametre (glukóza, TCh, LDL-Ch, HDL-Ch, TAG, kreatinín, kyselina močová) boli stanovené v akreditovanom Laboratóriu klinickej biochémie a hematológie (Alphamedical s.r.o., Slovensko) na analyzátore ADVIA 1800 Chemistry System (Siemens Healthcare Diagnostics, Nemecko).

Výsledky sú prezentované ako aritmetický priemer $\pm$ SEM pre normálne rozdelené dáta alebo ako medián a medzikvartilové rozpätie (IQR) pre dáta s odchýlkou od normality. Na posúdenie normality dát sme použili Shapiro-Wilkov test. ANOVA a Bonferroniho post-hoc test boli použité na štatistickú analýzu dát s normálnym rozdelením dát. Neparametrický Kruskal-Wallisov a Conover-Inmanov post-hoc test boli použité pre štatistickú analýzu dát s nenormálnym rozdelením. Hodnoty $p < 0,05$ sú považované za štatisticky významné. Na štatistickú analýzu sme použili program StatsDirect[®] 2.7.8 (StatsDirect, Cheshire, UK).

Výsledky

Všetky diabetické potkany (D, DFO1, DFO2) mali významne vyššiu hladinu glukózy ($p < 0,0001$), TCh a HDL-Ch ($p < 0,05$), a významne nižšiu hladinu kreatinínu a kyseliny močovej ($p < 0,05$) oproti skupine K.

Podávanie emulzie rybieho oleja v dávke 800 mg/kg kontrolným potkanom (KFO2) významne znížilo hladinu TCh o 19,35 % ($p = 0,0402$) a TAG o 33,62 % ($p = 0,0197$).

Podávanie emulzie rybieho oleja v dávke 160 mg/kg diabetickým potkanom (DFO1) významne znížilo hladinu glukózy o 10,45 % ($p = 0,05$) (Tab. 1).

parameter	K (n = 7)	KFO1 (n = 8)	KFO2 (n = 8)	D (n = 11)	DFO1 (n = 12)	DFO2 (n = 8)
glukóza (mmol/l)	10,70 $\pm$ 0,45	9,46 $\pm$ 0,48	9,12 $\pm$ 0,27	41,16 $\pm$ 1,71***	36,86 $\pm$ 2,12*** ^x	39,23 $\pm$ 2,72***
TCh (mmol/l)	1,55 (1,47 - 1,70)	1,34 (1,22 - 1,56)	1,25* (1,17 - 1,42)	2,29** (2,18 - 2,61)	2,28** (2,01 - 2,79)	2,06* (2,01 - 2,29)
TAG (mmol/l)	1,16 (1,11 - 1,39)	1,00 (0,79 - 1,14)	0,77* (0,59 - 0,99)	2,28 (1,36 - 2,46)	0,99 (0,74 - 4,40)	1,29 (1,06 - 2,41)
LDL-Ch (mmol/l)	0,13 (0,12 - 0,21)	0,15 (0,13 - 0,15)	0,14 (0,13 - 0,14)	0,17 (0,16 - 0,22)	0,23* (0,19 - 0,25)	0,18 (0,17 - 0,21)
HDL-Ch (mmol/l)	0,52 (0,52 - 0,57)	0,50 (0,43 - 0,57)	0,49 (0,46 - 0,58)	1,01*** (0,92 - 1,15)	0,85* (0,79 - 1,12)	1,01** (0,90 - 1,12)
Kreatinín (μ mol/ml)	34,80 (33,10 - 35,65)	32,50 (32,15 - 34,83)	34,20 (31,28 - 35,43)	26,30 (23,75 - 28,05)*	23,85 (22,23 - 24,28)***	23,80 (22,28 - 25,48)**
k. močová (μ mol/l)	153,61 $\pm$ 28,33	115,05 $\pm$ 12,78	146,73 $\pm$ 22,33	66,87 $\pm$ 12,46*	84,29 $\pm$ 12,79*	94,85 $\pm$ 22,50*

Tab. 1 Biochemické parametre

Dáta sú prezentované ako aritmetický priemer $\pm$ SEM alebo ako medián a IQR (1. kvartil - 3. kvartil). K – kontrolné potkany bez intervencie; KFO1 – kontrolné potkany + emulzia rybieho oleja v dávke 160 mg/kg; KFO2 – kontrolné potkany + emulzia rybieho oleja v dávke 800 mg/kg; D – diabetické potkany bez intervencie; DFO1 – diabetické potkany + emulzia rybieho oleja v dávke 160 mg/kg; DFO2 – diabetické potkany + emulzia rybieho oleja v dávke 800 mg/kg; *** $p < 0,0001$ vs. K; ** $p < 0,001$ vs. K; * $p < 0,05$ vs. K; ^x $p < 0,05$ vs. D.

Diskusia

Diabetes mellitus je ochorenie charakterizované nielen hyperglykémiou, ale aj dyslipidémiou, ktorá sa u ľudí prejavuje zvýšenými hladinami TAG a malých denzných častíc LDL-Ch a zníženými hladinami HDL-Ch (3). Viacerí autori zistili nepriaznivý lipidový profil u pacientov s DM (12-14). Podobné výsledky pozorovali autori aj v animálnych

experimentoch so STZ vyvolaným DM. Hao a kol. (15) zistili zvýšené hladiny cholesterolu a TAG u diabetických potkanov. Podobne aj Ashraf a kol. (16) zistili zvýšené hladiny TAG, TCh, LDL-Ch a znížené hladiny HDL-Ch u diabetických potkanov. Naše výsledky nie sú v súlade s týmito výsledkami. Napriek tomu, že sme zistili významne zvýšený TCh, koncentrácie TAG a LDL-Ch neboli zmenené. Navyše sme u nich pozorovali aj zvýšený HDL-Ch. Tieto výsledky by mohli byť čiastočne vysvetlené odlišným lipidovým metabolizmom u potkanov v porovnaní s ľuďmi. Na rozdiel od ľudí, u potkanov je 60 % cholesterolu transportovaných vo forme HDL-Ch a tento vysoký podiel HDL-Ch môže byť príčinou, že potkany sú dosť rezistentné na vyvolanie hyperlipidémie (17).

Hladina kreatinínu a kyseliny močovej v plazme diabetických potkanov bola významne nižšia v porovnaní s kontrolnými potkanmi. Kreatinín a kyselina močová sú metabolity vylučované predovšetkým obličkami a ich koncentrácia v plazme informuje o vylučovacej schopnosti obličiek. Zvýšené hladiny kreatinínu a kyseliny močovej v sére diabetických potkanov pozorovali viacerí autori (18-19). Zvýšená hladina kreatinínu a kyseliny močovej v plazme sa vysvetľuje rozvíjajúcimi zmenami v obličkách počas DM – tzv. diabetickou nefropatiou a zníženou glomerulárnou filtráciou. Naše výsledky sú však v protiklade s predošlými pozorovaniami. Tento stav by mohol byť vysvetlený tým, že hyperglykémia v prvých fázach DM spôsobuje polyúriu a glomerulárnu hyperfiltráciu a experiment v trvaní 8 týždňov zrejme nebol dosť dlhý na to, aby sme dosiahli u diabetických potkanov výrazné poškodenie obličiek. Viaceré klinické a animálne štúdie poukazujú na pozitívne účinky n-3 PUFA (EPA a DHA) pochádzajúcich z rybieho oleja a skutočnosť, že ich zvýšený príjem znižuje riziko vzniku KVO. Pozitívne účinky n-3 PUFA sú sprostredkované anti-arytmickými, anti-hypertenznými, anti-agregačnými, anti-trombotickými, protizápalovými účinkami a boli popísané pozitívne účinky aj na lipidový profil, predovšetkým znižovali hladinu TAG v plazme (20). Predpokladá sa, že n-3 PUFA by mohli zlepšovať aj glukózovú toleranciu a znižovať inzulínovú rezistenciu u pacientov s DM. Výsledky klinických aj animálnych experimentov sú však rozporuplné. Zatiaľ čo niektoré klinické štúdie zistili zlepšenie glukózovej tolerancie a inzulínovej citlivosti u pacientov s DM 2. typu, ktorí dostávali n-3 PUFA (10, 21), ďalší autori nezistili žiadny účinok n-3 PUFA na glukózovú toleranciu a inzulínovú rezistenciu, alebo zistili dokonca zhoršenie glukózovej tolerancie vplyvom vysokých dávok n-3 PUFA (22-24). Naproti tomu viaceré animálne experimenty potvrdili pozitívne účinky n-3 PUFA na hyperglykémiu, inzulínovú citlivosť a glukózovú toleranciu u potkanov s metabolickým syndrómom, DM 2. typu, ako aj so STZ indukovaným DM (25-27). Naše výsledky sú v súlade s výsledkami predchádzajúcimi animálnych štúdií, pretože emulzia rybieho oleja znížila hladinu glukózy u diabetických potkanov, avšak iba emulzia v dávke 160 mg/kg (DFO1). Pri podávaní emulzie vo vyššej dávke tento účinok už nepozorujeme. U kontrolných potkanov nemala emulzia rybieho oleja žiadny vplyv na hladinu glukózy.

N-3 PUFA môžu zlepšovať lipidový profil, a tým znižovať riziko KVO. Viaceré klinické štúdie pozorovali zlepšenie lipidového profilu účinkom podávania n-3 PUFA, predovšetkým bolo pozorované významné zníženie TAG a TCh v plazme (7, 28-30). K podobným výsledkom dospeli aj animálne štúdie (31-33). Naše výsledky sú čiastočne v súlade s predchádzajúcimi výsledkami. Emulzia rybieho oleja znižovala hladinu TAG a TCh v plazme, avšak tieto účinky emulzie sa prejavili iba pri podávaní vyššej dávky (800 mg/kg) kontrolným potkanom (KFO2). U diabetických potkanov sme účinky emulzie na lipidový profil nepozorovali.

Záver

Niektoré naše výsledky sú v súlade a niektoré v protiklade s publikovanými výsledkami ostatných autorov. Môže to byť spôsobené tým, že protokoly experimentov v projektoch nie sú rovnaké a výsledky sú niekedy ťažko porovnateľné. Môžu byť ovplyvnené odlišným

zložením zmesí olejov obsahujúcich n-3 PUFA, dĺžkou intervencie, ako aj celkovou dávkou podávaných olejov. Z našich výsledkov vyplýva, že podávanie 45% emulzie rybieho oleja vo vyššej dávke zlepšilo lipidový profil u kontrolných potkanov a v nižšej dávke znížilo hladinu glukózy u diabetických potkanov. Zvýšený príjem n-3 PUFA pochádzajúcich z rybieho oleja by mohol mať veľký význam u zdravých ľudí v rámci prevencie vzniku KVO. U ľudí s už rozvinutým diabetickým ochorením by mohol ich zvýšený príjem zlepšiť prognózu ochorenia prostredníctvom ovplyvnenia hyperglykémie.

Podakovanie

Práca bola finančne podporená spoločnosťou Cultech Ltd., Port Talbot, UK.

Literatúra

- 1. Rahimi R, Shekoufeh N, Larijani B a kol.** A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 365-373.
- 2. Yamagishi S, Ueda S, Okuda S.** A possible involvement of crosstalk between advanced glycation end products (AGEs) and asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase inhibitor in accelerated atherosclerosis in diabetes. *Med Hypotheses* 2007; 69: 922-924.
- 3. Dunn FL.** Management of dyslipidemia in people with type 2 diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11:41-51.
- 4. Willett WC.** The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutr* 2006; 9: 105-10.
- 5. Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, De Caterina R.** Nutraceuticals and prevention of atherosclerosis.: focus on omega-3 polyunsaturated fatty acids and Mediterranean diet polyphenols. *Cardiovasc Ther* 2010; 28: e13-9.
- 6. Pouydal H, panchal SK, Diwan V, Brown I.** Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 372-387.
- 7. Garaiová I, Muchová J, Nagyová Z a kol.** Effect of a plant sterol, fish oil a B vitamin combination on cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic children and adolescents: a pilot study. *Nutr J* 2013; 12:7
- 8. Allayee H, Roth N, Hodis HN.** Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases: Implications for Nutrigenetics. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2009; 2: 140-148.
- 9. Isharwal S, Misra A, Wasir JS, Nigam P.** Diet & insulin resistance: A review & Asian Indian perspective. *Indian J Med Res* 2009; 129: 485-499.
- 10. Karlström BE, Järvi AE, Byberg L, Berglund LG, Vessby BOH.** Fatty fish in the diet of patients with type 2 diabetes: comparison of the metabolic effects of foods rich in n-3 and n-6 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 26-33.
- 11. Luo P, Wang MH.** Eicosanoids, β -cell function, and diabetes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011; 95: 1-10.
- 12. Krentz AJ.** Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2003; 5: 19-27.
- 13. Krauss RM.** Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 1496-504.
- 14. Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A.** Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res* 2005; 36: 232-40.
- 15. Hao S, Xu R, Li D, Zhu Z, Wang T, Liu K.** Attenuation of streptozotocin-induced lipid profile anomalies in the heart, brain, and mRNA expression of HMG-CoA reductase by diosgenine in rats. *Cell Biochem Biophys* 2015; Jan 29. [Epub ahead of print]

16. **Ashraf H, Heidari R, Nejati V.** Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of fruit aqueous extract of berberis interegima Bge. In streptozotocin-induced diabetic rats. Iran J Pharm Res 2014; 13: 1313-8.
17. **Loeb WF.** Clinical biochemistry of laboratory rodents and rabbits In. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego, Academic Press, 1997. 845-855. ISBN-13 978-0-12-396305-5.
18. **Al-Malki AL, El-Rabey HA.** The antidiabetic effects of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy. Biomed Res Int 2015; 2015: 381040
19. **Liu J, Wang C, Liu F, Lu Y, Cheng J.** Metabonomics revealed xanthine-oxidase-induced oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Anal Bioanal Chem 2015; 407: 2569-79.
20. **Breslow JL.** n-3 fatty acids and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 2006; 83: 1477S-82S.
21. **Feskens EJ, Virtanen SM, Rasanen L, Tuomilohto J, Stengard J, Pekkanen J a kol.** Dietary factors determining diabetes and impaired glucose tolerance. A 20-year follow-up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study. Diabetes Care 1995; 18: 1104-12.
22. **Vessby B, Karlström B, boberg M, Lithell H, Berne C.** Polyunsaturated fatty acids may impair blood glucose control in type 2 diabetic patients. Diabet Med 1992; 9: 126-33.
23. **Rivellese AA, Maffetone A, Iovine C, Di Marino L, Annuzzi G, Mancini M a kol.** Long-term effects of fish oil on insulin resistance and plasma lipoproteins in NIDDM patients with hypertriglyceridemia. Diabetes Care 1996; 19: 1207-13.
24. **Mostad IL, Bjerve KS, Bjorgaas MR, Lydersen S, Grill V.** Effects of n-3 fatty acids in subjects with type 2 diabetes: reduction of insulin sensitivity and time-dependent alteration from carbohydrate to fat oxidation. Am J Clin Nutr 2006; 84: 540-550.
25. **Mori TA, Bao DQ, Burke V a kol.** Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects. Am J Clin Nutr 1999; 70: 817-25.
26. **Lovejoy JC.** The influence of dietary fat on insulin resistance. Curr Diab Rep 2002; 2: 435-40.
27. **Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, Moran-Salvador E a kol.** Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. FASEB J 2009; 23: 1946-57.
28. **Friedberg CE, Janssen MJFM, Heine RJ, Grobbee DE.** Fish oil and glycemic control in diabetes. A meta-analysis. Diabetes Care 1998; 21: 494-500.
29. **Montori VM, Farmer A, Wollan PC, Dinneen SF.** Fish oil supplementation in type 2 diabetes. A quantitative systematic review. Diabetes Care 2000; 23: 1407-15.
30. **Ebrahimi M, Ghayour-Mobarhan M, Rezaiean S, Hoseini M, Parizade SM, Farhoudi F a kol.** Omega-3 fatty acids supplements improve the cardiovascular risk profile of subjects with metabolic syndrome, including markers of inflammation and auto-immunity. Acta Cardiol 2009; 64: 321-7.
31. **Ikeda I, Kumamaru J, Nakatani N, sakono M, Murota I, Imaizumi K.** Reduced hepatic triglyceride secretion in rats fed docosahexaenoic acid-rich fish oil suppresses postprandial hypertriglyceridemia. J Nutr 2001; 131: 1159-64.
32. **Ryan AS, Bailey-Hall E, Nelson EB, Salem Jr N.** The hypolipidemic effect of an ethyl ester of a algal-docosahexaenoic acid in rats fed a high-fructose diet. Lipids 2009; 44: 817-26.

33. Cummings BP, Stanhope KL, Graham JL, Griffen SC, Havel PJ. Supplementation with EPA or fish oil for 11 months lower circulating lipids, but does not delay the onset of diabetes in UC Davis-type 2 diabetes mellitus rats. *Br J Nutr* 2010; 104: 1628-1634.

VPLYV KVERCETÍNU NA IMUNOEXPRESIU COX-2 A MPO V BUNKÁCH JEJUNÁLNEJ SLIZNICE PO ISCHEMICKO-REPERFÚZNOM POŠKODENÍ

(Influence of quercetin on COX-2 and MPO expression in the jejunal mucosa cells after ischemia-reperfusion injury)

Zuzana Jonecová¹, Štefan Tóth¹, Kristína Čurgali¹, Milan Mareta²

¹*Ústav histology a embryológie LF UPJŠ, Šrobárova 2, Košice, Slovensko,
stoth2000@gmail.com*

²*Neurologická klinika, Univerzitná nemocnica L.Pasteura, Košice, Slovensko*

Súhrn

Kvercetín predstavuje mimoriadne potentný prírodný antioxidant, ktorého efekt na úroveň zápalovej odpovede indukovanej v podmienkach experimentálnej intestinálnej ischémie-reperfúzie ešte nebol analyzovaný. Cieľom predloženej práce bolo posúdiť účinok podania kvercetínu na imunocytochemickú expresiu cyklooxygenázy-2 (COX-2) a myeloperoxidázy (MPO), ktoré sa uplatňujú pri zápalovej odpovedi tkaniva. V experimente bol použitý model ischemicko-reperfúzneho poškodenia jejúna u potkana *in vivo*. Počet COX-2 a MPO pozitívnych väzivových buniek sliznice jejúna bol nižší vo všetkých sledovaných periódach reperfúzie v skupinách s aplikáciou kvercetínu. Tento rozdiel sa pohyboval v intervale 9–33% pri analýze COX-2, pričom pri analyzovaní MPO pozitívnych buniek bol ešte zreteľnejší, pohyboval sa v intervale 28–55 %, čo bolo aj štatisticky významné po 24 hodinách reperfúzie ($p < 0,05$; E24 vs. Q24).

Kľúčové slová

Kvercetín, COX-2, MPO, ischémia-reperfúzia, jejúnium

Summary

There is no evidence about quercetin effect on inflammatory response of the tissues in the course of experimental intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. The aim of the present study was to investigate the effect of quercetin administration on immunocytochemical expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and myeloperoxidase (MPO), which are involved in the tissue inflammatory response. The reduced number of COX-2 and MPO-positive connective tissue cells in the jejunal mucosa was observed in all periods of reperfusion in the group with quercetin administration. The decrease in COX-2 positive cells number was by 9–33%. The decrease in MPO positivity was even more pronounced, ranged by 28–55%. The significant decrease in MPO activity after quercetin administration was found at 24 hours of reperfusion ($p < 0.05$: E24 vs. Q24).

Key words

Quercetin, COX-2, MPO, ischemia-reperfusion, jejunum

Úvod

Ischemico-reperfúzne poškodenie (IR) čreva je závažným problémom pri mnohých klinických stavoch, ako je transplantácia tenkého čreva, kardio-pulmonálny bypass, akútna mezenterická ischemia, intestinálna obštrukcia, trauma alebo šok (1). Prerušenie krvného zásobenia v priebehu ischemie spôsobuje poškodenie metabolicky aktívnych tkanív, ale paradoxne obnova krvného zásobenia ischemického tkaniva má za následok oveľa závažnejšiu reperfúznú devastáciu spojenú s nadprodukciou reaktívnych intermediátov kyslíka (ROS) a dusíka (RNS) (1,2). Kvercetin je vynikajúci prírodný antioxidant a predstavuje veľmi výkonný scavenger ROS (3), najmä superoxidových radikálov a RNS podobných NO a peroxynitritu. Experimenty na laboratórnych zvieratách potvrdili jeho protektívny efekt pri IR poškodení mozgu, srdca, obličiek a žalúdka (4,5,6). Účinky kvercetinu pri IR poškodení čreva doteraz v literatúre neboli popísané. Cieľom tejto štúdie bolo zistiť účinok aplikácie kvercetinu pred experimentálne indukovaným IR atakom jejúna u potkana a kvantitatívne analyzovať imunocytochemické zmeny exprese cyklooxygenázy-2 (COX-2) a myeloperoxidázy (MPO) v sliznici jejúna počas 24 hodinovej reperfúzie.

Materiál a metódy

V experimente boli použité laboratórne potkany kmeňa Wistar- SPF Charles River (n=42) ♂ pohlavia o hmotnosti 300-350g z Laboratória výskumných biomodelov UPJŠ LF (SK PC 4013). Experiment a metodický postup bol schválený ŠVPS SR (Ro-3004/14-221). Zvieratá boli rozdelené do 3 skupín. Pokusnej skupine (Q) s reperfúznou periódou 1, 4 a 24 hod bol aplikovaný antioxidant - kvercetin (Q1, Q4, Q24; v každej n=7ks). Kontrolnej skupine (E) s reperfúznou dobou 1, 4 a 24 hod bol aplikovaný iba etylalkohol ako vehikulum kvercetinu (E1, E4, E24; v každej n=7ks). Kvercetin bol aplikovaný v dávke 50 mg/kg ž.hm. i.p. 30 minút pred navodením ischemie jejúna oklúziou *arteria mesenterica cranialis*. Po uplynutí ischemického intervalu (1 hod) nasledovala príslušná perióda reperfúzie v celkovom trvaní 1, 4 a 24 hodín a po jej ukončení bol vykonaný odber biotického materiálu na kvantitatívnu imunocytochemickú analýzu počtu COX-2 a MPO pozitívnych väzivových buniek na 1 mm² plochy sliznice črevného klku.

Výsledky

Počet COX-2 pozitívnych buniek v sliznici jejúna bol nižší vo všetkých sledovaných periódach reperfúzie v skupinách s aplikáciou kvercetinu (viď Tab. 1).

Experimentálna skupina	COX-2 pozitívne bb (M ± SEM)	MPO pozitívne bb (M ± SEM)
E1	910,78 ± 75,24	1262,38 ± 92,71
Q1	837,64 ± 63,02	981,64 ± 119,14
E4	957,75 ± 59,31	1301,58 ± 73,91
Q4	715,25 ± 70,60	947,42 ± 51,14
E24	868,54 ± 75,30	1204,42 ± 112,40*
Q24	773,08 ± 61,12	774,82 ± 58,82*

Tab. 1 COX-2 a MPO pozitívne bunky na 1 mm² plochy sliznice jejúna (*p<0,05: E24 vs. Q24).

Tento rozdiel sa pohyboval v rozsahu 9-33%, avšak nedosiahol štatistickú významnosť. Rovnaká tendencia bola zaznamenaná pri imunocytochemickej analýze MPO pozitívnych buniek v sliznici jejúna. Rozdiel počtu MPO pozitívnych väzivových buniek medzi kontrolnými skupinami a skupinami s aplikovaným kvercetínom bol ešte výraznejší, a dosahoval 28-55%, pričom štatistická významnosť bola zaznamenaná v poslednej perióde reperfúzie, po 24 hodinách ($p < 0,05$: E24 vs. Q24).

Diskusia a záver

Izoformy cyklooxygenázy regulujú syntézu prostaglandínov z kyseliny arachidónovej. Produkcia izoformy COX-2, ktorá absentuje v tkanivách za fyziologických podmienok, je indukovaná počas vývoja, bunkového rastu a zápalu. Epitelové bunky, makrofágy, pohárikovité bunky a neutrofily produkujú COX-2 v oblasti histologických lézií, ako sú deskvamácia epitelových buniek, akumulácia zápalových buniek a nekróza väziva, čo bolo zistené pri vyšetrovaní lézií v pľúcnom parenchýme pri infekcii pľúc (7). COX-2 imunoreaktivita u neutrofilov je pravdepodobne sekundárna, vyvolaná fagocytózou nekrotických buniek s obsahom COX-2. Zvýšená expresia COX-2 bola zaznamenaná aj pri zápalových reakciách v tráviacom trakte, ako sú nekrotická enterokolitída a chronický zápal čreva (8,9). IR tenkého čreva vyvoláva silnú zápalovú reakciu spojenú so zhoršeným histopatologickým nálezom (10). V našom experimente vo všetkých skupinách zvierat bola zaznamenaná expresia COX-2 vo väzive jejúna. Počet COX-2 pozitívnych buniek na 1 mm² bol nižší v skupinách s aplikáciou kvercetínu pred navodením IR počas celej doby reperfúzie, ale rozdiely neboli štatisticky významné. Zmiernenie zápalovej reakcie a pokles COX-2 produkcie bol zaznamenaný po podaní kvercetínu v pečeni myši pri intoxikácii chloridu uhličitého (11). Prítomnosť zvýšenej MPO v tkanivách je jedným z prvých príznakov infiltrácie tkaniva neutrofilmi, pretože MPO sa extravaskulárne bez prítomnosti zápalu v tkanivách nenachádza (12). Podobne ako COX-2 pozitivita, aj MPO pozitivita buniek väziva bola redukovaná u potkanov, ktorým bol podaný pred IR zákrokom kvercetín. Po 24 hodinovej reperfúzii MPO pozitivita bola signifikantne nižšia ako v kontrolnej skupine. Tento výsledok potvrdzuje údaje získané pri skúmaní vplyvu kvercetínu pri IR poškodení mozgu. Annapurna a kol. (2013; 13) zistili, že aplikácia kvercetínu pred začatím reperfúzneho terapie pri cerebrálnej ischémii znižuje veľkosť lézií a signifikantne redukuje aktivitu MPO. Tendencia zníženia COX-2 a signifikantné zníženie MPO imunopozitivity buniek väziva jejúna potvrdzuje protektívny účinok podania kvercetínu pri IR tenkého čreva, čo naznačuje využitie tohto antioxidantu v klinickej praxi, predovšetkým pri plánovaných chirurgických zákrokoch.

PodĎakovanie

Experimentálna štúdia bola podporená grantom VEGA 1/0478/14.

Literatúra

1. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. Dig Dis Sci 2004;49(9):1359-77.
2. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. Eur J Pharmacol. 2008 ;585(2-3):325-3.
3. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2005;26(5):343-56.
4. Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. J Pharm Pharmacol 2009;61(10):1365-74.

5. **Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL.** The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol.* 2012 ;83(1):6-15.
6. **Ikizler M, Erkasap N, Dernek S, Kural T, Kaygisiz Z.** Dietary polyphenol quercetin protects rat hearts during reperfusion: enhanced antioxidant capacity with chronic treatment. *Anadolu Kardiol Derg* 2007;7(4):404-410.
7. **Rodriguez F, Ball HJ, Suárez-Bonnet A, Ramírez AS, Fernández A.** Immunohistochemical labelling of cyclooxygenase-2 in lung lesions of calves infected with *Mycoplasma bovis*. *Journal of Comparative Pathology* 2015;152(2-3):106-109.
8. **Hui L, Bing Z.** Role of cyclooxygenase-2 in intestinal injury in neonatal rats. *Biomedical Reports.* 2014 6(2): 875-878.
9. **Bergholz R, Zschiegner M, Eschenburg G, et al.** Mucosal loss with increased expression of IL-6, IL-8, and COX-2 in a formula feeding only neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2013; 48:2301-2307.
10. **Tóth Š, Jonecová Z, Varga J, Staško P, Kovalčinová B, Maretta M, Veselá J.** Mesenteric ischemia-reperfusion injury: Specific impact on different cell populations within the jejunal wall in rats. *Acta Histochemica* 2012; 114 (3): 276-284.
11. **Domitrovic R, Jakovac H, Vasiljev Marchesi V, Vladimir-Kneževic S, Cvijanovic O, Tadic Z, Romic Z, Rahelic D.** Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice. *Acta Pharmacol Sin* 2012;33(10): 1260-70.
12. **Nauseef WM.** Diagnostic assays for myeloperoxidase deficiency. *Methods Mol Biol* 2007;412:525-530.
13. **Annapurna A, Ansari MA, Manjunath PM.** Partial role of multiple pathways in infarct size limiting effect of quercetin and rutin against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17(4):491-500.

MECHANIZMY OBEZITY

(Mechanisms of Obesity)

Jana Kalninová¹, Vladimír Jakuš¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava; jana.kalninova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Obezita a s ňou súvisiaca morbidita dosiahli epidemické proporcie. Možné mechanizmy spájajúce obezitu/viscerálny tuk s diabetom a kardiovaskulárnymi komplikáciami zahŕňajú zápal a stúpajúci oxidačný stres.

Kľúčové slová

Mechanizmus, obezita

Summary

Obesity and related morbidities are reaching epidemic proportions. Possible mechanisms that link obesity/visceral fat to diabetes and cardiovascular complications include inflammation and increased oxidative stress.

Key words

Mechanism, Obesity

Úvod

Obezita je jedno z najrozšírenejších chronických ochorení na svete. Je hlavnou príčinou inzulínovej rezistencie (IR) a môže sa komplikovať metabolickou dysreguláciou, vrátane hypertenzie, dyslipidémie – známych spoločne ako metabolický syndróm, ktorá je prekursorom DM 2.

U obézných osôb IR je prepojená so zvýšeným uvoľnením odvođených od adipocytov bioaktívnych metabolitov, ako sú lipidy, FAA, MCP-1 a prozápalové cytokíny.

Nadváha vytvára podmienky pre nízko-stupňový chronický zápal s klesajúcimi hladinami adiponektínu. Keď nadváha prerastá do obezity, pokračujúci zápal naďalej ovplyvňuje hladiny CRP, fibrinogénu a IL-6. Obezita sa môže komplikovať metabolickou dysreguláciou (metabolický syndróm) s následným vývojom diabetu typu 2 (DM2). Počas patologického prechodu od nadváhy k DM2 progresívna IR stúpa a zvyšuje sa riziko kardiovaskulárnych chorôb (CVD) (1).

Charakteristika cytokínov a chemokínov je dôležitá z hľadiska potenciálnej možnosti stať sa biomarkermi zápalu a inzulínovej rezistencie súvisiacej s obezitou a tým samým aj so skorou detekciou rizika DM2.

V prípade inzulínovej rezistencie súvisiacej s obezitou vylučujú adipocyty po svojej aktivácii abnormálne množstvá bioaktívnych metabolitov, čo vedie k zvýšeniu monocytov v adipozných tkanivách. Diferenciácia monocytov na makrofagy má za následok dodatočné zvýšenie vylučovania zápalových faktorov a chemokínov, čo vyvoláva zápalovú reakciu tak v adipoznom tkanive lokálne, ako aj systémovo hocikde inde (2).

Najvýznamnejším následkom obezity v zdravotníctve je DM2, nakoľko obezita je najzávažnejším faktorom rizika vývinu DM2.

Obezita ako rizikový faktor pre rozvoj DM je považovaná za aktivátor vrodeneho imunitného systému, ktorý indukuje stav chronického zápalu nízkeho stupňa pomocou prozápalových cytokínov, ktoré zvyšujú inzulínovú rezistenciu.

Najdôležitejším zistením vo vzťahu medzi vrodenu imunitou a vývinom diabetu je, že osoby s obezitou prejavujú jasne vyjadrenú a dlhšie trvajúcu zápalovú reakciu ako odpoveď na podnet, čo nasvedčuje, že zápalová odpoveď na faktory životného štýlu, ktoré vyvolávajú diabetes sú obvykle samolimitujúce (1).

Obezita sa spája so stavom chronického zápalu nízkeho stupňa, charakterizovaného zmenami v cirkulačných imuno-modulačných faktoroch, keďže tukové tkanivo obsahuje imunitné bunky, ktoré môžu poskytnúť spojenie medzi zvýšenou adipozitou a IR. Tukové tkanivo je endokrinný orgán, ktorý vylučuje množstvo cytokínov, prevažne produkovaných lokálnymi makrofágmi, ktoré môžu tvoriť až do 40% všetkých buniek tukového tkaniva pri obezite.

Bolo preukázané spojenie medzi zápalom nízkeho stupňa, IR a obezitou. IR je primárnym mechanizmom ovplyvňujúcim rozvoj DM2 a je centrálnou zložkou definujúcou metabolický syndróm – zoskupenie abnormalít, ktoré zahŕňa obezitu.

Rozvoj abdominálnej obezity je podmienený narušením negatívneho spiatého spojenia medzi kôrou nadobličiek a hypotalamo-hypofýzovou oblasťou.

Jednou z funkcií tukového tkaniva v organizme je antitoxická. Tukové tkanivá sú aktívnymi sorbentami bakteriálneho lipopolysacharidu (bakteriálneho toxínu) a iných mikrobiálnych toxínov, ktoré ohraničujú ich systémový účinok. Tento mechanizmus je veľmi starodávny a evolučne predchádza vzniku imunitného systému. Osobitne významným vedeckým faktom je, že obezita je spojená s chronickým zápalom.

Celý rad patologických a iných špecifických vlastností, nezriedka majúci jednotný pôvod a prejavy, spájajú epidémiu diabetu a obezity.

Všeobecné rozšírenie miery obezity u pacientov s DM2 je vysoké po celom svete (3).

Od konca 20. storočia, keď sa tukové tkanivo považovalo za pasívne depo energie, začal sa formovať koncept tukového tkaniva ako endokrinného aktívneho orgánu, ktorý je zdrojom mnohých abioaktívnych látok – adipokínov (4).

Mechanizmus vzniku obezity sa nedá vysvetliť iba z hľadiska termodynamických zákonov, t.j. iba z nerovnováhy medzi príjmom a výdajom energie. Vysvetlenie vyžaduje komplexný prístup zahŕňajúci interakciu medzi určitým genetickým vybavením, vplyvom vonkajšieho prostredia a početnými metabolickými a patofyziologickými procesmi celého organizmu, ktoré určujú jeho energetickú homeostázu (5).

Nepriaznivý vplyv abdominálnej obezity na metabolizmus je sprostredkovaný okrem iného zmenami v produkcii adipocytokínov, ku ktorým dochádza pri výraznom rozvoji obezity. Poznatky o tukovom tkanive potvrdzujú, že regulačné procesy, ktoré v nej prebiehajú, sú veľmi komplexné a zložité.

Obezita má za následok zvýšenú potrebu inzulínu, čo stresovo pôsobí na β -bunky podžalúdkovej žľazy a časom vedie k ich vyčerpaniu. Jednako klinicky významné poškodenie β -buniek pri obezite sa realizuje v prítomnosti geneticky determinovaných porúch ich funkcie alebo obranných mechanizmov (6).

Tukové tkanivo je vysoko aktívny endokrinný orgán uvoľňujúci hormóny, cytokíny a enzýmy s tendenciou narušiť inzulínovú citlivosť.

Pribúdajú dôkazy, že obezita je sprevádzaná lokálnym a systémovým zápalom nízkeho stupňa. Chronický zápal nízkeho stupňa, charakterizovaný abnormálnou produkciou adipokínov a zápalových mediátorov, je zahrnutý do patogenezy s obezitou súvisiacich chronických ochorení (7).

Obezita patrí medzi civilizačné ochorenia, výskyt ktorých a prevaha celosvetovo stúpa. Komplikácie obezity predstavujú závažný socioekonomický problém, je spojená s dysfunkciou tukového tkaniva a je spôsobená nerovnováhou medzi energetickým príjmom a výdajom organizmu (8).

Bolo preukázané, že obezita vedie k funkčnému a morfológickému poškodeniu tkanív prostredníctvom cirkulujúcich faktorov.

Obezita je celosvetovou epidémiou s mnohopočetnými s ňou spojenými zdravotnými problémami, zahŕňajúc DM2, hypertenziu a kardiovaskulárne ochorenia. Tukové tkanivo slúži ako zásobáreň paliva, ale tiež zohráva kľúčovú úlohu v homeostáze spotreby energie, regulácii glukózy a imunity. Genetika a prostredie zohrávajú dôležité úlohy vo funkcii a dysfunkcii tukového tkaniva. Obezita predstavuje abnormálnu akumuláciu tukového tkaniva. Podstata tejto zvýšenej akumulácie tukového tkaniva, teda hyperplázia alebo hypertrofia, lokálna alebo ektopická, je spájaná s poruchami, ktoré zahŕňajú nadbytok sekrécie mastných kyselín, zvýšenú produkciu zápalových cytokínov a abnormálnu signalizáciu tukových hormónov, čo má za následok IR. Etiológia narastajúceho výskytu obezity súvisí so životným štýlom, ale náchylnosť k obezite je zložitá a zahŕňa prostredie ovplyvňujúce genetiku (9).

Epidémia nadváhy a obezity spôsobila dramatický vzostup počtu jedincov s metabolickými abnormalitami a predčasnými CVD. Prevaha diabetu, hlavne DM2, ktorý zahŕňa 80-90% všetkých jedincov s diabetom, tiež ostro stúpol s epidémiou obezity. Dva procesy prispievajú k rozvoju DM2. Porušená signalizácia inzulínu - známa tiež ako IR - vedie k zvýšenému dopytu po inzulíne, ktorý sa musí uspokojiť pomocou zvýšenej produkcie inzulínu β -bunkami, procesom známym ako kompenzačná funkcia β -buniek. Teda, IR indukovaná obezitou vedie spočiatku k vyššej koncentrácii cirkulujúceho inzulínu, ako v prípade dlhotrvajúcej a/alebo zhoršujúcej IR β -bunky nemôžu byť naďalej schopné uspokojiť vysoký dopyt. Toto môže viesť k nedostatočnosti hepatálnej a periférnej dispozícii glukózy a následne k vyšším hladinám cirkulujúcej glukózy a rozvoju DM2 (10). Obezita môže byť definovaná ako ochorenie, pri ktorom nadbytok telesného tuku sa akumuluje v takom rozsahu, že zdravie môže byť nepriaznivo ovplyvnené (11).

Literatúra

1. **Badawi et al.** Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2010, 3:173-186.
2. **King GL.** The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol* 2008, 79: 1527-1534.
3. **Colosia AD et al.** Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies: a systematic literature review. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2013, 6: 327-328.
4. **Ukropcová B et al.** Endokrinná funkcia tukového tkaniva. *Via pract* 2008, 5(3): 115-121.
5. **Masopust J.** Obezita jako nemoc, 1.díl, Etiologie a patogeneze, důsledky a nemoci sdružené, prevence a terapie. *Labor Aktuell* 2011, 4: 9-13.
6. **Kolb H, Mandrup-Poulsen T.** The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia* 2010, 53: 10-20.

7. **Al-Jiffri O et al.** Association of Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction in Obese Type Saudi Diabetic Patients. *World. Appl Sci J* 2013, 26(2): 200-204.
8. **Berková M, Berka Z.** Obezita, body mass index, obvod pasu a mortalita. *Vnitř Lék* 2011, 57(1): 85-91.
9. **Schuster DP.** Obesity and the development of type 2 diabetes: the effects of fatty tissue inflammation. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2010, 3: 253-262.
10. **Greevenbroek MMJ et al.** Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *The Netherlands J Med* 2013, 71 (4): 174-187.
11. **Cruz NG et al.** The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2013, 99: 85-92.

FARMAKOGENETIKA FINGOLIMODU

(Pharmacogenetics of fingolimod)

***Eubica Krajčiová¹, Katarína Čorejová¹, Petra Priščáková¹, Lenka Oravcová¹,
Iveta Gašparová¹, Vanda Repiská¹***

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LFUK a UNB, Sasinkova 4,
Bratislava, SR, lubica.krajciovaa@fmed.uniba.sk

Súhrn

Vyžitím farmakogenetického testovania pri terapii fingolimodom umožňuje pacientom podstúpiť tzv. „personalizovanú“ medicínu, čo má za následok zvýšený benefit liečby, ako napríklad rýchlejšie prispôsobenie sa liečbe a menej vedľajších účinkov. Fingolimod (Gilenya®) je perorálne liečivo, ktoré sa používa pri liečbe v prípade relaps-remitujúcej roztrúsenej sklerózy (RRMS), pričom znižuje relapsy a poškodenia mozgu. Poskytuje užitočnú alternatívnu liečbu u pacientov s RRMS, ktorí nereagovali dostatočne na iné druhy štandardnej liečby pri RRMS. Na metabolizme fingolimodu sa podieľa predovšetkým ľudský gén *CYP4F2* (80%), ale existujú aj ďalšie enzýmy, ako je *CYP3A4*, ktoré môžu ovplyvňovať jeho metabolizmus. Jednonukleotidové polymorfizmy v génoch *CYP4F2* (*CYP4F2*3*) a *CYP3A4* (*CYP3A4*1B* a *CYP3A4*22*), ktorých zastúpenie sme sledovali v skupine 156 jedincov môžu ovplyvňovať farmakogenetiku fingolimodu.

Kľúčové slová

Farmakogenetika, fingolimod, polymorfizmus, slovenská populácia

Summary

The use of fingolimod pharmacogenetics in drug therapy allows patients to undergo personalized medicine, which results into significant benefits, such as faster adjustment to treatment and fewer side effects. Fingolimod (Gilenya®) is an orally administered disease modifying agent (DMA) for use in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). Fingolimod is an efficacious therapy for RRMS that reduces relapses, disability progression, new brain lesions and loss of brain volume. It has an acceptable tolerability profile and provides a useful alternative treatment in patients with RRMS who have responded poorly to other DMAs. The metabolism of fingolimod is affected by human gene *CYP4F2* (80%), but there are other enzymes such as *CYP3A4* which may affect fingolimod metabolism. We tested the frequency of single nucleotide polymorphisms in genes *CYP4F2* (*CYP4F2*3*) and *CYP3A4* (*CYP3A4*1B* and *CYP3A4*22*) which can influence fingolimod pharmacogenetics.

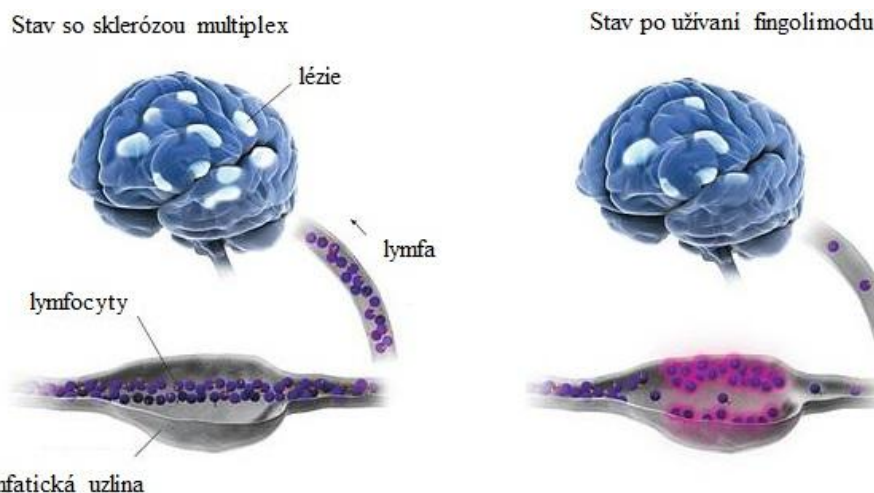
Key words

Pharmacogenetics, fingolimod, polymorphisms, slovak population

Úvod

Fingolimod patrí do skupiny perorálnych liečiv, ktoré sa používajú na liečbu remitujúcej roztrúsenej sklerózy (1). Jedná sa o prvý modulátor receptora pre sfingozín-1-fosfát (S1P), ktorý sa viaže na receptor lymfocytov. Lahko prechádza hematoencefalickou bariérou,

naviaže sa na receptor 1 S1P, ktorý sa nachádza v nervových bunkách v centrálnom nervovom systéme (2). Fingolimodfosfát pôsobí ako antagonista receptorov S1P na lymfocytoch. Znížením expzie SP1 dochádza k zníženiu množstva cirkulujúcich lymfocytov a to tak, že SP1 blokuje schopnosť lymfocytov vystupovať z lymfatických tkanív (3). Týmto spôsobom dochádza k redukcii infiltrácie autoagresívnych lymfocytov do centrálného nervového systému (Obrázok 1), kde by poškodzovali nervové tkanivo a podieľali sa na zápale nervov (4).



Obr. 1 Schematické znázornenie pôsobenie fingolimodu na lymfocyty a centrálny nervový systém (upravené podľa: 5).

Popis obrázku: Fingolimod (FTY720) udržiava lymfocyty v lymfatických uzlinách, čím sa zníži počet autoagresívnych lymfocytov v periférnej krvi, ktoré sú zodpovedné za sklerózu multiplex. Fingolimod sa používa práve kvôli tomu, aby sa dosiahlo zníženie množstva zápalových buniek v mozgu a neurónoch.

Fingolimod (Gilenya) sa podáva vo forme perorálnych kapsúl. Po podaní prvej dávky fingolimodu (0,5 mg) približne po 4 až 6 hodinách klesne počet lymfocytov na cca 75% východiskovej hodnoty v periférnej krvi. Dlhodobým denným užívaním sa udržiava permanentne znížená hladina lymfocytov (6). Absorpcia fingolimodu je pomalá, pričom príjem potravy nemá vplyv na jeho mieru vstrebávania. Výsledný polčas eliminácie liečiva je okolo 4-6 dní pričom jeho rovnovážna koncentrácia v krvi sa dosiahne v priebehu 1-2 mesiacov pri dávkovaní raz denne (7).

Fingolimod je metabolizovaný niekoľkými cestami, vrátane reverzibilnej fosforylácie, oxidácie a konjugácie s endogénnymi mastnými kyselinami za vzniku analógov ceramidov a jeho eliminácia prebieha prevažne pomocou oxidácie (8). Na metabolizme fingolimodu sa podieľa predovšetkým ľudský gén *CYP4F2* (80%), ale existujú aj ďalšie enzýmy, ako je *CYP3A4*, ktoré naň môžu mať vplyv (9). Inhibítory alebo induktory *CYP4F2* a možno aj ostatné *CYP4F* môžu zmeniť konformáciu fingolimodu alebo fingolimod-fosfátu. Jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs) v génoch *CYP4F2* a *CYP3A4* môžu ovplyvňovať farmakogenetiku fingolimodu. Polymorfizmus *CYP4F2*3* v géne *CYP4F2* spôsobuje zmenu Val433Met (10). Alela *CYP4F2*3* sa nachádza u približne 34% v kaukazskej populácii (11). Polymorfizmus *CYP3A4*1B*, ktorý sa nachádza v promótorovej oblasti génu *CYP3A4*, je spojený so zníženou expresiou proteínu *CYP3A4* (12). Avšak, klinický význam tohto polymorfizmu nie je doposiaľ úplne objasnený (13). Okrem polymorfizmu *CYP3A4*1B* aj

ďalší SNP *CYP3A4*22* v intróne 6 génu *CYP3A4* môže mať vplyv na farmakokinetiku liečiv (kalcineurínový inhibítor – imunosupresívum) (14). SNP *CYP3A4*22* v homozygotnom stave (TT) je spojený so znížením hladiny expície mRNA génu *CYP3A4* v pečeni, čo súvisí so znížením aktivity enzýmu CYP3A4. Alela *CYP3A4*22* sa nachádza v 3-4% v kaukazskej populácii (15).

Materiál a metódy

Zisťovali sme zastúpenie polymorfizmov v génoch *CYP4F2* (*CYP4F2*3*) s využitím metódy polymorfizmu dĺžky restričných fragmentov (PCR-RFLP) a *CYP3A4* (*CYP3A4*1B* a *CYP3A4*22*) pomocou alelovo-špecifickej real-time PCR v kontrolnej skupine 156 náhodne vybraných jedincov, ktorí nemajú sklerózu multiplex a nikdy neboli liečení pomocou preparátov s účinnou látkou fingolidu.

Výsledky

V kontrolnej skupine 156 náhodne vybraných jedincov (68 mužov a 88 žien) sme zistili nasledujúce zastúpenie vybraných SNPs (Tabuľka 1).

	<i>CYP4F2*3</i> - rs2108622	<i>CYP3A4*1B</i> - rs2740574	<i>CYP3A4*22</i> - rs35599367
Počet jedincov so štandardným genotypom	73 (46,79%)	147 (94,23%)	147 (94,23%)
Počet jedincov s mutáciou v heterozygotnom	74 (47,44%)	9 (5,77%)	9 (5,77%)
Počet jedincov s mutáciou v homozygotnom stave	9 (5,77%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)

Tab. 1 Zastúpenie SNPs v kontrolnej skupine 156 náhodne vybraných jedincov.

Diskusia a záver

Vyžitím farmakogenetického testovania vo farmakoterapi umožňuje pacientom podstúpiť tzv. „personalizovanú“ medicínu, čo má za následok zvýšený benefit liečby, ako napríklad rýchlejšie prispôbenie sa liečbe a menej vedľajších účinkov. Ak chceme realizovať personalizovanú medicínu, musíme brať do úvahy vzťah medzi odpoveďou na liečivo a genetické pozadie jedinca. Genetické polymorfizmy môžu spôsobiť rozdiely v enzymatickej aktivite a farmakodynamickej citlivosti na liečivo a môžu prispievať k interindividuálnym rozdielom v odpovedi organizmu na dané liečivo.

Liek Gilenya, ktorý obsahuje účinnú látku fingolimod, ovplyvňuje lymfatický systém a to tak, že bráni lymfocytom v lymfatických uzlinách v pohybe do centrálnej nervovej sústavy kvôli autoimunitnej odpovedi a má aj priamy vplyv na bunky centrálného nervového systému, ktoré stimulujú opravný proces gliových buniek (7).

Z doterajší výskumov vyplýva, že *CYP4F2* má významnú úlohu v metabolizme fingolimodu v pečeni (16). Ako vyplýva z literatúry SNPs v génoch *CYP4F2* (*CYP4F2*3*, rs2108622) a *CYP3A4* (*CYP3A4*1B*, rs2740574 a *CYP3A4*22*, rs35599367) by mohli mať vplyv na metabolizmus fingolimodu (9). Výskyt zistených polymorfizmov v sledovaných génoch by mohol mať vplyv na farmakogenetiky fingolimodu (Gilenye). Frekvencia týchto SNPs korelujú s výsledkami, ktoré sú uvádzané v literatúre. Scott a kolektív v ich práci z roku 2010 uvádzajú, že alely *CYP4F2*3* sa vyskytuje v približne 34% v kaukazskej populácii, čo sa potvrdilo aj v našej práci, kde táto frekvencia bola 35,26%. Alely *CYP3A4*1B* a *CYP3A4*22* sa v kaukazskej populácii vyskytujú v približne 3-4% (15), čo sa potvrdilo aj v našej štúdii, kde táto frekvencia v slovenskej populácii bola 4,5%.

Farmakogenetické testovanie by mohlo prispieť k zlepšeniu personalizovanej medicíny na Slovensku.

Literatúra

1. **Minagar A.** Current and Future Therapies for Multiple Sclerosis. *Scientifica* 2013; 1-11.
2. **Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, Haas T, Korn AA, Karlsson G, Radue EW, FTY720 D2201 Study Group.** Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 355:1124–1140.
3. **Brinkmann V.** Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther* 2007; 115:84–105.
4. **Hale JJ, Yan L, Neway WE, Hajdu R, Bergstrom JD, Milligan JA, Shei GJ, Chrebet GL, Thornton RA, Card D, Rosenbach M., Rosen H., Mandala S.** Synthesis, stereochemical determination and biochemical characterization of the enantiomeric phosphate esters of the novel immunosuppressive agent FTY720. *Bioorg Med Chem* 2004; 12:4803–4807.
5. <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/?id=35392>
6. **English C, Aloï JJ.** New FDA-Approved Disease-Modifying Therapies for Multiple Sclerosis. *Clin Ther.* 2015; 37(4):691-715.
7. <http://flipper.diff.org/app./items/6030>
8. **Zollinger M, Gschwind HP, Jin Y, Sayer C, Ze'cri F, Hartmann S.** Absorption and disposition of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in healthy volunteers: a case of xenobiotic biotransformation following endogenous metabolic pathways. *Drug Metab Dispos* 2011; 39:199–207
9. **Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W, van Gelder T.** Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74:245-54.
10. **Stec DE, Roman RJ, Flasch A, Rieder MJ.** Functional polymorphism in human CYP4F2 decreases 20-HETE production. *Physiol Genomics.* 2007; 30(1):74-81.
11. **Scott SA, Khasawneh R, Peter I, Kornreich R, Desnick RJ.** Combined CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 frequencies among racial and ethnic groups. *Pharmacogenomics.* 2010; 11(6):781-91.
12. **Amirimani B, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF, Rebbeck TR.** Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen* 2003; 42:299-305.
13. **Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y.** CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2007;82:711-25.
14. **Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadée W.** Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J* 2011;11:274-86.
15. **Bouamar R, Hesselink DA, Gelder T.** General introduction. Based on: Tacrolimus: Pharmacokinetics and pharmacogenetics; Optimized use of immunosuppressive drugs in transplantation. *Int Transpl Updates* 2009. 9-12.
16. **Jin Y, Zollinger M, Borell H, Zimmerlin A, Patten CJ.** CYP4F enzymes are responsible for the elimination of fingolimod (FTY720), a novel treatment of relapsing multiple sclerosis. *Drug Metab Dispos.* 2011; 39(2):191-198.

ÚČINOK OLEJA Z VLAŠSKÝCH ORECHOV NA AKTIVITU GLUTATIÓNPEROXIDÁZY MONOCYTOV V HYPERGLYKEMICKÝCH PODMIENKACH

(Effect of walnut oil on activity of glutathione peroxidase in monocytes in hyperglycemic conditions)

Lucia Laubertová¹, Zdeňka Ďuračková¹, Ingrid Žitňanová¹

¹ Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovenská republika, lucia.laubertova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Alternatívne prístupy založené na nutričnej terapii môžu predstavovať jeden z možných spôsobov ako zlepšiť život diabetických pacientov. Hyperglykémiou-indukovaný oxidačný stres zohráva významnú úlohu v progresii diabetes mellitus a rozvoji diabetických komplikácií. Olej z vlašských orechov je zdrojom omega-6 a omega-3 polynenasýtených mastných kyselín (PUFA) a mnohých antioxidantov. V tejto práci sme sledovali vplyv oleja z vlašských orechov na aktivitu glutatiónpoxidázy (GPx) monocytov U937 v hyperglykemických podmienkach. Testovaný olej z vlašských orechov signifikantne zvýšil aktivitu GPX, ktorá bola vplyvom hyperglykémie signifikantne znížená.

Kľúčové slová

Glutatiónpoxidáza, hyperglykémia, monocyty U937

Summary

Alternative approaches based on diet therapy could be one of the possible ways to ameliorate the life of diabetic patients. Hyperglycemia-induced oxidative stress plays an important role in the progression of diabetes mellitus and in the development of diabetic complications. Walnut oil is a source of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and several antioxidants. In this study we have examined the effect of walnut oil on activity of glutathione peroxidase (GPx) in monocytes U937 in hyperglycemic conditions. Tested walnut oil significantly increased activity of GPx, which was decreased by the effect of hyperglycemic conditions.

Key words

Glutathione peroxidase, hyperglycemia, monocytes U937

Úvod

Diabetické komplikácie, vzniknuté v dôsledku oxidačných a zápalových procesov, koronárnych, mozgových a periférnych tepien sú hlavným dôvodom hospitalizácie diabetických pacientov, pričom tvoria príčinu až 80% úmrtí diabetických pacientov. Jedným zo spôsobov, ako chrániť organizmus diabetikov pred vplyvom oxidačných procesov je zvýšiť

hladinu antioxidantov, ako aj látok, ktoré zvyšujú aktiváciu antioxidačných obranných systémov v organizme.

Viacere štúdie potvrdili zníženie aktivity glutatiónperoxidázy (GPx) u diabetických pacientov v porovnaní so zdravými jedincami (1). Taktiež popísali vzťahy medzi antioxidačnými enzýmami, glutatiónom a peroxidáciou lipidov v plazme a erytrocytoch diabetických pacientov (2).

Čoraz viac štúdií potvrdilo, že strava bohatá na nenasýtené mastné kyseliny by sa mohla podieľať na prevencii vzniku a rozvoja diabetických komplikácií. 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). Olej z vlašských orechov je taktiež bohatým zdrojom antioxidantov ako sú kyseliny: elagová, galová, kávová, vanilová a jablčná a mikronutrientov ako je kyselina listová, meď, horčík a jód (4). Táto štúdia bola uskutočnená za účelom sledovania vplyvu oleja z vlašských orechov na aktivitu glutatiónperoxidázy v monocytoch v hyperglykemických podmienkach *in vitro*.

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 (5). Na sledovanie vplyvu testovaných látok v hyperglykemických podmienkach sme použili kompletné médium doplnené o glukózu na výslednú koncentráciu 35 mmol/l. Ako kontrolu osmolarity sme použili manitol.

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 kultúry sme pripravili bunkovú suspenziu, ku ktorej sme pridali testovanú látku a inkubovali 24, 48 a 72 h. Po uplynutí požadovaného kultivačného času, sme bunky premyli chladným PBS a sonifikovali (3x5s on/ 5s off, 4°C). V bunkových homogenátoch sme stanovili koncentráciu proteínov použitím komerčného kitu (Micro BCA™ Protein Assay Kit, The Thermo Scientific, USA)

Stanovenie aktivity glutatiónperoxidázy (GPx)

Aktivitu GPx sme stanovili použitím komerčného kitu (Glutathione peroxidase activity kit, Promega, UK).

Štatistika

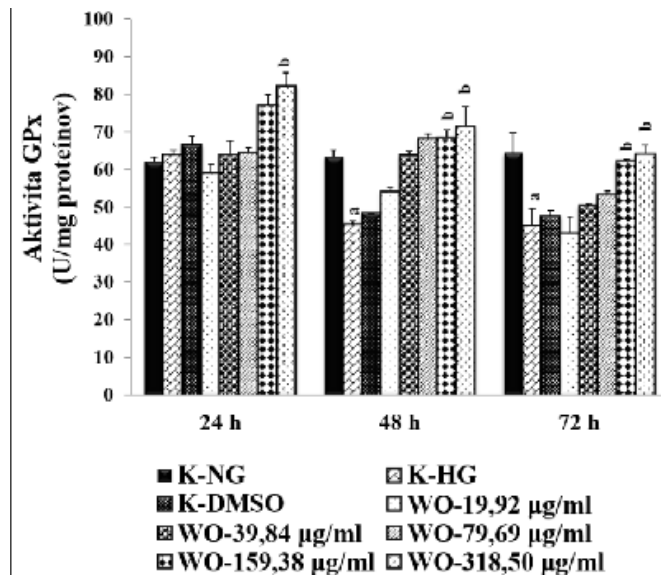
Údaje boli analyzované pomocou jednosmernej analýzy rozptylu (one-way ANOVA) s použitím post hoc testu (Tuskey a Games-Howell). Hladina významnosti bola definovaná ako $P < 0,05$.

Výsledky

Aktivitu glutatiónperoxidázy monocytov U937, vystavených hyperglykémii a rôznym koncentráciám WO sme sledovali počas 24 h, 48 h a 72 h inkubácie (Obr. 1). Po 48 h a 72 h

inkubácie sme zaznamenali signifikantné zníženie aktivity GPx vplyvom hyperglykemických podmienok v porovnaní s normoglykemickými podmienkami.

Najvyššia testovaná koncentrácia WO (318,50 µg/ml) signifikantne zvýšila aktivitu GPx už po 24 h inkubácie. Po 48 h a 72 h inkubácie sme sledovali pri dvoch najvyšších použitých koncentráciách WO (159,38 µg/ml; 318,50 µg/ml) signifikantné zvýšenie aktivity GPx.



Obr. 1 Vplyv hyperglykémie a oleja z vlašských orechov na aktivitu GPx 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 µg/ml). ^aP < 0,05 - K-HG v porovnaní s K-NG, ^bP < 0,05 - WO v porovnaní s K-DMSO.

Diskusia

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 poškodenie bunkových organel, enzýmov, ako aj zvýšenie peroxidácie lipidov (6). Mnohé vedecké štúdie popisujú zníženie aktivity GPx u diabetických pacientov s DM-2 v porovnaní s jedincami s normoglykémiou (7-9). Rovnaký vplyv hyperglykémie na aktivitu GPx monocytov U937 sme sledovali v našej štúdii. Tento pokles aktivity GPx môže byť spôsobený glykáciou proteínov vrátane antioxidantných enzýmov, ako dôsledok hyperglykémie indukovaných patogénnych mechanizmov (10-11).

Olej z vlašských orechov signifikantne zvýšil aktivitu GPx v monocytoch U937 inkubovaných v hyperglykemických podmienkach. Podobné výsledky pozorovali aj Yessoufouet al. (2006) u diabetických myši a potkanov, ktorým podávali zmes omega-6 a omega-3 olejov, s prevažným zastúpením EPA a DHA (12). Jedným z prevládajúcich fytosterolov nachádzajúcich sa vo vlašských orechoch je β-sitosterol, u ktorého bola taktiež popísaná schopnosť indukcie expresie génov pre GPx (13).

Schopnosť študovaného oleja z vlašských orechov zvyšovať aktivitu glutatiónpoxidázy v hyperglykemických podmienkach ho predurčuje k ďalšiemu hlbšiemu skúmaniu a potenciálnemu využitiu v klinickej praxi.

Záver

Antioxidačný význam glutatiónpoxidázy (GPx) spočíva v eliminácii organických peroxidov alebo peroxidu vodíka za súčasnej oxidácie glutatiónu. Eliminácia aktivity GPx môže zohrávať hlavnú úlohu v patogenéze cievnych komplikácií a mikroalbuminúrie pri zvýšenom oxidačnom strese vyvolanom hyperglykémiou. Vhodne zvolená liečba ako aj použitie prírodných suplementov na báze vlašských orechov môžu tieto patologické procesy eliminovať a tým zlepšiť kvalitu života diabetických pacientov.

Pod'akovanie:

Táto práca bola financovaná z prostriedkov projektu VEGA 1/0752-13 a MZ 2012/10-UKBA-10.

Literatura

- 1. Sadighi O, Makhloogh A, Shokrzadeh M, Hoorshad S.** Association between plasma selenium and glutathione peroxidase levels and severity of diabetic nephropathy in patients with type two diabetes mellitus. *Nephrourol Mon*2014; 6 (5): e21355.
- 2. Kornhauser C, Garcia-Ramirez JR, Wrobel K, Pérez-Lugue EL, Garay-Sevilla ME, Wrobel K.** Serum selenium and glutathione peroxidase concentrations in type 2 diabetes mellitus patients. *Prim Care Diabetes*2008; 2 (2): 81-85.
- 3. 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.
- 4. 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 SciNutr*2004; 55 (3): 171-178.
- 5. Celis JE.**Cell Biology: A Laboratory handbook 3th Edition (Vol. 1). London; Elsevier Academic Press, 2006: 21-25.
- 6. Hussein JS, El-Khayat Z, Morsy S, Oraby F, Singer G.**The effect of fish oil on oxidant/antioxidant status in diabetic rats through the reduction of arachidonic acid in the cell membrane. *Int J Pharm PharmSci*2014; 6 (2): 196-199.
- 7. Niedowicz DM, Daleke DL.**The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell BiochemBiophys*2005; 43 (2): 289-330.
- 8. Pasupathi P, Chandrasekar V, Kumar US.**Evaluation of oxidative stress, enzymatic and non-enzymatic antioxidants and metabolic thyroid hormone status in patients with diabetes mellitus. *Diabetes MetabSyndr* 2009; 3 (3): 160-165.
- 9. Aouacheri O, Saka S, Krim M, Messaadia A, Maldi I.**The investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 diabetes mellitus. *Can J Diabeted*(2015);39 (1): 44-49.
- 10. Kumawat M, Pahwa MB, Gahlaut VS, Singh N.** Status of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in type 2 diabetes with micro vascular complications. *Open Endocrinol J*2009; 3: 12-15.
- 11. Gillery P.** Oxidative stress and protein glycation in diabetes mellitus. *Ann BiolClin*2006; 64 (4): 309-314.
- 12. Yessoufou A, Soulaïmann N, Merzouk SA, Moutairou K, Ahissou H, Prost J et al.** N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring. *Int J Obes*2006;30 (5): 739-750.
- 13. Vivancos M, Moreno JJ.** beta-Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free RadicBiol Med*2005; 39 (1): 91-97.

ULTRAŠTRUKTÚRNA ŠTÚDIA MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK IZOLOVANÝCH Z KOSTROVÉHO SVALU S OHĽADOM NA ICH VYUŽITIE V REGENERÁCII SRDCA

(Ultrastructural study of mesenchymal stem cells derived from skeletal muscle and their potential role in the regeneration of heart)

Michal Miko¹, Ivan Varga¹, Ľuboš Danišovič², Štefan Polák¹

1 Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava 1; Slovenská rep.; e-mail: michal.miko@fmed.uniba.sk

2 Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava 1, Slovenská republika

Súhrn

V predkladanej práci sme sa zamerali na morfológickú analýzu mezenchymálnych kmeňových buniek získaných z priečne pruhovaného kostrového svalu potkana. Snažili sme sa predostrieť ich risujúci sa značný potenciál v regeneratívnej medicíne. Konkrétne sme sa v literárnom prehľade venovali terapii infarktu myokardu. Pri morfológickej analýze bunky spĺňali všetky presumované charakteristiky – išlo o bunky s mimoriadne zvýraznenou proteosyntetickou aktivitou. Charakteristické bolo veľké euchromatické jadro nepravidelného tvaru s niekoľkými hlbokými zárezmi a výraznými jadierkami zodpovedajúcimi za tvorbu rRNA. Zvlášť dobre vyvinuté cysterny drsného endoplazmatického retikula s množstvom ribozómov boli ďalším zo zistení potvrdzujúcich fakt o prebiehajúcej proteosyntéze. Veľké množstvo lyzozómov a transportných vezikul vypovedalo o živej výmene informácií a látok medzi bunkou a vonkajším prostredím. Ba čo viac, kultivované bunky vykazovali pozitivitu pri použití protilátok proti CD 34 a Sca-1 a naopak, výsledok imunofluorescencie bol negatívny pri použití anti- CD 45. Ďalej exprimovali antigény všeobecne akceptované ako myogénne markery (desmín, aktín).

Kľúčové slová

Kostrový sval, mezenchýmové kmeňové bunky, transmisná elektrónová mikroskopia, regenerácia srdca

Summary

In this paper, we tried to perform ultrastructural morphologic analysis of the cross-striated skeletal muscle-derived mesenchymal stem cells of the rat. We have tried to bring forward their assumed considerable potential for regenerative medicine. In the review part of this article, we linked these cells with the modern therapy of the myocardial infarction. During the morphological analysis, cultured, expanded and isolated cells showed all typical characteristics – we were dealing with cells with extremely highlighted proteosynthetic activity. Typical was large euchromatic nucleus of irregular shape with many deep notches

and with prominent nucleoli, responsible for production of rRNA. Presence of well developed cisterns of rough endoplasmic reticulum, together with a large number of ribosomes were another observation which informed us about ongoing proteosynthesis. Numerous lysosomes and transport vesicles had revealed a lively interaction between the cell and external environment. Moreover, given cells express CD34 and Sca-1, and were negative for CD45. They were also positive for myogenic markers, including desmin and actin.

Key words

skeletal muscle, mesenchymal stem cell, transmission electron microscopy, heart regeneration

Úvod

V priečne pruhovanom kostrovom svalu u dospelých jedincov existujú dve populácie kmeňových buniek – satelitové bunky a multipotentné mezenchýmové svalové kmeňové bunky. Satelitové bunky sú unipotentné, dávajú základ myogénnej línii buniek, ktoré zohrávajú kruciálnu úlohu pri regenerácii svalov [1, 2]. Multipotentné svalové kmeňové bunky sú, ako z názvu vyplýva, schopné tvoriť viacero rôznych buniek s rôznym osudom a funkciou, a považujú sa aj za prekursor satelitových buniek. Sú však schopné i kardiogénnej, chondrogénnej, osteogénnej, adipogénnej, neurogénnej diferenciácie, ktorá bola potvrdená ako *in vitro* tak aj *in vivo* [3, 4]. Teda, tieto bunky vykazujú obrovský potenciál, a to nie len v regeneratívnej medicíne a tkanivovom inžinierstve, ale aj v toxikologických štúdiách, ako vhodný *in vitro* model pre skríningové toxikologické vyšetrenia a pre štúdium rôznych dejov na bunkovej úrovni (5). Satelitové bunky sa po istom období eufórie ukázali ako nevhodné pre použitie v myokarde, najmä pre ich arytmogénne vlastnosti [4, 6, 7].

Pri infarkte myokardu človeka dochádza priemerne k zániku 1 miliardy kardiomyocytov. Aj preto sa pozornosť vedcov zameriava na oblasť kmeňových buniek, ktoré by za určitých okolností mohli poškodenú svalovinu osídliť a obnoviť [8]. Aj keď mikroprostredie poškodeného myokardu s vysokým obsahom cytokínov a zápalových buniek spúšťa vlastné reparačné mechanizmy, tie nestačia na regeneráciu tkaniva srdcovej svaloviny „*ad integrum*“. Jedinou možnou terapeutickou voľbou môžu byť práve kmeňové bunky získané z iných častí tela pacienta [9]. Tieto somatické kmeňové bunky sú v súčasnosti považované za najvhodnejšieho kandidáta pre klinickú aplikáciu v rámci regeneratívnej medicíny, najmä pre ich vysokú proliferáciu po autológnej transplantácii [10]. Navyše tým, že tieto bunky pochádzajú z tkanív dospelých jedincov, filozofické, sociálne, etické, politické ani náboženské dôvody nebránia ich využívaniu [11].

Nižšie skúmame možnosti mezenchýmových kmeňových buniek získaných z kostrového svalu pri terapii infarktu myokardu, resp. v procese regenerácie myokardu. Napriek ich dôležitosti pozorujeme nedostatok odborných prác zameraných na morfológický popis a sledovanie týchto buniek – čo podnietilo vznik tejto práce.

Materiál a metódy

Izolácia a kultivácia

Mezenchýmové svalové kmeňové bunky boli získané pri dodržaní sterilných podmienok z biopsie *m. femoralis* potkanov (Wistar potkan, dospelý samci, n=10). Získané tkanivo bolo natrávené a scentrifugovaná suspenzia bola prefiltrovaná cez bunkové sitko s veľkosťou pórov 70 µm (BD Falcon, USA). Po ďalších krokoch, detailne opísaných v našej predchádzajúcej práci [12, 13], boli bunky naočkované na Petriho misky a kultivované počas 21 dní, počas ktorých sme získali dostatočný počet mezenchymálnych svalových kmeňových

buniek. V momente, kedy bunky dosiahli konfluenciu boli trypsinizované a pasážované. Bunky z poslednej pasáže boli využité pri morfolologickej analýze [12].

Morfológická analýza

Hrubá morfológia *in vitro* expandovaných kmeňových buniek bola kontinuálne, na dennej báze sledovaná inverovaným mikroskopom Zeiss Axiovert 100 počas celej doby kultivácie.

Bunky náhodne vybrané na elektrónmikroskopickú analýzu boli enzymaticky natrávené, centrifugované a následne chemicky fixované. Záujemcov o detailnejší technický popis nášho postupu odkazujeme na našu predchádzajúcu prácu [14]. Takto pripravené preparáty boli vhodné na elektrónmikroskopické pozorovanie (FEI Morgagni TEM, Holandsko).

Bunky náhodne vybrané na imunohistochemickú analýzu boli fixované studeným metanolom počas 1 minúty. Po tejto dobe boli pripravené na imunofluorescenciu s použitím protilátok anti- alfa-aktínu a anti-dezmínu (Dako Glostrup, Dánsko), podľa pokynov výrobcu.

Pre fenotypickú analýzu sme použili prietokovú cytometriu. Bunky z tretej pasáže boli analyzované prietokovým cytometrom Epics ALTRA (Beckman Coulter, USA). Boli analyzované nasledovné povrchové markery: CD34, CD45 a Sca-1.

Výsledky a diskusia

V tejto štúdii boli mezenchýmové svalové kmeňové bunky získané z kostrového svalu dospelých potkanov Wistar izolované a expandované v *in vitro* podmienkach. Bunkové kultúry boli kultivované metódou opakovaného vysievania - kvôli rozdielnej schopnosti rôznych bunkových populácií adherovať na substráte [15-17]. Fibroblasty adherujú rádoovo rýchlejšie ako kmeňové bunky. Voľba tejto metódy bola tiež závislá na skutočnosti, že bunky, izolované priamo z disociovej suspenzie po fluorescenciou aktivovanom triedení buniek alebo magneticky aktivovanom triedení buniek, vykazujú zníženú regeneračnú schopnosť [18].

Kmeňové bunky začínali proliferovať v malých kolóniách. Po týždni až 10 dňoch kultivácie bunky dosiahli konfluenciu a boli pasážované kvôli prejavujúcemu sa fenoménu kontaktnej inhibície. Zaujímavosťou je absencia lag fázy. Ihneď po adhézii sa tieto kmeňové bunky začali deliť a ich počet narastal exponenciálne. Stacionárnu fázu dosiahli po 7 dňoch. Rovnako tak dosiahli podobné výsledky iní autori v prácach zameraných na správanie kmeňových buniek rôzneho pôvodu, kultivovaných *in vitro* [19-21].

Prvé izolované kmeňové bunky boli v jednej osi predĺžené, vretenovité až polygonálne, fibroblastom podobné bunky s niekoľkými výbežkami. Aj počas následnej kultivácie a pasážovania si zachovali túto tvarovú morfológiu. Elektrónogramy z transmisného elektrónového mikroskopu ukázali morfológické obrazy vystupňovanej proteosyntézy - laločnaté obrovské jadro s prevahou euchromatínu a veľkým jadierkom (Obr. 3) alebo niekoľkými jadierkami kompaktného typu a bohatým zastúpením drsného endoplazmatického retikula v cytoplazme (Obr. 2) - a aktívnej výmeny látok s vonkajším prostredím - veľké aglomerácie lyzozómov a tukových kvapôčiek spolu s početnými transportnými vezikulami (*caveolae*) nachádzajúcimi sa tesne pod plazmatickou membránou (Obr. 1). Na bunkách sa dalo pozorovať rôzne množstvo mikroklkov a drobných filopódií, ktoré boli zodpovedné za priľnutie bunky k substrátu (*in vitro*) (Obr. 4).

Výsledky získané z imunohistochemickej analýzy vypovedajú o produkcii alfa-aktínu a dezmínu v týchto bunkách. Pozitivita na tieto antigény potvrdzuje schopnosť mezenchymálnych svalových kmeňových buniek založiť myogénnu bunkovú líniu [22].

Prietoková cytometria ukázala, že vyizolované a pasážované kmeňové bunky exprimujú CD 34 a Sca-1, naopak, sú negatívne na CD 45. Tento výsledok zvyšuje istotu, že sme pracovali s mezenchymálnymi kmeňovými bunkami [23] pôvodom z priečne pruhovaného svalu [24], i keď by bol vhodný skrining i ďalších povrchových markerov.

Regenerácia myokardu

Ideálnym výsledkom regeneratívnej kardiológie by bolo dosiahnutie osídlenia chronicky poškodenej srdcovej svaloviny somatickými kmeňovými bunkami, ich transformácia na funkčné kardiomyocyty, lokálna regenerácia poškodených tkanív a opätovné vytvorenie elektrofyziológicky plnohodnotného srdca [25, 26].

Pre dosiahnutie tohto cieľa sa v recentnej literatúre extenzívne skúmajú možnosti kmeňových buniek, získaných z priečne pruhovaného svalu [27], ale i iné somatické kmeňové bunky, získané napr. z kostnej drene [28-31] alebo priamo zo srdca [31-34].

Avšak, funkčné zlepšenia pozorované v takmer všetkých prípadoch boli krátkodobé a klinické štúdie ukázali, že z dlhodobého hľadiska neexistujú žiadne relevantné rozdiely medzi infarktom myokardu s transplantovanými kmeňovými bunkami a infarktom bez týchto buniek [35]. Stále teda platí, že vzhľadom na skromné úspechy a dosiaľ neuspokojivú efektívnosť regeneratívnej terapie infarktu myokardu v praxi [36], je pre úspech nutný nejaký bezprecedentný a koncepčne nový prístup, ktorý vyberie optimálnu bunkovú líniu, ktorej vhodná batéria vlastností by zvýšila magnitúdu a kvalitu myokardiálnej reštitúcie [31, 37]. Z nášho pohľadu by do množiny možných kandidátov mali isto byť zaradené (a aj sú) i mezenchymálne kmeňové bunky z priečne pruhovaného svalu, nakoľko v predkladanej preliminárnej práci tieto bunky splnili všetky morfológické podmienky na ne kladené. Čo viac, nedávne štúdie [38-40] naznačujú, že kmeňové bunky z kostrovej svaloviny majú schopnosť kardiogénnej diferenciácie *in vitro* a *in vivo*. Ich obrovský význam v parakrinnej signalizácii pomáhajúcej sebaobnove myokardu inou cestou je takisto nepopierateľný [41, 42]. Tieto bunky, po vyriešení problémov s aplikáciou buniek do postihnutého myokardu, čo vyriešia zrejme metódy tkanivového inžinierstva [43, 44], môžu zohrávať kľúčovú úlohu pri prekonávaní aktuálnych nelichotivých výsledkov a v budúcnosti zvýšiť účinnosť terapie srdcového zlyhania [17, 45].

Podakovanie

Vedecká práca bola podporená grantom APVV-0434-12 „Morfologická charakteristika zmien pri reparačných a regeneračných mechanizmoch v myokarde pri chronických chorobách“.

Literatúra

1. **Danisovic L, Polak S, Vojtassak J.** Adult stem cells derived from skeletal muscle - biology and potential. *Centr Europ J Biol.* 2013; 8(3):215-25.
2. **Relaix F, Marcelle C.** Muscle stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Dec;21(6):748-53.
3. **Bueno DF, Kerkis I, Costa AM, et al.** New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients. *Tissue Eng. Part. A.* 2009; 15:427-35.
4. **Oshima H, Payne TR, Urish KL, Sakai T, Ling Y, Gharaibeh B, Tobita K, Keller BB, Cummins JH, Huard J.** Differential myocardial infarct repair with muscle stem cells compared to myoblasts. *Mol Ther.* 2005 Dec; 12(6):1130-41.
5. **Kelc R, Trapecar M, Vogrin M, Cencic A.** Skeletal muscle-derived cell cultures as potent models in regenerative medicine research. *Muscle Nerve.* 2013; 47(4):477-82.
6. **Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA.** The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation.* 2008 Mar 4; 117(9):1189-200.
7. **Duckers HJ, Houtgraaf J, Hehrlein C, Schofer J, Waltenberger J, Gershlick A, Bartunek J, Nienaber C, Macaya C, Peters N, Smits P, Siminiak T, van Mieghem W, Legrand V, Serruys PW.** Final results of a phase IIa, randomised, open-label trial to

evaluate the percutaneous intramyocardial transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients: the SEISMIC trial. *EuroIntervention*. 2011 Feb; 6(7):805-12.

8. Ding Z, Burghoff S, Buchheiser A, et al. Survival, integration and differentiation of unrestricted somatic stem cells (USSCs) in the heart. *Cell Transplant*. 2012 Apr 17.

9. Buccini S, Haider KH, Ahmed RP, et al. Cardiac progenitors derived from reprogrammed mesenchymal stem cells contribute to angiomyogenic repair of the infarcted heart. *Basic Res Cardiol*. 2012; 107(6): 301.

10. Behfar A, Terzic A. Mesenchymal stem cells: engineering regeneration. *Clin Transl Sci*. 2008; 1(1): 34-35.

11. Leri A, Hosoda T, Kajstura J, et al.: Heart failure and regenerative cardiology. *Regenerative Med* 2006; 1: 153-159.

12. Miko M, Varga I, Kuniaková M. Biological and morphological characterization of rat muscle-derived stem cells. In: Danisovic L (ed.). *Biomedicínsky výskum III*. Bratislava: Mamma Femenina; 2015: 32-37.

13. Miko M, Danišovič E, Varga I. Špecifická histologickej metódy prípravy bunkových kultúr mezenchymových kmeňových buniek na pozorovanie transmisným elektrónovým mikroskopom – naše vlastné skúsenosti. In Kovalská M, Furjelová M, Adamkov M. *Nové trendy a perspektívy v histológii II* (e-pub.). Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine Ústav histológie a embryológie; 2015: 46-52.

14. Miko M, Danisovic L, Majidi A, Varga I. Ultrastructural analysis of different human mesenchymal stem cells after in vitro expansion: a technical review. *Eur J Histochem*. 2015; 59:2528

15. Lu SH, Wei CF, Yang AH, et al. Isolation and characterization of human muscle-derived cells. *Urology*. 2009; 74(2):440–45.

16. Gharaibeh B, Lu A, Tebbets J, Zheng B, Feduska J, Crisan M, Péault B, Cummins J, Huard J. Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique. *Nat Protoc*. 2008; 3(9):1501-9.

17. Hassan N, Tchao J, Tobita K. Concise review: skeletal muscle stem cells and cardiac lineage: potential for heart repair. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Feb;3(2):183-93.

18. Cao B, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Cell Cycle*. 2004; 3(2):104-7.

19. Okumachi, E, Lee, S.Y., Niikura, T., et al. Comparative analysis of rat mesenchymal stem cells derived from slow and fast skeletal muscle in vitro. *Int Orthop*. 2015; 39(3):569-76.

20. Miao Z, Jin J, Chen L, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*, 2006; 30(9):681–687.

21. You Q, Tong X, Guan Y, et al. The biological characteristics of human third trimester amniotic fluid stem cells. *J Int Med Res*, 2009; 37(1):105–112.

22. Collins CA, Gnocchi VF, White RB, et al. Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *PLoS One*. 2009; 4:1-13.

23. Holmes C, Stanford WL. Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *Stem Cells*. 2007 Jun;25(6):1339-47.

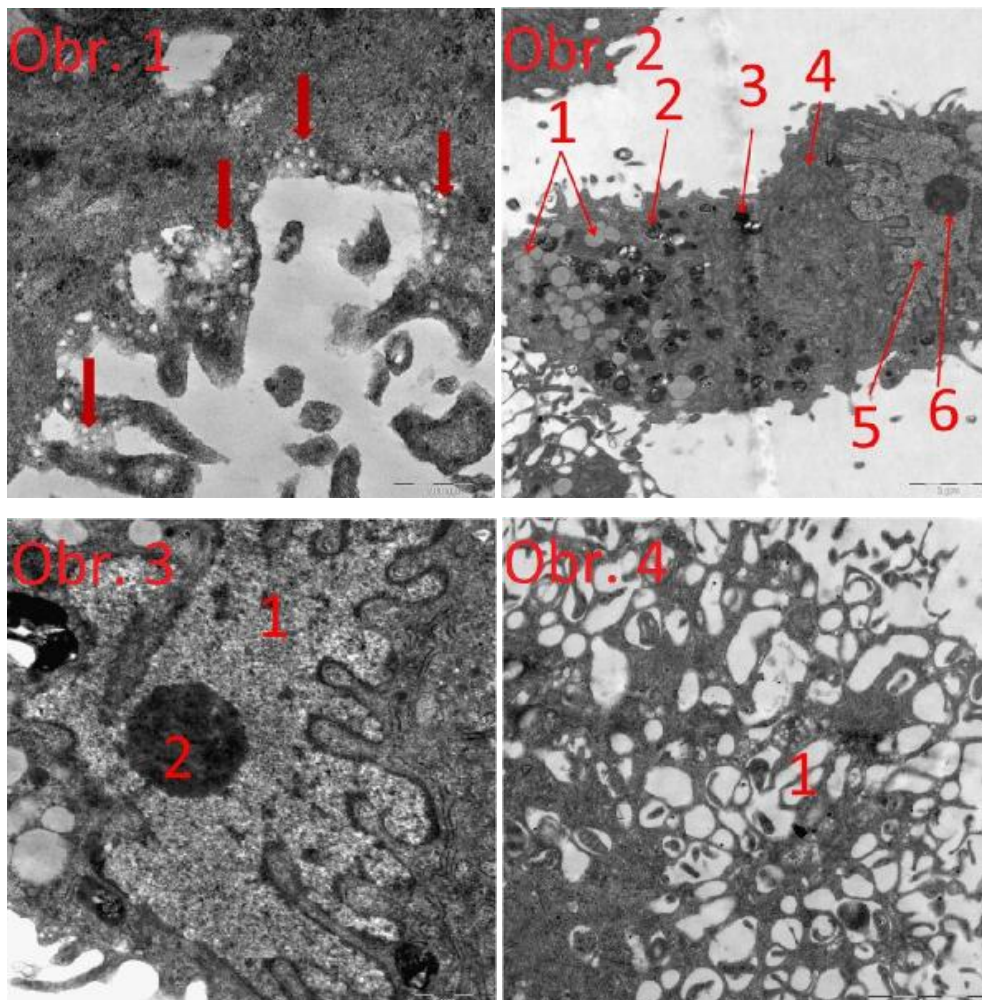
24. Carvalho KA, Oliveira L, Malvezzi M, Simeoni RB, Francisco JC, Olandoski M, Guarita-Souza LC. Immunophenotypic expression by flow cytometric analysis of cocultured skeletal muscle and bone marrow mesenchymal stem cells for therapy into myocardium. *Transplant Proc*. 2008 Apr;40(3):842-4.

25. Mullenix PS, Huddleston SJ, Stojadinovic A, et al. A new heart: somatic stem cells and myocardial regeneration. *J Surg Oncol*. 2012; 105(5): 475-480.

26. **Leri A, Kajstura J, Anversa P.** Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005; 85: 1373–1416.
27. **Kim J, Braun T.** Skeletal muscle stem cells for muscle regeneration. *Methods Mol Biol.* 2014;1213:245-53.
28. **Malecki M, Sabo C, Putzer E, Stampe C, Foorohar A, Quach C, Beauchaine M, Tombokan X, Anderson M.** Recruitment and retention of human autologous CD34+ CD117+ CD133+ bone marrow stem cells to infarcted myocardium followed by directed vasculogenesis: Novel strategy for cardiac regeneration. *Mol Cell Ther.* 2013 Dec 13;1.
29. **Igura K, Okada M, Kim HW, Ashraf M.** Identification of small juvenile stem cells in aged bone marrow and their therapeutic potential for repair of the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Nov 1;305(9):H1354-62.
30. **Sreejit P, Verma RS.** Natural ECM as biomaterial for scaffold based cardiac regeneration using adult bone marrow derived stem cells. *Stem Cell Rev.* 2013 Apr;9(2):158-71.
31. **Dixit P, Katare R.** Challenges in identifying the best source of stem cells for cardiac regeneration therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Mar 13;6:26.
32. **Gouadon E, Moore-Morris T, Smit NW, Chatenoud L, Coronel R, Harding SE, Jourdon P, Lambert V, Rucker-Martin C, Puc  at M.** Concise Review: Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Cells, A Promising Cell Source for Therapy of Heart Failure: Where Do We Stand? *Stem Cells.* 2015 Sep 9. doi: 10.1002/stem.2205. [Epub ahead of print]
33. **Nadal-Ginard B, Ellison GM, Torella D.** The cardiac stem cell compartment is indispensable for myocardial cell homeostasis, repair and regeneration in the adult. *Stem Cell Res.* 2014 Nov;13(3 Pt B):615-30.
34. **Hosoda T, Kajstura J, Leri A, et al.:** Mechanisms of myocardial regeneration. *Circ J* 2010; 74: 13–27.
35. **Burlacu A.** Tracking the mesenchymal stem cell fate after transplantation into the infarcted myocardium. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013 Jul;8(4):284-91.
36. **Russo V, Young S, Hamilton A, Amsden BG, Flynn LE.** Mesenchymal stem cell delivery strategies to promote cardiac regeneration following ischemic injury. *Biomaterials.* 2014 Apr;35(13):3956-74.
37. **Quijada P, Sussman MA.** Making it stick: chasing the optimal stem cells for cardiac regeneration. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2014 Nov;12(11):1275-88.
38. **Tamaki T, Uchiyama Y, Okada Y, Tono K, Masuda M, Nitta M, Hoshi A, Akatsuka A.** Clonal differentiation of skeletal muscle-derived CD34(-)/45(-) stem cells into cardiomyocytes in vivo. *Stem Cells Dev.* 2010 Apr; 19(4):503-12.
39. **Invernici G, Cristini S, Madeddu P, Brock S, Spillmann F, Bernasconi P, Cappelletti C, Calatozzolo C, Fascio U, Bisleri G, Muneretto C, Alessandri G, Parati EA.** Human adult skeletal muscle stem cells differentiate into cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Cell Res.* 2008;314:366–376.
40. **Arsic N, Mamaeva D, Lamb NJ, Fernandez A.** Muscle-derived stem cells isolated as non-adherent population give rise to cardiac, skeletal muscle and neural lineages. *Exp Cell Res.* 2008;314:1266–1280.
41. **Perez-Ilzarbe M, Agbulut O, Pelacho B, Ciorba C, San Jose-Eneriz E, Desnos M, Hag  ge AA, Aranda P, Andreu EJ, Menasch   P, Pr  sper F.** Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium. *Eur J Heart Fail.* 2008 Nov; 10(11):1065-72.
42. **Gharaibeh B, Lavasani M, Cummins JH, Huard J.** Terminal differentiation is not a major determinant for the success of stem cell therapy - cross-talk between muscle-derived stem cells and host cells. *Stem Cell Res Ther.* 2011 Jul 8; 2(4):31.

- 43. Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didié M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T.** Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med.* 2006 Apr; 12(4):452-8.
- 44. Fujimoto KL, Clause KC, Liu LJ, Tinney JP, Verma S, Wagner WR, Keller BB, Tobita K.** Engineered fetal cardiac graft preserves its cardiomyocyte proliferation within postinfarcted myocardium and sustains cardiac function. *Tissue Eng Part A.* 2011 Mar; 17(5-6):585-96.
- 45. Okada M, Payne TR, Drowley L, Jankowski RJ, Momoi N, Beckman S, Chen WC, Keller BB, Tobita K, Huard J.** Human skeletal muscle cells with a slow adhesion rate after isolation and an enhanced stress resistance improve function of ischemic hearts. *Mol Ther.* 2012 Jan; 20(1):138-45.

Obrazová príloha



Obr. 1: Originálne zväčšenie 36.000x – detail na transportné kaveoly (šípky) v kmeňových bunkách.

Obr. 2: Originálne zväčšenie 7.100x – prehľadný obrázok celej kmeňovej bunky. V cytoplazme vidieť lipidové kvapôčky (1), ako aj zrníčka glykogénu (2) a lyzozómy (3). Hojný je aj výskyt cisterien drsného endoplazmatického retikula v cytoplazme (4). Jadro (5), jadierko (6).

Obr. 3: Originálne zväčšenie 18.000x – detail na euchromatické jadro s početnými záhybmi (1) a nápadným jadierkom (2).

Obr. 4: Originálne zväčšenie 11.000x – filopódie slúžiace k uchyteniu na podklad Petriho misky (1)

ZÁPALOVÉ OCHORENIE ČREVA A OXIDAČNÝ STRES

(Inflammatory bowel disease and oxidative stress)

Jana Muchová¹, Marián Koláček¹, Monika Dvořáková¹, Zuzana Paduchová¹, Ingrid Žitňanová¹, Iveta Čierna², Zuzana Országhová¹, Dagmar Székelyová², László Kovács², Zdeňka Ďuračková¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava; jana.muchova@fmed.uniba.sk

²2. detská klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Detskej fakultnej nemocnice s poliklinikou, Limbová 1, 833 40 Bratislava;

Súhrn

Crohnova choroba je chronické zápalové ochorenie čreva s nejasnou etiológiou. Medzi faktory, ktoré zohrávajú úlohu v patogenéze ochorenia patrí aj oxidačný stres. Do štúdie bolo zaradených 69 detí s diagnózou Crohnova choroba, 34 detí s diagnózou ulcerózna kolitída a 17 zdravých kontrol. Pacienti s Crohnovou chorobou mali oproti kontrolám nižšiu aktivitu superoxiddismutázy, glutatiónperoxidázy a paraoxonázy 1, zvýšenú aktivitu katalázy, zníženú celkovú antioxidačnú schopnosť a zvýšené oxidačné poškodenie DNA. Pacienti s ulceróznou kolitídou mali oproti kontrolám zníženú aktivitu superoxiddismutázy, zvýšenú aktivitu katalázy a zvýšené oxidačné poškodenie DNA. V skupine pacientov s Crohnovou chorobou sme pozorovali rozdiely v redoxnom statuse v závislosti od zápalu. Kalprotektín dobre odzrkadľoval zápal – bol zvýšený ako u pacientov s Crohnovou chorobou, tak aj s ulceróznou kolitídou. Je to vhodný marker zápalu pre klinickú prax.

Kľúčové slová

Crohnova choroba, ulcerózna kolitída, oxidačný stres, zápal, kalprotektín

Summary

Crohn disease is chronic inflammatory disease with unclear etiology. Factors that play a role in the pathogenesis of the disease include the oxidative stress. The study included 69 children with diagnose Crohn disease, 34 children with diagnose ulcerative colitis and 17 healthy controls. Patients with Crohn's disease compared to control had lower activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and paraoxonase 1, increased catalase activity, decreased total antioxidant capacity and increased oxidative DNA damage. Patients with ulcerative colitis compared to control had reduced activity of superoxide dismutase, increased activity of catalase and increased oxidative DNA damage. In the group of patients with Crohn disease we observed differences in the redox status depending on the inflammation. Calprotectin well reflected inflammation - was elevated as Crohn's disease as well as ulcerative colitis and correlated with CRP and Paediatric Crohn's Disease Activity Index. It is a good marker of inflammation for clinical practice.

Key words

Crohn disease, ulcerative colitis, oxidative stress, inflammation, calprotectin

Úvod

Zápalové ochorenie čreva (IBD) je nešpecifické chronické zápalové ochorenie. Najznámejšími formami IBD sú Crohnova choroba (CC) a ulcerózna kolitída (UK). Príčina vzniku IBD nie je úplne objasnená. V úvahu pripadá viacero faktorov: genetické, imunologické, a environmentálne. Symptómy ochorenia zahŕňujú abdominálnu bolesť, hnačku, stratu hmotnosti, zakrpatený rast detí, anorexiu, krv v stolici a horúčku.

Vo viacerých štúdiách sa pozorovala štatisticky významná korelácia medzi závažnosťou symptómov CC a markermi oxidačného stresu. Aktivita ochorenia napr. koreluje s celkovou antioxidantnou schopnosťou a s lipoperoxidáciou. Rôzne oxidovadlá, ako napr. H_2O_2 dokážu indukovať klinické, aj histologické prejavy CC. Reaktívne metabolity kyslíka (RMO) dokážu dezintegrovat' črevný epitel a zvyšovať permeabilitu sliznice črevnej steny (1). Dokonca aj pacienti v kludovej fáze CC, ako aj 40 % ich príbuzných v prvom stupni, má zvýšenú permeabilitu čreva bez prítomnosti akútneho zápalu. To znamená, že oxidačný stres predchádza zápalu a vylučuje možnosť, že by reaktívne metabolity boli len vedľajšími produktmi zápalových procesov. Oxidačný stres pravdepodobne zohráva úlohu v patogenéze IBD. Môže byť manifestovaný poškodením lipidov, proteínov a DNA. Niektoré produkty oxidačného poškodenia považujeme za markery OS.

Aktívna IBD je charakteristická perzistentnou infiltráciou neutrofilov do postihnutej oblasti čreva a zvýšenou aktivitou cyklooxygenázy. Fagocytujúce bunky izolované z čreva pacientov s IBD (ako CC, tak aj UK) vo zvýšenej miere produkujú RMO. U pacientov s IBD sa pozoruje zníženie hladiny vitamínu C a E v krvi a nízka aktivita antioxidantných enzýmov Cu/Zn-SOD a katalázy ako aj znížená hladina beta-karoténu v čreve (2). Zvýšenie OS sa pozoruje nie len v aktívnej fáze ochorenia, ale aj v remisii (3, 4).

Číselné hodnotenie stavu a aktivity ochorenia CC (nie UK) u detí vyjadruje PCDAI (Paediatric Crohn's Disease Activity Index - pediatrický index aktivity Crohnovej choroby). PCDAI existuje v tzv. plnej a skrátenej forme (5, 6, 7). Skóre skrátenej formy PCDAI ≤ 10 predstavuje neaktívne štádium ochorenia, hodnoty ≥ 30 predstavujú závažné štádium ochorenia.

Cieľom práce bolo zistiť vzťah medzi zápalom a OS a priebehom ochorenia u pacientov s IBD v remisii a zistiť či sú rozdiely vo vzťahu medzi OS a zápalom u jednotlivých foriem - CC a UK. Tiež sme zisťovali vhodnosť použitia nového markera zápalu (kalprotektín) v diagnostike IBD.

Materiál a metódy

Pacienti: Do štúdie sme zaradili 103 detských pacientov: 69 detí s diagnózou CC a 34 s diagnózou UK. Kontrolnú skupinu tvorilo 17 zdravých detí. Do projektu sa zaradili pacienti s diagnostikovanou CC a UK v štádiu remisie s udržiavacou terapiou imunosupresorom Imuranom (azatioprín [6-(1-metyl-4-nitroimidazol-2-yl)-purín]) alebo tiež pacienti, ktorí nevyžadovali udržiavaciu liečbu Imuranom. Štúdia bola schválená Etickou komisiou Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave.

Stanovenie biochemických parametrov: koncentrácia základných biochemických parametrov sa stanovila na automatickom analyzátore COBAS Integra 800 (Roche, Švajčiarsko) s použitím diagnostických setov od firmy Roche (Švajčiarsko). Koncentrácia vysoko citlivého CRP sa stanovila v sére imunochemickým analyzátorom Vistor 5.1 Fusion Vitroc 5600 (Assist Company, Slovensko).

Stanovenie aktivity antioxidantných enzýmov: Na stanovenie aktivity Cu/Zn-superoxiddismutázy sa použil set č. 19160 od firmy Fluka. Aktivitu SOD sme vyjadrili v U/mg hemoglobínu. Aktivita katalázy sa stanovila podľa metódy Bergmeyer (8) a vyjadrila v $\mu\text{kat/mg}$ hemoglobínu. Na stanovenie aktivity glutatiónpoxidázy sa použil set č. CGP1 od firmy Sigma-Aldrich. Aktivitu GPX sme vyjadrili v U/g hemoglobínu. Hemoglobín sme

stanovili Drabkinovou metódou a množstvo hemoglobínu sme vyjadrili v g/l. Celkový antioxidačný stav sme stanovili podľa Re a kol. (9) a vyjadrili v mmol Troloxu/l.

Stanovenie markerov oxidačného poškodenia: lipoperoxidy v sére sa stanovili podľa El-Saadani a kol.(10). Koncentráciu lipoperoxidov sme vyjadrili v nmol/ml. Produkty pokročilej oxidácie proteínov sme stanovili spektrofotometricky a vyjadrili v $\mu\text{mol/l}$.

Stanovenie kalprotektínu: Na extrakciu a stanovenie kalprotektínu sme použili set č. CAL0100 (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Nemecko). Koncentráciu kalprotektínu sme vyjadrili v $\mu\text{g/g}$ stolice.

Štatistická analýza: na štatistické spracovanie údajov sme použili program StatsDirect® v.2.3.7. (StatsDirect Sales, Sale, Veľká Británia). Normálne rozdelenie dát sme overovali použitím Shapiro – Wilkovho testu. Normálne rozdelené dáta sme vyjadrili ako priemer $\pm$ SD a dáta, ktoré vykazovali odchýlku od normality sme vyjadrili ako medián s interkvartilovým rozpätím (1. a 3. kvartil). Štatistickú významnosť dát s normálnym rozdelením sme overovali Studentovým t-testom. Na ostatné dáta sme použili Mann–Witneyho test. Na overenie rozdielov v skóre PCDAI v rôznom čase sme použili neparametrický Friedmanov test a potvrdili permutačným testom. Pre štúdiu sme počítali s hladinou štatistickej významnosti $p \leq 0,05$.

Výsledky

Základné charakteristiky súboru pacientov sú uvedené v Tab. 1.

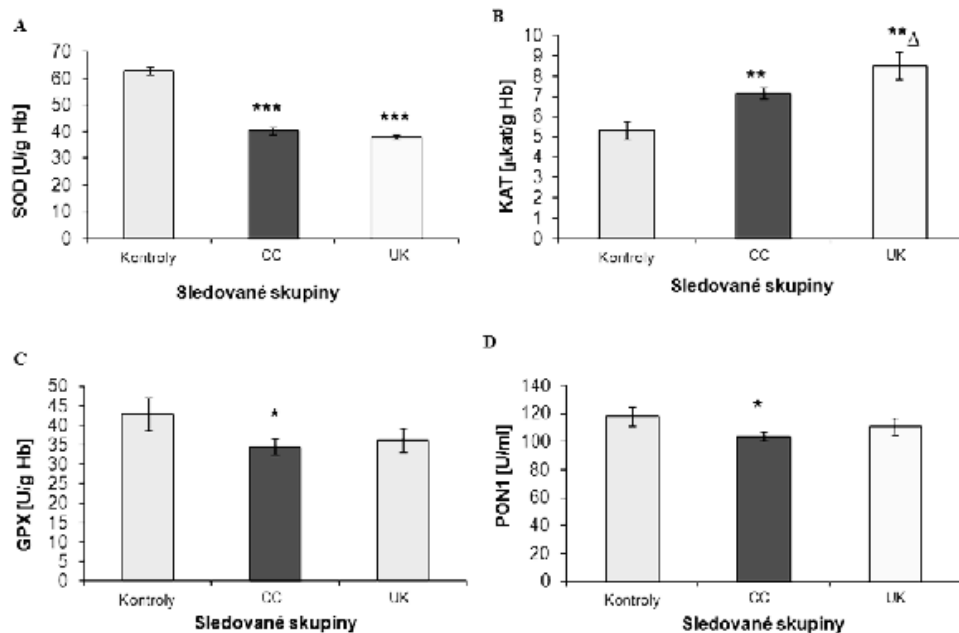
Parameter	Fyziologické hodnoty	Kontroly (K)	CC	UK
Vek	–	14,07 (12-18)	14,56 (9-19)	15,40 (3-19)
M : F	–	6 : 9	37 : 32	16 : 17
PCDAI	≤ 10	–	$8,37 \pm 6,35$	–
CRP [mg/l]	0 - 10	$1,21 \pm 1,15$	$10,83 \pm 13,26^o$	$1,72 \pm 2,85^{\Delta\Delta\Delta}$
DAO [U/ml]	≥ 10	$9,61 \pm 2,82$	$8,98 \pm 3,67^*$	$14,74 \pm 11,57$
Fekálny kalprotektín [$\mu\text{g/g}$]	0 - 50	19,05 (0,00 - 23,77)	756,97*** (242,08 - 1226,62)	247,81*** $^{\Delta}$ (57,54 - 804,23)

Tab. 1 Základná charakteristika sledovaného súboru pacientov

Všetky hodnoty sú vyjadrené ako priemer $\pm$ SD okrem kalprotektínu, ktorý je vyjadrený ako medián s IQ rozpätím (Q1-Q3; 25-75%), BMI – index telesnej hmotnosti, CRP – vysoko citlivý C-reaktívny proteín, F – ženy, M – muži, PCDAI – pediatrický index aktivity Crohnovej choroby, *** – $p < 0,001$ CC/UK vs. kontroly ; Δ – $p < 0,05$ CC vs. UK, $\Delta\Delta\Delta$ – $p < 0,001$ CC vs. UK; o – $p = 0,060$ CC vs. kontroly; * – $p = 0,076$ CC vs. kontroly; n pre CC = 69, n pre UK = 34, n pre Kontroly = 17.

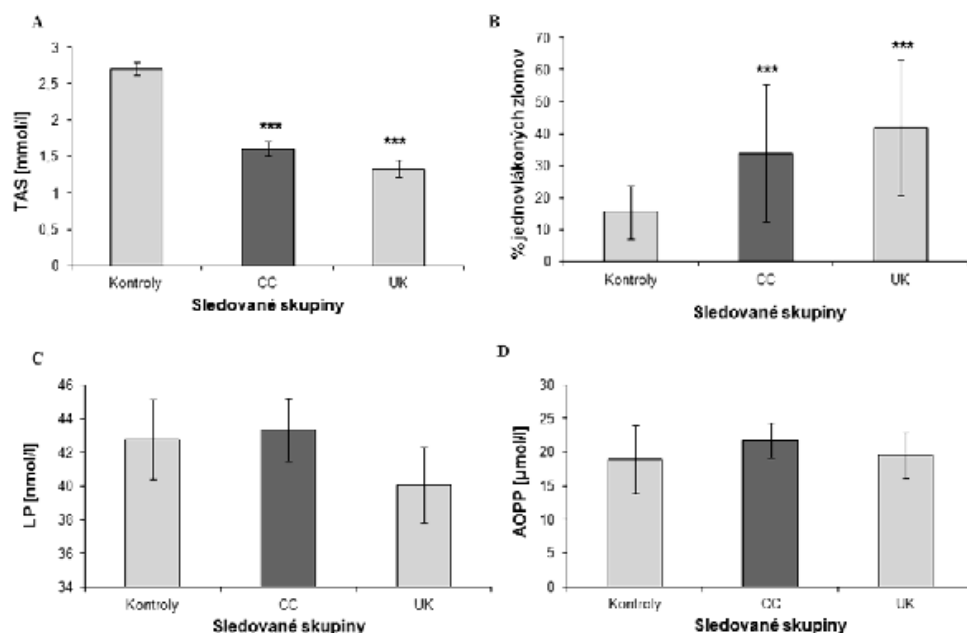
Zaznamenali sme signifikantne vyššiu hladinu kalprotektínu u CC aj UK oproti kontrolám a zároveň sme pozorovali, že kalprotektín je u CC signifikantne vyšší ako pri UK. Na hranici štatistickej významnosti sme pozorovali zvýšenú hladinu vysoko citlivého C-reaktívneho proteínu u CC oproti kontrolám (Tab. 1).

U oboch zápalových ochorení čreva sme pozorovali oproti kontrolám významné zníženie aktivity SOD (Obr. 1A) a významné zvýšenie aktivity KAT. Zároveň u UK bola aktivita KAT významne vyššia ako u CC (Obr. 1B). U CC sme pozorovali signifikantné zníženie aktivity GPX (Obr. 1C) a arylesterázovej aktivity paraoxonázy (Obr. 1D). Pozorovali sme významne zníženie celkovej antioxidačnej schopnosti krvného séra (Obr. 2A) a významne zvýšené percento jednovláknových zlomov DNA v lymfocytoch u oboch typov zápalového ochorenia



Obr. 1 Aktivity antioxidantných enzýmov.

CC – Crohnova choroba, GPX – glutatiónpoxidáza, KAT – kataláza, Hb – hemoglobín, PON1 – arylesterázová aktivita paraoxonázy, SOD – Cu/Zn-superoxiddismutáza, UK – ulcerózna kolitída, * – $p < 0,05$ CC/UK vs. kontrola, ** – $p < 0,01$ CC/UK vs. kontrola, *** – $p < 0,001$ CC/UK vs. kontrola, Δ – $p < 0,05$ CC vs. UK, n pre CC = 69, n pre UK = 34, n pre Kontrola = 17.



Obr. 2 Ostatné markery oxidačného stresu.

AOPP – produkty pokročilej oxidácie proteínov, LP – lipoperoxidy, TAS – celková antioxidantná schopnosť, CC – Crohnova choroba, UK – ulcerózna kolitída, *** – $p < 0,001$ CC/UK vs. kontrola, n pre CC = 69, n pre UK = 34, n pre Kontrola = 17.

čreva (Obr. 2B). U hladín markerov oxidačného poškodenia – lipoperoxidov a produktov pokročilej oxidácie proteínov sme nezaznamenali významný rozdiel oproti kontrolám (Obr. 2C,D).

Diskusia

V rámci tejto štúdie sme stanovili nový progresívny marker zápalových ochorení – fekálny kalprotektín a markery antioxidačného statusu a oxidačného stresu u detí s Crohnovou chorobou a ulceróznou kolitídou. Pozorovali sme nerovnováhu v aktivitách antioxidačných enzýmov a zvýšené oxidačné poškodenie DNA.

Kalprotektín je proteín produkovaný neutrofilmi. Zvýšené koncentrácie Kalp v stolici boli detegované u pacientov s kolorektálnym karcinómom, zápalovým ochorením čreva a bakteriálnou infekciou v GIT. U pacientov s CC (u detí aj u dospelých) sa pozorovalo významné zvýšenie koncentrácie fekálneho kalprotektínu v porovnaní so zdravými jedincami (11). Kalprotektín patrí medzi nové progresívne markery zápalových ochorení. Jeho hladina v stolici dobre odráža úroveň zápalu, nakoľko koreluje s CRP ako u Crohnovej choroby, tak aj u ulceróznej kolitídy. Zároveň koreluje s CRP aj v rámci zápalového ochorenia ako celku (CC + UK)(12). Naše výsledky potvrdzujú doterajšie zistenia a predpoklady využitia kalprotektínu ako neinvazívneho klinického markera aktivity ochorenia (13, 14, 15) nie len v aktívnej fáze ochorenia, ale aj v jeho remisii.

Oxidačný stres je jeden z hlavných faktorov patogenézy zápalového ochorenia čreva. Predpokladá sa, že mechanizmus pôsobenia oxidačného stresu v patogenéze CC a UK je rozdielny (16, 17, 18), o čom svedčia aj naše výsledky. Pozorovali sme zníženie aktivity SOD a TAS u pacientov s CC a UK a oproti kontrolám, kým aktivita GPX a PON1 boli významne znížené len u pacientov s CC. Na druhej strane aktivita KAT je významne zvýšená u oboch ochorení. Štatisticky významný rozdiel pozorujeme aj medzi CC a UK. Zníženú celkovú antioxidačnú schopnosť séra u pacientov s CC aj UK pozorovali aj Koutrobakis a kol. (19). Na druhej strane z markerov oxidačného poškodenia bolo významne zvýšené len oxidačné poškodenie DNA, kým hladina LP a AOPP nebola zmenená.

Predpokladá sa, že OS príčinne súvisí so zápalovými procesmi ochorení a nie je iba ich následkom (1). I keď boli všetci pacienti zaradení do štúdie v štádiu remisie ochorenia (podľa PCDAI), signifikantne zvýšené hladiny CRP a fekálneho kalprotektínu naznačujú pretrvávajúce zápalové procesy. To je v súlade s pozorovaním, že pacienti v aktívnej fáze ochorenia majú zvýšenú hladinu LP, kým pacienti v remisii majú tieto parametre porovnateľné so zdravými kontrolami (19, 20). V prípade aktivít antioxidačných enzýmov v erytrocytoch nie sú údaje z literatúry jednoznačné. V aktívnej fáze CC pozorovali Krzystek-Korpacka a kol. (21) zníženie aktivity KAT a GPX, avšak expresia SOD bola zvýšená. Aktivita KAT a GPX boli nepriamo úmerné aktivite ochorenia. Anémia spôsobila redukciu aktivity KAT. Phylactos a kol. (22) pozorovali zníženie aktivít SOD a GPX. Na rozdiel od nich, iní autori (23, 24) pozorovali zvýšenie aktivity GPX u pacientov s CC. Aktivita antioxidačných enzýmov nemôžu byť interpretované nezávisle od stanovenia markerov oxidačného poškodenia organizmu. My sme pozorovali zníženie vnútrobunkovej antioxidačnej ochrany prostredníctvom zníženej aktivity SOD a GPX. Negatívna korelácia medzi SOD resp. TAS a Kalp, ako aj medzi GPX resp. TAS a PCDAI potvrdzuje kauzálnu účasť OS nie iba v akútnej fáze ochorenia, ale aj v štádiu remisie ochorenia (12). Ďalší autori pozorovali pozitívne korelácie medzi aktivitou ochorenia a lipoperoxidáciou (19).

Štúdií zameraných na zápalové ochorenie čreva v remisii sa doteraz nerealizovalo veľa. Väčšinou sa realizovali štúdie porovnávajúce pacientov v aktívnej fáze ochorenia s kontrolami a menej porovnávajúce aktívnu fázu ochorenia s fázou remisie.

Záver

Crohnova choroba ako aj uclerózna kolitída v remisii sú spojené so zvýšeným oxidačným stresom, pričom mechanizmus pôsobenia oxidačného stresu v patogenéze Crohnovej choroby a ulceróznej kolitídy je rozdielny. U pacientov s Crohnovou chorobou zmeny redoxného statusu súvisia so zápalom, pričom vhodná doplnková „antioxidačná terapia“ by mohla zmierniť prejavy ochorenia. Kalprotektín je vhodný marker zápalového procesu a aktivity Crohnovej choroby a ulceróznej kolitídy. Stanovenie fekálneho kalprotektínu u pacientov so zápalovým ochorením čreva by bolo vhodné zaviesť do rutínnej klinickej praxe.

Pod'akovanie

Štúdiu finančne podporili: MZ SR 2007/16-UK-01, MŠ SR VEGA 1/4310/07 a VEGA 1/0224/08 a Rozum a zdravie, občianske združenie.

Literatúra

- 1. Rezaie A, Ghorbani F, Eshgortk A, Zamani MJ, Dehghan G, Taghavi B, Nikfar S, Mohammadirad A, Daryani NE, Abdollahi M.** Alterations in salivary antioxidants, nitric oxide, and transforming growth factor-beta 1 in relation to disease activity in Crohn's disease patients. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1091: 110-122
- 2. Alzoghaili MA.** Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2013 19: 6540-6547
- 3. Beltrán B, Nos P, Dasí F, Iborra M, Bastida G, Martínez M, O'Connor JE, Sáez G, Moret I, Ponce J.** Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of native and treated Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 76-86
- 4. Iborra M, Moret I, Rausell F, Bastida G, Aguas M, Cerrillo E, Nos P, Beltrán B.** Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochem Soc Trans* 2011; 39: 1102-1106
- 5. Yoshida EM.** The Crohn's Disease Activity Index, its derivatives and the Inflammatory Bowel Disease Questionnaire: a review of instruments to assess Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 1999; 13: 65-73
- 6. Hyams J, Markowitz J, Otley A, Rosh J, Mack D, Bousvaros A, Kugathasan S, Pfefferkorn M, Tolia V, Evans J, Treem W, Wyllie R, Rothbaum R, del Rosario J, Katz A, Mezzoff A, Oliva-Hemker M, Lerer T, Griffiths A.** Pediatric Inflammatory Bowel Disease Collaborative Research Group. Evaluation of the pediatric Crohn's disease activity index: a prospective multicenter experience. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005; 41: 416-421
- 7. Kappelman MD, Crandall WV, Colletti RB, Goudie A, Leibowitz IH, Duffy L, Milov DE, Kim SC, Schoen BT, Patel AS, Grunow J, Larry E, Fairbrother G, Margolis P.** A short pediatric Crohn's disease activity index for quality improvement and observational research. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 112-117
- 8. Bergmeyer HU.** Methods of enzymatic analysis, volume III: Enzymes 1: Oxidoreductases, transferases, VCH, Weinheim, 1987; 277
- 9. 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: 1231-1237
- 10. El-Saadani M, Esterbauer H, El-Sayed M, Goher M, Nassar AY, Jurgens G.** A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J Lipid Res* 1989; 30: 627-630
- 11. Paduchová Z a Ďuračková Z.** Fecal calprotectin as a promising marker of inflammatory diseases. *Bratisl Lek Listy*. 2009; 110: 598-602

- 12. Kolářček M, Muchová J, Dvořáková M, Paduchová Z, Žitňanová I, Čierna I, Országhová Z, Székelyová D, Jajcaiová-Zedníčková N, Kovács L, Ďuračková Z.** Effect of natural polyphenols (Pycnogenol) on oxidative stress markers in children suffering from Crohn's disease – a pilot study. *Free Rad Res* 2013; 47(8): 624–634
- 13. Wagner M, Peterson CGB, Ridefelt P, Sangfelt P, Carlson M.** Fecal markers of inflammation used as surrogate markers for treatment outcome in relapsing inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5584-5589
- 14. Henderson P, Casey A, Lawrence SJ, Kennedy NA, Kingstone K, Rogers P, Gillett PM, Wilson DC.** The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 941-949
- 15. Burri E a Beglinger C.** Faecal calprotectin – a useful tool in the management of inflammatory bowel disease. *Swiss Med Wkly* 2012; 142:w13557
- 16. Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW.** Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* 2003; 201: 28-36
- 17. Biasi F, Leonarduzzi G, Oteiza PI, Poli G.** Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Targets. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19:1711-1747
- 18. Piechota-Polanczyk A a Fichna J.** Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2014 May 6. [Epub ahead of print]
- 19. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulis PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA.** Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1433-1437
- 20. Wendland BE, Aghdassi E, Tam C, Carrrier J, Steinhart AH, Wolman SL, Baron D, Allard JP.** Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2001; 74: 259-264
- 21. Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Berdowska I, Zielinski B, Paradowski L, Gamian A.** Impaired erythrocyte antioxidant defense in active inflammatory bowel disease: impact of anemia and treatment. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1467-75
- 22. Phylactos AC, Fasoula IN, Arnaud-Battandier F, Walker-Smith JA, Fell JM.** Effect of enteral nutrition on antioxidant enzyme systems and inflammation in paediatric Crohn's disease. *Acta Paediatr.* 2001; 90: 883-888
- 23. Tüzün A, Erdil A, Inal V, Aydin A, Bağcı S, Yeşilova Z, Sayal A, Karaeren N, Dağalp K.** Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Biochem* 2002; 35: 569-572
- 24. Maor I, Rainis T, Lanir A, Lavy A.** Oxidative stress, inflammation and neutrophil superoxide release in patients with Crohn's disease: distinction between active and non-active disease. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2208-2214

REGENERÁCIA PEČENE PO POŠKODENÍ S CCl₄ – MÔŽU BYŤ POLYFENOLY NÁPOMOCNÉ?

(Regeneration of liver after CCl₄ intoxication – can the polyphenols be helpful?)

Ol'ga Otrubová¹, Ol'ga Uličná², Pavol Janega³, Zdenka Ďuračková⁴, Jana Muchová⁴

¹Klinika pracovného lekárstva a toxikológie LF UK a Národné toxikologické informačné centrum UN Bratislava, otrubova.o@gmail.com

²Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky LFUK a UN Bratislava

³Ústav patologickej anatómie LFUK a UN Bratislava; Ústav normálnej a patologickej fyziológie, SAV, Bratislava

⁴Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK, Špitálska 24, 813 72 Bratislava

Súhrn

V mnohých ochoreniach pečene zohráva dôležitú úlohu oxidačný stres. Prírodné polyfenoly majú vďaka svojej chemickej štruktúre schopnosť vychytávať voľné radikály a zároveň sú aj schopné interagovať s dôležitými enzýmami zúčastňujúcimi sa na udržaní oxido-redukčnej rovnováhy v organizme. Tetrachlórmetán (CCl₄) vyvoláva poškodenie pečene, ktorého mechanizmus prebieha cez vyvolanie oxidačného stresu masívnym nárastom voľných reaktívnych radikálov vznikajúcich pri biotransformácii tejto látky (1). Takýto model sme použili na vyvolanie oxidačného stresu vedúceho k poškodeniu pečene a následným podávaním extraktu z kôry borovice *Pinus Pinaster* - Pycnogenolu (Pyc; 50 mg/kg hmotnosti na deň) sme sa chceli presvedčiť o schopnosti prírodných polyfenolov prispieť k regenerácii pečene po 5 týždňovom podávaní CCl₄ (1 ml/kg hmotnosti, 2x týždenne). Vplyv polyfenolov sme sledovali jednak na zmenách morfológického obrazu pečene ale aj na zmenách aktivít pečenevých antioxidantných enzýmov (SOD, GPx, CAT). Po podaní tetrachlórmetánu sme zaznamenali nárast steatózy a fibrózy v tkanive, zväčšenie pečene zobrazil nárast hepatosomatického indexu. Poškodenie pečene sa prejavilo aj poklesom aktivít všetkých sledovaných pečenevých antioxidantných enzýmov. Po 5 týždňovom podávaní Pyc v regeneračnej fáze sa všetky sledované parametre vracali k hodnotám v kontrolnej skupine. Rovnaké zmeny v hodnotách všetkých parametrov boli zaznamenané aj v skupine, kde v regeneračnej fáze bola podávaná len voda. Naše výsledky ukázali, že Pyc v dávke 50 mg/kg hmotnosti, napomáha v regeneračnej fáze po poškodení CCl₄ obdobne ako voda, teda prioritnú úlohu v tomto procese zohráva samotná schopnosť pečene regenerovať sa.

Kľúčové slová

Polyfenoly, CCl₄, SOD, GPx, CAT, steatóza, fibróza

Summary

Oxidative stress plays an important role in many diseases of the liver. Natural polyphenols

through their chemical structure have the ability to scavenge free radicals and they are also able to interact with important enzymes which are taking part in the maintaining of the oxidoreductive balance in the body. Carbon tetrachloride (CCl₄) induces liver damage, the mechanism of which runs through the induction of oxidative stress with massive increase of free radicals, which are resulting from the biotransformation of this substance (1). This model was used to induce oxidative stress leading to liver damage and subsequent administration of the extract from pine bark *Pinus Pinaster* - Pycnogenol (Pyc; 50mg / kg body weight per day), we wanted to ascertain the ability of natural polyphenols contribute to liver regeneration after 5 weeks of administration of CCl₄ (1 ml / kg of weight, 2x a week). Effect of polyphenols we watched both by the morphology changes of the liver but also on changes in activities of liver antioxidant enzymes (SOD, GPx, CAT). After administration of carbon tetrachloride, we recorded an increase of steatosis and fibrosis in the tissue, liver enlargement was represented by the growth of hepatosomatic index. Liver damage was reflected in a decrease in all monitored activities of liver antioxidant enzymes. After 5 weeks of dosing Pyc, all endpoints returned to the values of the controls. The same changes in the values of all parameters were recorded also in the group, which in the recovery phase has been administered only water. Our results showed that the 50 mg dose Pyc / kg of weight, assists in the recovery phase following injury CCl₄ analogously to the water and that the primary objective playing in this processes is the ability of liver to regenerate.

Key words

Polyphenols, CCl₄, SOD, GPx, CAT, steatosis, fibrosis

Úvod

Pozitívny vplyv rôznych prírodných polyfenolov pri ochoreniach pečene potvrdili viaceré štúdie. Napríklad extrakt z *Hibiscus sabdarifa* v štúdiu s 36 pacientmi obmedzil akumuláciu tuku a obezitu a zlepšil stav pečenej steatózy (2). Japonskí autori odporúčajú ako súčasť terapie hepatitídy C zvýšiť príjem polyfenolov (káva, čaj) (3). Zvýšená konzumácia (nad 2 šálky/deň) kávy redukovala fibrózu pri chronických poškodeniach pečene (4). Konzumácia kávy sa ukázala ako redukujúca riziko hepatocelulárneho karcinómu nezávisle od jeho etiológie (5).

Aj pri akútnom poškodení pečene, ako je tomu pri intoxikácii Muchotrávkou zelenou (*Amanita phalloides*), sa v retrospektívnej štúdiu na 205 pacientoch potvrdilo zvýšené prežívanie po podaní Silybínu- extraktu zo *Silybum marianum* (6), ktorý sa ako antidotum stal súčasťou terapie týchto otráv. Svoje hepatoprotektívne účinky preukázal i v štúdiu s deťmi s leukémiou, ktoré podstúpili chemoterapiu, kde po 28 dňovom podávaní došlo k úprave zvýšených hepatálnych parametrov (7). K zmierneniu poškodenia pečene došlo po jeho podávaní taktiež u 85 pacientov s chronickou hepatitídou (8).

Pycnogenol ako zmes prírodných polyfenolov už vo viacerých prácach preukázal svoje antioxidačné schopnosti (9) a pozitívne pôsobenie pri rôznych ochoreniach (10,11).

Materiál a metódy

Potkany kmeňa Wistar (samce, váha 330 - 380 g, vek 5-6 týždňov, chované pri konštantnej teplote 22 ± 2°C, štandardný 12 hodinový cyklus svetla a tmy, voda a strava *ad libitum*) boli randomizovane rozdelené do 4 skupín: skupina K - kontrolná dostávala štandardnú stravu (kompletná diéta pre laboratorne potkany a myši: KKZ-P/M (reg. no 6147)), skupina C5 - potkany dostávali 5 týždňov CCl₄ (Centralchem s.r.o, SR) i.p. v dávke 1ml/kg hmotnosti v 50% roztoku CCl₄ v olivovom oleji (VULM SK s.r.o, SR) každý druhý deň, skupina C5P5 dostávala 5 týždňov CCl₄ a nasledovných 5 týždňov im bol podaný Pycnogenol (Horphag Res. Ltd., Ženeva, Švajčiarsko) v dávke 50mg/kg hmotnosti na deň, cestou gavage. Skupina

C5H5 - po 5 týždňoch podávania CCl₄ bola zvieratám nasledovných 5 týždňov podávaná voda cestou gavage. Skupina K bola pre vyrovnanie podmienok všetkých experimentálnych skupín vystavená obdobnému stresu ako ostatné skupiny (podávanie olivového oleja/vody). Po skončení experimentu bola zvieratám v anestéze (sodium pentobarbital, i.p. 60 mg/kg, vo forme 10% roztoku) odobraná pečeň a krv. Všetky vzorky boli uskladnené pri -80 °C. V 10 % homogenátoch pečene boli stanovené aktivity jednotlivých enzýmov. SOD (Cu/Zn SOD bola stanovená komerčným kitom Sigma, Nemecko použitím bovine Cu/Zn-SOD ako štandardu, aktivita sa vyjadřila ako U SOD/mg proteínov). GPx bola stanovená nepriamo komerčným kitom (Sigma-Aldrich, USA). Zmeny absorbancie boli zaznamenané spektrofotometricky pri 340 nm. Aktivita GPx sa vyjadřila v μ katal/mg proteínov. Aktivita KAT bola stanovená podľa Bergmeyer (12). V rezoch pečene (4 μ m, pravý lalok) bola farbením hematoxylínom a eozínom morfolometricky stanovená plocha makrovezikulárnej steatózy a farbením picrosiriusovou červenou modifikovanou podľa Dolber a Spach (1993) plocha kolagénového väziva. Výsledky sú vyjadrené ako pomer plochy steatózy resp. fibrózy voči celkovej ploche rezu. Rezy boli analyzované pomocou mikroskopu Leica DM 200 (Leica Nemecko) s použitím morfolometrického softvéru ImageJ (13). Z pomeru hmotnosti pečene k celkovej hmotnosti bol stanovený hepatosomatický index. Koncentrácia proteínov v homogenátoch bola stanovená spektrofotometricky použitím Lowryho metódy(14).

Výsledky

	K	C5	C5P5	C5H5
Hepatosomatický	0,030	0,039	0,032	0,032
n	8	13	8	12
SD	0,002	0,005	0,002	0,003
SEM	0,001	0,001	0,001	0,001
T-test		K/C5	C5/C5P5	C5/C5H5
		0,0005	0,0061	0,0030
				C5P5/ C5H5
				0,7144
Fibróza (%)	99,99	595,32	407,67	445,03
n	7	13	7	12
SD	65,175	455,648	243,580	255,133
SEM	24,634	126,374	92,065	73,651
T-test		K/C5	C5/C5P5	C5/C5H5
		0,0112	0,3276	0,2266
				C5P5/ C5H5
				0,7582
Makrovakuolárna	0,730	4,351	0,318	0,464
n	7	13	7	12
SD	0,898	3,023	0,350	0,482
SEM	0,340	0,839	0,132	0,139
T-test		K/C5	C5/C5P5	C5/C5H5
		0,0067	0,0027	0,0004
				C5P5/ C5H5
				0,4938

Tab.1 Histologicko fyziologické parametre pečene

Po 5 týždňovom toxickom pôsobení CCl_4 došlo k zmenám vo veľkosti a štruktúre pečeneového tkaniva. Hepatosomatický index štatisticky významne vzrástol. Obdobne sme zaznamenali aj nárast steatózy a fibrózy v tkanive. V regeneračnej fáze podávanie Pyc štatisticky významne zlepšilo hepatosomatický index aj steatózu pečeneového tkaniva. Pokles podielu kolagénu ako prejav fibrotických zmien síce bol zaznamenaný po 5 týždňoch podávania Pyc, ale tento pokles bol len mierny a nebol štatisticky významný (Tab 1.). Obdobné zmeny parametrov sme pozorovali aj u skupiny, ktorej bola v regeneračnej fáze podávaná voda (C5H5). Rozdiely medzi skupinami C5H5 a C5H5 neboli štatisticky významné.

	K	C5	C5P5	C5H5
	n=8	n=13	n=8	n=12
GPX U/mg prot)	10911,780	6243,106	11360,264	11105,637
SD	3664,909	1525,385	3583,043	3500,706
SEM	1295,741	423,066	1266,797	1010,567
T-test		K/C5	C5/C5P5	C5/C5H5
		0,0006	0,0004	0,0001
				C5P5/ C5H5
				0,8763
CAT (μkat/g	20,736	7,720	17,342	18,077
SD	3,951	3,714	2,897	5,164
SEM	0,868	1,337	0,696	1,215
T-test		K/C5	C5/C5P5	C5/C5H5
		0,0000	0,0000	0,0000
				C5P5/ C5H5
				0,7203
SOD (U/mg prot)	517,114	243,358	511,815	497,186
SD	71,156	68,708	137,636	112,444
SEM	25,157	19,056	48,662	35,558
T-test		K/C5	C5/C5P5	C5/C5H5
		0,0000	0,0000	0,0000
				C5P5/ C5H5
				0,8069

Tab.2 Aktivity antioxidantných enzýmov v homogenátoch pečene

Po záťaži s CCl_4 bol pozorovaný štatisticky významný pokles aktivity sledovaných antioxidantných enzýmov SOD, GPx, KAT. (Tab 2.). Po podávaní Pyc v regeneračnej fáze sa aktivity enzýmov štatisticky významne vracali k hodnotám aktivít v kontrolnej skupine. Aj tieto parametre sa v skupine s podávanou vodou správali rovnako, teda štatisticky významne sa vracali k hodnotám v kontrolnej skupine. Medzi oboma skupinami C5P5 a C5H5 navzájom neboli štatisticky významné rozdiely.

Diskusia

Z rešerše v dostupných databázach sa ukázalo, že málo prác sa venuje skúmaniu schopnosti prírodných látok napomáhať v regeneračnej fáze. A to aj napriek tomu, že práve tento model je v medicínskej praxi najčastejší, teda po negatívnom zásahu do organizmu treba znova nastoliť rovnováhu a liečebnými postupmi nastoliť stav čo najbližší stavu pôvodnému - "zdraviu".

Naše výsledky poukazujú na významnú úlohu usporiadania experimentu v interpretácii hepatoprotektívnych vlastností prírodných látok. Nestretli sme sa s prácami s obdobným usporiadaním, aké sme mali v našom pokuse, väčšinou sa podávali toxické látky alebo

polyfenoly jednorázovo. Napríklad v štúdiách (15, 16, 17, 18) bol hodnotený účinok suplementácie prírodnými polyfenolmi po poškodení pečene vyvolanom len jednorázovým alebo krátkodobým podávaním toxickéj látky. V niektorých prácach sa hodnotil účinok iba voči kontrole/záťažovej skupine bez liečby (15, 19), čím sa nezohľadňovala spontánna regenerácia tkaniva.

Naše výsledky vytvárajú priestor na diskusiu s inými publikáciami o záveroch hepatoprotektívneho účinku Pyc v rôznych záťažových situáciách (16, 19), ako aj pri intoxikácii s CCl₄ (17, 18).

Záver

V regeneračnej fáze po 5 týždňovej intoxikácii s CCl₄ je pôsobenie prírodného polyfenolového extraktu Pyc v dávke 50 mg/kg hmotnosti na deň, na úrovni pôsobenia vody. Dominantné sú pochody samotnej regeneračnej schopnosti pečene. Napriek našim výsledkom polyfenoly môžu byť nápomocné v procese regenerácie, ale táto ich schopnosť závisí od stupňa závažnosti poškodenia pečenevého tkaniva prípadne od dávky a špecifického zloženia jednotlivých polyfenolových prípravkov.

PodĎakovanie

Stanovenia boli realizované s podporou grantu MŠ VEGA 1/1133/11.

Literatúra

- 1. Weber LWD, Boll M, Stampfl A.** Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology*. 2003;33(2):105-136
- 2. Chang HC, Peng CH, Yeh DM, Kao ES, Wang CJ.** *Hibiscus sabdarifa* extract inhibits obesity and fat accumulation, and improves liver steatosis in humans. *Food Funct*. 2014 Apr;5(4):734-9.
- 3. Kawaguchi Y, Mizuta T.** Interaction between hepatitis C virus and metabolic factors. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 21;20(11):2888-901.
- 4. Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, Hoofnagle JH.** Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2010 Jan; 51(1):201-9
- 5. Gelatti U, Covolo L, Franceschini M, Pirali F, Tagger A, Ribero ML, Trevisi P, Martelli C, Nardi G, Donato F.** Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. *J Hepatol*. 2005 Apr;42(4):528-34
- 6. Enjalbert F, Rapior S, Nouguiet-Soulé J, Guillon S, Amouroux N, Cabot C.** Treatment of amatoxin poisoning: 20-years retrospective analysis. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2002;40(6):715-57
- 7. Loguercio C, Festi D.** Silibinin and the liver: From basic research to clinical practice. *World J Gastroenterol* 2011; May 14;17(18):2288-2301
- 8. Loguercio C, Andreone P, Brisc C, Chiaramonte M, de Sio I, Federico A, Floreani A, Freni MA, Grieco A, Lobello S, Milani S, Okolicsanyi L, Portincasa p, Smedile A, Spandaro A, Sporea I, Sorrentino P, Vecchione R, Del Vecchio Blanco C.** Effect of silybin in patients with chronic hepatitis: preliminary results of a multicentre randomized controlled trial vs placebo. *Gastroenterology* 2010;138 Suppl1:8800
- 9. 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*. 40:158-168
- 10. Trebatická J, Kopasová S, Hradečná Z, Činovský K, Škodáček I, Šuba J, Muchová J, Žitňanová I, Waculíková I, Rohdewald P, Ďuračková Z.** Treatment of ADHD with

French maritime pine bark extract, Pycnogenol. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2006;15:329-335

11. Kolářček M, Muchová J, Dvořáková M, Paduchová Z, Žitňanová I, Čierna I, Országhová Z, Székýová D, Jajcaiová-Zedníčková N, Kovács L, Ďuračková Z. Effect of natural polyphenols (Pycnogenol) on oxidative stress markers in children suffering from Crohn's disease – a pilot study. *Free Rad Res* 2013; 47(8): 624–634

12. Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis, volume III: Enzymes I: Oxidoreductases, transferases. Weinheim, VCH, 1987: 277pp.

13. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 2004; 11(7):36-42.

14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr SL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-275.

15. Ajiboye TO, Salawu NA, Yakubu MT, Oladiji AT, Akanji MA, Okogun JI. Antioxidant and drug detoxification potentials of *Hibiscus sabdariffa* anthocyanin extract. *Drug Chem Toxicol.* 2011 Apr;34(2):109-15

16. Ko JW, Lee IC, Park SH, Moon C, Kang SS, Kim SH, Kim JC. Protective effects of pine bark extract against cisplatin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Laboratory Animal Research* 2014; 30(4): 174-80

17. Yang YS, Ahn TH, Lee JC, Moon CJ, Kim SH, Jun W, Park SC, Kim HC, Kim JC. Protective effects of Pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* 2008 Jan;46(1):380-7

18. Ahn TH, Yang YS, Lee JCh, Moon ChJ, Kim SH, Jun W, Park SCh, Kim JCh. Ameliorative Effects of Pycnogenol on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Oxidative Damage in Rats. 2007; *Phytoter. Res.* 21 1015-1019

19. Mei L., Mochizuki M., Hasegawa N. Hepatoprotective Effects of Pycnogenol in a Rat Model of Non-alcoholic Steatohepatitis. *Phytotherapy Research* 2012; 26 : 1572-4

ÚLOHA OXIDAČNÉHO STRESU U DIALYZOVANÝCH PACIENTOV S CHRONICKÝM OCHORENÍM OBLIČIEK

(The role of oxidative stress in patients with chronic kidney disease)

Zuzana Paduchová¹, Martina Horváthová¹, Mária Chomová¹, Branislav Trebatický², Jana Muchová¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska Fakulta UK, Sasinkova 2, 81372 Bratislava, zuzana.paduchova@fmed.uniba.sk

²Urologická klinika s Centrom pre transplantácie obličiek, Univerzitná nemocnica UK, Limbová 5, 83305 Bratislava

Súhrn

Pacienti s chronickým ochorením obličiek (CKD) podstupujúci hemodialýzu sú vystavení konštantnému oxidačnému stresu. Primárne príčiny vzniku CKD môžu byť rôzne, ale navzájom môžu byť prepojené prostredníctvom dráh regulovaných oxidačným stresom a chronickým zápalom. Preto je potrebné neustále definovať signálne dráhy spojené s oxidačným stresom z dôvodu cieľenej antioxidantnej terapie v kombinácii s polyfarmakoterapiou. Preto cieľom našej práce bolo stanoviť a porovnať mieru oxidačného stresu u pacientov s chronickou tubulointersticiálnou nefritídou, glomerulonefritídou, polycystickými obličkami, diabetickou nefropatiou a chronickou renálnou insuficienciou. Pacientom na dialýze s rôznou diagnózou CKD sme stanovili hladiny markerov oxidačného poškodenia DNA (8-oxoG), lipidov (lipoperoxidy), proteínov (nitrotyrozín) a tiež hladinu antioxidantnej ochrany buniek (Cu/Zn-SOD).

Kľúčové slová

Chronické poškodenie obličiek, dialýza, oxidačný stres, oxidačné poškodenie DNA, 8-oxoG, lipoperoxidy, nitrotyrozín, Cu/Zn-SOD

Summary

Patients with chronic kidney disease (CKD) undergoing hemodialysis are constantly exposed to oxidative stress. The primary causes of CKD can vary, but they may be interlinked through the pathways regulated by oxidative stress and chronic inflammation. It is necessary to define signal pathways related to oxidative stress because of targeted antioxidant therapy in combination with polypharmacotherapy. Therefore, the aim of our study was to determine and compare the level of oxidative stress in patients with chronic tubulointerstitial nephritis, glomerulonephritis, polycystic kidneys, diabetic nephropathy and chronic renal insufficiency. In dialysed patients with different diagnosis of CKD levels of markers of oxidative damage to DNA (8-oxoG), lipids (lipoperoxides), proteins (nitrotyrosine) were determined and also the level of antioxidant protection of cells (Cu/Zn-SOD).

Key words

Chronic kidney disease, dialysis, oxidative stress, oxidative DNA damage, 8-oxoG, lipoperoxide, nitrotyrosine, Cu/Zn-SOD

Úvod

Oxidačný stres, alebo nerovnováha medzi zvýšenou tvorbou voľných radikálov produkovaných poškodenými bunkami v dôsledku patologických procesov a zníženou hladinou prirodzených antioxidantov, ktorými sa naše bunky chránia pred voľnými radikálmi, je proces, ktorý je spoločný pre mnohé ochorenia, vrátane chronického ochorenia obličiek (CKD, chronic kidney disease) (1). Táto nerovnováha vedie k poškodeniu esenciálnych biomolekúl, akými sú DNA, RNA, proteíny a lipidy, čo môže viesť k zlyhaniu obličiek. Zlyhanie je podmienené štruktúrnym poškodením obličiek (deštrukcia obličkovej hmoty spojená so stratou nefrónov) a tiež zhoršením funkcie obličiek (znižovaním rýchlosti glomerulárnej filtrácie). Príčiny vzniku CKD sú rôzne, napr. systémové (hypertenzia, Diabetes mellitus, obezita), zvyšujúce sa percento starnúcej populácie, zvyšujúci sa počet fajčiarov, hlavne u žien, nízky počet nefrónov pri narodení alebo neúplné zotavenie sa po jednej alebo viacerých epizódach akútneho poškodenia obličiek (2,3). Ochorenia súvisiace s CKD majú spoločné prvky, ktoré môžu byť prepojené prostredníctvom dráh regulovaných oxidačným stresom a chronickým zápalom (4). Signálne dráhy spojené s oxidačným stresom je neustále potrebné definovať z dôvodu cieleného podávania antioxidantov v kombinácii s polyfarmakoterapiou (1). Preto cieľom našej práce bolo stanoviť u pacientov s CKD hladiny markerov oxidačného poškodenia DNA, lipidov a proteínov, a tiež hladinu antioxidačnej ochrany buniek, ktorú reprezentuje enzým SOD.

Pacienti a metódy

Do štúdie bolo zaradených 34 pacientov s CKD na dialýze vo veku od 38 – 87 rokov (priemerný vek $61,8 \pm 1,65$ roka) z toho bolo 9 žien a 25 mužov, ktorí sú liečení na Urologickej klinike s Centrom pre transplantácie obličiek Univerzitnej nemocnice UK. Všetci pacienti súhlasili so zaradením do projektu a podpísali informovaný súhlas. Súbor pacientov bol rozdelený do 5 skupín podľa primárnej diagnózy: 1. Chronická tubulointericiálna nefritída (ChTIN, n = 6), 2. Chronická glomerulonefritída (ChGN, n = 6), 3. Polycystické obličky (PO, n = 4), 5. Diabetická nefropatia (DN, n = 8) a 6. Chronická renálna insuficiencia (ChRI, n = 10).

Pacientom bola odobratá krv do komerčných skúmaviek s/bez EDTA ako antikoagulantom. Malý objem celkovej krvi s EDTA (200 μ l) bol odobratý a okamžite zmrazený bez kryoprotektívnej látky pri -80°C počas 3 – 5 týždňov do stanovenia bazálneho a oxidačného poškodenia DNA kométovou metódou podľa Al-Salmi a kol. (5). Zvyšná krv bola ďalej centrifugovaná, sérum/plazma boli rozdelené na alikvóty, zamrazené a uložené v mrazničke až do analýzy vzoriek.

Základné biochemické parametre (albumín, kreatinín, glukóza, celkové bielkoviny, kyselina močová, močovina, gama-glutamyltransferáza (GMT), alkalická fosfatáza (ALP), aspartát aminotransferáza (AST), alanín aminotransferáza (ALT), CRP, ióny, parametre metabolizmu železa a lipidový profil) boli analyzované štandardnými metódami v klinicko-biochemickom laboratóriu.

Stanovenie oxidačného poškodenia DNA

Na stanovenie oxidačne poškodenej DNA sme použili enzýmovo modifikovanú kométovú metódu, pri ktorej sa na vyšetrenie oxidačne modifikovaných purínov používa špecifický enzým formamidopyrimidín-DNA glykozyláza (Fpg) (6,7). Bazálne poškodenie DNA bolo stanovené jednoduchou kométovou metódou bez použitia Fpg podľa Collins a kol. (8). Preparáty sme farbili roztokom DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid) v glycerole a pomocou fluorescenčného mikroskopu (Olympus BX 41 s excitačným filtrom 515 – 560 nm a hraničným filtrom pri 530 nm) a softvéru Lucia sme vyhodnotili poškodenie

DNA. Keďže poškodenie nebolo homogénne, vybrali sme náhodne 25 buniek na géľ (50 buniek na pacienta). Celkové poškodenie DNA (bazálne poškodenie) vyjadrujeme ako %DNA v chvoste vo vzorkách neošetrených Fpg enzýmom a oxidačné poškodenie DNA (8-oxoG) vyjadrujeme ako rozdiel poškodenia s a bez ošetrenia Fpg enzýmom (%DNA v chvoste (9).

Stanovenie poškodenia lipidov

Lipoperoxidy sme stanovili v sére metódou podľa El-Saadaniho a kol. (10). Metóda je založená na oxidačnej schopnosti peroxidov premieňať jodid na jód (I_2), ktorý v reakčnej zmesi reaguje s nadbytočným jodidom za vzniku I_3 s absorpčným maximom pri vlnovej dĺžke 365 nm. Množstvo lipoperoxidov vyjadrujeme v nmol/ml séra.

Stanovenie nitrotyrozínu

Nitrotyrozín sme stanovili komerčne dostupným ELISA setom (Hycutl Biotechnology, HK501) pri vlnovej dĺžke 450 nm. Detekčné minimum setu je 2 nmol/l a set meria v koncentračnom rozpätí 2 až 1500 nmol/l. Hladinu nitrotyrozínu vyjadrujeme v nmol/l.

Stanovenie aktivity Cu/Zn -superoxiddismutázy (Cu/Zn-SOD)

Aktivitu Cu/Zn-SOD sme stanovili v hemolyzáte erytrocytov komerčným setom (Fluka, Nemecko) pri vlnovej dĺžke 450 nm. Ako štandard sme použili hovädziu Cu/Zn-SOD (Sigma-Aldrich, USA). Aktivitu Cu/Zn-SOD vyjadrujeme ako U SOD/mg Hb, pričom 1U je definované ako enzýmová aktivita, ktorá spôsobuje 50% inhibíciu redukcie detektora (WST-1). Koncentráciu hemoglobínu (Hb) v hemolyzáte erytrocytov sme stanovili metódou podľa Drabkina a kol. (11). Koncentráciu Hb vyjadrujeme v g/l.

Štatistické vyhodnotenie

Výsledky sú prezentované ako aritmetický priemer $\pm$ stredná chyba priemeru (SEM) pre normálne rozdelené dáta. Na posúdenie normality dát sme použili Shapiro-Wilkov test. Na porovnanie rozdielov medzi skupinami sme použili ANOVA test. Hodnoty $p < 0,05$ sú považované za štatisticky významné. Na štatistickú analýzu bol použitý štatistický program StatsDirect® 2.3.7. (StatsDirect Sales, Sale, Cheshire M33 3UY, UK).

Výsledky

Skupinu pacientov s chronickým ochorením obličiek, ktorí podstupujú dialýzu počas mnohých rokov, sme rozdelili na základe primárnej diagnózy do 5 skupín (Obr. 1). Základná charakteristika celej skupiny pacientov s CKD, ako aj klinicko-biochemické parametre pre jednotlivé diagnózy sú uvedené v tabuľkách 1 a 2.

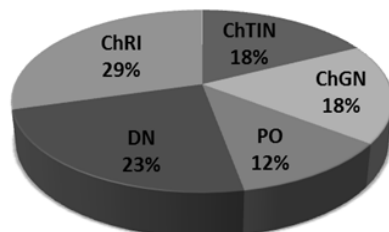
Chronické ochorenie obličiek (CKD)					
Vek pacientov s CKD	61,8 $\pm$ 1,65				
ženy	62,7 $\pm$ 2,77				
muži	61,5 $\pm$ 2,03				
Počet pacientov (ženy/muži)	34 (9/25)				
Diagnózy	ChTIN	ChGN	PO	DN	ChRI
Vek	63,5 $\pm$ 2,22	56,7 $\pm$ 4,46	60,0 $\pm$ 3,94	67,6 $\pm$ 3,41	60,0 $\pm$ 3,28
Počet pacientov (ženy/muži)	6 (2/4)	6 (1/5)	4 (3/1)	8 (1/7)	10 (2/8)

Tab. 1 Základná charakteristika skupiny pacientov s CKD.

Základné klinicko-biochemické parametre					
Hematológia	ChTIN	ChGN	PO	DN	ChRI
Leukocyty (x 10 ⁹ /l)	7,16 ± 0,86	6,59 ± 0,66	5,43 ± 0,95	7,82 ± 0,67	7,16 ± 0,47
Erytrocyty (x 10 ¹² /l)	3,66 ± 0,16	3,54 ± 0,17	3,54 ± 0,11	3,95 ± 0,16	3,75 ± 0,12
Trombocyty (x 10 ⁹ /l)	182,67 ± 11,34	197,67 ± 20,58	145,00 ± 21,21	171,25 ± 11,21	209,50 ± 28,10
MONO %	8,50 ± 1,25	8,48 ± 1,25	8,55 ± 0,89	8,50 ± 0,85	8,74 ± 0,88
BASO %	0,38 ± 0,14	0,38 ± 0,05	0,55 ± 0,12	0,59 ± 0,13	0,45 ± 0,15
NEU %	65,70 ± 2,29	64,82 ± 5,29	62,05 ± 2,20	67,41 ± 2,21	69,46 ± 2,01
EOS %	4,80 ± 1,46	2,90 ± 1,11	5,73 ± 3,13	5,56 ± 0,99	3,77 ± 0,71
LYM %	20,62 ± 2,17	23,42 ± 4,21	23,13 ± 4,34	17,94 ± 1,70	17,58 ± 1,93
Hemoglobín (g/l)	111,17 ± 4,71	110,83 ± 3,37	109,25 ± 2,29	117,38 ± 5,01	112,30 ± 2,65
Hematokryt	0,35 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,35 ± 0,01
Základná biochémia					
Albumín (g/l)	39,6 ± 1,9	42,1 ± 1,2	40,7 ± 1,6	40,1 ± 1,9	41,2 ± 0,9
Kreatinín (μmol/l)	779 ± 70	890 ± 47	832 ± 96	878 ± 101	730 ± 102
Glukóza (mmol/l)	5,2 ± 0,45	5,3 ± 0,28	4,8 ± 0,46	5,0 ± 0,43	7,1 ± 1,22
Celkové bielkoviny (g/l)	64 ± 1,2	65 ± 1,1	61 ± 4,4	61 ± 8,2	66 ± 1,3
Kys. močová (μmol/l)	388 ± 17	461 ± 27	367 ± 21	349 ± 50	449 ± 32
Močovina pred	21,8 ± 2,9	21,9 ± 1,4	17 ± 1,7	21,4 ± 1,8	25,5 ± 1,8
a po dialýze (mmol/l)	8,6 ± 2,8	6,9 ± 0,7	6,9 ± 1,6	5,8 ± 0,6	8,7 ± 1,7
Celkový bilirubín (μmol/l)	5,8 ± 0,54	6,1 ± 1,00	6,3 ± 1,23	6,4 ± 0,63	5,7 ± 1,02
Lipidový metabolizmus					
CHOL (mmol/l)	4,38 ± 0,35	5,77 ± 0,41	3,89 ± 1,04	3,05 ± 0,52	4,08 ± 0,31
HDL (mmol/l)	1,39 ± 0,32	1,08 ± 0,12	1,34 ± 0,37	0,83 ± 0,09	1,04 ± 0,08
LDL (mmol/l)	2,61 ± 0,22	4,14 ± 0,33	2,34 ± 0,70	1,62 ± 0,43	2,72 ± 0,20
VLDL (mmol/l)	0,55 ± 0,07	1,06 ± 0,09	0,44 ± 0,02	0,91 ± 0,18	0,48 ± 0,04
TAG (mmol/l)	1,21 ± 0,15	2,33 ± 0,30	0,96 ± 0,03	2,00 ± 0,40	1,05 ± 0,13
Parameter zápalového procesu					
CRP (mg/l)	4,99 ± 3,16	13,43 ± 5,87	7,54 ± 0,55	11,64 ± 8	5,22 ± 2,25
Pečeňové enzýmy					
AST (μkat/l)	0,27 ± 0,03	0,28 ± 0,08	0,33 ± 0,16	0,25 ± 0,05	0,24 ± 0,02
ALT (μkat/l)	0,27 ± 0,05	0,32 ± 0,10	0,45 ± 0,29	0,28 ± 0,05	0,27 ± 0,05
ALP (μkat/l)	1,31 ± 0,15	1,40 ± 0,31	1,37 ± 0,14	1,76 ± 0,30	1,60 ± 0,14
GMT (μkat/l)	0,56 ± 0,18	0,57 ± 0,27	0,45 ± 0,08	0,78 ± 0,31	1,34 ± 0,60
Minerálne látky					
Ca (mmol/l)	2,32 ± 0,09	2,21 ± 0,05	2,16 ± 0,10	2,22 ± 0,08	2,13 ± 0,06
P (mmol/l)	1,73 ± 0,10	1,72 ± 0,16	1,50 ± 0,24	1,87 ± 0,12	1,86 ± 0,11
Na (mmol/l)	146 ± 4,9	141 ± 0,7	144 ± 2,9	140 ± 1,6	140 ± 0,6
K (mmol/l)	5,2 ± 0,3	4,5 ± 0,2	5,1 ± 0,7	4,9 ± 0,2	4,7 ± 0,2
Cl (mmol/l)	104 ± 1,5	104 ± 0,9	104 ± 0,5	102 ± 1,4	103 ± 0,7
Mg (mmol/l)	0,97 ± 0,06	0,99 ± 0,05	0,94 ± 0,06	0,96 ± 0,04	0,97 ± 0,04
Parametre metabolizmu železa					
Fe (μmol/l)	10 ± 1,1	11 ± 1,5	11 ± 1,2	11 ± 1,8	9 ± 0,6
CVK-Fe (μmol/l)	44 ± 3	41 ± 4	41 ± 3	43 ± 4	37 ± 5
Saturácia (%)	23 ± 3	29 ± 5	26 ± 3	28 ± 5	23 ± 1
Feritín (μg/l)	394 ± 66	574 ± 118	615 ± 20	489 ± 105	562 ± 86

Tab. 2 Porovnanie základných klinicko-biochemických parametrov dialyzovaných pacientov s CKD.

Skupina pacientov s CKD rozdelená podľa primárnej diagnózy



Obr. 1 Rozdelenie pacientov s CKD podľa primárnej diagnózy: Chronická tubulointerstiálna nefritída (ChTIN), Chronická glomerulonefritída (ChGN), Polycystické obličky (PO), Diabetická nefropatia (DN) a Chronická renálna insuficiencia (ChRI).

Naše výsledky klinicko-biochemických parametrov potvrdili už v minulosti publikované dáta u pacientov s CKD. U všetkých dialyzovaných pacientov sme stanovili nasledovné symptómy: anémiu, zvýšenú hladinu feritínu, vysokú hladinu kreatinínu v sére, poukazujúcu na nízku glomerulárnu filtráciu obličiek, hyperurikémiu a hyperfosfatémiu. Prebiehajúci zápalový proces sme detegovali u všetkých pacientov, okrem pacientov s ChTIN. U týchto pacientov sme zistili mierne zvýšené hladiny Na a K, a tiež zvýšenú hladinu močoviny po dialýze. U všetkých pacientov, okrem ChRI, sme zistili hypoproteinémiu. U pacientov s ChRI sme zistili aj hyperglykémiu, zvýšenú hladinu GMT, hypokalémiu a aj po dialýze stále zvýšenú hladinu močoviny. U pacientov s DN sme zistili mierne zvýšenú hladinu ALP a zvýšenú hladinu GMT.

Na posúdenie rozsahu oxidačného stresu v patogenéze CKD u dialyzovaných pacientov sme stanovili markery oxidačného poškodenia DNA (8-oxoG), lipidov (lipoperoxidy) a proteínov (nitrotyrozín) a taktiež úroveň antioxidačnej ochrany, ktorú predstavuje v bunkách enzým Cu/Zn-SOD. Výsledky uvádzame v tabuľke 3.

Parametre oxidačného stresu					
	ChTIN ^a	ChGN ^b	PO ^c	DN ^d	ChRI ^e
Bazálne poškodenie DNA (%DNA v chvoste)	1,56 ± 0,24 P = 0,0857 ^d	1,87 ± 0,37 P = 0,0473 ^d	1,30 ± 0,10	1,14 ± 0,09	1,33 ± 0,21
Oxidačné poškodenie DNA (%DNA v chvoste)	0,76 ± 0,22 P = 0,0913 ^d	1,48 ± 0,62	1,01 ± 0,47	1,9 ± 0,57	1,44 ± 0,55
Lipoperoxidy (nmol/ml)	42,16 ± 2,7 P = 0,0301 ^b	53,55 ± 3,34	53,47 ± 6,11	49,32 ± 6,43	65,48 ± 11,57 P = 0,0782 ^a
Nitrotyrozín (nmol/l)	9,22 ± 0,89 P = 0,0857 ^e	11,49 ± 2,67	9,87 ± 0,97	9,43 ± 0,68 P = 0,0516 ^e	17,19 ± 3,40
Aktivita SOD (U/mg Hb)	678,34 ± 36,54	700,59 ± 40,49	667,53 ± 66,26	726,61 ± 21,53 P = 0,0707 ^e	662,24 ± 25,33

Tab. 3 Parametre oxidačného stresu v skupine pacientov s CKD, rozdelených podľa diagnózy na: Chronická tubulointerstiálna nefritída (ChTIN), Chronická glomerulonefritída (ChGN), Polycystické obličky (PO), Diabetická nefropatia (DN) a Chronická renálna insuficiencia (ChRI).

Záver a Diskusia

Z našich výsledkov vidieť, že oxidačný stres sa vo veľkej miere podieľa v patogenéze ChRI, pretože sme stanovili zvýšené hladiny markerov oxidačného poškodenia DNA, lipidov, proteínov a zníženú aktivitu Cu/Zn-SOD. K progresii oxidačného stresu môže tiež prispievať zvýšená hladina glukózy v krvi. Z výsledkov tiež vidieť, že pri ChTIN tvorí oxidačné poškodenie DNA len 49% z celkového poškodenia DNA a zvýšené hladiny markerov sú v porovnaní s ostatnými diagnózami najnižšie. Môžeme teda predpokladať, že oxidačný stres sa v patogenéze tohto ochorenia podieľa v menšej miere. U ChGN predstavuje oxidačné poškodenie DNA až 79% z celkového poškodenia, pričom ostatné markery sú tiež zvýšené v porovnaní s ostatnými diagnózami. Pacienti s touto diagnózou majú vyššiu aktivitu antioxidantného enzýmu Cu/Zn-SOD, a aj napriek tomu je oxidačné poškodenie vyššie. V patogenéze tohto ochorenia sme stanovili aj zvýšenú hladinu CRP, čo poukazuje na možnú účasť zápalu, čo potvrdzuje aj práca, v ktorej dokázali, že CRP > 50 mg/l silne podporuje zápalový proces, zatiaľ čo hladina < 10 mg/l účasť zápalu vylučuje (12). Okrem toho mali pacienti s ChGN dislipidémiu, čo tiež prispieva k zvyšovaniu oxidačného stresu. Pacienti s diagnózou PO majú oxidačne poškodenú DNA na 78% z celkového poškodenia DNA, avšak ostatné parametre oxidačného stresu sa výrazne neodlišujú od parametrov iných diagnóz. U pacientov s DN sme stanovili výrazne zvýšené oxidačné poškodenie DNA a tiež mierne zvýšenú hladinu CRP, avšak ďalšie markery boli porovnateľné s ostatnými diagnózami, okrem enzýmu SOD, ktorého aktivita bola spomedzi všetkých diagnóz najvyššia. Na záver môžeme konštatovať, že oxidačný stres sa rôznou mierou podieľa na patogenéze uvedených ochorení u dialyzovaných pacientov.

Pod'akovanie

Štúdia bola finančne podporená grantom MZ 2012/8-UKBA-8.

Literatúra

1. **Gobe GC.** Oxygen, Free Radicals, and Renal Function. 2581-2603. In: Laher I. (ed.), Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.
2. **Venkatachalam MA, Griffin KA, Lan R, Geng H, Saikumar P, Bidani AK.** Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol 2010; 298: F1078–F1094.
3. **Bedford M, Farmer C, Levin A, Ali T, Stevens P.** Acute kidney injury and CKD: chicken or egg? Am J Kidney Dis 2012; 59: 485–491.
4. **Vlassara H, Torreggiani M, Post JB, Zheng F, Uribarri J, Striker GE.** Role of oxidants/inflammation in declining renal function in chronic kidney disease and normal aging. Kidney Int 2009; 114: S3–S11.
5. **Al-Salmani K, Abbas HHK, Schulpen S, Karbaschi M, Abdalla I, Bowman KJ, So KK, Evans MD, Jones GDD, Godschalk RW, Cooke MS.** Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood 2011; 51 (3): 719-25.
6. **Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL.** Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. Carcinogenesis 1993; 14: 1733-1735.
7. **Dušinská M, Collins AR.** Detection of oxidised purines and UV – induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion – specific enzymes in the comet assay. Altern Lab Anim 1996; 24: 405-411.
8. **Collins AR, Dobson VL, Dušinská M, Kennedy G, Štetina R.** The comet assay: what can it really tell us? Mutat Res 1997; 375: 183-193.

- 9. Collins AR, Dušinská M, Gedik CM, Štetina R.** Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Enviro Health Perspect* 1996; 14: 1733-1735.
- 10. el-Saadani, Esterbauer H, el-Sayed M, Goher M, Nassar AY, Jurgens G.** A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *Journal of Lipid Research* 1989; 30: 627-630.
- 11. Drabkin DL, Austin JH.** Spectrophotometric studies: I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. *J Biol Chem* 1932; 98: 719-733.
- 12. Samouilidou1 EC, Grapsa EJ, Kakavas I, Lagouranis A, Agrogiannis B.** Oxidative stress markers and C-reactive protein in end-stage renal failure patients on dialysis: *International Urology and Nephrology* 2003; 35: 393–397.

FERROOXIDÁZOVÁ A POLYFENOLOXIDÁZOVÁ AKTIVITA CERULOPLAZMÍNU V SÉRE PACIENTOV PO TRANSPLANTÁCII PEČENE – PREDBEŽNÁ INFORMÁCIA

(Ferroxidase and polyphenoloxidase activities of ceruloplasmin in sera
of patients after liver transplantation – preliminary report)

Ladislav Turecký¹, Viera Kupčová², Peter Ščigulinský¹

*¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK, Sasinkova 2, 81108
Bratislava a ²III.interná klinika LFUK v Bratislave*

Súhrn

Ceruloplazmín je multifunkčný proteín, ktorý má v organizme katalytickú, antioxidačnú a transportnú funkciu. Cieľom práce bolo porovnať zmeny v enzýmových aktivitách ceruloplazmínu – polyfenoloxidáza a ferroxidáza – v sére pacientov po transplantácii pečene. Ako ukázali výsledky našej práce, enzýmové aktivity ceruloplazmínu v postrtransplantačnom období vykazovali odlišnú dynamiku zmien. Jedným z možných vysvetlení odlišného charakteru zmien v aktivitách polyfenoloxidázy a ferroxidázy by mohol byť rozdielny stupeň saturácie apoceruloplazmínu meďou. Ferroxidázová aktivita je viac závislá od saturácie molekuly enzýmu meďou ako polyfenoloxidázová aktivita.

Kľúčové slová

Ceruloplazmín, polyfenoloxidáza, ferroxidáza, transplantácia pečene

Summary

Ceruloplasmin is a multifunctional protein with catalytic, antioxidative and transport role. The aim of our study was to compare changes in enzymatic activities of ceruloplasmin – polyphenoloxidase and ferroxidase – in sera of patients after liver transplantation. Our results showed different changes in enzymatic activities of ceruloplasmin in posttransplantation period. One of the possible explanation of different changes in enzymatic activities of polyphenoloxidase and ferroxidase is different level of saturation of apoceruloplasmin with copper ions. The activity of ferroxidase is more dependent on copper saturation than the activity of polyphenoloxidase.

Key words

Ceruloplasmin, polyphenoloxidase, ferroxidase, liver transplantation

Úvod

Ceruloplazmín je multifunkčný proteín, ktorý má v organizme katalytickú, antioxidačnú a Cu-transportnú funkciu. Jeho enzýmový charakter je unikátny, ceruloplazmín je schopný oxidovať organické aj anorganické substráty. Oxidázová aktivita ceruloplazmínu, ak sú substrátom aromatické amíny, veľmi dobre koreluje s jeho ferroxidázovou aktivitou, pričom sú redukované určité (vybrané) atómy Cu v oxidovaných miestach holoproteínu.

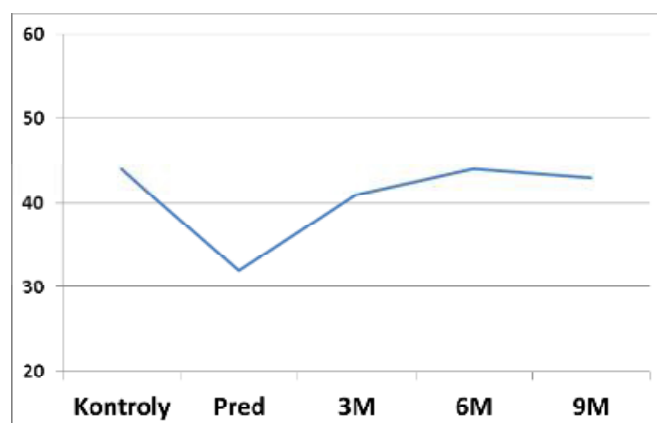
Ceruloplazmín je alfa-2-glykoproteín s molekulovou hmotnosťou 132 kDa, ktorý sa syntetizuje v hepatocytoch, kde sú atómy Cu inkorporované do holoproteínu a takto sa secernuje do cirkulácie. Všeobecne sa akceptuje, že ferrooxidázová aktivita ceruloplazmínu je spojená s jeho úlohou v homeostáze železa (1,2). Ceruloplazmín je efektívny antioxidant, pretože má schopnosť oxidovať vysokotoxické Fe^{2+} ióny na relatívne netoxické Fe^{3+} ióny a takto pomáha zabrániť oxidačnému poškodeniu bielkovín, lipidov a DNA (3,4). Ceruloplazmín patrí medzi proteíny akútnej fázy a jeho syntéza je stimulovaná prozápalovými cytokínmi. V súvislosti s tým sa uvádza aj úloha ceruloplazmínu pri rejekcii transplantátu u pacientov s transplantáciou pečene (5). Je známe, že hladiny ceruloplazmínu sú výrazne znížené v sére pacientov s cirhózou pečene. Hladiny ceruloplazmínu boli signifikantne znížené aj u pacientov s ťažkou hepatitídou (6). Pri niektorých hepatopatiách je jediným riešením v pokročilých štádiách choroby transplantácia pečene. Cieľom našej štúdie bolo zhodnotiť zmeny enzýmových aktivít ceruloplazmínu v sére u pacientov s chronickými ochoreniami pečene po transplantácii pečene.

Materiál a metódy

Súbor tvorilo 8 pacientov po transplantácii pečene (5 mužov a 3 ženy, priemerný vek 45,3 rokov). Indikáciou pre transplantáciu pečene bola primárna sklerozujúca cholangitída (2 prípady), kryptogénna cirhóza (3 prípady), cirhóza po autoimúnnej hepatitíde (1 prípad), cirhóza s kombinovanou etiológiou (2 prípady). U žiadneho z pacientov sa v posttransplantačnom období nevyskytla závažnejšia komplikácia (napr. rejekčná reakcia). Vyšetrovali sme sérum pred transplantáciou a 1, 3 a 6 mesiacov po transplantácii pečene. Zároveň sme vyšetrili skupinu zdravých dobrovoľníkov (20 osôb, priemerný vek 25,4 rokov). Polyfenoloxidázovú aktivitu ceruloplazmínu sme vyšetrovali spektrofotometrickou metódou podľa Příbyla a spol. (7) s použitím p-fenylendiamínu ako substrátu. Ferrooxidázovú aktivitu sme vyšetrovali spektrofotometrickou metódou podľa Takayanagi a Yashiro (8) s použitím komplexotvorného činidla bathofenantrolín disulfonátu. Hladina albumínu bola vyšetrovaná imunochemicky s použitím monošpecifického antiséra a hladina celkových žlčových kyselín enzymatickou metódou pomocou komerčnej diagnostickej súpravy.

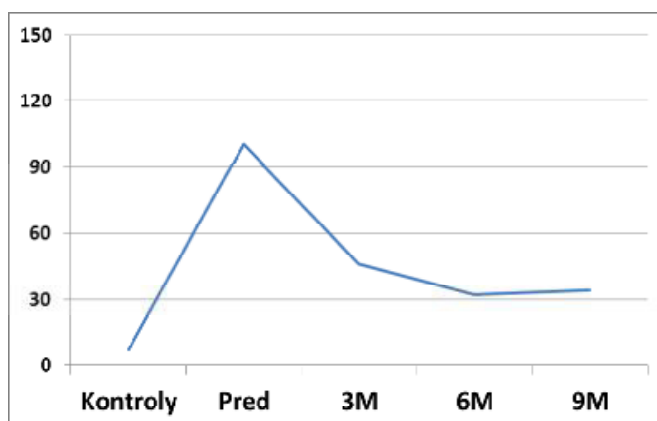
Výsledky

Okrem samotného ceruloplazmínu sme vyšetrovali u pacientov po transplantácii pečene aj hladinu albumínu ako parametra pre posúdenie proteosyntetickej funkcie pečene a hladinu celkových žlčových kyselín ako ďalšieho funkčného parametra pečene.



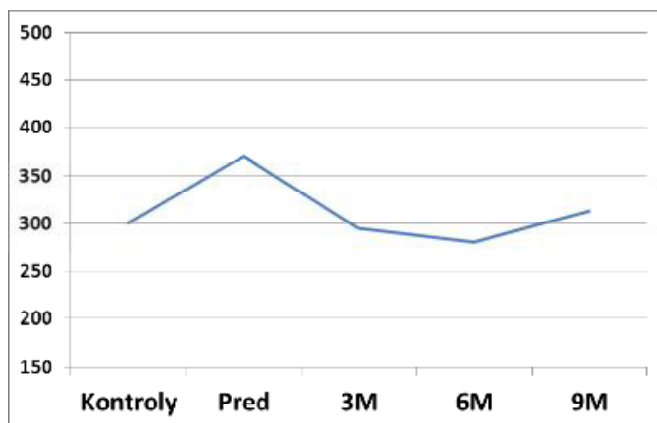
Obr.1 Hladiny albumínu v sére pacientov a v kontrolnom súbore (g.l⁻¹)

Hladina albumínu bola u pacientov pred transplantáciou pečene signifikantne znížená (44 g.l^{-1} vs. $32,6 \text{ g.l}^{-1}$) (obr.1). Po transplantácii pečene sa začala normalizovať a po 6 mesiacoch bola ako v kontrolnom súbore zdravých ľudí. Hladina celkových žlčových kyselín bola u pacientov s hepatopatiami pred transplantáciou pečene signifikantne vyššia ($7,0 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ vs. $100,4 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Po transplantácii sa výrazne znížila, ale ani 9 mesiacov po transplantácii pečene nedosiahla hodnoty v kontrolnom súbore zdravých ľudí (obr.2).



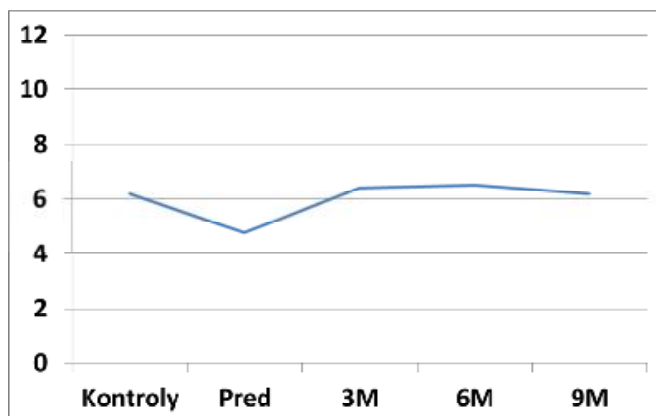
Obr.2 Hladiny celkových žlčových kyselín v kontrolnom súbore a u pacientov s hepatopatiami pred a 3, 6 a 9 mesiacov po transplantácii ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)

Vyšetrenie ceruloplazmínu na základe jeho polyfenoloxidázovej aktivity ukázalo u pacientov s ochoreniami pečene pred transplantáciou vyššie aktivity ako v súbore kontrol (300 mg.l^{-1} vs. 370 mg.l^{-1}) (obr.3 a 5).

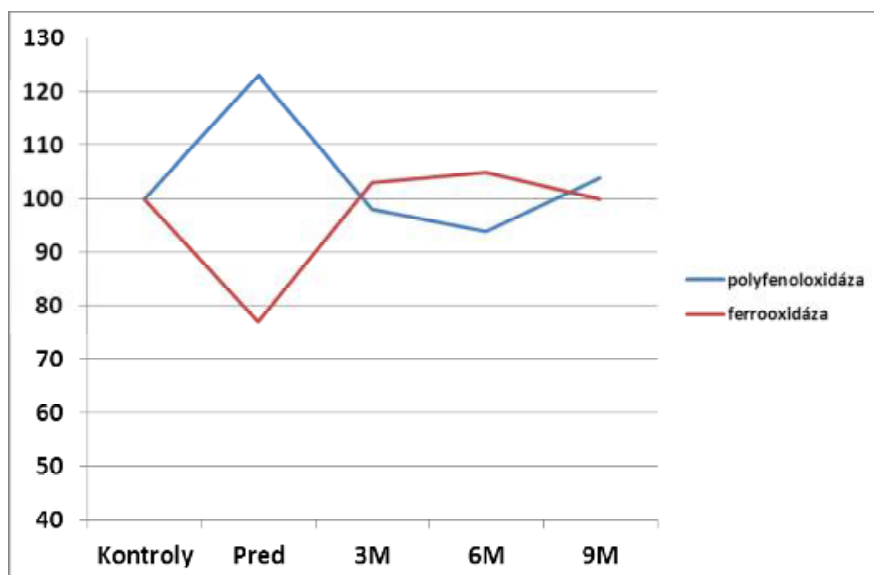


Obr.3 Aktivita polyfenoloxidázy v sére kontrol a pacientov s hepatopatiami pred a 3, 6 a 9 mesiacov po transplantácii pečene (mg.l^{-1})

Po transplantácii došlo ku normalizácii aktivity polyfenoloxidázy. V prípade aktivity ferroxidázy bola situácia opačná (obr.4 a 5). Ferroxidáza bola u pacientov pred transplantáciou pečene signifikantne znížená v porovnaní s kontrolami ($6,22 \text{ } \mu\text{kat.l}^{-1}$ vs. $4,85 \text{ } \mu\text{kat.l}^{-1}$). Po transplantácii sa jej aktivita zvyšovala a po 3 mesiacov po transplantácii už bola na hodnotách ako v kontrolnom súbore.



Obr.4 Aktivita ferroxidázy v sére kontrol a pacientov s hepatopatiami pred a 3, 6 a 9 mesiacov po transplantácii pečene ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)



Obr.5 Aktivity polyfenoloxidázy a ferroxidázy u kontrol a u pacientov s hepatopatiami pred a 3, 6 a 9 mesiacov po transplantácii pečene. Výsledky vyjadrujeme v percentách, pričom kontroly považujeme za 100%.

Diskusia

Ako ukázali výsledky našej štúdie, parametre funkcie pečene – albumín a celkové žľožové kyseliny – mali v našom súbore pacientov s hepatopatiami pred transplantáciou pečene výrazne patologické hodnoty a ich hladina sa po transplantácii pomerne rýchlo normalizovala. Pohľad na obr.5 ukazuje diskrepanciu medzi zmenami enzýmovej aktivity ceruloplazmínu vyšetrennej ako polyfenoloxidáza a ferroxidáza. Na obrázku vidíme skoro zrkadlový obraz oboch enzýmových aktivít. Zatiaľ čo aktivita polyfenoloxidázy bola pred transplantáciou signifikantne zvýšená oproti kontrole, aktivita ferroxidázy bola naopak znížená. Ich hodnoty sa v období po transplantácii postupne normalizovali.

Na základe imunochemického vyšetrenia sa nedá rozlíšiť medzi apoceruloplazmínom alebo holoceruloplazmínom, lebo pri imunochemickom vyšetrení reaguje len bielkovinová časť

molekuly a saturácia proteínu meďou nezohráva žiadnu úlohu. Na druhej strane, naviazanie medi na apoceruloplazmín je nevyhnutné pre jeho enzýmovú aktivitu (hlavne ferrooxidázu). Z literatúry je známe, že molekula ceruloplazmínu pozostáva zo šiestich domén a zo šiestich pevne viazaných atómov medi. Okrem šiestich pevne viazaných atómov medi sa na molekulu ceruloplazmínu môže viazať aj niekoľko ďalších atómov medi do celkového počtu 10. Prídavné atómy medi bývajú viazané slabými väzbami a môžu byť zapojené do transportnej funkcie ceruloplazmínu (9).

Rozdielne správanie sa ferrooxidázy a polyfenoloxidázy môže súvisieť práve s rozdielnym obsahom medi v ceruloplazmíne. Tomu by nasvedčovali aj určité rozdiely v správaní sa polyfenoloxidázy a ferrooxidázy ceruloplazmínu popísané v sére gravidných žien v priebehu tehotenstva (10). Le Lan a spol. (11) popísali u pacientov s cirhózou pečene zvýšené hladiny imunoceruloplazmínu (apoceruloplazmínu) a zníženú aktivitu ferrooxidázy.

Určitým prekvapením pre nás bol nález zvýšených aktivít polyfenoloxidázy u pacientov s hepatopatiami v období pred transplantáciou pečene v porovnaní s kontrolným súborom. Zvýšené hodnoty ceruloplazmínu u pacientov s cirhózou pečene popisuje aj Le Lan a spol. (11). Zvýšenie hladiny ceruloplazmínu u pacientov s chronickými hepatopatiami by mohlo mať viacero dôvodov: (a) je známe, že u pacientov s chronickými hepatopatiami dochádza ku zníženiu degradácie estrogénov v poškodennej pečeni a ku následnému zvýšeniu ich koncentrácie v cirkulácii. O estrogénoch je známe, že stimulujú syntézu ceruloplazmínu (10, 12). (b) nekroticko-zápalová aktivita v tkanive pečene je u pacientov s chronickými hepatopatiami výrazne zvýšená. Ceruloplazmín je proteínom akútnej fázy a prozápalové cytokíny produkované lokálne v parenchýme pečene môžu stimulovať syntézu ceruloplazmínu. (c) hypoxia, ku ktorej dochádza pri chronických hepatopatiách v tkanive pečene, môže stimulovať zvýšenie hladiny mRNA pre ceruloplazmín, čo sa prejaví jeho zvýšenou produkciou (13).

Pri ťažšom poškodení pečene tak môže byť ešte syntéza apoceruloplazmínu vďaka stimulácii zachovaná na fyziologickej úrovni alebo dokonca zvýšená, ale zabudovanie medi do molekuly apoceruloplazmínu viazne a preto jeho enzýmová je znížená. Tvorí sa tak nefunkčný ceruloplazmín. Roxborough a spol. (14) popísali u pacientov s renálnou insuficienciou znížené aktivity ferrooxidázy, zatiaľ čo hladina apoceruloplazmínu nebola znížená.

Dostatočná aktivita ferrooxidázy vyžaduje dobrú syntézu apoceruloplazmínu a dostatočnú inkorporáciu medi do molekuly proteínu na vytvorenie plne funkčného holoceruloplazmínu (15). Je možné, že u pacientov po transplantácii pečene nedochádza hneď k úplnej saturácii apoceruloplazmínu meďou, čo by mohlo vysvetliť postupné zvyšovanie aktivity ferrooxidázy v posttransplantačnom období.

Technická spolupráca: E.Hederová

Literatúra

1. **Mukhopadhyay CK, Attieh ZK, Fox PL.** Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science* 1998; 279: 714-717.
2. **Young SP, Fahmy M, Golding S.** Ceruloplasmin, transferrin and apotransferrin facilitate iron release from human liver cells. *FEBS Lett* 1997; 411: 93-96.
3. **Gutteridge JM.** Antioxidant properties of ceruloplasmin towards iron- and copper-dependent oxygen radical formation. *FEBS Lett* 1983; 157: 37-40.
4. **Miyajima H, Takahashi Y, Serizawa M, Kaneko E, Gitlin JD.** Increased plasma lipid peroxidation in patients with aceruloplasminemia. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 757-760.

- 5. Pan TL, Chen CL, Lin CL, Lai CY, Tseng HP et al.** Ceruloplasmin, novel candidate as a diagnostic marker for liver function after liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 2000; 32: 2198.
- 6. Yang X, Tong DJ, Liang J, Zhang YH, Lei JH et al.** Ceruloplasmin level of patients with liver disease in China. *Zhonghua Nie Ke Za Zhi* 2006; 44 (1):13-15.
- 7. Příbýl T.** Serum polyphenol oxidase activity (ceruloplasmin) in conventional laboratory animals and man. *Folia Biol (Praha)* 1978; 24 (2): 136-141.
- 8. Takayanagi M, Yashiro T.** Determination of human serum ceruloplasmin based on its ferroxidase activity. *Jpn J Clin Chem* 1985; 14: 233-238.
- 9. Healy J, Tipton K.** Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm* 2007; 114 (6): 777-781.
- 10. Uhlíková E, Sotáková L, Divéky E, Netriová J, Božek P, Kupčová V, Turecký L.** Med' a enzymová aktivita ceruloplazmínu v sére v priebehu gravidity. 186-194. In: Kubíková E, Weismann P, Cingel' V (Eds). *Anatomické štruktúry a laparoscopia*. Bratislava; Vydavateľstvo Únia, 2013.
- 11. Le Lan C, Ropert M, Lainé F, Medevielle M, Jard Ch et al.** Serum ceruloplasmin and ferroxidase activity are not decreased in hepatic failure related to alcoholic cirrhosis: Clinical and pathophysiological implications. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28 (5): 775-779.
- 12. Song S, Chen JK, Yang PJ, He ML, Li LM, Fan BC, Rekers H, Fotherby K.** A cross-over study of three oral contraceptives containing ethinyloestradiol and either desogestrel or levonorgestrel. *Contraception* 1992; 45 (6): 523-532.
- 13. Mukhopadhyay CK, Mazumber B, Fox PL.** Role of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem* 2000; 275: 21048-21054.
- 14. Roxborough HE, Mercer C, McMaster D, Maxwell AP, Young IS.** The ferroxidase activity of caeruloplasmin is reduced in haemodialysis patients. *Nephron* 2000; 84 (3): 211-217.
- 15. Sato M, Gitlin JD.** Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J Biol Chem* 1991; 266: 5128-5134.

SÉROVÁ CHOLÍNESTERÁZA A OBSAH TRIACYLGLYCEROLOV V PEČENI PRI STEATÓZE

(Serum cholinesterase and liver triacylglycerols in fatty liver disease)

Ladislav Turecký¹, Jana Muchová¹, Ol'ga Otrubová², Monika Ďurfinová¹, Eva Uhlíková¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK, Sasinkova 2, 81108 Bratislava a ²Klinika pracovného lekárstva a toxikológie LFUK Bratislava
ladislav.turecky@fmed.uniba.sk

Súhrn

Cholinesteráza je hydrolytický enzým syntetizovaný v pečeni a vylučovaný do cirkulácie. Fyziologická funkcia cholinesterázy nie je presne známa, ale zvýšené aktivity tohto enzýmu boli popísané u pacientov s obezitou a hyperlipoproteinémiou. Cieľom našej práce bolo sledovať zmeny v sérových aktivitách cholinesterázy u zvierat s CCl₄-poškodením pečene. Výsledky našej štúdie ukázali, že aktivita cholinesterázy sa v sére experimentálnych zvierat štatisticky významne zvyšovala. Zistili sme aj signifikantný vzostup množstva triacylglycerolov v pečeni experimentálnych zvierat. Regresná analýza ukázala dobrú koreláciu medzi sérovou aktivitou cholinesterázy a obsahom triacylglycerolov v pečeni vyšetrovaných zvierat. Na základe našich výsledkov môžeme predpokladať, že aktivita sérovej cholinesterázy by mohla byť relatívne užitočným markerom steatózy pečene.

Kľúčové slová

Cholinesteráza, tetrachlórmetán, steatóza pečene, poškodenie pečene, triacylglyceroly

Summary

Cholinesterase is an enzyme that is synthesized in the liver and secreted into the blood. The physiological function of cholinesterase is unknown, but high serum activities have been observed in patients with obesity and hyperlipoproteinemia. The aim of our contribution was to study changes of serum cholinesterase activities in animals with CCl₄-damaged liver. The results of our study showed that the activities of cholinesterase were increased in animals with experimental hepatopathy. There was also significant increase in content of liver triacylglycerols in experimental animals. Regression analysis showed significant correlation between liver triacylglycerols and serum cholinesterase. We anticipate that serum cholinesterase could be useful marker of liver steatosis.

Key words

Cholinesterase, tetrachlormethan, fatty liver disease, liver damage, triacylglycerols

Úvod

Sérová cholinesteráza (EC 3.1.1.8, pseudocholinesteráza, BChE) je sekrečný enzým syntetizovaný v pečeni a vylučovaný do krvi. Nejde o jeden enzým, ale o skupinu viacerých izoenzýmov. Cirkulujúci enzým vystupuje ako tetramér zložený zo 4 identických

podjednotiek a s m.h. 342 kDa (1). BChE patrí do rodiny α - β -hydroláz, ktoré majú centrálnu podjednotku v podobe β -skladaného listu, ktorá je obklopená podjednotkami v tvare α -helixu. BChE kóduje gén na chromozóme č.3 v polohe 3q26.1-26.2, ktorý má 4 exóny. Fyziologická funkcia sérovej cholinesterázy nie je dosiaľ známa. BChE je schopná hydrolyticky štiepiť rôzne hydrofilné aj hydrofóbne estery cholínu (2) a je dobre známe, že sa podieľa aj na hydrolýze viacerých xenobiotík ako sú napr. sukcinylcholín, mivacurium, prokaín, chlorprokaín, tetrakaín, kokaín a heroín (1). Vyšetrenie aktivity sérovej cholinesterázy sa v klinickej praxi využíva ako parameter na posúdenie proteosyntetickej funkcie pečene. Zmeny v sérových hladinách albumínu a protrombínu dobre korelovali so zmenami aktivity BChE čo naznačuje, že vyšetrenie aktivity tohto enzýmu sa môže použiť na posúdenie proteosyntetickej kapacity pečene parenchýmu (3). Pokles sérovej aktivity cholinesterázy bol pozorovaný pri ochoreniach pečene ako sú hepatitída, cirhóza alebo nádorové postihnutie pečene (1). Pokles v rozsahu 30-50% bol pozorovaný u pacientov s akútnou a chronickou hepatitídou, 50-70% pokles aktivity býva u pacientov s pokročilou cirhózou pečene alebo s nádorovým postihnutím pečene. Vyšetrovanie aktivity cholinesterázy sa používa aj na monitorovanie funkcie pečene po transplantácii pečene. Opakované vyšetrovanie cholinesterázy má aj prognostický význam, keď pokles pod 25% fyziologických hodnôt je spojený s vysokým rizikom smrti.

V našej práci nás zaujímala možnosť využitia vyšetrenia aktivity sérovej cholinesterázy na posúdenie funkcie pečene pri experimentálnom tetrachlórovom poškodení pečene.

Materiál a metódy

Experimentálne podmienky

V pokuse boli použité potkany kmeňa Wistar-samce, vo veku 5-6 týždňov. Experiment trval 10 týždňov. Skupina s experimentálnym tetrachlórovým poškodením pečene dostávala intraperitoneálne 50% roztok CCl_4 v olivovom oleji v dávke 1 ml/kg telesnej hmotnosti dvakrát týždenne v priebehu 10 týždňov. Zvieratá mali voľný prístup k vode. Po skončení pokusu boli zvieratá usmrtené v celkovej anestéze. Z pečene experimentálnych zvierat sme pripravili 10% (w/v) homogenát vo vychladenom izotonickom $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ roztoku sacharózy s obsahom 1 mmol.l^{-1} EDTA, ktorého pH sme upravili na hodnotu 7,3-7,4 pomocou roztoku hydroxidu sodného. Tkanivo sme homogenizovali v Potter-Elvehjemovom homogenizátore s teflonovým piestom.

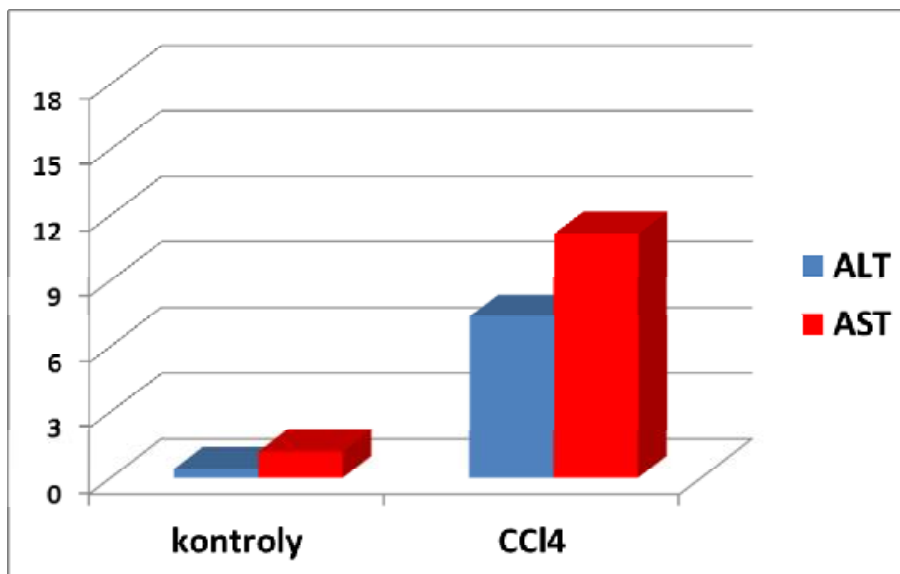
Použité analytické metódy

Sérové hladiny albumínu ako aj aktivity alanínaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST) boli stanovené bežnými komerčnými metódami. Aktivitu cholinesterázy sme stanovovali spektrofotometrickou metódou s použitím butyryltiocholínjodidu ako substrátu. Uvoľnený tiocholínjodid reaguje s dithiobisnitrobenzoátom za vzniku 2-nitro-5-merkaptobenzoátu (4). Obsah triacylglycerolov v pečeni bol stanovený enzymatickou metódou.

Matematické spracovanie výsledkov sme robili pomocou programov SSPE a Statgraphics. Štatistickú významnosť rozdielov medzi oboma súbormi sme vyhodnocovali pomocou neparametrického Wilcoxonovho testu.

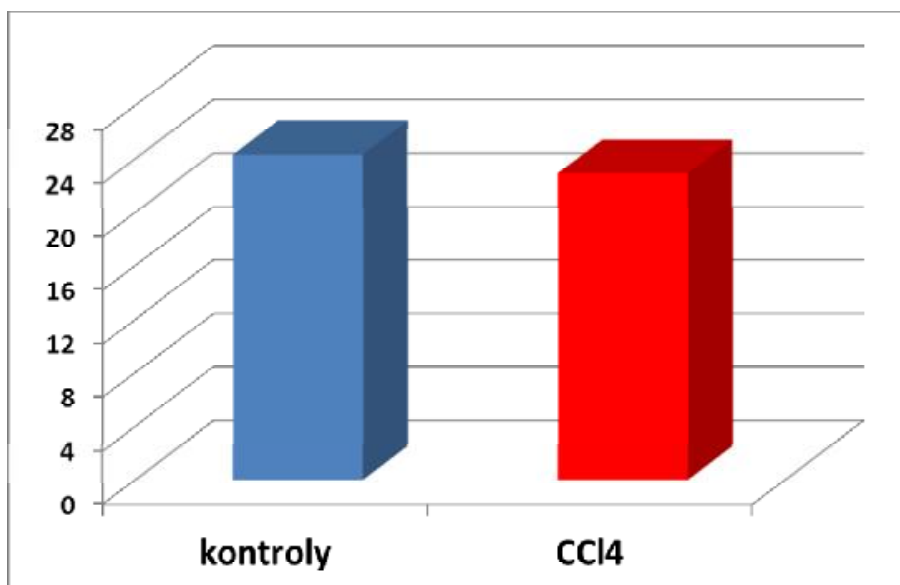
Výsledky

Ako ukázali výsledky vyšetrenia sérových enzýmov poukazujúcich na poškodenie hepatocytov, aktivít aminotransferáz ALT a AST, v skupine zvierat s CCl_4 -poškodením pečene dochádzalo ku vysoko signifikantnému zvýšeniu aktivít oboch aminotransferáz (ALT: $0,4$ vs. $7,33 \text{ } \mu\text{kat.l}^{-1}$, $P < 0,001$ a AST: $1,18$ vs. $11,13 \text{ } \mu\text{kat.l}^{-1}$, $P < 0,001$) (obr.1).



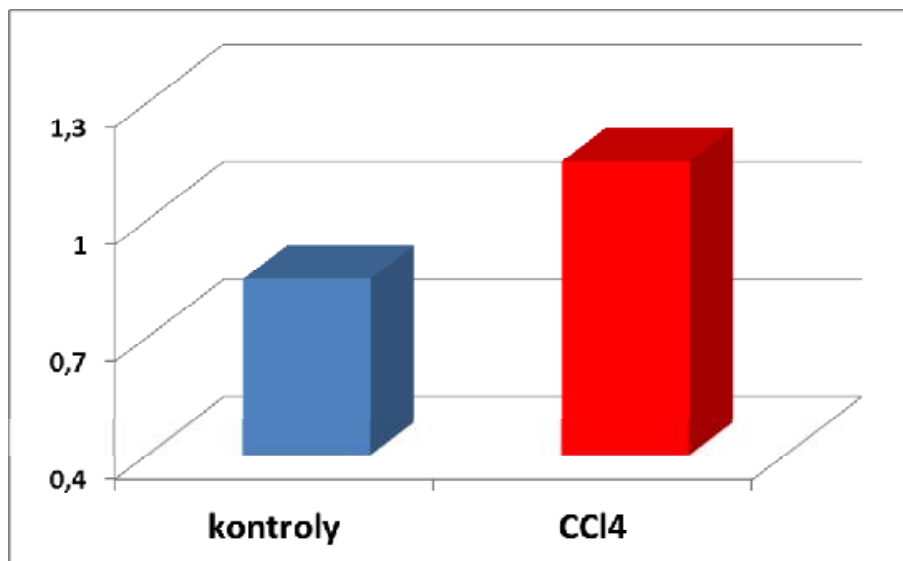
Obr.1 Aktivity ALT a AST v sére kontrolných zvierat a zvierat s CCl_4 -poškodením pečene. Výsledky vyjadrujeme v $\mu\text{kat.l}^{-1}$.

Vyšetrenie parametrov funkcie pečene – albumínu a sérovej cholinesterázy – ukázalo mierne, avšak štatisticky nevýznamné zníženie hladiny albumínu v sére experimentálnych zvierat oproti kontrolám (obr.2).



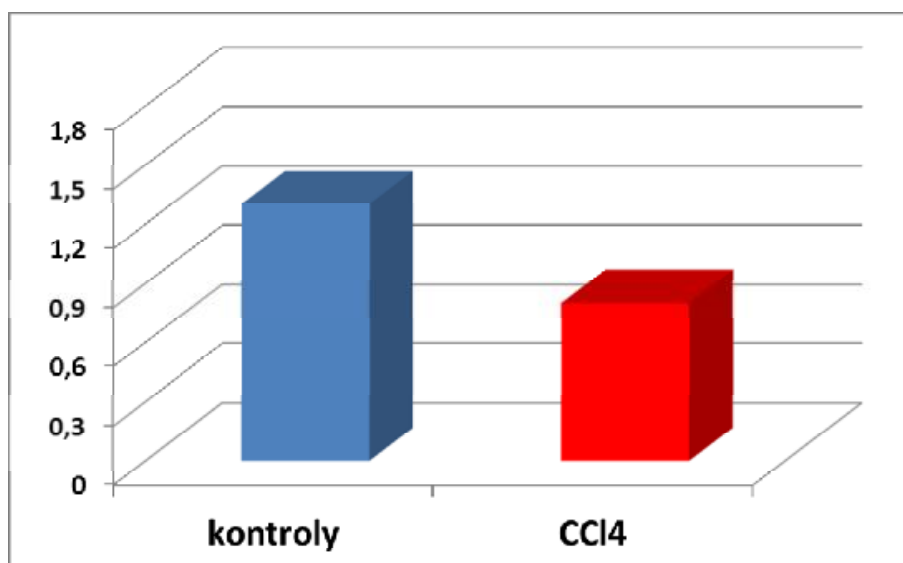
Obr.2 Hladiny albumínu v sére kontrolných zvierat a zvierat s CCl_4 -poškodením pečene. Výsledky vyjadrujeme v g.l^{-1} .

V prípade sérovej cholinesterázy sa ukázalo, že v skupine zvierat s CCl_4 -poškodením pečene dochádzalo ku vzostupu aktivity vyšetrovaného enzýmu. Aktivita BChE sa zvyšovala o 35% oproti kontrolám, pričom tento vzostup bol štatisticky významný ($P < 0,05$) (obr.3).

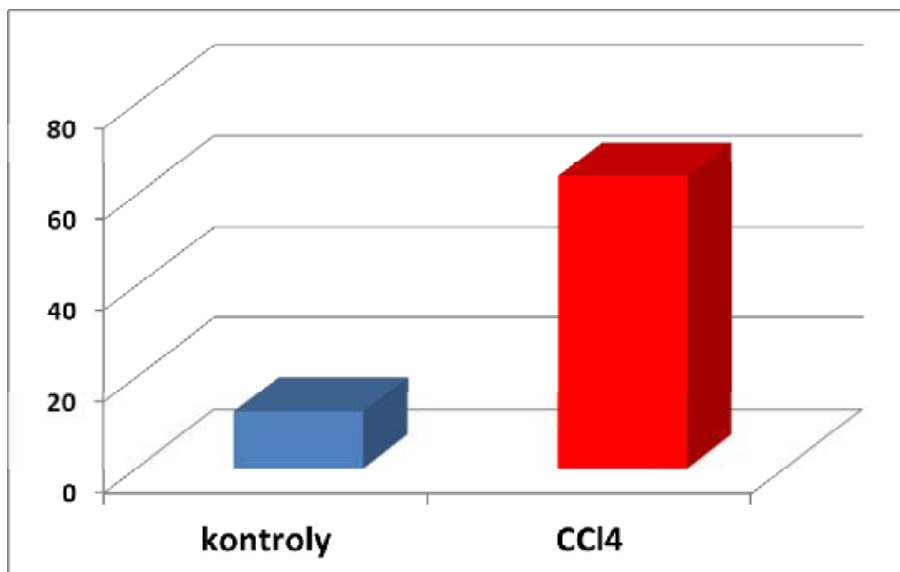


Obr.3 Aktivita cholinesterázy v sére kontrolných zvierat a zvierat s CCl₄-poškodením pečene. Výsledky vyjadrujeme v $\mu\text{kat.l}^{-1}$.

Hladinu triacylglycerolov sme vyšetrovali ako v sére, tak aj v tkanive pečene. V sére dochádzalo ku signifikantnému poklesu hladiny triacylglycerolov (1,3 vs. 0,8 mmol.l^{-1} , $P < 0,05$)(obr.4). V pečeni zvierat s CCl₄-poškodením pečene sme zaznamenali výrazný vzostup obsahu triacylglycerolov (12,44 vs. 64,0 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, $P < 0,001$)(obr.5).



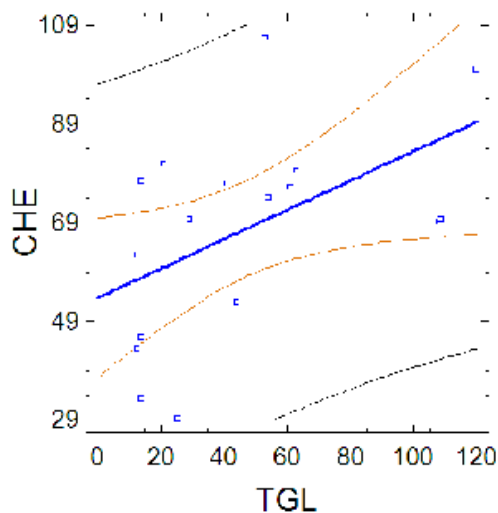
Obr.4 Hladina triacylglycerolov v sére kontrolných zvierat a zvierat s CCl₄-poškodením pečene. Výsledky vyjadrujeme v mmol.l^{-1} .



Obr.5 Obsah triacylglycerolov v pečeni kontrolných zvierat a zvierat s CCl_4 -poškodením pečene. Výsledky vyjadrujeme v $\mu\text{moloch/g}$ hmotnosti pečene.

Regresná analýza závislosti aktivity sérovej cholinesterázy na obsahu triacylglycerolov v pečeni ukázala štatisticky významnú závislosť oboch parametrov ($P < 0,01$) (obr.6).

Korelacia CHE/TGL



Obr.6 Korelácia medzi sérovou aktivitou cholinesterázy a obsahom triacylglycerolov v pečeni. Štatistická významnosť $P < 0,001$.

Diskusia

Podávanie tetrachlórmétánu experimentálnym zvieratám sa používa na vyvolanie modelového poškodenia pečene, ktoré je sprevádzané okrem iného poškodením hepatocytov ako aj

ukladaním tukov v parenchýme pečene. Ako ukázalo vyšetrenie aktivity aminotransferáz AST a ALT, ktorých aktivita sa vysoko signifikantne zvyšovala, dochádzalo u experimentálnych zvierat ku poškodeniu pečene parenchýmu. Na posúdenie proteosyntetickej funkcie pečene sme použili vyšetrenie hladiny albumínu a sérovej aktivity cholinesterázy. Hladiny albumínu nevykazovali štatisticky významnú zmenu, čo sa dá pripísať skutočnosti, že zrejme nedochádzalo ku výraznejšej nekróze hepatocytov a aj tomu, že syntéza albumínu ako kvantitatívne najvýznamnejšej bielkoviny má pomerne výraznú rezervu.

Určitým prekvapením bol nález zvýšených aktivít sérovej cholinesterázy u zvierat s CCl₄-poškodením pečene, kde sme skôr očakávali jej pokles. Je známe, že cholinesteráza je vcelku dobrým ukazovateľom proteosyntetickej funkcie pečene a pri hepatopatiách sprevádzaných redukciou funkčného parenchýmu (chronické hepatitidy, cirhóza pečene) dochádza ku poklesu jej sérových aktivít. Na rozdiel od človeka, u potkana je aktivita cholinesterázy v sére výrazne nižšia (zhruba 50-krát nižšia), takže je možné, že nebude tak dobre odrážať syntetickú kapacitu pečene ako to vidíme u človeka.

Z literatúry je známe, že aktivita cholinesterázy býva zvýšená u pacientov s obezitou, hyperlipoproteinémiou aj diabetom, teda so stavmi, ktoré sú spojené s určitým stupňom steatózy pečene (5-7). Preto nás zaujímalo, či zvýšenie sérových aktivít cholinesterázy v našom súbore zvierat s tetrachlórmetánovým poškodením pečene nebude súvisieť s metabolizmom triacylglycerolov v pečeni.

Ako ukázali výsledky vyšetrenia obsahu triacylglycerolov v pečeni experimentálnych zvierat, po podávaní tetrachlórmetánu dochádzalo ku signifikantnému zvýšeniu ich obsahu v parenchýme pečene. Hladina triacylglycerolov v sére experimentálnych zvierat bola znížená. Tieto dve zistenia nasvedčujú tomu, že v poškodenej pečeni dochádza k porušeniu sekrécie VLDL z hepatocytov a k ich následnému hromadeniu v pečenej bunkách. Regresná analýza vzťahu koncentrácie triacylglycerolov v pečeni a aktivity cholinesterázy v sére exoerimentálnych zvierat ukázala vysoko signifikantnú koreláciu týchto dvoch parametrov.

Uvedený nález by mohol byť vysvetlením zvýšených aktivít sérovej cholinesterázy u zvierat s CCl₄-poškodením pečene a zároveň podporuje predpoklad o súvise medzi metabolizmom triacylglycerolov v pečeni a sérovou aktivitou cholinesterázy (8). Na základe týchto poznatkov môžeme konštatovať, že vyšetrenie sérovej aktivity cholinesterázy by mohlo byť vhodným biochemickým markerom pre posúdenie steatózy pečene.

Zhodnotením získaných výsledkov sa dá ďalej predpokladať, že poškodenie pečene tetrachlórmetánom v našej skupine experimentálnych zvierat malo v popredí viac steatotické poškodenie ako nekrózu parenchýmu pečene (len veľmi málo znížený albumín, zvýšená aktivita cholinesterázy).

Záver

V našom experimente s tetrachlórmetánovým poškodením pečene nás zaujímala možnosť vyšetrenia aktivity sérovej cholinesterázy pre posúdenie závažnosti poškodenia pečene experimentálnych zvierat. Na rozdiel od našich predpokladov, keď sme očakávali pokles aktivity BChE v sére zvierat s CCl₄-poškodením pečene, výsledky vyšetrení ukázali, že aktivita cholinesterázy v sére experimentálnych zvierat po podávaní CCl₄ sa naopak signifikantne zvyšovala. Regresná analýza vzťahu sérovej cholinesterázy a obsahu triacylglycerolov v pečeni ukázala vysoký stupeň korelácie. Na základe uvedeného možno konštatovať, že vyšetrenie sérovej aktivity cholinesterázy u potkanov nebolo dobrým parametrom pre posúdenie funkcie pečene, ale vcelku dobre odrážalo stupeň steatózy pečene.

Technická spolupráca: Eva Hederová

Literatúra

- 1. Platteborze PL.** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. In: Kazmierczak SC, Azzazy HME (eds): Diagnostic enzymology. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston 2014, 197s.
- 2. Müller TC, Rocha JB, Morsch VM, Neis RT, Schetinger MP.** Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. *Biochim Biophys Acta* 2002;1587 (1): 92-98.
- 3. Adolph L.** Diagnostische Bedeutung der Cholinesterase-Bestimmung in menschlichen Serum. *Med Wochenschr* 1979; 121: 1527-1530.
- 4. Knedel M, Böttger R.** A kinetic method for determination of the activity of pseudocholinesterase. *Klin Wschr* 1967; 45 (6): 325-327.
- 5. Lunkes GI, Stefanello F, Lunkes DS, Morsch VM, Schetinger MRC, Goncalves JF.** Serum cholinesterase activity in diabetes and associated pathologies. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 72: 28-32.
- 6. Rustemeijer C, Schouten JA, Voerman HJ, Beynen AC, Donker AJM, Heine RJ.** Is pseudocholinesterase activity related to markers of triacylglycerol synthesis in type II diabetes mellitus? *Clin Science* 2001; 101: 29-35.
- 7. Turecký L, Kupčová V, Mojto V, Smutný M, Uhlíková E, Vozár I.** Serum cholinesterase activity and proteosynthetic function of liver in patients with diabetes mellitus. *Bratisl Lek Lis* 2005; 106 (8-9): 266-269.
- 8. Nomura F, Ohnishi K, Koen H, Hiyama Y, Nakayama T et al.** Serum cholinesterase in patients with fatty liver. *J Clin Gastroenterol* 1986; 8 (5): 599-602.

VPLYV FLAVONOIDOV NA BIOTRANSFORMAČNÝ SYSTÉM CYTOCHRÓMU P-450 V PEČENI POTKANOV

(Effect of bioflavonoids on liver biotransformation system of
cytochrome P-450 in experimental animals)

Ladislav Turecký¹, Jana Muchová¹, Oľga Otrubová², Eva Uhlíková¹,

*¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK, Sasinkova 2, 81108
Bratislava, ladislav.turecky@fmed.uniba.sk, a ²Klinika pracovného lekárstva a toxikológie
LFUK v Bratislave*

Súhrn

Výživový doplnok Pycnogenol® je komplex vo vode rozpustných, biologicky dostupných a vstrebateľných látok extrahovaných z prímorskej borovice *Pinus pinaster*. Používa sa ako rastlinný výživový doplnok pri liečbe širokej škály chorobných stavov od chronických zápalov až po cirkulačné dysfunkcie. Flavonoidy nachádzajúce sa v Pycnogenole majú antioxidantné vlastnosti. Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv podávania Pycnogenolu® na enzýmové aktivity cytochrómu P-450 v pečeni experimentálnych zvierat. Podávanie Pycnogenolu® vyvolávalo signifikantný vzostup aktivity p-nitroanisol O-demetylázy a etoxykumarín O-deetylázy. Zvýšenie aktivity anilín hydroxylázy nebolo štatisticky významné. Nekontrolované užívanie takýchto výživových doplnkov, schopných indukovať biotransformačný systém, by mohlo vyvolať zmeny vo farmakokinetike rôznych liečiv, alebo dokonca indukovať toxické poškodenie organizmu.

Kľúčové slová

Pycnogenol, flavonoidy, cytochróm P-450, biotransformačný systém, deetyláza, demetyláza

Summary

The dietary supplement Pycnogenol® is a water soluble mixture of flavonoid compounds extracted from French maritime pine bark. It is utilized throughout the world as a phytochemical remedy for various diseases ranging from chronic inflammation to circulatory dysfunction. The flavonoids in Pycnogenol have antioxidant properties. The aim of our study was to analyze the effect of administration of Pycnogenol® on cytochrome P-450 enzyme activities in liver of experimental animals. Administration of Pycnogenol® induced significantly the activities of p-nitroanisol O-demethylase and ethoxycoumarin O-deethylase. The increase of activity of aniline hydroxylase was not significant. The uncontrolled use of such dietary supplements with inductive effect on biotransformation system could induce changes in pharmacokinetics of different drugs or induce toxic effects on organism.

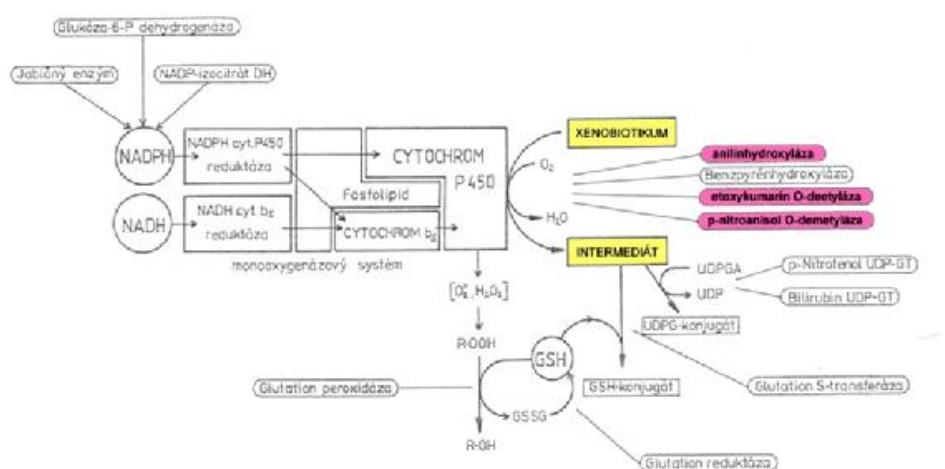
Key words

Pycnogenol, flavonoids, cytochrome P-450, biotransformation system, deethylase, demethylase

Úvod

Biotransformačné procesy v ľudskom tele majú za úlohu premeniť hydrofóbne exogénne aj endogénne látky na polárnejšie metabolity ako bola východisková látka. Zmeny chemickej štruktúry týchto látok sa uskutočňujú pomocou enzýmov katalyzovaných biotransformačných reakcií, ktoré vo svojom dôsledku zapríčiňujú obvykle stratu biologického účinku, teda detoxikáciu. Metabolizmus xenobiotík však nevyústi vždy do neúčinného metabolitu. Z niektorých látok vznikajú metabolity s rovnakými alebo podobnými vlastnosťami ako mali pôvodné látky a v niektorých prípadoch môže mať biotransformácia za následok vznik biologicky aktívneho a niekedy aj toxického metabolitu. Teda okrem bežnej biodetoxikácie podmienenej biotransformačnými reakciami, poznáme aj viaceré prípady bioaktívácie, kedy biotransformačný proces má za následok vznik aktívneho metabolitu. Stále viac sa ukazuje, že existujú látky, ktoré sa pomocou biotransformácie menia v ľudskom organizme na škodlivé, toxické produkty. Proces biotransformácie prebieha vo viacerých orgánoch ľudského tela, rozhodujúcu úlohu však zohráva pečeň. Procesy biotransformácie možno rozdeliť na dve fázy, pričom úlohou prvej fázy je vytvoriť v molekule transformovanej látky funkčné skupiny zvyšujúce jej polaritu a umožňujúce jej vstup do konjugáčnych reakcií, ktoré sú náplňou druhej fázy biotransformácie.

Základom prvej fázy biotransformácie je monooxygenázový mikrozómový systém cytochrómu P450. Kľúčovým miestom monooxygenázového systému je cytochróm P450 (EC 1.14.14.1). Už dlhšie je známe, že cytochróm P450 nie je jednotnou bielkovinou, ale že predstavuje rodinu príbuzných proteínov (1,2,3). Každá izoforma cytochrómu P450 má svoj vlastný katalytický profil, pre seba charakteristické spektrum substrátov, ktorých premenu je schopná katalyzovať (4).



Obr.1 Schéma biotransformačného systému cytochrómu P450. Vyznačené sú enzýmové aktivity cytochrómu P450 vyšetované v tejto štúdii

Flavonoidy sú prírodné látky, medzi ktoré patria napr. oligoméne proantokyanidíny, polyfenolové kyseliny, katechíny a ďalšie flavonoly. V mechanizme ich biologickej aktivity sa uplatňujú ich antioxidačné schopnosti, schopnosť chelátovo viazať redoxne aktívne prechodné prvky a iné biomodulačné účinky. Pycnogenol® je štandardizovaný extrakt

izolovaný z kôry borovice *Pinus pinaster*. Je to zmes vo vode rozpustných flavonoidov a ďalších polyfenolov. Hlavnou zložkou sú prokyanidíny a fenolové kyseliny, ktoré predstavujú 65-75% z celkového množstva látok v extrakte (5,6). Na Slovensku je registrovaný a dostupný ako výživový doplnok.

Cieľom našej štúdie bolo otestovať vplyv podávania Pycnogenolu® na aktivitu biotransformačného systému pečene, hodnotenú na základe vyšetrenia enzýmových aktivít cytochrómu P450.

Experimentálne podmienky a použité metódy

V pokuse boli použité potkany kmeňa Wistar-samce, vo veku 5-6 týždňov. Experiment trval 10 týždňov. Kontrolná skupina dostávala počas celej doby len štandardnú potravu. Pycnogenolová skupina dostávala Pycnogenol® v dávke 50 mg/kg hmotnosti denne počas 10 týždňov. Zvieratá mali voľný prístup k vode. Po skončení pokusu boli zvieratá usmrtené v celkovej anestéze. Z pečene experimentálnych zvierat sme pripravili 10% (w/v) homogenát vo vychladenom izotonickom $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ roztoku sacharózy s obsahom 1 mmol.l^{-1} EDTA, ktorého pH sme upravili na hodnotu 7,3-7,4 pomocou roztoku hydroxidu sodného. Tkanivo sme homogenizovali v Potter-Elvehjemovom homogenizátore s teflonovým piestom.

Použité metódy

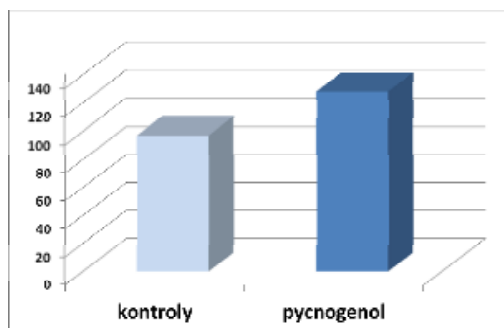
Aktivitu ethoxykumarín O-deetylázy sme stanovovali spektrofotometricky podľa metódy Aitia (7), ktorú sme modifikovali nahradením NADPH-generujúceho systému typu izocitrát/izocitrátdehydrogenáza systémom glukóza-6-fosfát/glukóza-6-fosfát dehydrogenáza. Meranie fluorescence sme robili na spektrofotometri KONTRON SFM 23.

Stanovenie aktivity p-nitroanisol O-demetylázy sme stanovovali metódou podľa Nettera a Seidela (8) v našej modifikácii, pri ktorej sme NADPH nahradili NADPH-generujúcim systémom. Metóda je založená na demetylácii p-nitroanisolu za vzniku p-nitrofenolu. p-nitrofenol dáva v alkalickom prostredí žlté sfarbenie, intenzita ktorého je úmerná množstvu vzniknutého p-nitrofenolu.

Aktivitu anilínhydroxylázy sme stanovovali spektrofotometricky metódou podľa Winstona a Narayana (9) v našej modifikácii. Anilínhydroxyláza katalyzuje premenu anilínu za vzniku 4-aminofenolu, ktorý reakciou s fenolom v zásaditom prostredí dáva modro sfarbený produkt. Matematické spracovanie výsledkov sme robili pomocou programov SSPE a Statgraphics. Štatistickú významnosť rozdielov medzi oboma súbormi sme vyhodnocovali pomocou neparametrického Wilcoxonovho testu.

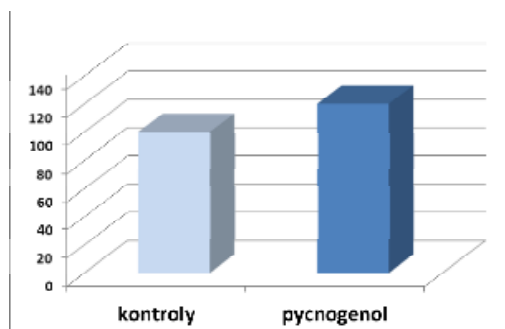
Výsledky

Ako ukázali výsledky vyšetrenia enzýmových aktivít cytochrómu P-450 v našom pokuse, podávanie preparátu Pycnogenol® vyvolalo zvýšenie aktivity všetkých troch vyšetrovaných enzýmov.

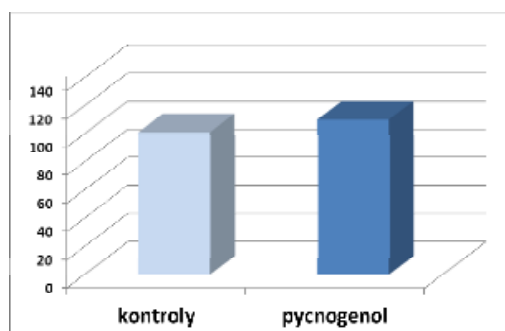


Obr.2 Aktivita p-nitroanisol O-demetylázy v pečeni kontrolných zvierat a po podávaní Pycnogenolu®, rozdiel je štatisticky významný ($P < 0,03$)

Najvýraznejší vzostup sme zaznamenali v prípade p-nitroanisol O-demetylázy (132% vs. 100%, $P < 0,03$). Signifikantný vzostup sme zaznamenali aj pri vyšetrení aktivity etoxykumarín O-deetylázy (120% vs. 100%, $P < 0,05$). Zvyšovala sa aj aktivita tretieho vyšetřovaného enzýmu – anilínhydroxylázy – aj keď toto zvýšenie nebolo štatisticky významné (109% vs. 100%, NS). (obr.2-4)



Obr.3 Aktivita etoxykumarín O-deetylázy v pečeni kontrolných zvierat a po podávaní Pycnogenolu®, rozdiel je štatisticky významný ($P < 0,05$)



Obr.4 Aktivity anilínhydroxylázy v pečeni kontrolných zvierat a po podávaní Pycnogenolu®, zvýšenie nebolo štatisticky významné

Diskusia

Nález zvýšených hodnôt enzýmových aktivít cytochrómu P-450 po podávaní Pycnogenolu® svedčí pre indukciu monooxygenázového systému cytochrómu P-450. Rozdielny efekt podávania bioflavonoidov na jednotlivé enzýmové aktivity poukazuje na to, že Pycnogenol® indukoval len niektoré izoformy cytochrómu P-450, čo spôsobilo rozdielne zmeny v jeho enzýmových aktivitách.

Indukcia biotransformačného systému cytochrómu P-450 Pycnogenolom sama o sebe nemusí znamenať pre človeka užívajúceho tento preparát žiaden závažnejší problém. Na druhej strane si treba uvedomiť, že monooxygenázový systém cytochrómu P-450 predstavuje účinnú metabolickú dráhu, v ktorej sa môže metabolizovať celý rad endogénnych aj exogénnych látok. Mnohé xenobiotiká sú metabolizované prostredníctvom cytochrómu P-450, čo má za následok vo väčšine prípadov ich biologickú inaktiváciu. Na druhej strane treba však mať na zreteli, že niektoré látky sa stávajú až po prechode cez monooxygenázový systém biologicky aktívne, ba dokonca môžu byť až toxické. Veľa liekov sa metabolizuje v tele práve

prostredníctvom cytochrómu P-450, čo ovplyvňuje aj ich biologický polčas a výšku ich hladiny v krvi.

Výživové doplnky, ako je napr. aj Pycnogenol, si pacient môže bez problémov zakúpiť v lekárni sám. V prípade, že užíva nejaké lieky a ošetrojúcemu lekárovi túto skutočnosť neoznami, tak v prípade, že výživový doplnok ovplyvní aktivitu biotransformačného systému, môže dôjsť ku zmene farmakokinetiky užívaného liečiva, čo sa môže prejavovať buď jeho rýchlejším odbúraním a inaktiváciou, čo znižuje jeho účinnú hladinu v krvi, alebo naopak môže dôjsť ku zvýšenej tvorbe aktívneho metabolitu, ktorý môže mať pri vyšších hladinách dokonca toxické účinky.

Takýmto spôsobom by mohlo dôjsť aj ku vážnejšiemu poškodeniu zdravotného stavu pacienta. Preto by mali byť aj preparáty typu výživových doplnkov otestované aj na ich vplyv na proces biotransformácie, aby bolo zrejmé, aké účinky ich užívanie prináša. Na druhej strane by mal pacient informovať svojho ošetrojúceho lekára, či náhodou neužíva nejaké výživové doplnky. Tým, že pacienti často nepovažujú takúto informáciu za dôležitú, mal by sa aj sám lekár aktívne informovať, či pacient náhodou neužíva takéto preparáty, ktoré by potom mohli ovplyvniť priebeh samotnej liečby.

Záver

Podávanie bioflavonoidov v preparáte Pycnogenol® spôsobovalo v pečeni experimentálnych zvierat miernu, ale významnú indukciu monooxygenázového systému cytochrómu P-450. Nekontrolované užívanie takýchto preparátov by mohlo ovplyvniť či už farmakokinetiku liekov, ktoré pacienti užívajú, alebo v prípade niektorých potenciálne toxických látok, ktoré sú potom vo zvýšenej miere aktivované, aj poškodenie zdravotného stavu pacienta.

Technická spolupráca: Eva Hederová

Literatúra

- 1. Guengerich FP.** Cytochrome P-450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008; 21 (1): 70-83.
- 2. Guengerich FP.** Characterization of human cytochrome P-450 enzymes. *FASEB J* 1992; 6 (2): 745-748.
- 3. Guengerich FP.** Characterization of human microsomal cytochrome P-450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989; 29: 241-264.
- 4. Guengerich FP, Umbenhauer DR, Churchill PF, Beaune PH, Böcker R, Knodell RG, Martin MV, Lloyd RS.** Polymorphism of human cytochrome P-450. *Xenobiotica* 1987; 17 (3): 311-316.
- 5. Rohdewald P.** A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Therapeut* 2002; 40: 158-168.
- 6. Grimm T, Skrabala R, Chovanová Z, Muchová J, Sumegová K, Liptáková A, Duracková Z, Högger P.** Single and multiple dose pharmacokinetics of marine pine bark extract (Pycnogenol) after oral administration to healthy volunteers. *BMC Clin Pharmacol* 2006; 6: 4.
- 7. Aitio A.** A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal Biochem* 1978; 85: 488-491.
- 8. Netter KJ, Seidel G.** An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 1964; 146: 61-65.
- 9. Winston GW, Narayan S.** Alteration of liver microsomal monooxygenases and substrate competition with aniline hydroxylase from rats chronically fed low-fat and high-fat-containing alcohol diets. *J Biochem Toxicol* 1988; 3: 191-212.

VYUŽITIE PODTLAKOVÉHO ODSÁVANIA Z RANY JEDNORÁZOVÝM PRENOSNÝM SYSTÉMOM PICO (SMITH & NEPHEW) NA LIEČBU RÁN PO ZLOMENINÁCH

(Management of distal humerus fractures in adults)

Jozef Barinka¹, Radoslav Zamborský^{1,2}, Dominika Rusnáková², Melinda Takácsová^{2,3}

¹Klinika úrazovej chirurgie LF SZU a UNB, Limbová 5, 833 05 Bratislava, Slovensko, jozefbarinka@gmail.com

²Anatomický ústav LF UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovensko

³Anatomický ústav LF SZU, Limbová 14, 833 03 Bratislava, Slovensko

Súhrn

Využitie podtlakového odsávania z rany je rozšírenou metódou ako liečiť komplikácie hojenia rán. Jej využitie je rozšírené prevažne formou kontinuálneho odsávania, krytie musí byť spojené z odsávacím prístrojom, pacienti musia byť hospitalizovaní na oddeleniach, ich mobilizácia je obmedzená.

V našej práci sme sa za práve preto zamerali na použitie nového jednorazového, prenosného prístroja PICO od firmy Smith & Nephew, ktorý umožňuje liečbu rán aj ambulantnou formou a možnosť výrazne zlepšenie mobilizácie pacienta. Za obdobie jedného roka sme ošetrili danou metódou 8 pacientov. Krytie sme ihneď po prepustení použili iba 2x, ostatní m pacientom bolo krytie použité na ranu až v neskoršom období 1 mesiac a viac od prepustenia. Danou metódou sme liečili prevažne rany vzniknuté až po vybratí stehov. Z výsledkov vyplýva že najčastejšie sme vymenili krytie 2x počas liečby, a čas medzi výmenami bol 7 dní. Všetky rany sa zhojili bez ďalšieho rozvoja komplikácie, v polovici prípadov bolo ešte nutné dohodenie pomocou iných metód vlhké krytie, Ialugen krém, Activo tube, Actilite krytie. Počas liečby nedošlo ani raz k zlyhaniu systému odsávania. Všetci pacienti tolerovali danú metódu. Zo záveru vyplýva že využitie danej metódy má veľký potenciál, ďalšie pokračovanie štúdie bude treba, vzhľadom na malý počet pacientov.

Kľúčové slová

Podtlakové odsávanie z rany, PICO, liečba rán

Summary

Negative pressure wound therapy is an advanced reliable method in treatment of wound healing complications. The conventional system works on continuous suction, under the vacuum dressings connected to the suction device, but there is a need of hospitalization and limitations in mobility.

In our research we have been focused on the new single, portable-negative pressure wound therapy system - PICO (Smith & Nephew), which allows outpatient treatment and allows

early mobility of the patients. For a period of one year we have experience with this system in treatment of eight patients. Immediate cover dressing was used only twice after discharge, the other patients were treated in a later period of one month or more after discharge from the hospital. We have used the PICO system mostly for the complications of the wounds after the stitches removal and the results indicates that we have changed the dressings 2x in average in one patient and the interval between changes was 7 days in average. All wounds healed completely without further complications, in 50% of cases the other methods of wet dressings - Ialugen cream, Activo tube, Actilite dressing were still necessary to use. No failure of the system was recorded and all patients tolerated it well. In conclusion the new system PICO shows the great potential, but the number of patients is still limited, therefore we need more prospective studies.

Key words

Negative pressure wound therapy, PICO, wound healing

Úvod

Využitie podtlaku a odsávania z rany v liečbe rán (*negative pressure wound therapy* – NPWT) nie je až tak nová metóda, jej prvé využitie sa datuje od 90-tých rokov minulého storočia, kedy bol prvýkrát zaregistrovaný prístroj firmy KCI na liečbu rán riadeným podtlakom, ktorý dostal názov V. A. C. - *vacuum assisted closure* (1,4). Prvé využitie v liečbe zložitých rán sa postupom času výrazne rozšírilo. Dostupnosť, účinnosť, jednoduchosť a pomerne dobré krátkodobé výsledky, vznik „generických“ nahrad pôvodného systému viedol k využitiu na liečbu rozličných typov rán (1,3,4). V posledných rokoch sa stal takmer štandardom používanie podtlakového odsávania na výrazne znečistené rany, rozsiahle rany ktoré neumožňujú primárnu chirurgickú súťuru (2,3,4). V poslednom období začal byť dopyt po možnosti zmenšenia odsávacích prístrojov, a možnosti prenosnosti prístroja, možnosti včasnej mobilizácie pacienta. Pri liečbe rán podtlakom musí byť pacient napojený na odsávacie prístroje, ktoré sú pomerne robustné a neprenosné, treba opakovane vymieňať odsávacie nádoby, pacient ktorý by mohol byť mobilizovaný je limitovaný a viac-menej pripútaný k lôžku (5,7). Vzhľadom na túto skutočnosť firma Smith & Nephew ako prvá prišla na náš trh s novým systémom PICO, ktorý nepotrebuje odsávací kanister, odsávací prístroj sa zmenšil na veľkosť dlane, je možnosť prenášania prístroja bez prerušenia kontinuálneho podtlaku, pacient s týmto systémom už nemusí byť hospitalizovaný na oddeleniach nemocníc, liečba môže pokračovať v domácom prostredí, stačia iba ambulantné kontroly (6).

Materiál a metódy

V našej práci sme sa zamerali na sledovanie využitia prenosného jednorazového systému odsávania z rany (PICO). Systém bol použitý na pacientoch z ranami po zlomeninách a operačných výkonoch, osteosyntézach na Klinike úrazovej chirurgie – LF SZU a Univerzitnej Nemocnici v Bratislave. Pacienti boli indikovaní na tento typ liečby podľa rozsahu rany, veľkosti znečistenia a množstva sekrétu vyprodukovaného ranou, ako aj perspektívnej možnosti včasnej mobilizácie. Analyzovaní pacienti boli sledovaní v období jedného roka od 08.01.2014-08.01.2015.

Systémom PICO bola rana prvýkrát ošetrovaná na ambulantnej kontrole, následne bol pacient v časových intervaloch 3,7 dní kontrolovaný, rana bola preväzovaná, podľa nutnosti došlo k výmene krytia PICO, alebo jeho zrušeniu. Ďalšie pokračovanie v liečbe odsávaním pomocou PICO bolo indikované vzhľadom na stav rany, pri stave ktorý už nevyžadoval odsávanie bolo indikované dohojenie bez nutnosti odsávania. Ďalšie dohojenie rany bolo vykonané pomocou krémov ev. suchého dohojenie bez nutnosti aplikovania ďalších látok.

Všetci pacienti a výsledky liečby boli následne vyhodnotené.

Výsledky

Za obdobie jedného roka 08.2014 - 08.2015 bolo ošetrovaných 8 pacientov z ranou po zlomenine, po operácií, alebo aj bez operácie pomocou prenosného systému PICO, z toho 7 pacientov malo jednu ranu ošetrovanú a jeden pacient mal dve rany ošetrované na tej istej končatine. Z celkového počtu 8 pacientov bolo 5 žien a 3 muži, priemerný vek bol 58 rokov, najmladší pacient mal 25 rokov, najstarší 89. 7 pacientov bolo po zlomenine a operácií (osteosyntéze), jeden pacient bol po zlomenine bez operačného zákroku.

Prvé krytie rany systémom bolo u 2 pacientov ihneď na druhý deň po prepustení z nemocnice, 4x bolo krytie rany po mesiaci od prepustenia, 1x 2 mesiace od prepustenia, 1x 3 mesiace od prepustenia. Čo sa týka opakovaného používania systému - na 2 pacientoch bolo použité iba jedno krytie, na 4 boli použité 2 krytia, na 2 boli použité 4 krytia, a na jednom pacientovi bolo použitých až 5 krytí.

Výmena krytia bola vykonaná najčastejšie 5x (62,5%) po 7 dňoch, 3x po 3 dňoch.

Po zrušení odsávania a nálezu stavu rany, bolo rozhodnuté o ďalšej liečbe. V 4 prípadoch (50%) bola nutná ďalšia liečba, z toho 2x pomocou prípravku Ialugen, 2x Activone tube, Actilite, zvyšných 50% pacientov už nepotrebovala ďalšiu liečbu.

Plné zhojenie rany z kompletným zacelením bez známok secernácie, granulácie nastalo 3x do 4 týždňov, 3x do 7 týždňov, 1x do 8 týždňov, iba 1x trvalo zhojenie až 10 týždňov.

Využitie systému bolo 7x na ranách ktoré boli bez stehov, buď po vybratí, alebo to bola rana bez sutury, 1x bolo využitie systému na ranu na ktorej boli stehy, daná rana bola čerstvá rana po operácií.



Obr. 1 Rana po prvom ošetrení



Obr. 2 Rana po aplikácii krytia



Obr. 3 Rana po týždňovej aplikácii krytia

Kazuistika

55 ročná pacientka po opakovanej operácií, po reosteosyntéze mediálneho malleolu pre zlyhanie primárnej osteosyntézy. V oblasti mediálneho malleolu mala v čase naloženia systému 2 rany. Prvá rana ktorá sa nachádzala kranialnejšie (po prvej operácií), následne 3 týždne po prvej operácií bola nutná druhá operácia, keďže prvá rana bola ešte pokrytá

krustou, operatér sa rozhodol pre ďalšiu ranu kaudálnejšie. Pre malý kožný mostík a veľkú pravdepodobnosť infekcie a dehiscencie rany bolo ihneď po operácii na druhý deň naložené krytie PICO na obe rany aj na ranu po druhej operácii na ktorej boli ešte stehy.

Pacientke bolo v priebehu liečby 2x vymenené krytie, v 7 dňových odstupoch, rana sa postupne hojila, bola bez známkov dehiscencie alebo prítomnosti infekcie, následne bola rana ešte doliečovaná prípravkom Ialugen-krém a kompletne sa zhojila za 4 týždne od prvého krytia systémom PICO.



Obr. 1. Rana 7 dní po aplikácii PICO



Obr. 2. Rana 4 týždne po prvej aplikácii



Obr. 3. Chirurgická rana 8 týždňov po prvej aplikácii

Diskusia a záver

Využívanie podtlakového odsávania na hojenie rán, sa v poslednom období rozmohlo v rôznych chirurgických odvetviach a ako ukazujú doterajšie literárne zdroje, liečba touto metódou urobila v hojení rán naozajstný pokrok. Účinnosť, dostupnosť a jednoduchosť odsávacích systémov výrazne spopularizovala jeho použitie aj v našich nemocniciach. Na Klinike úrazovej chirurgie SF SZU a UNB už niekoľko rokov úspešne používame podtlakové odsávanie, ale vzhľadom na veľkosť, nepresnosť a nutnosť použitia prístroja iba počas hospitalizácie bez možnosti výraznej mobilizácie, sme sa zamerali na nový typ prenosného podtlakového odsávania (PICO). Spoločnosť Smith & Nephew prišla s novým typom prístroja PICO, ktorý je prenosný, kompaktný, jednorazový bez nutnosti výmeny kanistra (5,6). Je možnosť aplikovať ho aj ambulantne nemusí byť pacient hospitalizovaný, ma lepšiu možnosť ďalšej rehabilitácie.

V našej štúdií sme sa práve preto zamerali na zhodnotenie výsledkov používania daného systému. Z predbežných výsledkov vyplýva že použitie systému PICO bolo hlavne na rany pri ktorých bolo spomalené hojenie alebo došlo k dehiscencii až pri pravidelných kontrolách na ambulancii. Pri 6 pacientoch bolo prvý krát použité krytie až mesiac a viac od prepustenia z nemocnice, iba 2x sme použili krytie ihneď od prepustenia ako prevenciu možnej komplikácie hojenia. Systém sme používali skôr na liečenie komplikácií hojenia rany (dehiscenciu, infekciu v rane) ako na prevenciu. Posledné štúdie zamerané na využitie systému PICO ukázali dobré výsledky aj pri aplikácii ako prevencie možnej komplikácie, a práve zrýchlenie

hojenia rany (6,7). Pri pokračovaní štúdie by sme sa radi zamerali aj na možnosť preventívneho použitia.

Z výsledkom vyplýva že v najčastejšie postačovalo 1 až 2 krytie na bežné zhojenie rany, v jednom prípade bolo nutné použiť až 5 krytí. Po zrušení krytia sa polovica rán zhojila bez nutnosti ďalšej liečby druhá polovica, ešte vyžadovala ďalšiu aplikáciu prípravkov na ranu.

Všetky rany sa ale zhojili bez ďalšieho rozvoja komplikácie v rane. Výmena krytí prebiehala najčastejšie po 7 dňoch iba pri výrazne pretečených ranách bol nutná skoršia výmena. Ani v jednom prípade nedošlo k zlyhaniu systému odsávania.

Vzhľadom na výsledky je využitie daného systému veľmi prospešné, pacienti ktorý by museli podstúpiť z danými komplikáciami hojenia rany hospitalizáciu aj eventuálny operačný výkon, mohli pokračovať v ambulantnom ošetrovaní. Všetky rany sa po danej liečbe skĺudnili, nedochádzalo k ďalšiemu zápalu, dehicenciám, polovica si ešte vyžiadala ďalšie ošetrovanie, ale v konečnom výsledku sa všetky rany týmto systémom kompletne zhojili. Pacienti systém PICO bez ťažkostí tolerovali, nevyskytol sa žiadny nežiaduci efekt na kožu v zmysle macerovania či alergických reakcií.

Najväčšou limitáciou štúdie je zatiaľ menší počet V ďalšom pokračovaní štúdie by stálo za úvahu použitie systému na rany ktoré sú vysoko rizikové vzhľadom na hojenie, je predpoklad že by takmer vôbec nedochádzalo ku komplikáciám a skrátila by sa aj doba použitia systému. Nevýhodou štúdie je malý súbor pacientov, vzhľadom na to nemožnosť ideálneho štatistického zhodnotenie výsledkov.

Literatúra

1. **Kopal T.** Liečba rán metódou riadeného podtlaku, , Dermatol. prax, 2010, 4(4): 135–139
2. **Moues CM, Vos MC, van den Bemd GJ, Stijnen T, Hovius SE.** Wound Repair Regen. 2004, Jan-Feb; 12(1): 11–17.
3. **Loree S, Dompmartin A, Penven K, et al.** Is Vacuum Assisted Closure a valid technique for debriding chronic leg ulcers, J Wound Care. 2004; 13(6): 249–252.
4. **Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, McGuirt W.** Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. Ann Plast Surg. 1997; 38(6): 553–562.
5. **Hudson DA1, Adams KG, Van Huyssteen A, Martin R, Huddleston EM.** Simplified negative pressure wound therapy: clinical evaluation of an ultraportable, no-canister system, Int Wound J. 2015 Apr;12(2):195-201.
6. <http://www.smith-nephew.com/key-products/advanced-wound-management/pico/>
7. **Theresa Hurd, RN, MScN, PhD; Paul Trueman, BA, MA; and Alan Rossington, MEng, MSc.** Use of a Portable, Single-use Negative Pressure Wound Therapy Device in Home Care Patients with Low to Moderately Exuding Wounds: A Case., Volume 60 - Issue 3 - March 2014 ISSN 1943-2720

GRAFOVÉ ALGORITMY A ICH APLIKÁCIA PRI HODNOTENÍ APOPTÓZY

(Graph algorithms and their application in the evaluation of apoptosis)

Mária Ždímalová¹, Tomáš Bohumel², Kateřina Plachá³, Hisham El Falougy⁴, Peter Weismann⁴

¹ KMDG Stavebná fakulta, STU v Bratislave, zdimalova@math.sk,

² KMDG Stavebná fakulta, STU v Bratislave, študent mpm

³ Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie SAV, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava

⁴ Anatomický ústav, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava

Súhrn

Parkinsonova choroba (PCH), Alzheimerova choroba (ACH) a amyotropná laterálna skleróza (ALS) sú závažné neurodegeneratívne ochorenia dospelých ľudí, pre ktoré je charakteristická s vekom spojená neurodegenerácia niektorých nervových štruktúr. Napriek tomu, že pri niektorých formách spomínaných ochorení má určitú úlohu dedičnosť, nie je pri nich celkom objasnený mechanizmus bunkovej smrti. Pre skvalitnenie a uľahčenie výskumu neurodegeneratívnych ochorení sme vytvorili počítačový program detekcie apoptózy/nekrózy na histologických preparátoch. Jeho funkčnosť sme testovali na histologických preparátoch mozgov sedemdnových potkanov kmeňa Wistar 12 resp. 36 hodín po hypoxicko-ischemickom inzulte.

Kľúčové slová

apoptóza, nekróza, neurodegeneratívne ochorenia, hypoxia, počítačová morfometria

Summary

Parkinson's disease (PCH), Alzheimer's disease (AD), and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are major neurodegenerative diseases of adults, which are characterized by age-related neurodegeneration of many neural structures. Although, in some forms of the mentioned diseases, heredity plays a role, the mechanism of cell death is not totally understood. For the purpose of precise analysis of programmed cell death in neurodegenerative disease research, we have created a computer software to detect apoptosis/necrosis on histological preparations. We tested its functionality on histological preparations of the brains gained from Wistar rats (7 days old), which were exposed to hypoxic-ischemic insult for 12 and 36 hours.

Key words

apoptosis, necrosis, neurodegenerative diseases, hypoxia, computer morphometry

Úvod

Poznanie príčin apoptózy pri jednotlivých ochoreniach má pre liečbu nesmierny význam. Jej spustenie môže zachrániť organizmus pred nádorovým bujením (1), ale pri neurologických degeneratívnych ochoreniach je cieľom jej zabrániť, aby sa predišlo poškodzovaniu organizmu

(2). Bunky môžu odumrieť rôznymi spôsobmi (3). Tieto boli rozdelené do dvoch hlavných kategórií - nekróza a apoptóza. Morfologické ale aj molekulárne odlišnosti medzi týmito dvomi kategóriami sa postupom času stali nezreteľnými v prípade degenerácie neurónov na zvieracom modeli (4). To si vynútilo úvahy nad novým – „prechodným štádiom“ bunkovej smrti, kedy nesie umierajúca bunka v rôznej miere znaky obidvoch základných spôsobov bunkovej smrti (apoptóza a nekróza) (5). Naš počítačový program zohľadňuje pri vyhodnocovaní/kvantifikácii bunkovej smrti aj túto možnosť.

Spracovanie obrazu a pre-processing (predspracovanie obrazu) sú rozšírené a vhodné metódy pre prácu s rôznymi typmi dát. V medicínskom výskume je veľmi dôležité zjednodušenie reprezentácie získaných snímok (dát) pre užívateľov a práve tu nachádza segmentácia uplatnenie. Existuje veľké množstvo algoritmov používaných na segmentáciu obrazu, resp. pre-processing, akými sú napríklad thresholding, grafové algoritmy, level-set metódy a mnohé iné. V práci sa zameriavame na segmentáciu objektov, konkrétne na identifikáciu apoptotických a nekrotických buniek. Cieľom segmentácie je rozdeliť pixle na snímkach do regiónov a tak zjednodušiť ich reprezentáciu. Rozlišujeme dva typy regiónov - regióny objektové a regióny pozadia. Výsledkom segmentácie je teda binárny obraz, v ktorom je pre každý jeho pixel uchovávaná informácia o tom, či bol priradený k objektom alebo k pozadiu. Objektmi nazývame tie skupiny pixlov, ktoré na snímke hľadáme a zaujímajú nás a pozadím všetky zvyšné pixle. Po segmentácii dostávame obraz (snímku), ktorý je pre ďalšie počítačové spracovanie jednoduchšie použiteľný.

Materiál a metódy

Biologický materiál

Na testovanie miery výskytu apoptóz/nekroz sme použili histologické preparáty mozgov sedemdnových potkanov kmeňa Wistar 12 resp. 36 hodín po hypoxicko-ischemickom infulte. Použili sme kryostatové koronálne rezy hrubé 30 μ m farbené pomocou cresyl violet. Vyhodnocovali sme pyramídové bunky oblasti CA1 hipokampu.

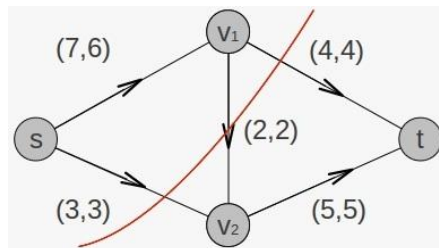
Segmentácia a grafové algoritmy

Segmentácia používaná v spracovaní obrazu môže byť abstrahovaná do teórie grafov ako minimalizačný problém. Funguje ako silný nástroj využívaný pri minimalizácii energie s globálne optimálnym riešením. Na segmentáciu obrazu používame metódu nazývanú „grafové rezy“ resp. teória grafov. V práci sa zameriavame primárne na dva algoritmy z teórie grafov a to na Ford-Fulkersonov a Edmonds-Karpov algoritmus (6, 7). Spracúvame 2D obraz, ktorý najskôr pretransformujeme na graf (teória grafov) a následne v danom grafe hľadáme maximálny tok (minimálny rez). Po jeho nájdení sme schopný obraz segmentovať. Grafové algoritmy, používané na segmentáciu medicínskych a biologických dát, majú podstatu v niektorých dynamických algoritmoch používaných pri hľadaní lokálneho minima energie a v porovnaní s threshold technikou ponúkajú objektívnejšie a realistickejšie výsledky (8, 9, 10).

Princíp Ford-Fulkersonovho a Edmonds-Karpovho algoritmu spočíva vo zvyšovaní hodnoty toku v grafe prostredníctvom zväčšujúcich polociest Algoritmus pokračuje pokiaľ je možné nájsť aspoň jednu zväčšujúcu polocestu. Ak neexistuje žiadna ďalšia zväčšujúca polocesta, algoritmus končí a je dosiahnutý maximálny tok v grafe. Hodnota maximálneho toku je potom rovná súčtu kapacít hrán „minimálneho rezu“ (11, 12, 13).

Minimálny rez je výsledok použitých grafových algoritmov, spomínaných v odseku vyššie. Zjednodušená interpretácia hľadania minimálneho rezu je proces, pri ktorom, pokiaľ je to možné, vpúšťame tok (imaginárne jednotky), cez vrchol s , nazývaný „zdroj“ do vrcholu t , nazývaný „ústie“ cez graf pozostávajúci z vrcholov a hrán. Keď proces skončí a už neexistuje žiadna hrana,

ktorá by mala kapacitu na to, aby sa po nej mohol prepraviť ďalší tok z s do t , je „minimálny rez“, tvorený množinou práve takých hrán, a to hrán s nulovou kapacitou (rezervou), podobne ako na obrázku 1.

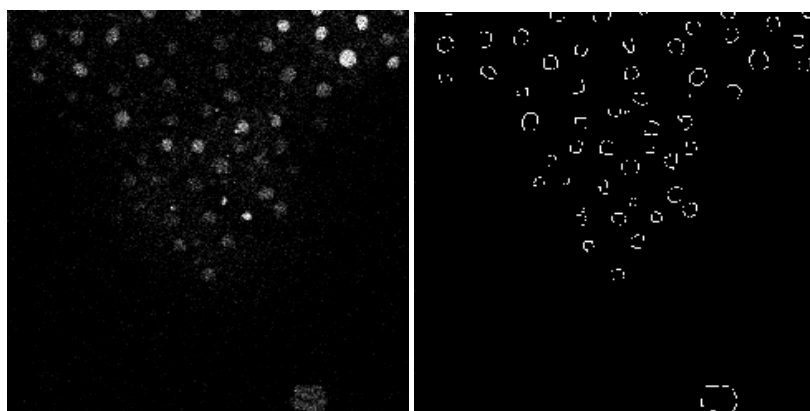


Obr. 1 Zobrazenie grafového rezu (červená farba – minimálny rez).

V procese segmentácie obrazu môžu byť pixle ľubovoľného 2D obrazu pretransformované do vrcholov grafu a podľa matematickej definície môže byť zostrojený graf. Následne je možné aplikovať grafové algoritmy, nájsť minimálny rez a reprezentovať obraz pomocou objektových pixlov a pixlov pozadia, tak ako na obrázku 2.

Program a užívateľská príručka

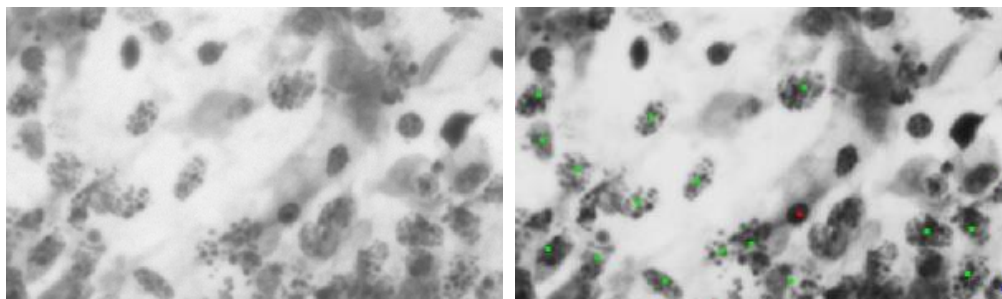
Pre účely segmentácie obrazu sme vytvorili softvér so zabudovanými algoritmami hľadajúcimi minimálny rez. V našom prípade sme použili snímky z mikroskopu. Výhodou tejto metódy je to, že poskytuje globálnu ako aj lokálnu segmentáciu a takisto sme schopní nájsť hrany, ktoré reprezentujú hranice medzi jednotlivými bunkami a pozadím.



Obr. 2 Ukážka obrazu pred a po segmentácii.

Aj pri detekcii apoptózy/nekrózy sme aplikovali pre-processing. Použili Gaussove jadro a upravili sme všetky výstupy z mikroskopu tak, aby boli vhodnými vstupmi pre aplikáciu grafových algoritmov (obrázok 3). Hlavnou výhodou nášho softvéru je jeho komplexnosť. Softvér dokáže obraz predpripraviť (pre-processing), segmentovať, teda v našom špeciálnom prípade rozpoznať konkrétne typy buniek a nakoniec bunky spočítať a zaradiť ich do jednotlivých kategórií. Po tom,

ako je obraz segmentovaný, bunky spočítané a rozdelené do kategórií, vie užívateľ manuálne upraviť označenie buniek, ich kategóriu a takisto použiť číselný výstup z programu na následnú štatistiku.



Obr. 3 Vstup a výstup obrazu z počítačového programu.

Segmentácia obrazu a kategorizácia buniek pozostáva z nasledujúcich krokov:

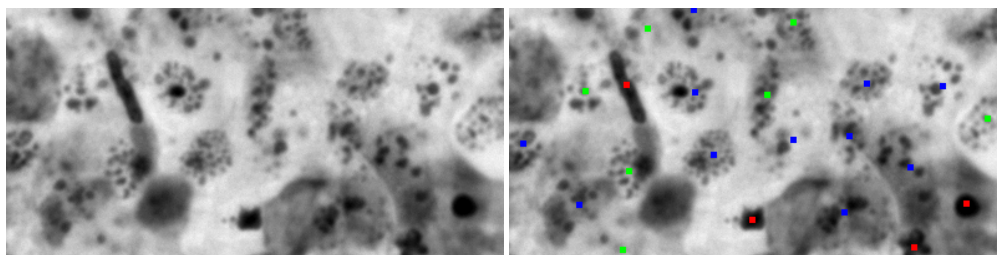
- 1) Získanie dát z mikroskopu
- 2) Pre-processing dát
- 3) Inicializácia softvéru a načítanie konkrétnej snímky
- 4) Nastavenie pixlov objektov a pozadia
- 5) Segmentácia obrazu
- 6) Nastavenie parametrov pre jednotlivé typy buniek
- 7) Spočítanie, farebné označenie a kategorizácia buniek
- 8) Manuálna úprava označených buniek užívateľom
- 9) Uloženie výstupu (obrázok a číselný výstup)

Použitie pri stanovení apoptózy/nekrózy

Aplikácia segmentácie obrazu popísaná vyššie slúži na identifikovanie troch rozličných typov buniek, viditeľných na snímkach z mikroskopu, ktorými sú apoptóza, prechodné štádium a nekróza. Po tom, ako je segmentácia ukončená, je potrebné (počítačovo) rozlíšiť segmentované objekty a zoskupiť ich, pretože každý z troch typov buniek pozostáva z viacerých menších častí. Každá zo skupín objektov pozostáva z objektov charakteristických veľkostí, vzájomných vzdialeností medzi sebou a početností, vďaka čomu ich program vie zaradiť do jednej z troch kategórií. Na obrázku 4 vidíme časť snímky z mikroskopu (vstup a výstup) s označenou apoptózou (červená), prechodným štádiom (modrá) a nekrózou (zelená).

Záver

Nakoľko je využitie aplikácie segmentácie obrazu na kategorizáciu buniek v jeho **počiatočnej fáze**, je ešte potrebné jeho neustále zlepšovanie a ladenie. Úspešnosť automatického a korektného označovania typov buniek, bez ďalšieho manuálneho upravovania sa pohybuje medzi 50 až 75%. Správne nastavenie parametrov v softvéri závisí na skúsenosti užívateľa. Výpočtový čas je optimalizovaný a výsledok je dostupný a zobrazený v priebehu niekoľkých sekúnd. Po automatickej detekcii je však ešte potrebná manuálna korekcia, ktorá však prebehne rýchlo.



Obr. 4 Počítačovo stanovená apoptóza, nekróza a prechodné štádium. Pred a po spracovaní/označení počítačovým programom. Prípadné nezrovnalosti sa upravujú manuálne.

Pod'akovanie

Práca vznikla s podporou grantovej úlohy VEGA 1/0065/13.

Literatúra

1. **Zheng, T.S.:** Death by design: the big debut of small molecules. *Nat. Cell Biol.* **2001**, 3, E1-E3.
2. **Martin, L.J.:** Neurodegenerative disorders of the human brain and spinal cord. In *Encyclopedia of the Human Brain*; Ramachandran, V.S., Ed.; Elsevier Science Academic Press: San Diego, USA, 2002; Volume 3, pp. 441–463.
3. **Martin, L.J., Al-Abdulla, N.A., Brambrink, A.M., Kirsch, J.R., Sieber, F.E., Portera-Cailliau, C.:** Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.* **1998**, 46, 281–309.
4. **Martin, L.J.:** Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury. *Int. J. Mol. Med.* **2001**, 7, 455–478.
5. **Portera-Cailliau, C., Price, D.L., Martin, L.J.:** Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J. Comp. Neurol.* **1997**, 378, 70–87.
6. **Boykov, Y., Jily, M, P.:** Interactive graph cuts for optimal boundary & region segmentation of objects in N-D images. Proceedings of “International Conference on Computer Vision”. Vancouver, Canada, 2001, vol.1, p. 105-112. ISBN 0-7695-1143-0.
7. **Ford jr., L. R., Fulkerson, D. R.:** Maximal flow through a network. *Canadian Journal of Mathematics.* 1956, Vol. 8, 399 – 404 s.
8. **Ford jr., L. R., Fulkerson, D. R.:** *Flows in Networks.* Princeton University Press, 1962.
9. **Goldberg, A. V., Tarjan, R. E.:** A new approach to the maximum flow problem. *Journal of the Association for Computing Machinery.* 1988, Vol. 35, No. 4, 921 – 940 s. ISSN 0004-5411.
10. **Knor, M.:** *Teória grafov.* Bratislava, Vydavateľstvo STU, 2008. ISBN 978-80-227-2879-9.
11. **Loucký, J., Oberhuber, T.:** *Graph cuts in segmentation of a left ventricle from MRI data.* Prague, Czech Technical University in Prague, 2010.
12. **Plesník, J.:** *Grafové algoritmy.* Bratislava, Slovenská akadémia vied, 1983, 300 s.
13. **Uherčík, M.:** *Spracovanie obrazu pomocou knižníc ITK.* Bratislava, Slovenská Technická Univerzita v Bratislave, Stavebná fakulta, 2009, Bakalárska práca.

BIOMEDICÍNSKE VYUŽITIE PROBIOTÍK

(Application of probiotics in biomedicine)

Petra Lukáčiková

Anatomický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, petra.lukacikova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Medzi človekom a jeho vnútornou mikroflórou existuje úzky vzťah, ktorý sa vytvoril v priebehu evolúcie. Najmä gastrointestinálny trakt je bohatý na mikroorganizmy, ktoré zohrávajú symbiotickú interakciu s hostiteľom. Najdôležitejšími baktériami sú v tomto smere probiotické baktérie mliečneho kvasenia. Probiotiká sú definované ako nepatogénne mikroorganizmy, majúce pozitívny vplyv na zdravie hostiteľa. Probiotické baktérie mliečneho kvasenia sa hojne vyskytujú vo fermentovaných potravinách, napríklad v tradičnej slovenskej bryndzi a vyznačujú sa širokým biomedicínskym využitím.

Kľúčové slová

Baktérie mliečneho kvasenia, zdravie

Summary

An intimate relationship exists between the host and its microflora that has developed as humans as a species have evolved. The gastrointestinal tract harbours a rich microflora, which entertains a symbiotic interaction with its host. The most important are probiotics lactic acid bacteria. Probiotics have been defined as non-pathogenic microorganisms that, when ingested exert a positive influence on host health or physiology. Dietary probiotic lactic acid bacteria are mostly known for their widespread use in the preparation of fermented food, for example in traditional Slovak food - bryndza. Probiotics are widely used in biomedicine.

Key words

Lactic acid bacteria, health

Úvod

Termín probiotikum prvýkrát zaviedli do praxe Lilly a Stillwell v roku 1965. Definovali ním biologické látky produkované prvokmi, ktoré stimulovali rast iných mikroorganizmov. Termín probiotikum je antonymom k termínu antibiotikum (pro bios = pre život, anti bios = proti životu). Existuje viacero modifikácií pre definíciu probiotík, ale najvýstižnejšou je asi táto: „Probiotiká sú živé mikroorganizmy, ktoré sa vyznačujú, ak sú podávané v dostatočnom množstve, zdraviu prospešnými účinkami a to najmä udržovaním, respektíve zlepšovaním zloženia mikroflóry v gastrointestinálnom trakte, alebo v inom anatomickom mieste hostiteľa“ (12).

Pri vzájomných interakciách mikroorganizmov s makroorganizmom sa vyvíja jedinečné súžitie a to podmieňuje vznik obdobných selekčných mechanizmov u mikroorganizmov aj u imunitného systému tela (2). Črevná mikroflóra je hlavným sprostredkujúcim článkom medzi imunitným systémom a vonkajším prostredím.

Najčastejším karcinómom tráviaceho traktu u nás, i vo svete, je kolorektálny karcinóm. Je to druhé najčastejšie onkologické ochorenie, hneď po karcinóme pľúc u mužov a karcinómu prsníka u žien. Bohužiaľ, v súčasnosti má frekvencia výskytu tohto ochorenia stúpajúcu tendenciu (11). Štúdie probiotických kmeňov LA-5 (*L. acidophilus*) a BB-12 (*Bifidobacterium animalis*, spp. *lactis*) potvrdili, že tieto probiotické baktérie (oba sú humánne izoláty) produkujú látky so silnými protizápalovými a antimutagénymi vlastnosťami (6, 8, 9, 10). V humánnych štúdiách sa účinky probiotík potvrdzujú najčastejšie prostredníctvom zníženia exkrécie fekálnych mutagénov, poklesu aktivity enzýmov spôsobujúcich konverziu prokarcinogénov, zvýšenia aktivity detoxifikačných enzýmov a stimuláciou imunity. Napríklad, suplementácia potravy pomocou kmeňov *Lactobacillus sp.* viedla k zníženiu fekálnej aktivity beta-glukuronidázy, nitroreduktázy a azoreduktázy. Podobný efekt na aktivitu beta-glukuronidázy malo podávanie kmeňa *Enterococcus faecium* M-74 (5).

Preventívne účinky probiotík boli zaznamenané i pri nádoroch pečene. Je známe, že aflatoxíny obsiahnuté v búrskech orieškoch zvyšujú riziko nádorov pečene. Podávaním kmeňov *L. rhamnosus* LC 705 a *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* sa znížila biologicky efektívna dávka aflatoxínov, čím sa znížilo riziko hepatocelulárneho karcinómu (4).

Liečba nádorov prostredníctvom ožarovania je okrem iného spojená s poškodením slizníc a alteráciou črevnej mikroflóry s následnými hnačkami, nevoľnosťami alebo nechutenstvom. V randomizovanej, placebom kontrolovanej štúdií bol pacientom podstupujúcim rádioterapiu na oblasť abdomenu a panvy podávaný kmeň *L. rhamnosus*. Pacienti, ktorí dostávali probiotiká, mali výrazne znížený výskyt hnačky (13).

Klinické štúdie potvrdili, že probiotiká sú zdravotne prospešné aj v oblasti metabolizmu tukov a tým aj v oblasti kardiovaskulárnych ochorení. Hypercholesterolémia je jedným z hlavných rizikových faktorov týchto ochorení, vrátane úmrtí. Niektoré mliečne baktérie asimilujú cholesterol a produkujú hydrolázu žlčových kyselín. Každé jedno % zníženia hladiny cholesterolu predstavuje zhruba 2 až 3 % zníženia rizika kardiovaskulárnych ochorení. Napríklad, príjem fermentovaného mlieka s kmeňom *Lactobacillus acidophilus* (úroveň znižovania hladiny cholesterolu závisí od aktivity použitého kmeňa, produkcie lipáz a iných bioaktívnych substancií) redukuje riziko srdcovocievnych ochorení o 6 až 10 % (1).

MIKROORGANIZMY POUŽÍVANÉ AKO PROBIOTIKÁ

(podľa: Ebringer a kol., 2004) (3)

LACTOBACILLUS SP.: *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. casei*, *L. crispatus*,
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*, *L. gallinarum*,
L. gasseri, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*,
L. reuteri, *L. rhamnosus*

BIFIDOBACTERIUM SP.: *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*,
B. infantis, *B. lactis*, *B. longum*

INÉ MLIEČNE BAKTÉRIE: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,
Lactococcus lactis, *Leuconostoc mesenteroides*,
Pediococcus acidilactici, *Sporolactobacillus in-*
sulinus, *Streptococcus thermophilus*

INÉ MIKROORGANIZMY: *Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Bacillus subtilis*,
Escherichia coli kmeň Nissle, *Propionibacterium*
freudenreichii, *Saccharomyces cerevisiae*,
Saccharomyces boulardii

Záver

Probiotické baktérie majú ohľadom zdravia široké uplatnenie (imunomodulačné a antialergické účinky, pomoc pri laktózovej intolerancii, hnačkách, zápaloch, infekciách a pod.). Probiotický výskum zohráva dôležitú úlohu. Pre toto ich významné uplatnenie v prevencii a liečbe rôznych ochorení a čoraz častejšom siahaní po prírodnejšej liečbe sa dostávajú na popredné miesto v oblasti zdravej výživy. Mali by byť neoddeliteľnou súčasťou nášho stravovania. Probiotiká nepochybne prispievajú k skvalitneniu nášho života a sú nevyhnutnou súčasťou zdravého vývoja budúcich generácií.

Literatúra

1. **Anderson JW, Gilliland SE:** Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J Amer Col Nutr*.18, 1999, s.43-50.
2. **Brunham RC, Plummer FA, Stephens RS:** Bacterial antigen variation, host-immune response, and pathogen-host coevolution. *Infect Immun*, 61,1993, s.2273-2276.
3. **Ebringer L, Ferencík M, Mikeš Z, Rovenský J:** Probiotiká, prebiotiká a biomedicína I. a II. časť. Prehľadný referát. *Rheumatologia*, 18, 2004, č.3 a 4, s. 143-154 a 197-209.
4. **El-Nezami HS, Polychronaki NN, et al.:** Probiotic supplementation reduces a biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern China, *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(5):1199-203.
5. **Ferencík M, Ebringer L, et al.:** Beneficial modification of the human intestinal microflora using orally administered lactic acid bacteria, *Bratisl Lek Listy*, 1999, 100:238-245.
6. **Klaver FA, van der Meer R:** The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity, *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(4): 1120-4.
7. **Lilly DM, Stillwell RH:** Growth promoting factors produced by microorganism. *Science*, 147, 1965, s.747-748.
8. **Lo PR, Yu RC, et al.:** Antimutagenic activity of several probiotic bacteria against benzo(a)pyrene, *J Biosci Bioeng*, 2002, 94(2):148-153.
9. **Lo PR, Yu RC, et al.:** Determinations of the antimutagenic activities of several probiotic bifidobacteria under acidic and bile conditions against benzo(a)pyrene by a modified Ames test, *Int J Food Microbiol*, 2004, 93(2):249-57.
10. **Matsumoto M, Benno Y:** Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects, *Mutat Res*, 2004, 568(2):147-53.
11. **Pleško I, Ondrušová M, et al.:** Incidencia zhubných nádorov v SR 2002, NCZI, Bratislava, 2005.
12. **Schrezenmeir J, de Vriese M:** Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching and definition. *Amer J Clin Nutr*, 73, 2001, s. 361S-364S.
13. **Urbancsek H, Kazar T, et al.:** Results of a double-blind, randomized study to evaluate the efficacy and safety of *Antibiofilus* in patients with radiation-induced diarrhoea, *Eur Gastroenterol Hepatol*, 2001, 13(4):391-6.

ANALÓGIE VO FÚZIÍ VYBRANÝCH ORGÁNOV

(Analog in fusion of selected organs)

Diana Pacáková¹, Diana Kúkel'ová¹

¹Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ Moyzesova 11, Košice, 040 11, email: dianapacakova@gmail.com

Súhrn

V rámci embryonálneho vývoja vykazujú tkanivové fúzie podobné znaky vo viacerých orgánoch (podnebie, neurálna trubica, srdce). Proliférácia buniek a umiestnenie tkaniva do správnej pozície a v správnom čase sú primárne procesy nevyhnutné pre samotnú fúziu. Detailné štúdie ukázali, že medzi mnohými tkanivami sú určité mechanizmy fúzie konzervované a niektoré sú naopak vysoko špecifické pre dané tkanivo. Jedným zo spôsobov ako porozumieť vývoju orgánov a samotnému procesu fúzie je hľadať analógie v bunkových procesoch, ktoré prebiehajú počas fúzie tkanív. Porovnanie nevyhnutnosti apoptózy v rámci vývoja fúzných orgánov, je jeden z možných spôsobom ako tieto analógie preskúmať.

Kľúčové slová

Fúzia, podnebie, neurálna trubica, srdce, apoptóza

Summary

In the context of embryonic development, tissue fusion exhibit similar features in several organs (palate, neural tube, heart). Cell proliferation and tissue location to the correct position at the right time are the primary processes necessary for fusion. Detailed studies showed that the certain mechanisms in fusion organs are conserved while other are high-specific. One way to understand the development of organs and fusion process itself is to find common analogy in cell processes during tissue fusion. Comparison of necessity of apoptosis in the development of fusion organs, is one possible way to explore these analogies.

Key words

Fusion, palate, neural tube, heart, apoptosis

Úvod

V rámci vývoja vykazujú tkanivové fúzie podobné znaky vo viacerých orgánoch. Poruchy v špecifických transkripčných faktoroch a signálnych molekulách spôsobujú defekty vo fúzii a tým vznik vrodených porúch. Formovanie orgánov je komplexný proces, v rámci ktorého sú mechanizmy, ktoré umožňujú ich vznik vysoko špecifické pre dané tkanivo. Proliférácia buniek a umiestnenie tkaniva do správnej pozície v správnom čase sú primárne procesy nevyhnutné pre samotnú fúziu. Detailné štúdie ukázali, že medzi mnohými tkanivami sú určité mechanizmy fúzie konzervované a niektoré sú naopak vysoko špecifické pre dané tkanivo.

Podnebie je modelovým orgánom, ktorý najlepšie slúži pre popis procesu fúzie. Prvé fúzie v rámci vývoja podnebia sa objavujú na 10,5. embryonálny deň a to medzi maxilárnymi a mediálnymi nosovými výbežkami. Na 11. embryonálny deň dochádza k fúzii laterálnych nosových výbežkov. Fúzia týchto troch tkanív pokračuje do 12,5. embryonálneho dňa. Výsledkom je vznik primárneho podnebia, ktoré je podkladom pre hornú čeľusť a peru. Formovanie sekundárneho podnebia sa vyskytuje v rámci vývoja o čosi neskôr. Podnebné dosky pochádzajú z maxilárných výbežkov. Medzi 13. a 14. embryonálnym dňom, podnebné dosky elevujú nad chrbát jazyka a ich mediálne epiteliálne hrany rastú do tesnej blízkosti. Medzi 14,5. až 16. embryonálnym dňom dochádza k fúzii v mediálnej oblasti a následne pokračuje anteriórnym a posteriorným smerom. Výsledkom je vznik sekundárneho podnebia. Predpokladá sa, že mechanizmus fúzie je v rámci primárneho a sekundárneho podnebia podobný. Medzi hlavné kroky fúzie patrí prefúzia, fúzia a fúzia šva. Počas prefúzie je epitel protiľahlých podnebných dosiek neporušený a bazálna lamina je na niektorých miestach mierne narušená. Počas fúzie sa dve protiľahlé podnebné dosky dostávajú do kontaktu svojimi mediálnymi epiteliálnymi hranami, avšak z hľadiska morfológie je tento krok podobný prefúzii. Medzi kontaktnými bunkami epitelu sa v tejto fáze netvorí dezmozómy, tesné spojenia (*tight junctions*) ani adhézne produkty. Spojenie protiľahlých mediálnych epiteliálnych hrán podnebných dosiek je v tejto fáze výsledkom fyzickej sily, ktorá spôsobuje vytrhnutie buniek bazálnej membrány z vrstvy epitelu jednej podnebnéj platne a uviaznutie týchto buniek v epiteli protiľahlej podnebnéj dosky. Počas fúzie švu sa fagocyty a umierajúce epiteliálne bunky objavujú na rozhraní zdravých buniek a degenerujúcej bazálnej laminy. Stredový epitel podnebných dosiek sa stenčí v dôsledku konvergentného predĺženia, epiteli oboch podnebných dosiek sa medzi seba zasunú za vytvorenia mediálneho epiteliálneho švu. Niektoré bunky mediálnej epiteliálnej hrany môžu migrovať preč zo stredovej línie na miesto zvané ako epiteliálny trojuholník. Postupom fúzie je epitelová vrstva rozrušená a bunky mezenchýmu z oboch podnebných dosiek vniknú do MES, čo je nevyhnutné pre následnú konfluenciu mezenchýmu (1). Niektoré štúdie identifikovali apoptózu ako kľúčovú pre proces fúzie (2, 3). Naopak, Fitchett a Hay (4) navrhli hypotézu, že bazálna vrstva epitelových buniek stráca identitu epitelu a nadobúda vlastnosti mezenchýmu – epitelovo-mezenchýmová transdiferenciácia. Následné štúdie sa tak snažili identifikovať primárny proces, ktorý je nevyhnutný pre fyziologický priebeh fúzie (1).

Fúzie v rámci embryonálneho vývoja taktiež prebiehajú pri formovaní neurálnej trubice. Po vytvorení neurálnej platne sa neurálne záhyby zdvíhajú a približujú sa k sebe. Výsledkom fúzie neurálnych záhybov je formovanie súvislej neurálnej trubice. Počas fúzie neurálnych záhybov sa neuroepitel oddeľuje od susedného non-neurálneho ektodermu, čoho výsledkom je uzavretie neurálnej trubice, ktorú pokrýva už len jedna vrstva non-neurálneho ektodermu. Úloha apoptózy pre vývoj neurálnej trubice je v porovnaní s podnebiím nejasná. Niektoré štúdie preukázali rozptýlené apoptické bunky v neurálnom tkanive, ktoré podlieha fúzii (5). Metódou TUNEL bola preukázaná korelácia medzi prítomnosťou apoptických buniek a následným spájaním a fúziou neurálnych záhybov. Pridaním farmakologických inhibítorov apoptózy v čase fúzie neurálnej trubice viedlo k zisteniu, že apoptóza nie je nevyhnutná pre uzavretie neurálnej trubice (6). Aj napriek týmto zisteniam, je ťažké, vysloviť závery o priamej úlohe apoptózy v rámci fúzie neurálnych záhybov (1).

Tkanivové fúzie zohrávajú dôležitú úlohu aj v rámci vývoja srdca. Fúzia prebieha v niekoľkých odlišných miestach a umožňuje oddelenie predsieni a komôr a rozdelenie výtokovej časti srdca na aortu a pľúcny kmeň. Na 9,5. embryonálny deň dochádza k pravostrannému ohnutiu srdcovej trubice. Medzi 9,5. a 10,5. embryonálnym dňom, dve sady endokardiálnych vankúšov začnú rásť k sebe cez otvorený atrioventrikulárny kanál. Prvá sada endokardiálnych vankúšov,

konotrunkálne endokardiálne vankúše, sa formujú v oblasti výtokovej časti srdca. Tieto vankúše sa následne rozdelia na proximálne a distálne páry konotrunkálnych endokardiálnych vankúšov. Fúziou distálnych konotrunkálnych endokardiálnych vankúšov sa vytvára konotrunkálne septum, ktoré oddeľuje aortu od pľúcneho kmeňa. Fúziou proximálnych konotrunkálnych endokardiálnych vankúšov sa vytvára membránové komorové septum. Fúziou druhej sady endokardiálnych vankúšov, tzv. atrioventrikulárnych endokardiálnych vankúšov, sa oddelia predsieň od komôr. V rovnakom čase, primárne predsieňové septum a komorové septum rastie z hornej a dolnej steny embryonálneho srdca. Tieto dve septa spoločne fúzujú s atrioventrikulárnymi endokardiálnymi vankúšmi, čím vytvoria štvordutinové srdce. Tieto fúzie v rámci embryonálneho vývoja srdca sa objavujú medzi 12,5. a 13,5. embryonálnym dňom. V rámci vývoja srdca je apoptóza považovaná viacerými autormi za kľúčový proces nevyhnutný pre fúziu endokardiálnych vankúšov a tým formovanie štvordutinového zrelého srdca. Metódou TUNEL bol demonštrovaný dynamický priebeh apoptózy v rámci vývoja srdca. Na 12,5. embryonálny deň, v období kedy prebieha fúzia švu atrioventrikulárnych endokardiálnych vankúšov, možno pozorovať nárast a následný pokles apoptózy. V rámci fúzie konotrunkálnych endokardiálnych vankúšov, možno pozorovať nárast apoptózy nie len pri fúzii švu ale zároveň aj počas fúzie konotrunkálnych endokardiálnych vankúšov. Z tohto dôvodu je apoptóza považovaná za kľúčovú pre fúziu endokardiálnych vankúšov a zároveň aj pre remodelovanie tkaniva. Pre správny vývoj očí, bránice a mužskej močovej trubice je nevyhnutný proces fúzie. Existuje málo poznatkov o mechanizmoch fúzie v rámci týchto tkanív. Počas vývoja mužskej močovej trubice, porucha Shh a Fgf signálnej dráhy vedie k zníženiu rastu buniek močovej trubice a k hypospádii, avšak fúzia sama o sebe nie je zasiahnutá. Akokoľvek, priamy mechanizmus, ktorý poháňa fúziu nie je známy. Ostáva teda otázne, či sú mechanizmy fúzie medzi niektorými alebo všetkými tkanivami konzervované, alebo sa odlišujú v určitých znakoch a teda sú vysoko špecifické (1).

Záver

Apoptóza je kľúčový proces pre vývoj viacerých fúzných orgánov. Akokoľvek, postavenie apoptózy v rámci samotného procesu fúzie je stále nejasné. Štúdiami viacerých autorov bola nevyhnutnosť apoptózy pre proces fúzie preukázaná v podnebí a v srdci. Mechanizmus, ktorý poháňa fúziu v ostatných fúzných orgánoch (oko, bránica, mužská močová trubica, neurálna trubica) je však naďalej neznámy a vyžaduje si ďalšie vedecké skúmanie.

Literatúra

- 1. Ray HJ, Niswander L.** Mechanisms of tissue fusion during development. *Development* 2012; 139 (10): 1701-1711.
- 2. Farbman AI.** Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. *Developmental biology* 1968; 18: 93-116.
- 3. Hinrichsen CF, Stevens, GS.** Epithelial morphology during closure of the secondary palate in the rat. *Archives of Oral Biology* 1974; 19: 969-980.
- 4. Fitchett JE, Hay ED.** Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Developmental biology* 1989; 131: 455-474.
- 5. Geelen JA, Langman J.** Ultrastructural observations on closure of the neural tube in the mouse. *Anatomy and embryology* 1979; 156: 73-88.
- 6. Massa V et al.** Apoptosis is not required for mammalian neural tube closure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; 106: 8233-8238.

ÚLOHA VASKULÁRNEHO ENDOTELIÁLNEHO RASTOVÉHO FAKTORU V ROZVOJI DIABETICKEJ RETINOPATIE

(Role of vascular endothelial growth factor in the development of diabetic retinopathy)

Petra Priščáková^{1*}, Helena Gbelcová¹, Ľubica Krajčiová¹, Lenka Oravcová¹, Iveta Gašparová¹, Gabriel Minárik², Daniel Böhmer¹, Vanda Repiská¹

¹ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta UK, Sasinkova, Bratislava, Slovenská republika

² Medirex Group Academy n.o., Bratislava, Slovenská republika

*Mgr. Petra Priščáková

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB

Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika

e-mail: p.priscakova@gmail.com

Súhrn

Diabetická retinopatia (DR) je komplexné multifaktoriálne ochorenie s neúplne objasnenou patofyziológiou. DR je jednou z hlavných príčin slepoty diabetických pacientov v produktívnom veku. Slepota je vo väčšine prípadov spôsobená abnormálnou neovaskularizáciou v retine oka. Jedným z hlavných induktorov vaskularizácie je vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF). Množstvo štúdií sa zaoberá identifikáciou polymorfizmov v géne VEGF s možným prepojením na DR. Bolo identifikovaných viacero polymorfizmov, ale ani jeden nedosiahol kritéria potrebné pre diagnostický marker upozorňujúci na zvýšené riziko DR. Na druhej strane, identifikované polymorfizmy objasňujú rozdielny účinok anti-VEGF terapie u pacientov trpiacich diabetickou retinopatiou. Tieto zistenia zdôrazňujú dôležitosť farmakogenetiky pri návrhu a vyhodnocovaní účinnosti nových terapeutických prístupov, pri ktorých je často zanedbaný genetický profil pacientov. Nepochybne ďalšie genetické štúdie sú potrebné pre objasnenie všetkých atribútov diabetickej retinopatie a pre navrhnutie optimálnej efektívnej liečby.

Kľúčové slová

Diabetická retinopatia, DNA varianty, genetické štúdie

Summary

Diabetic retinopathy (DR) is a complex multifactorial disease with unclear pathophysiology. It is the main reason of blindness among the people in productive age. Blindness is usually a consequence of abnormal neovascularization in the retina. One of the major inductor of vascularization is vascular endothelial growth factor (VEGF). Great amount of the studies is focused on genetic polymorphisms in VEGF with possible connection to DR. Several polymorphisms were identified, but none of them reach the criteria necessary for the diagnostic marker. On the other side, identified polymorphisms can explain diverse outcome of anti-VEGF therapies in patients suffering from diabetic retinopathy. These findings

underline the importance of pharmacogenetics in designing and evaluating effectiveness of the new therapeutic approaches since genetic profiles of patients are often underestimated in studies. It is indisputable that the additional genetic studies are necessary for elucidating every aspect of diabetic retinopathy and for designing a more effective treatment.

Key words

Diabetic retinopathy, DNA variants, genetic studies

Úvod

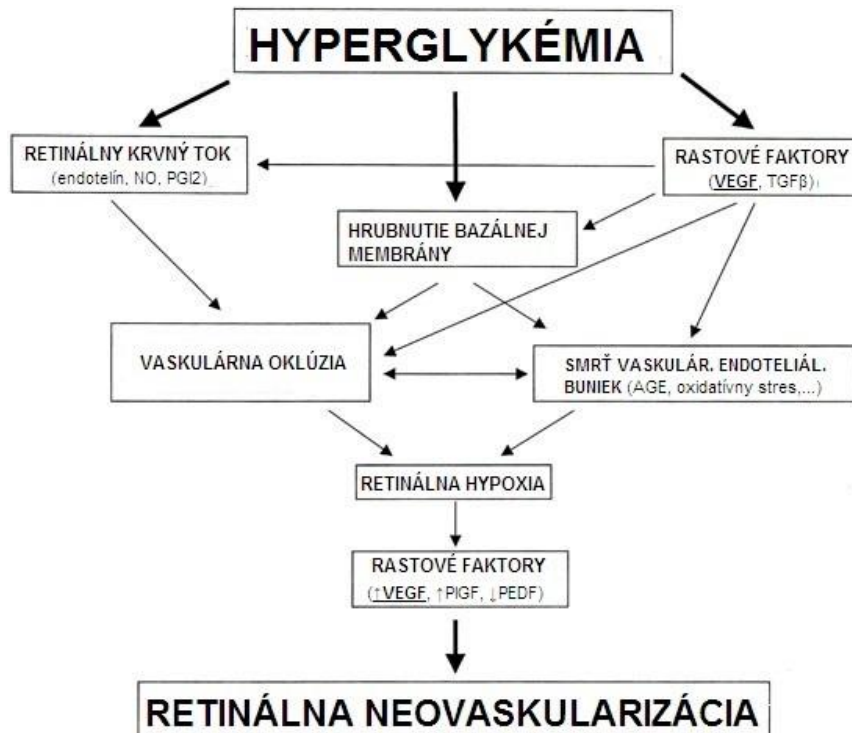
Diabetická retinopatia (DR) patrí medzi hlavné mikrovaskulárne komplikácie *diabetes mellitus* s celkovou incidenciou 22-37% **(1)**. Závažné a neliečené formy DR môžu viesť k trvalému poškodeniu zraku až k slepote. DR sa radí medzi ochorenia s veľmi komplexnými heterogénnymi prejavmi, ktoré poukazujú na jej multifaktoriálny charakter. Množstvo vedeckých štúdií sa snaží už desaťročia objasniť genetické pozadie DR. Výsledkom genetických štúdií je konsenzus o úlohe viacerých génov s malým účinkom na rozvoj ochorenia. Na základe tejto hypotézy sa genetické štúdie zamerali na gény patriace do viacerých biochemických dráh, ktorých abnormálne fungovanie vedie k niektorým z patologických príznakov DR alebo sú ovplyvňované hyperglykémiou, hlavným rizikovým faktorom DR.

Proliferatívna diabetická retinopatia (PDR) je závažnejšie štádium DR, pri ktorom vplyvom hypoxie dochádza k angiogenéze a tvorbe nových fragilných ciev pozdĺž retiny. Novovzniknuté cievy sú náchylné k hemorágii, čo môže viesť k deštrukcii retiny a následnej slepote **(2)**. Proces neovaskularizácie je iniciovaný nerovnováhou medzi stimulantami a inhibítormi angiogenézy. Medzi proangiogenické faktory patria viaceré rastové faktory (vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF), inzulínu podobný rastový faktor 1 (IGF-1), hepatocytový rastový faktor (HGF), základný fibroblastový rastový faktor (bFGF), doštičkový rastový faktor (PDGF)), prozápalové cytokíny a angiopoietíny **(3)**. Za fyziologických podmienok prevládajú v organizme inhibítory angiogenézy, ale pri patologických stavoch môže dôjsť k posunu smerom k stimulantom. V prípade DR, hyperglykémia stimuluje špecifické biochemické dráhy, čo vedie k oxidatívnu stresu a indukcii proangiogenických faktorov a aktivácii procesu angiogenézy. Špecifické biochemické dráhy modifikované hyperglykémiou, ktorých gény sú aj predmetom genetických štúdií, sú **zvýšený polyolový flux, aktivácia diacyl-glycerolovej (DAG-PKC dráhy, zvýšená expresia rastových faktorov (VEGF, IGF-1), hemodynamické zmeny, zvýšená tvorba koncových produktov pokročilej glykácie (AGE), renin-angiotenzín-aldosterónový systém (RAAS), subklinický zápal, leukostáza a oxidatívny stres** vedúci k zvýšenej expresii viacerých prozápalových génov asociovaných so stresom (NF- κ B, TGF- β , NOX4, Nrf2,...) **(4)**.

Súčasná terapia sa primárne zameriavajú na zvládnutie hlavných symptómov DR prostredníctvom kontroly krvného tlaku a množstva glukózy a lipidov v krvi. Invazívne zásahy do oka sú implementované až v pokročilých štádiách DR pri vážnom ohrození zraku. Medzi takého zákroky patrí laserová fotokoagulácia, intravitreálne injekcie kortikostreoidov a vitreo-retinálne operácie **(5)**. Neexistujú žiadne diagnostické testy, ktoré by predikovali zvýšené riziko DR pred objavením symptómov alebo v skorých štádiách ochorenia. Súčasný stav diagnostiky DR ilustruje potrebu odhalenia nových genetických súvislostí v patologických procesoch DR, ktoré by vytvorili priestor pre navrhnutie inovatívnych diagnostických testov a cielených terapií. Cieľom genetických štúdií je identifikácia polymorfizmov v génoch kandidátnych dráh, ktoré by boli signifikantne asociované s DR, a teda by mohli slúžiť ako diagnostický marker zvýšeného rizika rozvoja ochorenia.

Angiogenéza (neovaskularizácia) je jedným z najvýznamnejších kontribútorov v patogenéze PDR, a práve preto sa súčasné výskumy zameriavajú na nájdenie spôsobu prevencie alebo

liečby neželanej angiogenézy v retine oka, ktorá môže viesť k slepote u pacientov s DR. Vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF) je jedným z najviac študovaných génov s najväčším počtom identifikovaných polymorfizmov. VEGF ovplyvňuje vaskulárnu permeabilitu endoteliálnych buniek. Expresia VEGF je ovplyvnená hyperglykémiou aj retinálnou hypoxiou počas DR (6). Aktivácia VEGF vedie k zrúteniu krvnej bariéry v retine, rozvoju diabetického makulárneho edému a neovaskularizácii typickej pre PDR (7). Zvýšené množstvá VEGF boli pozorované v sére a v sklovci oka (corpus vitreum) pacientov trpiacich PDR (8), čo napovedá o úlohe VEGF v patologických procesoch počas DR.



Obr.1 Patogénne procesy počas diabetickej retinopatie vedúce k retinálnej neovaskularizácii

Štúdie identifikovali niekoľko polymorfizmov v promótorovej oblasti génu VEGF (rs2010963, rs25648, rs1570360, rs3095039, rs35569394, rs699947, rs13207351, rs735286, rs2146323, rs833061, rs3025021, rs10434, rs833068 and rs833070) s možným dopadom na expresiu génu a asociáciou s DR (9, 10, 11) (tab. 1). Polymorfizmus rs2010963 (-634C/G) sa objavuje najčastejšie v jednotlivých štúdiách, pri čom asociácia bola potvrdená len v japonskej a indickej populácii, kde C alela zvyšuje riziko NPDR u pacientov s *diabetes mellitus* typu 2 (12, 13). Zároveň je ten istý polymorfizmus asociovaný so zvýšeným rizikom makulárneho edému v japonskej populácii (14). Zvyšné spomenuté polymorfizmy vykazovali nesignifikantné alebo protichodné asociácie v rôznych populáciách, čo napovedá o potrebe väčších štatistických súborov, ktoré budú vyhodnocované v kontexte populácii. Neustále sa objavujú nové štúdie identifikujúce ďalšie polymorfizmy génu VEGF s možným prepojením na DR, čo sa môže chápať ako dôkaz zapojenia VEGF do patologických procesov počas DR, ale zároveň žiadny s polymorfizmov nedosiahol signifikantnosť na úrovni genetického markra.

Polymorfizmus	Typ DM ³	Populácia	Popis
rs2010963 (c. C-634G)	2	japonská, indická, kaukazská	C alela predstavuje rizikový faktor NPDR ⁴ pri T2M ⁵
c. C-460T	1&2	kaukazská	možná asociácia s DR
rs25648	2	multi-etnická	T alela zvyšuje riziko DR, ale nesignifikančná asociácia
rs1570360 (c. A-116G)	2	multi-etnická	nekonzistentné zistenia
rs3095039	2	multi-etnická	T alela zvyšuje riziko DR, ale nesignifikančná asociácia
rs35569394	1&2	multi-etnická	(-2549) DEL zvyšuje riziko DR, ale nesignifikančná asociácia
rs699947 (c. A-2578C)	2	multi-etnická	A alela zvyšuje riziko DR, ale nesignifikančná asociácia
rs13207351 (c. A-152G)	1&2	kaukazská	asociované s PDR ⁶ v niektorých populáciách
rs735286 (c. C4618T)	1&2	kaukazská	SNP asociované so závažnosťou PDR
rs2146323 (c. C5092A)	1&2	kaukazská	SNP asociované so závažnosťou DR a so skorou progresiou DR
rs833061 (c. C-1498T)	2	čínska	nekonzistentné zistenia
rs3025021	2	čínska	nekonzistentné zistenia
rs10434	1&2	kaukazská	G alela asociovaná s DR
rs833068	1&2	kaukazská	G alela predstavuje rizikový faktor DR
rs833070	1	japonská	SNP asociované so skorou progresiou DR

¹ vaskulárny endoteliálny rastový faktor, ² diabetická retinopatia, ³ diabetes mellitus, ⁴ neproliferatívna diabetická retinopatia, ⁵ diabetes mellitus typ 2, ⁶ proliferatívna diabetická retinopatia

Tab.1 Identifikované polymorfizmy génu VEGF¹ vzhľadom na DR²

Administrácia anti-VEGF terapie vystúpila v posledných rokoch do popredia pri liečbe závažnejšie štádia DR. Vo väčšine prípadov liečba viedla k zlepšeniu stavu pacienta a spomaleniu proliferácie retinálnych artérií (7). Štúdie poukazujú na efektívnejšie výsledky anti-VEGF terapie, než použitím fotokoagulácie, vzhľadom na zachovanie a zlepšenie videnia pacientov s pokročilými štádiami DR. Nevýhodou anti-VEGF liečiv je ich možný prechod do celotelového krvného obehu, čo potenciálne môže vyústiť do hypertenzie, proteinúrie, k zvýšenému riziku kardiovaskulárnych príhod a k zhoršeniu hojenia rán (5). Ďalšie angiogénne faktory, ako PDGF (doštičkový rastový faktor), HGF (hepatocytový rastový faktor), bFGF (základný fibroblastový rastový faktor) a CTGF (rastový faktor spojivových tkanív) sa tiež podieľajú na procese retinálnej neovaskularizácie (6) a mohli by byť ďalšie ciele v špecifickej terapii DR. **Endostatín** je účinný inhibítor angiogenézy inhibujúci aktivitu viacerých pro-angiogénnych faktorov (CXCL1, MMP, AP-1), vrátane VEGF. Z tohto dôvodu v súčasnosti prebieha klinická štúdia zaoberajúca sa použitím a účinnosťou endostatínu ako antiangiogénneho terapeutika počas DR (15).

Rozvoj a progresia DR nie je identická u každého pacienta a môže mať značne heterogénne prejavy závislé na nie úplne objasnenom genetickom pozadí ochorenia. Na dôvažok, prebiehajúce patologické procesy nie sú rovnocenné u všetkých skupín pacientov, u

niektorých pacientov je pre rozvinutie ochorenia esenciálna aktivácia RAGE (receptor pre koncové produkty pokročilej glykácie), pre iných pacientov zas systémový zápal **(5)**. Vplyvom heterogenity procesov vedúcich k symptómom DR, môže byť potenciálna terapia navrhnutá na rôzne dráhy zapojené do rozvoja ochorenia s rozdielnymi výsledkami účinnosti terapie, v prípade nezohľadnenia genetického profilu jednotlivých pacientov a ich genetických predispozícií v súvislosti s DR. Z tohto dôvodu by mala byť farmakogenetika integrovaná pri dizajne nových terapeutických postupov a identifikácii prognostických markerov. Správnosť takéhoto prístupu potvrdila aj štúdia z 2014 na egyptských pacientoch, kde práve polymorfizmus c. C-634G (rs2010963) génu VEGF mohol nepriaznivo ovplyvniť účinnosť a výsledok anti-VEGF terapie **(16)**.

Napriek desiatkam rokov štúdia a výskumu diabetickej retinopatie, veľa aspektov tohto komplexného ochorenia zostáva neobjasnených. Možnosti diagnostiky a liečby sú z týchto dôvodov nedostatočné, čo spôsobuje, že DR je jednou z najčastejších príčin slepoty. Cesta k úspešnej terapii leží aj v genetike a jej prepojení s už známymi patologickými procesmi počas DR.

Táto štúdia je podporovaná operačným programom výskum a vývoj - ITMS 26240120038, 2013/4.1/04-SORO.

Literatúra

- 1. Singh K, Kant S, Singh VK, Agrawal NK, Gupta SK, Singh K.** (2014) Toll-like receptor 4 polymorphisms and their haplotypes modulate the risk of developing diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Molecular Vision*. 20: 704-713.
- 2. Petrovic D.** (2013) Candidate Genes for Proliferative Diabetic Retinopathy. *BioMed Research International*. 2013. 1-9.
- 3. Behl T, Kaur I, Goel H, Kotwani A.** (2015) Significance of the antiangiogenic mechanisms of thalidomide in the therapy of diabetic retinopathy. *Vascular Pharmacology*. doi: 10.1016/j.vph.2015.07.003.
- 4. Kato M, Castro NE, Natarajan R.** (2013) MicroRNAs: Potential Mediators and Biomarkers of Diabetic Complications. *Free Radic Biol Med*. 64:85-94.
- 5. Simó R, Hernández C.** (2015). Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence. *Prog Retin Eye Res*. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.04.003.
- 6. Simó-Servat O, Hernández C, Simó R.** (2013) Genetics in Diabetic Retinopathy: Current Concepts and New Insights. *Current Genomics*. 14: 289-299.
- 7. Stewart MW.** (2012) Aflibercept (VEGF Trap-eye): the newest anti-VEGF drug. *Br J Ophthalmol*. 96 (9): 1157–1158.
- 8. Sydorova M, Lee MS.** (2005) Vascular endothelial growth factor levels in vitreous and serum of patients with either proliferative diabetic retinopathy or proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res*. 37 (4):188–190.
- 9. Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, Craig JE.** (2009) A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. *Diabetes*. 58 (9):2137–2147.
- 10. Churchill AJ, Carter JG, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, Brenchley PE et al.** (2008) VEGF polymorphisms are associated with severity of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49 (8):3611–3616.
- 11. Nakanishi K, Watanabe C.** (2009) Single nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene intron 2 are markers for early progression of diabetic retinopathy in Japanese with type 1 diabetes. *Clin Chim Acta*. 402 (1–2): 171– 175.
- 12. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al.** (2002) A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 51 (5): 1635–1639.

- 13. Uthra S, Raman R, Mukesh BN, Rajkumar SA, Padmaja KR, Paul PG, et al. (2008)** Association of VEGF gene polymorphisms with diabetic retinopathy in a south Indian cohort. *Ophthalmic Genet.* **29** (1): 11–15.
- 14. Awata T, Kurihara S, Takata N, Neda T, Iizuka H, Ohkubo T, et al. (2005)** Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macula retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* **333** (3): 679–685.
- 15. Behl T, Kotwani A. (2015)** Possible role of endostatin in the antiangiogenic therapy of diabetic retinopathy. *Life Sci.* **135** (15): 340-349.
- 16. Cho H, Sobrin L. (2014)** Genetics of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep.* **14**: 515.

MÔŽU RASTLINNÉ POLYFENOLY ZLEPŠIŤ KVALITU ŽIVOTA PACIENTOV SO PSORIÁZOU?

(Can plant's polyphenols improve the quality of patient's life with psoriasis?)

Jarmila Rodáková¹, Zuzana Paduchová¹, Zdeňka Ďuračková¹, Jana Muchová¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava; rodakova4@uniba.sk

Súhrn

Psoriáza je chronické autoimunitné zápalové ochorenie postihujúce 2 až 3 % európskej populácie. Hlavnou cieľovou skupinou sú ľudia (bez ohľadu na pohlavie) vo veku 15-35 rokov. Príčinou vzniku psoriázy je porucha imunitného systému, pri ktorej dochádza k nadmernej produkcii kožných buniek. Psoriáza má niekoľko foriem, ktoré sú spojené s mnohými ochoreniami (napr. depresia, metabolický syndróm, obezita). Rozloženie psoriatických ložísk je rôznorodé a sprevádzané prevažne svrbením. Výskum psoriázy je veľmi dôležitý, pretože toto ochorenie ovplyvňuje nie len fyzické zdravie pacienta ale aj psychiku človeka a kvalitu každodenného života. Alternatívne prístupy založené na používaní prírodných látok (napr. Pycnogenol) môžu predstavovať jeden z možných spôsobov ako zlepšiť život psoriatických pacientov. Pycnogenol je extrakt z kôry francúzskej prímorskej borovice *Pinus pinaster* s biomodulačnými vlastnosťami.

Kľúčové slová

Psoriáza, oxidačný stres, Pycnogenol

Summary

Psoriasis is chronic autoimmune inflammatory disease. Population prevalence of this disease is 2-3 % in Europe. People aged 15-35 years (regardless of sex) are the main target group. The cause of psoriasis is a disorder of the immune system, in which is the overproduction of skin cells. Psoriasis has several forms, which are associated with many diseases (e.g. depression, metabolic syndrome, obesity). Location of psoriatic plaques is diverse and it is mostly accompanied by itching. Research of psoriasis is very important because this disease affects not only the patient's physical health but also it has an adverse impact on the human psyche and the quality of everyday life. Alternative approaches based on using natural compounds (e.g. Pycnogenol) could be one of the possible ways to ameliorate the life of psoriatic patients. Pycnogenol is extract from French maritime pine bark *Pinus pinaster* with biomodulation properties.

Key words

Psoriasis, oxidative stress, Pycnogenol

Psoriáza

Psoriáza patrí medzi najčastejšie kožné ochorenia postihujúce približne 2-3 % populácie nezávisle od pohlavia. Ide o chronické zápalové ochorenie s doposiaľ neznámou etiológiou, ktorá súvisí s abnormálnym metabolizmom lipidov a oxidačným stresom. Okrem človeka sa nevyskytuje u žiadneho živočíšneho druhu. Psoriáza je charakterizovaná červenými šupinatými oblasťami, olupujúcou sa a praskajúcou kožou, bolesťou a neprijemným svrbením. Najviac postihnuté miesta tela sú lakty, kolenná, pokožka hlavy a sakrálna oblasť s análnym otvorom. V súčasnosti sa zaraďuje medzi systémovú, genetickú a imunologickú chorobu spojenú s viacerými pridruženými ochoreniami. Najčastejšie ide o depresiu, obezitu a metabolický syndróm (1). Najnovšie štúdie dokazujú, že psoriáza je geneticky podmienené ochorenie a jeho predispozície sú dedičné. Ide hlavne o gény na 6. chromozóme, ktoré sa zúčastňujú na kožnej imunite a ovplyvňujú aj diferenciáciu keratinocytov. K vývoju psoriázy prispieva aj psychika, infekčné ochorenia, klimatické podmienky, hormóny, či ochorenia napr. Diabetes mellitus, hepatopatia.

V patogenéze psoriázy je prítomná zvýšená expresia viacerých prozápalových cytokínov, ako sú rôzne interleukíny, tumor nekrotizujúci faktor a interferón γ . V rozvoji psoriázy hrajú dôležitú úlohu epidermálne keratinocyty, mononukleárne leukocyty, neutrofily a aktivované T- bunky spolu s chemokínmi a cytokínmi. Počas formovania psoriatickej lézie spolu komunikujú dva odlišné typy buniek: epidermálne keratinocyty a leukocyty. Epidermálne keratinocyty produkujú chemoatraktívne látky, ktoré lákajú neutrofily do epidermis a uvoľňujú reaktívne formy kyslíka (ROS). Aktivované T-lymfocyty vyvolávajú zmeny v koži, ktorých dôsledkom je ochorenie psoriáza (12). Zvýšeným hromadením polymorfonukleárných lymfocytov (PMNL) v tkanive dochádza k oxidačnému poškodeniu významných biomolekúl, pretože PMNL produkujú ROS. Tie zapríčínajú modifikáciu DNA, lipoperoxidáciu a produkciu zápalových cytokínov a chemokínov. ROS slúžia aj ako druhí posolovia v signálnych dráhach a modulujú expresiu viacerých génov. Najvýraznejší účinok sa pozoroval v nasledovných cestách prenosu signálu: MAPK/AP – 1, NF- κ B a JAK – STAT. Práve tieto cesty prenosu signálu sa považujú za kľúčové pri zápalových ochoreniach, medzi ktoré psoriáza patrí. Aktivovaním týchto kaskád prenosu signálu sa spúšťa bunková odpoveď v podobe rastových faktorov, cytokínov, neurotransmiterov a ďalších intracelulárnych signálnych molekúl, čo vedie k bunkovej proliferácii, diferenciácii a apoptóze. Abnormálny rast keratinocytov je u psoriázy zapríčinený aj produkciou superoxidu PMNL a psoriatickými dermálnymi fibroblastmi. Zvýšený výskyt PMNL v psoriatických léziách vedie k uvoľňovaniu ROS a tým k následnej lipoperoxidácii a k oxidačnému poškodeniu membrán buniek. Keď je zároveň poškodený aj systém antioxidačnej ochrany, účinok pôsobenia ROS je ešte masívnejší. Presný mechanizmus aktivácie a následného priebehu ochorenia nie je doposiaľ známy.

Psoriázu je možné rozdeliť podľa formy, veku, priebehu alebo lokalizácie. Podľa úrovne postihnutia sú rozlišované tri základné typy: jednoduchá psoriáza – *Psoriasis vulgaris*, psoriáza spojená s hnisajúcimi pľuzgierikmi – *Psoriasis pustulosa* a artropatická psoriáza s postihnutím kĺbov. Najčastejším typom je *Psoriasis vulgaris*, ktorá tvorí približne 85 % zo všetkých prípadov psoriázy a najviac postihnuté sú oblasti laktov, kolien, či krížov. Podľa formy môže byť psoriáza akútna (trup, končatiny), chronická stacionárna - ložisková, inverzná (tvár) a pustulózná (dlane).

Klinické prejavy týchto ochorení sú u každého pacienta individuálne, rovnako ako aj ich priebeh a intenzita.

Liečba psoriázy

V súčasnosti sa pri liečbe psoriázy využíva veľké množstvo liečebných metód a postupov, ktoré sa radia do štyroch základných skupín: I. topická (lokálna) liečba, II. fototerapia, III. systémová liečba a IV. biologická liečba.

Lokálna liečba sa využíva pri liečbe ľahkej až stredne závažnej psoriázy a pri ťažkej forme má len doplnkový charakter. Lieky sa aplikujú priamo na postihnuté miesta kože. Pri lokálnej liečbe psoriázy sa využívajú kortikosteroidy, analógy D3 vitamínov, retinoidy a premasťujúce prípravky. Pri liečbe kortikosteroidmi sa vyskytujú aj nežiaduce účinky (tachykardia a iné), a preto sú kortikoidy pri liečbe kontraindikované. Dôležitá je podporná starostlivosť o psoriatickú pokožku, ktorá môže znížiť ich vedľajší účinok.

Fototerapia je liečba využívajúca ultrafialové svetlo pôsobiace na psoriatické lézie. Pri psoriáze je najúčinnšie úzke spektrum UVB o vlnovej dĺžke 311 nm. Fototerapia je vhodná pre pacientov, ktorí majú tela postihnuté psoriázou na viac ako 30 %. Liečba môže prebiehať maximálne 3 mesiace 3-5 krát do týždňa. Ide o významnú, účinnú a relatívne bezpečnú metódu, ktorá sa využíva pri liečbe strednej a ťažkej formy psoriázy. Mnohokrát sa fototerapia kombinuje s balneoterapiou s použitím solných, bylinných a iných kúpeľov. Lokálna liečba a fototerapia vyžadujú maximálnu zodpovednosť pacienta, keďže sú časovo náročné a musia byť podstupované pravidelne. Ich výhodou je však bezpečnosť v porovnaní so systémovou liečbou.

V prípadoch, kde je potrebný rýchly nástup účinku, alebo kde nezaberá lokálna liečba ani fototerapia, pacienti podstupujú systémovú liečbu. Ide o pacientov so stredne ťažkou až ťažkou psoriázou, ktorej limitom je orgánová toxicita a jej aplikáciu je potrebné dôkladne zvážiť. Najviac predpisovaným liekom pri systémovej liečbe je metotrexát. Ide o metabolit kyseliny listovej, ktorý sa využíva pri liečbe súčasného kožného a kĺbového poškodenia. Dlhodobým užívaním narastá riziko cirhózy pečene a znižuje sa pravdepodobnosť počatia. Pri liečbe psoriázy sa využíva viac ako 40 rokov a je považovaný za klasický liek pri systémovej liečbe.

Novým rozvíjajúcim sa druhom liečby psoriázy predstavujú biologiká. Biologické lieky špecificky zasahujú poškodené molekuly bez toho, aby zasiahli zdravé bunky. Vďaka súčasným znalostiam o patogenéze psoriázy je tento typ liečby vysoko selektívny, čo prispieva aj k lepšej znášanlivosti liečby. Biologickú liečbu môžu podstúpiť pacienti, ktorí majú psoriázou postihnutých viac ako 10 % tela a u ktorých bola predchádzajúca liečba neúspešná. V súčasnosti sú na Slovensku pre biologickú liečbu dostupné tieto biologiká: infliximab, adalimumab, etanercept, ustekinumab, omalizumab a secukinumab. Nevýhodou biologickej liečby je, že doposiaľ nie sú známe vedľajšie účinky po ich dlhodobom užívaní.

Ťažká forma psoriázy vyžaduje kombináciu niekoľkých typov liečby a pravidelné monitorovanie pacienta lekárom. Zmyslom tejto liečby je zvýšenie účinnosti liečiv a eliminácia ich nežiaducich účinkov.

Oxidačný stres a ochorenia kože

Nerovnováha medzi oxidantom a antioxidantom posunutá v prospech oxidanta, ktorá vedie k poškodeniu, nesie pomenovanie oxidačný stres. Oxidanty sú produkty normálneho aeróbného metabolizmu, ale môžu byť tiež tvorené pri neštandardných patofyziologických podmienkach (16). Medzi indikátory oxidačného stresu patrí poškodenie dusíkatých zásad v DNA, produkty oxidačného poškodenia proteínov a peroxidácie lipidov.

Koža je najväčší orgán tela, poskytujúci ochrannú funkciu a zabezpečujúci homeostázu organizmu, preto je hlavným cieľom pôsobenia ROS. ROS sú látky prirodzene sa tvoriace v nízkej koncentrácii počas normálneho aeróbného metabolizmu. Patria sem singletový kyslík, superoxidový anión, hydroxylový radikál a iné (3). Najvýznamnejším procesom tvorby voľných radikálov je dýchať reťazec, pri ktorom sa oxidáciou vzdušného kyslíka

vytvára energia a vedľajším produktom sú hydroxylový radikál a superoxid. Za normálnych podmienok nie je produkcia radikálov prekážkou, problém nastáva až pri ich nadprodukcii, ktorá je zväčša dôsledkom istého patologického stavu. Základnou úlohou uvoľňovania veľkého množstva ROS počas zápalových procesov je usmrtiť napádajúce mikroorganizmy a/alebo degradovať poškodené tkanivo. Nepresným zacielením ROS dochádza k indukcii oxidačného stresu aj u normálnych buniek čo vedie k aktivácii patologických procesov. Nekontrolovateľný únik ROS sa podieľa na rozvoji mnohých kožných ochorení.

Organizmus bojuje proti voľným radikálom najmä pomocou antioxidantov, ktoré zabraňujú poškodeniu lipidov a bielkovín a zabezpečujú homeostázu kože (17). Tie účinkujú na princípe troch základných mechanizmov: I. bránia tvorbe voľných radikálov, II. vychytávajú už vytvorené voľné radikály alebo III. odstraňujú poškodené molekuly z organizmu. Prvú skupinu tvoria antioxidanty v širšom slova zmysle, medzi ktoré patria rôzne chelatačné činidlá (napr. albumín, transferín) a enzýmy (napr. xantínoxidáza, kataláza, či peroxidáza). Antioxidanty v užšom slova zmysle tvoria druhú skupinu, ktorá sa delí podľa mechanizmu eliminácie radikálov na: vychytávače (vychytávajú radikály a premieňajú ich na neradikálové molekuly; napr. superoxiddismutáza (SOD), lapače (premieňajú radikály na stabilnejšie molekuly; napr. vitamín E) a zhasače (zhasajú radikály; napr. β -karotén). Tretia skupina zahŕňa reparačné systémy, ktorých úlohou je odstrániť poškodené molekuly (napr. fosfolipáza A_2) (4). Hoci endogénne antioxidanty zoslabujú škodlivé účinky ROS, zvýšená a dlhotrvajúca prítomnosť voľných radikálov a ROS môže prelomiť obranné mechanizmy a sprostredkovať rozsiahlu bunkovú odpoveď, ktorá prispieva k rozvoju kožných ochorení, vrátane psoriázy. Zvýšená tvorba voľných radikálov narúša kožnú homeostázu. Zásadnú úlohu v rozvoji kožných chorôb zohráva redoxný stav v bunkách kože. Využitie antioxidačnej terapie v liečbe psoriázy sa ukázalo ako prínosné (5, 11, 17).

Rôzne parametre oxidačného poškodenia hodnotí viacero štúdií. Súčasné práce, ktoré sumarizujú markery oxidačného stresu zhodne poukazujú na zvýšenú hladinu malondialdehydu (MDA) v plazme psoriatických pacientov (10, 13). Súčasne sa zistili znížené hladiny antioxidantov β -karoténu, glutatiónu, α -tokoferolu (vitamín E) a znížené aktivity antioxidačných enzýmov SOD, glutatiónperoxidázy a katalázy (8, 17).

Górnicki a Gutsze (2001) zaznamenali znížené aktivity SOD a katalázy v erytrocytoch psoriatických pacientov a zvýšenie hladiny MDA v porovnaní s kontrolnou skupinou.

V inej štúdii bola ako marker lipoperoxidácie použitá kyselina tiobarbiturová, kde sa namerali jej zvýšené hladiny v sére psoriatických. Stanovili aj celkovú antioxidačnú kapacitu plazmy, ktorá bola signifikantne znížená u pacientov so psoriázou. Zároveň porovnávali mieru lipoperoxidácie u pacientov s aktívnou psoriázou (viac ako 10 % kože pokrytej psoriatickými léziami) s pacientmi s neaktívnou psoriázou, a zistili, že u pacientov s aktívnou formou je významne vyššia (15).

Odborná literatúra zaoberajúca sa touto problematikou vo všeobecnosti uvádza, že oxidačný stres zohráva hlavnú úlohu v patogenéze psoriázy. Štúdie však nie sú jednotné vo všetkých parametroch oxidačného stresu a v niektorých údajoch sa výsledky rozchádzajú, preto je potrebný ešte ďalší výskum.

Doplnková liečba prírodnými látkami

Pri liečbe psoriázy je často využívaná doplnková liečba prírodnými i látkami, príkladom je pycnogenol. Pycnogenol je extrakt z kôry francúzskej prímorskej borovice *Pinus pinaster* obsahujúci zmes polyfenolových látok s antioxidačnou, protizápalovou a inou biomodulačnou aktivitou. Zúčastňuje sa tvorby kolagénu, kyseliny hyalurónovej a napomáha produkcii endotelového oxidu dusíka, ktorý zabezpečuje rozširovanie ciev. Obsahuje prokyanidíny, bioflavonoidy a organické zlúčeniny v konštantných pomeroch. Až 65-75 % tvoria

prokyanidíny obsahujúce katechínové a epikatechínové podjednotky s rôznou dĺžkou reťazca (7).

Významnou vlastnosťou tejto prírodnej látky je jeho antioxidačná schopnosť, vďaka ktorej dokáže zneškodniť veľké množstvo voľných radikálov. Tie priamo nevyvolávajú žiadne ochorenie, ale zhoršujú jeho priebeh. Ide hlavne o srdcovo-cievne, autoimunitné, nádorové ochorenia, Alzheimerovu chorobu, či ochorenia postihujúce pohybový aparát.. Voľné radikály negatívne ovplyvňujú aj proces starnutia a prispievajú k tvorbe vrások, pričom doposiaľ jediným ochranným prostriedkom sú práve antioxidanty. Pycnogenol napomáha znižovaniu hladiny histamínu, slúži pri prevencii kardiovaskulárnych ochorení, tvorbe kŕčových žíl, znižuje riziko infarktu myokardu a dokonca znižuje aj ukladanie tukov do tukových buniek (14).

Belcaro a kol. (2014) potvrdili pozitívny účinok Pycnogenolu na liečbu psoriázy (150 mg/deň, 12 týždňov), kedy sa u pacientov užívajúcich Pycnogenol pozoroval vo všetkých zasiahnutých oblastiach tela pokles psoriatických lézií v porovnaní s pacientmi bez suplementácie. Pacienti boli vo veku 30-45 rokov so strednou až ťažkou formou psoriázy. Tieto výsledky poukazujú na účinnosť Pycnogenolu pri liečbe psoriázy a znížení oxidačného stresu. Ďalšie štúdie môžu potvrdiť využitie Pycnogenolu pri systémovej a lokálnej liečbe psoriatických lézií.

Psoriáza nepatrí k život ohrozujúcim ochoreniam, je však ochorením znepríjemňujúcim každodenný život. V rebričku ochorení, ktoré negatívne ovplyvňujú život sa nachádza hneď za depresiami. Pacienti trpiaci psoriázou majú mnohokrát okrem fyzických problémov aj psychické poruchy, ktoré sú často krát dôsledkom negatívneho vplyvu okolia. Vzhľadom na rastúci trend prevalencie psoriázy je dôležité poznať patológiu ochorenia, čo by napomohlo vývoju liečiv resp. používaniu prírodných látok ako doplnkovej terapie, na zabezpečenie kvalitnejšieho a bezstarostnejšieho života pacientov.

Literatúra

1. **Alsufyani MA, Golant AK, Lebwohl M.** Psoriasis and the metabolic syndrome. *Dermatol. Ther.* 2010; 23 (2): 137-143.
2. **Belcaro G, Luzzi R, Hu S, Cesarone MR, Dugall M, Ippolito E, Corsi M, Caporale S.** Improvement in signs and symptoms in psoriasis patients with Pycnogenol® supplementation. *Panminerva med.* 2014; 56 (1): 41-48.
3. **Bicker DR, Athar M.** Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J. Invest. Dermatol.* 2006; 126 (12): 2565-2575.
4. **Ďuračková Z.** Voľné radikály a antioxidanty v medicíne (I). Bratislava; Slovak academic press, 1998: 88-174
5. **Ďuračková Z.** Some current insight into oxidative stress. *Physiol. Res.* 2010; 59 (4): 459-469.
6. **Górnicki A, Gutsze A.** Erythrocyte membrane fluidity changes in psoriasis: an EPR study. *Journal of Dermatological Science.* 2001; 27: 27-30.
7. **Grimm T, Chovanová Z, Muchová J, Sumegová K, Liptáková A, Ďuračková Z, Högger P.** Inhibition of NF- κ B activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *Journal of Inflammation* 2006; doi:10.1186/1476-9255-3-1.
8. **Kökçam I, Naziroğlu M.** Antioxidants and lipid peroxidation status in the blood of patients with psoriasis. *Clinica Chimica Acta.* 1999; 289: 23-31.
9. **Lowes MA., Bowcock AM, Krueger JG.** Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 2007; 445 (7130): 866-873.

- 10. Okayama Y.** Oxidative stress in Allergic and Inflammatory Skin Diseases. *Current Drug Targets – Inflammation & Allergy*. 2005; 4: 517-519.
- 11. Péč J.** Chronická ložisková psoriáza. Komplexný pohľad na problematiku a biologická liečba. Banská Bystrica, Dali-BB; 2006: 182.
- 12. Prinz JC.** Neueste aspekte in der pathogenese der psoriasis. *Hautarzt* 2003; 54: 209-214.
- 13. Rashmi R, Rao KS, Basavaraj KH.** A comprehensive review of biomarkers in psoriasis. *Clin Exp Dermatol*. 2009; 34 (6): 658-663.
- 14. Rohdewald P, Passwater RA.** The pycnogenol phenomenon. Bohum; Ponte press, 2015: 11-105.
- 15. Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Rebelo I, Figueiredo A, Quintanilha A, Teixeira F.** Erythrocyte damage in mild and severe psoriasis. *British Journal of Dermatology*. 2004; 150 (2): 232-244.
- 16. Sies H.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp physiol*. 1997; 82 (2): 291-295.
- 17. Zhou Q, Mrowietz U, Rostam Yazdi M.** Oxidative stress in the pathogenesis of psoriasis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; 47: 891-905.

