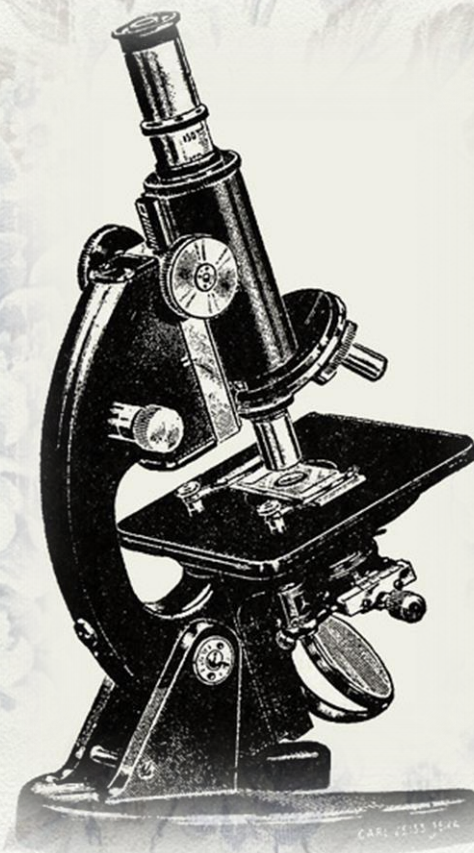




UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA
V MARTINE



NOVÉ TRENDY A PERSPEKTÍVY V HISTOLÓGII VI



Martin 2020

Nové trendy a perspektívy v histológii VI

Recenzovaný zborník prác

Editori: RNDr. Mária Kovalská, PhD.
Ing. Veronika Cígerová, PhD.
prof. MUDr. Marian Adamkov, DrSc.

Recenzenti: prof. RNDr. Erika Halašová, PhD.
doc. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

Grafická úprava: PhDr. Libuša Kovalská

Zborník neprešiel jazykovou korektúrou.

Za obsahovú, ako aj gramatickú stránku zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov.

Všetky práva vyhradené. Žiadna časť tohto zborníka nemôže byť reprodukováná bez súhlasu vydavateľa.

Vydavateľ: Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita
Komenského v Bratislave, Martin, 2020

Tlač: Tlačiareň P+M, s.r.o., Turany, 2020

Dostupnosť on-line: <http://www.jfmed.uniba.sk>

ISBN 978–80–8187–086–6

EAN 9788081870866

NIL VOLENTI DIFFICILE

Neznámy autor

Nové trendy a perspektívy v histológii VI

sú venované pamiatke

RNDr. Ľudmile Bošelovej, CSc.



*Aj týmto spôsobom si chceme pripomenúť našu bývalú spolupracovníčku,
na ktorú s úctou a láskou často spomíname.*

*Kolektív Ústavu histológie
a embryológie*

OBSAH

	Predhovor	5
EXPERIMENTÁLNE ŠTÚDIE		
Lysíková T.	Vplyv starnutia na mieru apoptózy v mozgu potkanov	6
Báľentová S.	Apoptóza v neurogénnych oblastiach mozgu potkana po expozícii ionizujúcim žiarením	11
Hnilicová P.	Metabolicko-morfologické účinky metionínom vyvolanej hyperhomocysteinémie v hipokampe mozgu potkanov	15
Oravcová B.	Efekt metionínovej diéty na histopatologické zmeny v hipokampe potkanov	20
Bencúrová M.	Význam vzájomnej komunikácie sarko/endoplazmatického retikula s mitochondriami v patofyziológii ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu	25
Mokrá D.	Hodnotenie apoptózy epitelových buniek pľúc zvierat s modelom syndrómu aspirácie mekónia pri rôznych typoch pľúca šetriacej pľúcnej ventilácie	30
Harsányiová J.	Imunohistochemická analýza celistvých tkanív tráviaceho traktu v rotenónom indukovanom myšom modeli Parkinsonovej choroby	34
Holovská K.	Mikroskopická štúdia vplyvu EMR na pečeň potkanov	39
Andrašková S.	Morfologická a funkčná maturácia Leydigových buniek v semenníku potkana	43
Kubatka P.	Chemopreventívne účinky Škorice pravej v modeli experimentálneho karcinómu prsníka in vivo: hodnotenie základných parametrov karcinogenézy a histopatologických zmien	47
Koklesová L.	Vplyv Cinnamomum zeylanicum L. na posttranslačné modifikácie histónov v experimentálnom modeli mamárnej karcinogenézy in vivo	51
Samec M.	Modulačný účinok Škorice pravej v reguláciách metylácie vybraných génových promótorov v chemopreventívnom modeli mamárnej karcinogenézy in vivo	55
Líšková A.	Vplyv Cinnamomum zeylanicum L. na expresiu vybraných parametrov nádorových kmeňových buniek v modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy in vivo	59
Murín R.	Import extracelulárnych proteínov ľudskými neuroblastómovými a astrocytómovými bunkami	63
Murín R.	Immunocytochemická analýza expresie pyruvát karboxylázy v ľudských nádorových bunkách	67
KLINICKÉ A HISTOMORFOLOGICKÉ ŠTÚDIE		
Cígerová V.	Vzájomný vzťah medzi SATB2 expresiou a MSI, COX-2, HIF-1α v kolorektálnych karcinómoch	71
Bartoš V.	Hodnotenie imunohistochemickej expresie cyclinu D1 (Bcl-1) v tkanive bazocelulárneho karcinómu kože	75
Škuciová V.	Tumor infiltrujúce lymfocyty v malígnych melanómoch	80
Péčová T.	Diskrepancie v klinickom a histopatologickom obraze – o dôvod viac na biopsiu	85
Dušenka R.	Testikulárny nádor – NSGCT – Teratóm	88
Števík M.	MR spektroskopická analýza mozgových lézií	93
Snopko P.	Spinálny epidurálny hematóm po operačnej liečbe degeneratívneho ochorenia driekovej chrbtice u pacientov nad 60 rokov - incidencia a analýza rizikových faktorov	98
Masaryková M.	Intersomatické cervikálne kliečky s integrovanou dlahou	102

PREHL'ADOVÉ PRÁCE

Parvanovová P.	<i>Úloha neurogenézy hipokampu v rozvoji depresie</i>	110
Neuschlová M.	<i>Systémová vaskulitída detského veku</i>	115
Kunertová L.	<i>Klinické a histopatologické prejavy psoriázy</i>	119
Mešťanová V.	<i>K histologickému pozadiu nádorovej progresie</i>	123
Petráš M.	<i>Využitie anti-PD-1/PD-L1 imunoterapie pri karcinóme pľúc</i>	127
Csizmárová S.	<i>Úloha HPV a onkoproteínov pri léziách krčka maternice</i>	132
Dušenka R.	<i>Epigenetics in prostate cancer: Review</i>	136
Holečková K.	<i>Strata funkcie proteínov PTEN a CDKN1B v karcinogéníze prostaty</i>	146

Predhovor

Zborník „Nové trendy a perspektívy v histológii VI“ prezentuje 31 článkov, ktoré sa venujú obsahovo rôznej medicínskej problematike, ale ich spoločným menovateľom je vzťah k morfológickým vedám. Väčšina publikovaných článkov prináša prehľadným spôsobom prierez výskumných aktivít na viacerých pracoviskách JLF UK v Martine. Napriek tomu, že sme akceptovali až 31 prác, museli sme niekoľko príspevkov z kapacitných dôvodov opäť odmietnuť. Autorom týchto článkov sa úprimne ospravedľujeme.

Tak ako každý rok, aj teraz odmeníme najkvalitnejšiu prácu v zborníku vecnými cenami, medzi ktorými budú aj hodnotné knižné publikácie. Ceny budú osobne odovzdané autorovi/autorom vybraného článku na Ústave histológie a embryológie JLF na začiatku zimného semestra akademického roku 2020/2021.

Martin, jún 2020

Zostavovatelia zborníka

Vplyv starnutia na mieru apoptózy v mozgu potkanov

Lysíková, T.¹, Kovalská, M.², Bencúrová, M.¹, Tomašcová, A.³, Kolísek, M.³,
Lehotský, J.¹, Kaplán, P.¹, Kovalská, L.⁴, Tatarková, Z.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Martin
zuzana.tatarkova@uniba.sk

Abstract

Aging can be defined, on the molecular level, as a progressive deterioration of physiological functions, which ultimately leads to systemic dysfunction and death. One of the characteristic features of the aging process is mitochondrial dysfunction. The central role of mitochondria in the regulation of both, energy metabolism and apoptosis, suggests a possible link between these two crucial cellular processes. It seems that during normal aging when low-level chronic stress occurs, apoptosis increases to some extent to eliminate dysfunctional cells, but possibly also essential post-mitotic cells like neurons in the group of 15 months old. On the contrary, the higher amount of Bcl-2, Bcl-xL in the senescent cells could maintain to some extent elevated oxidative stress and lower probability for apoptosis as seen by Bax/Bcl-2 ratio, when compared to the 15 months old. In the cortical M1 region increased presence of TUNEL+ cells and more than 20-times higher density of Fluoro-Jade C+ cells in 26 months old was observed, suggesting a significant neurodegenerative effect of aging in the neuronal cells. Taken together, our study supports a scenario in which senescent nonsynaptic mitochondria exhibit lower apoptotic activity in comparison to the 15 months old. The pattern of age-dependent changes in the mitochondrial pathway of apoptosis is complex and not easy to interpret unequivocally. Therefore our work has focused only on caspase-related apoptosis in cerebral cortex mitochondria during aging, how they might influence each other, and impact the health/function of neurons.

Keywords: aging mitochondria, apoptosis, TUNEL and FluoroJade C

Úvod

Na molekulárnej úrovni je proces starnutia definovaný ako postupné zhoršovanie fyziologických funkcií, ktoré môžu viesť k systémovej dysfunkcii až k smrti [1]. Tento proces môže zahŕňať akumuláciu senescentných buniek cells, tým sú obmedzené regeneračné schopnosti [2]. Zdravé starnutie a neurodegeneratívne choroby spojené s vekom zdieľajú niektoré spoločné patologické mechanizmy, ktoré vedú k neuronálnej dysfunkcii, najmä prítomnosť energetického deficitu, znížený príjem glukózy a poškodenie mitochondrií [3]. Mitochondrie zohrávajú okrem energetickej úlohy aj zásadnú úlohu pri kontrole homeostázy vápnika v neurónoch [4], signalizácii buniek [5], apoptóze [6] a nekroptóze [7]. Súčasné poznatky naznačujú, že narušenie mitochondriálnej funkcie v mozgu pri starnutí je spôsobené najmä zníženou rýchlosťou prenosu elektrónov v komplexe I a IV dýchacieho reťazca. V mitochondriách mozgu bolo pozorované kontinuálne zníženie mitochondriálnej respirácie s najvýraznejšími zmenami v oblastiach mozgu, ktoré sa považujú za najviac postihnuté v procese starnutia, ako je napríklad hipokampus a mozgová kôra [8]. Okrem energetického metabolizmu mitochondrie zohrávajú dôležitú úlohu aj v procese intracelulárnej dráhy

apoptózy. Preto sme sa v našej práci zamerali práve na zmonitorovanie proteínov vnútornej mitochondriálnej dráhy apoptózy v mitochondriách starnúceho kortexu, ale aj zmien na úrovni tkanivových rezov a to pomocou metódy TUNEL a Fluoro-Jade C so špecifickým zameraním na kortikálnu M1 oblasť a CA1 oblasť hipokampu.

Materiál a metódy

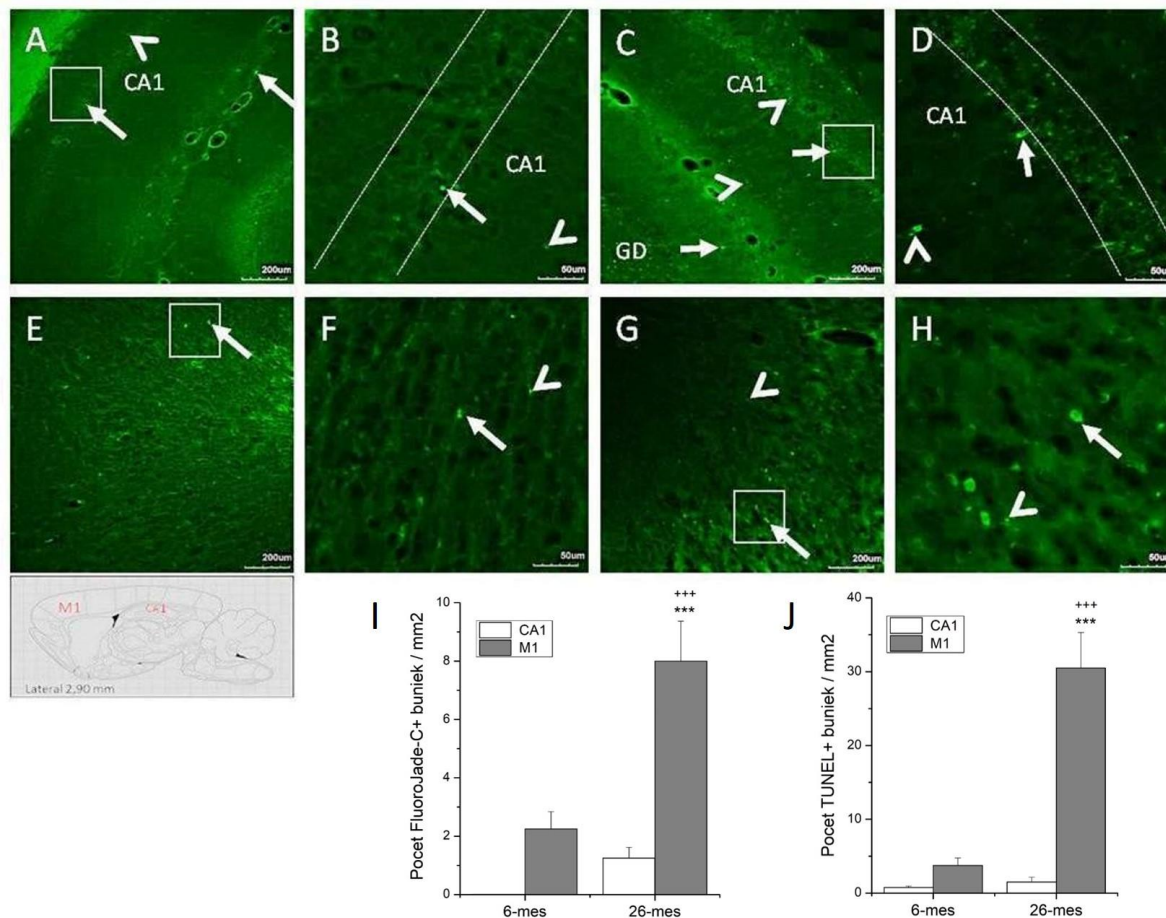
Dospelé samce kmeňa Wistar boli rozdelené do 3 skupín, 6 mes (dospelé), 15 mes (staré) a 26 mes (senescentné). V skratke, prvá skupina, vyoperované kortexy bez hipokampu ($n=3$ /skupinu) boli zhomogenizované a následne boli vyizolované nesynaptické mitochondrie diferenciálnou centrifugáciou podľa štandardného postupu. Druhá skupina ($n=4$ /skupinu) mozgov bola najskôr zafixovaná štandardným postupom a podrobená TUNEL analýze (in situ značená fragmentácia jadrovej DNA na tkanivových rezoch) a Fluoro-Jade C analýze, charakterizujúcej mieru neuronálnej degenerácie v M1 kortikálnej oblasti a CA1 oblasti hipokampu. Druhý nami zvolený prístup bol kombináciou metód SDS-polyakrylamidovej gélovej elektroforézy, Western blottingu a špecifických protilátok charakterizujúcich pro- a anti-apoptotické proteíny. Boli aplikované protilátky voči Bcl2 (sc-7382), Bcl-XL (sc-634), Bax (sc-493) a p53 (sc-393031), všetky od firmy Santa Cruz Biotechnology. Pre vyhodnotenie denzity detegovaných proteínov bol použitý štatistický program GrafPhad InStat V3.01 a Student-Neuman-Keulsov test, pričom hladina $p<0,05$ bola považovaná za štatisticky významnú. Snímky tkanivových rezov boli zosnímané pomocou OLYMPUS fluoview FV10i konfokálneho mikroskopu a ďalej analyzované a kvantifikované pomocou Image-Pro Plus 6.0 softvéru.

Výsledky a diskusia

Jednou z charakteristických črt procesov starnutia je mitochondriálna dysfunkcia. Hlavná úloha mitochondrií pri regulácii energetického metabolizmu a apoptózy naznačuje možnú súvislosť medzi týmito dvomi kľúčovými bunkovými procesmi. V prvej časti sme sa zamerali na fluorescenčnú mikroskopiu, kedy sme detegovali dvomi prístupmi mieru neurodegenerácie v CA1 oblasti hipokampu a M1 oblasti kortexu. Na demonštráciu degenerácie neurónov boli tkanivové rezy 6 a 26 mes potkanov analyzované najskôr pomocou metódy Fluoro-Jade C. Nezistili sme žiadne pozitívne degenerujúce neuróny v CA1 oblasti hipokampu a iba málo buniek v M1 oblasti kortexu u 6 mes, preto prezentujeme iba skupinu senescentných 26 mes (Obr. 1I). V skupine 26 mes potkanov (Obr. 1A-B) boli Fluoro-Jade C+ bunky lokalizované väčšinou v *stratum oriens* CA1 oblasti hipokampu, pričom farbenie bolo výraznejšie v extra hipokampálnych oblastiach (vrstvy III-V kortikálnej oblasti M1; Obr. 1E-F). Navyše v spomínanej M1 oblasti sme zaznamenali 22,3-krát vyššiu hustotu Fluoro-Jade C+ buniek u 26 mes ($p<0,001$) v porovnaní so 6 mes jedincami. Pri porovnaní skúmaných oblastí sme u 26 mes zvierat detegovali signifikantne zvýšenú hustotu pozitívnych buniek v kortikálnej M1 oblasti ($8,0 \pm 1,4$; $p<0,001$) v porovnaní s CA1 oblasťou hipokampu ($1,2 \pm 0,3$; Obr. 1I). Toto poukazuje na výrazný neurodegeneratívny účinok starnutia v neuronálnych bunkách mozgovej kôry, najmä v M1 oblasti kortexu.

Ako druhú metódu sme použili TUNEL assay, pri ktorej bola zistená iba slabá pozitivita v oblasti CA1 hipokampu, ako aj v M1 oblasti prednej mozgovej kôry u 6 mes skupiny. Na druhej strane, prítomnosť TUNEL+ buniek u 26 mes jedincov v oboch spomínaných oblastiach bola signifikantne zvýšená (Obr. 1J) a morfológické znaky TUNEL+ buniek naznačujú prítomnosť glií. Počet TUNEL+ buniek v oblasti M1 kortexu u 26 mes bol 87,5-krát ($30,5 \pm 4,8$; $p<0,001$) vyšší než u 6 mes jedincov ($3,8 \pm 1,0$;

Obr. 1C-D). Navyše sme zaznamenali signifikate zvýšený počet TUNEL+ buniek v kortikálnej oblasti než v CA1 oblasti hipokampu ($p < 0,001$; Obr. 1G-H, J), čo poukazuje na negatívny vplyv starnutia v neuronálnych bunkách mozgovej kôry.

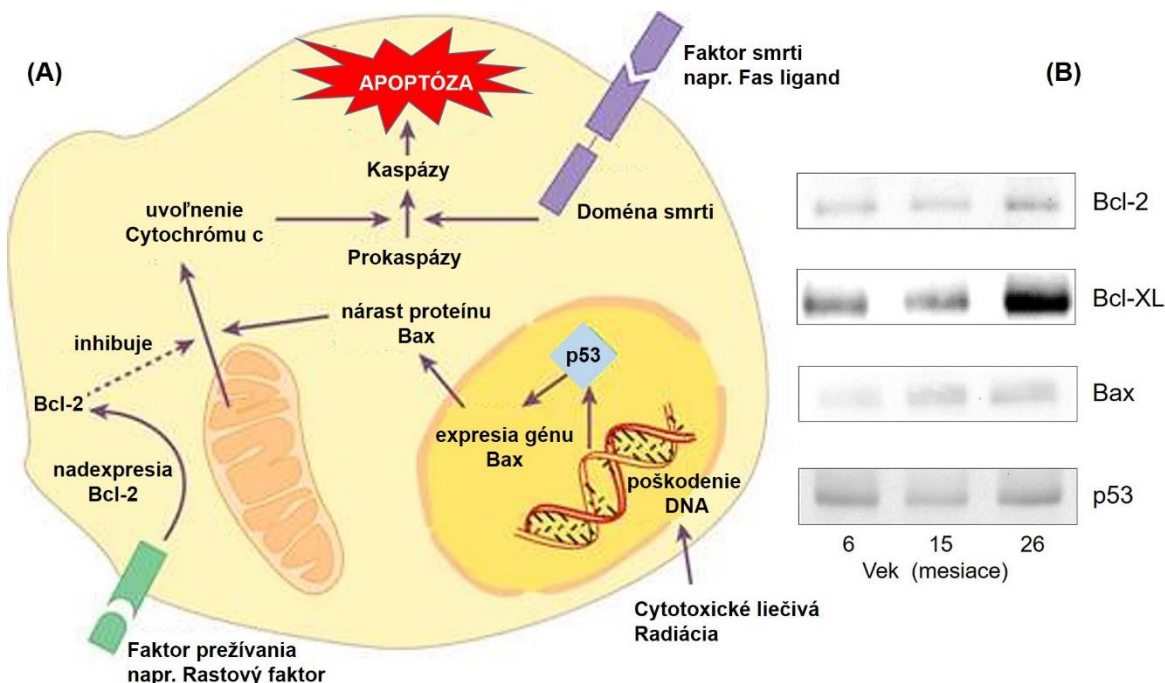


Obr. 1 Fluorescenčné mikrografy Fluoro-Jade C a TUNEL-značených buniek v oblasti CA1 hipokampu a M1 mozgovej kôry u 26 mes zvierat. Mikrografy Fluoro-Jade C+ buniek v CA1 oblasti hipokampu (A) s detailom (B), a v kortikálnej M1 oblasti (E) s detailom (F). Mikrografy TUNEL+ buniek (C) s detailom (D) v CA1 oblasti hipokampu a v kortikálnej M1 oblasti (G) s detailom (H). Šípky indikujú počet fluorescenčne značených neuronálnych buniek, zatiaľ čo hlavičky šípky ukazujú gliálne elementy. Ohraničená čiara ohraničuje CA1 oblasť hipokampu, GD - *gyrus dentatus*. Mierka 200 a 50 µm. Kvantifikácia Fluoro-Jade C+ (I) a TUNEL+ neuronálnych buniek (J) u 6 a 26 mes zvierat. Výsledky sú vyjadrené ako Priemer ± SEM pre $n = 4$ / skupinu, *** $p < 0,001$ štatisticky odlišné v porovnaní s kontrolou, 6 mes a *** $p < 0,001$ medzi CA1 a M1 oblasťami.

Na základe mnohých prác možno predpokladať, že proces starnutia je do istej miery spojený s aktiváciou apoptózy. Preto sme monitorovali tri proteíny Bcl rodiny (Bcl-2, Bcl-XL a Bax) a proteín p53 (Obr. 2B). Hladina Bcl-2 proteínu nebola výrazne zmenená v procese starnutia, avšak Bcl-XL proteín vykazoval odlišnú odpoveď so zvyšujúcim sa vekom. Relatívne množstvo Bcl-XL pokleslo o 15,1% u starých, 15 mes zvierat so signifikantným nárastom hladiny o 51,4% v skupine 26 mes oproti kontrolnej skupine dospelých. Pro-apoptotický proteín Bax vykazoval nadprodukciiu o 30,1% u 15 mes a o 41,7% u senescentných jedincov. Typický indikátor apoptózy je podiel Bax/Bcl-2, ktorý vykazoval najvyššiu pro-apoptotickú hodnotu u 15 mes skupiny. Mitochondriálna hladina p53 bola signifikantne znížená o 27,7% u 15 mes oproti 6 mes, zatiaľ čo bez zmien sme zaznamenali porovnanie 26 mes skupiny so 6 mes (Obr. 2B).

Súhrnne sme zistili, že zatiaľ čo hladina proteínu Bcl-2 vykazovala len trend v smere nárastu v procese starnutia, ďalší anti-apoptotický proteín Bcl-XL bol jednoznačne

nadprodukovaný u 26 mes zvierat ako aj naopak pro-apoptotický Bax. Avšak vzájomný podiel Bax/Bcl-2 poukázal na vzostup naopak u 15 mes. Zdá sa, že v procese fyziologického starnutia, kedy sa vyskytuje mierny chronický stres, do istej miery sa zvyšuje apoptóza, aby sa odstránili poškodené/dysfunkčné bunky, ale možno aj esenciálne post-mitotické bunky, ako sú neuróny v skupine 15-mesačných.



Obr. 2 Stručné schématické znázornenie apoptózy regulovanej kaspázami (A); imunodetekcia proteínu p53, základných anti-apoptotických (Bcl 2, Bcl-XL) a pro-apoptotickej (Bax) kaspázy Bcl rodiny detegované v mitochondriách starnúceho kortexu (B).

Naproti tomu u senescentných buniek sa ukazuje pravdepodobnosť výskytu apoptózy oveľa nižšia, čo potvrdzujú aj experimenty na senescentných bunkách, ktoré boli popísané ako takmer rezistentné voči apoptóze [9], toto súčasne vedie k prežívaniu poškodených buniek, ako aj postmitotických buniek so zníženou housekeeping funkciou a v konečnom dôsledku zlepšuje proces starnutia. Súhrnne teda odozva 26 mes jedincov na stres vyvolaný fyziologickým starnutím môže odrážať vyššiu adaptáciu v porovnaní so skupinou starých, 15 mes. Avšak akútne poškodenie, akým je cerebrálna ischemia, indukovala translokáciu Bax a p53 do mitochondrií hipokampu, ale bez účinku na Bcl-XL v kortexe i hipokampe [10]. Hromadenie p53 v neuronálnom cytosole ako dôsledok normálneho vnútrobunkového transportu alebo stabilnej monoubikvitinácie je hlavným zdrojom mitochondriálneho p53, ktorý indukuje oligomerizáciu Bax počas stresových podmienok a antagonizuje anti-apoptotický účinok Bcl-2 a Bcl-XL [11]. Senescentné mitochondrie obohatené o proteín Bcl-2 interagujú s Bax, čím môžu zabrániť permeabilizácii vonkajšej membrány mitochondrií priamo alebo nepriamo cez reguláciu toku iónov, vrátane Ca^{2+} , cez membránu mitochondrií aj endoplazmatického retikula. STAT3 (signálny transducer a aktivátor transkripcie 3) po naviazaní na komplex I [12], indukuje produkciu ROS a zároveň pôsobí synergicky s tumor supresorovým proteínom p53, čím stimuluje jeho akumuláciu v mitochondriách [13] a na strane druhej naviazanie na STAT3 potláča expresiu Bcl-2 a Bcl-XL proteínov [14], čo sme pozorovali u skupiny dospelých v porovnaní so starnúcimi skupinami. V našich experimentoch nadprodukovaný Bcl-XL väzbou na uvoľnený p53 je schopný do istej miery udržať ho neaktívnym. Zostatok

akumulovaného p53 môže aktivovať Bax a tak eliminovať poškodené, či nefunkčné bunky prostredníctvom apoptózy alebo môže zabrániť proliferácii, a tým aj schopnosti buniek formovať nádory v starnutí.

Záver

Na molekulárnej úrovni sa zdá, že vekovo-závislá rezistencia na apoptózu je zapojená do multifaktoriálnej siete a spôsobuje funkčný deficit komplexov dýchacieho reťazca, najmä podjednotiek komplexu I a ich priame, či nepriame spojenie s prežitím/smrťou buniek. Naše výsledky naznačujú nižšiu apoptotickú aktivitu u senescentných, 26 mes nesynaptických mitochondrií v porovnaní so skupinou 15 mes. Vekovo-závislé zmeny pozorované na nami vybranej vzorke proteínov zapojených do mitochondriálnej dráhy apoptózy je zložitý a nie je ľahké tieto výsledky jednoznačne interpretovať. Preto sú potrebné ďalšie štúdie na objasnenie apoptózy v procese starnutia nesynaptických ale i synaptických mitochondrií, čo by napomohlo pri objasnení nielen samotého procesu starnutia ale i v patogenéze neurodegeneratívnych ochorení.

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0004/2019 a VEGA 1/0554/19.

Literatúra

- [1] Campisi, *Annu Rev Physiol.* **2013**, 75:685-705.
- [2] Lopez-Otin, *Cell.* **2013**, 153:1194-1217.
- [3] Lam, *Free Radic Res.* **2009**, 43:431-439.
- [4] Berridge, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2003**, 4:517-529.
- [5] Cadenas, *Mol Aspects Med.* **2004**, 25:17-26.
- [6] Wegrzyn, *Science.* **2009**, 323:793-797.
- [7] Shulga, *J Cell Sci.* **2012**, 125:2995-3003.
- [8] Navarro, *Adv Drug Deliv Rev.* **2008**, 60:1534-1544.
- [9] Salminen, *Cell Mol Life Sci.* **2011**, 68:1021-1031.
- [10] Chomova, *Neurochem Res.* **2012**, 37:965-976.
- [11] Amaral, *Discov Med* **2012**, 9:145-152.
- [12] Tammineni, *J Biol Chem.* **2013**, 288:4723-4732.
- [13] Zho., *PLoS ONE.* **2011**, 6:1-12.
- [14] Wang, *Lung Cancer.* **2011**, 72:287-293.

Apoptóza v neurogénnych oblastiach mozgu potkana po expozícii ionizujúcim žiarením

Báľentová, S.¹, Kalenská, D.², Muriň, P.³, Hajtmanová, E.³, Lehotský, J.^{4, 5}, Adamkov, M.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³ Univerzitná nemocnica Martin, Onkologické centrum, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ⁵ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed, Oddelenie neurovied v biochémii, Martin
sona.balentova@uniba.sk

Abstract

In this experimental study, we used fractionated whole-brain irradiation (fWBI) of adult male rats with a total dose of 35 Gy, delivered in 5 fractions (dose 7 Gy per fraction) once per week in the same weekday during 5 consecutive weeks. After 18-21 weeks of survival, we evaluated histopathological changes in neurogenic areas of the rat brain. Using immunohistochemistry, confocal microscopy and image analysis, we identified apoptotic changes in the hippocampal dentate gyrus (DG) and individual areas along the rostral migratory stream (RMS), i.e. anterior subventricular zone (SVZa), vertical arm, elbow and horizontal arm. fWBI resulted in a significant increase of apoptotic caspase 3 and Annexin V immunoreactive cells in DG. A less expressive increase was found in SVZa and other areas along the RMS. The results showed that fWBI at a clinically relevant dose resulted in radiation-induced apoptosis in neurogenic areas of the brain. Apoptosis persisted 21 weeks after fWBI and represented a manifestation of subacute changes.

Keywords: ionizing radiation, neurogenesis, caspase 3, Annexin V

Úvod

Rádioterapia hrá významnú úlohu pri liečbe pacientov s primárnymi mozgovými nádormi a metastázami. Tento spôsob liečby však má mnohé vedľajšie, nepriaznivé účinky, ktoré môžu iniciovať morfologické a funkčné zmeny v nervovom tkanive [1]. Morfologicky dochádza po ožiarení prednostne k poškodeniu cievneho endotelu, prekursorov oligodendrocytov a nervových kmeňových (NSCs) a progenitorových buniek [2, 3]. Mozog dospelých cicavcov obsahuje zdroj regeneratívnych NSCs, ktoré sídlia v špecifických neurogénnych oblastiach a produkujú nové neuróny. V mozgu dospelých cicavcov existujú dve neurogénne oblasti: subgranulárna zóna (SGZ) v gyrus dentatus (GD) hipokampálnej formácie a subvetrikulárna zóna (SVZ) lemujúca laterálne mozgové komory (LK) [4, 5]. Po ožiarení mozgu dospelých potkanov jednorazovou (0,5 - 30 Gy) alebo frakcionovanou (denne 1,5 Gy po dobu 7 dní) dávkou došlo v SVZ k najvyššiemu nárastu apoptózy už po 6 hodinách [6, 7]. Hoci po niekoľkých hodinách až dňoch došlo k repropoliferačii prežívajúcej populácie NSCs, straty buniek v dôsledku apoptózy boli nahradené len čiastočne. Počty NSCs a progenitorových buniek preto zostali znížené niekoľko mesiacov po ožiarení [8-11]. V našej štúdii sme sa zamerali na hodnotenie rozsahu postradiačných zmien v neurogénnych oblastiach mozgu potkana s využitím dvoch odlišných markerov apoptózy.

Materiál a metódy

Samce potkanov kmeňa Wistar vo veku 3-4 mesiace sme rozdelili na dve skupiny: kontrolnú (n=5) a druhú skupinu (n=9), ktorú sme ožiarili celkovou dávkou 35 Gy ionizujúceho žiarenia. Dávku sme rozdelili na 7 frakcií, pričom veľkosť jednej frakcie bola 5 Gy. Zdrojom ionizujúceho žiarenia bol rádioizotop ^{60}Co (prístroj TERAGAM ÚJP Praha, ČR) a ožarovateľný objem predstavoval hlavu a krk. Po uplynutí stanovenej doby prežívania po ožiarení (18 až 21 týždňov) sme vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu potkanov pomocou 4% paraformaldehydu a po dekapitácii sme z mozgových hemisfér narezali sériové sagitálne 30 μm zmrazené rezy. Apoptotické zmeny sme identifikovali imunofluorescenčným farbením pomocou markerov kaspázy 3 a Anexínu V. Počet kaspázy 3 a Anexín V imunoreaktívnych buniek (kaspáza 3-IR, anexín V-IR) sme vyhodnocovali v jednotlivých anatomických oblastiach pozdĺž rostrálnej migračnej dráhy (RMS): prednej stene SVZ (SVZa), vertikálnom ramene, ohybe, horizontálnom ramene a v GD hipokampálnej formácie. Kvantitatívnu obrazovú analýzu preparátov sme vykonali pomocou programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

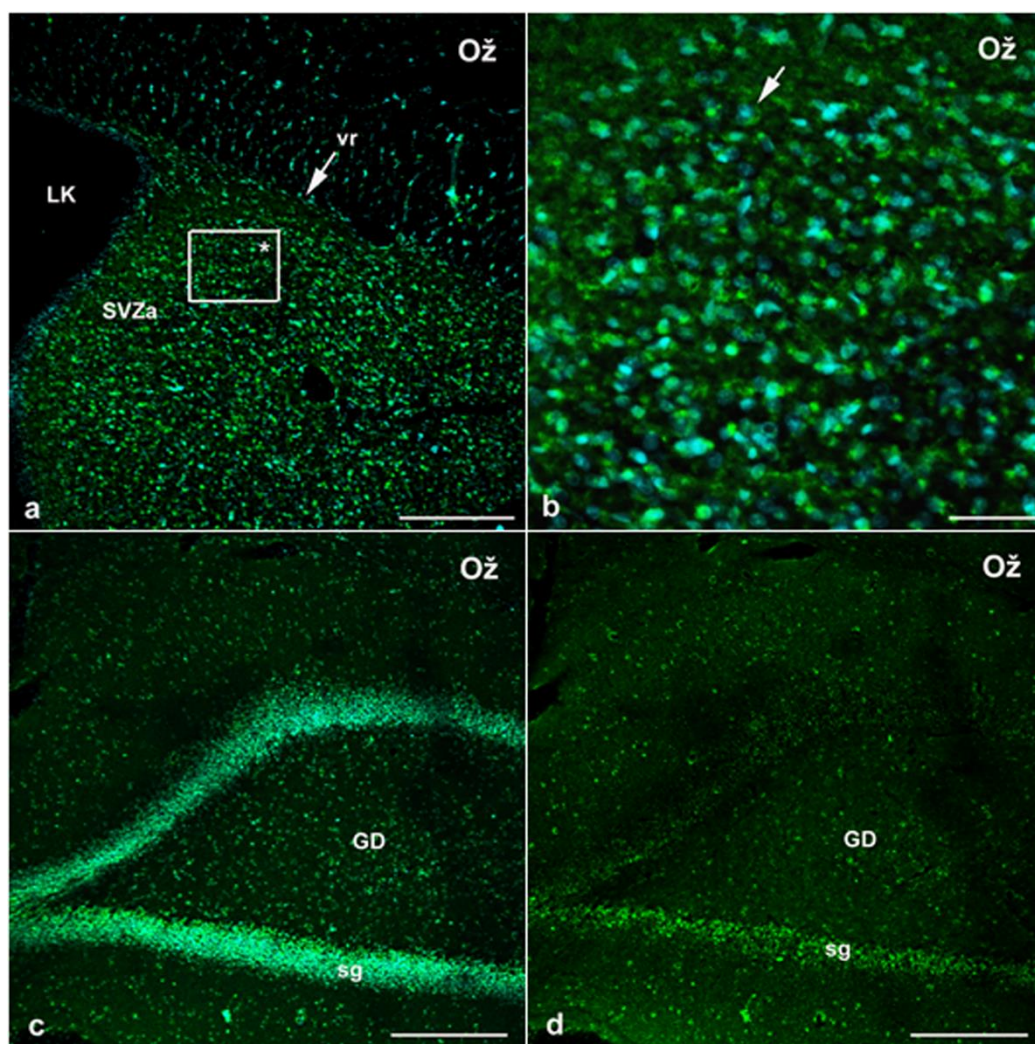
Výsledky

Počet kaspázy 3-IR buniek bol v mozgu kontrolných potkanov (K) len veľmi malý (SVZa: $6,25 \pm 3,17/\text{cm}^2$; vr: $5,5 \pm 1,5$; hr: $11 \pm 1,3$; GD: $11,75 \pm 3,50$). Šestnásť týždňov po ožiarení došlo k výraznému, avšak nesignifikančnému zvýšeniu kaspázy 3-IR buniek v jednotlivých oblastiach RMS (SVZa: $605,75 \pm 192,48$; vr: $521,25 \pm 148,2$; hr: $391 \pm 109,73$) a signifikantnému nárastu v GD ($5764,7 \pm 765,29$ vz. K; $P < 0,001$). V mozgu ožiarených potkanov sme identifikovali kaspázy 3-IR bunky aj v oblastiach susediacich s RMS, teda v *corpus striatum*. V oblasti GD sme početné kaspázy 3-IR bunky sledovali okrem *stratum granulosum* aj v susedných vrstvách a to *stratum moleculare* a *stratum multiforme* (Obr. 1).

Podobne ako v prípade kaspázy 3 aj anexín V-IR bunky boli v mozgu kontrolných potkanov prítomné len v malom počte (SVZa: $5 \pm 1,18/\text{cm}^2$; vr: $12,83 \pm 3,43$; hr: $13,17 \pm 4,43$; GD: $9,62 \pm 1,92$). Po ožiarení došlo k signifikantnému zvýšeniu v zastúpení anexín V-IR buniek v SVZa ($551,38 \pm 138,03$ vz. K; $P < 0,05$) a v GD ($3158,2 \pm 320,52$ vz. K; $P < 0,001$). V ďalších oblastiach RMS nebol zistený výrazný nárast (vr: $208,6 \pm 64,44$; hr: $295 \pm 82,61$).

Diskusia

Výsledky práce ukazujú, že bez ohľadu na použitý marker apoptózy došlo v neurogénnych oblastiach k porovnateľným stratám buniek po ožiarení. Výraznejšie zmeny nastali v GD hipokampálnej formácie a iniciálnej oblasti RMS, t.j. SVZa. Výsledky imunofluorescenčného vyfarbenia v našom experimente naznačujú výraznejšiu expresiu markera kaspázy 3 v porovnaní s anexínom V. Enzým kaspáza 3 je primárny vykonávateľ apoptózy, ktorý po aktivácii katalyzuje štiepenie stoviek proteínových substrátov, najmä v súvislosti s kondenzáciou chromatinu, fragmentáciou DNA a kolapsom jadra [12]. Inhibícia kaspázy 3 je spojená s nekrotickými charakteristikami, čo poukazuje na zásadný význam aktivity tohto proteínu pri výskyte apoptózy po ožiarení [13]. Po ožiarení mozgu hlodavcov jednorazovou subletálnou (1 Gy) alebo vyššou (30 Gy) dávkou došlo ku zvýšeniu expresie kaspázy 3 v neurogénnych oblastiach niekoľko dní až mesiacov po expozícii



Obr. 1 Mikrofotografie sagitálnych rezov mozgom dospelých samcov potkanov prežívajúcich 18 až 21 týždňov po frakcionovanej expozícii ionizujúcim žiarením (Ož) (cD = 35Gy). Tkanivové rezy boli spracované pomocou imunofluorescenčnej metódy na dôkaz enzýmu kaspázy 3, ktorý slúžil ako marker apoptózy. V ožiarenej skupine došlo ku zvýšenému zastúpeniu kaspázy 3-IR buniek v (a) prednej stene subventrikulárnej zóny (SVZa) a (c, d) v zrnitej vrstve (*stratum granulosum*; sg) v *gyrus dentatus* (GD) hipokampálnej formácie. (b) Detail SVZa, v ktorom vidno cytoplazmu kaspázy 3-IR buniek (zelená fluorescencia, šípka), pričom jadrá buniek (aj jadrá buniek v GD) boli dofarbené pomocou jadrového farbiva DAPI (modrá fluorescencia). LK – laterálna komora, vr – vertikálne rameno. Mierky: a, c, d=200µm; b=50µm.

[14, 15]. Keďže uvedené štúdie sa zaoberali hodnotením apoptózy po jednorazovej alebo frakcionovanej expozícii, môžeme naše výsledky porovnať iba čiastočne.

Anexíny sú intracelulárne proteíny, ktoré sa po redistribúcii z vnútorného na vonkajší povrch bunkovej membrány špecificky viažu na fosfatidylserín. Exponovanie fosfatidylserínu na povrchu bunky nastáva po aktivácii kaspázy 3 avšak pred fragmentáciou jadrovej DNA. Anexín V je preto senzitívnym markerom včasnej prípadne prostrednej fázy apoptózy [16]. *In vivo* štúdie zaoberajúce sa vplyvom ionizujúceho žiarenia na tkanivá úspešne používajú anexín V ako indikátor rádiotoxicity [17, 18].

Výsledky morfometrickej analýzy ukázali, že frakcionované ožiarenie mozgu a následné prežívanie 18 až 21 týždňov po expozícii viedli k iniciovaniu skorých štádií

apoptózy. Štúdia tiež poukázala, že na detekciu apoptózy iniciovanej ionizujúcim žiarením je optimálne zvoliť rôzne markery.

Záver

Na základe rozsahu apoptózy v neurogénnych oblastiach a doby prežívania po expozícii klinicky relevantnou frakcionovanou dávkou žiarenia môžeme konštatovať, že v mozgovom tkanive došlo ku vzniku subakútnych zmien. Je známe, že zmeny po ožiarení sa vyvíjajú pomaly, avšak ich morfológické a funkčné následky sú veľmi závažné a nezvratné. Tieto zmeny môžu ovplyvniť fyzický a psychický stav pacienta a významne zhoršiť kvalitu jeho života.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0243/18.

Literatúra

- [1] <https://somepomed.org/articulos/contents/mobipreview.htm?37/44/38593?view=print>; Updated March 27. **2020**.
- [2] Murphy, *J Neurooncol.* **2015**, 122:421-429.
- [3] Michaelidesová, *Genes* **2019**, 10/9:640.
- [4] Doetsch, *J Neurosci.* **1997**, 17:5046-5061.
- [5] Kempermann, *J Neurosci.* **2002**, 22:635-638.
- [6] Bellinzona, *Neurosci Lett.* **1996**, 208:163-166.
- [7] Shinohara, *Cancer Res.* **1997**, 57:2694-2702.
- [8] Tada, *Neuroscience* **2000**, 99:33-41.
- [9] Winocur, *Hippocampus* **2006**, 16:296-304.
- [10] Bálentová, *Neurotoxicology* **2017**, 60:70-81.
- [11] Bálentová, *Brain Res.* **2019**, 1708:146-159.
- [12] Palai, *J Adv Vet Anim Res.* **2015**, 2:18-22.
- [13] Garcia-Belinchón, *J Biol Chem.* **2015**, 290:20841-20855.
- [14] Tong, *Oncol Lett.* **2018**, 16/2:2525-2532.
- [15] Metzdorf, *Front Neurosci.* **2019**, 13:699.
- [16] Guo, *J Exp Clin Cancer Res.* **2009**, 28/1:136.
- [17] Wilkins, *Cytometry* **2002**, 48:14-19.
- [18] Tavakoli, *Adv Biomed Res.* **2015**, 4:119.

Metabolicko-morfologické účinky metionínom vyvolanej hyperhomocysteinémie v hipokampe mozgu potkanov

Hnilicová, P.¹, Kovalská, M.², Kalenská, D.³, Kovalská, L.⁴, Lehotský, J.⁵

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Martin; ⁵ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin
petra.hnilicova@uniba.sk

Abstract

Hypehomocysteinemia (hHcy) is considered as an independent, strong risk factor for atherosclerosis-associated diseases like stroke, dementia or Alzheimer diseases. Methionine diet might lead to elevated level of homocysteine in plasma and causing pathological alterations across the brain. Especially hippocampus is being constantly studied for neurodegenerative disorders based on its involvement into the neural maintenance. In this experimental study were explored the hHcy-induced hippocampal metabolic and morphological changes using proton magnetic resonance spectroscopy (¹H MRS) in combination with MR-volumetry and histochemical analysis. For induction of hHcy in adult male Wistar rats was used methionine-enriched diet at a dose of 2 g/kg of animal weight/day in duration of four weeks. In hHcy animal group was found the slightly increase volume of the dorsal hippocampus, as well as metabolic changes showing enhanced reactive astrogliosis. However, the ongoing neurodegeneration was not confirmed nor in metabolic alternation, nor with histomorphological Fluoro-Jade C⁺ detection of the dying neural cells in this brain area.

Keywords: hypehomocysteinemia, methionine, hippocampus

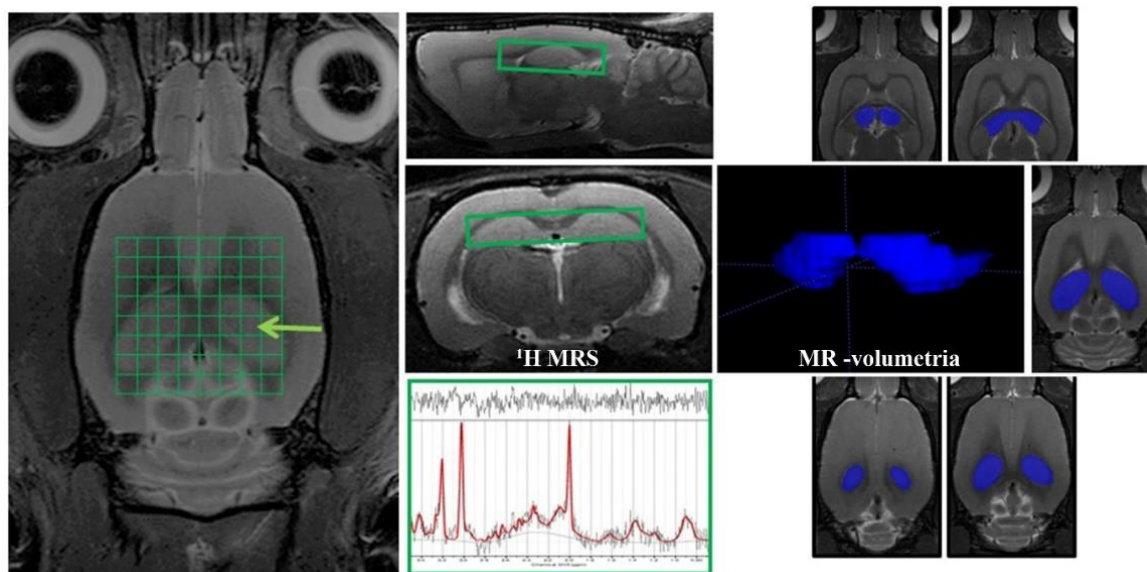
Úvod

Artériosklerotické vaskulárne ochorenia akými sú infarkt myokardu a náhla cievna mozgová príhoda sú najväčšími príčinami úmrtí vo vyspelých krajinách [1]. Medzi ich spoločné rizikové faktory patria hyperlipidémia, hypecholesterolémia, hypertenzia, diabetes mellitus ale aj vek, fajčenie či genetická predispozícia [1, 2]. V roku 1969 McCully bol prvý, ktorý navrhoval homocystein (Hcy) ako možnú príčinu aterosklerózy [3]. Stála hladina Hcy v organizme je dôsledkom rovnováhy jeho syntézy z metionínu, ako hlavného prekursora, ale aj degradačných metabolických procesov podmienených kofaktormi, vitamínom B₆, B₉ a B₁₂ [3, 4]. Za ostatných dvadsať rokov výskumu bolo tiež dokázané, že zvýšená hladina plazmatického Hcy, tzv. hyperhomocysteinémia (hHcy; mierna: 15-30 μmol/l, stredne ťažká: 30-100 μmol/l, ťažká: >100 μmol/l [4]) predstavuje nezávislý rizikový faktor artériosklerotických vaskulárnych ochorení akými sú ischemická choroba srdca, stenóza karotických artérií, cievna mozgová príhoda, venózna tromboembolická choroba, ale aj kognitívnych dysfunkcií počnúc miernym kognitívnym poklesom až po vaskulárnu demenciu či Alzheimerovu chorobu [2, 4]. Predpokladá sa, že všetky tieto asociácie chorôb sú vzájomne prepojené prostredníctvom zvýšeného Hcy a následnej metylácie mnohých látok, vrátane DNA a proteínov, ktoré vyvolávajú u neurónov zvýšenú náchylnosť na poškodenie a apoptózu [4, 5]. Zabezpečenie správneho fungovania metionínového cyklu výživovými moduláciami môže zlepšiť metyláciu a chrániť mozog pred poškodením.

Cieľom tejto štúdie bolo preto analyzovať metabolicko-morfologické zmeny v dorzálnom hipokampe mozgu, predovšetkým v oblasti *gyrus dentatus*, u zvieracieho modelu hHcy poškodenia mozgu v dôsledku metionínovej diéty. Experimentálna štúdia bola založená na *in vivo* vyšetrení relatívnych koncentrácií metabolitov skúmaného tkaniva mozgu pomocou protónovej magnetickej rezonančnej spektroskopie (^1H MRS), ale aj MR-volumetrie spolu s histochemickými (Fluoro-Jade C⁺ detekcia) farbiacimi metódami.

Materiál a metódy

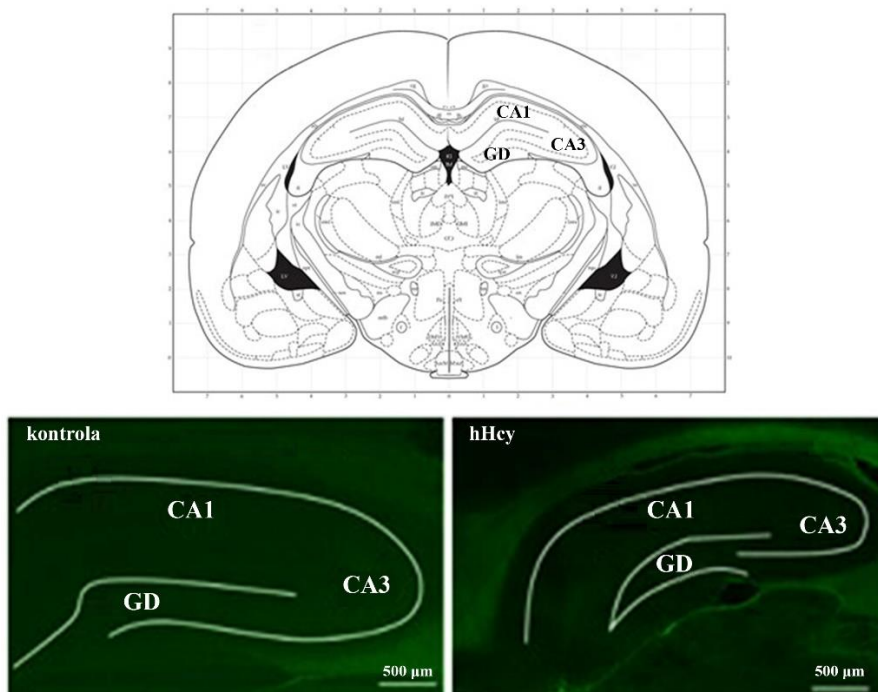
Všetky vykonané experimenty v tejto štúdii boli schválené Etickou komisiou JLF UK ako aj ŠVPS SR pod číslom 727/12-221. Do výskumu bolo zaradených sedem 5-mesačných samcov potkanov rodu Wistar (Velaz, Praha, ČR) chovaných v štandardných podmienkach zverinca JLF UK. Zvieratám bol po dobu 28 dní podávaný metionín (L-methionine, Sigma Aldrich, Germany) v podobe tekutín a to v koncentrácii 2g/kg váhy zvieraťa, čím bola navodená hHcy [6], ktorá bola následne potvrdená stanovením hladiny Hcy v plazme komerčne dostupným kitom [7]. Všetky zvieratá podstúpili na začiatku (kontrolná skupina) experimentu a po navodení hHcy (hHcy skupina) MR vyšetrenie prostredníctvom 7 Teslového animálneho MR skeneru Bruker BioSpec 70/20 (Bruker, Ettlingen, Nemecko). Počas *in vivo* MR vyšetrenia boli zvieratá pod regulovanou anestéziou (2-4% sevofluran v medicínskom kyslíku) za súčasného monitorovania vitálnych funkcií. Súčasťou MR-meracieho protokolu boli anatomické T₂-vážené MRI (TR opakovací čas/TE echo čas = 2680/40 ms; 2 priemery; oblasť zobrazenia FOV = 35x35 mm²; rozlíšenie 0,137x0,137x0,5 mm³; 23 resp. 25 rezov s hrúbkou rezu 0,5 mm a 0.3 resp. 0 mm medzerou medzi rezmi). MR-volumetria tkaniva dorzálného hipokampu bola vypočítaná v ITK-SNAP softvéri (3.4.0 verzia, USA) po vykreslení požadovanej oblasti mozgu na piatich po sebe idúcich koronálnych MRI-rezoch (Obr. 1). Spektroskopické dáta z dorzálného hipokampu (Obr. 1) boli získané pomocou multivoxelovej spektroskopie s reálnou veľkosťou voxela 2,75x2,75x2 mm³ (TR/TE = 1500/20 ms; 36 priemerov; FOV = 22x22 mm²). Zmerané ^1H MRS dáta boli kvantifikované pomocou LCModelu (verzia 6.3-1K, S. Provencher, Kanada), so zameraním na metabolické pomery (Obr. 1): tNAA (N-acetyl-aspartát/aspartyl-glutamát) a mIns (myoinozitol) ku tCr (predovšetkým kreatín a fosfokreatín), v oblasti dorzálného hipokampu. V poslednej časti štúdie bola u zvierat navodená hlboká anestézia s následnou transkardiálnou perfúziou podľa predchádzajúcich postupov [8]. Po dekapitovaní boli mozgy vyňaté z lebky, fixované pri 4°C v 30% sacharóze, uložené v médiu a zamrazené podľa už skorej publikovaných postupov [9]. Po príprave série sagitálnych 30 µm rezov [9] boli vzorky pripravované pre histochemické Fluoro-Jade C⁺ farbenie. Jednotlivé sekcie tkaniva boli po umiestnení na termo-sklíčka (Superfrost Plus glass, Thermo Scientific, USA) zohrievané na 50°C aspoň 30 minút pred samotným farbením. Rezy boli namáčané v alkohole (3 min v 100%, 1 min v 70%) a destilovanej vode (1 min), následne prenesené do manganistanu draselného (0,06%, 15 min) s prepláchnutím v destilovanej vode (2 min). Po 120min farbenia nasledovalo opakované preplachovanie destilovanou vodou (3x1min). Pripravené rezy boli osušené pri izbovej teplote a pokryté médiom Fluoromount™ (Sigma-Aldrich, Germany) podľa štandardných protokolov [9].



Obr. 1 ^1H MRS znázorňuje reprezentatívne spektrum (LCModel) získané z dorzálneho hipokampu (T_2 -vážené MRI) potkana pomocou multivoxelovej spektroskopie (veľkosť voxela $2,75 \times 2,75 \times 2 \text{ mm}^3$). MR-volumetria predstavuje vykreslenie dorzálnej časti hipokampu mozgu potkana (T_2 -vážené MRI) a kvantifikovanie objemu požadovaného tkaniva v softvéri ITK-SNAP.

Výsledky

Na základe kvantitatívneho histochemického Fluoro-Jade C^+ farbenia so zameraním na oblasť dorzálneho hipokampu kontrolnej aj hHcy skupiny zvierat (Obr. 2) sme nedetegovali degenerujúce neuróny v dôsledku metionínovej suplementácie.



Obr. 2 Na reprezentatívnych mikrofotografiách dorzálneho hipokampu (oblasť CA1, CA3 a gyrus dentatus - GD) nie sú zachytené žiadne Fluoro-Jade C^+ značené neuróny u hHcy skupiny zvierat v porovnaní s kontrolami.

Zároveň boli štatisticky vyhodnocované (Tab. 1) rozdiely metabolických pomerov tNAA/tCr a mIns/tCr v dorzálnom hipokampe mozgu potkanov medzi kontrolnou a hHcy skupinou (Tab.1) na základe párového dvojstranného t-testu v softvéri SPSS (verzia 15.0; Chicago; USA). Ako štatisticky významná hladina bola stanovená hodnota $p = 0,05$. Z výsledkov štúdie bol zrejmý signifikantný nárast mIns/tCr v dorzálnom hipokampe hHcy skupiny zvierat, hoci neboli zistené signifikantné zmeny tNAA/tCr medzi skupinami. Na základe MR-volumetrie bol pozorovaný signifikantný nárast objemu tkaniva dorzálného hipokampu u hHcy skupiny (Tab. 1) a to s percentuálnym nárastom objemu tkaniva o $12 \pm 9\%$.

Tab. 1 MR-volumetria a ^1H MRS metabolické pomery tNAA/tCr a mIns/tCr v dorzálnom hipokampe mozgu potkanov spolu so štatistickým porovnaním kontrolnej a hHcy skupiny na základe párového dvojstranného testu v softvéri SPSS.

dorzálny hipokampus	<i>kontrola</i> <i>/n=7/</i>	<i>hHcy</i> <i>/n=7/</i>	<i>párový</i> <i>t-test (p)</i>
<i>tNAA/tCr (pomer; priemer \pm SD)</i>	1,14 \pm 0,19	0,95 \pm 0,14	0,109
<i>mIns/tCr (pomer; priemer \pm SD)</i>	0,42 \pm 0,13	0,61 \pm 0,15	0,047
<i>MR-volumetria (mm³; priemer \pm SD)</i>	43,16 \pm 1,57	46.56 \pm 3,87	0,040

Diskusia

Naše predchádzajúce práce poukazujú na koreláciu medzi ischemickým poškodením mozgu a chemicky indukovanou hHcy, pričom v závislosti od sily a dĺžky trvania inzultu sa potenciovala degenerácia nervového tkaniva [7-11]. V tejto štúdii sme sa zamerali na štúdium neurodegeneratívnych účinkov hHcy vyvolanej metionínovou diétou, so zameraním na selektívne vulnerabilné neuróny, ktoré sú citlivejšie na neurodegeneratívne zmeny. Hipokampus je jedna z mála oblastí mozgu, kde nervové kmeňové bunky pokračujú v delení a kde sa aj v dospelosti vytvárajú neuróny [10, 12]. Neuróny hipokampu sú náchylné na široké spektrum rôznych deštruktívnych procesov, ako sú ischemia, trauma, epileptické záchvaty ako aj degeneratívne zmeny prichádzajúce s vekom [9, 10, 12]. Neurodegeneratívne poškodenie je možné detegovať *in vivo* pomocou ^1H MRS ako pokles metabolického piku tNAA. N-acetyl aspartát je jednou z najbežnejších aminokyselín v mozgu, ktorá pôsobí ako dôležitá signálna organická látka, osmolyt, zásadný medziprodukt Krebsovoho cyklu, a prekursor syntézy proteínov, a lipidov vrátane myelínu [7, 13]. Vzhľadom na to, že NAA sa vyskytuje takmer výlučne v neurónoch, axónoch a dendritoch, považuje sa za rozhodujúci biomarker neurálnej hustoty a neuro-axonálnej funkčnosti [13, 14]. Viaceré štúdie dokonca deklarujú, že pokles hladiny tNAA koreluje s patologickou závažnosťou poškodenia CNS [7, 13, 14]. V tejto štúdii sme nepozorovali, že by sa metionínom podnietená hHcy prejavila výrazným poklesom metabolického pomeru tNAA/tCr. Toto zistenie bolo v súlade s histomorfologickou analýzou Fluoro-Jade C⁺ značených degenerujúcich neurónov v dorzálnom hipokampe, ktorých zvýšená miera v hHcy skupine zvierat nebola dokázaná. Vzhľadom na to, že toto histochemické farbenie fluorescenčne označuje telá, dendrity, ale aj axóny poškodených neurónov [8, 11], nepreukázalo sa, že by metionínom vyvolaná hHcy spôsobovala celkovú neuro-axonálnu degeneráciu tkaniva. Zato sme však poukázali, že by mohla byť spojená so zápalovými zmenami tkaniva a následnou progresívnou degradáciou myelinického traktu v hippocampe či dokonca metabolickými poruchami v CNS, čo môže mať klinicky relevantné následky. Jedným z prejavov poškodenia tkaniva mozgu je zápalová reakcia tkaniva spojená s aktiváciou astrocytov, ktorú je možné sledovať *in vivo* pomocou ^1H MRS metabolického piku mIns [7, 15]. Okrem toho, že je mIns

dôležitým osmolytom, podieľa sa na prenose signálov, syntéze membránových fosfolipidov a fosforylácii proteínov [13, 15]. Keďže sa primárne syntetizuje v gliových bunkách, a to predovšetkým v astrocytoch, predstavuje marker proliferácie gliových buniek [7, 15]. V našich experimentoch sme pozorovali signifikantný nárast pomeru mIns/tCr v skupine hHcy zvierat, signalizujúci patologicky aktivované astrocyty v oblasti dorzálneho hipokampu. V súlade s našimi pozorovaniami sa zistilo, že hHcy podporuje neuro-gliovú degradáciu v dôsledku mitochondriálnej dysfunkcie, epigenetickej dysregulácie DNA a proteínov, ale aj edému tkaniva [7, 10, 13]. Rovnako naše výsledky jasne demonštrovali zvýšenie objemu dorzálneho hipokampu u hHcy zvierat, pravdepodobne v dôsledku hHcy narušenia cievneho endotelu, ale aj hematoencefalickej bariéry, alebo aj priamym excitotoxickým účinkom hHcy na astrocyty [16, 17]. Volumetrické zmeny tkaniva spolu s metabolickými markermi naznačujúcimi reaktívnu gliózu spolu so zápalovými a metabolickými alternáciami v tkanive mozgu, podporujú teóriu o cytotoxicite metionínom indikovanej hHcy.

Záver

V tejto experimentálnej štúdii sme pozorovali zvýšenú mieru reaktívnej astrogliózy spolu s postupujúcimi zápalovými zmenami v tkanive dorzálneho hipokampu mozgu potkanov v dôsledku hHcy vyvolanej metionínovou diétou. Je teda zrejmé, že výživovými moduláciami je možné ovplyvniť hladiny plazmatického Hcy a tak nepriamo preventívne pôsobiť na neuropatologické prejavy rôznych ochorení. Z klinického hľadiska je hlbšie poznanie podstaty molekulárno-biologických mechanizmov poškodenia mozgu v asociácii s hHcy nápomocné pri zefektívňovaní terapie pacientov po ischemickom infarkte v možnej spojitosti s neurodegeneratívnymi zmenami v mozgu.

Táto publikácia vznikla vďaka projektom VEGA 1/0171/18 a APVV-15-0107 a vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre výskum v personalizovanej terapii (CEVYPET), ITMS kód projektu 26220120053, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Adams, *Stroke*. **2003**, 34/9:2310-2322.
- [2] Cojocaru, *Recent Trends in Cardiovascular Risks*. **2017**, <http://doi:10.5772/intechopen.69039>.
- [3] McCully, *The American Journal of Clinical Nutrition*. **2007**, 86/5:1563-1568.
- [4] Maron, *Annual Review of Medicine*. **2009**, 60/1:39-54.
- [5] Hiltunen, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, 23:1750-53.
- [6] Xu, *Neurosci Lett*. **2011**, 494:139-144.
- [7] Kovalska, *Int J Mol Sci*. **2019**, 10:20-24.
- [8] Kovalska, *Neurochem Res*. **2018**, 43:1766-1778.
- [9] Kovalska, *Activitas Nervosa Superior Rediviva*. **2019**, 61/1:31-38.
- [10] Lehotsky, *Cell Mol Neurobiol*. **2015**, 35/1:7-15.
- [11] Kovalská, *Klin Biochem Metab*. **2015**, 23/44:181-187.
- [12] Vavrušová, *Psychiatr pro Praxi*. **2004**, 1:20-22.
- [13] Soares, *Clin Radiol*. **2009**, 64:12-21.
- [14] Tisell, *Magn Reson Med*. **2013**, 70/4:905-915.
- [15] Chhetri, *Front Pharmacol*. **2019**, 10:1172.
- [16] Weekman, *ASN Neuro*. **2017**. <https://doi.org/10.1177/1759091417742296>.
- [17] Wu, *Redox Biol*. **2019**, 20:46-59.

Efekt metionínovej diéty na histopatologické zmeny v hipokampe potkanov

Oravcová, B.¹, Hnilicová, P.², Kalenská, D.³, Kovalská, L.⁴, Dzuracký, J.¹,
Lehotský, J.⁵, Kovalská, M.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Martin; ⁵ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin
kovalska@ifmed.uniba.sk

Abstract

Hyperhomocysteinemia (hHcy) is regarded as an independent and strong risk factor for cerebrovascular diseases, stroke, and dementias. The hippocampus has a crucial role in spatial navigation and memory processes and is being constantly studied for neurodegenerative disorders. Therefore, hHcy could be considered as one of the modifiable risk factors in genesis of hippocampal histopathology. We used a moderate methionine (Met) diet at a dose of 2 g/kg of animal weight/day in duration of 4 weeks to induce mild hHcy in adult male Wistar rats. Such obtained tissues then underwent MRI (magnetic resonance imaging) and immunofluorescence analyses to explore hippocampal changes in histo-morphology and volume. We found remarkable histo-morphological alterations, as well as an increase of hippocampal volume, changes in number and morphology of astrocytes, neurons, and their processes in the selective vulnerable brain area of animals treated with Met-enriched diet. Results suggest that the mild hHcy induced by Met-enriched diet alters volume and histo-morphological pattern, which might eventually endorse the neurodegenerative processes.

Keywords: hyperhomocysteinemia, hippocampus, neurodegeneration, methionine diet

Úvod

Viacero nutričných faktorov môže zohrávať dôležitú úlohu v rozvoji neurodegeneratívnych ochorení a v rýchlosti ich ďalšej progresie. Aj preto je v súčasnosti rastúci záujem o získanie poznatkov, ako by práve stravovacie návyky, modifikovateľný rizikový faktor, mohli znížiť ich výskyt a podieľať sa na ich prevencii [1, 2].

Metionín (Met) je esenciálna aminokyselina nachádzajúca sa v mnohých pravidelne konzumovaných potravinách v rámci *Západnej diéty* [2-6]. Vplyv diéty na organizmus so stredným a vysokým obsahom Met bol dokumentovaný už v niekoľkých štúdiách [2, 4]. Vysoký príjem Met alebo dysregulácia jeho metabolizmu môže viesť k zvýšeniu plazmatickej hladiny homocysteínu (Hcy). Hcy je aminokyselina obsahujúca tiolovú skupinu. Vzniká konverziou Met v Met-Hcy cykle a jeho zvýšená koncentrácia v plazme, hyperhomocysteinémia (hHcy), je známym rizikovým faktorom kardio- a cerebrovaskulárnych ochorení [7, 8]. hHcy sa spája ako s progresívnou aterosklerózou, akútnou cievnu mozgovou príhodou, kognitívnou deterioráciou, demenciou, tak i s Alzheimerovou chorobou (AD). Napriek mnohým výskumom, presný mechanizmus jeho ovplyvňovania nervového tkaniva nie je stále úplne objasnený [3, 4, 6].

Taktiež, pri metabolickej premene Hcy vzniká S-adenozyl homocysteín (SAH), u ktorého sa ukazuje, že môže mať dôležitú úlohu v kontrole metyláciou-regulovanej signalizácie v Met-Hcy cykle. SAH potencióálne iniciuje hypometyláciu DNA a proteínov, čoho dôsledkom sú alternácie vo viacerých tkanivách, vrátane nervových buniek [9].

Predchádzajúce práce, v ktorých bol Hcy priamo aplikovaný subkutánne s navodením miernej hHcy, poukázali na dezintegráciu nervového tkaniva v oblasti hipokampu aj mozgového kortexu [10-12]. Okrem toho, Tóthová a kol. [12] tiež popísali, že hHcy spôsobuje značné epigenetické zmeny s poškodením acetylácie histónov najmä v zraniteľných častiach kortexu s už hHcy navodenou DNA hypometyláciou.

V tejto práci sme indukovali hHcy diétou so zvýšeným obsahom Met, aby sme poukázali na jej podiel v patomechanizme neurodegenerácie a pokúsili sa ho bližšie objasniť. Demonštrovali sme, že strava bohatá na Met vedie k histo-morfologickým zmenám v hipokampálnej oblasti *cornu ammonis* 1 (CA1), a tiež k celkovej zmene objemu hipokampu.

Materiál a metódy

Samce potkana kmeňa Wistar vo veku 5-6 mesiacov, s hmotnosťou 300-400g, boli chované v štandardných podmienkach v centrálnom zverinci JLF UK. Manipulácia s týmito zvieratami bola schválená Etickou komisiou JLF UK ako aj ŠVPS SR pod číslom 727/12-221. Kontrolná skupina (K, n=8) v dni 0 podstúpila MR-volumetriu hipokampu prostredníctvom 7 Teslového MR skeneru Bruker BioSpec 70/20 (Bruker, Ettlingen, Nemecko), následne im bola po dobu 4 týždňov podávaná strava so zvýšeným obsahom Met v dávke 2g/kg váhy zvieraťa/deň, čím sa navodila mierna hHcy. Po podstúpení diéty, v 28 dní, sa skupina s Met diétou (MDG - z *angl. methionine diet group*, n=8) opäť podrobila MR-volumetrii. Výsledky z MR meraní boli vyhodnotené štatisticky použitím SPSS softwaru, verzia 15.0. a Studentovým t-testom. Druhá skupina bola zaradená na histologickú analýzu - časť ako MDG skupina po 4 týždňoch a časť ako kontrolná skupina (K). Obe skupiny boli po uspaní usmrtené dekapitáciou v súlade s Nariadenením vlády SR č.377/2012 Z.z. Následne im bol odobratý mozog na histologickú analýzu, ktorá bola vykonaná na spracovaných kryorezoch získaného tkaniva. Na zobrazovanie a vyhodnocovanie imunohistofluorescenčných metód sme použili konfokálny mikroskop Olympus FluoView FV10i. Sledovaná oblasť mozgu bola CA1 (*cornu ammonis* 1) hipokampu, kde sme dokazovali a sledovali prítomnosť NeuN (neuronal nucei) a GFAP (glial fibrillary acidic protein) protilátok. Výsledky sme vyhodnotili v programe GrafPhad InStat V3.01 a pre vyjadrenie štatistickej významnosti sme použili Studentov t-test.

Výsledky

1. Volumetrická analýza

Na základe MR-volumetrickej analýzy sme zaznamenali signifikantný ($p=0.031$) nárast hipokampálneho objemu v MDG skupine zvierat ($100.85 \pm 1.82 \text{ mm}^3$) v porovnaní s K skupinou ($96.51 \pm 4.78 \text{ mm}^3$). Základná hodnota objemu tkaniva (referečný objem tkaniva hipokampu) bola definovaná ako rozdiel medzi strednou hodnotou (mediánom) objemu a štandardnou odchýlkou (SD) podľa MR výsledkov kontrolnej skupiny. Tak bolo možné vyjadriť percentuálne zmeny v objeme hipokampu, čím sme vypočítali hodnotu priemerného nárastu hipokampálneho objemu ($10 \pm 2 \%$) v MDG skupine vo vzťahu ku kontrole.

Tab. 1 MR-volumetria oblasti hipokampu potkanov.

1. stĺpec - Hodnota objemu tkanív (stredná hodnota \pm SD) hipokampu pre kontrolnú skupinu (K, n=8), pod tým skupina s Met diétou (MDG, n=8). 2. a 3. stĺpec- vyjadrená základná hodnota objemu tkaniva pre K a percentuálny nárast objemu hipokampu MDG voči K spolu so štatistickou signifikantnosťou rozdielu medzi skupinami a vypočítanými hodnotami.

HIPPOCAMPUS

<div> VOLUME CHANGE MEAN \pm SD </div> <div> TISSUE VOLUME MEAN \pm SD </div>	K	MDG
	(volume threshold)	10 \pm 2 %
K	-	independent sample 2-tailed t-test
96.51 \pm 4.78 MM ³		
MDG	0.031	-
100.85 \pm 1.82 MM ³		

“-“ znamená štatistickú signifikantnosť medzi K/K a MDG/MDG

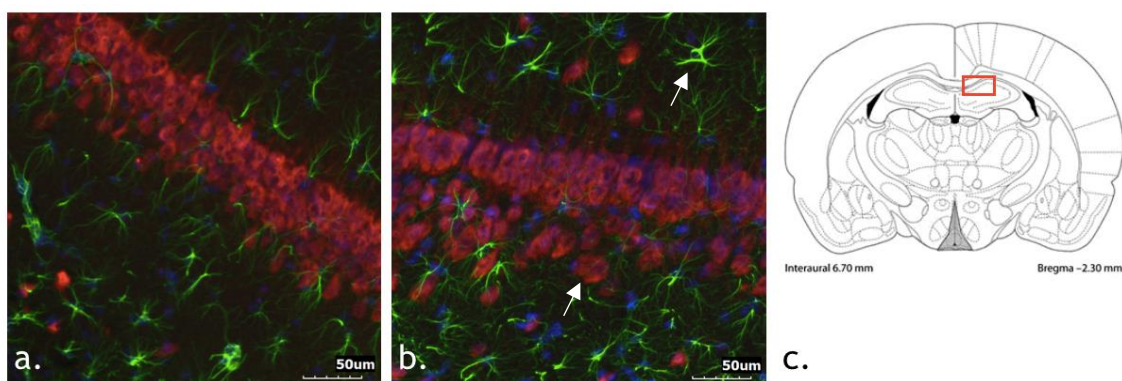
2. Histomorfologické zmeny v CA1 oblasti hipokampu v mozgu potkanov po indukovanej hHcy

Imunohistofluorescenčné zobrazovanie NeuN a GFAP sa využíva na detekciu potencionálnych zmien v množstve a/alebo prítomnosť morfológických zmien zreých neurónov a astrocytov v oblasti hipokampu.

V kontrolnej skupine boli NeuN+ neuróny prítomné ako v kortexe, tak i v hipokampe. Pozitivita bola koncentrovaná najmä v tele neurónov, len zriedka zasahovala do výbežkov. V astrocytoch v CA1 nebola pozorovaná žiadna pozitivita.

Naproti tomu, v MDG skupine boli detekované značné morfológické zmeny neurónov oblasti CA1 (edém tela aj jadier) bez významných štatistických zmien v ich celkovom počte.

Pri imunodetekcií GFAP vykazovali astrocyty v K skupine typické radiálne usporiadané tenké výbežky, pričom astrocyty boli prítomné vo všetkých vrstvách hipokampu. U MDG skupiny bol v hipokampe prítomný výrazný nárast počtu astrocytov (o 23,7 % ($p < 0,001$), najmä v *stratum oriens*, *stratum radiatum* a *stratum lacunosum*. Tiež sme zaznamenali odlišnú morfológiu astrocytov oproti K skupine, zrejme spôsobenú ich aktiváciou.



Obr. 1 Imunofluorescenčné mikrofotografie NeuN a GFAP v CA1 oblasti hipokampu. **(a)** Fluorescenčná mikrofotografia hipokampu potkana u kontrolnej (K) skupiny. Na obrázku zelenou fluorescenciou zobrazený GFAP a červenou NeuN. Mierka na obrázku = 50 μ m. **(b)** Fluorescenčná mikrofotografia hipokampu potkana u skupiny s diétou obohatenou o Met (MDG). Zelenou fluorescenciou zobrazený GFAP a červenou NeuN. Jadrá všetkých buniek sú zvýraznené DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Mierka na obrázku = 50 μ m. Šípky označujú morfológicky zmenené bunky. **(c)** Schematické znázornenie CA1 oblasti mozgu potkana červeným rámcikom ukazujúcim oblasť, ktorá bola bližšie znázornená na **a)** a **b)** (upravené podľa Paxinos a Watson [20]).

Diskusia

Hipokampus je jedna z najzraniteľnejších mozgových štruktúr, ktorá sa spája so selektívnym poškodením neurónov indukovaným rôznymi noxami. Vysoký príjem Met alebo dysregulácie Met metabolismu môže potencionálne viesť k hHcy. hHcy je jedným zo známych rizikových faktorov pre kardio- a cerebrovaskulárne ochorenia [7, 8]. Avšak presný mechanizmus, ako sa hHcy podieľa na neurodegenerácii, nie je úplne jasný. Práve preto sme sa v našej práci zamerali na objasňovanie patomechanizmov asociovaných s hHcy navodenou stravou bohatou na Met.

Naše výsledky jasne poukázali na nárast objemu hipokampu v MDG skupine. Môže to byť dôsledkom porušenia hematoencefalickej bariéry (HEB) zapríčineným zvýšenou plazmatickou koncentráciou Hcy a jeho metabolitov, ako aj priamym cytotoxickým efektom hHcy na astrocyty [13]. Je známe, že hHcy môže poškodiť schopnosť endotelu regulovať cievny tonus redukovaním biodostupnosti NO, čo vedie k endotelovej dysfunkcii [14, 15]. Následne tak ovplyvňuje astrocyty, súčasť HEB, ktoré sa podieľajú na regulácii extracelulárneho objemu a homeostáze neurotransmisie, ktorá je pôsobením hHcy poškodená [16]. Výsledky, ukazujúce zväčšený hipokampálny objem tak naznačujú, že sa zrejme jedná o cytotoxický edém v danej oblasti, čo je podporené aj zobrazeným edémom tiel neurónov za použitia NeuN protilátky a nárastom počtu astrocytov značených GFAP z histomorfologickej analýzy. Udáva sa, že hipokampus je zložený z oblastí s rozlične selektívnou náchylnosťou na neurodegeneratívne procesy [17], z toho najcitlivejšou je CA1 oblasť. Preto sme upriamili imunofluorescenčnú analýzu práve na ňu. Použitím NeuN a GFAP sme mohli pozorovať okrem vyššie uvedeného opuchu tiel neurónov aj hypertrofické telá astrocytov s hrubšími a viac vetvenými výbežkami. Tieto zmeny by mohli byť spôsobené aktiváciou astrocytov pri maladaptívnej alterácii neuronálnych funkcií [18]. Bližšie objasnenie týchto zmien vyplýva zo štúdie, kde aj subletálne koncentrácie Hcy viedli k významným metabolickým zmenám a poškodeniu mitochondriových funkcií astrocytov v *in vitro* podmienkach [19]. Naše výsledky ukázali, že hHcy indukovaná zvýšeným príjmom Met v *in vivo* podmienkach iniciuje reaktívnu astrogliózu v CA1 oblasti hipokampu potkanov.

Záver

Zistenia z MR-volumetrie aj histomorfologickej analýzy ukazujú značnú dysreguláciu a akceleráciu neurodegenerácie hipokampu u potkanov s miernou hHcy navodenou diétou obohatenou o Met. Ukazuje sa, že prevencia rizikových faktorov spojených s Met-Hcy cyklom má dôležité profylaktické uplatnenie u neurodegeneratívnych ochorení, demencií a mozgovej príhody. Evidencia kauzálneho prepojenia medzi diétou obohatenou o Met s následnou hHcy a neurodegeneratívnymi procesmi by tak mohla predstavovať prínos pre klinickú prax s využitím tohto preventabilného rizikového faktora. Zároveň sme kombináciou MRI a imunohistofluorescenčnej analýzy prispeli k objasneniu a ďalším poznatkom o komplexnom patomechanizme skrývajúcim sa za metabolickými neurodegeneratívnymi ochoreniami.

Práca bola podporená projektami VEGA č. 1/0171/18, VEGA č. 1/0230/20, APVV č. 15/0107 a z projektu „Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení“, kód: 26220220114 spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Cardoso, *Clin Interv Aging* **2013**, 8:531-542.
- [2] Berti, *J Nutr Health Aging* **2015**, 19:413-423.
- [3] Xu, *Neurosci Lett.* **2011**, 494:139-144.
- [4] Liu, *Am J Transl Res.* **2016**, 8:117-124.
- [5] Esse, *Int J Mol Sci.* **2019**, 20:867.
- [6] Lehotsky, *Nova Science Pub Inc.*, NY, USA, **2019**, 115-156 s.ISBN 978-1-53615-163-3.
- [7] Hainsworth, *BBA Mol Basis Dis.* **2016**, 1862:1008-1017.
- [8] Bugnicourt, *JASN* **2013**, 24:353-363.
- [9] Shen, *Redox Biol.* **2020**, 28:101322.
- [10] Kovalska, *J Physiol Pharmacol.* **2015**, 66:887-897.
- [11] Kovalska, *Neurochem Res.* **2018**, 43:1766-1778.
- [12] Tóthová, *B Int J Mol Sci.* **2018**, 19:3147.
- [13] Weekman, *ASN Neuro* **2017**. <https://doi.org/10.1177/1759091417742296>.
- [14] Wu, *Redox Biol.* **2019**, 20:46-59.
- [15] Zhang, *Anim Nutr.* **2018**, 4:11-16.
- [16] Abbott, *Nat Rev Neurosci.* **2006**, 7:41-53.
- [17] Wang, *Genomics* **2007**, 90:201-212.
- [18] Dossi, *Brain Res Bull.* **2018**, 136:139-156.
- [19] Jin, *Neurochem Int.* **2008**, 52:1410-1415.
- [20] Paxinos, *Academic Press*, London, GB, **2006**, <http://www.scribd.com/doc/22822097/Rat-Brain-Atlas>.

Význam vzájomnej komunikácie sarko/endoplazmatického retikula s mitochondriami v patofyziológii ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu

Bencúrová, M.¹, Kovalská, M.², Brndiar, G.¹, Lysíková, T.¹, Tomašcová, A.³,
Lehotský, J.¹, Kaplán, P.¹, Tatarková, Z.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed, Martin
zuzana.tatarkova@uniba.sk

Abstract

Mitochondria are highly dynamic organelles, which undergo continuous morphological changes to maintain cellular homeostasis. They fuse in response to specific physiological conditions or divide to facilitate their removal by autophagy, and they maintain dynamic contacts with other membranous compartments of the cell especially with the endoplasmic reticulum (ER) by establishing physical contacts known as mitochondria-associated membranes (MAMs). MAMs are important hubs for lipid trafficking, ER stress, mitochondrial dynamics, Ca^{2+} signaling, apoptosis, or autophagy. The integrity of the proteome in cardiac myocytes is critical for robust heart function and is managed by protein homeostasis, which encompasses processes that maintain the balance of protein synthesis, folding, trafficking, and degradation. Dominant roles in maintaining cardiac contractile function have the cytosol, mitochondria, and sarcoplasmic reticulum (SR). Our work focuses on proteostasis in the SR and mitochondria, and how they might influence each other and, thus, impact heart function in the settings of cardiac physiology and disease. The interaction between organelles is an emerging field that will permit us to identify key proteins leading to modified pathways, and possibly explain their implications in disease state such as IR injury.

Keywords: heart, ischemia-reperfusion injury, mitochondria-associated membranes

Úvod

Mitochondrie sú vysoko dynamické organely podliehajúce neustálym morfológickým zmenám, čím je zabezpečené udržanie bunkovej homeostázy. V reakcii na špecifické fyziologické podmienky mitochondrie fúzujú alebo sa štiepia pre ľahšie odstránenie autofágom, pričom neustále udržiavajú dynamický kontakt s inými membránovými kompartmentmi bunky nazývané súhrnne membrány asociované s mitochondriami (MAMs). Ide najmä o vzájomnú komunikáciu s endoplazmatickým retikulom (ER), kvapôčkami lipidov, Golgiho aparátom, lyzozómami, melanozómami a peroxizómami prostredníctvom kontaktných miest. Nedávna štúdia s využitím fluorescenčného značenia všetkých spomínaných organel *in vivo* odhalila jednotlivé oblasti bunky, v ktorých tri a viac z týchto organel fyzicky interagujú [1]. Jednotlivé procesy boli rozdelené do skupín: prenos lipidov, mitochondriálna dynamika, signalizácia Ca^{2+} , stres ER, iniciácia apoptózy a tvorba autofagozómov.

Mitochondrie a ER aktívne komunikujú a ich kontaktné miesta sú dôležité pre mnohé procesy, avšak medzi najvdôležitejšie patrí transport lipidov. K vnútrobunkovému transportu lipidov môže dochádzať „flip-flop“ translokáciou z jednej strany dvojvrstvy

membrány na druhú, vezikulárnym transportom, difúziou alebo za pomoci lipidyprenášajúcich proteínov. MAMs slúžia ako uzly pre transport nevezikulárneho fosfolipidu a cholesterolu, pričom tento proces je spojený so syntézou ich medziproduktov. Na membráne ER sa fosfatidylcholín (PC) mení na fosfatidylserín (PS) za katalytického účinku fosfatidylserínsyntázy 1 a je transportovaný do mitochondrií, ktoré nie sú schopné syntetizovať PS. V mitochondriách sa dekarboxyláciou PS získa fosfatidyletanolamín (PE), ktorý sa môže premiestniť do ER, kde podlieha premene na PC a ojedinele aj na PS [2]. Ešte veľa otázok zostáva nezodpovedaných, ale objav, že *de novo* syntetizovaný PS a PE sú transportované nevezikulárnym spôsobom medzi ER a mitochondriami, poukazuje na kľúčovú úlohu MAMs v prenose lipidov. Navyše, fosfatidyletanolamín je priamo spojený s procesom autofágie, konkrétne tvorbou autofagozómu a fosfatidylserín s procesom skorej apoptózy. Jedným z významných hráčov v procese riadenej-bunkovej smrti, apoptózy je annexín 5 (AnxA5), ktorý má antiapoptotické [3] a protizápalové vlastnosti [4]. Vzostup plazmatickej hladiny endogénneho AnxA5 bol pozorovaný po infarkte myokardu, kedy PS bol exprimovaný na povrchu kardiomyocytov viac než 6 hodín. Annexín A5 má vysokú, až nanomolárnu afinitu voči PS, preto je v súčasnosti využívaným a ľaho dostupným markerom pre detekciu skorej fázy apoptózy v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach. Zaujímavým bolo zistenie, že exogénne podaný AnxA5 viedol k obnoveniu sarkolemálnej asymetrie bez externalizovaného PS, čo značí možnosť reverzibility procesu apoptózy [5].

Oblasti mitochondrií v tesnej blízkosti ER sa zúčastňujú aj veľmi dôležitej Ca^{2+} signalizácie (Obr. 1A), kedy ER inkorporuje Ca^{2+} z cytoplazmy pomocou SERCA1/2/3 ATPáz [6]. Uvoľnenie Ca^{2+} z ER je zabezpečené ryanodínovými receptormi (RyR1/2/3), a IP3R1/2/3 receptormi, pričom účinkom napäťovo-závislého kanála (VDAC) je vápnik transportovaný do medzimembránového priestoru mitochondrií a za pomoci Ca^{2+} uniporteru (MCU) do matrixu mitochondrií [7]. Udržanie komunikácie medzi IP3R receptormi (ER) a VDAC kanálom (mitochondria) stabilizuje v cytosole proteín GRP75, čím je zabezpečený rýchly vstup Ca^{2+} do mitochondrií. CypD (peptidylprolyl cis-trans isomeráza F) proteín, ktorý sa podieľa na iniciácii apoptózy, mitochondriálnej modulácii ATP syntázy [8], ale aj interaguje a udržiava VDAC1-GRP75- IP3R1 komplex [9]. Vstup Ca^{2+} do mitochondrií zároveň stimuluje translokáciu v kristách akumulovaného H_2O_2 do MAMs, čo vedie k zvýšenému výskytu redoxných nanodomén na rozhraní mitochondria-ER, čím sa zvyšuje eflux Ca^{2+} z ER [10]. V dôsledku aktívneho úniku Ca^{2+} z ER sa ROS hromadia v MAMs, pričom tieto môžu oxidáciou MCU regulovať v mitochondriách aj samotný tok Ca^{2+} do matrixu, čo zvyšuje oligomerizáciu aj aktivitu Ca^{2+} uniportera [11]. Toto spolu s inými stimulmi okolitých molekúl/dráh vedie k Ca^{2+} preťaženiu v mitochondriách. Avšak schopnosť mitochondrií akumulovať vápnik je až 20-násobne vyššia než v cytosole, čo im umožňuje fungovať ako tlmivé systémy a obnoviť homeostázu po „ Ca^{2+} výbuchu“ [12]. V srdcovom svale je kontrakcia spojená so zvýšenou produkciou ATP sprostredkovanou Ca^{2+} -závislými enzýmami TCA cyklu, ATP syntázy a ADP/ATP transportéra [13], pričom účinok je zosilnený lokálnymi koncentraciami Ca^{2+} v MAMs [14].

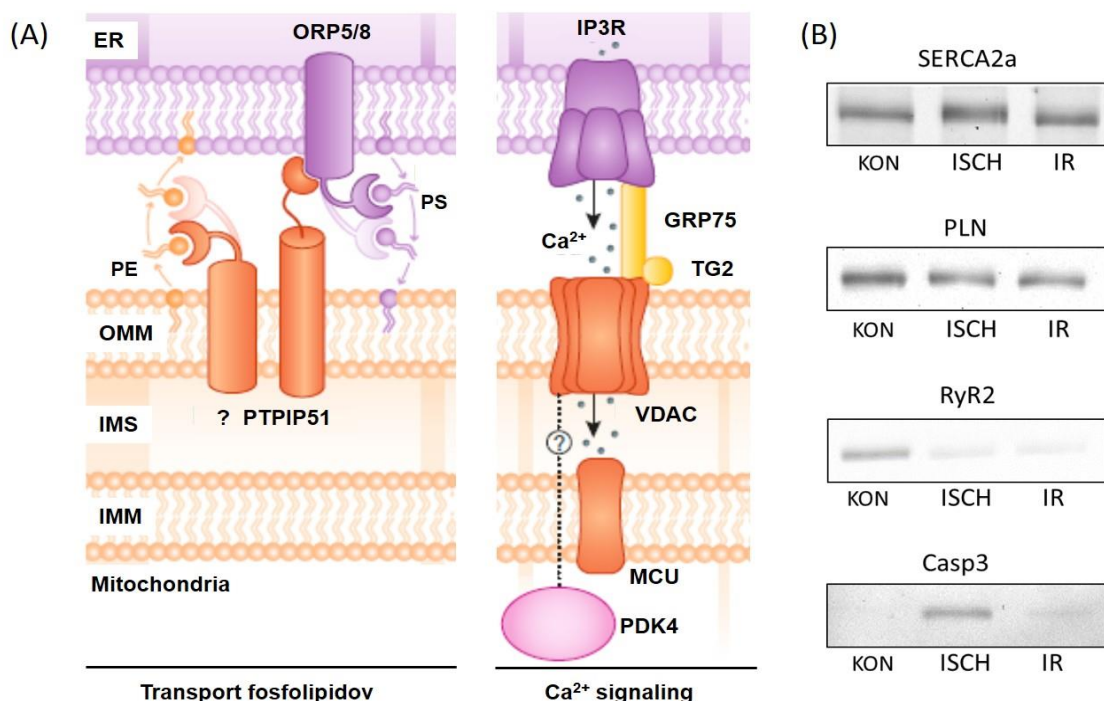
Preto lepšie pochopenie mechanizmov kontaktných miest ER-mitochondria, MAMs, môže napomôcť pri objasnení mnohých bunkových procesov ako je transport lipidov či Ca^{2+} signalizácia a ich vzájomné prepojenie na dráhy prežívania/bunkovej smrti v procese IR poškodenia myokardu.

Materiál a metódy

Dospelé, 6-mes potkany kmeňa Wistar ($n=6+3$ /skupinu) boli podrobené modelu globálnej ischémie a reperfúzie myokardu (Langendorffov model perfúzie), pričom boli rozdelené na kontrolnú (KON) skupinu srdc perfundovanú kontinuálne 65 min Krebs-Henseleitovým roztokom, ISCH skupinu sme vystavili 20-min globálnej ischémii a IR skupinu so znovuoobnovením prietoku 30-min reperfúziou. Srdcia boli ďalej spracované podľa typu analýzy: prvá skupina srdc bola najskôr zafixovaná ($n=3$ /skupinu) na imunohistochemické farbenie fluorescenčne značeného AnxA5 a z druhej skupiny srdc ($n=6$ /skupinu) boli získané postupnou izoláciou mitochondrie a sarkoplazmatické retikulá. Tenkovrstvovou chromatografiou bolo stanovené množstvo fosfatidylserínu v mitochondriách. Kombináciou metód SDS-polyakrylamidovej gélovej elektroforézy, Western blottingu a špecifických protilátok firmy Santa Cruz Biotechnology bolo detegované množstvo SERCA2a (sc-53010), RyR (sc-13942), PLN (sc-21923) a kaspázy 3 (sc-7272). Výsledky sme vyhodnotili pomocou štatistického programu GrafPhad InStat V3.01 a Student-Neuman-Keulsovoho testu, pričom hladina $p<0,05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

Výsledky a diskusia

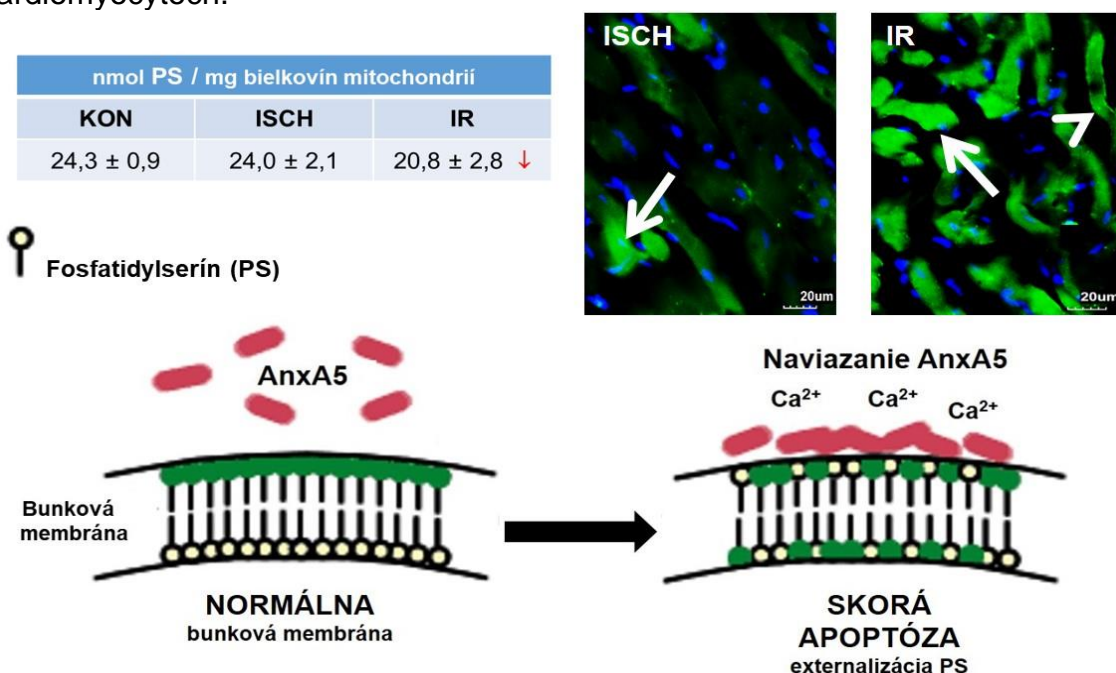
Aktívna komunikácia medzi mitochondriami a ER je sprostredkovaná kontaktnými miestami, MAMs, z ktorých medzi najvýznamnejšie patrí transport Ca^{2+} a fosfolipidov (Obr. 1A). Ca^{2+} signalizácie sa zúčastňujú oblasti mitochondrií v tesnej blízkosti ER. Ca^{2+} je inkorporovaný do ER z cytoplazmy pomocou SERCA ATPáz a naopak jeho uvoľnenie je zabezpečené IP3R a ryanodínovými receptormi (RyR). Ca^{2+} -ATPáza SR srdca (SERCA2a) zabezpečuje spätné vychytávanie Ca^{2+} do SR v kardiomyocytoch.



Obr. 1 Schématické znázornenie MAMs-sprostredkovaného transportu Ca^{2+} a fosfolipidov medzi ER a mitochondriami (A); Imunodetekcia relatívneho množstva Ca^{2+} -regulujúcich bielkovín SERCA2a, PLN a RyR2 v SR a pro-apoptotickej kaspázy 3 (Casp3) (B).

V našich experimentoch sme pozorovali výraznú nadexpresiou SERCA2a počas ischémie, zatiaľ čo IR zásadnejšou mierou neovplyvnila jej množstvo (Obr. 1B).

Primárnym regulátorom aktivity SERCA2a je fosfolambán (PLN), ktorý ju inhibuje v defosforylovanej forme, avšak fosforylovaný z pumpy disociuje. Zaznamenali sme protektívne zníženie exprese defosforylovaného PLN v ISCH aj IR skupine (Obr. 1B), čo v kombinácii s nadexpresiou SERCA2a po ISCH umožňuje zvýšené vychytávanie Ca^{2+} . Vzájomný pomer SERCA2a/PLN je v zlyhávajúcom srdci výrazne znížený a PLN hypofosforylovaný, čo spôsobuje chronické zníženie aktivity SERCA2a, ale aj jej kapacity na spätné vychytávanie Ca^{2+} uvoľneného počas kontrakcie [15]. RyR2 (Ca^{2+} -uvoľňujúci kanál SR) po fosforylácii stimuluje rýchlejšie uvoľňovanie Ca^{2+} zo SR. Navyše, ak oddisociuje od proteínu kalstabin, toto má za následok spontánne uvoľňovanie Ca^{2+} . Tento jav sa objavuje počas diastoly a je spojený s komorovými arytmiami a znížením rezervy Ca^{2+} v SR [16]. Naše výsledky ukázali, že ISCH aj IR indukovala signifikantný pokles množstva RyR2 v porovnaní s predischemickým stavom, preto možno predpokladať vzostup fosforylácie a zvýšené uvoľňovanie Ca^{2+} zo SR sprostredkované RyR2. Toto je v literatúre spájané s kontraktílnou dysfunkciou [17], s arytmogenézou pri vysokej aktivite PKA v prítomnosti fosfodiesterázy D v tomto procese [18]. Okrem vzájomnej interakcie jednotlivých Ca^{2+} -regulujúcich bielkovín, tieto môžu podliehať rôznym zmenám v dôsledku nerovnováhy Ca^{2+} a nárastu ROS po ISCH, ale najmä po znovuoživení prietoku koronárnou tepnou, reperfúzií v kardiomyocytoch.



Obr. 2 Schématické znázornenie skorej fázy apoptózy detegovanej po ISCH a IR v myokarde dospelých potkanov s obsahom fosfatidylserínu v mitochondriách a fluorescenčnými mikrogrami pre AnxA5, kde šípka označuje cytoplazmatickú a hlava šípky plazmatickú pozitívitu (zelená). Jadrá sú značené DAPI (modrá). Dĺžka úsečky zodpovedá 20µm.

Mitochondrie nie sú schopné syntetizovať fosfatidylserín, preto je nevezikulárnym transportom prenášaný z ER do mitochondrií, kde je lokalizovaný na vnútornej strane plazmatickej membrány. V podmienkach indukovaného oxidačného stresu, hypoxie či zápalovej reakcie dochádza k postupnému prestupu PS na vonkajšiu stranu bunkovej membrány, a tým k poklesu jeho obsahu, čo sme pozorovali u dospelých potkanov po znovuoživení prietoku koronárnou tepnou, reperfúzií s využitím dvoch metodických prístupov (Obr. 2). V srdciach vystavených ischémii sme pozorovali cytoplazmatickú pozitívitu AnxA5, pričom v mitochondriách sme nezaznamenali výraznejšie zmeny

množstva PS. Avšak po indukovanej IR došlo k poklesu PS v mitochondriách a detegovali sme výraznú AnxA5 cytoplazmatickú pozitivitu aj plazmatickú (Obr. 2). Toto by mohlo naznačovať aktívnu, skorú fázu apoptózy, ktorú charakterizuje práve externalizácia PS. Popri translokácii PS na vonkajšiu stranu bunkovej membrány bola v mnohých prácach pozorovaná strata membránového potenciálu mitochondrií, uvoľnenie cytochrómu c a ATP, aktivácia kaspáz 8 a 9. S expresiou PS na povrchu apoptotických buniek je spojená aj aktivácia jednej z najdôležitejších exekutívnych kaspáz, kaspázy 3, ktorá reprezentuje strednú fázu apoptózy spolu s kaspázou 6 a 7, štiepením poly-ADP-ribóza polymerázy, aktiváciou nukleáz a zmršťovaním bunky. Výraznú nadexpresiu, a teda aktiváciu kaspázy 3 sme pozorovali v ISCH skupine v bunkových lyzátach dospelých srdc (Obr. 1B). Prečo dochádza k tak výraznej aktivácii kaspázy 3 v kardiomyocytoch po ischémii z našich výsledkov nevieme vysvetliť. Niektoré štúdie popísali prestup aktívnej kaspázy 3 do medzimembránového priestoru mitochondrií a dokonca bola popísaná jej esenciálna úloha pri kompletnej a efektívnej aktivácii kaspázy 9, kedy nevyhnutnou sa javí prítomnosť kaspázy 3 a mitochondrií [19]. Prokaspáza 3 a 9 lokalizované v mitochondriách sú translokované spolu s cytochrómom c a Hsp60 ako aktívne kaspázy do cytosolu a perinukleárnej oblasti v skorej fáze apoptózy. Tieto mitochondriálne aktívne kaspázy môžu fungovať ako mechanizmus pozitívnej spätnej väzby na aktiváciu iných alebo zvyškových prokaspáz, degradáciu mitochondriálnych zložiek a dezintegráciu mitochondriálnych funkcií. Navyše perinukleárne vezikuly v prostredí so zvýšenou koncentráciou Ca^{2+} môžu zabrániť uvoľňovaniu cytochrómu c z mitochondrií, čo podporuje antiapoptotickú úlohu AnxA5 v bunkách ischemického srdcového svalu [20].

Záver

V patofyziológii I/R poškodenia srdca sú MAMs dôležitým faktorom z viacerých dôvodov. Pri kardiovaskulárnych ochoreniach je deregulovaná bunková bioenergetika, udržanie homeostázy Ca^{2+} je nevyhnutné pre správne fungovanie srdca, funkcia a kvalita mitochondrií je rozhodujúca pre prežitie buniek. Preto bližšie pochopenie mechanizmov vzájomnej komunikácie medzi ER/SR a mitochondriami predstavuje potenciálny terapeutický cieľ IR poškodenia srdca.

Táto práca bola podporená grantom UK/46/2020 a projektom VEGA 01/0004/2019.

Literatúra

- [1] Valm, *Nature*. **2017**, 546:162-167.
- [2] Kentala, *Int Rev Cell Mol Biol*. **2016**, 321:299-340.
- [3] Konstantinidis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2012**, 32:1552-1562.
- [4] Frangogiannis, *Circ Res*. **2012**, 110:159-173.
- [5] Kenis, *J Nucl Med*. **2010**, 51:259-267.
- [6] Gordaliza-Alaguero, *EMBO Rep*. **2019**, 20:e47928.
- [7] Giorgi, *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2018**, 19:713-730.
- [8] Fayaz, *CNS Neurol Disord Drug Targets*. **2015**, 14:654-663.
- [9] Paillard, *Circulation*. **2013**, 128:1555-1565.
- [10] Booth, *Mol Cell*. **2016**, 63:240-248.
- [11] Dong, *Mol Cell*. **2017**, 65:1014-1028.
- [12] Giorgi, *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2018**, 19:713-730.
- [13] Viola, *J Mol Cell Cardiol*. **2009**, 46:1016-1026.
- [14] Paillusson, *Acta Neuropathol*. **2017**, 134:129-149.
- [15] Park, *BMB Rep*. **2013**, 46:237-243.
- [16] Bers, *Annu Rev Physiol*. **2014**, 76:107-127.
- [17] Ai, *Circ Res*. **2005**, 97:1314-1322.
- [18] Lehnart, *Cell*. **2005**, 123:25-35.
- [19] Chandra, *J Biol Chem*. **2003**, 278, 19:17408-17420.
- [20] Kenis, *J Nucl Med*. **2010**, 51:259-267.

Hodnotenie apoptózy epitelových buniek pľúc zvierat s modelom syndrómu aspirácie mekónia pri rôznych typoch pľúca šetriacej pľúcnej ventilácie

Mokrá, D.¹, Báľentová, S.², Mikolka, P.¹, Košútová, P.¹, Adamkov, M.², Čalkovská, A.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav fyziológie a Biomed, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
daniela.mokra@uniba.sk

Abstract

Ventilation support in severe meconium aspiration syndrome (MAS) is realized with lung-protective techniques: small-volume conventional mechanical ventilation (CMV), high-frequency oscillatory ventilation (HFOV), or with high-frequency jet ventilation (HFJV). Whereas indications for use of lung-protective techniques in MAS have not been definitively concluded, this study compared effects of three ventilation modes on the apoptotic markers of lung epithelial cells in experimental model of MAS to estimate suitability of the ventilations for this purpose. Model of MAS was induced in rabbits by intratracheal instillation of meconium suspension (25 mg/ml, 4 ml/kg). After induction of respiratory distress, meconium-instilled animals were ventilated either with CMV (supplied by ventilators Aura V, Chirana, Slovakia and SLE-5000, SLE Ltd., UK), HFOV (supplied by SLE-5000, SLE Ltd., UK), or HFJV (supplied by Monsoon, Acutronic, Switzerland), n=7 in each group for additional 4 hours, n=6 of healthy non-ventilated animals served as controls. At the end of experiment, right lung was used for determination of wet/dry lung weight ratio and immunohistochemical analysis of apoptosis of lung epithelial cells by TUNEL methods and detection of caspase-3. Meconium instillation caused significant lung edema formation compared to healthy controls ($p < 0.001$), with no differences among the MAS groups ($p > 0.05$). In all MAS groups, slightly, but non-significantly increased apoptotic index ($p > 0.05$) was found vs Control, except for CMV-SLE vs Control ($p < 0.05$). However, elevation in number of caspase-3 immunoreactive cells in alveoli was significant for all MAS groups vs Control ($p < 0.05-0.001$), in bronchi the increase was significant for HFOV vs Control ($p < 0.05$). In conclusion, all lung-protective ventilations exerted comparable impact on the lung edema formation. Both high-frequency ventilations (HFOV and HFJV) showed a trend to reduce apoptosis of alveolar cells, but increased apoptosis of bronchial cells, particularly HFOV.

Keywords: meconium aspiration, rabbit model, mechanical ventilation

Úvod

Syndróm aspirácie mekónia (MAS) je život ohrozujúcim respiračným ochorením novorodencov. Vdýchnutie prvej stolice (mekónia), ktorá sa v prípade stresu plodu (intrauterinne) alebo novorodenca (počas pôrodu) môže uvoľniť do plodovej vody, má závažné následky. Častice mekónia upchávajú stredné a malé dýchacie cesty. Na úrovni alveol zložky mekónia vyvolávajú neutrofilný zápal, inaktiváciu pľúcneho surfaktantu, pľúcny edém a vazokonstrikciu, čo sa prejaví poklesom poddajnosti pľúc, hypoxémiou, hyperkapniou a acidózou [1]. V dôsledku zhoršenia pľúcnych funkcií je často potrebné novorodencov s MAS ventilovať vyššími koncentráciami kyslíka

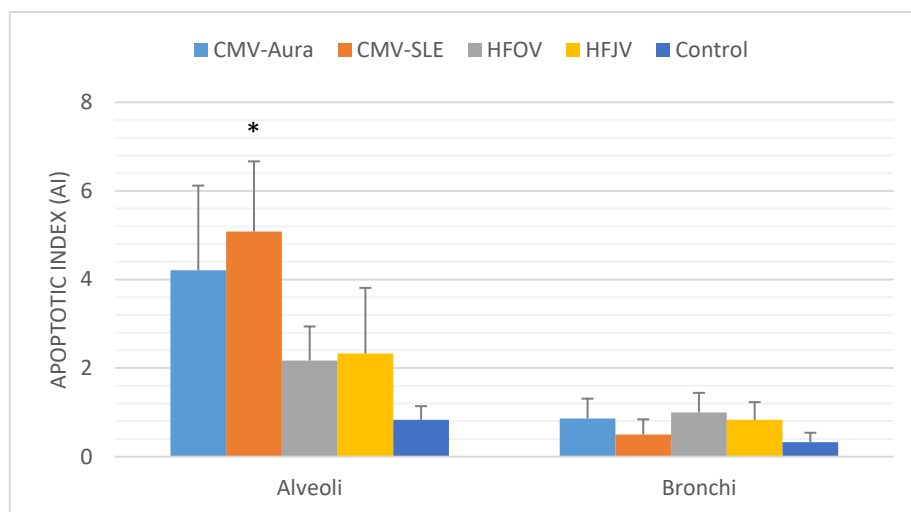
s alebo bez použitia kontinuálneho pretlaku v dýchacích cestách (cPAP). Pri závažnejšom respiračnom zlyhávaní je nutné zahájiť mechanickú ventiláciu pomocou tzv. ventilačných režimov šetriacich pľúca (*lung-protective ventilation*) [2]. Základným typom ventilácie je konvenčná mechanická ventilácia (*conventional mechanical ventilation*, CMV), s hodnotou vrcholového inspiračného tlaku (PIP) do 3 kPa, hodnotou pozitívneho tlaku na konci výdychu (PEEP) 0,4-0,7 kPa a dychovým objemom (V_T) 4-6 ml/kg hmotnosti. V prípade, že CMV nedokáže zabezpečiť optimálnu výmenu dýchacích plynov, je možné použiť tzv. vysokofrekvenčné režimy: vysokofrekvenčnú oscilačnú ventiláciu (*high-frequency oscillatory ventilation*, HFOV) alebo vysokofrekvenčnú tryskovú ventiláciu (*high-frequency jet ventilation*, HFJV) [2]. Nakoľko doteraz chýbajú jednoznačné odporúčania ohľadom umelej pľúcnej ventilácie pri MAS, cieľom našej štúdie bolo porovnať zmeny základných markerov poškodenia pľúc, t.j. edému pľúc a apoptózy alveolárnych a bronchiálnych epitelových buniek, medzi jednotlivými skupinami a zistiť, či je vzhľadom na získané výsledky použitie niektorého z vyššie uvedených typov ventilácie výhodnejšie.

Materiál a metódy

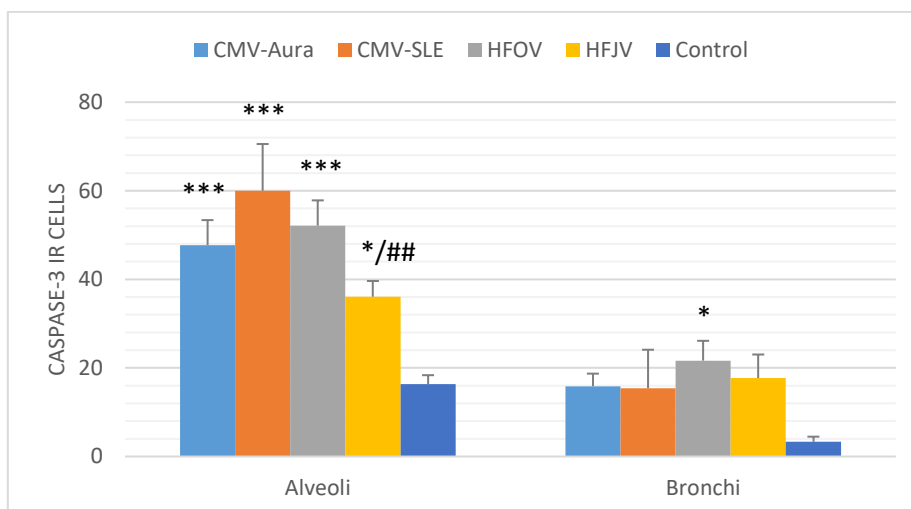
V experimentoch sme použili novozélandské biele králiky s hmotnosťou $2,0 \pm 0,3$ kg. Experimenty sme realizovali v súlade s platnými etickými normami a ich protokol bol odsúhlasený Etickou komisiou JLF UK a ŠVPS SR. Čerstvé mekónium bolo po odbere od zdravých novorodencov lyofilizované (48 h pri -54°C) a uskladnené pri -20°C . Pred podaním sme pripravili suspenziu mekónia vo fyziologickom roztoku s koncentráciou 25 mg/ml. Zvieratám boli podané anestetiká (úvod: tiletamín + zolazepam 15 mg/kg; Zoletil) a xylazín (5 mg/kg; Xylariem) i.m., následne i.v. infúzia: tiletamín + zolazepam (10 mg/kg/h). Zaviedli sme tracheálnu kanylu a katétre do a. femoralis, v. femoralis a v. jugularis ext. Skupina zdravých neventilovaných zvierat (Control) bola v tejto fáze usmrtená predávkovaním anestetika. Ostatným zvieratám sme podali myorelaxans (pipekuronium bromid, 0,3 mg/kg/30 min i.v.; Arduan) a ventilovali ich konvenčne s nasledovnými nastaveniami: f. 40/min, FiO_2 50%, Ti 50 %, PEEP 0,5 kPa, stredný tlak v dýchacích cestách (MAP) 0,7-0,8 kPa, $V_T < 6$ ml/kg. Po 15 min stabilizácie sme vytvorili model MAS i.t. podaním suspenzie mekónia v dávke 4 ml/kg. Následne sme FiO_2 zvýšili na 100% a f. na 50/min, aby sme zabezpečili adekvátnu výmenu plynov. V priebehu 30 min došlo k vytvoreniu respiračného zlyhávania s poklesom PaO_2 na 10 kPa pri FiO_2 100% a poklesom poddajnosti pľúc o viac ako 40%. Zvieratá s modelom MAS pokračovali v CMV ventilácii ventilátorom Aura V (Chirana, SR; skupina CMV-Aura, n=7) alebo ventilátorom SLE-5000 (SLE Ltd., UK; skupina CMV-SLE, n=7) s nastaveniami: f. 50/min, $V_T < 6$ ml/kg, Ti 50 %, FiO_2 100%, PEEP 0,5 kPa, MAP 1,1 kPa), a to počas nasledujúcich 4 hodín. Ďalšie zvieratá boli ventillované pomocou HFOV ventilácie ventilátorom SLE-5000 (SLE Ltd., UK; skupina HFOV, n=7) s nastaveniami: f. 600/min, FiO_2 100%, MAP 1,1 kPa), alebo pomocou HFJV ventilátorom Monsoon (Acutronic, Švajčiarsko; skupina HFJV, n=7) s f. 150/min, FiO_2 100%, MAP 1,1 kPa), a to počas nasledujúcich 4 h. Na konci experimentu sme zvieratá usmrtili predávkovaním anestetika. Vybrali sme pľúca a tracheu. Časť tkaniva pravých pľúc sme odvážili, sušili 24 h pri 60°C a stanovili pomer vlhkej a suchej hmotnosti pľúc (*wet-dry lung weight ratio*). Apoptózu pľúcnych epitelových buniek sme určili pomocou TUNEL metódy a na základe detekcie kaspáza-3 imunoreaktívnych buniek (podrobnejšie viď [3]). Na štatistické spracovanie výsledkov sme použili SYSTAT for Windows. Rozdiely medzi skupinami sme analyzovali pomocou one-way ANOVA testu s post-hoc Fisher's LSD testom. Hodnotu $p < 0,05$ sme považovali za štatisticky významnú. Výsledky sme vyjadrili ako aritmetické priemery \pm SEM.

Výsledky

Po podaní mekónia sa zvýšila tvorba pľúcneho edému v porovnaní s kontrolami (všetky MAS ventilované skupiny vs Control $p < 0,001$). V MAS skupinách vs Control sme pozorovali aj zvýšenie apoptózy pľúcnych buniek (Graf 1 a 2).



Graf 1 Hodnotenie apoptózy pľúcnych alveolárných a bronchiálnych epitelových buniek pomocou apoptotického indexu (AI) TUNEL metódou. Pre rozdiely medzi ventilovanými MAS skupinami vs Control: * $p < 0,05$.



Graf 2 Počet kaspáza-3 imunoreaktívnych buniek v rezoch pľúc. Pre rozdiely medzi ventilovanými MAS skupinami vs Control: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, pre rozdiel medzi CMV-SLE vs HFJV: ## $p < 0,01$.

Zatiaľ čo zvýšenie apoptotického indexu bolo napriek jednoznačnému trendu nesignifikantné (s výnimkou CMV-SLE vs Control $p < 0,05$) (Graf 1), počet kaspáza-3 IR buniek sa v alveolách zvýšil vo všetkých ventilovaných MAS skupinách v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,05$ až $0,001$ vs Control) (Obr. 2). Menej výrazné apoptotické zmeny sme pozorovali v bronchiálnom epiteli, kde bol významný rozdiel v počte kaspáza-3 IR buniek len medzi HFOV vs Control ($p < 0,05$) (Graf 2).

Diskusia

Závažné poškodenie alveolokapilárnej membrány (AKM) pri MAS vedie k rýchlemu poklesu pľúcnej poddajnosti a hypoxémii. Poškodenie pľúcneho tkaniva zároveň spúšťa prozápalové a proapoptotické kaskády. Vyplavené chemokíny a cytokíny stimulujú prestup neutrofilov do pľúc a ich aktiváciu, ale aj aktiváciu iných buniek vrátane makrofágov. Zvyšuje sa tvorba cytokínov (IL-1 β , IL-8, TNF α), proteáz, reaktívnych foriem kyslíka a iných látok, ktoré potencujú lokálny zápal a podieľajú sa aj na systémovej zápalovej reakcii. Okrem toho podporujú prienik tekutiny z kapilár do interstícia pľúc a do alveolárneho priestoru. V našich experimentoch sa zvýšila tvorba pľúcneho edému vo všetkých MAS skupinách v porovnaní s kontrolami. Podobne, zvýšenie pomeru vlhkej a suchej hmotnosti pľúc zvierat s MAS zaznamenali aj iní autori [4, 5]. Akútne poškodenie pľúc a neutrofilmi-sprostredkovaný zápal pri MAS stimulujú apoptózu pľúcnych epitelových buniek, ktorá ďalej zhoršuje poškodenie AKM [6]. Apoptické kaskády sa spúšťajú dvomi alternatívnymi cestami: externou, po väzbe ligandu smrti (napr. TNF α) na špecifické receptory na povrchu bunky, alebo internou, po aktivácii cytokínmi, hypoxiou alebo oxidantmi. Obe cesty konvergujú a následne sa aktivujú kaspázy-3, -6 alebo -7, zodpovedné za vykonanie bunkovej smrti [6]. Naše výsledky ukázali, že k aktivácii proapoptotických procesov v pľúcach králikov dochádza už v priebehu 4 hodín od intratracheálneho podania mekónia. Tieto zmeny môžu byť spôsobené prozápalovými cytokínmi, reaktívnymi formami kyslíka, NO, angiotenzínom II, proteázami a pod., ktoré sa vo zvýšenej miere tvoria pri MAS [7]. Včasné zmeny DNA boli publikované aj pri iných formách akútneho poškodenia pľúc či pri sepe [8, 9]. Dynamika tvorby pľúcneho edému bola vo všetkých skupinách s modelom MAS porovnateľná, a to aj napriek tomu, že sme na ventiláciu zvierat s respiračným zlyhávaním použili 3 rôzne typy pľúca šetriacej ventilácie. Výsledky apoptózy epitelových pľúcnych buniek sa však líšili v závislosti od použitého typu ventilácie: apoptóza alveolárnych buniek bola výraznejšia pri CMV ventilácii, ale obe vysokofrekvenčné ventilácie (HFOV aj HFJV) ju mierne znížili. Vysokofrekvenčné techniky používajú menšie dychové objemy a často aj nižšie vrcholové tlaky [2], čo môže zmierniť strihové sily a zmenšiť poškodenie epitelu. Naopak, v dýchacích cestách sme pri vysokofrekvenčných ventiláciách, najmä pri HFOV, pozorovali trend k zvýšeniu apoptózy bronchiálnych buniek, pravdepodobne z dôvodu vyšších prietokov plynu dýchacími cestami v porovnaní s CMV.

Záver

Pri ventilácii zvierat s experimentálnym MAS všetky 3 typy šetriacej ventilácie viedli k porovnateľnému stupňu pľúcneho edému. Jednotlivé typy ventilácie sa však môžu líšiť v efekte na apoptózu alveolárnych a bronchiálnych epitelových buniek, preto by sa mali tieto skutočnosti zobrať do úvahy pri výbere typu ventilácie.

Práca bola podporená projektom APVV-15-0075.

Literatúra

- [1] Lindenskov, *Neonatology*. **2015**,107:225-230.
- [2] Dargaville, *Int J Pediatr*. **2012**, 2012:965159.
- [3] Mokra, *J Physiol Pharmacol*. **2016**, 67:919-932.
- [4] Lindenskov, *Pediatr Res*. **2005**, 57:371-377.
- [5] Li, *Int J Clin Exp Med*. **2015**, 8:6804-6812.
- [6] Galani, *Pathol Res Pract*. **2010**, 206:145-150.
- [7] Vidyasagar, *J Perinatol*. **2008**, 28:102-107.
- [8] Ronchi, *J Appl Physiol (1985)*. **2012**, 112:1184-1190.
- [9] Chopra, *Exp Biol Med (Maywood)*. **2009**, 234:361-371.

Imunohistochemická analýza celistvých tkanív tráviaceho traktu v rotenónom indukovanom myšom modeli Parkinsonovej choroby

Harsányiová, J.¹, Hajdúchová, D.¹, Pokusa, M.², Kráľová Trancíková, A.²

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej fyziológie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed, Martin

jana.harsanyiova@uniba.sk; alzbeta.trancikova@uniba.sk

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a complex neurodegenerative disease characterized by progressive degeneration of dopaminergic neurons, and at the cellular level by aggregation of pathological forms of alpha-synuclein (α S) and formation of Lewy bodies in the central nervous system (CNS) and enteric nervous system (ENS). The onset of the disease is believed to be localized to peripheral organs, particularly the gastrointestinal tract (GIT) and the olfactory bulb sooner before neuropathological changes occur in the CNS. Patients already in the pre-motor stage of PD suffer from various digestive problems and/or due to significant changes in the composition of the intestinal microbiome in this early stage of the disease. Nowadays, the only direct evidence of PD-related neuropathological changes in the ENS appears to be the confirmation of the presence of protein inclusions in the GIT tissues of PD patients. The purpose of this study is to develop a suitable animal model of PD-related neuropathological changes and optimize the protocol of the immunohistochemical staining for reliable detection of neuropathological changes in the wholemount GIT tissues that would be suitable for biopsy extraction.

Keywords: Parkinson's disease, alpha-synuclein, immunohistochemistry, wholemount tissue

Úvod

Parkinsonova choroba (PCH) je po Alzheimerovej chorobe druhé najčastejšie sa vyskytujúce neurodegeneratívne ochorenie na svete [1], pri ktorom incidencia rapídne stúpa s vekom pacientov a postihuje najmä jedincov nad 65 rokov [2]. Ochorenie je na úrovni CNS charakterizované progresívnou degeneráciou dopaminergických neurónov v *substantia nigra pars compacta* (SNpc), následnou deficienciou dopamínu v striate a zvýšenou aktivitou striatálnych glutamatergických neurónov, čo je asociované s výskytom typických klinických symptómov [2, 3, 4]. Primárnym neuropatologickým znakom PCH na bunkovej úrovni je tvorba intraneuronálnych cytoplazmatických eozinofilných proteínových inklúzií v neurónoch centrálného a enterického NS [5, 6]. Tieto inklúzie, Lewyho telieska a Lewyho neurity, sú tvorené predovšetkým patologickými formami α S (oligoméry, protofibrily a fibrily) asociovanými s viacerými neurodegeneratívnymi ochoreniami [7]. Popri charakteristických klinických motorických príznakoch, ako sú kľudový tremor, bradykinéza, svalová rigidita a posturálna instabilita, je PCH manifestovaná taktiež nemotorickými symptómami, ktoré sú nešpecifické a prejavujú sa najčastejšie dysfunkciou GIT a olfakcie [8], avšak u pacientov sa stretávame aj s psychickými ťažkosťami (depresia, úzkosť), kognitívnymi poruchami, poruchami spánku, bolesťami a nadmernou únavou [9]. Niektoré nemotorické príznaky PCH sa u pacientov vyskytujú už v premotorickej fáze ochorenia, a teda oveľa skôr, ako sú pozorované prvé motorické symptómy [10, 11].

Zistenie, že k iniciácii patogenézy PCH dochádza v GIT, naznačuje, že je extrémne dôležité zamerať sa na skorú detekciu neuropatologických zmien prebiehajúcich v premotorických štádiách ochorenia a nájsť primeraný typ tkaniva vhodný na odoberanie biopsií s čo najmenšou invazivitou. V našej štúdii sa zameriavame na optimalizáciu postupu imunohistochemického farbenia celistvých tkanív GIT myšieho modelu PCH, vďaka ktorému dokážeme signál z jednej molekuly špecifického antigénu v tkanive amplifikovať až štyrikrát, a teda značne zvýšiť senzitivitu experimentov. V celistvých tkanivách tak môžeme vizualizovať inváziu a výskyt neuropatologických zmien spojených s PCH vo väčšej oblasti GIT a dostať komplexnú a presnejšiu informáciu v porovnaní s konvenčnými metódami histológie a farbenia tkanív [12].

Materiál a metódy

V našich experimentoch sme ako biologický materiál použili celistvé tkanivá GIT (duodenum) samcov myší kmeňa Black six (C57BL6N) s váhou 25 g (8 ks v skupine), chované v štandardných podmienkach. Neuropatologické zmeny spojené s PCH boli v myšom modeli indukované pomocou orálnej aplikácie rotenónu s koncentráciou 10 mg/kg rozpusteného v 1% karboxymetylcelulózy a 1% chloroforme. Kontrolným myšiam bola aplikovaná 1% karboxymetylcelulóza s 1% chloroformom bez prídavku rotenónu. Po 0, 4, 6, 8, 10 a 12 týždňoch aplikácie rotenónu boli myši usmrtené pomocou asfyxie a exsanguinácie CO₂. Celistvé duodená boli rozstrihnuté longitudinálne po anteriórnej alebo dorzálnej strane tkaniva, fixované 4% PFA (12hod., pri laboratórnej teplote (LT)) na sylgardom potiahnutých miskách. Po následnom intenzívnom premytí pomocou 1x phosphate-buffered saline (PBS) 3-4x denne po dobu 3 dní pri 4°C boli tkanivá permeabilizované pomocou 1% Tween20 v PBS (6 hod., LT) a opätovne premyté (PBS, 3x 20 min., 4°C). Potenciálne nešpecifické väzobné miesta protilátok boli blokovanie pomocou Avidínu (SP-2001) v 1% BSA/PBS (4 hod., LT) a premyté opätovne (PBS, 5x 20 min., 4°C). Fyziologické alebo patologické formy α S, ako aj samotnú neuronálnu sieť, sme vizualizovali pomocou špecifických primárnych protilátok: chicken anti-neurofilament/NF-L (ab72997, 1:500), mouse anti- α S (610787, 1:200), rat anti- α Tubulín (ab6160, 1:200), rabbit anti- α S (phospho S129) (ab51253, 1:500) a rabbit anti- α S filament (ab209538, 1:2000). Počas inkubácie tkanív s primárnymi protilátkami (1% BSA v PBS, 48 hod., 4°C), sme niekoľkokrát menili pozíciu vzoriek v mikroskúmvkách, aby sme zabránili kontaktu tkanív so stenou mikroskúmvky, a teda aj nerovnomernému naviazaniu protilátok. Po intenzívnom premytí vzoriek (PBS, 10x 30 min., 4°C) boli tkanivá inkubované so sekundárnymi protilátkami (PBS, 12hod., LT) i) konjugovanými s fluorofórom: goat anti-chicken IgY+AF633 (A21103, 1:200), goat anti-mouse IgG+AF555 a goat anti-rabbit IgG+AF555 (A21428, 1:500) (A32727, 1:200), alebo ii) konjugovanými s biotínom z dôvodu zintenzívnenia sledovaného signálu: rabbit anti-rat IgG + biotín (A18925, 1:500). V druhom prípade, po dôkladnom premytí (PBS, 10x 20 min., 4°C), nasledovala inkubácia so streptavidínom konjugovaným s fluorofórom AF647 (S21374, 1:100) (PBS, 5 hod., LT). Všetky inkubácie s fluorofórom konjugovanými protilátkami prebiehali v tme z dôvodu predchádzania fenoménu rýchleho vysvietenia (photobleaching) fluorofórov konjugovaných s protilátkami. Po konečnom premývaní (PBS, 5x 20 min., 4°C) boli tkanivá skladované v anti-fade glycerole (pH 8,6) v tme pri 4°C. Vzorky jednotlivých tkanív boli vizualizované zo slizničnej aj zo svalovej vrstvy tkaniva konfokálnym mikroskopom Zeiss LSM 880 s 20x objektívom (Zeiss Plan-Apochromat 20x/0,8 M27) s veľkosťou jedného zorného poľa 424,7 μ m x 424,7 μ m pri rozlíšení 2048x2048 pixelov. Na zobrazenie väčšej plochy a hĺbky sledovaného

tkaniva boli využívané pokročilé funkcie „Tile“ a „Z-stack“ softvéru Zen Black, čo nám umožnilo vizualizáciu tkaniva v celej hrúbke, dĺžke aj šírke. Z dôvodu dĺžky skenovania (>24 hod.) boli celistvé tkanivá vizualizované vo viacerých jednotlivých skenovaniach. Konečná analýza a úprava obrázkov prebiehala v softvéri Zen Blue.

Výsledky

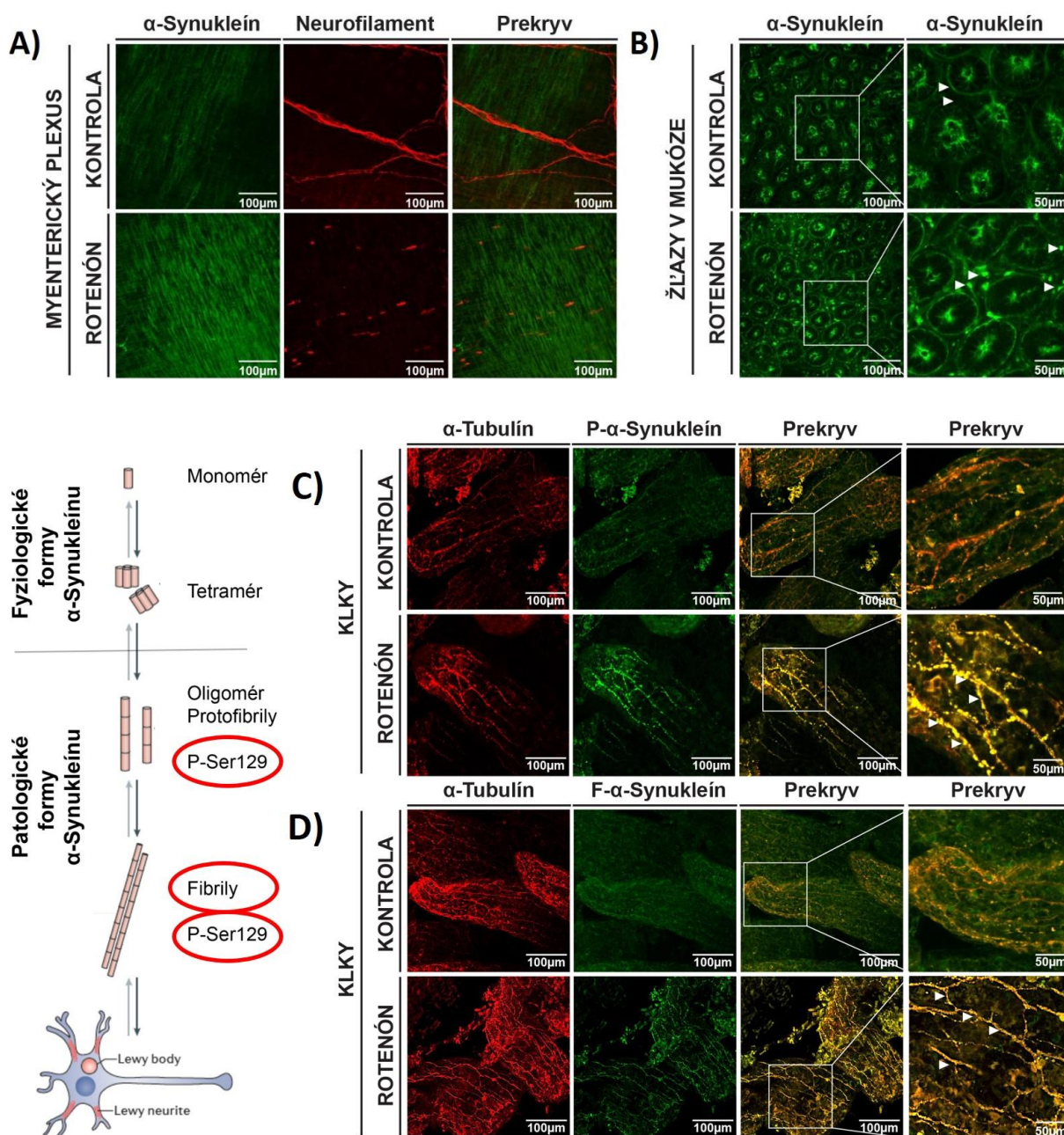
V duodenách myší sme po 8 – 12 týždňovej orálnej aplikácii rotenónu zaznamenali anatomické zmeny v ENS na úrovni myenterického plexu, pričom jednotlivé nervové zväzky a vlákna boli oproti inervácii v kontrolnom tkanive značne fragmentované (Obr. 1A). Neuropatológiu spojenú s akumuláciou α S sme v svalových vrstvách alebo myenterickom plexe neidentifikovali (Obr. 1A). Naopak, akumuláciu celkového α S sme pozorovali v mukozálnej vrstve duodena medzi žľazami (Obr. 1B). Patologické zmeny v slizničnej vrstve sme potvrdili aj pomocou špecifických protilátok proti patologickým formám α S: fosforylovaný (Obr. 1C) a fibrilárny α S (Obr. 1D), pričom kontrolné vzorky podobnú pozitivitu nevykazovali.

Diskusia

Už začiatkom 21. storočia Braak a kolektív [5, 8] navrhli teóriu, že rozvoj PCH je iniciovaný v ENS a *bulbus olfactorius* vplyvom neznámeho toxínu a/alebo patogénu a progreduje do CNS anatomickými spojeniami týchto systémov, resp. ENS môže byť zasiahnutý patologickými zmenami spojenými s PCH už vo veľmi skorých štádiách ochorenia. Táto hypotéza je podporená faktom, že väčšina pacientov s PCH trpí nemotorickými tráviacimi symptómami [6], ktoré sa často vyskytujú niekoľko rokov pred prvými motorickými príznakmi [10, 11]. Detailné analýzy biopsií a autopsií pacientov s PCH [13, 14, 15] a výskum animálnych modelov [16, 17] pomohli objasniť vývoj ochorenia v CNS a následne objaviť vhodnú terapiu na potlačenie symptómov PCH. Mnohé štúdie využili na analýzy klasické imunohistochemické farbenie tkanív GIT [13, 15, 18, 19, 20], avšak vo viacerých chýbal dostatočný počet kontrolných vzoriek, detekcia patologických foriem α S, potvrdenie výsledkov biochemickými metódami výskumu, prípadne komplexná analýza tkanív celého GIT, ktorá by umožnila predikovať vývoj ochorenia v rámci tráviaceho traktu a jeho postup do CNS. V našej štúdii sa nám doposiaľ podarilo zoptimalizovať metódu imunohistochemického farbenia celistvých myších tkanív, v ktorých dokážeme detegovať výskyt a lokalizáciu celkového α S, ale taktiež jeho patologických foriem, morfológické zmeny v ENS, resp. vývoj neuropatológie spojenie s PCH v závislosti od dĺžky orálneho podávania rotenónu a komplexne ich porovnať s kontrolnými vzorkami.

Záver

Podarilo sa nám zaviesť rotenónom indukovaný myší model patologických zmien asociovaných s PCH, vďaka ktorému môžeme sledovať vývoj neuropatológie PCH v tkanivách GIT v závislosti od dĺžky podávania rotenónu. Naše výsledky naznačujú, že po orálnej aplikácii rotenónu môžeme v duodenách myší zaznamenať morfológické zmeny ENS a taktiež akumuláciu patologických foriem α S. Imunohistochemické farbenie celistvých tkanív GIT sa teda spolu s konfokálnou mikroskopiou ukazujú ako vhodné nástroje na detekciu primárnych patologických zmien ENS v skorých štádiách PCH a vo výskume iniciácie patogenézy tohto ochorenia. Popri imunohistochemických experimentoch však netreba zabúdať na dôležitosť ostatných detekčných metód, a teda klasickej histológie a biochemických analýz, ktoré spoločne vytvárajú ucelený obraz vzniku a progresie PCH.



Obr. 1 Príklady vizualizácie jednotlivých vrstiev duodena myšieho modelu Parkinsonovej choroby.

A) Rotenón vedie k fragmentácii ENS v myenterickom plexe (anti-Neurofilament+AF633, anti- α S+AF555), **B)** akumulácii α S v duodene myši (anti- α S+AF488), **C-D)** prítomnosti patologických foriem α S v klkoch duodena. **(C)** Fosforylovaný α S vizualizovaný pomocou špecifických anti- α S phospho S129+AF555 protilátok a **(D)** a patologicky fibrilárny α S vizualizovaný pomocou špecifických protilátok proti anti- α S filament+AF555. Tubulárna sieť je v oboch prípadoch vizualizovaná pomocou anti- α Tubulín+biotín+streptavidín AF647 s využitím biotín-streptavidín amplifikačného systému.

Práca bola podporená grantom MZ SR 2018/10-UKMT-6 a grantom VEGA 1/0334/18. Autori sú vďační za výraznú podporu zo strany zamestnancov Centrálného zverinca JLF UK v Martine pri starostlivosti o experimentálne zvieratá.

Literatúra

- [1] de Lau and Breteler, *Lancet Neurol.* **2006**, 5:525-35.
- [2] Dauer and Przedborski, *Neuron.* **2003**, 39:889-909.
- [3] Jankovic, *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **2008**, 79:368-76.

- [4] Santos, *Front Neurol.* **2019**, 10:574.
- [5] Braak, *Neurosci Lett.* **2006**, 396:67-72.
- [6] Caputi, *Int J Mol Sci.* **2018**, 19/6.
- [7] Lashuel, *Nat Rev Neurosci.* **2013**, 14/1:38-48.
- [8] Braak, *J Neural Transm.* **2003**, 110:517-536.
- [9] Sveinbjornsdottir, *J Neurochem.* **2016**, 139/1:318-324.
- [10] Poewe, *Nat Rev Dis Primers.* **2017**, 3:17013.
- [11] Kalia, *Lancet.* **2015**, 386/9996:896-912.
- [12] Harsanyi, *Dysphagia.* **2020**, 35:471-478.
- [13] Beach, *Acta Neuropathol.* **2010**, 119/6:689-702.
- [14] Cersosimo, *Gastroenterol Res Pract.* **2015**, 2015:476041.
- [15] Lebouvier, *PLoS One.* **2010**, 5/9:e12728.
- [16] Hisahara, *Parkinsons Dis.* **2010**, 2011:951709.
- [17] Duty, *Br J Pharmacol.* **2011**, 164/4:1357-1391.
- [18] Hilton, *Acta Neuropathol.* **2014**, 127:235-241.
- [19] Gold, *Mov Disord.* **2013**, 28/2:237-240.
- [20] Pouclet, *Mov Disord.* **2012**, 27/6:708.

Mikroskopická štúdia vplyvu EMR na pečeň potkanov

Holovská, K.¹, Almášiová, V.¹, Andrašková, S.¹, Račková, E.², Cigánková, V.¹

¹ Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra anatómie, histológie a fyziológie, Košice; ² Neurobiologický ústav SAV, Košice
katarina.holovska@uvlf.sk

Abstract

The aim of our study was to compare the morphological changes in the rat's liver that were daily exposed to electromagnetic radiation (EMR) at a frequency of 2.45 GHz and mean power density of 2.8 mW/cm², in a different way. In the first experimental group (E1), 14 days old rats were exposed to EMR 2 hours a day, per 3 weeks. Immediately after the last exposure, the liver tissue was obtained and processed. In the second experimental group (E2), pregnant females were exposed to EMR 2 hours a day throughout pregnancy. Their offspring were no longer exposed to EMR and their liver tissue was subjected to histopathological evaluation at the age of 5 weeks. Microscopic examination of rat liver revealed that EMR did not cause any significant morphological changes in the liver. We observed only small inflammatory foci in the group E1 and in both groups the formation of vesicles of various sizes and shapes that occurred at the basal pole of hepatocytes. The vesicles were more pronounced in group E2 than in group E1.

Keywords: electromagnetic radiation, liver, structure

Úvod

Všetky organizmy, vrátane ľudí, sú každodenne vystavené vplyvu rôznych typov elektromagnetického žiarenia (EMŽ). Za posledných 20 rokov sa používanie mobilných telefónov a ďalších bezdrôtových zariadení, ako je Wi-Fi, exponenciálne zvýšilo [9]. Na jednej strane nám tieto zariadenia uľahčujú život, ale ako ukazujú posledné výskumy, môžu byť aj príčinou mnohých zdravotných problémov. K najcitlivejším tkanivám, v ktorých boli pozorované morfológické zmeny vplyvom EMŽ, patrí nervový systém [10, 11], ďalej kardiovaskulárny systém [1] a imunitný systém [8]. Cieľom našej práce bolo porovnať morfológické zmeny v pečeni potkanov, ktoré boli rôznym spôsobom vystavené účinku EMŽ.

Materiál a metódy

Experiment bol uskutočnený na Neurobiologickom ústave SAV v Košiciach. Pri manipulácii so zvieratami boli dodržané všetky zásady etiky podľa pravidiel Komisie na ochranu zvierat pri NbÚ SAV ako aj Štátnej veterinárnej správy SR (Ro 2792/15-221/2).

Potkany Wistar albino boli náhodne rozdelené do experimentálnych a kontrolných skupín. V prvej experimentálnej skupine (E1) boli potkany vo veku 14 dní celotelovo ožarované 2 hodiny denne pulzným elektromagnetickým žiarením s frekvenciou 2,45 GHz a s priemernou silovou hustotou 2,8 mW/cm² počas 3 týždňov. Po poslednom ožarovaní a usmrtení zvierat boli odobraté vzorky pečene.

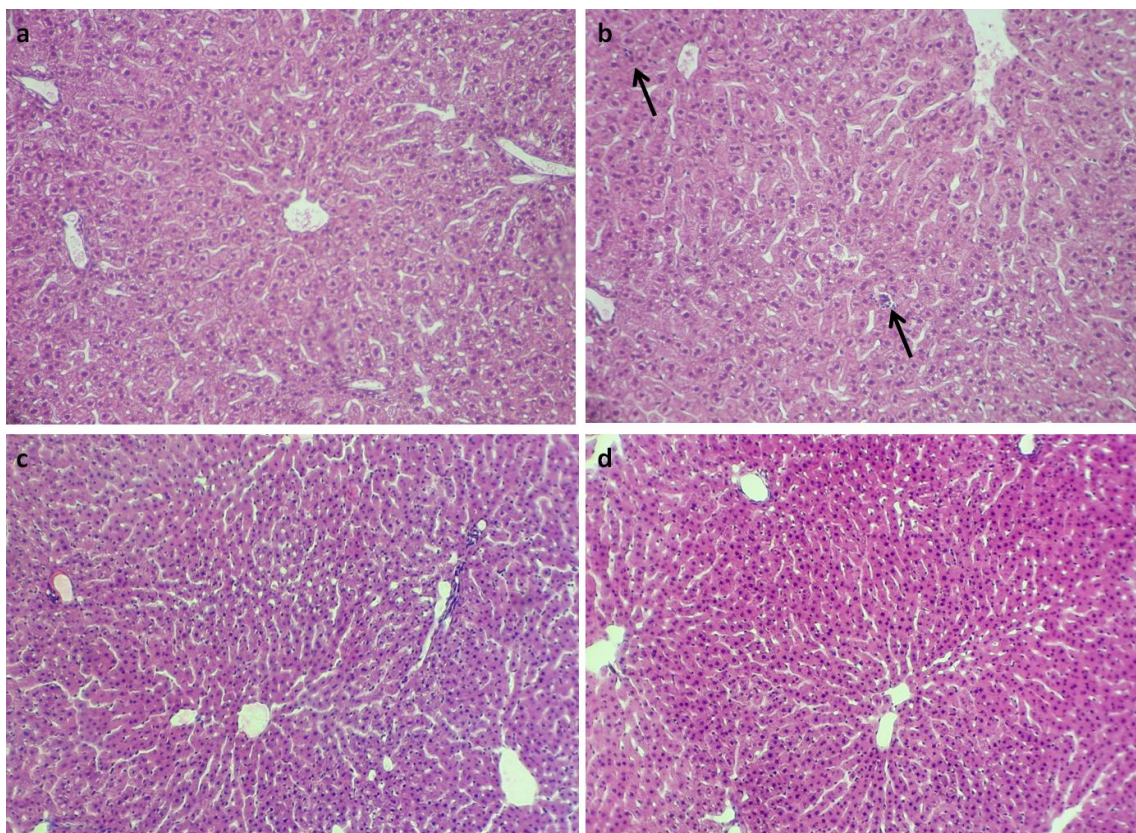
V druhej experimentálnej skupine (E2) boli gravidné samice potkanov vystavené rovnakému EMŽ 2 hodiny denne počas celej dĺžky gravidity. Ich mláďatá už neboli ožarované a nechali sa prežívať do veku 5 týždňov, kedy sa odobrali vzorky tkaniva. Kontrolné zvieratá boli držané v rovnakých podmienkach ako experimentálne zvieratá,

avšak bez aplikácie žiarenia (K-E1, K-E2). Vzorky pečene zo všetkých zvierat boli odobraté a spracované pre mikroskopické vyšetrenie. Vzorky boli fixované dvoma metódami v závislosti od ich ďalšieho spracovania. Jedna skupina vzoriek bola fixovaná v 4 % neutrálnom formaldehyde, zaliata do parafínu a ofarbená metódou hematoxylín-eozín. Druhá skupina vzoriek bola fixovaná v 3% glutaraldehyde a postfixovaná 1% OsO₄, odvodnená v acetóne, zaliata do Durkupanu. Poloténkové rezy (1 µm) boli ofarbené toluidínovou modrou. Následne všetky spracované vzorky boli vyhodnocované a fotografované svetelným mikroskopom Jenamed.

Výsledky

V kontrolnej skupine zvierat mala pečeň klasický morfológický vzhľad (Obr. 1a,c; 2a,c). V E1 skupine bola štruktúra pečene porovnateľná s kontrolnou skupinou. Pečeňový lalôčik mal zachovaný tvar a veľkosť. Nepozorovali sme žiadne zápalové zmeny v blízkosti v. *centralis* a ani v portobiliárných priestoroch. V niektorých lalôčikoch sa na periférii vyskytli drobné zápalové ložiská (Obr. 1b). Pri detailnom štúdiu hepatocytov sme v ich cytoplazme pozorovali drobné vezikuly, ktoré sa vytvárali na vaskulárnom póle buniek (Obr. 2b).

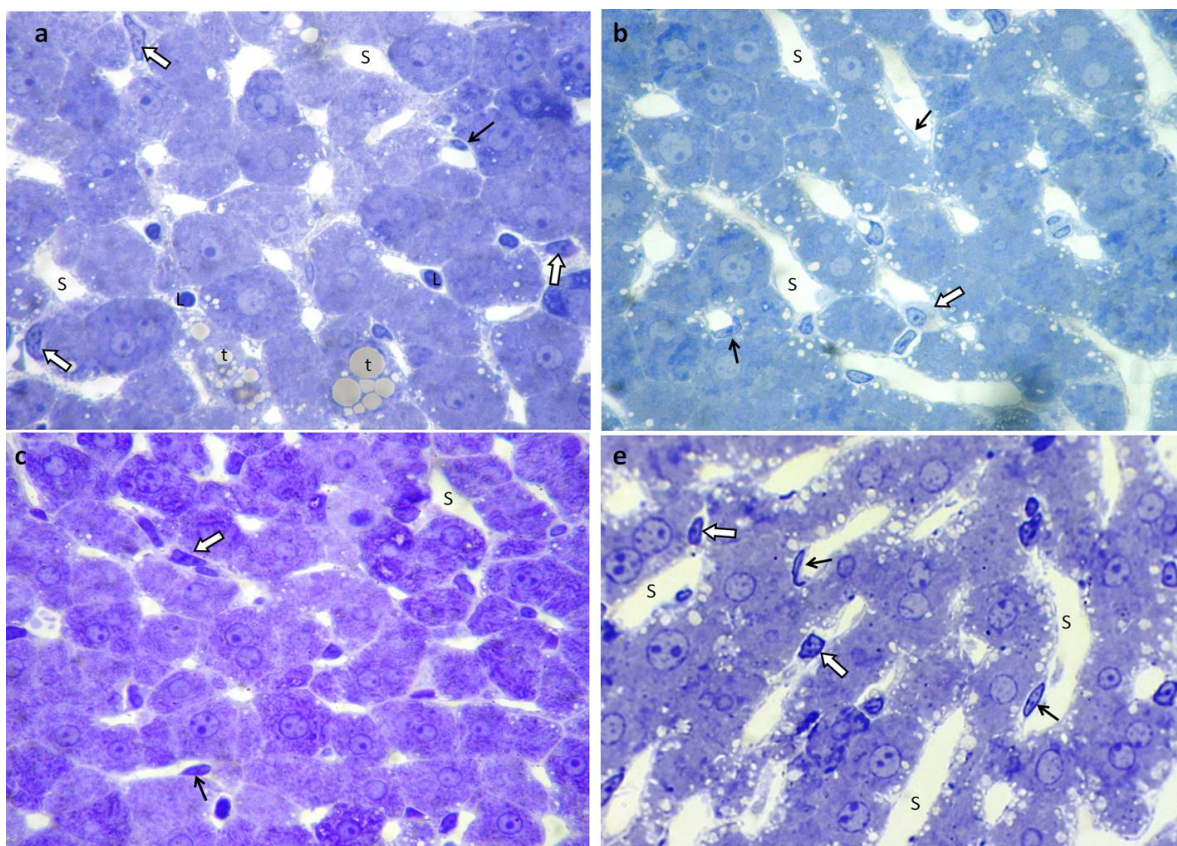
V E2 skupine sme v štruktúre tkaniva pečene taktiež nepozorovali žiadne výrazné morfológické zmeny. Hepatocyty mali zachovaný tvar a veľkosť. Pečeňové sinusoidy boli bez dilatácie a hyperémie. Nepozorovali sme žiadne zápalové zmeny a ani zvýšenie množstva intersticiálneho väziva (Obr. 1d). Avšak na poloténkových rezoch boli v cytoplazme hepatocytov pozorované početné vezikuly. Vezikuly mali homogénny vzhľad a vyskytovali sa na krvnom póle buniek (Obr. 2e).



Obr. 1 Mikrofotografie pečene kontrolné skupiny (a- K-E1, c- K-E2) a experimentálne skupiny (b - E1, d - E2). Čierna šípka - zápalové ložisko. (hematoxylín-eozín, zväčšenie 100x)

Diskusia

Negatívny účinok EMŽ bol preukázaný na mnohé tkanivá a orgány. V tráviacom systéme boli zmeny pozorované hlavne v slinných žľazách [2]. V našom experimente sme sa zamerali na ďalšiu významnú žľazu tráviaceho systému, a to na pečeň. Sledovali sme mikroskopickú štruktúru pečene u nedospelých potkanov, vo veku 5 týždňov. Tieto potkany boli rôznym spôsobom vystavené účinku EMŽ. V E1 skupine, kde boli ožarované potkany vo veku 14 dní po dobu 3 týždňov, sme pozorovali tvorbu drobných zápalových ložísk. V E2 skupine boli ožarované gravidné samice. Pri sledovaní morfológických zmien v pečeni ich mláďat vo veku 5 týždňov, sme nepozorovali žiadne zápalové zmeny. El-Bediwi a kol. [5] však u dospelých potkanov pozorovali v pečeni okrem zápalu aj steatózu, nekrózu a zmnoženie väziva (900 MHz/1h denne/ po dobu 3-6 mesiacov).



Obr. 2 Mikrofotografie pečene potkanov, polotenké rezy. Kontrolné skupiny (a - K-E1, c - K-E2), experimentálne skupiny (b - E1, d - E2). S - pečeňové sínusoidy, t - tukové vakuoly, biela šípka - Kupfferove bunky, čierna šípka - endotelové bunky. (Toluidínová modrá, zväčšenie 1000 x)

Ďalšie nami pozorované zmeny, ktoré nastali v obidvoch experimentálnych skupinách, bola tvorba vezikúl. Tieto útvary sa vyskytovali na krvnom póle hepatocytov a boli početnejšie u potkanov, ktoré boli vystavené EMŽ počas intrauterinného vývoja. Je známe, že prenatálne obdobie predstavuje kritickú fázu vo vývoji jedinca. Je to spôsobené vysokou citlivosťou vyvíjajúcich sa tkanív na environmentálne činitele [4]. K takýmto činiteľom sa zaraďuje aj EMŽ. Jeho biologický účinok závisí od mnohých faktorov, ako sú charakter poľa, použitý rozsah frekvencií, intenzita a doba pôsobenia. Z literatúry je známe, že účinkom EMŽ dochádza k poškodeniu tkanív zvýšenou produkciou voľných radikálov, čo môže viesť k oxidačnému stresu [3, 6]. Na oxidačný stres sú veľmi citlivé bunkové membrány. V nich dochádza k poškodeniu

nenasýtených mastných kyselín tzv. peroxidácia lipidov [7]. Zmeny v membráne, aké sme pozorovali v našom experimente, predstavovali tvorbu vezikúl na vaskulárnom póle hepatocytov. Aj keď vek experimentálnych zvierat pri odbere vzoriek bol zhodný (5. týždeň), podstatný rozdiel bol v samotnom prevedení experimentu. Kým v skupine E1, kedy sa ožarovali potkany vo veku 14 dní, došlo len k miernemu výskytu vezikúl, u potkanov, ktoré boli ožarované iba počas intrauterinného vývoja (E2) došlo k intenzívnejšej tvorbe týchto štruktúr. Poukazuje to na možné riziko EMŽ, ktorému sú jedince počas intrauterinného vývoja taktiež vystavené.

Záver

Ako vyplýva z našich výsledkov, elektromagnetické žiarenie s frekvenciou 2,45 GHz s priemernou silovou hustotou $2,8 \text{ mW/cm}^2$, spôsobilo v štruktúre hepatocytov len mierne morfológické zmeny. Aj keď vek zvierat pri odbere vzoriek bol zhodný, podstatný rozdiel bol v samotnom prevedení experimentu. Výraznejšie zmeny sme pozorovali v pečeni potkanov, ktoré boli ožarované počas intrauterinného vývoja a po narodení už neboli vystavené ďalšiemu žiareniu. Nami pozorované zmeny neboli síce výrazné, ale upozorňujú na možné riziko, ktoré je spojené s každodenným a neustálym vystavením organizmu vplyvu EMŽ.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0060/18.

Literatúra

- [1] Azab, *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*. **2017**, 4/2:1-7.
- [2] Aydogan, *Am J Otolaryngol*. **2015**, 36/1:39-46.
- [3] Burlaka, *Exp Oncol*. **2013**, 35: 219-225.
- [4] Dietert, *Hum Exp Toxicol*. **2008**, 27:129-134.
- [5] El-Bediwi, *Journal of Medical Sciences*. **2011**, 11/6:256-260.
- [6] Esmekaya, *Gen Physiol Biophys*. **2011**, 30: 84-89.
- [7] Halliwell, *Nutr Rev*. **1994**, 52:253-65.
- [8] Li, *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. **2013**, 31/8:602-5.
- [9] Pall, *Environmental Research*. **2018**, 164:405-416.
- [10] Say, *J Chem Neuroanat*. **2016**, 75:70-6.
- [11] Wang, *Scientific Reports*. **2017**, 7:1-12.

Morfologická a funkčná maturácia Leydigových buniek v semenníku potkana

Andrašková, S., Almášiová, V., Holovská, K., Cigánková, V.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Ústav histológie a embryológie, Košice

Sandra.Andraskova@student.uvlf.sk

Abstract

Leydig cells are the major steroid-producing cells in the interstitial tissue of the mammalian testis. The clusters of Leydig cells are found in the spaces among the seminiferous tubules and are frequently associated with blood vessels. Four main cell types are described in the lineage of the Leydig cells, namely the mesenchymal precursor cells, progenitor cells, immature Leydig cells, and mature Leydig cells. Mesenchymal cells are the precursors to Leydig cells at the onset of their differentiation in the prepubertal stage. Circulatory hormones as well as locally produced growth factors are shown to have important influence on the differentiation and maturation of the adult Leydig cell population. The onset of precursor cell differentiation into progenitor cells is independent from LH, however LH is essential for the later stages in the Leydig cell lineage to induce cell proliferation and establishment the set of organelles required for the steroidogenic function. In adults a constant number of Leydig cells is maintained. The aim of this study is to elucidate the prenatal and postnatal differentiation of Leydig cells in the rat testis.

Keywords: rat testes, Leydig cells, prenatal and postnatal development

Úvod

Leydigove bunky sú mezenchýmového pôvodu. Na základe zmien v morfológii a steroidogénnej kapacite, prechádzajú štyrmi štádiami diferenciácie. Jedná sa o fetálne, postnatálne progenitorové, nezrelé prepubertálne a zrelé Leydigove bunky. Dôležitý vplyv na diferenciáciu a dozrievanie populácie Leydigových buniek majú cirkulujúce hormóny, ako aj lokálne produkované rastové faktory.

Fetálne Leydigove bunky sa u plodu potkana objavujú už na 12. gestačný deň [1]. Diferencujú sa z mezenchýmových buniek, ktoré sú prítomné v intersticiálnom väzive medzi pohlavnými povrazcami. Tvorba fetálnych Leydigových buniek je nezávislá od stimulácie LH. Steroidogéza je vo fetálnych semenníkoch udržiavaná množstvom rôznych parakrinných faktorov [2]. Testosterón je Leydigovými bunkami produkovaný v embryonálnom období od 15. dňa gravidity [3]. Určuje vývoj samčieho fenotypu, je zodpovedný za maskulinizáciu a ovplyvňuje aj ďalšie vyvíjajúce sa orgány [4]. Ku koncu gravidity činnosť fetálnych Leydigových buniek klesá, tesne po narodení sú mitoticky neaktívne a napokon postupne degenerujú. Ich rýchla regresia po narodení (6.-14. deň) sa zhoduje s náhlým poklesom sérového testosterónu [5].

Postnatálny vývojový proces pozostáva z viacerých stupňov, ktoré zahŕňajú proliferáciu prekurzorových buniek a ich diferenciáciu na progenitorové Leydigove bunky, proliferáciu progenitorových buniek na nezrelé Leydigove bunky a nakoniec dozrievanie nezrelých na zrelé Leydigove bunky [6].

Prekurzorové bunky sa diferencujú z mezenchýmových kmeňových buniek [3]. Sú to fibroblastom podobné nediferencované bunky, uložené peritubulárne v interstíciu semenníkov. Zatiaľ, čo sa niektoré mezenchýmové bunky diferencujú počas intrauterinného vývinu na fetálne Leydigove bunky, iné zostávajú nediferencované a

slúžia ako prekursorové bunky pre populáciu zreých Leydigových buniek [7]. Podľa viacerých autorov začína proces postnatálnej diferenciácie Leydigových buniek tvorbou agranulovaného endoplazmatického retikula na jednom póle bunky a postupne dochádza aj k pribúdaniu počtu mitochondrií a ďalších bunkových organel [8]. Tieto bunky ešte neexprimujú steroidogénne enzýmy. Prolifерácia prekursorových mezenchýmových buniek je regulovaná parakrinnými a endokrinnými faktormi a nie je závislá na luteinizačnom hormóne (LH) [3].

Progenitorové bunky sa v interstíciu semenníkov potkanov objavujú od 10. dňa po narodení a ich počet sa zvyšuje do nástupu puberty [9]. Mitotická aktivita v progenitorových Leydigových bunkách je jediným znakom na ich odlíšenie od zanikajúcich fetálnych buniek. Progenitorové Leydigove bunky majú vretenovitý tvar a sú morfológicky nerozoznatelné od prekursorových buniek. Exprimujú však steroidogénne enzýmy a sú tak schopné produkovať androgény. Produkujú ich v nižšej miere ako zrelé Leydigove bunky, keďže množstvo organel zapojených do produkcie steroidov je obmedzené [9]. Podľa niektorých autorov nástup diferenciácie prekursorových buniek v semenníkoch prepupertálneho potkana je nezávislý od LH, podobne ako vo fetálnych semenníkoch potkanov [10]. Uvádzajú, že progenitorové bunky obsahujú nefunkčnú formu LH receptorov, na ktoré sa viaže iba malé množstvo LH, a preto je produkcia testosterónu nízka [5, 11]. S progresiou diferenciácie progenitorových buniek smerom k nasledujúcemu bunkovému typu dochádza postupne k zmene ich tvaru, zaokrúhľujú sa a začínajú sa premiestňovať z peritubulárnej oblasti smerom do centra interstícia [8].

Nezrelé prepupertálne Leydigove bunky predstavujú ďalší krok vo vývoji Leydigových buniek. Ich diferenciácia začína približne na 28. deň po narodení a je závislá od LH. Najviditeľnejším rozdielom medzi progenitorovými a nezrelými Leydigovými bunkami je zmena tvaru buniek z vretenovitého na polygonálny [8]. Okrem toho je táto diferenciácia sprevádzaná zmenou ich lokalizácie z peritubulárneho priestoru do stredu interstícia. Jadrá buniek sú veľké a okrúhle s kondenzovaným heterochromatínom. Cytoplazma obsahuje značne rozvinutý Golgiho aparát, množstvo tubulovezikulárnych mitochondrií a početné malé lipidové kvapôčky. Cholesterol uložený v týchto lipidových kvapkách slúži ako substrát pre syntézu steroidov. Celkový počet lipidových kvapôčok, ako aj ich veľkosť je v nezrelých Leydigových bunkách menší ako v prípade fetálnych Leydigových buniek [6, 12]. Na rozdiel od progenitorových Leydigových buniek obsahujú funkčnú formu LH receptorov a hladiny exprese rôznych steroidogénnych enzýmov sa začínajú meniť [13]. Kontrastujúcim aspektom metabolizmu steroidov v nezrelých Leydigových bunkách v porovnaní so zrelými Leydigovými bunkami je prítomnosť vysokých hladín enzýmov redukujúcich testosterón, ako je 5 α -reduktáza a 3 α -hydroxysteroiddehydrogenáza. Preto tieto bunky produkujú hlavne redukované metabolity testosterónu, ako je dihydrotestosterón a 3 α -androstendiol, ktoré sú dôležité pre udržanie prvej vlny spermatogenézy [14]. Nezrelé Leydigove bunky majú len 40%-tnú sekrečnú kapacitu testosterónu v porovnaní so zrelými Leydigovými bunkami a to v dôsledku nižšej aktivity 17 β -hydroxysteroiddehydrogenázy. Nezrelé Leydigove bunky sú dominantným typom bunkovej línie Leydigových buniek približne do 45. až 50. dňa po narodení [6]. Zrelé Leydigove bunky sa diferencujú z nezrelých Leydigových buniek a vyznačujú sa výrazným zväčšením ich objemu a vymiznutím lipidových kvapôčok z ich cytoplazmy [6, 12]. Absenciou lipidových kvapôčok zrelé Leydigove bunky prechádzajú na iný zdroj cholesterolu. Získavajú ho syntézou *de novo*, alebo zo sérových lipoproteínov [15]. Zrelé bunky obsahujú viac bunkových organel potrebných na produkciu steroidov a majú zvýšenú citlivosť k cirkulujúcemu LH aj v dôsledku väčšieho počtu LH receptorov

[11]. Produkcia predovšetkým testosterónu sa výrazne zvyšuje, pričom dôležitá je najmä zvýšená aktivita 17 β -hydroxysteroiddehydrogenázy, ktorá katalyzuje posledný krok v biosyntéze testosterónu. V tomto období zároveň dochádza k výraznému poklesu aktivity enzýmov produkujúcich redukované formy androgénov [14].

Zrelé Leydigove bunky sú endokrinné elementy intersticiálneho väziva semenníkov, ktorých hlavnou funkciou je syntéza dominantného androgénneho hormónu steroidnej podstaty – testosterónu. Testosterón má intratestikulárne účinky na spermatogézu a periférne účinky na prídavné pohlavné orgány, taktiež aj na iné tkanivá a orgány, ako sú mozog, svaly, kosti, koža [3]. Prekurzorom syntézy testosterónu je cholesterol a do Leydigovej bunky sa dostáva buď receptorom sprostredkovanou endocytózou lipoproteínu, alebo *de novo* syntézou z acetátu. U potkana predstavujú zrelé Leydigove bunky približne 20% objemu interstícia a sú usporiadané jednotlivo, alebo v skupinkách, vždy v tesnej blízkosti krvných kapilár. U dospelých jedincov je celkové množstvo Leydigových buniek približne konštantné [3]. Majú polygonálny tvar a u potkana sú veľké približne 15-20 μ m. Jadro je okrúhle alebo oválne, mierne excentricky uložené, s jedným až dvomi jadierkami. Ich eozinofilne farbiaca sa cytoplazma vykazuje typické znaky steroidogénnych buniek. Obsahuje rôzne inklúzie ako lipidové kvapôčky, ktoré sú zdrojom prekurzorov biosyntézy androgénov, zrnká lipofuscínu a glykogénu, ktoré jej na periférii dávajú bledý penovitý vzhľad [16]. Podstatnú časť cytoplazmy tvorí agranulované endoplazmatické retikulum, kde prebieha biosyntéza samčích pohlavných hormónov, mitochondrie s tubulami - *tubuli mitochondriales*, ktoré sú typické pre bunky produkujúce steroidy [17].

Záver

Cieľom tejto práce bolo opísať diferenciáciu Leydigových buniek v semenníkoch potkana počas prenatalného a postnatalného vývinu a poskytnúť základný obraz korelácie medzi morfológiou a endokrinnou dynamikou Leydigových buniek vyskytujúcej sa počas vývoja samčieho reprodukčného systému. V bunkovej línii postnatalných Leydigových buniek sú prítomné štyri hlavné typy buniek a to mezenchýmové prekurzorové bunky, progenitorové bunky, nezrelé prepubertálne bunky a zrelé Leydigove bunky. Nástup diferenciácie prekurzorových buniek na progenitorové bunky je nezávislý od LH. Tento hormón je však nevyhnutný pre neskoršie štádiá bunkovej línie Leydigových buniek a pre tvorbu kompletnej organelovej výbavy, ktorá je potrebná pre ich steroidogénnu funkciu. Mezenchýmové bunky sú prekurzormi Leydigových buniek ako u prepubertálneho potkana, tak aj u dospelého potkana. V dospelosti sú prirodzene odumierajúce Leydigove bunky nahradzované novými, čím je v semenníkoch pohlavne dospelého jedinca udržiavaný konštantný počet Leydigových buniek [6].

Práca bola finančne podporená projektami VEGA č. 1/0060/18 a KEGA č. 004UVLF-4/2018.

Literatúra

- [1] Migrenne, *Mol Cell Endocrinol.* **2001**, 172:193-202
- [2] Katja, *Human Reproduction Update.* **2015**, 3:310-328.
- [3] Creasy, *Elsevier*, **2013**, 2493-2598 s., ISBN 9780124157590
- [4] Chen, *Mol.Cell.Endocrinol.* **2009**, 306: 9-16.
- [5] Lee, *J Reprod Fert.* **1975**, 42: 121-126.
- [6] Mendis-Handagama, *Biology of Reprod.* **2001**, 3:660-671.
- [7] Lording, *J Reprod Fert.* **1972**, 29:261-269.
- [8] Dierichs, *Zellforsch.* **1973**, 143:207-227.

- [9] Hardy, *Endocrinology*. **1989**, 124:762-770.
- [10] Majdic, *Biol Reprod*. **1998**, 58:520-525.
- [11] Shan, *Endocrinology*. **1992**, 131:1107-1114.
- [12] Ariyaratne, *Biol Reprod*. **2000**, 62:680-690.
- [13] Bortolussi, *Cell Tissue Res*. **1990**, 260:185-191.
- [14] Murono, *Acta Endocrinol*. **1989**, 121:477-483.
- [15] Ge, *Humana Press*, **2007**, 55-70 s., ISBN 978-1-59745-453-7
- [16] Kerr, *Endocrinology* **1985**, 116: 1030-1043.
- [17] Dym, *Macmillan Press*, **1983**, 1000-1053 s., ISBN-13: 978-0444007162

Chemopreventívne účinky Škorice pravej v modeli experimentálneho karcinómu prsníka *in vivo*: hodnotenie základných parametrov karcinogenézy a histopatologických zmien

Kubatka, P.¹, Kajo, K.², Líšková, A.³, Samec, M.³, Koklesová, L.³, Péč, M.¹, Adamkov, M.⁴

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie Martin; ² Onkologický ústav sv. Alžbety v Bratislave, Ústav patológie, Bratislava; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie Martin
peter.kubatka@uniba.sk

Abstract

It is supposed that the antineoplastic effects of nutraceuticals and whole functional foods, rich in phytochemicals, are not caused by a single phytochemical but it is the activity of the mixture of plethora phytochemicals. The cocktail of phytochemicals present in plant foods with a broad spectrum of biologically active compounds can provide additive or synergic effect against carcinogenesis. Based on this hypothesis, the main aim of this study is to evaluate chemopreventive effects of phytochemical compounds present in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) in carcinogen-induced premenopausal model of rat mammary gland cancer. Experimental animals were divided into three groups: control group without chemoprevention, chemoprevention with cinnamon administered dietary at a concentration of 0.1 % (CIN 0.1) and chemoprevention with cinnamon administered dietary at a concentration of 1 % (CIN 1). Results demonstrated significant decrease in tumor incidence and significant positive histopathological changes in tumors after treatment with CIN when compared with control animals. In conclusion, our results showed significant chemopreventive potential of *C. zeylanicum* L. in the rodent model of breast carcinogenesis.

Keywords: mammary carcinoma, rat, chemoprevention, phytochemicals, cinnamon, histopathology

Úvod

Rozsiahly onkologický (najmä predklinický) výskum preukázal, že fytochemikálie, ktoré sa podávajú buď ako celé potraviny alebo ako izolované molekuly, signifikantne ovplyvňujú všetky štádiá rakoviny vrátane karcinogenézy prsníka [1, 2]. Chemopreventívne účinky Škorice pravej (*C. zeylanicum* L.) neboli doteraz testované použitím modelu karcinómu prsníka hlodavcov. Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť protirakovinové účinky diétne podávanej *C. zeylanicum* s použitím chemicky indukovaného modelu adenokarcinómu prsníka u samíc potkanov. Realizácia tejto štúdie bola založená na predchádzajúcich výsledkoch z nášho laboratória, v ktorom sme zdokumentovali protinádorové účinky vňate *Thymus vulgaris* L., pukov *Syzygium aromaticum* L., vňate *Origanum vulgare* L., zmesi polyfenolov šupiek tmavého ovocia, *Chlorella pyrenoidosa* a mladých listov jačmeňa [3-8]. Uvedené koreniny, byliny, ovocie alebo rastlinné potraviny vykazovali významné protirakovinové účinky v modeli rakoviny mliečnej žľazy potkanov *in vivo* a *in vitro*, ktoré boli sprevádzané významnými proapoptotickými, antiproliferatívnymi, antiangiogénnymi, antioxidantnými,

epigenetickými alebo anti-CSCs (nádorové kmeňové bunky) účinkami v nádorovom tkanive. Prirodzené zmesi bioaktívnych molekúl zahrnutých v uvedených celých rastlinných látkach ovplyvňuje širokú signalizačnú sieť zapojenú do karcinogenézy prsníka [9]. Z týchto dôvodov bolo naším cieľom v tejto štúdii vykonať analýzu základných parametrov mamárnej karcinogenézy a zmeny histopatologických ukazovateľov nádorového tkaniva po dlhodobej aplikácii *C. zeylanicum* v modeli chemoprevencie mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov.

Materiál a metódy

Experiment bol schválený Etickou komisiou JLF UK (No. EK1860/2016) a ŠVPS SR (No. Ro-3239/15-221 a Ro-1640/17-221). V experimente sme použili panenské samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley z chovnej stanice Charles River Germany vo veku 32-36 dní. Zvieratá boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca. Mamárnu karcinogenézu sme vyvolali intraperitoneálnou aplikáciou N-metyl-N-nitrozourey (NMU) (Sigma, Deisenhofen, Nemecko) medzi 40. - 46. postnatálnym dňom v dávke 50 mg/kg hmotnosti zvieraťa. Tento experimentálny model imituje situáciu u zdravých, ale vysoko rizikových žien. Týždeň pred aplikáciou karcinogénu sme začali s chemoprevenciou, ktorá trvala 14 týždňov až do ukončenia experimentu. Fytosubstanciu sme aplikovali v potrave. Dodávateľom presnej koncentrácie substance v potrave (typ R-Z bez fytoestrogénov) bol SSNIFF Spezialdiäten GmbH (Soest, Nemecko). Zvieratá boli napájané pitnou vodou *ad libitum*. Zvieratá v počte 75 kusov boli rozdelené do 3 skupín: 1. kontrolná skupina bez chemoprevencie, 2. skupina s fytosubstanciou v nižšej koncentrácii (0.1%), 3. skupina s fytosubstanciou vo vyššej koncentrácii (1%). Pri dávkovaní škoricie sme vychádzali z našich skúseností v predchádzajúcom období, kedy sme úspešne analyzovali viaceré rastlinné potraviny (chlorella, mladý jačmeň, oregano, klinček, či tymián). Pri definovaní dávky fytosubstancie primárne vychádzame z klinického dávkovania s tým, že použijeme aj rádovo vyššiu dávku, ktorá je bežná pri aplikácii u potkanov (z dôvodu rozdielnej medzidruhovej farmakokinetiky a farmakodynamiky fytochemikálií).

Na konci experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Pri pitve sme zhodnotili makroskopické zmeny na vybraných orgánoch (pečeň, obličky, žalúdok, črevo, pľúca). Mamárne nádory boli vypitvané a zaznamenali sme ich rozmery. Časť vzoriek tkaniva mamárnych nádorov bola zafixovaná v 10 %-nom roztoku pufrovaného formalínu a následne technikou parafrínových rezov pripravená na histologické a imunohistochemické vyšetrenie. Druhá časť vzoriek mamárnych nádorov bola zmrazená v tekutom dusíku pre vyhodnotenie expresie parametrov rôznych signálnych dráh. Nádory boli klasifikované podľa kritérií pre klasifikáciu mamárnych nádorov potkanov [10]. Kritériá pre kategorizáciu gradingu (solidizácia, atypia buniek, index mitotickej aktivity a nekróza) boli definované podľa štandardnej diagnostickej metódy. HG (high grade) karcinómy sa považovali za nádory s ≥ 2 pozitívnymi kritériami a LG (low grade) karcinómy boli nádory s ≤ 1 pozitívnymi kritériami. Histologická analýza a grading tkaniva poskytla informáciu o stupni diferenciácie, prognóze mamárneho nádoru a účinnosti liečby/chemoprevencie.

V štatistickom hodnotení získaných dát sme použili Mann-Whitneyho test, jednocestnú analýzu variancie, Kruskal-Wallisov test a Studentov t-test.

Výsledky a diskusia

Škorica významne znížila incidenciu nádorov v oboch liečených skupinách o 15,5 % ($P < 0.05$) v porovnaní s kontrolnými zvieratami (Tab. 1). V skupine s vyššou dávkou škorice sme zaznamenali signifikantný pokles priemerného objemu nádorov o 55,5 % ($P < 0.05$) voči skupine s nižšou dávkou substance. Čo sa týka ostatných parametrov mamárnej karcinogenézy, frekvencia nádorov a latencia neboli významne zmenené v porovnaní s kontrolnou skupinou. Nižšia dávka škorice nepreukázala žiadne významné zmeny frekvencie, latencie a objemu nádorov v porovnaní s kontrolnými zvieratami.

Zmiešané papilárne/kribriformové karcinómy, kribriformné/papilárne karcinómy, kribriformné karcinómy a kribriformné/komedózne karcinómy boli najčastejšie vyskytujúce sa mamárne lézie v tomto experimente. Pomery slabo a dobre diferencovaných karcinómov (HG/LG) sa po chemoprevencii signifikantne znížili – KONT (0,67); CIN 0.1 (0,26) ($P < 0,05$ vs KONT); CIN 1 (0,31) ($P < 0,05$ vs KONT) (Tab. 2).

Tab. 1 Účinky škorice v NMU-indukovanej mamárnej karcinogenéze u samíc potkanov na konci experimentu.

Skupina	KONT	CIN 0.1	CIN 1
Frekvencia nádorov na skupinu*	3.88 ± 0.66	2.46 ± 0.48 (- 36.5 %)	2.67 ± 0.65 (- 31 %)
Incidencia nádorov (%)	95.8	70.8* (- 15.5 %)	70.8* (- 15.5 %)
Latencia nádorov* (dni)	73.35 ± 3.83	78.65 ± 3.09 (+ 5.5 dňa)	82.76 ± 3.35 (+9.5 dňa)
Priemerný objem nádorov* (cm ³)	0.54 ± 0.09	0.67 ± 0.16 (+ 24 %)	0.33 ± 0.05# (- 39 %)
Kumulatívny objem nádorov ** (cm ³)	48.97	38.22 (- 22 %)	20.41 (- 58.5 %)

*Dáta sú vyjadrené ako priemery ± SEM, ** Dáta sú vyjadrené ako suma objemov nádorov na skupinu. Hodnoty v zátvorkách vyjadrujú %-uálnu odchýlku voči KONT. Sign. rozdiel * $P < 0.05$ vs KONT, # $P < 0.05$ vs CIN 0,1.

Tab. 2 Pomer slabo a dobre diferencovaných karcinómov po liečbe škoricom.

Skupina	KONT	CIN 0,1	CIN 1
Počet HG karcinómov	37	12	15
Počet LG karcinómov	55	47	48
Pomer HG/LG	0,67	0,26 *(-62 %)	0,31 * (-53,5 %)

Signifikantný rozdiel * $P < 0,05$ vs KONT.

Rastlinné substance sa zatiaľ v klinickej praxi nepoužívajú na liečbu či prevenciu nádorov prsníka. V tejto súvislosti naša štúdia s použitím animálneho chemopreventívneho modelu priniesla pôvodné vedecké výsledky. *C. zeylanicum* vykázal významný chemopreventívny účinok v modeli chemicky indukovanej karcinogenézy mliečnej žľazy u potkanov. Protirakovinový účinok škorice bol sprevádzaný významnými pozitívnymi zmenami v histopatologických vlastnostiach nádorov. Vyššia ale aj nižšia dávka škorice signifikantne znížila incidenciu mamárnych nádorov a nesignifikantne redukovala frekvenciu nádorov o vyše 30 % voči kontrole. V tej istej štúdii škorica signifikantne zlepšila histopatologické charakteristiky v oboch liečených skupinách. Dominantné fenolické látky prítomné v Škorici pravej, ktoré boli

zodpovedné za popísané protinádorové účinky sú cinnamaldehyd, limonén, kopaen, naftalén, 2-propenal či heptán [11]. Výsledky našich predklinických štúdií potvrdzujú vedecké východisko, že signifikantný protirakovinový účinok celých rastlinných funkčných potravín je založený viac na kombinácii rôznych fytochemikálií ako na izolovaných zložkách. Z toho vyplýva, že cielené zameranie na viaceré signálne dráhy súčasne, môže predstavovať efektívnejší biomedicínsky prístup. Závěry viacerých predklinických a klinických štúdií preukazujú nižšiu efektivitu izolovaných fytochemikálií v porovnaní s celými rastlinnými funkčnými potravinami u rakovinových ochorení [9]. Chemopreventívny efekt rôznych rastlinných prirodzených substancií (potravín) v mamárnej karcinogéze u samíc potkanov popísali aj ďalší autori [12-15].

Záver

Výsledky tejto štúdie a aj našich skôr zrealizovaných experimentov preukazujú pozitívny protinádorový účinok rastlinných potravín nielen v modeli chemoprevenencie ale aj terapie experimentálneho karcinómu mliečnej žľazy. Dosiahnuté výsledky preukazujú správnosť vedeckého predpokladu našej práce, ktorá spočívala v poznatku, že kombinácia širokého spektra sekundárnych metabolitov prítomných v rastlinných potravinách prináša benefity pre organizmus v podobe protinádorového účinku. Predpokladáme, že sledované signifikantné protinádorové účinky škorice, ale aj klinčeka, tymiánu, oregana, tmavého ovocia, či chlorelly boli dôsledkom aditívnych, či synergických účinkov fytochemikálií v nich obsiahnutých. Ako dokazujú ďalšie naše analýzy, za výrazne pozitívnym účinkom testovaných rastlinných potravín bude predovšetkým ich silný antioxidačný a epigenetický vplyv. Chemoprevenencia rakoviny prsníka u ľudí pomocou rastlinných potravín vyžaduje okrem stanovenia účinnosti aj definovanie vhodného dávkovania a nežiaducich vedľajších účinkov počas ich dlhodobého podávania. K tomu budú potrebné precízne dizajnované a dobre kontrolované klinické štúdie. Vysoký chemopreventívny efekt vybraných rastlinných potravín možno predpokladať aj u ľudí, pričom je zrejmé, že denná konzumácia niekoľkých rôznych bylín a korenín typických pre ázijskú či stredomorskú kuchyňu (napr. škoric, tymián, klinček, oregano, rozmarín, kurkuma, šalvia, atď.) bude výrazne efektívnejšia v porovnaní s jednou potravinou.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0136/19 a APVV-16-0021.

Literatúra

- [1] Bray, *CA Cancer J Clin.* **2018**, 68:394-424.
- [2] Ko, *J Cancer Prev.* **2015**, 20:223-231.
- [3] Kubatka, *Int J Mol Sci.* **2019**, 20.
- [4] Kubatka, *J Cell Mol Med.* **2017**, 21:2837-2851.
- [5] Kubatka, *J Nutr.* **2017**, 56:1303-1316.
- [6] Kubatka, *Eur J Nutr.* **2017**, 56:1303-1316.
- [7] Kubatka, *Nutrition.* **2015**, 31:560-569.
- [8] Kubatka, *Nutr Cancer.* **2016**, 68:611-621.
- [9] Kapinova, *Biomed Pharmacother.* **2017**, 96:1465-1477.
- [10] Russo, *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **2000**, 5:187-200.
- [11] Kubatka, *Molecules.* **2020**, 25:1399.
- [12] Jeybalan, *J Agric Food Chem.* **2014**, 62:3963-3971.
- [13] Ravoori, *J Agric Food Chem.* **2012**, 60:5547-5555.
- [14] Singletary, *Cancer Lett.* **1996**, 104:43-48.
- [15] Bishayee, *Nutr Cancer.* **2016**, 68:120-130.

Vplyv *Cinnamomum zeylanicum* L. na posttranslačné modifikácie histónov v experimentálnom modeli mamárnej karcinogenézy *in vivo*

Koklesová, L.¹, Samec, M.¹, Lišková, A.¹, Výbohová, D.², Péč, M.³, Adamkov, M.⁴, Kubatka, P.³

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
koklesova5@uniba.sk; peter.kubatka@uniba.sk

Abstract

Diet rich in phytochemicals have a beneficiary effect on human health, including the preventive effects in carcinogenesis. In this study, we focused on the evaluation of potential chemopreventive and antitumor effects, specifically on histone modifications by *Cinnamomum zeylanicum* L. in rat model of mammary carcinoma. *C. zeylanicum* (as bark powder) was dietary administered at two concentrations of 0.1 % and 1 % during the whole experiment in a chemically-induced rat mammary carcinomas. Chemoprevention was not administered in the control group. The evaluation of epigenetic changes including histone modifications in rat tumor cells *in vivo* demonstrated significant decrease in lysine methylation status of H3K4me3 and H3K9me3 in high-dose treated group, dose-dependent increase of H4K16ac levels; however, the methylation status of H4K20me3 was not changed. Our results revealed that cinnamon in both doses has chemopreventive and antitumor effects through the epigenetic changes such as the posttranslational histone modifications in rat mammary carcinoma cells *in vivo*.

Keywords: mammary carcinoma, cinnamon, chemoprevention, histone modification, epigenetics

Úvod

Chemoprevencia predstavuje jednu z významných foriem prevencie rakoviny, ktorej cieľom je využitie netoxických nutričných látok so snahou potlačiť, oddialiť alebo zvrátiť karcinogénny proces v organizme [1]. Vzhľadom na vysokú incidenciu a mortalitu mamárneho karcinómu prsných žliaz žien, ktorá predstavuje celosvetový problém, je vývoj nových terapeutických možností ako aj prevencie veľmi dôležitý [2].

Fytochemikálie sú molekuly vykazujúce významnú antioxidačnú, protizápalovú a imunomodulačnú aktivitu *in vitro* a *in vivo* [3-5]. Navyše dokážu regulovať bunkový cyklus, programovanú bunkovú smrť, angiogézu a aktivitu kmeňových buniek v rakovinovom tkanive, čím môžu potláčať rast a šírenie zhubných buniek v organizme [6]. Rastlinné bioaktívne molekuly vykazujú tumor-supresívny potenciál pri zameraní sa na aberantné epigenetické modifikácie ako napríklad posttranslačné chemické modulácie histónov [7, 8]. Kôra škoric, *Cinnamomum zeylanicum* L., patrí medzi korenie s vysokou antioxidačnou kapacitou a s protinádorovým účinkom *in vitro* [9, 10]. Esenciálny olej zo škoric má vysoký obsah fytochemikálií ako monoterpenoidy, seskviterpenoidy, cinnamaldehyd, cinnamylacetát, eugenol a benzaldehyd [11]. Protinádorový a chemopreventívny účinok škoric nebol doposiaľ skúmaný v animálnom modeli mamárneho karcinómu a preto cieľom našej štúdie bolo sledovať

histónové posttranslačné zmeny (metylácie a acetylácie) v bunkách mamárneho karcinómu samíc potkanov po dlhodobom podávaní *Cinnamomum zeylanicum* L. v diéte.

Materiál a metódy

V experimente sme použili samice potkanov Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Nemecko) vo veku 5 týždňov. Zvieratá boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca pri teplote 23 ± 2 °C, relatívnej vlhkosti 40-60 % a umelom svetelnom režime svetlo/tma 12:12 h). Karcinogénu sme u potkanov indukovali intraperitoneálne (jednorazová dávka 50 mg/kg telesnej hmotnosti v 42. deň postnatálneho vývoja) pomocou N-nitrozo-N-methylurey (NMU, Sigma, Deisenhofen, Nemecko). Uvedený animálny model samíc potkanov imituje premenopauzálne obdobie žien s vysokým rizikom rozvoja rakoviny prsníka. Chemoprevenca so škorickou (*Cinnamomum zeylanicum* L.), ktorá bola aplikovaná v diéte (Sniff, Soest, Nemecko) začala týždeň pred podaním karcinogénu a trvala 14 týždňov. Zvieratá boli rozdelené do 3 skupín: kontrolná skupina bez aplikácie fyto-substancie (KONT), skupina s obsahom škorice v potrave s nižšou koncentráciou (1 g/kg) (ŠKOR 0.1) a skupina so škorickou v potrave s vyššou koncentráciou (10 g/kg) (ŠKOR 1). Jedenkrát týždenne boli zvieratá vážené a palpované za účelom zistenia výskytu, lokalizácie a frekvencie nádorov mliečnej žľazy. Posledný týždeň experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou a okamžite im bolo odobrané nádorové tkanivo, ktoré sme zafixovali formalínom a zaliali do parafínu.

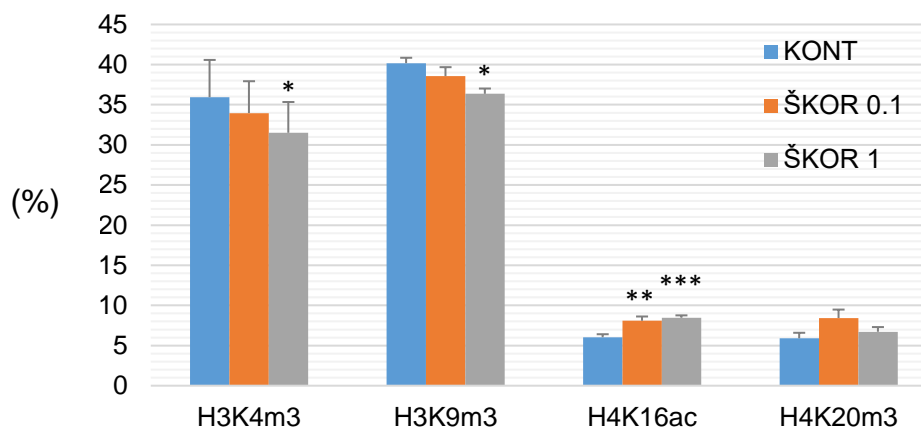
Pre imunohistochemickú analýzu bola vybraná najvýznamnejšia časť nádoru prsníka potkana v parafínovom bloku (ktorý zahŕňa typizačné charakteristiky a najväčšie zastúpenie vitálnej epitelovej zložky nádoru, t.j. bez regresívnych zmien, ako je rozsiahla nekróza). Detekcia vybraných markerov pre mechanistickú štúdiu sa uskutočňovala nepriamou imunohistochemickou metódou na celých parafínových rezoch s použitím komerčne dostupných protilátok špecifických pre potkany. Imunohistochemické farbenie (Autostainer Link 48 /Hermes/) bolo spracované podľa odporúčania výrobcov a koncentrácia použitá pre každú primárnu protilátku bola nasledujúca: H3K4m3 1:500, H3K9m3 1:400, H4K20m3 1:300, H4K16ac 1:200. Primárne protilátky boli vizualizované sekundárnym farbením (EnVision, Dual Link System-HRP, kat. č. K060911, Dako North America, Carpinteria, CA, USA) s použitím substrátu (diaminobenzidín tetrahydrochlorid). U negatívnych kontrol sa vynechalo farbenie primárnymi protilátkami. Vyhodnotenie imunohistochemickej expresie antigénu bolo získané morfometrickou metódou. Digitálne obrázky boli pozorované mikroskopicky (Olympus BX41N, Tokio, Japonsko) pri zväčšení 400x a ich morfometrická analýza bola vykonaná pomocou softvéru QuickPHOTO MICRO, verzia 3.1 (Promicra, Praha, Česká republika). Hodnoty boli porovnávané medzi ošetrovanými (ŠKOR 0,1 a ŠKOR 1) a neošetrovanými (KONT) vzorkami nádorových tkanív samíc potkanov, pričom sa analyzovalo najmenej 60 vzoriek nádoru na jeden marker.

Výsledky

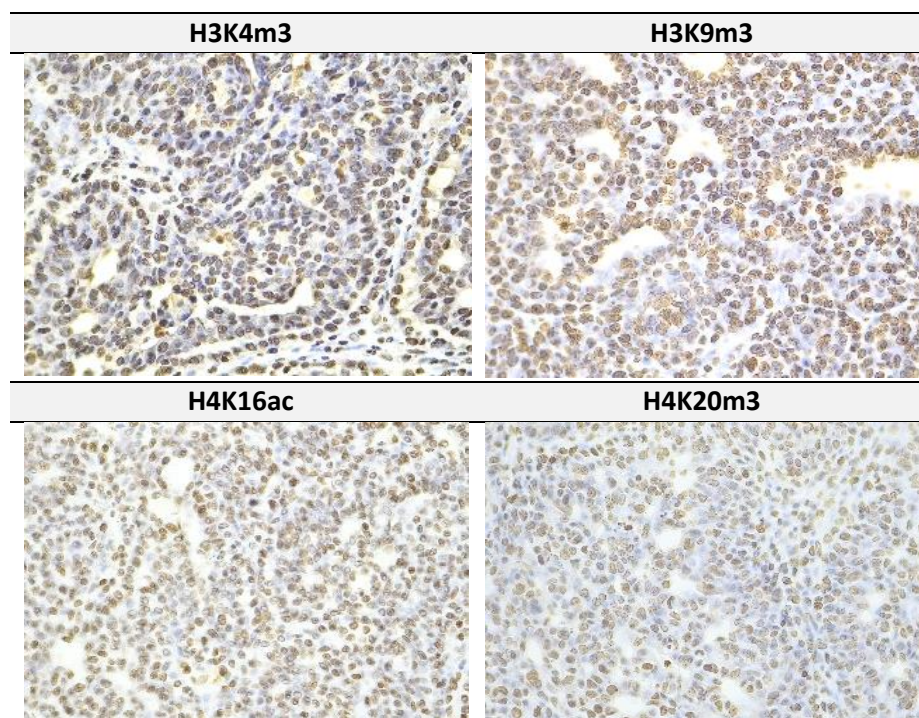
Posttranslačné chemické modifikácie histónu 3 a histónu 4 vyvolané škorickou vo vyšších dávkach preukázali významné zníženie metylácie H3K4m3 o 12,5 % ($P < 0,05$) a H3K9m3 o 9,5 % ($P < 0,05$) v porovnaní s kontrolami. Stupeň acetylácie H4K16ac v ošetrovaných rakovinových bunkách boli v závislosti od dávky zvýšené o 34 % ($P < 0,01$) a 40,5 % ($P < 0,001$) v porovnaní s kontrolnými bunkami. Zmeny metylácie H4K20m3 v liečených skupinách neboli významné v porovnaní s neošetrovanou (kontrolnou) skupinou (Graf 1). Obrázok 1 sumarizuje reprezentatívne zábery

uvedených štyroch markerov posttranslačnej modifikácie histónov v nádorových bunkách mliečnej žľazy potkanov.

Pozitívne bunky karcinómu



Graf 1 Imunoexpresia markerov metylácie a acetylácie histónov v bunkách karcinómu prsníka potkana po liečbe *C. zeylanicum*. Dáta sú vyjadrené ako priemer \pm SEM. Významný rozdiel: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ v porovnaní s KONT. Hodnoty proteínovej expresie boli porovnávané medzi ošetrovanými (ŠKOR 0,1 a ŠKOR 1) a neošetrovanými (kontrolnými) karcinómovými bunkami samíc potkanov, pričom sa analyzovalo najmenej 60 obrázkov na jeden marker.



Obr. 1 Reprezentatívne zábery expresie markerov chemickej modifikácie histónov v nádorovom tkanive.

Diskusia

Úloha stravy bohatej na fytochemikálie a jej vplyv na epigenóm nádorového tkaniva je vysoko klinicky relevantnou témou vzhľadom na množstvo štúdií dokazujúce, že

epigenetické zmeny dynamicky prispievajú k patogenéze rakoviny [12] súčasne tiež vykazujú protinádorové vlastnosti prostredníctvom modulácie epigenómu neoplastických buniek [8, 13]. Súčasný onkologický výskum sa intenzívne zaoberá definovaním špecifických epigenetických modulácií indukovaných rastlinnými bioaktívnymi molekulami, vrátane histónových chemických modifikácií. Kombinácia niekoľkých izolovaných fytochemikálií alebo použitie prírodných zmesí fytochemikálií prítomných v rastlinných potravinách by mohla poskytnúť aditívne alebo synergické účinky na početné epigenetické ciele v porovnaní s jednou použitou molekulou [7]. Škorica v tejto štúdii znížila hladiny posttranslačných chemických modifikácií molekúl histónov ako H3K4m3 a H3K9M3 a zvýšila hladiny H4K16ac v karcinómoch mliečnej žľazy potkana. V inej štúdii sme zistili, že pupienky klinčeka významne zvýšili hladiny H4K20me3 a H4K16ac [14] a *Thymus vulgaris* L. znížil hladiny H3K4me3 v chemicky indukovanej karcinogéze potkanov [15]. Všetky tieto zmeny predstavujú pozitívny vplyv na epigenetické modifikácie opísané našou skupinou v modeli karcinómu prsníka u hlodavcov. Iní autori ukázali, že resveratrol obmedzoval supresívny stav kritických nádorových supresorov vrátane BRCA1, p53 a p21 v bunkových líniiach MCF-7 a MDA-MB-231, čo viedlo k inhibícii rastu rakoviny. Inhibícia rakoviny bola spojená so znížením metylácií H4R3me2s a H3K27me3 a zvýšením acetylácií H3K9ac, H3K27ac v histónoch organizujúcich/regulujúcich promótoru uvedených génov [16]. Hlbšie pochopenie globálnych vzorcov posttranslačných modifikácií histónov a ich dôsledkov na chemické modifikácie jadrového chromatinu môže odhaliť dôležité molekulárne ciele pre jednotlivé fytochemikálie alebo celé rastlinné potraviny, ktoré sa dajú klinicky aplikovať ako progresívne klinické prístupy v manažmente rakoviny.

Záver

V našej štúdii mamárneho karcinómu samíc potkanov sme zaznamenali signifikantný protinádorový a chemopreventívny účinok fytochemikálií prítomných v škorici prostredníctvom epigenetických zmien, akými sú postranlačné modifikácie histónov. Škorica v nižšej (0,1 %) aj vyššej (1 %) koncentrácii aplikovanej v diéte dokázala znížiť metylačný status v H3K4m3 a H3K9m3 a zvýšiť acetylačný status v H4K16ac. Predpokladáme, že protinádorový a chemopreventívny účinok škorice spočíva v aditívnych či synergických účinkoch kombinácie viacerých fytochemikálií prítomných v celistvej rastline.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0136/19 a APVV-16-0021.

Literatúra

- [1] Kubatka, *Univerzita Komenského v Bratislave*, **2017**, 204 s., ISBN 978-80-223-4373-2
- [2] Pratheeshkumar, *BioMed Res Int.* **2015**, 324021.
- [3] Ranjan, *Int J Mol Sci.* **2019**, 20:4981.
- [4] Chikara, *Cancer Lett.* **2018**, 413:122-134.
- [5] Chen, *Int J Mol Sci.* **2018**, 19:2729.
- [6] Kapinova, *Health Prev Med.* **2018**, 23:36
- [7] Kapinova, *Biomed Pharmacother.* **2018**, 99:51-58.
- [8] Samec, *Biomolecules* **2019**, 9:829.
- [9] Husain, *J Ethnopharmacol.* **2018**, 219:110-116.
- [10] Ghosh, *3 Biotech.* **2015**, 5:939-947.
- [11] Cardoso-Ugarte, *Elsevier*, **2016**, 930 s., ISBN 9780124166417
- [12] Uramová, *EPMA J.* **2018**, 9:403-419.
- [13] Jašek, *Biomolecules.* **2019**, 9:289.
- [14] Kubatka, *J Cell Mol Med.* **2017**, 21:2837-2851.
- [15] Kubatka, *Int J Mol Sci.* **2019**, 20:1749
- [16] Chatterjee, *BioFactors Oxf Engl.* **2019**, 45:818-829.

Modulačný účinok Škorice pravej v reguláciách metylácie vybraných génových promótorov v chemopreventívnom modeli mamárnej karcinogenézy *in vivo*

Samec, M.^{1,2}, Jašek, K.², Lišková, A.^{1,2}, Koklesová, L.^{1,2}, Adamkov, M.⁴, Kubatka, P.^{2,3}

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed Martin-Divízia Onkológia, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
marek.samec@uniba.sk; peter.kubatka@uniba.sk

Abstract

It is supposed that naturally occurring mixtures of phytochemicals present in vegetables, fruits, grains, beans, and other plants (functional foods) may be associated with anticancer activities. Recently, numerous studies suggested that epigenetic mechanisms, including miRNA expression, histone modifications, and promoter methylation are linked to cancer initiation and progression. In this study, we evaluated antitumor efficacy of *Cinnamomum zeylanicum* L. in the modification of methylation status of tumor suppressor genes *ATM*, *PTEN*, *PITX2*, *RASFF1*, and *TIMP3* in chemopreventive model of breast cancer in rodents. Chemoprevention by *Cinnamomum zeylanicum* L. was administered at a concentration of 0.1 % and 1 % in diet and lasted 14 weeks. Our results revealed that dietary administrated *Cinnamomum zeylanicum* L. significantly decreased methylation status of promoter regions of tumor suppressor genes *ATM* and *TIMP3* in rat mammary carcinoma cells *in vivo*.

Keywords: *Cinnamomum zeylanicum* L., DNA methylation, gene promoters, mammary carcinogenesis, rat

Úvod

Fytochemikálie sú biosyntetizované v rastlinách vo forme sekundárnych metabolitov a predstavujú dôležitý zdroj biomolekúl s pleiotropickými účinkami, ktoré poskytujú široké spektrum možných klinických aplikácií [1]. Pre tieto sekundárne metabolity rastlín sú charakteristické antibakteriálne, antioxidantné, protizápalové a imunomodulačné vlastnosti. Fytochemikálie slúžia ako dôležité zdroje pre nové lieky a sú tiež využívané ako efektívne látky v protinádorovej terapii. Niektoré typické príklady predstavujú analógy taxolu, vinka alkaloidy ako napríklad vinkristín, vinblastín a analógy podofylotoxínu. Tieto fytochemikálie často pôsobia prostredníctvom regulácie signálnych dráh, ktoré sa podieľajú na riadení intracelulárnych procesoch asociovaných s rakovinou ako je rast a proliferácia [2]. Špecifické mechanizmy predstavujú zvýšenie antioxidantného statusu, inaktivácia karcinogénov, inhibícia proliferácie, indukcia zastavenia bunkového cyklu a apoptóza, a regulácia imunitného systému [3]. Okrem toho bioaktívne zložky rastlín preukázali výrazne modulačné účinky v rámci epigenetických modifikácií, ktoré predstavujú vysoko aktuálnu oblasť vedeckého výskumu [4]. Rakovina prsníka predstavuje najčastejšie diagnostikované nádorové ochorenie v ženskej časti populácie a druhú najčastejšiu príčinu smrti asociovanú s nádorovým ochorením u žien [5]. Zhubné ochorenie prsníka je komplexné molekulárne ochorenie ktoré je spojené so zmenami v génoch zapojených

v regulácii rastu a proliferácie [6]. Epigenetické modifikácie, ktoré zahŕňajú zmeny v metylácii DNA, chemických modifikáciách histónov a v expresii mikroRNA, predstavujú reverzibilné procesy regulujúce génovú expresiu bez zmeny poradia nukleotidov DNA [7]. Zmena úrovne metylácie DNA ako následok deregulácie aktivity DNA metyltransferáz (DNMT) je fundamentálny epigenetický proces zapojený do iniciácie, promócie a progresie rakoviny prsníka [8]. Z toho dôvodu predstavuje regulácia DNA metylácie potencionalný cieľ v prevencii a terapii nádorov mamárnej žľazy [9]. Aplikácia fytochemikálií predstavuje nádejný prístup zameraný na moduláciu aktivity DNMT v mamárnej karcinogénze. Preto cieľom našej štúdie bolo hodnotenie metylačného profilu tumor supresorových génov *ATM*, *PITX2*, *PTEN*, *RASSF1* a *TIMP3* po dlhodobej konzumácii Škorice pravej v experimentálnej štúdii mamárnej karcinogénzy *in vivo*.

Materiál a metódy

Animálne modely a indukcia mamárnej karcinogénzy

V predkladanom experimente boli použité samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) vo veku 30-34 dní. Zvieratá boli chované v štandardných podmienkach vo zverinci. Potkanom bola indukovaná karcinogénza subkutánnou aplikáciou karcinogénu N-methyl-N-nitrosourea (NMU, Sigma, Deisenhofen, Germany) v jednorazovej dávke 50 mg/kg telesnej hmotnosti v 42. deň postnatálneho vývoja. Použitý animálny model potkana imituje situáciu žien v premenopauzálnom období s vysokým rizikom rozvoja rakoviny prsníka. Chemoprevencia škoricou začala týždeň pred indukciou karcinogénom. Potkany boli náhodne rozdelené do 3 skupín pričom: 1. skupina predstavovala kontrolnú skupinu bez chemoprevencie; 2. skupina predstavovala zvieratá kŕmené nižšou koncentráciou škoric (0,1 %); 3. skupina bola kŕmená potravou obohatenou o vyššiu koncentráciu škoric (1 %). Posledný týždeň experimentálnej štúdie boli zvieratá dekapitované a bolo im odobraté nádorové tkanivo.

Homogenizácia nádorového tkaniva a izolácia DNA

Homogenizácia nádorového tkaniva bola vykonaná pomocou TissueLyser LT (Qiagen, Germany). V ďalšom kroku sme ku homogenizovanému tkanivu pridali 20 µl proteinázy K a inkubovali 4 dni pri 56°C. Na izoláciu DNA bol použitý komerčný kit DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany), pričom sme postupovali podľa priloženého protokolu. Koncentráciu DNA sme stanovili pomocou Qubit™ 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Na bisulfidovú konverziu sme použili DNA s koncentráciou 50 ng/µl a ďalej sme postupovali podľa priloženého protokolu.

Kvantitatívna analýza metylácie

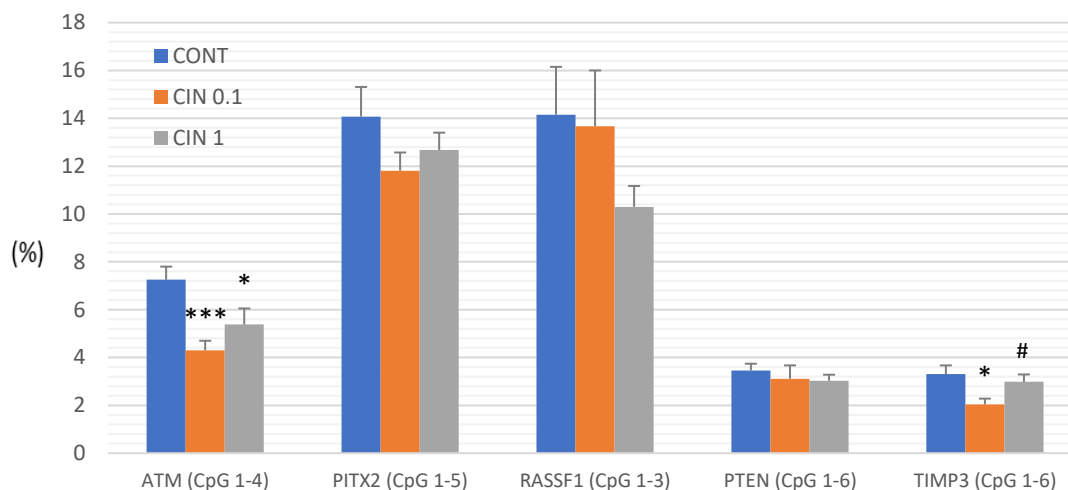
S použitím komerčného kitu PyroMark PCR (Qiagen, Germany) sme analyzovali metylačný profil promótorovej oblasti vybraných génov. V rámci metodiky sme použili komerčne dostupné eseje na stanovenie metylačného profilu piatich génových promótorov (*RASSF1*, *TIMP3*, *PITX2*, *ATM*, *PTEN*) (PyroMark CpG assay, Qiagen, Germany). Pyrosekvenčná analýza prebiehala na zariadení PyroMark Q96 ID System (Qiagen, Germany) s použitím PyroMark Gold Q96 Reagents. Metylácia bola meraná komerčným softvérom (PyroMark Q96 software version 2.5.8; Qiagen, Germany).

Výsledky

Analyzovali sme úroveň metylácie CpG ostrovov v piatich promótorových oblastiach

tumor supresorových génov: *ATM* (1-4 CpG), *PITX2* (1-5 CpG), *RASSF1* (1-3 CpG), *PTEN* (1-6 CpG) a *TIMP3* (1-6 CpG). Zmenený metylačný profil sme sledovali v 20 odobratých nádoroch v každej z 3 experimentálnych skupín (KONT, CIN 0.1, CIN 1) (60 nádorov celkovo). Škorica signifikantne a nezávisle od dávky znížila celkový metylačný status promótoru génu *ATM* o 40.5 % ($p < 0,001$) a 26 % ($p < 0,05$) oproti kontrolnej skupine. Škorica v nižšej dávke signifikantne znížila metyláciu v promótorovej oblasti génu *TIMP3* o 38.5 % ($p < 0,01$) v porovnaní s kontrolnou skupinou; vyššia dávka škorice však bola menej účinná (zníženie o 10 % oproti kontrole, $p > 0,05$). Porovnanie medzi kontrolnou a liečenou skupinou nepreukázalo žiadne významné rozdiely v celkovej metylácii promótorových oblastí génov *PITX2*, *RASSF1* a *PTEN*. Vo všetkých troch prípadoch sa však zistili zjavné tendencie k poklesu špecifických parametrov.

Metylačný status génových promótorov



Skratky: CIN, *Cinnamomum zeylanicum* L (škorica); CONT, kontrola

Graf 1 Metylácia promótorovej oblasti génov *ATM*, *PITX2*, *RASSF1*, *PTEN* a *TIMP3* v mamárnom karcinóme v animálnom modeli potkana. U každého analyzovaného génu (*ATM*, *PITX2*, *RASSF1*, *PTEN* a *TIMP3*) bola kvantifikovaná úroveň metylácie CpG ostrovčekov v kontrolnej a v liečených skupinách. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetické priemery \pm SEM, signifikantný rozdiel * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs. kontrole a # $P < 0,05$ vs. cin 0,1.

Diskusia

Pokles v expresii tumor supresorových génov ako sú *ATM*, *PITX2*, *RASSF1*, *PTEN* a *TIMP3* je často pozorovaným fenoménom v klinických [10] ako aj v predklinických štúdiách [11] zameraných na mamárnu karcinogézu. Molekulárnou analýzou metylačného statusu CpG ostrovčekov situovaných v promótorových oblastiach vyššie uvedených génov sme zaznamenali pokles v metylácii génov *ATM* a *TIMP3* v nádorovom tkanive potkana po chemopreventívnej intervencii škoricom. V prípade génu *TIMP3* sme zaznamenali signifikantný pokles len v skupine s najnižšou dávkou škorice v potrave (0.1 %), pričom v prípade vyššej dávky (1 %) sme nezaznamenali žiadny významný rozdiel. Bez hlbšej molekulárnej intervencie je ťažké stanoviť, čo mohlo spôsobiť tento výsledok. Proces metylácie génov predstavuje komplexnú kaskádu udalostí a vyššia koncentrácia chemopreventívnej substancie mohla mať za

následok zmeny v týchto komplexných procesoch. Nižšia koncentrácia škoric znížila aktivitu DNMT zatiaľ čo vyššia koncentrácia rastlinnej substancie tieto mechanizmy na reguláciu DNMT aktivity blokovala. V inej štúdii naša skupina preukázala, že zmes fytochemikálií, ktoré sú obsiahnuté v tymiane (*Thymus vulgaris* L.) signifikantne znížila metylačný status génových promótorov génov *ATM*, *RASSF1*, *PTEN*, a *TIMP3* v animálnom modeli mamárnej karcinogenézy [11]. V našej podobnej experimentálnej štúdii sme potvrdili zníženú metyláciu promótorovej oblasti génu *RASSF1* po chemoprevenčii klinčekom (*Syzygium aromaticum* L.) v obdobnom animálnom modeli indukovanej mamárnej karcinogenézy [12]. V štúdiách iných autorov, potrava obohatená o černice, ktoré predstavujú bohatú zmes flavonoidov ako sú anthokyanidíny viedla k demetylácii promótorov tumor supresorových génov vrátane *WIF1*, *SOX17* a *GK1* v prekanceróznom modeli rakoviny hrubého čreva *in vivo* [13]. Iná štúdia, ktorá analyzovala chemopreventívny efekt černíc detekovala pokles v metylácii promótoru génu *Sfr4* v animálnom modeli rakoviny pažeráka [14].

Záver

V našej experimentálnej štúdii sme potvrdili signifikantný modulačný účinok škoric v rámci regulácie metylácie promótorových oblastí génov asociovaných s rakovinou v animálnom modeli mamárnej karcinogenézy u samíc potkana. Naše výsledky ukázali, že škorica predstavuje vhodnú potravinu, ktorej pravidelná konzumácia môže byť spojená so znížením rizika rozvoja malígneho ochorenia prsníka, najmä v populácii žien s vysokým rizikom vzniku rakoviny. Aj napriek pozitívnym výsledkom, ktoré sme získali v rámci našej štúdie sú potrebné ďalšie predklinické a najmä klinické štúdie zamerané na chemopreventívne účinky škoric v rozvoji rakoviny prsníka. Inovatívne klinické stratégie založené na individuálnom prístupe k pacientovi v rámci prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny predstavujú koncept, kde pravidelná konzumácia rastlinných funkčných potravín ako spôsob chemoprevenčie predstavuje ideálny spôsob na redukovanie rizika rozvoja malígnej transformácie.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 01/0136/19 a APVV-16-0021.

Literatúra

- [1] Jasek, *Biomolecules*. **2019**, 9/7:289.
- [2] Choudhari, *Frontiers in Pharmacology*. **2020**, 10:1614.
- [3] Ahmed, *Oncology letters*. **2019**, 18/1:487-498.
- [4] Guo, *Current pharmacology reports*. **2015**, 1/4:245-257.
- [5] Ferlay, *Int J Cancer*. **2019**, 144:1941-1953.
- [6] Radhi, *Prog Mol Biol Transl Sci*. **2016**, 144:539-562.
- [7] Aggarwal, *Biochemistry*. **2015**, 80/8:972-989.
- [8] Pouliot, *Anticancer research*. **2015**, 35/9:4569-4574.
- [9] Uramova, *EPMA J*. **2018**, 9/4:403-419.
- [10] Maleva Kostovska. *Pathol Oncol Res*. **2018**, 24/4:937-940.
- [11] Kubatka, *Int J Mol Sci*. **2019**, 20/7:1749.
- [12] Kubatka, *J Cell Mol Med*. **2017**, 21/11:2837-2851.
- [13] Wang, *Cancer Prev Res*. **2013**, 6/12:1317-27.
- [14] Huang, *Mol Carcinog*. **2016**, 55/11:1867-1875.

Vplyv *Cinnamomum zeylanicum* L. na expresiu vybraných parametrov nádorových kmeňových buniek v modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy *in vivo*

Líšková, A.¹, Samec, M.¹, Koklesová, L.¹, Vybohová, D.², Adamkov, M.³, Péč, M.⁴, Kubatka, P.⁴

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin
lisikova80@uniba.sk; peter.kubatka@uniba.sk

Abstract

The significant anti-cancer potential of phytochemicals, isolated or their mixtures in whole plant foods is currently increasing due to their abilities to modulate multiple cancer-associated pathways. Tumor stem cells represent a subpopulation of cells that play an important role in the process of carcinogenesis. Our experiment deals with the antineoplastic effects of *Cinnamomum zeylanicum* L. via a modulation of expression of selected markers of cancer stem cells (CD24, CD44, ALDH1A1, EpCAM) in the chemopreventive model of experimental mammary carcinogenesis in female rats. Experimental animals were divided into three groups: control group without chemoprevention, chemoprevention at a concentration of 0.1 % (CIN 0.1) and chemoprevention at a concentration of 1 % (CIN 1). Immunohistochemical analysis of treated rat tumor specimens showed a dose-independent significant decrease in CD24 expression by 40.5 % ($p < 0.001$) in CIN 0.1 and by 29 % ($p < 0.05$) in CIN 1 compared to the control group. In conclusion, our results showed a potential of *Cinnamomum zeylanicum* L., presumably based on synergic or additive effects of the phytochemicals of the whole plant foods, to affect the multistep process of mammary carcinogenesis via modulation of cancer stem cells.

Keywords: mammary carcinoma, rat, chemoprevention, phytochemicals, cinnamomum, cancer stem cells

Úvod

Zaradenie rakoviny prsníka medzi najčastejšie diagnostikované malígne ochorenia a jednu z hlavných príčin úmrtia v dôsledku rakoviny u žien [1, 2] zdôrazňuje urgentnú potrebu progresu v rámci liečby a tiež prevencie uvedeného ochorenia [3]. Nádorové kmeňové bunky predstavujú subpopuláciu buniek s možnosťou sebaobnovy a diferenciácie do rôznych typov nádorových buniek, ktoré sa významne podieľajú na procesoch karcinogenézy zahŕňajúcich nádorovú iniciáciu, promóciu ako aj progresiu, vznik metastáz či rezistencie na terapiu [4]. V prípade rakoviny prsníka bolo identifikovaných niekoľko bunkových markerov, ktoré vykazujú charakteristiky nádorových kmeňových buniek [5]. Izolované fytochemikálie alebo ich zmesi v rámci rastlinných funkčných potravín významne ovplyvňujú viaceré signálne dráhy asociované s procesom karcinogenézy [6, 7]. *Cinnamomum zeylanicum* L. (*C. zeylanicum*) je rastlina z čeľade *Lauraceae* [8], ktorej protinádorové účinky boli preukázané viacerými autormi [9, 10]. Protirakovinové účinky *C. zeylanicum* neboli doposiaľ v modeli rakoviny prsníka s použitím hlodavcov hodnotené. Zvierací model

dokáže imitovať dôležité signálne dráhy zapojené v procese mamárnej karcinogenézy u ľudí [11]. *In vivo* modely, ktoré predstavujú medzistupeň medzi *in vitro* a klinickými štúdiami preto zohrávajú v onkologickom výskume zásadný význam [12]. Na základe uvedeného sme sa rozhodli zhodnotiť vplyv *C. zeylanicum* na parametre nádorových kmeňových buniek v chemopreventívnom modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy samíc potkanov *in vivo*.

Materiál a metódy

Samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley (Charles River Germany) vo veku 32 - 36 dní v celkovom počte 75 ks boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca (teplota 23 ± 2 °C, relatívna vlhkosť 40 – 60 %, umelý svetelný režim svetlo/tma 12 : 12 h). Mamárna karcinogenéza bola indukovaná intraperitoneálnou aplikáciou chemokarcinogénu N-nitroso-N-methylurea (NMU, Sigma, Deisenhofen, Germany) v jednorazovej dávke 50 mg/kg hmotnosti zvieraťa v priemere v 42. postnatálnom dni. Chemoprevencia *C. zeylanicum* (kôra, Calendula, Nová Ľubovňa, Slovenská republika; krajina pôvodu - Indonézia) začala týždeň pred podaním karcinogénu a trvala 14 týždňov po podaní NMU. Fytosubstancia bola zapracovaná v potrave (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Nemecko). Zvieratá boli rozdelené do 3 skupín: kontrolná skupina bez aplikácie fytosubstancie (KONT), skupina s obsahom *C. zeylanicum* v potrave v nižšej koncentrácii (1 g/kg) (ŠKO 0.1) a skupina s *C. zeylanicum* v potrave vo vyššej koncentrácii (10 g/kg) (ŠKO 1). V závere (14. týždeň po NMU) experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Pri hodnotení protinádorového účinku *C. zeylanicum* u samíc potkanov sme sa zamerali na imunohistochemické stanovenie vybraných parametrov nádorových kmeňových buniek (CD24, CD44, ALDH1A1, EpCAM) v rámci reprezentatívnych oblastí nádorového tkaniva parafínových bločkov. Detekcia vybraných proteínov bola zrealizovaná nepriamou imunohistochemickou metódou pomocou komerčne dostupných protilátok. Imunohistochemické farbenie (Autostainer Link 48/Hermes/) prebehlo podľa odporúčaní výrobcu. Vizualizácia primárnych protilátok bola uskutočnená prostredníctvom sekundárneho detekčného systému (EnVision, Dual Link System-HRP, cat. No. K060911, Dako North America, Carpinteria, CA, USA) s použitím diaminobenzidín tetrahydrochloridu ako substrátu. Reprezentatívne oblasti rezov tkaniva boli nasnímané a analyzované pri 400-násobnom zväčšení (Olympus BX41N). Expresia proteínov bola kvantifikovaná ako priemerná percentuálna hodnota antigén pozitívnych oblastí v štandardných poliach (0,5655 mm²) nádorových "hot spot" oblastí. Morfometrická analýza digitálnych záberov bola uskutočnená za použitia softvéru QuickPhoto Micro, verzie 3.0 (Promicra, Praha, Česká republika). Antigén pozitívne oblasti boli vyhodnotené prostredníctvom fázovej analýzy so štandardnými prahovými hodnotami pre slabú, miernu a silnú intenzitu imunoreaktivity. Analyzovaných bolo minimálne 60 záberov na jeden skúmaný parameter. Experimenty boli schválené Etickou komisiou JLF UK (No. EK1860/2016) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. Ro-3239/15-221 a Ro-1640/17-221).

Výsledky

Za účelom zhodnotenia protinádorových účinkov *C. zeylanicum* v chemopreventívnom modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy sme analyzovali expresiu vybraných parametrov nádorových kmeňových buniek z tkanív mamárnych karcinómov potkanov *in vivo*. Naše výsledky preukázali signifikantné zníženie expresie CD24 o 40,5 % ($p < 0.001$) v skupine ŠKO 0,1 v porovnaní s kontrolnou skupinou a o 29 % ($p < 0.05$) v prípade ŠKO 1 v porovnaní s kontrolou (Graf 1). Reprezentatívne zábery

imunohistochemickej analýzy expresie CD24 ako parametra nádorových kmeňových buniek v mamárnych nádoroch potkanov so signifikantným rozdielom zaznamenaným po aplikácii *C. zeylanicum* zobrazuje Obrázok 1.

Diskusia a záver

Významné protinádorové účinky fytochemikálií sprostredkované ovplyvnením nádorových kmeňových buniek prostredníctvom signálnych dráh zapojených v mnohostupňovom procese karcinogenézy ako aj účinkom na mechanizmy apoptózy či rezistencie rakovinových buniek boli jasne preukázané v rámci rozsiahleho predklinického výskumu [13, 14]. V rámci zhubných ochorení prsníka je v klinickej praxi zavedených niekoľko parametrov nádorových kmeňových buniek ako markerov predikcie, prognózy či priebehu ochorenia [15]. V súvislosti s chemicky indukovanou mamárnou karcinogénou potkanov predstavujú CD24, CD44, EpCAM a ALDH1A1 vhodné parametre nádorových kmeňových buniek [16, 17]. Na základe porovnávacích predklinických onkologických štúdií sa predpokladá, že rastlinné funkčné potraviny (obsahujúce zmesi fytochemikálií) vykazujú lepšie protirakovinové účinky porovnaní s izolovanými fytochemikáliami [7]. Výsledky nášho experimentu preukázali významné zníženie expresie CD24 v nádoroch potkanov po aplikácii *C. zeylanicum* v oboch dávkach. V prípade predchádzajúcich štúdií sme zaznamenali významné zníženie expresie CD24 a CD44 ako aj zvýšenie expresie ALDH1A1 po aplikácii klinčeka [18], zníženie expresie CD44 a ALDH1A1 po aplikácii tymianu [19] a tiež zníženie expresie CD24 a EpCAM po aplikácii oregana [20] v nádorových tkanivách samíc potkanov v rovnakom modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy. Na základe doteraz publikovaných štúdií našej pracovnej skupiny je možné jasne poukázať na pozitívny vplyv rastlinných potravín resp. fytochemikálií na klinicky relevantné parametre nádorových kmeňových buniek prsníka. Na druhej strane klinický výskum zameraný na účinky fytochemikálií na nádorové kmeňové bunky v porovnaní s predklinickým hodnotením stagnuje. V tejto súvislosti sa klinické štúdie primárne zaoberajú mechanizmami syntetických liečiv ovplyvňujúcich vitalitu nádorových kmeňových buniek. Naše výsledky ako aj údaje iných autorov poukazujú na významné účinky fytochemikálií v modulácii nádorových kmeňových buniek v širokej škále typov rakoviny. Aktuálny nedostatok klinických štúdií hodnotiacich účinky rastlinných potravín resp. izolovaných fytochemikálií na mechanizmy asociované s nádorovými kmeňovými bunkami poukazujú na naliehavú potrebu dôkladného skúmania v rámci klinického výskumu [21-23].

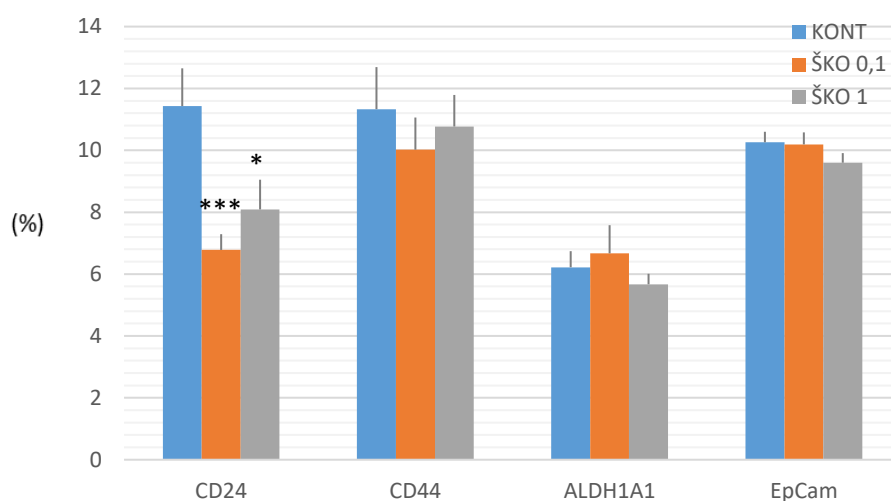
Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0136/19 a APVV-16-0021.

Literatúra

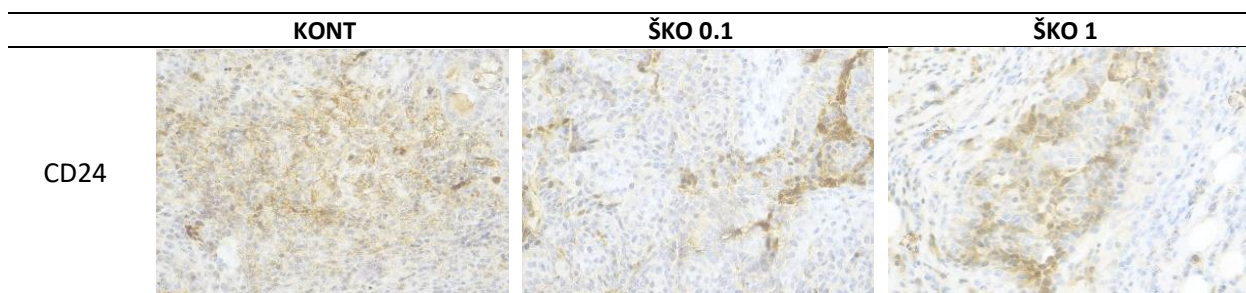
- [1] Bray, *CA Cancer J Clin.* **2018**, 68:394-424.
- [2] Ko and Moon, *J Cancer Prev.* **2015**, 20:223-231.
- [3] Feng, *Genes Dis.* **2018**, 5:77-106.
- [4] Crabtree, *Biomedicines.* **2018**, 6.
- [5] Gökmen-Polar, *Biomark Med.* **2011**, 5:661-671
- [6] Kane-Diallo, *Int J Cancer.* **2018**, 143:2168-2176.
- [7] Kapinova, *Biomed Pharmacother.* **2017**, 96:1465-1477.
- [8] Butt, *EXCLI J.* **2013**, 12:1043-1065.
- [9] Unlu, *Food Chem Toxicol.* **2010**, 48:3274-3280.
- [10] Chiang, *Antioxidants (Basel).* **2019**, 8.
- [11] Imaoka, *Radiat Res.* **2009**, 50:281-293.
- [12] Holen, *Dis Model Mech.* **2017**, 10:359-371.
- [13] Zhu, *Biochem Biophys Res Commun.* **2017**, 482:15-21.

- [14] Fu, *PLoS ONE*. **2014**, 9:e102535.
 [15] Shima, *Gland Surg*. **2017**, 6:82-88.
 [16] Rennó, *Toxicol Pathol*. **2015**, 43:400-410.
 [17] Levi, *Biochem Biophys Res Commun*. **2009**, 385:430-433.
 [18] Kubatka, *J Cell Mol Med*. **2017**, 21:2837-2851.
 [19] Kubatka, *Int J Mol Sci*. **2019**, 20.
 [20] Kubatka, *Eur J Nutr*. **2017**, 56:1303-1316.
 [21] Oh, *Toxins (Basel)*. **2016**, 8.
 [22] Dandawate, *Semin Cancer Biol*. **2016**, 40-41:192-208.
 [23] Liskova, *Molecules*. **2019**, 24.

Pozitívne bunky karcinómu



Graf 1 Imunohistochemické hodnotenie exprese parametrov nádorových kmeňových buniek CD24, CD44, ALDH1A1 a EpCAM v mamárnych nádorových bunkách potkanov po aplikácii *C. zeylanicum*. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetické priemery \pm SEM. Signifikantný rozdiel, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs. KONT.



Obr. 1 Reprezentatívne zábery imunohistochemickej analýzy parametra nádorových kmeňových buniek CD24 so zaznamenaným signifikantným rozdielom po aplikácii *C. zeylanicum* v chemopreventívnom modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy samíc potkanov. Zväčšenie 400x.

Import extracelulárnych proteínov ľudskými neuroblastómovými a astrocytómovými bunkami

Murín, R.¹, Gondáš, E.¹, Pokusa, M.², Baranovičová, E.²

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed, Divízia neurovedy, Martin
radovan.murin@uniba.sk

Abstract

The amino acids are essential for sustaining the growth and division of cancer cells. We hypothesize, that in addition to the incorporation of free amino acids present in extracellular fluids into their metabolism, the cancer cells possess also the capability to increase the availability of amino acids by importing and hydrolysing of the intact proteins from their milieu. Therefore, we tested the capability of human neuroblastoma cells to import the fluorescently labelled albumin from their culture media. The albumin import was tracked by fluorescent microscopy and fluorescence intensity changes in incubation media and cell lysates. Indeed, our results clearly show, that the human neuroblastoma cells potently remove fluorescently labelled albumin from culture media and the accumulation of the fluorescence in the subcellular organelles. Therefore, we may conclude that extracellular proteins could contribute to the overall metabolism of amino acids by cancer cells.

Keywords: cancer cell, metabolism, essential amino acid, protein

Úvod

Jednou zo základných charakteristických čŕt nádorových buniek je ich schopnosť nekontrolovaného delenia [1, 2]. Rast a delenie buniek sú procesy, ktoré sú úzko previazané s bunkovým metabolizmom [3]. V prípade nádorových buniek je bunkový metabolizmus pozmenený, pričom dochádza k jeho preprogramovaniu [2], ako dôsledku jeho adaptácie na zabezpečenie metabolicky a energeticky náročných anabolických procesov syntézy bunkových proteínov, lipidov, ako aj nukleotidov. Zvýšené energetické nároky nádorových buniek sú zabezpečované nárastom tvorby ATP prostredníctvom zvýšenia glykolytického metabolizmu glukózy v cytosole [4]. Vzostup intenzity energetického metabolizmu a anabolických procesov v nádorových bunkách je závislý od dostupnosti substrátov a ich transmembránového transportu. Glukóza je hlavným substrátom pre energetický metabolizmus buniek, prekursorom pre syntézu sacharidov a neesenciálnych metabolitov derivovaných z uhlíkovej kostry glukózy, ako aj zdrojom elektrónov nevyhnutným pre priebeh redukčných reakcií. Ale aj dostupnosť a následný bunkový metabolizmus aminokyselín sú nevyhnutné podmienky pre zachovanie rastu a delenia nádorových buniek [5].

Aminokyseliny majú niekoľko nenahraditeľných úloh pre zachovanie bunkového metabolizmu. Aminokyseliny sú substrátmi pre rôznorodé metabolické a signálne procesy, ako sú proteosyntéza, anaplerotický metabolizmus, syntéza nukleotidov či lipidov, ale aj epigenetická regulácia expresie génov. V neposlednom rade, bunky môžu využiť aminokyseliny aj ako alternatívne substráty pre zachovanie ich energetického metabolizmu [5].

Ľudské bunky majú schopnosť syntetizovať uhlíkovú kostru neesenciálnych aminokyselín, ktoré tvoria takmer polovicu z celkového počtu proteinogénnych aminokyselín. Väčšina proteinogénnych aminokyselín sú pre ľudské bunky esenciálne,

to znamená, že ich nedokážu syntetizovať vôbec alebo len v nedostatočnej miere. Celkové množstvo esenciálnych aminokyselín v bunkách je dôsledkom súbežného pôsobenia niekoľkých procesov, pričom okrem obmedzeného poolu voľných aminokyselín a ich 2-oxo derivátov, bunky obsahujú aj esenciálne aminokyseliny viazané v proteínoch a peptidoch. Primárne je obsah esenciálnych aminokyselín v bunkách determinovaný ich koncentráciou v extracelulárnom priestore a bunkovou kapacitou ich trans-membránového transportu, ale tiež ich prítomnosťou v endogénnych proteínoch a peptidoch, ako aj bunkovou kapacitou ich inkorporácie do intermediárneho metabolizmu.

V organizme, v extracelulárnom priestore sú okrem voľných aminokyselín prítomné aj proteíny a peptidy, ktoré by mohli predstavovať ďalší zdroj aminokyselín pre nádorové bunky [6]. V prípade nádorových buniek pankreasu sú extracelulárne proteíny importované pomocou makropinocytózy do vnútrobunkového priestoru a inkorporované do metabolizmu, pričom stimulujú ich rast [6, 7].

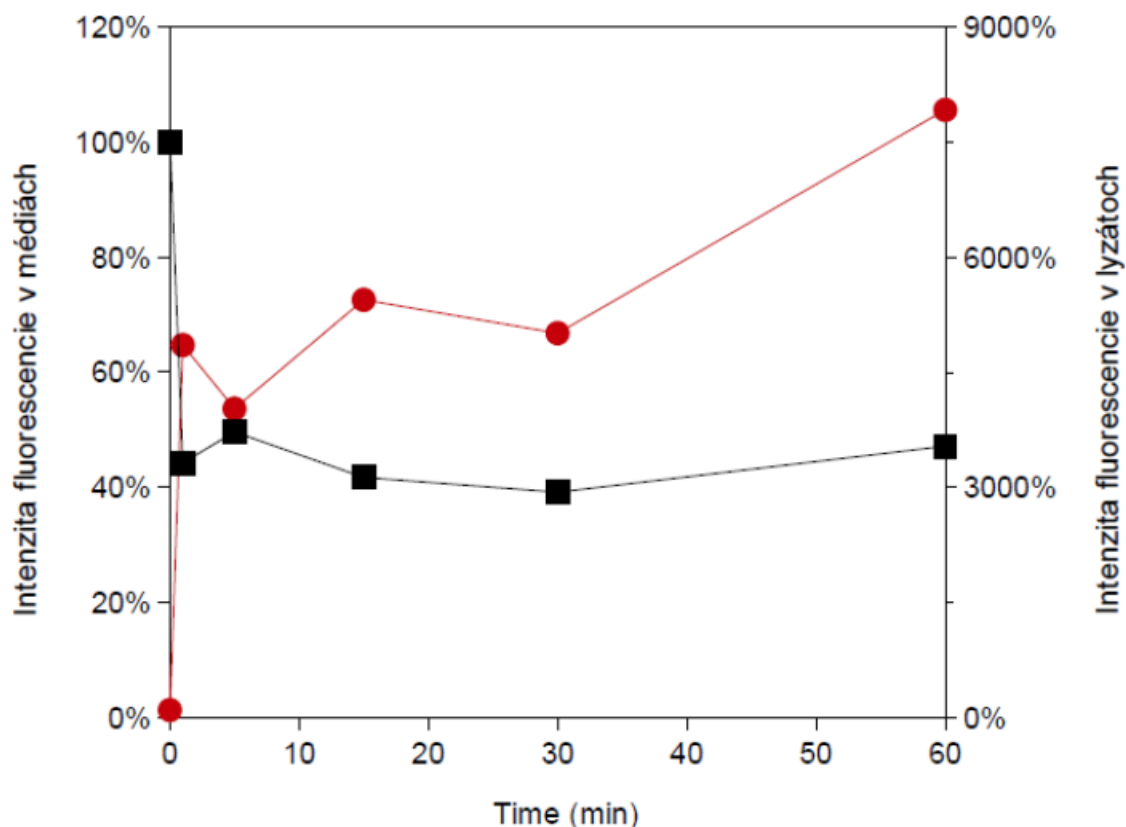
S cieľom overiť možnosť, že ľudské neuroblastómové a astrocytómové bunky sú schopné vychytávať extracelulárne proteíny a následne ich využívať ako zdroj aminokyselín pre ich metabolizmus sme pomocou fluorescenčnej mikroskopie sledovali inkorporáciu fluorescenčne značeného albumínu v bunkách. Spektrofluorimetricky sme stanovili zmeny intenzity fluorescencie albumínu v bunkových médiách a lyzátoch v závislosti od času inkubácie. Naše výsledky poukazujú na schopnosť ľudských neuroblastómových buniek vychytávať albumín z inkubačného média, ktorý je následne lokalizovaný intracelulárne a inkorporovaný do vezikulárnych vnútrobunkových štruktúr. Okrem toho je pravdepodobné, že neuroblastómové a astrocytómové bunky by mohli získavať aminokyseliny aj hydrolýzou extracelulárnych proteínov.

Materiál a metódy

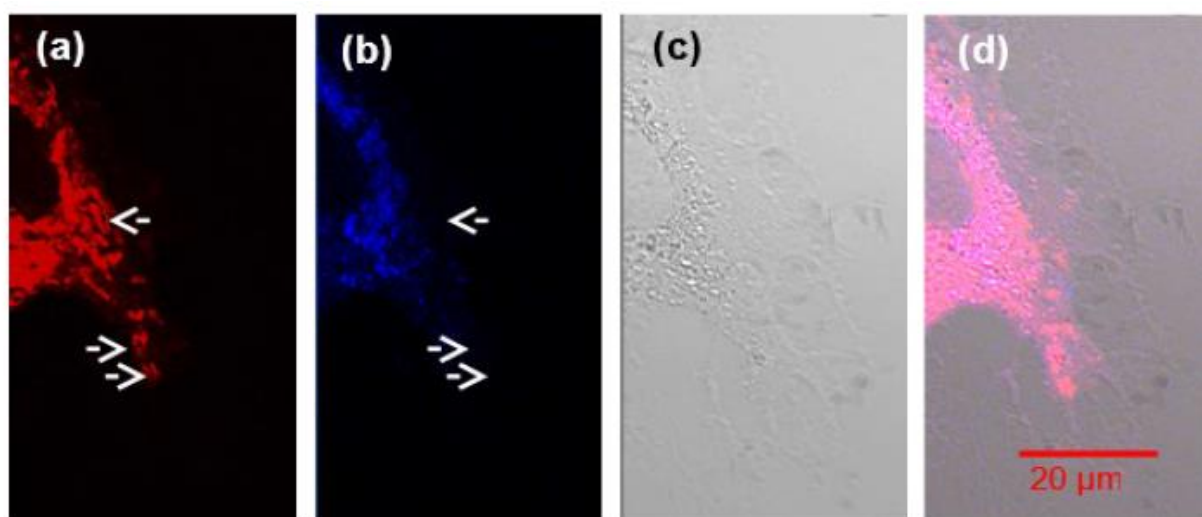
Bunky ľudskej neuroblastómovej línie SHSY-5Y a astrocytómovej línie SW1088, boli štandardne inkubované podľa pokynov dodávateľa (Sigma-Aldrich). Pred inkubáciou s fluorescenčne značeným albumínovým komplexom, bunkové médium bolo zamenené za DPBS s prídavkom fluorescenčného albumínového komplexu. Dva typy fluorescenčných albumínových komplexov boli pripravené a to kovalentným naviazaním Uniblu A (Sigma-Aldrich) alebo fluoresceínizotiokyanátu (FITC; Sigma-Aldrich) fluorochrómu. Vzniknuté komplexy boli separované od nezreagovaného fluorochrómu pomocou precipitácie s acetónom. Bunky v médiu s pridaným fluorescenčne značeným albumínom boli vizualizované pomocou konfokálneho fluorescenčného mikroskopu LSM 880 NLO (Carl Zeiss AG). Mitochondrie v bunkách boli vizualizované pomocou fluorescenčnej próby MitoTracker RED (Thermo Fisher Scientific). Zmena intenzity fluorescencie v bunkových médiách a lyzátoch SHSY-5Y buniek bola meraná pomocou spektrofluorometra Synergy.

Výsledky

Pre overenie možnosti, že ľudské neuroblastómové bunky majú kapacitu vychytávať proteíny zo svojho okolia sme do inkubačného média SHSY-5Y buniek pridali fluorescenčne značený albumínový komplex. Výsledky získané meraním intenzity fluorescencie FITC v médiách a bunkových lyzátoch v rôznych časových intervaloch poukazujú na pokles fluorescencie FITC v médiách a jeho súbežný nárast v lyzátoch získaných z neuroblastómových buniek (Graf 1). S cieľom identifikovať, či nárast fluorescencie FITC konjugovaného s albumínom súvisí s jeho importom



Graf 1 Zmeny intenzity fluorescence albumínového konjugátu s FITC počas inkubácie v prítomnosti ľudských neuroblastómových buniek v bunkových médiách (■) a lyzátoch (●). DPBS médium bolo obohatené o konjugát albumínu s FITC a intenzita fluorescence FITC bola meraná pomocou spektrofluorometra SYNERGY. Hodnoty fluorescence v čase 0 min sú považované za 100 %.



Obr. 1 Prítomnosť kovalentného komplexu albumínu s Uniblue A v ľudských astrocytómových bunkách SW 1088. Bunky boli inkubované 15 min. v prítomnosti fluorescenčného markeru mitochondrií MitoTracker RED (a) a kovalentného komplexu albumínu s chromofórom Uniblue A (b). Mikrograf identickej časti bunky zobrazenej v častiach (a) a (b) pozorovanej pri fázovom kontraste (c) a ich spoločný prekryv (d).

intracelulárneho priestoru, astrocytómové bunky boli počas inkubácie s fluorescenčne značeným albumínom pozorované pomocou fluorescenčnej mikroskopie (Obr. 1). Pozorovaný fluorescenčný signál, zodpovedajúci prítomnosti albumínu (Obr. 1b, d) bol lokalizovaný v intracelulárnych vezikulách, ktoré sa tvarom a intracelulárnou lokalizáciou odlišovali od mitochondrií (Obr. 1a).

Diskusia

Biosyntetické reakcie tvorby proteínov, nukleových kyselín, lipidov a ďalších biomolekúl v rastúcich a deliacich sa nádorových bunkách sú závislé od dostupnosti ich substrátov. Aminokyseliny sú v organizme prítomné vo forme voľných molekúl, alebo vo forme proteínov a peptidov, kde sú navzájom pospájané peptidovou väzbou. Zatiaľ čo metabolizmus voľných aminokyselín nádorovými bunkami je intenzívne študovaný na rôznych úrovniach [5], možnosti získavania aminokyselín aj hydrolytickým štiepením extracelulárnych peptidov a proteínov nebola zatiaľ dostatočne preskúmaná [6, 7]. Schopnosť ľudských neuroblastómových buniek importovať extracelulárne proteíny do vnútrobunkových kompartmentov poukazuje na možnosť ich následného využitia, ako ďalšieho zdroja aminokyselín. Naše výsledky sú v súlade s výsledkami štúdie, ktorá identifikovala schopnosť nádorových pankreatických buniek inkorporovať aminokyseliny získané z extracelulárnych proteínov do svojho metabolizmu [7]. Naše pozorovanie je tiež v súlade s výsledkami našich predchádzajúcich metabolomických štúdií, kedy sme pomocou $^1\text{H-NMR}$ analýzy pozorovali nárast koncentrácie esenciálnych aminokyselín v inkubačných médiach [8, 9], pričom ľudské nádorové bunky, tak ako aj ostatné ľudské bunky, nemajú schopnosť syntetizovať esenciálne kyseliny.

Záver

Schopnosť ľudských neuroblastómových SH-SY5Y a astrocytómových SW1088 buniek importovať extracelulárne proteíny do bukového priestoru je predpokladom pre následnú hydrolýzu importovaných proteínov na aminokyseliny, ktoré by mohli byť následne inkorporované do metabolizmu nádorových buniek. Preto je možné predpokladať, že endocytóza proteínov poskytuje nádorovým bunkám alternatívny spôsob získavania aminokyselín pre zachovanie ich metabolizmu. Tieto výsledky môžu napomôcť nie len pri ďalšom štúdiu metabolizmu nádorových buniek, ale tiež pri vývoji terapeutických, hlavne farmakologických, intervencií pri nádorových ochoreniach, ktoré sú založené na inhibícii metabolizmu nádorových buniek.

Táto práca bola podporená grantmi: VEGA 1/0255/20, APVV-18-0088, Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky 2018/13-UKMTO-9; a projektom "Centrum excelentnosti pre výskum v personalizovanej terapii (CEVYPET)", ITMS kód: 26220120053, spolufinancovanými zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Hanahan and Weinberg, *Cell*. **2000**, 100:57-70.
- [2] Hanahan and Weinberg, *Cell*. **2011**, 144:646-674.
- [3] Locasale and Cantley, *Cell Metab.* **2011**, 14:443-451.
- [4] Liberti and Locasale, *Trends in biochemical sciences*. **2016**, 41:211-218.
- [5] Lieu, *Experimental and molecular medicine*. **2020**, 52:15-30.
- [6] Ha, *Front. Physiol.*, **2016**, 7:381.
- [7] Commisso, *Nature*, **2013**, 497:633-637.
- [8] Gondáš, *Drobnicov memoriál: 10. ročník*, **2019**, 37 s., ISBN 978-80-972752-6-6
- [9] Murín, *EMBO, Metabolism meets epigenetics*, **2019**, 156 s.

Immunocytochemická analýza expresie pyruvát karboxylázy v ľudských nádorových bunkách

Murín, R.¹, Gondáš, E.¹, Pokusa, M.², Bystrický, P.²

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed, Divízia neurovedy, Martin
murin@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Pyruvate carboxylase is an enzyme catalyzing the conversion of pyruvate to oxaloacetate and possesses the important anaplerotic role. The expression of pyruvate carboxylase was identified in several types of cancers, in which it is supposed to stimulate the growth and division of cancer cells. With the aim to investigate the expression of pyruvate carboxylase in human astrocytomas, glioblastomas and neuroblastomas we applied the immunocytochemical detection method. Our results reveal that all of the tested types of cancer cells express pyruvate carboxylase.

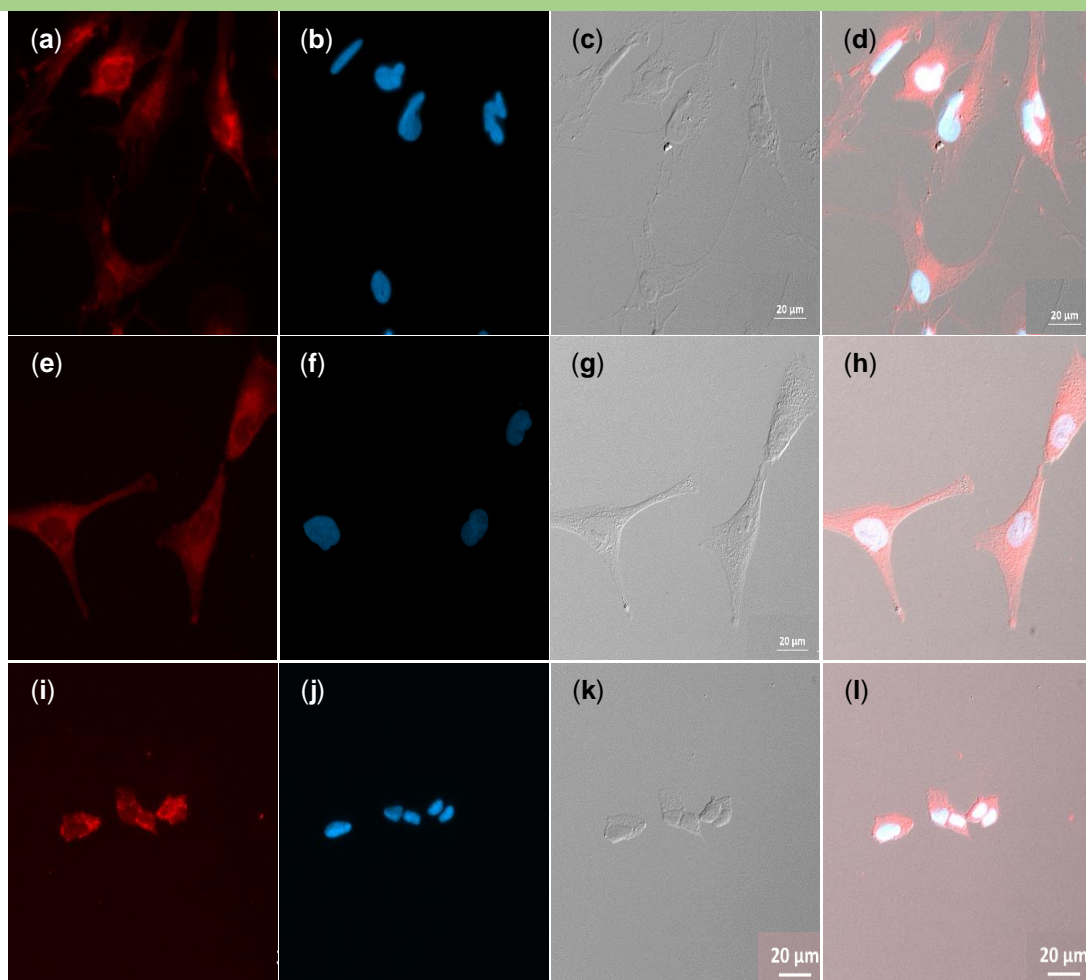
Keywords: cancer cell, metabolism, anaplerotic metabolism, pyruvate carboxylase

Úvod

Medzi základné charakteristické črty nádorových buniek patria ich autonómna stimulácia rastu a rezistencia k signálom inhibujúcich rast buniek [1, 2]. Tieto dve črty nádorových buniek úzko súvisia s transformáciou ich metabolizmu, dôsledkom ktorej je nárast anabolickej kapacity buniek [3]. Anabolizmus nádorových buniek je závislý od viacerých faktorov, medzi ktoré patrí aj dostupnosť substrátov. Nádorové bunky získavajú substráty pre syntézu makromolekulových látok buď importom z extracelulárneho priestoru, alebo vo forme medziproduktov intermediárneho metabolizmu. Aby bunka mohla využívať ako substráty pre anabolické deje aj medziprodukty Krebsovho cyklu a nedošlo k metabolickému kolapsu, ich koncentrácia v bunkách musí byť udržiavaná pomocou anaplerotických reakcií.

Anaplerotický metabolizmus zahŕňa procesy tvorby 2-oxoglutarátu, oxaloacetátu a sukcinyl-CoA, medziproduktov Krebsovho cyklu, ktoré vznikajú katabolizmom niektorých glukogénnych aminokyselín, mastných kyselín s nepárnym počtom uhlíkov, syntézy močoviny či enzymatickej premeny pyruvátu na oxaloacetát pomocou pyruvát karboxylázy (PC). V rámci metabolizmu väčšina typov nádorových buniek je katabolizmus glutamínu považovaný za jeden z najvyužívanejších spôsobov tvorby 2-oxoglutarátu, pričom bunky spôsobom glutaminolýzy získavajú aj molekuly obsahujúce redukovaný dusík, ktorý je esenciálny pre biosyntézu purínových a pyrimidínových báz či neesenciálnych aminokyselín [5, 6].

V nedávnej dobe boli získané poznatky, že v prípade rakovinových buniek epiteliálnych typov pľúcnych nádorov, anaplerotická úloha glutaminolýzy je suplementovaná, či dokonca nahradená aktivitou PC [7, 8]. V tomto prípade, inhibícia aktivity PC koreluje s poklesom vnútrobunkovej koncentrácie nukleotidov a neesenciálnych aminokyselín, ako aj rastom nádorov. Okrem buniek pľúcnych nádorov, PC bola identifikovaná aj v bunkách nádorov prsníka [9] a vaječníkov [10]. Expresia PC je bunkovo špecifická a indukateľná, pričom iniciácia expresie PC sa môže spolupodieľať na rozvoji rezistencie na proti-nádorové liečivá v prípade akútnej myeloidnej leukémie [11].



Obr. 1 Imunofluorescenčná detekcia prítomnosti pyruvát karboxylázy v ľudských astrocytómových (a, b, c, d), glioblastómových (e, f, g, h) a neuroblasómových (i, j, k, l) bunkách. Pyruvát karboxyláza prítomná v bunkách bola imunofluorescenčne značená pomocou primárnych polyklonálnych králičích protilátok anti-PC a následne s afinitne purifikovanými sekundárnymi protilátkami konjugovanými s Alexa Fluor 568 (a, e, i). Jadrá boli vizualizované pomocou interkalačného fluorochrómu DAPI (b, f, j). Fázovo kontrastné zobrazenie buniek (c, g, k) spolu s fluorescenčným signálom PC a jadier boli použité na vytvorenie spoločného prekryvového zobrazenia (d, h, l).

V mozgovom tkanive je PC prítomná v astrocytoch a pravdepodobne tiež v oligodendrocytoch, ependýmových a mikrogliových bunkách [12]. Na základe výsledkov experimentov na astrocytoch s mutovanou formou izocitrát dehydrogenázy, kedy došlo k nárastu aktivity PC [13] a pozorovaní, že mutovaná izocitrát dehydrogenáza je prítomná v značnej časti glioblastómov je možné predpokladať, že PC bude prítomná aj v prípade nádorových buniek derivovaných z gliocytov. S cieľom overiť náš predpoklad, sme použili metódu imunofluorescenčnej analýzy na detekciu prítomnosti PC v bunkách ľudských astrocytómových (SW1088), glioblastómových (A-172) ako aj neuroblastómových (SH-SY5Y) bukových línií.

Materiál a metódy

Ľudské bunkové línie astrocytómov (SW1088), glioblastómov (A-172) a neuroblastómov (SH-SY5Y) boli inkubované podľa pokynov dodávateľa (Sigma). Bunky boli pred experimentom vysadené do Petriho misiek s krycími sklíčkami, na ktorých boli uchytené bunky po dvojdnovej inkubácii fixované pomocou roztoku formaldehydu (4 % w/w) v PBS. Prítomnosť PC v bunkách bola testovaná imunofluorescenčne pomocou králičích polyklonálnych protilátok pripravených proti

PC a následne vizualizovaných pomocou sekundárnych protilátok s kovalentne naviazaných fluorochrómom Alexa Fluor 568. Negatívne kontroly boli pripravené vynechaním primárnych protilátok. Jadrá buniek boli vizualizované pomocou DAPI. Fluorescenčný signál bol zaznamenávaný pomocou mikroskopu Zeiss AxioObserver vybaveného detektorom typu Apotome a zdrojom fluorescence pre excitáciu HPX 120V (Zeiss). Špecifická zachytenia fluorescence emitovanej v modrom (DAPI) resp. červenom (Alexa Fluor 568) farebnom spektre a jej odlišenie bolo zabezpečené použitím zabudovaných relevantných svetelných filtrov.

Výsledky

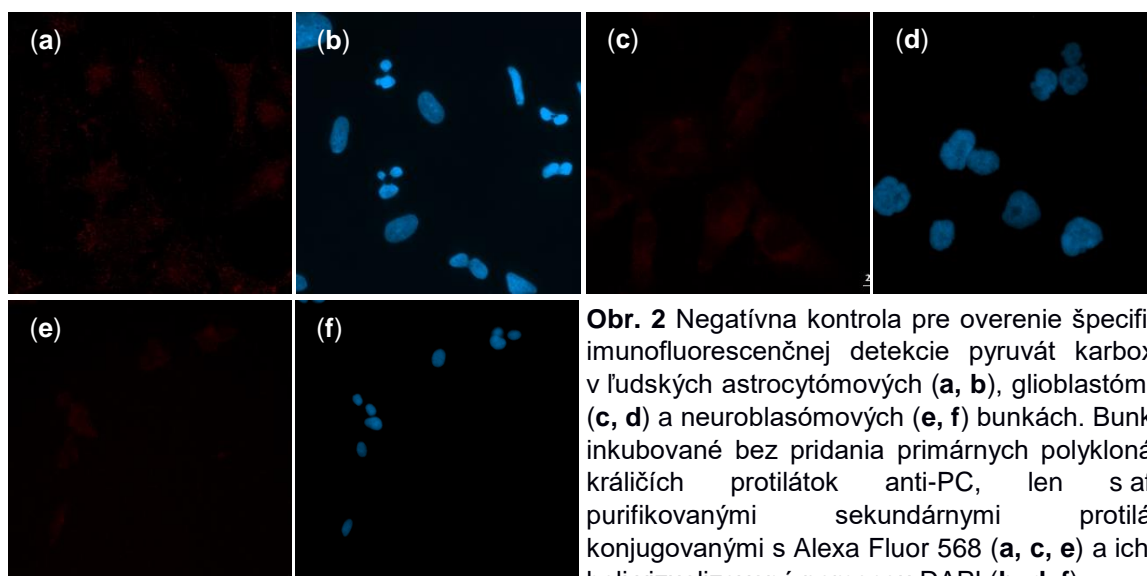
Polyklonálne králičie protilátky proti PC [12] v kombinácii so sekundárnymi protilátkami konjugovanými s Alexa Fluor 568 boli použité na imunofluorescenčnú detekciu exprese PC v bunkách ľudských nádorových línií. V bunkách všetkých testovaných línií, a to astrocytómov SW1088, glioblastómov A-172, ako aj neuroblastómov SH-SY5Y, pri pozorovaní pomocou fluorescenčnej mikroskopie bol viditeľný červený fluorescenčný signál, ktorý bol lokalizovaný v intracelulárnom priestore s najväčšou koncentráciou signálu v blízkosti bunkových jadier (Obr. 1). Celkový vzhľad fluorescenčného signálu a jeho zvýšená perinukleárna koncentrácia korešpondujú s prítomnosťou PC mitochondriách. Nakoľko, pozorovaný fluorescenčný signál bol viditeľný len v prípade použitia kombinácie primárnych a sekundárnych protilátok (Obr. 1) a nebol prítomný v bunkách, na ktoré boli aplikované len sekundárne protilátky (Obr. 2), preto je možné predpokladať, že pozorovaný fluorescenčný signál korešponduje s prítomnosťou PC v bunkách.

Diskusia

Pomocou metódy imunofluorescenčnej detekcie exprese proteínov sme identifikovali, že v ľudských astrocytómových, glioblastómových, ako aj neuroblastómových bunkách sa nachádza PC (Obr. 1).

PC je mitochondriálny enzým, ktorý katalyzuje syntézu oxaloacetátu z pyruvátu a CO_2 . Oxaloacetát je jeden z medziproduktov Krebsovho cyklu a za fyziologických podmienok je jeho syntéza pomocou PC jednou z najdôležitejších anaplerotických reakcií, ktorá sa spolupodieľa na zachovaní, ako aj regulácii širokého spektra biochemických, cytologických a fyziologických funkcií v organizme na všetkých jeho úrovniach [8]. Z biochemického pohľadu je resyntéza medziproduktov Krebsovho cyklu nevyhnutná pre zachovanie energetického metabolizmu ale aj anabolizmu lipidov, bielkovín a nukleových kyselín. Dôvodom je, že syntéza týchto makromolekúl je závislá od možnosti využívať špecifické medziprodukty Krebsovho cyklu ako svoje substráty, čo je spojené s poklesom celkovej koncentrácie medziproduktov Krebsovho cyklu. V prípade nedostatočnej anaplerotickej kapacity buniek by nedostatok medziproduktov Krebsovho cyklu viedol k inhibícii oxidačnej časti energetického metabolizmu, alebo k zastaveniu biosyntetických reakcií [14] s negatívnym dôsledkom na rast buniek [4, 8]. V protiklade s tým je stav, keď expresia a aktivita PC v bunkách sa zvýši. Dôsledkom toho sú zmeny na metabolickej ako aj signálnej úrovni, ktoré stimulujú rast a delenie nie len zdravých ale hlavne nádorových buniek [8, 15].

Naše pozorovanie, že oba typy glioblastómových buniek, A-172, obsahujú PC sú v súlade s predpokladanou expresiou PC v ľudských glioblastómových bunkách, ktorá bola predpokladaná na základe metabolomickej a RT PCR analýzy [13]. Usudzuje sa, že PC by mohla mať tiež dôležitú úlohu pre zachovanie metabolizmu glioblastómových buniek s mutovanou formou izocitrát dehydrogenázy. Tieto bunky produkujú 2-hydroxyglutarát z 2-oxoglutarátu, ktorý môže byť následne vylučovaný z buniek,



Obr. 2 Negatívna kontrola pre overenie špecifickosti imunofluorescenčnej detekcie pyruvát karboxylázy v ľudských astrocytómových (a, b), glioblastómových (c, d) a neuroblasómových (e, f) bunkách. Bunky boli inkubované bez pridania primárnych polyklonálnych králičích protilátok anti-PC, len s afinitne purifikovanými sekundárnymi protilátkami konjugovanými s Alexa Fluor 568 (a, c, e) a ich jadrá boli vizualizované pomocou DAPI (b, d, f).

pričom je tým iniciovaný pokles intracelulárnej koncentrácie 2-oxoglutarátu. Tento pokles 2-oxoglutarátu môže byť kompenzovaný stimuláciou anaplerotických reakcií, ktoré zahŕňajú aj syntézu oxaloacetátu pomocou PC [8].

Prítomnosť PC v astrocytómoch poukazuje na možnosť, že počas procesu malígnej transformácie astrocytov je zachovaná ich schopnosť expresie PC [12]. Expresia PC vo všetkých typoch študovaných nádorových bunkách je nevyhnutným predpokladom pre enzymatickú konverziu pyruvátu na oxaloacetát a získanie možnosti autonómnej anaplerotickej aktivity v nádorových bunkách. Tato skutočnosť by im mohla poskytnúť niekoľko metabolických výhod a tiež možnosť rýchlejšieho rastu a delenia.

Záver

Výsledky našich experimentov poskytujú dôkaz o prítomnosti pyruvát karboxylázy v ľudských astrocytómoch, glioblastómoch a neuroblastómoch. Tieto naše poznatky môžu napomôcť k lepšiemu poznaniu úlohy anaplerotického metabolizmu v nádorových bunkách, ako aj jeho pravdepodobného významu pre zachovanie či dokonca stimuláciu bunkového rastu a delenia.

Táto práca bola podporená grantmi: VEGA 1/0255/20, APVV-18-0088, Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky 2018/13-UKMTO-9; a projektom "Centrum excelentnosti pre výskum v personalizovanej terapii (CEVYPET)", ITMS kód: 26220120053, spolufinancovanými zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Hanahan and Weinberg, *Cell*. **2000**, 100:57-70.
- [2] Hanahan and Weinberg, *Cell*. **2011**, 144:646-674.
- [3] Locasale and Cantley, *Cell Metab.* **2011**, 14:443-451.
- [4] Ochoa-Ruiz and Diaz-Ruiz, *AJMB*. **2012**, 2:291-303.
- [5] DeBerardinis, *Cell Metab.* **2008**, 7:11-20.
- [6] Altman, *Nat Rev Cancer*. **2016**, 16:619-634.
- [7] Sellers, *J Clin Invest*. **2015**, 125:687-698.
- [8] Lao-On, *Journal of molecular medicine*. **2018**, 96:237-247.
- [9] Phannasil, *PLoS ONE*. **2015**, 10:e0129848.
- [10] Caneb, *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **2012**, 303:1036-1052.
- [11] Reed, *Cancer Met.* **2016**, 4:15.
- [12] Murín, *Neurochem Res*. **2009**, 34:480-489.
- [13] Izquierdo-Garcia, *PLoS ONE*. **2014**, 9:e108289.
- [14] Owen, *J Biol Chem*. **2002**, 277:30409-30412.
- [15] Leal-Esteban, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. **2020**, 1866:165715.

Vzájomný vzťah medzi SATB2 expresiou a MSI, COX-2, HIF-1 α v kolorektálnych karcinómoch

Cígerová, V. ¹, Drahošová, S. ², Dzuracký, J. ¹, Adamkov, M. ¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ² Hermes LabSystems, s.r.o., Bratislava
veronika.tupa@uniba.sk

Abstract

This study was designed to evaluate the expression of SATB2 protein in colorectal cancer (CRC) and its association with microsatellite instability (MSI) status, inflammation and hypoxia. SATB2 expression was observed by immunohistochemical analysis in 111 CRC samples. We assessed the correlation between SATB2 expression and clinico-morphological parameters, MSI, COX-2 and HIF-1 α expression. SATB2 was noticed in 92.8% CRC with nuclear localization in all positive cases. We observed predominantly strong immunoreaction intensity (67.6%) and percentage of SATB-2 positive cells in more than 50% of cells (87.4%). The statistically significant associations were recorded between high SATB2 expression and low grade, negative lymph nodes and negative vascular invasion. Statistical analysis confirmed a significant correlation between SATB2 expression and microsatellite stability, tendency to correlate with COX-2 and no significant correlation with HIF-1 α . In conclusion, SATB2 is overexpressed in CRC and its high expression is a marker of good prognosis. Moreover, SATB2 expression is significantly associated with microsatellite stability, there is tendency to correlate with pro-inflammatory COX-2 and there is no association with hypoxia.

Keywords: SATB2, microsatellite instability, COX-2, hypoxia, colorectal cancer

Úvod

Kolorektálny karcinóm (CRC) je celosvetovo treťou najčastejšou malignitou diagnostikovanou u mužov a žien a štvrtou hlavnou príčinou úmrtia na nádorové ochorenie [1]. Hoci CRC možno liečiť už v rannom štádiu, vyznačuje sa rýchlou progresiou, oneskoreným nástupom klinických príznakov a skutočnosť, že veľká časť prípadov je diagnostikovaná v pokročilom štádiu [2]. Väčšina úmrtí na CRC je spojená s inváziou a metastázovaním nádoru, je preto dôležité objasniť funkcie génov zapojených do progresie a invázie CRC [3].

SATB2 (z angl. Special AT-rich sequence binding-protein) predstavuje transkripčný faktor, ktorý sa špecificky viaže na adenín a tymín bohaté sekvencie DNA a následne reguluje transkripciu a remodelovanie chromatinu [3, 4]. Expresia SATB2 je tkanivovo špecifická a z epitelových buniek ho exprimujú iba žľazové bunky z dolnej časti gastrointestinálneho traktu [4]. V poslednej dobe sa spája čoraz viac aj s nádormi, a to hlavne s CRC, nádormi kostí, hlavy a krku [5, 6, 7]. Pri CRC je úloha SATB2 najviac preskúmaná, pričom slúži na jeho rozlíšenie od iných typov nádorov. Nadmerná expresia tohto proteínu v CRC sa spája s priaznivou prognózou a na druhej strane nízka expresia je asociovaná s metastázovaním a inváziou nádoru [3, 4, 5].

Podľa Eberharda a kol. mikrosatelitná instabilita (MSI) negatívne koreluje s expresiou SATB2 [8]. MSI predstavuje následok mutácií v mismatch reparačných (MMR) génoch, čo vedie k absencii detegovateľného génového produktu. Ak nie je exprimovaný MLH1 alebo MSH2, tak často nepozorujeme ani expresiu ich heterodimérnych partnerov

(PMS2 pre MLH1 a MSH6 pre MSH2) [9].

O'Connor a kol. pozorovali negatívnu koreláciu medzi SATB2 a cyklooxygenázou-2 (COX-2) [10]. COX-2 je enzým nadmerne exprimovaný v miestach zápalu a v niektorých nádoroch, vrátane CRC. Reguluje syntézu prostaglandínu E2 (PGE2) a zvyšuje karcinogézu CRC prostredníctvom indukcie bunkovej proliferácie a redukcie apoptózy [11, 12].

Nedostatočné zásobovanie buniek kyslíkom môže viesť k hypoxii [13]. Zmenou hladiny kyslíka dochádza k aktivácii alebo represii určitých génov, čo umožňuje prežívanie buniek napriek nestabilným podmienkam prostredia [14]. Jedným z týchto génov je hypoxiou-indukovaný faktor 1 (HIF-1), ktorého biologická funkcia je určená predovšetkým expresiou a aktivitou podjednotky HIF-1 α [15]. Jeho nadmerná expresia sa vyskytuje u mnohých nádoroch a koreluje so zlou prognózou [16].

Úloha SATB2 v CRC a jeho mechanizmus v karcinogéze sú stále nejasné, preto sme chceli obohatiť existujúce poznatky o výsledky našej štúdie. Cieľom tejto práce bolo analyzovať expresiu proteínu SATB2 u pacientov s CRC a korelovať ju so stavom MSI, pro-zápalovým enzýmom COX-2 a proteínom HIF-1 α spojeným s hypoxiou.

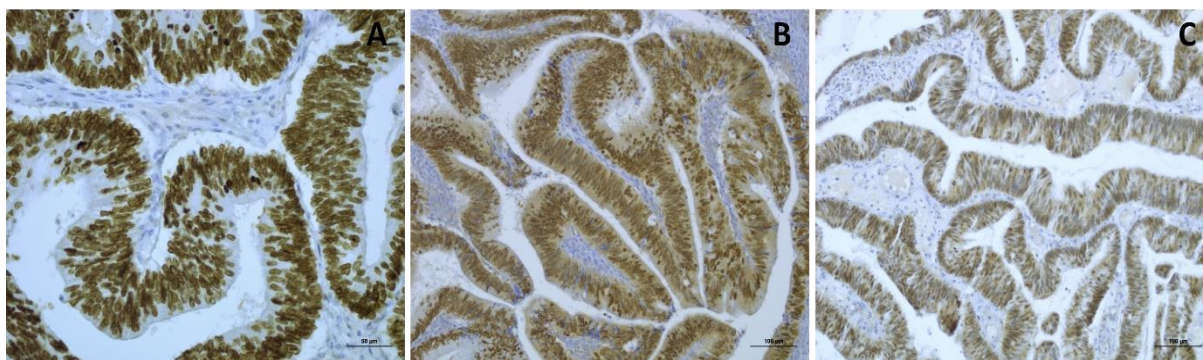
Materiál a metódy

V predloženej štúdii sme imunohistochemicky vyšetrili archívny parafrínový materiál zo 111 prípadov CRC. Z každej vzorky boli pripravené 4 μ m hrubé rezy. Na dôkaz proteínov SATB2, COX-2, HIF-1 α sme použili automat Ventana BenchMark® ULTRA (Roche) a MMR proteíny sme farbili ručne, pričom na deparafinizáciu, rehydratáciu a revitalizáciu antigénu sme využili PT Link (Pre-Treatment Module for Tissue Specimens, Dako). Protokol v automate pozostával z deparafinizácie, kondicionovania buniek s CC1 a inkubácie s UV Peroxidase Inhibitor. Ďalej nasledovala inkubácia s primárnou protilátkou (SATB2 – klon EP281, COX-2 – klon SP21, HIF-1 α – klon EP118). Vzorky boli následne inkubované s UV HRP Multimer, s UV DAB Chromogen, s UV DAB H₂O₂, s UV DAB Copper, s Hematoxylin a s Bluing Reagent. Pri ručnom farbení bol na vzorky po vytiahnutí z PT Linku aplikovaný peroxidázový blok a následne boli inkubované s primárnou protilátkou (MLH1 – klon ES05, MSH2 – klon FE11, MSH6 – klon EP49, PMS2 – klon EP51), s linkerom (len v prípade MSH2) a so sekundárnou protilátkou. Ďalej nasledovala vizualizácia DAB chromogénom a dofarbenie jadier Hematoxylínom. Pri interpretácii získaných imunohistochemických vyšetrení sme semikvantitatívne hodnotili intenzitu imunoreakcie a percento pozitívnych buniek. MSI sme pozorovali vo vzorkách CRC bez expresie MLH1, MSH2, MSH6 alebo PMS2 proteínov. Nádory s negatívnym MSI statusom sme považovali za MSS (mikrosatelitne stabilné) [8]. Štatistické hodnotenie bolo realizované pomocou testu Chi-square (χ^2) v softvéri R (verzia 3.2.3). Výsledky s p-hodnotou pod 0,05 boli považované za štatisticky signifikantné.

Výsledky

Proteín SATB2 bol exprimovaný v 92,8% prípadov CRC. Vo väčšine (67,%) vzoriek sme detegovali silnú pozitivitu imunoreakcie (Obr. 1). Prevládali prípady (87,4%), v ktorých bolo viac ako 50% pozitívnych buniek. Chi kvadrát test potvrdil signifikantné asociácie medzi klinicko-morfologickým parametrom grade s intenzitou imunoreakcie ($p=5,97E-05$) a percentom SATB2-pozitívnych buniek ($p=0,003$). Ďalej boli signifikantné vzťahy zistené medzi stavom lymfatických uzlín a intenzitou imunoreakcie ($p=0,017$). Signifikantne asociovala aj vaskulárna invázia s percentom pozitívnych buniek ($p=0,042$), pričom tendenciu ku korelácii sme zaznamenali aj s intenzitou imunoreakcie ($p=0,064$). Ostatné klinicko-morfologické charakteristiky

CRC (vek, pohlavie, stage, lokalizácia lézie) nekorelovali s imunohistochemickými parametrami expresie SATB2 ($p>0,05$). Tabuľka 1 sumarizuje výsledky z korelácie SATB2 expresie s MSI statusom a s proteínmi COX-2 a HIF-1 α .



Obr. 1 Expresia SATB2 v CRC so silnou (A), strednou (B) a slabou (C) intenzitou imunoreakcie vo viac ako 50% pozitívnych buniek.

Tab. 1 Korelácia expresie SATB2 a MSI statusom, COX-2, HIF-1 α v CRC.

Expresia SATB2	A	Intenzita imunoreakcie			Percento pozitívnych buniek		
		+	++	+++	11 – 25%	26 – 50%	>50%
MSI status (n=99)							
MSS	1	6	22	64	1	4	87
MSI	6	0	0	0	0	0	0
Hodnota p		p<0.001			p<0.001		
COX-2 (n=111)							
Pozitívne prípady	8	6	21	59	1	4	81
Negatívne prípady	0	0	1	16	1	0	16
Hodnota p		0.086			0.248		
HIF-1α (n=111)							
Pozitívne prípady	6	4	18	52	1	3	70
Negatívne prípady	2	2	4	23	1	1	27
Hodnota p		0.697			0.911		

Diskusia

V našej práci sme imunohistochemickou detekciou pozorovali expresiu proteínu SATB2 v 111 vzorkách CRC. V 92,8% pozitívnych prípadoch sme detegovali jadrovú expresiu, pričom väčšina vykazovala silnú intenzitu a pozitivitu vo viac ako 50% buniek. Predložené výsledky sú v súlade s viacerými štúdiami, ktoré zaznamenali rozsah jadrovej expresie SATB2 v CRC od 85 – 96,8% [8, 17, 18].

Štatistickou analýzou sme zaznamenali signifikantnú asociáciu medzi nižším gradingom a silnou intenzitou a vyšším percentom SATB2-pozitívnych buniek. Ďalej medzi negatívnymi lymfatickými uzlinami a silnou intenzitou a negatívnou vaskulárnou inváziou a vysokým percentom SATB2-pozitívnych buniek. Ďalšie klinicko-morfologické parametre (vek, pohlavie, stage, lokalizácia lézie) signifikantne nekorelovali s parametrami expresie SATB2. Na základe našich pozorovaní môžeme predpokladať, že vysoká expresia SATB2 je asociovaná s dobrou prognózou u CRC. Wang a kol. vo svojej štúdii zaznamenali signifikantné asociácie medzi expresiou SATB2 a metastatickým postihnutím lymfatických uzlín a stagingom [5]. Eberhard a kol. vo svojej práci detegovali signifikantné asociácie expresie SATB2 s T a N stagingom, gradingom a vaskulárnou inváziou [8]. Z týchto výsledkov rovnako ako z našich vyplýva, že vysoká expresia SATB2 je nezávislým dobrým prognostickým

faktorom u CRC.

Ďalej sme v našej štúdii pozorovali signifikantnú koreláciu expresie SATB2 s MSS, čo je v súlade s výsledkami Eberharda a kol. a Dasa a kol. [8, 19]. Podľa niektorých autorov 5-fluorouracil (liek, ktorý zlepšuje prežívanie počas CRC) negatívne ovplyvňuje nádory s MSI [20, 21]. Tieto zistenia naznačujú zvýšený prínos adjuvantnej terapie pre pacientov s CRC s vysokou expresiou SATB2 [8].

V progresii CRC môže zohrávať kľúčovú úlohu aj zápal [22]. Preto sme v našej práci študovali koreláciu medzi expresiou SATB2 a pro-zápalovým enzýmom COX-2. Podľa O'Connora a kol. SATB2 môže fungovať ako hlavný regulátor zápalu v hrubom čreve a strata expresie je signifikantne asociovaná s progresiou CRC [10]. Vo svojej štúdii pozorovali inverznú koreláciu medzi expresiou SATB2 a COX-2. V našej práci sme nezaznamenali žiadnu signifikantnú koreláciu medzi týmito proteínmi, ale existovala tendencia ku korelácii medzi intenzitou imunoreakcie SATB2 a expresiou COX-2.

Klinicko-patologický význam SATB2 a jeho potenciálny mechanizmus pri karcinogenéze a progresii CRC je stále nejasný [23]. V našej štúdii sme ako prví pozorovali asociáciu medzi expresiou SATB2 a hypoxiou indukovaným faktorom HIF-1 α . Hypoxia predstavuje dôsledok vysokej miery proliferácie nádorových buniek a je spojená s progresiou nádoru [24]. Medzi týmito proteínmi sme však nezaznamenali žiadne signifikantné korelácie.

Záver

Výsledky našej štúdie ukazujú, že SATB2 je v CRC nadmerne exprimovaný a jeho vysoká expresia je znakom dobrej prognózy. Proteín SATB2 je navyše signifikantne asociovaný s MSS, zaznamenali sme tendenciu ku korelácii s prozápalovým COX-2 a nepozorovali sme žiadnu asociáciu s hypoxiou. Na objasnenie možného mechanizmu, ktorým SATB2 ovplyvňuje progresiu CRC sú potrebné ďalšie štúdie.

Práca bola financovaná z grantu VEGA 1/0129/16 a UK/98/2016.

Literatúra

- [1] Arnold, *Gut*. **2017**, 66:683-691.
- [2] Jemal, *CA Cancer J Clin*. **2011**, 61:69-90.
- [3] Mansour, *FEBS J*. **2015**, 282:1394-1405.
- [4] Brocato and Costa, *Carcinogenesis*. **2015**, 36:186-191.
- [5] Wang, *J Pathol*. **2009**, 219:114-122.
- [6] Liu, *PLoS One*. **2012**, 7:e40704.
- [7] Seong, *Oncogene*. **2015**, 34:3582-3592.
- [8] Eberhard, *Br J Cancer*. **2012**, 106:931-938.
- [9] Kheirleiseid, *J Gastrointest Oncol*. **2013**, 4:397-408.
- [10] O'Connor, *J Clin Oncol*. **2018**, 36:3569-3569.
- [11] Sinicrope and Gill, *Cancer Metastasis Rev*. **2004**, 23:63-75.
- [12] Mahmoud, *Asian Pac J Cancer Prev*. **2014**, 15:6787-6790.
- [13] Wigerup, *Pharmacol Ther*. **2016**, 164:152-169.
- [14] Ziello, *Yale J Biol Med*. **2007**, 80:51-60.
- [15] Rankin and Giaccia, *Cell Death Differ*. **2008**, 15:678-685.
- [16] Chen, *Med Oncol*. **2014**, 31:304.
- [17] Dragomir, *Am J Clin Pathol*. **2014**, 141:630-638.
- [18] Lin, *Arch Pathol Lab Med*. **2014**, 138:1015-1026.
- [19] Das, *Cancer Res*. **2018**, 78:Abstract nr 698.
- [20] Ribic, *N Engl J Med*. **2003**, 349:247-257.
- [21] Kim, *J Clin Oncol*. **2007**, 25:767-772.
- [22] Yang and Pei, *World J Gastroenterol*. **2006**, 12:6741-6746.
- [23] Yu, *Scientific Reports*. **2017**, 7:10939.
- [24] Muz, *Hypoxia (Auckland, N.Z.)*. **2015**, 3:83-92.

Hodnotenie imunohistochemickej expresie cyclinu D1 (Bcl-1) v tkanive bazocelulárneho karcinómu kože

Bartoš, V.

Martinské bioptické centrum, s.r.o., Martin
vladim.bartos@gmail.com

Abstract

Background: Cyclin D1 is a nuclear protein that is required for the transition from G1 to S phase of the cell cycle. Objective: The goal of this study was to analyze an immunohistochemical expression status of cyclin D1 in cutaneous basal cell carcinoma (BCC) and to explain, whether there is a difference in the expression patterns related to the histologic tumor subtypes. Material and Methods: The study group comprised biopsy samples from 27 BCCs, that were investigated by anti-human cyclin D1 monoclonal antibody. Average percentage fraction of reactive neoplastic cells was ranked on a four-tiered semiquantitative scale: 0 – negative (< 1%), 1+ (1–10%), 2+ (11–50%), and 3+ (> 50%). Results: All BCCs were positive for cyclin D1. Grades 1+, 2+ a 3+ occurred in 4 cases (14.8%), 16 cases (59.3%), and 7 cases (25.9%). No apparent differences in the presence of given grades between aggressive and non-aggressive BCC phenotypes were observed, but the results were not statistically evaluated. Conclusion: Cyclin D1 is constantly expressed in neoplastic cells of cutaneous BCC. This study did not provide an evidence, that the extent of cyclin D1 expression might be related to histologic phenotype of BCC and hence might reflect the biological behaviour of cancer.

Keywords: basal cell carcinoma, cyclin D1

Úvod

Cyclin D1 (Bcl-1) je ubikvitárny jadrový proteín kódovaný génom CCND1, ktorý sa významne podieľa na regulácii bunkového cyklu [1]. Funkčne pôsobí ako regulačná podjednotka cyclin-dependentných kináz CDK4 a CDK5 a interaguje s tumor supresorickým génom Rb [1]. Aktivita cyclinu D1 je zásadná pre progresiu bunkového cyklu z G1 fázy do S fázy [2]. Počas G1 fázy dochádza k jeho rýchlej tvorbe a akumulácii v jadrách buniek. S následným prechodom do S fázy je rýchlo degradovaný [2]. V biopickej praxi predstavuje excelentný marker na hodnotenie rastovej frakcie a proliferatívneho stavu bunkovej populácie. Keďže mutácie a amplifikácie génu CCND1, ktoré sú následne sprevádzané nadmernou tvorbou cyclinu D1 v bunke boli pozorované pri mnohých malignitách, hodnotenie jeho expresie pomocou imunohistochemie slúži ako diagnostický aj prognostický marker pri viacerých zhubných nádoroch u ľudí [2]. Cieľom prezentovanej práce bolo kvantitatívne hodnotenie imunohistochemickej expresie cyclinu D1 v tkanive bazocelulárneho karcinómu (BCC) kože.

Materiál a metódy

Súbor zahrňoval bioptické vzorky 27 prípadov primárnych BCC získaných od 20 pacientov. Nádory zahrňovali 4 histopatologické podtypy: superficiálny (n = 5), nodulárny (n = 10), zmiešaný nodulárno-infiltratívny (n = 9) a infiltratívny (n = 3). Superficiálny a nodulárny podtyp boli považované za neagresívny (low-risk) fenotyp a infiltratívny a nodulárno-infiltratívny podtyp za agresívny (high-risk) fenotyp. Všetky

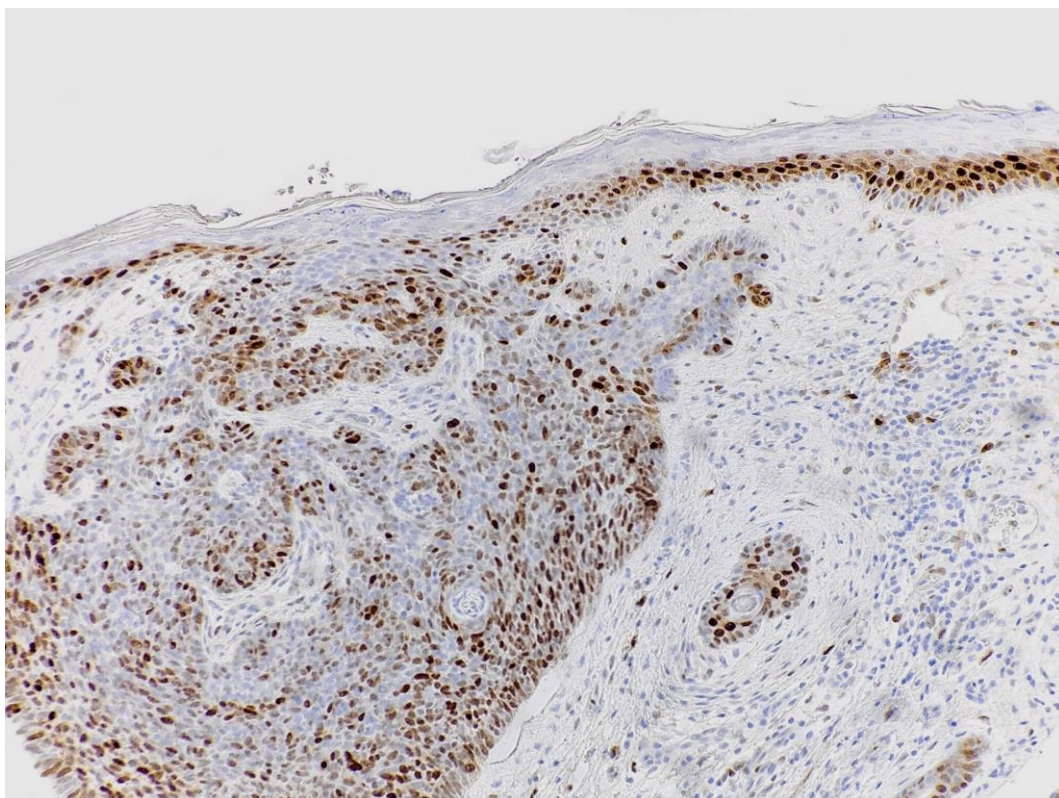
prípady boli imunohistochemicky vyšetrené monoklonálnou králičiou protilátkou proti ľudskému cyclinu D1 (klon EP12, DAKO, ready-to-use). Stanovená bola priemerná percentuálna frakcia nádorových buniek s jadrovým farbením a podľa autorov Liang a kol. [2] kategorizovaná v nasledovnej semikvantitatívnej škále: 0 – negatívny stav (< 1 % pozitívnych buniek), 1+ (1 – 10 % pozitívnych buniek), 2+ (11 – 50 % pozitívnych buniek) a 3+ (> 50 % pozitívnych buniek). Malé množstvo študovaných prípadov neumožňovalo štatistické vyhodnotenie súboru.

Výsledky

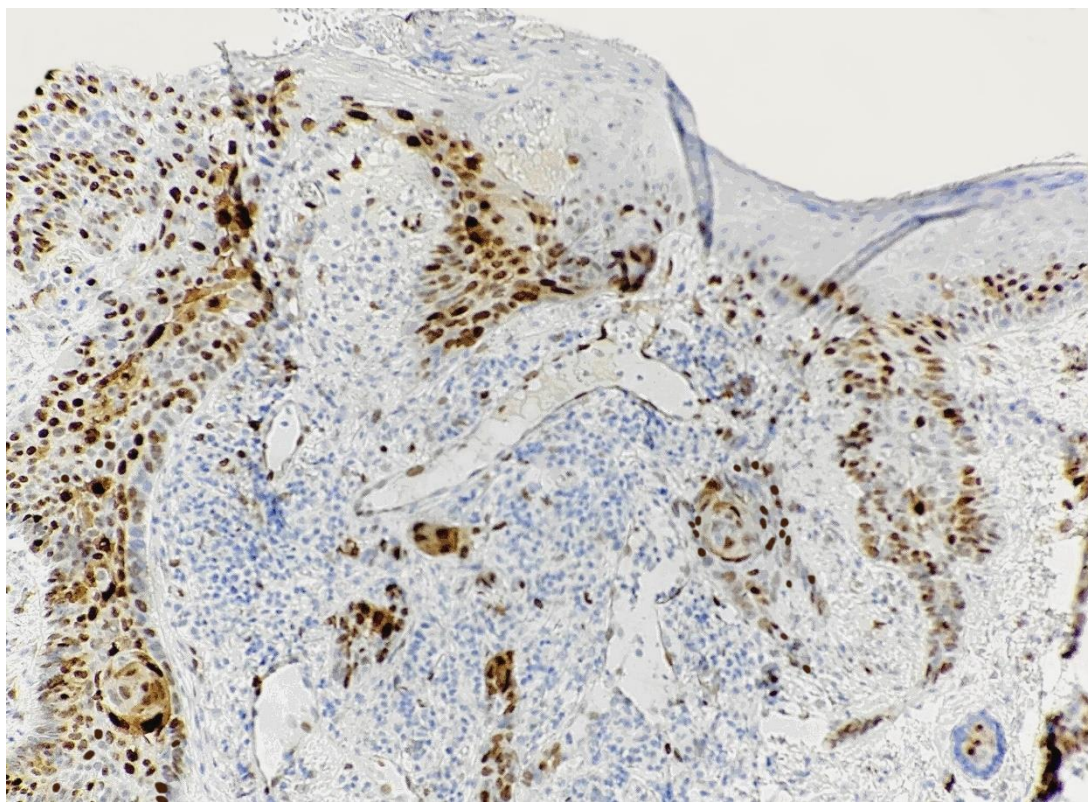
Všetky BCC boli imunohistochemicky pozitívne na uvedený marker. Cyclin D1 vykazoval strednú až výraznú jadrovú expresiu, ktorá varíovala v rozsahu 5 – 80 % nádorového tkaniva (priemerne 35 %). Semikvantitatívne stupne (grade) 1+, 2+ a 3+ sa vyskytovali v 4 prípadoch (14,8 %), 16 prípadoch (59,3 %) a 7 prípadoch (25,9 %). Subjektívne neboli pozorované výraznejšie rozdiely v zastúpení jednotlivých stupňov expresie medzi BCC s neagresívnym a agresívnym fenotypom, avšak výsledky neboli štatisticky spracované. Priestorová distribúcia cyclinu D1 v nádorom tkanive bola väčšinou nepravidelná a úseky s veľkým počtom nádorových buniek exprimujúcich tento marker sa často vyskytovali v blízkosti úsekov s veľmi nízkou až absentujúcou expresiou. V normálnej epiderme v blízkosti BCC, ktorá nevykazovala známky keratinocytovej dysplázie, sa vo všetkých prípadoch vyskytovala nukleárna expresia cyclinu D1. Imunoreaktívne keratinocyty boli prítomné v bazálnej a suprabazálnej vrstve a rozsahom nepresahovali 1/4 hrúbky epidermy. Zastúpenie jednotlivých stupňov expresie cyclinu D1 pri konkrétnych typoch BCC je sumarizované v Tabuľke 1 a ilustratívne imunohistochemické nálezy sú na Obrázkoch 1 a 2.

Tab. 1 Zastúpenie semikvantitatívnych stupňov (grade) expresie cyclinu D1 v histologických typoch BCC.

	grade 1+		grade 2+		grade 3+	
neagresívny fenotyp	2/15	(13,3 %)	10/15	(66,7 %)	3/15	(20,0 %)
- <i>superficiálny</i>	1/5		2/5		2/5	
- <i>nodulárny</i>	1/10		8/10		1/10	
agresívny fenotyp	2/12	(16,7 %)	6/12	(50,0 %)	4/12	(33,3 %)
- <i>nodulárno-infiltratívny</i>	2/9		4/9		3/9	
- <i>infiltratívny</i>	0/3		2/3		1/3	



Obr. 1 Jadrová expresia cyclinu D1 (grade 2+) v nodulárnom BCC. Viditeľná je tiež pozitivita v keratinocytoch bazálnej a suprabazálnej vrstvy priľahlej epidermy (zväčšenie 40x).



Obr. 2 Jadrová expresia cyclinu D1 (grade 3+) v infiltratívnom BCC. Taktiež je prítomná reaktivita aj v keratinocytoch bazálnej a suprabazálnej vrstvy intaktnej epidermy (zväčšenie 60x).

Diskusia

V prezentovanej štúdii autor analyzoval imunohistochemickú expresiu cyclinu D1 v bioptických vzorkách BCC kože. Zároveň revidoval štyri publikované práce zaoberajúce sa uvedenou problematikou [2-4], s ktorými porovnával vlastné výsledky. Napriek malému počtu hodnotených prípadov možno urobiť určité závery.

Po prvé, zo štúdie je zrejmé, že expresia cyclinu D1 je pri BCC kože konštantným nálezom. Toto pozorovanie sa nezhoduje s výsledkami niektorých autorov. Staibano a kol. [3] a Liang a kol. [2] potvrdili výskyt cyclinu D1-pozitívnych BCC iba v 56,7 % a 54,3 % všetkých prípadov. V ďalších dvoch prácach [4, 5] nie je možné toto zastúpenie objektivizovať, nakoľko v nich autori zahrňujú v najnižšom semikvantitatívnom stupni rozsah expzie 0 – 5 % resp. < 5 % pozitívnych buniek a teda sa nedá zistiť, koľko prípadov z tejto skupiny bolo úplne negatívnych.

Po druhé, v prezentovanej štúdii neboli pozorované výraznejšie rozdiely v zastúpení jednotlivých stupňov expzie cyclinu D1 medzi BCC s neagresívnym a agresívnym histologickým fenotypom. Podľa niektorých autorov [3, 5] však imunoreaktivita cyclinu D1 súvisí s histologickým typom resp. rastovým vzorom BCC kože. Staibano a kol. [3] porovnávali 30 BCC s neagresívnym a 30 BCC s agresívnym fenotypom. Pokým v prvej skupine sa jadrová expresia cyclinu D1 vyskytovala iba v 4 nádoroch (13,3 %), v druhej skupine bola prítomná vo všetkých prípadoch. Potvrdili, že nadprodukcia cyclinu D1 signifikantne koreluje s výskytom lokálnych recidív a/alebo nádorových metastáz. Aj Sivrikov a kol. [5] zistili štatisticky významné rozdiely medzi neagresívnymi (nodulárny typ) a agresívnymi (mikronodulárny typ, infiltratívny typ a bazoskvamózny karcinóm) variantami BCC, pričom expresia cyclinu D1 bola výraznejšia v druhej skupine. Z týchto výsledkov sa zdá, že hodnotenie imunohistochemickej expzie cyclinu D1 v tkanive BCC kože by mohlo byť sľubnou metodikou na identifikáciu podskupiny nádorov s horšou prognózou. Na druhej strane tureckí autori [4] nepotvrdili súvis expzie cyclinu D1 s histologickými charakteristikami BCC, čím sú výsledky podobné s prezentovanou prácou.

Po tretie, v prezentovanej štúdii bola vo všetkých prípadoch potvrdená imunoreaktivita cyclinu D1 v bazálnej a suprabazálnej vrstve príľahlej intaktnej epidermy. Tento nález je v kontradikcii s výsledkami iných autorov. Koseoglu a kol. [4] pozorovali expresiu cyclinu D1 v normálnej epiderme v blízkosti BCC len v približne polovici prípadov a Staibano a kol. [3] a Liang a kol. [2] ju dokonca nepotvrdili v žiadnom prípade. Tieto výsledky sú dosť prekvapujúce, keďže epiderma pozostáva z permanentne sa obnovujúcich keratinocytov, ktoré by vždy mali vykazovať určitý stupeň proliferácie. Diskrepancie možno vysvetliť napr. aj rozdielnou metodikou laboratórneho spracovania vrátane použitých protilátok, nakoľko vo všetkých publikovaných štúdiách (vrátane súčasnej) bol aplikovaný iný klon protilátky.

Záver

Cyclin D1 je konštantne exprimovaný v nádorových bunkách BCC kože. Z výsledkov uvedenej štúdie sa však nezdá, že by rozsah expzie súvisel s histologickým fenotypom BCC a tým by mohol reflektovať biologické správanie karcinómu.

Autor ďakuje Ing. Zuzane Kviatkovskej za edukačnú podporu týkajúcu sa imunohistochemického spracovania vzoriek.

Literatúra

- [1] John, *Indian J Dent Res.* **2017**, 28/2:187-192.
- [2] Liang, *Virchows Arch.* **2000**, 436/4:370-376.
- [3] Staibano, *Am J Clin Pathol.* **2001**, 115/6:805-813.
- [4] Koseoglu, *J Cutan Pathol.* **2009**, 36/9:958-965.
- [5] Sivrikoz, *Iran J Pathol.* **2015**, 10/3:185-191.

Tumor infiltrujúce lymfocyty v malígnych melanómoch

Škuciová, V.^{1, 4}, Výbohová, D.², Drahošová, S.³, Adamkov, M.⁴

¹Alphamedical s.r.o., DCP Banská Bystrica; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³ Hermes LabSystems, s.r.o., Bratislava;

⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
veronikaskuciova@gmail.com

Abstract

Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) are a local histopathological reflection of the host immune response against tumor cells. Currently, immune infiltrate have gained increasing scientific attention, however, a full picture of their role in cancer pathogenesis is still unclear. The present study aimed to reveal correlations between TIL grade and clinicopathological features of malignant melanomas. The presence of TILs was assessed from 56 patients with malignant melanoma as grade 0, 1+, 2+ and 3+ based on density and distribution. Lower TIL score correlates with higher age ($p = 0,006$) and poor prognostic clinicopathological parameters such as higher number of mitotic figures ($p = 0,005$) Clark's level ($p = 0,007$) and Breslow's depth ($p = 0,010$). Our results indicate that assesment of TIL density is a valuable prognostic marker that may be helpful in risk stratification in MM.

Keywords: malignant melanoma, Tumor infiltrating lymphocytes, microenvironment

Úvod

Zápalová celulizácia v mikroprostredí malígneho melanómu (MM) je pri histopatologickom vyšetrení pomerne často pozorovaný jav a predstavuje lokálnu imunitnú odpoveď organizmu na prítomnosť nádoru. Diagnosticky dôležité sú najmä tumor infiltrujúce lymfocyty (TILs), charakteristické spôsobom infiltratívneho šírenia do hniez nádorových buniek s ich disrupciou a/alebo lymfocyty s priamym kontaktom s melanómovými bunkami. Klinický význam nemá hodnotenie neinfiltroujúcich lymfocytov nachádzajúcich sa v okolí tumoru a hodnotenie prítomnosti polymorfonukleárov. Dôležité je tiež zohľadňovať rastovú fázu melanómu, nebrať do úvahy zápalovú celulizáciu pri skorom, radiálnom raste melanómu a hodnotiť ju iba pri vertikálnom raste [1-3].

Spôsob hodnotenia zápalovej infiltrácie sa v rôznych štúdiách líši. U malígneho melanómu je doporučený spôsob hodnotenia podľa Clarka, ktorý rozdeľuje TIL v MM na 3 kategórie – „absent“, „non-brisk“ a „brisk“. Výhodou tohto štýlu hodnotenia je pomerná jednoduchosť, dobrá reprodukovateľnosť, ale má však aj isté limitácie ako je absencia presných kritérií a nezohľadnenie prítomnosti lymfocytov v okolí lézie, ktoré neprenikajú do tumoru [3, 4].

Hodnotenie podľa „Melanoma Institute Australia“ (2012) je založené na 4-stupňovej škále – grade 0-3. Výhodou je presnejšia klasifikácia s ohľadom na rozsah infiltrácie a rovnako dobrá reprodukovateľnosť, nevýhodami zostáva nehodnotenie lymfocytov mimo nádoru, malé skúsenosti s týmto spôsobom hodnotenia a nedostatok dát s ohľadom na praktický a prognostický prínos [3].

CD8+ T bunky sú dominantnou súčasťou TILs a majú hlavnú úlohu v antitumoróznej imunite vďaka cytolytickej schopnosti a uvoľňovaniu cytokínov [5]. V našej práci sme hodnotili hustotu CD8+ T-lymfocytov v tumoróznom mikroprostredí v primárnych

i metastatických MM 4-stupňovým skórovacím systémom (Obr. 1). TILs grade sme následne korelovali s klinickými a histopatologickými vlastnosťami MM.

Materiál a metódy

Pacienti a vzorky

Náš súbor predstavoval 56 vzoriek malígnych melanómov od 53 pacientov štandardne spracovaných a zaliatych do parafrínových bločkov z archívu Diagnostického centra patológie Alphamedical s.r.o. v Martine. Súbor tvorilo 43 primárnych melanómov rôznych histologických typov (19 superficiálne sa šíriacich, 21 typu lentigo maligna, 1 dezmozplastický, 2 nodulárne), 2 bližšie nešpecifikované, 2 rekurentné a 5 metastáz do lymfatických uzlín alebo subkutáneho tuku. V ďalších 4 prípadoch nebolo možné rozlíšiť, či sa jedná o nodulárny melanóm alebo metastázu do hlbkej dermy, zaradili sme ich však do skupiny metastáz.

Spracovanie vzoriek

Parafrínové bločky boli narezané na hrúbku 4 μm a ofarbené hematoxylín-eozínom. Pri hodnotení sme použili svetelný mikroskop (Olympus CX31, China). Údaje o pacientoch (vek, pohlavie, lokalita MM) boli získané zo záverov histopatologického vyšetrenia. Rovnako aj ďalšie parametre (histologický typ, prítomnosť ulcerácie, pigmentu, počet mitotických figúr, hrúbka podľa Breslowa, level podľa Clarka), ktoré boli následne verifikované mikroskopickým vyšetrením.

Imunohistochemia

Po vybraní vhodných tkanivových blokov sme vykonali imunohistochemickú detekciu použitím Ventana BenchMark Ultra (Roche). Zápalový infiltrát bol vizualizovaný anti-CD8 protilátkou (SP57, Roche) použitím štandardných automatických metód. Ako chromogén bol naviazaný 3,3-diaminobenzidín (DAB). Nakoniec sme vzorky opäť hodnotili svetelným mikroskopom (Olympus CX31, China).

Kvantifikácia zápalovej odpovede

Intenzitu zápalu sme posudzovali semikvantitatívnou škálou 0 až 3+, pričom použitím imunohistochemickej detekcie antigénu CD8 bola dosiahnutá lepšia vizualizácia.

Grade 0 - absencia zápalu.

Grade 1+ - fokálne distribuovaný zápal, najmä na periférii, <5% tumoru.

Grade 2++ - zápal zasahuje 5-50 % tumoru.

Grade 3+++ - >50% tumoru, difúzne distribuovaný zápal so širokou infiltráciou.

Štatistická analýza

Následne bola štatisticky vyhodnotená korelácia medzi prítomnosťou TILs a inými klinickými a histopatologickými parametrami (vek, pohlavie, lokalita MM, histologický typ, prítomnosť ulcerácie, pigmentu, počet mitotických figúr, hrúbka podľa Breslowa, level podľa Clarka). Výsledky s p-hodnotou pod 0,05 boli považované za štatisticky významné.

Výsledky

Imunitný infiltrát (rôznej intenzity) bol pozorovaný v 47 prípadoch (47/56, 83,9 %), konkrétne grade 1 v 24 (42,6 %), grade 2 v 15 (26,8 %) a grade 3 v 8 prípadoch (14,3 %).

Z našich výsledkov vyplýva, že pacienti s vyšším TIL skóre v MM boli častejšie nižšieho veku ($p = 0,006$). Nižšie TIL skóre boli asociované s negatívnymi

prognostickými známkami ako sú vyšší počet mitóz ($p = 0,005$), vyšší Clark level ($p = 0,007$) a tiež väčšia hrúbka podľa Breslowa ($p = 0,010$). Medzi ďalšími sledovanými parametrami a prítomnosťou zápalového infiltrátu sa nenašla žiadna spojitosť. Korelácie medzi klinicko-histopatologickými parametrami a TILs v MM sú zhrnuté v Tab.1.

Tab. 1 Korelácia medzi klinicko-histopatologickými parametrami a TILs v MM.

	Tumour Infiltrating Lymphocytes					P-value
	Total No (%)	Absent	1+	2+	3+	
Age ($n = 56$) median (range)	61,5 (32-87)	72,8 (58 - 84)	62,2 (32 – 87)	58,7 (35 – 87)	55,6 (38 – 68)	0,006
Sex ($n = 56$)						
Male	30 (53,6)	5 (8,9)	12 (21,4)	8 (14,3)	5 (8,9)	0,647
Female	26 (46,4)	4 (7,1)	12 (21,4)	7 (12,5)	3 (5,6)	
Location ($n = 56$)						
Head and neck	8 (14,3)	1 (1,8)	4 (7,1)	3 (5,6)	0 (0)	0,390
Trunk	28 (50,0)	1 (1,8)	13 (23,2)	9 (16,1)	5 (8,9)	
Limbs	20 (35,7)	7 (12,5)	7 (12,5)	3 (5,6)	3 (5,6)	
Melanoma subtype ($n = 56$)						0,163
Superficial	19 (33,9)	0 (0)	10 (17,9)	6 (10,7)	3 (5,6)	
LMM	21 (37,5)	2 (3,6)	8 (14,3)	8 (14,3)	3 (5,6)	
Desmoplastic	1 (1,8)	0 (0)	1 (1,8)	0 (0)	0 (0)	
Nodular	2 (3,6)	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,8)	0 (0)	
Not otherwise specified	2 (3,6)	1 (1,8)	1 (1,8)	0 (0)	0 (0)	
Reccurent	2 (3,6)	0 (0)	2 (3,6)	0 (0)	0 (0)	
MTS	5 (8,9)	5 (8,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
MTS/Nodular	4 (7,1)	2 (3,6)	0 (0)	1 (1,8)	1 (1,8)	
Ulceration ($n = 51$)						
Present	12 (23,5)	2 (3,9)	6 (11,8)	1 (2,0)	3 (5,9)	0,679
Absent	39 (76,5)	3 (5,9)	17 (33,3)	14 (27,5)	5 (9,8)	
Clark ($n = 51$)						
I	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,007
II	11 (21,6)	0 (0)	3 (5,9)	6 (11,8)	2 (3,9)	
III	7 (13,7)	0 (0)	3 (5,9)	2 (3,9)	2 (3,9)	
IV	31 (60,8)	4 (7,8)	16 (31,4)	7 (13,7)	4 (7,8)	
V	2 (3,9)	2 (3,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Breslow (mm) ($n = 56$) median (range)						0,010
	3,5 (0,05 – 16)	9,8 (2,5 – 16)	2,4 (0,05 – 10)	3,8 (0,2 – 6)	2,5 (0,2 – 4,5)	
MF/1 mm2 ($n = 56$) median (range)						0,005
	9,2 (0-91)	24,2 (2 – 44)	6,2 (0 – 19)	2,2 (0 – 7)	14,25 (0-91)	
Pigment ($n = 56$)						
0	7 (12,5)	3 (5,6)	2 (3,6)	1 (1,8)	1 (1,8)	0,459
1	21 (31,7)	2 (3,6)	10 (17,9)	4 (7,1)	5 (8,9)	
2	20 (35,7)	3 (5,6)	11 (19,6)	5 (8,9)	1 (1,8)	
3	8 (14,3)	1 (1,8)	1 (1,8)	5 (8,9)	1 (1,8)	

Diskusia

Malígne melanómy sú často doprevádzané bohatou zápalovou celulizáciou. Hodnotenie jej rozsahu je súčasťou štandardného histopatologického vyšetrenia MM. Systémy hodnotenia TILs sú však nejednotné a je obtiažne formulovať ich presný prediktívny a prognostický význam. Denzný zápalový infiltrát je však vo väčšine štúdií spájaný s dobrou prognózou pacientov [5-10]. V ďalšej štúdii označujú absenciu TILs, popri ulcerácii, väčšej hrúbke podľa Breslowa a mužskom pohlaví, ako ďalší nezávislý parameter asociovaný s pozitívnou sentinelovou uzlinou [11]. Niektoré práce naopak spochybňujú prognostický význam TILs [5, 12]. Rozporuplné výsledky môžu byť vysvetlené heterogenitou zápalovej populácie, hodnoteným rôznych typov melanómov s rozdielnym stageom a tiež použitím rôzneho spôsobu skórovania [9].

Viaceré práce sa zaoberali asociáciou TILs s klinickými a histopatologickými parametrami [11, 13-18]. Naše závery odhalili asociáciu TILs s nižším vekom, na ktoré poukázali výsledky iných štúdií, čo môže byť následok nižšej aktivity imunitného systému vo vyššom veku [13, 18]. V súlade s našimi zisteniami boli i závery ďalších prác, ktoré definovali koreláciu medzi vyšším stupňom TILs v skorých fázach invázie (t.j. MM s nižšou hrúbkou podľa Breslowa a nižším stupňom invázie podľa Clarka) [11, 13] a s nižším počtom mitotických figúr [16, 17]. Naopak v štúdii Taylora a spol. nezistili žiadnu asociáciu TILs s mitotickou aktivitou [11]. Thomas a spol. spájal hustejší TIL infiltrát s častejšou prítomnou ulceráciou a výskytom v MM z lokality trupu a hornej končatiny, čo sa nezhodovalo s našimi výsledkami [18]. Táto práca okrem výhody rozsiahlejšej sledovanej skupiny MM používala i trojstupňový skórovací systém.

Hussein a spol. poukazujú v svojej práci na progresívnu tendenciu zvyšovania TIL skóre počas tumorigenézy ako odraz zvyšujúcej sa antigenicity MM v dôsledku hromadenia mutácií [12]. Progresia ochorenia napriek prítomnosti TILs je považovaná v imunológii za paradox. Bunky melanómu disponujú celým radom mechanizmom na supresiu antitumoróznej imunity a úniku spod imunitného dozoru [5]. Následne, po narušení imunitnej odpovede a rezignácii organizmu pozorujeme pokles až absenciu TIL infiltrátu v metastázach MM [5, 12]. Naše závery sú dôkazom tohto fenoménu, keďže až dve tretiny metastatických MM nesprevádzala žiadna zápalová celulizácia.

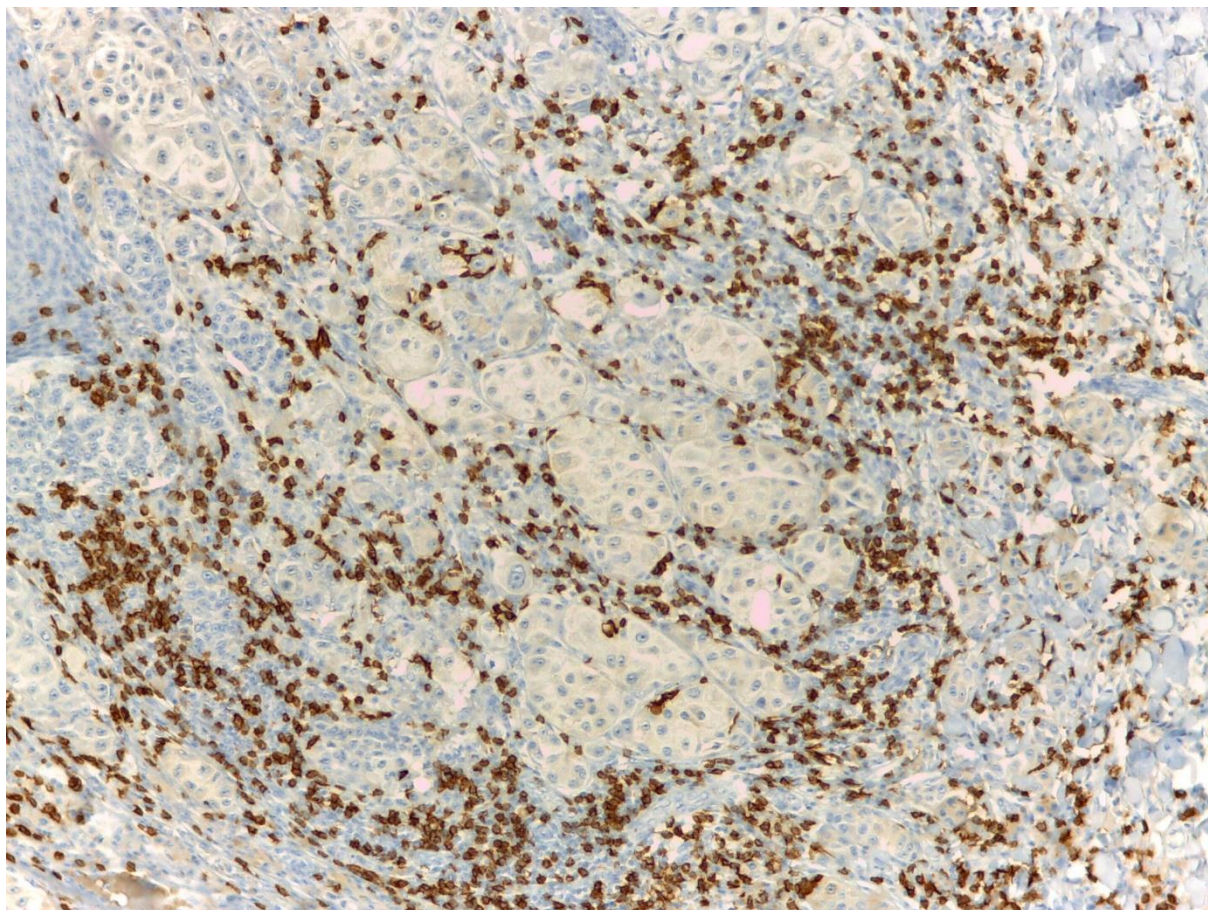
Záver

TIL infiltrát vzbudzuje v posledných rokoch záujem nielen kvôli prognostickému významu, ale aj jeho použitiu ako prediktívneho biomarkera predpovedajúceho odpoveď na imunomodulačnú liečbu, najmä inhibítormi kontrolných bodov. Tiež sa ukazuje ako vhodný terapeutický objekt, ktorý použitím vakcín, imunogénnych peptidov alebo imunizujúcich vektorov otvára nové možnosti personalizovanej terapie s cieľom indukovať vlastnú protinádorovú imunitu a potlačiť progresiu ochorenia [19].

Literatúra

- [1] Galon, *J Transl Med.* **2016**, 14:273.
- [2] Elder, *DC: American Registry of Pathology*, **2010**, 468 s., ISBN 1-933477-10-5
- [3] Dunder, *Ceskoslovenska Patol.* **2018**, 54/1:27-31.
- [4] Clark, *J Natl Cancer Inst.* **1989**, 81:1893-1904.
- [5] Antohe, *Oncol Lett.* **2019**, 17/5:4155-4161.
- [6] Neagu, *Adv Clin Chem.* **2012**, 58:89-140.
- [7] Mukherji, *Clin Dermatol.* **2013**, 31:156-165.
- [8] Schatton, *Methods Mol Biol.* **2014**, 1102:287-324.
- [9] Fu, *Oncoimmunology.* **2019**, 8/7:1593806.
- [10] Donizy, *Anticancer Res.* **2015**, 35/1:351-358.
- [11] Taylor, *J Clin Oncol.* **2007**, 25:869-875.
- [12] Hussein, *J Clin Pathol.* **2006**, 59:316-324.

- [13] Mandalà, *Eur J Cancer*. **2009**, 45/14:2537-2545.
- [14] Elder, *Cancer*. **1985**, 56:413-418.
- [15] Clemente, *Cancer*. **1996**, 77:1303-1310.
- [16] Azimi, *J Clin Oncol*. **2012**, 30:2678-2683
- [17] Grotz, *Melanoma Res*. **2013**, 23/2:132-137.
- [18] Thomas, *J Clin Oncol*. **2013**, 31/33:4252-4259.
- [19] Lee, *Pathol*. **2016**, 48/2:177-187.



Obr. 1 Tumor infiltrujúce lymfocyty vizualizované anti-CD8+ protilátkou v tumoróznom mikroprostredí MM, grade 3+ (100x zväčšenie).

Diskrepancie v klinickom a histopatologickom obraze – o dôvod viac na biopsiu

Péčová, T.¹, Sokol, J.², Plank, L.³, Péč, J.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Dermatovenerologická klinika, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika hematológie a transfuziológie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej anatómie, Martin
tpecova@gmail.com

Abstract

Dermatology and dermatohistopathology closely rely on each other, however, in some cases there can be a significant discrepancy between estimated diagnosis based on clinical picture and actual diagnosis corrected by the dermatopathological results. Authors present a case report of patient with cancer duplicity presenting with actinic keratoses and basal cell carcinomas, which were histologically re-evaluated as squamous cell carcinoma and mantle cell lymphoma.

Keywords: dermatopathology, squamous cell carcinoma, mantle cell lymphoma

Úvod

Dermatovenerológia patrí k odborom závislým od klinického aj histopatologického obrazu [1]. Dermatológia a dermatopatológia sú od seba závislé. Úspešnosť vyhodnotenia závisí od správnej voľby miesta biopsie, techniky biopsie a spracovania vzorky. V praxi klinický a histopatologický obraz často nekorelujú, môže sa jednať o diskrepancie v predpokladanom stupni závažnosti ochorenia alebo o úplne inú diagnózu. Stretávame sa s prejavmi vysoko malígnych ochorení skrývajúcich sa za benígny klinickú manifestáciu.

Materiál a metódy

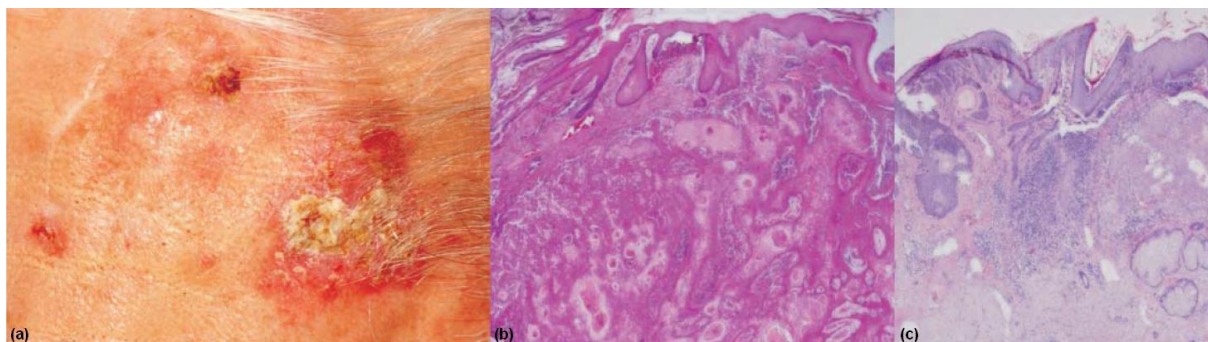
Autori prezentujú kazuistický prípad pacienta s nádorovou duplicitou - raritnou variantou lymfómu z plášťových buniek (mantle cell lymphoma, MCL) a skvamocelulárnym karcinómom (SCC), u ktorého boli v úvode supponované odlišné klinické diagnózy.

Výsledky

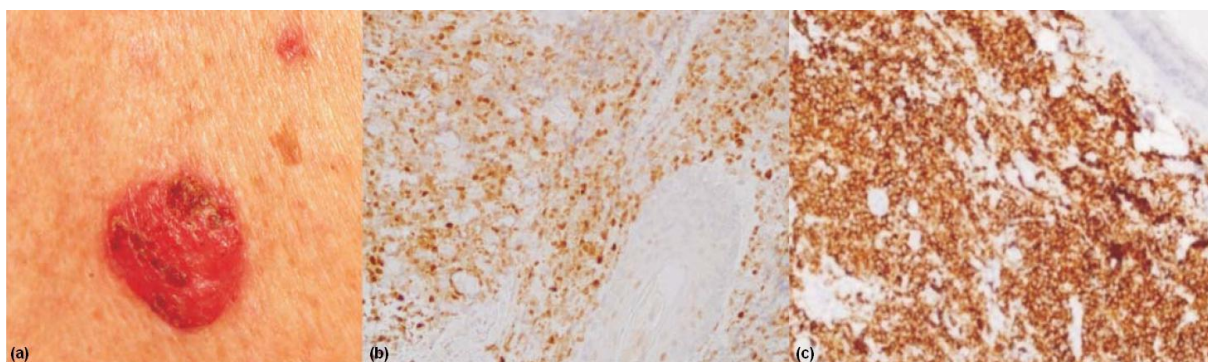
72-ročný pacient, fajčiar, pracujúci v exteriéri ako farmár, sa dostavil na vyšetrenie s mnohopočetnými infiltrovanými papulami, nodulami až tumoróznymi léziami vo veľkosti 0,5 – 2 cm lokalizovanými predominantne na tvári, krku a trupe. Prejavy na tvári boli erytematózne, s krustami a hyperkeratózami, klinicky imponujúce pri prvovýšetrení ako aktinické keratózy, zatiaľ čo lézie na hrudníku boli ružovkasté až jasnočervené, infiltrované s hladkým intaktným povrchom bez ulcerácií, klinicky imponujúce ako nodulárne bazaliómy. Kožné prejavy boli u pacienta sprevádzané dysfágiou. Vzhľadom na osobnú anamnézu kožných nádorových ochorení – skvamocelulárneho karcinómu nosa a temporálnej oblasti a bazocelulárneho karcinómu predlaktia bola vykonaná biopsia.

V tvárových léziách bol potvrdený dobre diferencovaný SCC s fokálnymi blastocytovými CD20+ infiltrátmi na periférii, s potvrdeným vysoko rizikovým HPV 52 metódou PCR. Imunohistochemia a histológia lézií z hrudníka potvrdila CD 20 a cyklín

D1 pozitívne blastické infiltráty vedúce k diagnóze CD20+ B-NHL typu lymfómu z plášťových buniek.



Obr. 1 Dobre diferencovaný SCC (a,b) s CD20+ blastovým infiltrátom na periférii (c).



Obr. 2 MCL infiltrujúci kožu trupu (a), cyklín D1 pozitívny (b) a CD20+ pozitívny (c).

Pre generalizovanú periférnu lymfadenopatiu s hyperpláziou tonzíl a konfluujúcimi zväčšenými lymfatickými uzlinami oblasti krku bolo doplnené CT vyšetrenie zobrazujúce mnohopočetné metastázy v pľúcach, mediastinálnych, paraaortálnych a subhepatálnych lymfatických uzlinách, ako aj obrovské splývajúce lymfatické uzliny s kompresiou vena cava superior.

Laboratórne boli zvýšené beta-2-mikroglobulín (9,08mg/L; referenčné hodnoty 0,8-1,8mg/L), katát dehydrogenáza (5,16 ukat/L; referenčné hodnoty 1,84-4,12ukat/L), mierne elevovaný C-reaktívny proteín (12,1mg/L; referenčné hodnoty 0,0-5,0mg/L) a sideropenická anémia. Z onkomarkerov boli pozitívne karcinoembryonálny antigén (CEA), neurón špecifická enoláza (NSE) a cytokeratínový fragment CYFRA 21. Alfa-fetoproteín, CA 19-9 a SCCA boli negatívne. Pacient odmietol ďalšie vyšetrenia a liečbu.

Diskusia

Lymfóm z plášťových buniek (MCL) je relatívne vzácny typ lymfómu, predstavujúci 8% non-Hodgkinových lymfómov [2]. zvyčajne postihuje starších pacientov (priemerný vek pri diagnóze je 64 rokov) a mužov (pomer muži:ženy je 2:1), často je diagnostikovaný až v neskorých štádiách ochorenia [3, 4]. Kožné manifestácie sú pomerne zriedkavé, k roku 2006 bolo v literatúre popísaných len 17 prípadov kožných metastáz MCL [5]. Najčastejšie bol pri nich postihnutý trup (60%), tvár (30%) a ramená (20%) a prejavovali sa ako noduly (34%), makuly a papuly (34%) alebo fokálne infiltráty (21%) [6]. Posledná klinická štúdia zahŕňajúca dáta z registrov pokrývajúcich obdobie 13 rokov identifikovala 14 pacientov s kožnými prejavmi MCL (1%), u 50% týchto pacientov

bola koža primárna lokalizácia [7]. Histologicky je najčastejší blastoidný variant – zložený z buniek, ktoré majú veľmi disperzný chromatín a vysokú mitotickú aktivitu pripomínajúcu lymfoblasty (klasický typ) alebo z väčších a niekedy pleomorfných buniek často s jadrami, pripomínajúcich bunky difúzneho veľkobunkového B lymfómu (DLBCL) (pleomorfný typ). Blastoidný MCL môže pripomínať DLBCL alebo B-lymfoblastickú leukémiu/lymfóm (B-LBicL), preto je na odlíšenie vhodné farbenie na cyklín D1, ktoré je takmer vždy pozitívne pri MCL, ale nie pri DLBCL alebo B-LBicL [8].

Záver

Pacienti s NHL alebo chronickou lymfocytovou leukémiou (CLL) sú rizikovejší na rozvoj sekundárnej malignity. Kožné nádory sú druhou najčastejšou malignitou u pacientov s lymfómom a naopak, u pacientov s kožnými nádormi je lymfóm najčastejšou sekundárne asociovanou malignitou [9]. U takýchto pacientov je nutný monitoring a v prípade akýchkoľvek pochybností aj adekvátne imunohistochemické farbenia.

Literatúra

- [1] Singh, *J Am Acad Dermatol*. **2005**, 53/4:694-697.
- [2] Campo, *Blood*. **2011**, 19/117:5019-5032.
- [3] Samaha, *Leukemia*, **1998**, 12/8:1281-1287.
- [4] Ráty, *Eur J Haematol*. **2002**, 1/69:11-20.
- [5] Singh, *Mediterr J Hematol Infect Dis*. **2013**, 5/1.
- [6] Motegi, *Eur J Dermatol*. **2006**, 16:435-438.
- [7] Wehkamp, *Am J Surg Pathol*. **2015**, 39/8:1093-1101.
- [8] Canpolat, *Acta Dermato-Venereologica*. **2010**, 90/5:548-550.
- [9] Manusow and Weinerman, *JAMA*. **1975**, 232/3:267-269.

Testikulárny nádor – NSGCT – Teratóm

Dušenka, R.¹, Eliáš, B.², Dušenková, S.², Dargaj, J.², Slávik, M.³, Švihra st., J.¹,
Ľupták, J.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Urologická klinika, Martin; ² Univerzitná nemocnica Martin, Urologická klinika, Martin; ³ Ústredná vojenská nemocnica SNP, Ústav patologickej anatómie, Ružomberok
rdusenka@gmail.com

Abstract

Germ cell testicular tumors constitute the most common type; 90–95% of testicular tumors have germ cell origin. Nonseminomatous germ-cell tumors (NSGCTs) affect young adults, with the peak incidence occurring between the ages of 20 and 35 years. NSGCTs represent 1% of all malignancies in men. Histological examination is the only way to confirm the diagnosis.

Case presentation of 27-year-old man presented with nonpainful palpable newly developed testicular mass. Histologically classified as NSGCT – teratoma. He underwent radical orchiectomy with initiation of standart chemotherapeutic protocol. In conclusion, this report highlights another case of the NSGCT – teratoma and underlines the importance of thorough and complete examination and diagnostics in revelation of secondary hydronephrosis due to ureteric compression by retroperitoneal mass which was confirmed on computer tomography.

Keywords: testicular cancer, hydronephrosis, radical orchiectomy

Úvod

Nádory semenníkov tvoria 1% solídnych nádorov u mužov [1, 2]. Najčastejšie sa vyskytujúcim typom sú testikulárne nádory zo zárodočných buniek, tvoria 90 - 95% všetkých nádorov semenníkov. Medzi tieto nádory patria seminómy a neseminomatózne nádory testis. V patogenéze vzniku zohrávajú významnú úlohu genetické aj epidemiologické faktory [3]. Anamnéza kryptorchizmu alebo prítomnosť nezostúpeného semenníka sa považuje za najdôležitejší epidemiologický rizikový faktor [4]. Je všeobecne známe, že klasickým klinickým prejavom nádoru semenníka je bezbolestná rezistencia v miešku [5]. Keďže nezostúpený semenník je spojený s dlhodobým rizikom vzniku rakoviny semenníka, včasné rozpoznanie prázdneho hemiskróta alebo mieška u dospelého pacienta by malo viesť k podozreniu na nádor semenníka [6]. V čase stanovenia diagnózy testikulárneho nádoru sa v pokročilých štádiách ochorenia môže vyskytovať retroperitoneálna tumorózna masa. Neseminomatózne nádory zárodočných buniek (NSGCT) postihujú mladých dospelých s maximálnym výskytom vo veku medzi 20 a 35 rokmi. NSGCT predstavujú 1% všetkých malignít u mužov. V prípade včasnej liečby je prognóza zvyčajne dobrá, no závisí od histológie nádoru, štádia ochorenia a hladín sérových markerov. Presná histopatologická klasifikácia nádoru testis, prítomnosť a prípadný rozsah metastáz rozhoduje o výbere liečebnej metódy a jej úspešnosti.

Kazuistika

27-ročný muž sa dostavil na Urologickú kliniku Univerzitnej nemocnice v Martine s anamnézou dva dni trvajúcej nešpecifickej intermitentnej tupej bolesti brucha. Udával nebolestivú hmatnú rezistenciu ľavej polovice skróta, ktorú si prvýkrát nahmatával pred

dvoma týždňami. Okrem chronickej liečby myoklonickej epilepsie v osobnej anamnéze neudával iné ochorenia. Pacient negoval traumy skráta infekciu močových ciest, symptómy dolných močových ciest, či potiaže s dýchaním, nemal ťažkosti so sexuálnou funkciou, znížené libido. Vitálne funkcie pacienta boli v rozmedzí fyziologických hodnôt. Fyzikálne vyšetrenie identifikovalo hmatnú, nebolestivú, cystoidnú rezistenciu ľavého semenníka prominujúcu extratestikulárne. Kontralaterálna strana mieška bola bez patologického nálezu. V laboratórnych výsledkoch bola prítomná mierna hyponatrémia 134 mmol/l, C-reaktívny proteín 8,0 mg/l, hemokoagulácia s fyziologickými hodnotami. Boli prítomné abnormálne hodnoty onkomarkerov špecifických pre nádory semenníkov, a to alfa-1-fetoproteín (AFP) > 30 000 µg/l, celkový β-hCG 4,03 U/l a laktát dehydrogenáza (LDH) 5,41 ukat/l. Ultrazvukové vyšetrenie skráta odhalilo prítomnosť cystickej septovanej hypoechogénnej masy v oblasti ľavého dolného testikulárneho pólu veľkosti 13,8 x 9,9 mm (Obr. 1). Pri ultrazvukovom vyšetrení obličiek bola zistená dilatácia kalicha ľavej obličky veľkosti 9,3 mm (Obr. 2). Realizovali sme zobrazovacie vyšetrenie hrudníka, brucha a retroperitonea pomocou počítačovej tomografie, kde bola diagnostikovaná nehomogénna nekrotická masa lobulárnych štruktúr v retroperitoneu s rozmermi 65x72x12 mm, s podozrením na metastatickú lymfadenopatiu (Obr. 3). Nehomogénna masa siahala od úrovne renálnych vén vľavo až po ľavú arteria iliaca communis v tesnej blízkosti aorty, bez známkov infiltrácie aorty alebo renálnych vén. Nebolo možné vylúčiť možnú infiltráciu m. psoas vľavo. Nekrotická masa spôsobovala útlak ľavého ureteru s následnou sekundárnou hydronefrózou vľavo – šírka panvičky 13 mm, šírka kalichov 7,5 mm. CT hrudníka bolo bez patologického nálezu. Pacient bol indikovaný na operačnú liečbu. Pred operačným zákrokom bola realizovaná kryoprezervácia spermií. Po podpísaní informovaného súhlasu bola vykonaná ľavostranná radikálna orchiektómia bez peroperačných a pooperačných komplikácií. V ďalšom kroku bola realizovaná implantácia ureterálneho stentu do oblasti ľavého močovodu (Obr. 4), za účelom riešenia sekundárnej hydronefrózy v dôsledku obštrukčnej uropatie. Pacient podstúpil prvotnú chemoterapeutickú liečbu na Onkologickej klinike Univerzitnej nemocnice v Martine, štyri cykly bleomycínu, etopozidu a cisplatiny (BEP) s následným plánovaným kontrolným vyšetrením počítačovou tomografiou. V čase publikovania tejto práce pacient ukončil štvrtú dávku BEP.

Patologický nález

Makroskopicky: veľkosť semenníka 50x30x25 mm s cystickými tumormi o veľkosti 13 mm v priemere, lokalizovanými v blízkosti epididymis.

Mikroskopicky: dobre ohraničený, neopuzdrený nesemimomatózny tumor zárodočných buniek (NSGCT), podtypu postpubertálneho teratómu. Bez nálezu invázie do tunica vaginalis, tunica albuginea, tunica vasculosa, rete testis, epididymis, funiculus spermaticus. Nebola prítomná angioinvázia. Nádor sa skladal z cystických štruktúr lemovaných jednovrstvovým a viacjadrovým glandulárnym epitelom (enterický a cylindrický typ). Ďalším histologickým nálezom bola rozsiahla fibróza s usadeninami hemosiderínu, mikrolitiáza, ložiská kalcifikácií a prítomnosť tubulov lemovaných Sertoliho bunkami.

Klasifikácia TNM: pT1 pNx pMx L0 V0 Pn0 S

Štádium: Štádium II

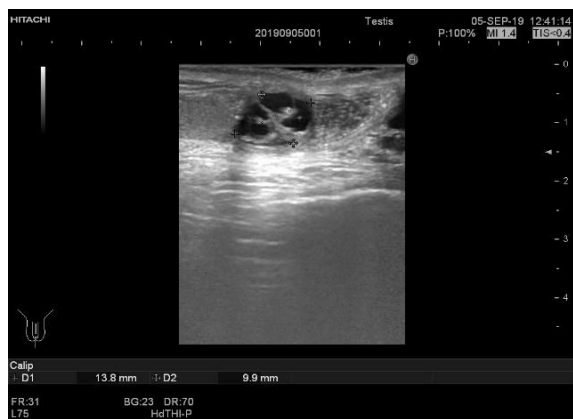
Klinické štádium: IIIC (podľa AJCC / UICC a IGCCCG)

Diskusia

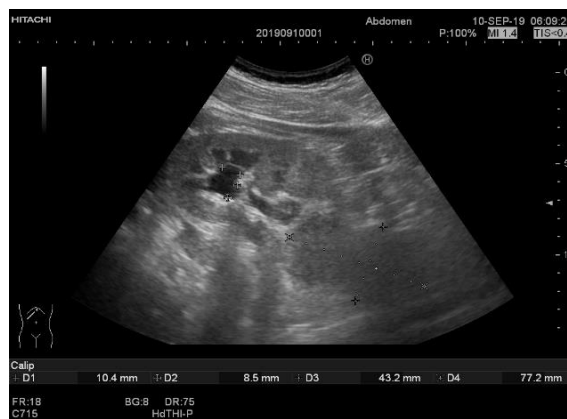
Zhubný nádor semenníka je najčastejšie diagnostikovaný u mužov vo veku 15 - 44 rokov [1, 2, 4]. Zlatým štandardom liečby je radikálna orchiektómia. U spomínaného pacienta bola pri fyzikálnom vyšetrení diagnostikovaná drobná hmatná rezistencia v oblasti ľavého semenníka. Anamnesticky sa pacient sťažoval na tupé pobolievanie ľavého boku. Pri ultrazvukovom vyšetrení obličiek sa potvrdila sekundárna hydronefróza vľavo v dôsledku útlaku ureteru rastom tumorózneho útvaru retroperitona. Pacient podstúpil neodkladnú operačnú liečbu, radikálnu orchiektómiu s následnou chemoterapiou podľa terapeutického protokolu.

Záver

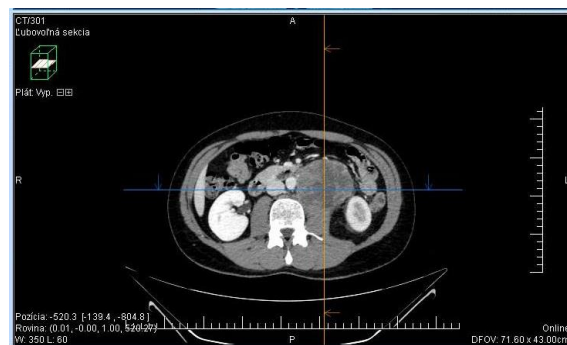
Tento prípad zdôrazňuje dôležitosť dôkladného a komplexného urologického vyšetrenia v diagnostike zhubných nádorov semenníka. Diagnóza zhubného nádoru semenníka by mala byť potvrdená na základe klinického ultrazvukového vyšetrenia skróta, laboratórneho stanovenia hodnôt sérových hladín onkomarkerov a CT vyšetrenia. Treba zdôrazniť dôležitosť ultrazvukového vyšetrenia obličiek, ktoré môže odhaliť sekundárnu hydronefrózu spôsobenú kompresiou ureteru retroperitoneálnou metastázou, s následným stanovením stagingu ochorenia pomocou počítačovej tomografie hrudníka, brucha a retroperitonea. Zlatým štandardom liečby zhubných nádorov semenníka je neodkladná operačná liečba, radikálna orchiektómia.



Obr. 1 Ultrazvukové vyšetrenie ľavého semenníka zobrazujúce 4-laločnatú cystoidnú štruktúru.



Obr. 2 Ultrazvukové vyšetrenie ľavej obličky s hydronefrózou a masou lokalizovanou suprenálne.



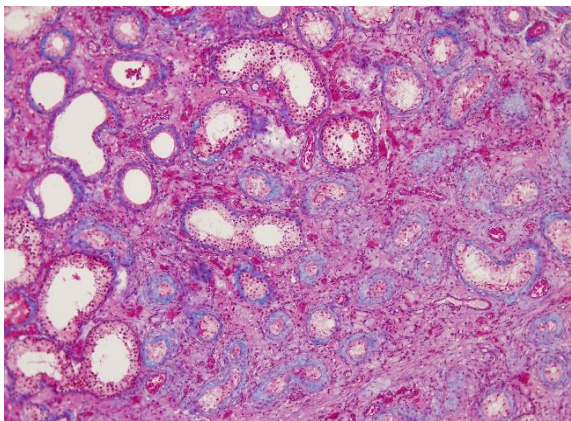
Obr. 3 Vyšetrenie počítačovou tomografiou (CT) s dôkazom retroperitoneálnej masy, spôsobujúcej útlak ľavého močovodu so sekundárnou hydronefrózou. Kalkulovaný objem tumorózneho útvaru 10x8x6 cm³.



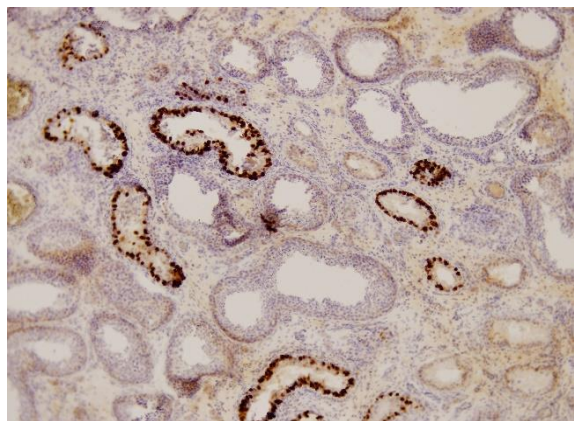
Obr. 4 Ureterálny stent v ľavom močovode dislokovaný retroperitoneálnou masou.



Obr. 5 Makroskopická charakteristika tumoru ľavého semenníka.



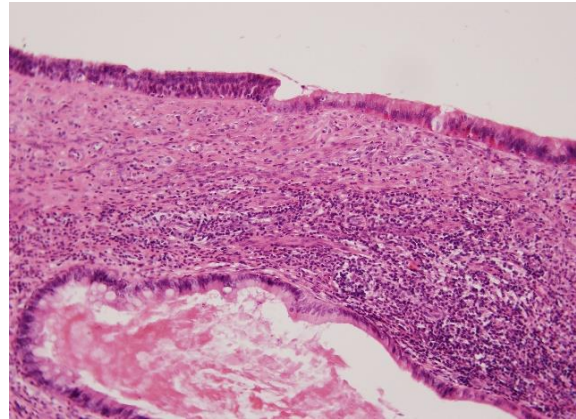
Obr. 6 Histologický preparát tkaniva semenníka - vľavo hore obraz IGCNU, disperzne tubuly so zachovalou spermatogenezou, vpravo dole atrofické testikulárne tubuly s obrazom peritubulárnej fibrózy, Masson, zväčšenie 100x.



Obr. 7 Histologický preparát tkaniva semenníka – Imunohistologické vyšetrenie OCT3/4 (nukleárny transkripčný faktor), zväčšenie 200x, silná nukleárna pozitivita v tubuloch vykazujúcich známky IGCNU, non-neoplastické testikulárne tkanivo je negatívne.



Obr. 8 Histologický preparát tkaniva semeníka - cystické štruktúry teratómu vystlané kubickým aj cylindrickým epitelom, v časti zachytená aj hladká svalovina, v stróme je ložiskovo zvýraznená zápalová celulizácia, Farbenie hematoxylíneozínom, zväčšenie 100x.



Obr. 9 Histologický preparát tkaniva karcinómu semeníka - detail na epitelovú výstelku v cystických štruktúrach teratómu, farbenie hematoxylíneozínom, zväčšenie 200x.

Literatúra

- [1] Wood, *J Urol.* **2009**, 181:452-461.
- [2] Woodward, *Radiology.* **2004**, 231:388-392.
- [3] Fonkalsrud, *Semin Pediatr Surg.* **1996**, 5:2-7.
- [4] Elder, *J Urol.* **2009**, 150:452-461.
- [5] Liss, *Urology.* **2012**, 80:971-973.
- [6] Gorbatiy, *Indian J Urol.* **2009**, 29:186-189.

MR spektroskopická analýza mozgových lézií

Števík, M.¹, Zeleňák, K.¹, Bittšanský, M.², Kolarovszki, B.³, Sýkora, J.¹, Vorčák, M.¹, Slávik, P.⁴, Michalik, J.⁵

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Rádiologická klinika, Univerzitná nemocnica Martin, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin, Neurochirurgická klinika, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin, Ústav patologickej anatómie, Martin; ⁵ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin, Neurologická klinika, Martin
stevik1@uniba.sk

Abstract

MR spectroscopic imaging with high resolution (¹H MRSI) allows in vivo more accurate noninvasive determination and monitoring of metabolites concentrations in the brain. It could be used for improvement diagnosis and therapy of brain tumors in particular. ¹H MRSI plays an important role, especially in distinguishing low grade glioma from high grade glioma, metastasis, abscess. Learning objectives was to describe method and benefit of the 3D high resolution proton magnetic resonance spectroscopic imaging (¹H MRSI) of the brain metabolites in a group of patients with suspected brain tumor lesion. The most important metabolites include choline (Cho). The most important ratio metabolites include choline to N-acetylaspartate (NAA), the ratio of which correlates with the grading of the glioma.

Keywords: brain metabolit, brain tumor, proton magnetic resonance spectroscopic imaging (¹H MRSI)

Úvod

MR spektroskopické vyšetrenie mozgu (¹H MRSI) umožňuje in vivo neinvazívne stanovenie a monitorovanie koncentrácie metabolitov v mozgu. MR spektrum mozgu u zdravého človeka je pomerne stále. Pri rôznych patologických zmenách a biochemických procesoch však dochádza k jeho zmene [1, 2]. Biochemické procesy predchádzajú makroskopickým zmenám, čo umožňuje MRS detegovať patologické zmeny skorej ako klasické MR vyšetrenie. Dochádza ku kvantitatívnym zmenám signálu metabolitov alebo ku výskytu signálu nových metabolitov, ktoré v spektre normálneho mozgu nie sú detekovateľné [3]. Protón obsahujúce metabolity sú predovšetkým N-acetylaspartát, cholín, kreatín. Ďalej sú to aminokyseliny, laktát, tuky a iné. ¹H MRSI môže zvýšiť senzitivitu a špecifitu diagnostiky tumorov. Zohráva významnú úlohu hlavne pri odlíšení low grade gliomov (LGG) od high grade gliomov (HGG). Taktiež pomáha pri oddiferencovaní periférne sa sýtiacej lézie, odlíšenie postradiačných zmien od recidívy tumoru. Cieľom práce bola spektroskopická charakteristika tumorov mozgu a korelácia s histologickým nálezom.

Materiál a metódy

MR spektroskopickým (¹H MRSI) zobrazením mozgu v rámci multiparametrického protokolu u pacientov s ložiskovou suspektnou tumoróznou léziou bolo od 1/2018 do 12/2019 93 vyšetrení u 66 pacientov. V lézii boli vyhodnotené koncentrácie matabolitov a porovnávané s koncentráciami v nepostihnutom tkanive. Diagnóza bola overená histologicky, klinicky, laboratórne alebo rádiologickým sledovaním.

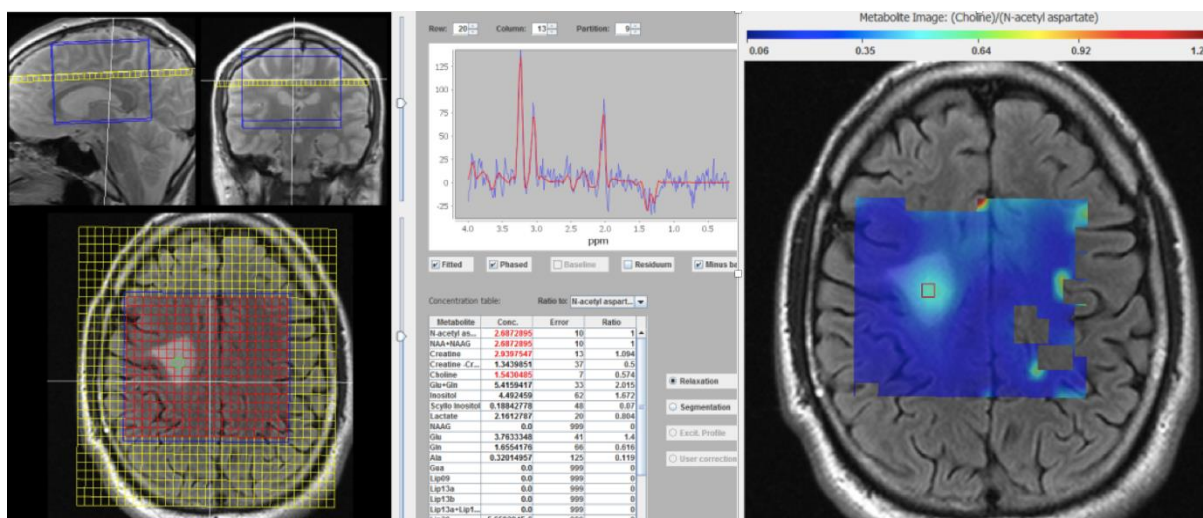
Problematické meranie, nehodnotiteľné boli u 4 pacientov pri nehomogenite magnetického poľa, prekrvácení lézie a lézia blízko pneumatizovaných dutín. Vyšetrenia boli realizované na MR prístroji Siemens Sypmhony (Siemens, Erlangen) 1,5 tesla, 8-kanálová hlavová cievka, štandardná sekvencia PRESS (TE/TR 30/1500 a 135/1500 ms), po 15 minút, rozlíšenie 16x16x8 voxlov, eliptické kódovanie k- priestoru, typické FOV 160x160x80 mm³, typický excitovaný objem 80x80x65 mm³, voxel 10x10x10mm s prepočtom na 5x5x5mm, FOV a veľkosť excitovaného objemu sa prispôsobila anatomickej oblasti meraného priestoru. Signál podkožných lipidov bol potlačený najviac ôsmymi saturačnými pásmi. Kvantifikácia metabolitov prebehla vztiahnutím na signál vody, zmeraný štandardnou sekvenciou FID s identickým rozlíšením a priestorovým kódovaním, ako sekvencia PRESS (TE/TR 2/200 ms, sklápací pulz 1°, dĺžka merania 2 minúty). Koncentrácie metabolitov boli vyhodnotené v programe LCModel a vizualizované v prostredí jSIPRO.

Výsledky

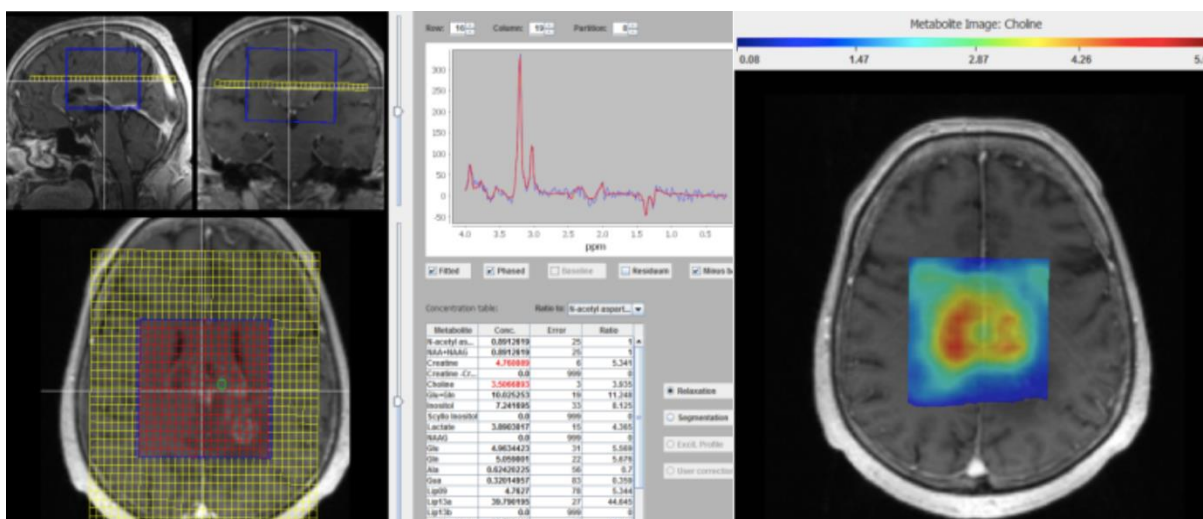
Zo súboru 89 hodnotiteľných vyšetrení 3D ¹H MRSI bolo novodiagnostikovaných 54 pacientov. Nález bol korelovaný s histologickým výsledkom u 34 pacientov s nálezom glioblastómu gr. IV. u 17 pacientov, meningeóm u 5, glióm gr. III. u 2, LGG u 3 metastáza u 4, glióza u 3. Suspektná metastáza bez histologizácie u 4, lymfóm u 4, suspektný LGG v sledovaní u 3, nešpecifický nález u 3, absces u 2, ischemia u 1, SM lézia u 1, encefalitída u 1, ischemia u 1 pacient. Kontrolných spektroskopických vyšetrení bolo 35. Hodnoty pomerov koncentrácií Cho/NAA v histologicky verifikovanej lézii typu high grade a low grade so štatistickým porovnaním s kontrolnou oblasťou mimo lézie, vykonané na základe párového t-testu, sú znázornené v Tab.1. Štatisticky významná hladina p=0,05. Z výsledkov štúdie bol zrejmý signifikantný nárast pomeru koncentrácií Cho/NAA výraznejší v high grade lézii.

Tab. 1 Koncentrácia metabolického pomeru Cho/NAA v mozgovej lézii charakteru HGG a v LGG a v kontrolnej oblasti mimo lézie.

koncentrácia Cho/NAA (priemer±SD)	<i>lézia</i>	<i>kontrolná oblasť</i>	<i>t-test (p)</i>
HGG (n=17)	6,53±4,75	0,19±0,5	0,00048
LGG (n=6)	0,74±0,5	0,21±0,6	0,043



Obr. 1 T2-vážené multiplanárne MR rezy s umiestnením CSI mriežky a voxela v LGG lézii. ¹H spektroskopická krivka metabolitov, tabuľka koncentrácií metabolitov. Metabolická mapa pomeru Cho/NAA, mierne zvýšená na 0,57 svedčiaca pre LGG.



Obr. 2 T1VO postkontrastné multiplanárne MR rezy s umiestnením CSI mriežky a voxela v HGG lézii. ¹H spektroskopická krivka metabolitov, tabuľka koncentrácií metabolitov, výrazne znížený NAA, prítomný laktát, lipidy, zvýšený pomer Cho/NAA na 3,9 svedčiaci pre HGG. Metabolická mapa cholínu so zvýšením v HGG lézii.

Diskusia

¹HMRSI umožňuje in vivo neinvazívne stanoviť a sledovať koncentrácie metabolitov v mozgu. Medzi najdôležitejšie metabolity patrí cholín, k ostatným patrí NAA, kreatín, myoinozitol, lipidy a laktát. Najdôležitejšie pomery metabolitov sú Cho/NAA a Cho/Cr. Nádory rozlišujeme nízkeho stupňa, low-grade (LGG) (WHO grade I/II), difúzne astrocytové a oligodendrogliové tumory, iné astrocytové tumory, iné gliómy. Vysokého stupňa, high-grade (HGG) (WHO grade III, IV). U všetkých typoch dochádza v rôznej miere k poklesu NAA v dôsledku náhrady zdravých neurónov infiltrujúcimi nádorovými bunkami. Zvyšuje sa koncentrácia Cho v dôsledku prebiehajúcej syntézy bunkových membrán a nárastu počtu buniek [4, 5]. Najčastejšie pomery metabolitov pre diagnózu nádorov sú Cho/Cr, Cho/NAA a NAA/Cr. Markerom low-grade nádorov je súčasné zvýšenie koncentrácie ml a Cho [6]. Myoinozitol býva vyšší pri LGG stupni II ako pri HGG (III, IV). Pri LGG nedochádza k významnému zníženiu NAA a Cr, nie je zvýšenie

lipidov a laktátu (Obr.1). Koncentrácia Cho narastá s malignitou nenekrotických nádorov s nízkou hladinou tukov. V high-grade nádoroch prítomnosť nekrózy zmenšuje absolútne koncentrácie metabolitov. Koncentrácia Cr sa mení veľmi málo. So stupňom tumoru sa zväčšuje koncentrácia tukov a laktátu, čo naznačuje prítomnosť nekrotickej zložky. Kritériom pre odlíšenie stupňa malignity (grade) nádorov je pomer Cho/NAA a Cho/Cr, ktoré korelujú s grade nádoru [7, 8]. Pomer Cho/NAA väčší ako 2, pomer Lac/NAA väčší ako 0,25 a prítomnosť lipidu pri MR spektroskopickom zobrazovaní s dlhým TE (135 ms) sú charakteristikami nádoru vysokého stupňa (Obr. 2). Medzi najvýznamnejšie metabolity patrí cholín, ktorého koncentrácia koreluje so stupňom gliómu [9]. Wang a kol. vykonali metaanalýzu magnetickej rezonančnej spektroskopie (MRS) pri diferenciácii HGG od LGG. Z databázy PubMed a Embase bolo zahrnutých tridsať článkov s 1228 pacientami. Autori dospeli k záveru, že pomer Cho/NAA vykazoval vyššiu senzitivitu a špecifitu pri odlíšení HGG od LGG ako pomer Cho/Cr a pomer NAA/Cr [10]. Abdelaziz a kol. prospektívne porovnávali výsledky MRS a stereotaktickej biopsii pri charakterizácii mozgových lézií. Korelácia medzi predoperačnou MRS a histopatologickou diagnózou bola zhodná v 25 z 27 prípadov (senzitivita 88 %, špecifita 100 %). Z 15 pacientov diagnostikovaných MRS ako neoplastických bolo histologicky potvrdených 12 pacientov s gliómami mozgu rôznych stupňov. MRS klasifikácia gliómov zodpovedala histopatologickej klasifikácii v 10 z 12 prípadov (senzitivita 89 %, špecifita 67 %). Autori dospeli k záveru, že MRS je prínosná pri charakterizácii rôznych mozgových lézií. Podľa autorov môže multivoxel MRS zvýšiť diagnostickú výťažnosť stereotaktickej biopsie zameraním sa na oblasti s vyšším obsahom cholínu a nižším N-acetylaspartátom [11]. MRS tiež napomôže k odlíšeniu postradiačnej nekrózy od recidívy tumoru. Chuang a kol. vykonali metaanalýzu metabolitov pomocou MR spektroskopie pri diferenciácii recidivujúceho nádoru od nekrózy, pričom bol významne zvýšený pomer Cho/NAA pri recidíve nádoru ako pri nekróze. Autori dospeli k záveru, že MR spektroskopia pomocou pomerov Cho/NAA a Cho/Cr môžu zvýšiť presnosť diferenciácie nekrózy od recidivujúceho nádoru [12].

Záver

¹H MRSI umožňuje neinvazívne stanoviť a sledovať koncentrácie metabolitov v mozgu in vivo. Spektroskopické vyšetrenie a hodnotenie spektier ovplyvňuje množstvo faktorov a má aj svoje limity. Napriek tomu má úlohu v rámci MR multiparametrického protokolu pri odlíšení niektorých typov lézií. Taktiež zohráva úlohu pri plánovaní biopsie a sledovaní pacientov po terapii. U pacientov s novodiagnostikovanou léziou mozgu pri akútne zhoršenom neurologickom stave môže napomôcť pri oddiferencovaní tumoru od inej lézie. Medzi najvýznamnejšie metabolity patrí cholín, ktorého koncentrácia korelovala s grading tumoru. Rovnako pomer metabolitov Cho/NAA korelovala s grading tumorov.

Práca bola podporená projektom „Využitie systému PACS vo výskume a vývoji“, ITMS 26210120004, ktorý je spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Ross, *Saunders-Elsevier*. **2006**, 4:1840-1910.
- [2] Hourani, *AJNR Am J Neuroradiol*. **2008**, 29:366-372.
- [3] Starčuk, *Neurologie pro praxi*. **2005**, 3:140-148.
- [4] Verma, *BBA Clinical*. **2016**, 5:170-178.
- [5] Hafez, *Menoufia Med J*. **2016**, 29:136-140.
- [6] Howe, *Magn Reson Med*. **2003**, 49:223-232.

- [7] Yang, *Nat Rev Clin Oncol.* **2009**, 6:648-657.
- [8] Horská, *Neuroimaging Clin. N. Am.* **2010**, 20:293-310.
- [9] Bulik, *BioMed Research International.* **2015**, 15:1-10.
- [10] Wang, *Tumour Biol.* **2017**, 39:1-9.
- [11] Abdelaziz, *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg.* **2016**, 77:283-290.
- [12] Chuang, *PLoS One.* **2016**, 7:1-13.

Spinálny epidurálny hematóm po operačnej liečbe degeneratívneho ochorenia driekovej chrbtice u pacientov nad 60 rokov - incidencia a analýza rizikových faktorov

Snopko, P., Hanko, M., Masaryková, M., Richterová, R., Opšenák, R., Kolarovszki, B.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin, Neurochirurgická klinika, Martin
pavsnopko@gmail.com

Abstract

Degenerative lumbar spine disease is currently considered as a serious medical issue, due to the significant increase of patients over the past decades whose clinical condition required surgical intervention. Presence of postoperative symptomatic spinal epidural hematoma (SEDH) is a serious complication whose incidence requires urgent surgical intervention. Occurrence of SEDH can lead to unpleasant long-term/persistent neurological complications. This work deals with the incidence and risk factors of postoperative SEDH. Our prospective study showed statistically significant correlation between incidence of postoperative SEDH, antiaggregation therapy and presence of liver diseases. This study may be beneficial to physicians involved in comprehensive treatment of degenerative spine disease.

Keywords: degenerative spine disease, epidural hematoma, complications, spine surgery

Úvod

Pooperačný spinálny epidurálny hematóm je definovaný ako nahromadenie krvi v intraspinálnom epidurálnom priestore, spravidla v mieste operačného zákroku (s možnou expanziou kaudálnym a kraniálnym smerom od chirurgicky ošetrovaného priestoru). Obvykle vzniká v dôsledku pokračujúceho krvácania z epidurálnych venózných plexov. Jeho incidencia sa v literatúre pohybuje v rozmedzí 0,1-3% [1, 2]. Prítomnosť symptomatického epidurálneho hematómu je pomerene zriedkavá, avšak jeho výskyt môže viesť k závažným neurologickým komplikáciám s nutnosťou urgentnej chirurgickej intervencie. Klinické prejavy závisia od veľkosti epidurálneho hematómu resp. od jeho kompresívneho efektu na príľahlé nervové štruktúry. U pacientov je obvykle prítomná významná bolesť v oblasti operačnej rany nedostatočne kompenzovaná štandardnou analgetickou liečbou, dochádza k prudkému rozvoju iritačno - zánikovej radikulárnej symptomatológie (často bilaterálneho charakteru), ktorá je zvyčajne zhoršená v porovnaní s predoperačným stavom (v krajnom prípade dochádza k rozvoju perianogenitálnej hypestézy a sfinkterických porúch resp. vzniká syndróm caudae equinae). Neurologický stav môže byť hodnotený pomocou ASIA (American Spinal Injury Association) vyšetrovacej škály alebo jednoduchšej Frankelovej škály [3, 4]. Diagnostika spočíva v dôkladnom klinickom vyšetrení a urgentnom zobrazovacom vyšetrení. SEDH sa v obraze natívneho CT vyšetrenia zobrazuje ako hyperdenzná (50-70 HU) extradurálna masa. Vyšetrenie magnetickou rezonanciou verifikuje prítomnosť epidurálnej kolekcie v oblasti ošetrovaného priestoru chrbtice spôsobujúcu kompresiu nervových štruktúr, ktorá je izointenzná alebo hyperintenzná v T1 vážení a heterogénne hyperintenzná v T2 vážení. Symptomatický nález pooperačného epidurálneho hematómu vyžaduje

urgentnú chirurgickú intervenciu spočívajúcu v revízii operačnej rany s dôkladnou evakuáciou epidurálnej kolekcie [5, 7, 8]. Cieľom práce bolo zhodnotenie rizikových faktorov vzniku pooperačného spinálneho epidurálneho hematómu u exponenciálne sa zväčšujúcej skupiny pacientov vo veku nad 60 rokov.



Obr. 1 Vyšetrenie magnetickou rezonanciou - nález pooperačného epidurálneho hematómu v oblasti dekompresívneho operačného výkonu v segmente L4/5.

Materiál a metódy

Štúdia bola realizovaná prostredníctvom prospektívnej analýzy pacientov vo veku nad 60 rokov, ktorí podstúpili operačnú liečbu degeneratívneho ochorenia drierkovej chrbtice na Neurochirurgickej klinike UNM (Univerzitná nemocnica Martin) od januára 2016 do decembra 2017. U pacientov bol sledovaný výskyt pooperačného symptomatického spinálneho epidurálneho hematómu, ktorý vyžadoval revízný operačný výkon. U pacientov boli sledované vybrané rizikové faktory - pohlavie, ASA (American Society of Anesthesiologists), operačná diagnóza, typ operačného výkonu, rozsah operačného výkonu, užívanie antiagregačnej liečby a pridružené ochorenia. Všetci pacienti podstúpili operačný výkon zo zadného resp. posterolaterálneho prístupu. Výsledky boli štatisticky zhodnotené metódami deskriptívnej štatistiky a pomocou Fisherovho testu, pričom hodnoty $p < 0,05$ boli považované za štatisticky významné.

Výsledky

Súbor pozostával zo 165 pacientov, 67 mužov a 98 žien (40,6 %/ 59,4 %). Pooperačný symptomatický spinálny epidurálny hematóm sa vyskytol u 4 pacientov (2,42 %). Výsledky preukázali štatisticky významne zvýšený výskyt pooperačného SEDH u pacientov, ktorý užívali chronickú antiagregačnú liečbu - napriek jej predoperačnému

vysadeniu s prechodom na LMWH ($p = 0,0187$). Z pridružených ochorení sme preukázali štatisticky významný rozdiel medzi prítomnosťou hepatálnych ochorení a výskytom pooperačného symptomatického spinálneho epidurálneho hematómu ($p = 0,0478$) (Tab. 1).

Tab. 1 Štatisticky významné rizikové faktory SEDH.

Štatisticky významné rizikové faktory	Počet pacientov	Počet pacientov s SEDH	Hodnota „p“
Chronické užívanie antiagregačnej liečby	58 (35,2 %)	4 (6,9 %)	0,0187
Hepatálne ochorenia	38 (23 %)	3 (7,9 %)	0,0478

Diskusia

Degeneratívne ochorenie chrbtice je v súčasnosti jednou z najčastejších príčin pracovnej neschopnosti dospeléj populácie. Proces degenerácie je prirodzeným dôsledkom starnutia organizmu. Postihuje všetky časti pohybového aparátu chrbtice - medzistavcové platničky, telá stavcov, facetové kĺby a väzy. Odlíšiť prirodzené zmeny starnutia od degeneratívneho ochorenia je veľmi obtiažne, pričom základný rozdiel spočíva vo veku a v rýchlosti priebehu degeneratívnych zmien. Operačná liečba je indikovaná u pacientov s degeneratívnym ochorením drierkovej chrbtice, u ktorých sú vyčerpané možnosti konzervatívnej liečby. S narastajúcou priemernou dĺžkou života narastá aj počet pacientov podstupujúcich operačnú liečbu degeneratívneho ochorenia chrbtice. Vzhľadom na zvyšovanie kvality života, čoraz viac pacientov, obvykle staršieho veku, podstupuje plánované operačné výkony z dôvodu degeneratívneho postihnutia chrbtice, napriek ich možným rizikám [3, 6, 7]. V čase indikácie plánovaného operačného výkonu je dôležité zvážiť riziko výskytu pooperačných komplikácií, pretože ich výskyt môže viesť k reoperácii, predĺženej hospitalizácii, negatívnym ekonomickým následkom a k zníženiu spokojnosti pacientov s operačnou liečbou. Prítomnosť symptomatického pooperačného epidurálneho hematómu je závažnou komplikáciou, ktorej výskyt vyžaduje urgentnú operačnú intervenciu [8]. Táto prospektívna štúdia preukázala štatisticky významne zvýšený výskyt pooperačného symptomatického spinálneho epidurálneho hematómu u pacientov s hepatálnymi ochoreniami a u pacientov, ktorí užívali chronickú antiagregačnú liečbu. Viaceré zahraničné štúdie preukázali ako rizikové faktory pre rozvoj SEDH prítomnosť dekompenzovanej artériovej hypertenzie v skorom pooperačnom období, vek pacientov nad 60 rokov, predoperačnú prítomnosť koagulačných porúch, užívanie antiagregačnej liečby a nesteroidných antiflogistík v predoperačnom období, INR > 2,0, Rh pozitívny typ krvnej skupiny, malfunkciu/nepřítomnosť subfasciálnej drenáže, obezitu, realizáciu revízieho alebo multisegmentového operačného výkonu [3, 6, 9, 10]. U rizikových pacientov je vhodná dôkladná predoperačná diskusia a edukácia pacienta ohľadne možných perioperačných komplikácií, často vedúcich k závažným dôsledkom a zhoršeniu

pooperačného benefitu, s následnou indikáciou vhodného typu, rozsahu a charakteru operačného výkonu.

Záver

Symptomatický spinálny epidurálny hematóm je závažnou, avšak riešiteľnou pooperačnou komplikáciou v spondylochirurgii. Znalosť jeho charakteru, symptomatológie, diagnostiky a rizikových faktorov môže pomôcť lekárom v jeho skorom odhalení s adekvátnym načasovaním liečby. Dôkladná znalosť a prevencia pooperačných komplikácií a ich rizikových faktorov má pri chirurgickej liečbe nepopierateľný význam, pretože prevencia ich výskytu môže viesť ku skráteniu doby hospitalizácie, k zníženiu finančných nákladov súvisiacich s liečbou pacientov a najmä k pozitívnemu ovplyvneniu spokojnosti pacienta po operačnom výkone.

Literatúra

- [1] Kou, *Spine*. **2002**, 27:1670-1673.
- [2] Aono, *J Neurosurg Spine*. **2011**, 2:202-205.
- [3] Ikuta, *J Neurosurg Spine*. **2006**, 5:404-409.
- [4] Frankel, *Paraplegia*. **1969**, 7:179-192.
- [5] Lawton, *J Neurosurg*. **1995**, 83:1-7.
- [6] Fraser, *Arch Phys Med Rehabil*. **2009**, 90:1964-1968.
- [7] Nawashiro, *Am J Neuroradiol*. **2001**, 22:1445.
- [8] Braun, *Eur J Radiol*. **2007**, 64:119-125.
- [9] Awad, *J Bone Jt Surg Br*. **2005**, 87:1248-1252.
- [10] Boukobza, *Neuroradiology*. **1994**, 36:456-459.

Intersomatické cervikálne kliečky s integrovanou dlahou

Masaryková, M.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin, Neurochirurgická klinika, Martin
mari.masarykova@gmail.com

Abstract

Anterior cervical discectomy and fusion (ACDF) has been the standard surgical treatment for degenerative disease of the cervical spine. Since the description of the anterior approach for cervical discectomy and fusion by Robinson and Smith in 1955, anterior cervical procedures have become quite common with generally good clinical results. The plate-cage construct applied in ACDF has become the standard method of anterior column reconstruction to allow a complete immediate stability, thereby improving clinical outcomes. However, the use of anterior plates is associated with complications such as dysphagia and adjacent segment degeneration. To minimize these issues, some authors have advocated for treatment involving some new anterior interbody systems with internal fixation, such as the Zero-P and ROI-C devices.

Keywords: anterior cervical discectomy, cage with integrated plate, zero-profile spacer

Úvod

Zlatým štandardom ošetrovania pohybového segmentu krčnej chrbtice po prednej krčnej diskektómii je rekonštrukcia výšky medzistavcového priestoru a následná indukcia intersomatickej fúzie. Použitie syntetickej náhrady platničky bez istenia predstavuje riziko jej zanorenia a následnej straty operačne získanej segmentovej lordózy a distrakcie. Vzhľadom k tomu bolo okrem úrazových indikácií do praxe zavedené použitie predných krčných dláh. Nevýhodou použitia prednej krčnej dlahy je nutnosť väčšieho operačného prístupu, a tým aj tendencia k tvorbe rozsiahlejších fibroadhezívnych zmien. Intímna vzdialenosť medzi okrajmi prednej krčnej dlahy a prilahlými medzistavcovými priestormi môže viesť k osifikácii uvedených segmentov. Použitie kliečok s integrovanou dlahou prináša možnosť bezpečného ošetrovania intervertebrálneho priestoru a indukcie intersomatickej fúzie pri súčasnej eliminácii nevýhod konvenčnej krčnej dlahy a má predpoklady stať sa optimálnou voľbou pre ošetrovanie intervertebrálneho priestoru po prednej krčnej diskektómii. Dizajn kliečok s integrovanou dlahou predpokladá redukciu výskytu osifikácie prilahlého segmentu a minimalizáciu operačného prístupu s redukciou tvorby fibroadhezívnych zmien [1-3]. Nulový profil uvedených implantátov predpokladá elimináciu iritácie hypofaryngu a ezofágu [1-9].

Benefity intersomatických kliečok s integrovanou dlahou

Nesporňovanou výhodou dizajnu uvedených kliečok je zachovanie nulového profilu implantátu (vlastný implantát neprominuje pred úroveň predných plôch tiel prilahlých stavcov) pri zachovanej bezpečnej stabilizácii implantátu v medzistavcovom priestore. Uvedené riešenie odstraňuje nevýhody prednej krčnej dlahy a zachováva jej prednosti. Použitie prednej krčnej dlahy znižuje počet reoperácií pre pseudoartrózu, umožňuje udržať segmentovú distrakciu a lordotické postavenie. Medzi udávané výhody uvedených implantátov patria, v porovnaní s použitím kombinácie kliečka a konvenčná

krčná dlahu, zníženie výskytu, závažnosti a pretrvávania pooperačnej dysfágie, zníženie traumatizácie mäkkých tkanív pre možnosť menšieho operačného prístupu, redukcia pooperačných adhézii a tiež prevencia osifikácie priľahlých segmentov (indukcia tvorby predného osteofytu priľahlého segmentu v dôsledku iritácie dlahou). Menšia flekčno-extendná stabilita kletky s integrovanou dlahou je pravdepodobne príčinou rýchlejšieho nástupu kostnej fúzie v porovnaní s implantáciou kletky istenej konvenčnou krčnou dlahou [1, 3]. Klinické štúdie udávajú úspešnosť fúzie 90–100 % po jednosegmentových výkonoch a 70–100 % po dvojsegmentových výkonoch [13–15]. Scholz et al. udávajú po použití kletky s integrovanou dlahou a nulovým profilom incidenciu fúzie v období 12 mesiacov po operačnom výkone 97 % [12]. Dysfágia je relatívne bežná komplikácia po ACDF s použitím prednej dlahy. Medzi preventívne opatrenia redukujúce výskyt pooperačnej dysfágie patrí šetrná operačná technika, dôsledná hemostáza počas operačného výkonu a aplikácia drénu na konci operačného výkonu pre elimináciu hematómu v operačnom prístupe. Lee et al. skúmali význam dizajnu prednej krčnej dlahy ako rizikového faktoru. Vo svojej prospektívnej štúdii zistili, že použitie krčnej dlahy Zephir (Medtronic, Sofamor Danek, USA) je spojené s nižšou incidenciou pooperačnej dysfágie ako použitie dlahy Atlantis od rovnakého výrobcu. Autori vysvetľujú uvedené zistenie hladším povrchom a nižším profilom krčnej dlahy Zephir. Fogel et al. referujú v retrospektívnej analýze pacientov s perzistujúcou poruchou prehĺtania po implantácii konvenčnej dlahy regresiu dysfágie po jej odstránení v 55 % prípadov. Peroperačne nachádzali autori rozsiahle adhérie medzi pažerákom a dlahou, prípadne prevertebrálnou fasciou. Xiao. et. al vo svojej kohortovej štúdii z r. 2017 uvádzajú znížený výskyt pooperačnej dysfágie pri implantácii kletiek s nulovým profilom v porovnaní s fixáciou prednou krčnou dlahou a to 1,0% v.s. 10% po 12 mesiacoch a 0,8% v.s. 4,2% po 24 mesiacoch. Uvedené štúdie predikujú nižšiu incidenciu pooperačnej dysfágie pri použití implantátov s nulovým profilom. Viaceré štúdie však tento logický predpoklad nepotvrdili [4–8, 16–19]. Výhodné je použitie niektorých typov kletiek s integrovanou dlahou pri ošetrovaní degeneratívnych zmien segmentu priľahlého k primárne prevedenej prednej krčnej diskektómii a fúzii s použitím konvenčnej dlahy, pretože nie je nutné jej odstránenie. Rovnako je vhodné ich použitie pri hybridných implantáciách v kombinácii s totálnou artroplastikou [4].

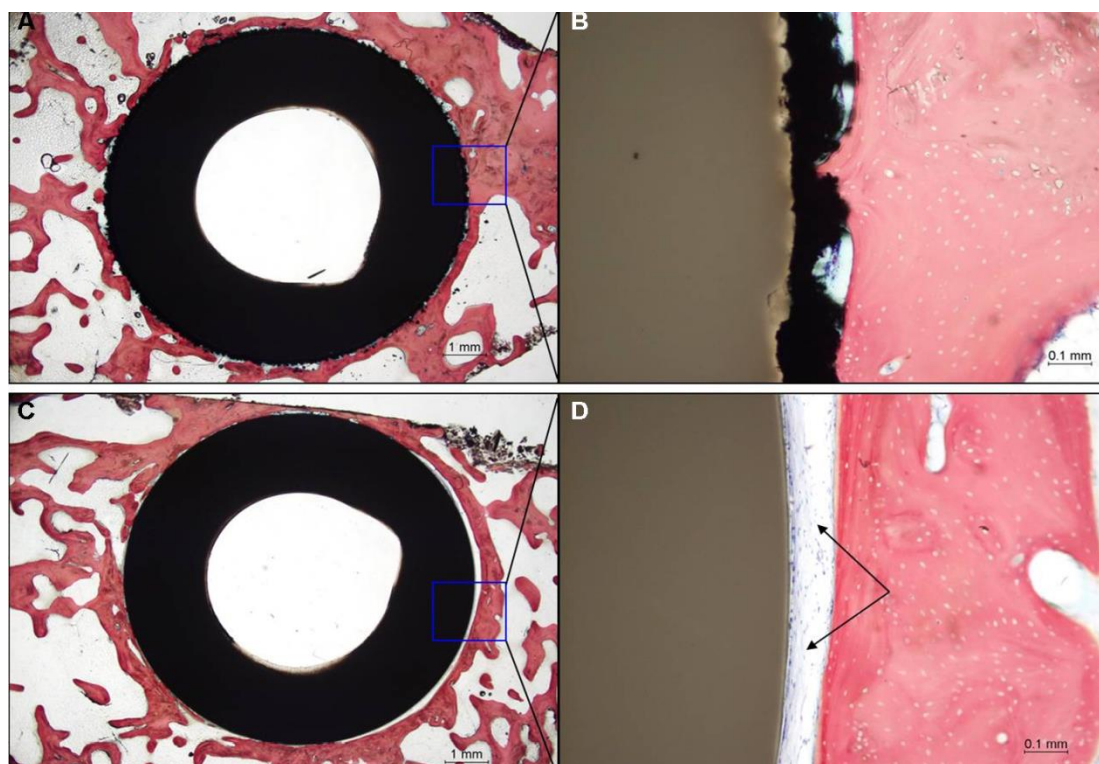
Majid et al. porovnávali biomechanickú stabilitu dvojskrutkovej kletky s intergrálnou dlahou, štvorskutkovej kletky s integrálnou dlahou, klasickej kletky a kletky s prednou krčnou dlahou na kadaveroch. Nezistili sa žiadne významné rozdiely v pohybe medzi zariadeniami v žiadnej z podmienok zaťaženia [20].

Stein et al. porovnal kletky s integrálnou dlahou s fixáciou prednou krčnou dlahou v segmente C5 /C6 na ľudských kadaveroch a uviedol, že kletka s integrálnou dlahou poskytuje takmer rovnakú biomechanickú stabilitu ako fixácia prednou krčnou dlahou [21].

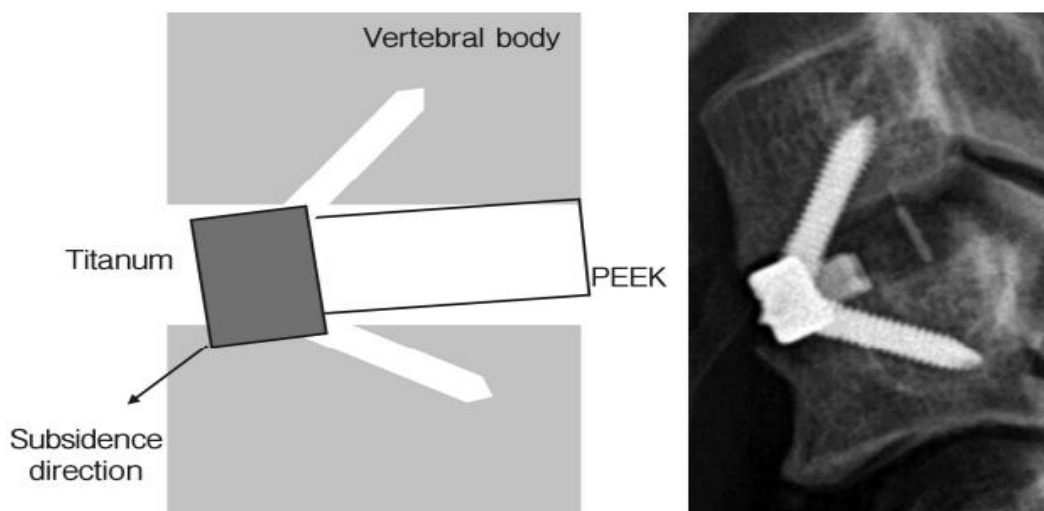
Konstruktia

Pri výrobe dutých kletiek sa používajú 3 kľúčové materiály - titán, polyéteréterketón (PEEK), a kombinácia karbónové vlákna –PEEK. Z dôvodu synovitídy spôsobenej úlomkami vlákien asociovanými s kletkami z karbónových vlákien – PEEK je v súčasnosti preferovaný titán a PEEK. Chen et al. preukázali, že použitie PEEK kletky vykazuje lepšie udržanie operačne získanej distrakcie, segmentovej lordózy a podmieňuje nižšiu incidenciu zanorenia v porovnaní s titánovou kletkou, vzhľadom na ich elastický modul bližší ku spongióznej kosti [22]. V štúdii Opšenáka et al. na našej klinike bola napriek použitiu PEEK-kletky istenej integrovanou dlahou (Zero Profile

Variable angle™) strata operačne získanej distrakcie významná [23]. Titánové implantáty majú výnimočný osteogénny potenciál a sú porovnateľne rezistentné voči mikrobiálnej adhézii [24, 25]. Výhody oboch materiálov sa spájajú v kombinovaných kliebkach. Firma B- Braun vo svojej rade implantátov Aesculap XP (Arcadius XP C®) kombinuje PEEK jadro s povrchovou úpravou Plasmapore, ktorý predstavuje porézny, osteokonduktívny a biokompatibilný povlak z čistého titánu. Táto kombinácia zabezpečuje vysokú primárnu stabilitu vďaka pórovitému povrchu (až 60%), ktorý umožňuje dobrý kontakt s kosťou, a tak zabezpečuje zvýšenú odolnosť voči migráciám a zvyšuje mechanickú pevnosť. Taktiež ako model pružnosti, ktorý je blízky modulu elasticity kortikálnej kosti znižuje zanorenie implantátov, v dôsledku možnosti tvorby kosti v štruktúre Plasmapore navodzuje vysokú sekundárnu stabilitu. Rovnako má aj vynikajúce zobrazovacie vlastnosti (jasné ohraničenie kontúr implantátu, žiadne alebo minimálne artefakty na CT / MR skenoch) [22, 26-28]. Uvedené materiály sa vyznačujú výbornými mechanickými vlastnosťami, ktoré prevyšujú požiadavky zaťaženia krčnej chrbtice aj vtedy, keď implantát nie je kompaktný, ale vyrobený vo forme dutej kliebky. Vytvorený priestor vo vnútri kliebky sa vyplní buď spongióznou kosťou pacienta alebo syntetickými, materiálmi. Použitie syntetických osteokonduktívnych materiálov vo forme granúl, tmelu alebo stripov pri prednej krčnej diskektómii dominuje, pretože pri tomto výkone nie je možné v rozsahu operačného poľa získať dostatočné množstvo spongiózneho kosti (na rozdiel od somatektómie) [22, 24, 25, 38].



Obr. 1 PEEK implantát s titanovým povrchom Plasmapore a čistý PEEK implantát. Histologické údaje zobrazujú významný rast kosti pri použití implantátu s plášťom Plasmapore (A,B), v porovnaní s čistým PEEK implantátom (C,D), pri ktorom dochádza k zvýšenej tvorbe fibrotického tkaniva, zdroj: https://www.bbraun.com/content/dam/b-braun/global/website/products-and-therapies/degenerative-spinal-disorders/O85002_Aesculap_XP.pdf.bb-.95195616/O85002_Aesculap_XP.pdf
https://www.dovepress.com/cr_data/article_fulltext/s180000/180482/img/mder-180482_F011.jpg
 dátum prevzatia: 06.05.2020



Obr. 2 Zanorenie kliečky, zdroj: <https://www.thenerve.net/upload//thumbnails/nv-5-2-33f5.gif>
dátum prevzatia: 28.04.2020

Zero Profile

Prvým implantátom s integrovanou dlahou bola kliečka Zero Profile® (Zero-P, Synthes, Švajčiarsko), ktorá sa skladá z tela (PEEK alebo titán), integrovanej titánovej dlahy a štyroch uzamykateľných fixačných skrutiek. Dutinu kliečky je možné vyplniť spongióznou kosťou alebo syntetickým osteokonduktívnym materiálom. Kliečka sa vyrába v troch tvarových vyhotoveniach – konvexné, lordotické a paralelné. Medzi kontraindikácie použitia kliečky Zero-P® patria ťažká osteoporóza, nádorové a zápalové ochorenia chrbtice a úrazy chrbtice.



Obr. 3 Prvý implantát s integrovanou dlahou - Zero Profile® (Zero-P, Synthes, Švajčiarsko), zdroj: <https://i.pinimg.com/originals/9b/2e/f3/9b2ef3c06ad6b043efcedb2ca43cea8f.jpg>
dátum prevzatia: 28.04.2020

Scholz et al. testovali na 24 kadaveroch biomechanickú stabilitu implantátu Zero-P® v anteflexii, retroflexii, inklináciach a rotáciach. Ako kontrolný súbor použili kombináciu PEEK - kliečka + dlahu CSLP™ (uzamykateľná nedynamická dlahá) a PEEK - kliečka + Vectra™ T (uzamykateľná dynamická dlahá). Bola síce zistená nižšia stabilita Zero-

P® v anteflexii a retroflexii, ale rozdiel nebol štatisticky významný [3]. Nižšia stabilita v sagitálnej rovine však môže podmieňovať rýchlejší nástup kostnej fúzie v porovnaní s dlahou. V lateroflexii a rotácii nebol zistený rozdiel medzi jednotlivými skupinami. Napriek uvedenému výsledkom je použitie kliečky Zero-P® pri úrazoch chrčtice kontraindikované [1]. Scholz et al. v inej prospektívnej štúdii udávajú nízky výskyt komplikácií po použití kliečky Zero-P®, vrátane nízkeho výskytu pooperačnej dysfágie [10]. Azab et al. vo svojej prospektívnej štúdii hodnotili výsledky liečby pacientov po prednej krčnej diskektómii a fúzii kliečkou Zero-P® a uvádzajú, že použitie kliečky je dobrou alternatívou k iným fúznym technikám, zaznamenali nízku incidenciu pooperačnej dysfágie (žiadny pacient neudával poruchu prehĺtania tri mesiace po operácii) a nezaznamenali komplikácie vo vzťahu k implantátu [11]. Dhir et al. retrospektívne hodnotili rádiologické nálezy krčnej chrčtice po ACDFP s použitím kliečky Zero-P® a nezistili žiadne komplikácie vo vzťahu k implantátu (dislokáciu skrutiek alebo kliečky). Zanorenie implantátu bolo prítomné vo všetkých skúmaných prípadoch, ale významné zanorenie (>3 mm) bolo verifikované len vo 2 % prípadov po šiestich mesiacoch od výkonu [29]. Vzhľadom k tomu, že kliečka Zero-P® má v tele integrovanú dlahu, eliminuje nedostatok stand-alone kliečok – extenčnú nestabilitu. Zavedenie štyroch fixačných skrutiek istiacich kliečku v medzistavcovom priestore má divergentný smer, čo podmieňuje určitý stupeň segmentovej distrakcie vo ventrálnej časti segmentu, a tým aj významnejší lordotizačný efekt oproti použitiu kliečky istenej konvenčnou krčnou dlahou. Pri použití konvenčnej dlahy dochádza skôr ku kompresii vo ventrálnej časti medzistavcového priestoru, a tým aj k redukcii segmentovej lordózy. Vaněk et al. uvádzajú, že v období šiestich týždňov pooperačne dochádza k významnému poklesu medzistavcového priestoru ošetrovaného kliečkou Zero-P®, na čom sa spolupodieľa okrem axiálneho zaťaženia aj už spomínaná nižšia biomechanická stabilita tejto kliečky v anteflexii a retroflexii. Rovnaký mechanizmus viedol k zvýšeniu segmentovej lordózy v období šiestich týždňov pooperačne v skupine pacientov stabilizovaných dlahou v dôsledku toho, že fyziologické zaťaženie pôsobilo proti ťahu dlahy. Pri neskorších kontrolách však nebol prítomný rozdiel medzi oboma skupinami v segmentovom sagitálnom profile. Celkový sagitálny profil nebol ovplyvnený vzhľadom k tomu, že išlo o implantácie v jednom alebo dvoch segmentoch [1]. Tento nález potvrdila aj štúdia autorov Barsu a Suchomela, ktorí sledovali sagitálny profil krčnej chrčtice po implantácii kliečky neistenej dlahou [30]. Kliečku Zero-P® sme používali na našom pracovisku od uvedenia implantátu do klinickej praxe v roku 2009. Použitie štyroch fixačných skrutiek zabezpečuje síce dostatočnú primárnu stabilitu kliečky, pri viac ako dvojsegmentových implantáciách však predlžuje dobu operácie. Použitie tejto kliečky v medzipriestore C2/3 je technicky limitované a pri implantácii do medzipriestoru C3/4 bolo technicky niekedy ťažké zaviesť fixačné skrutky do tela distálneho príľahlého stavca v dôsledku konfliktu trajektórie aplikácie skrutky s mandibulou. Podobný problém vznikal aj v segmentoch C6/7 a C7/T1 u pacientov s hyperstenickým habitom a veľkým obvodom hrudníka, keď bolo ťažké zaviesť fixačné skrutky do proximálneho tela príľahlého stavca v dôsledku konfliktu trajektórie aplikácie skrutky s manubriom sternu.

Zero Profile Variable angle

Zero Profile Variable angle™ (Zero-P VA™, DePuy Synthes, Švajčiarsko) predstavuje novú generáciu kliečky s integrovanou dlahou. Rovnako ako pri kliečke Zero-P® sa vyrába v troch tvarových vyhotoveniach (konvexné, lordotické a paralelné). Ku fixácii kliečky však slúžia len dve skrutky, ktoré sa dajú zaviesť pod variabilným uhlom a ich počet skrátuje operačný čas pri ošetrovaní viacerých segmentov. Zavedenie skrutiek

pod variabilným uhlom umožňuje použitie kletky pre ošetrenie pohybového segmentu priľahlého k primárne ošetrovanému segmentu pomocou konvenčnej krčnej dlahy. Na druhej strane však počet skrutiek znižuje primárnu stabilitu implantátu v porovnaní s kietkou Zero-P®. Medzi vylepšenia patrí aj zmena dizajnu integrovanej titánovej dlahy, ktorej tvar determinuje presnú ventrodorzálnu inzerciu kletky a eliminuje možnosť dorzálnej dislokácie. Po nástupe kostnej fúzie je možné realizovať odstránenie dlahy a skrutiek, pri súčasnom ponechaní vlastného tela kletky v medzistavcovom priestore. Opšenák et. al v 2018 v súbore pacientov na našej klinike s po implantácii ukotvenej kletky Zero - P VA™ zaznamenali dlhodobý pokles intenzity bolesti šije, bolesti horných končatín a zlepšenie kvality života pacientov. Incidencia intersomatickej fúzie bola porovnateľná s kietkami istenými konvenčnou krčnou dlahou a nebol dokázaný žiadny rizikový faktor ovplyvňujúci úspešnosť fúzie. Výskyt a charakter pooperačných komplikácií v súvislosti s operačným prístupom bol podobný ako u iných implantátov. Nepotvrdil sa preventívny efekt nulového profilu implantátu na incidencia pooperačnej dysfágie. Jediným rizikovým faktorom pre incidencia pooperačnej dysfágie bola preexistujúca dysfágia. Dislokácia kletky alebo fixačných skrutiek a zlomenie implantátu neboli zaznamenané. Nepotvrdil sa preventívny efekt stabilizácie kletky v intervertebrálnom priestore pomocou fixačných skrutiek na zanorenie implantátu. Zanorenie kletky nemalo významný vplyv na efekt operačnej liečby a incidencia intersomatickej fúzie. Rizikovým faktorom pre zanorenie kletky bola denzitometricky verifikovaná osteoporóza alebo osteopénia [2, 23].



Obr. 4 Nová generácia kletky s integrovanou dlahou - Zero Profile Variable angle™, zdroj: https://www.jnjmedicaldevices.com/sites/default/files/2019-07/H1_1.png
dátum prevzatia: 29.04.2020

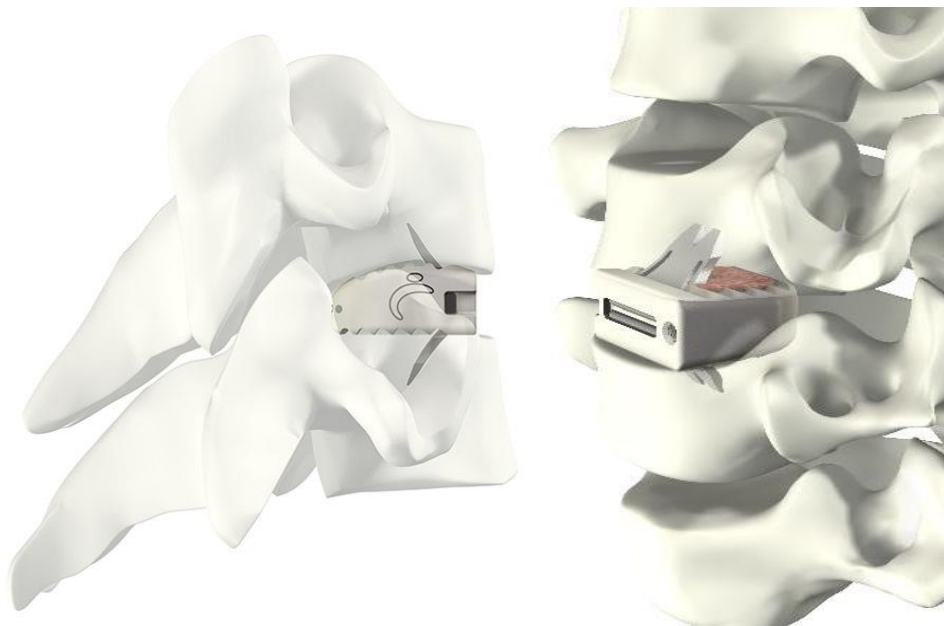
ROI – C

Zaujímavé riešenie primárnej stability kletky prináša kietka ROI-C® (LDR, Francúzsko) vo forme technológie VerteBRIDGE™. Jedná sa o unikátny systém ukotvenia kletky v medzistavcovom priestore pomocou dvoch fixačných kotiev, ktorých implantácia je veľmi jednoduchá. Nedochoádza ku konfliktom s anatomickými štruktúrami pri ich

zavádzaní v porovnaní s kliečkami Zero-P® a Zero-P VA™. Nedostatkem systému VerteBRIDGE™ je však nemožnosť odstránenia fixačných kotiev pri revíziných operáciách bez porušenia integrity kliečky a znehodnotenia implantátu. Konštrukcia kliečky umožňuje menší operačný prístup ako implantácia

klasickej prednej dlahy ale aj ako implantácia iných typov kliečok ukotvených pomocou skrutiek. Po implantácii sa dosahuje okamžitá stabilizácia a dokonca vzhľadom na systém ukotvenia nie je nutné pooperačné používanie goliera. Grasso et al. v prvej prospektívnej štúdií o použití kliečky s integrovanou dlahou ROI-C s následným sledovaním 9 rokov potvrdzuje bezpečnosť systému aj pri dlhodobých kontrolách. V koreláte s nedávnou metanalýzou poukazujú, že systémy s nulovým profilom majú nižšie riziko pooperačnej dysfágie ako kliečky fixované prednou krčnou dlahou [8, 12, 31]. Buccit et al. rovnako pri používaní systému ROI-C dokazujú vysokú mieru fúzie a nízky výskyt dysfágie (2,3%). Poukazujú najmä na výhody pri fúzií v úrovni C7-Th1, kde nie je nutné zasahovať kaudálnejšie ako po samotný disk. Iné štúdie s ROI -C hlásili podobne nízku incidenciu dysfágie (0-3,1%), kým naopak po ACDF s prednou krčnou dlahou bola incidencia až 35,1% [32]. Hoci zanorenie kliečky je jedným z hlavných problémov pri používaní kliečok s integrálnou dlahou, táto štúdia neuviedla žiadny prípad zanorenia. Rovnaký výsledok uvádzajú predchádzajúce štúdie, ktoré využívali rovnaký typ kliečky [5, 31-34].

Len málo štúdií porovnáva klinické a rádiologické parametre priamo medzi kliečkami Zero-P a ROI-C. Wu et. al. uvádzajú, že medzi kliečkami ROI- C a Zero-P nebol významný rozdiel v incidencii dysfágie ani v incidencii zanorenia kliečky. Výsledky ich práce potvrdzujú, že Zero- P a ROI-C dosahujú podobné klinické a rádiologické výsledky. Operačný čas je však dlhší pri kliečke Zero -P, čo vedie k zvýšenému riziku pooperačnej dysfágie (dlhšia doba ťahu na esophagus). Pokiaľ neboli brané do úvahy operované segmenty C3/4 a C6/7 nebol medzi týmito kliečkami žiadny rozdiel v trvaní chirurgického výkonu. Z dlhodobého hľadiska pri kliečke ROI - C dochádzalo k väčšej strate Cobbovho uhla [35-37].



Obr. 5 Kliečka ROI-C® (LDR, Francúzsko) s riešením primárnej stability vo forme technológie VerteBRIDGE™, zdroj: <http://fr.ldr.com/english/Products/Cervical/ROIC%C2%AECervicalCage>
dátum prevzatia: 29.04.2020

Záver

Klietky s integrovanou fixáciou predstavujú významný posun v operačnej liečbe degeneratívneho ochorenia krčnej chrbtice. Poskytujú dostatočnú biomechanickú stabilitu a nástup indukovanej fúzie porovnateľné s konvenčnými fixačnými systémami klietka-konvenčná predná krčná dlaha. Medzi ich výhody patrí redukcia incidencie a závažnosti pooperčnej dysfágie, kratší operačný čas a nižšia incidencia osifikácie príľahlých segmentov.

Literatúra

- [1] Vaněk, *Acta Chir Orthop Traumatol Czech*. **2011**, 78/6:562-567
- [2] Opšenák, *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. **2018**, 81/6:669-677.
- [3] Scholz, *Spine (Phila Pa 1976)*. **2009**, 34/2:156-160.
- [4] Opšenák, *Rozhledy v chirurgii*. **2019**, 98/3:115-120.
- [5] Hofstetter, *J Spinal Disord Tech*. **2015**, 28:284-290.
- [6] Opšenák, *Gastroenterologia hepatologia*. **2017**, 71/2:150-155.
- [7] Opšenák, *Neurológia pre prax*. **2017**, 18/2:92-95.
- [8] Xiao, *Eur Spine J*. **2017**, 26:975-84.
- [9] Yue, *Eur Spine J*. **2005**, 14:677-682.
- [10] Scholz, *Clin Orthop Relat Res*. **2011**, 469/3:666-673.
- [11] Azab, *Turk. Neurosurg*. **2012**, 22/5:611-617.
- [12] Scholz, *Acta Orthop Belg*. **2014**, 80/4: 558-566.
- [13] Rudinský, *Spinálna chirurgia*. *Slovak Academic Press*. **2006**, 36-147.
- [14] Martin, *Spine (Phila Pa 1976)*. **1999**, 24/9:852-858.
- [15] Thalgott, *Spine (Phila Pa 1976)*. **1999**, 24/13:1295-1299.
- [16] Nicolas, *Medicine (Baltimore)*. **2019**, 98/3.
- [17] Wang, *Eur Spine J*. **2015**, 24:148-154.
- [18] Lee, *CSRS 3. 32nd annual meeting*. Edited, Boston, MA. **2004**.
- [19] Fogel, *Spine J*. **2005**, 5/2:140-144.
- [20] Majid, *Clin Biomech*. **2012**, 27:532-536.
- [21] Stein, *Spine J*. **2014**, 14:128-136.
- [22] Chen, *Eur Spine J*. **2013**, 22:1539-1546.
- [23] Opšenák, *Neurológia*. **2019**, 14/1:20-23.
- [24] Johansson, *Clin Implant Dent Relat Res*. **1999**, 1:33-40
- [25] Cabraja, *BMC Musculoskelet Disord*. **2012**, 13:172.
- [26] Cheng, *Aesculap Implant Systems, Whitepaper*. **2013**, (ART 129 12/23).
- [27] Kuhn, *J Orthop Res*. **1989**, 7/6:876-84.
- [28] Ratner, *Academic Press*. **1996**.
- [29] Dhir, *J Bone Joint Surg*. **2012**, 94:142
- [30] Barsa, *Eur Spine J*. **2007**, 16:1395-1400.
- [31] Grasso, *J Craniovertebr Junction Spine*. **2018**, 9/2:87-92.
- [32] Bucci, *Med Devices (Auckl)*. **2017**, 10:61-69.
- [33] Grasso, *Eur Spine J*. **2014**, 23/ 6:650-657.
- [34] Yue, *Eur Spine J*. **2005**, 14:677-682.
- [35] Penghuan, *PREPRINT (Version 1) available at Research Square*. **2019**.
<https://doi.org/10.21203/rs.2.12368/v1>
- [36] Bohl, *Spine J*. **2016**, 16/3:335-342.
- [37] Wang, *Medicine (Baltimore)*. **2017**, 96/34:e7916.
- [38] Phan, *Orthopaedic surgery*. **2019**, 11:52-59.

Úloha neurogenézy hipokampu v rozvoji depresie

Parvanovová, P.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej
biochémie, Martin
parvanovova1@uniba.sk

Abstract

A depressive disorder is one of the serious health problems in terms of individual and societal. From an individual point of view, it brings a high degree of subjective suffering and reduced quality of life. In response to intrinsic and extrinsic stimuli, including stress and depression, those are related mostly to a vital feature of the brain, neural plasticity. According to clinical and basic research studies in correlations between depression and neural plasticity, there are present very complex pathophysiological processes involving the most sensitive areas affected by depression such as dentate gyrus, subiculum and cornu ammonis. Numerous studies point out the association between depression and structural changes in the hippocampus, such as reduced volumes as well as complicated interactions of many signal pathways, such as NMDA, glutamate, and glucocorticoid. On the other hand, the changes in neural plasticity induced by stress and other negative stimuli can contribute to the onset and development of depression. The majority of antidepressant treatments, including psychotherapies, physiotherapies, and medications, exert antidepressant effects associated with neural plasticity. Unfortunately, to date, no ideal and completely effective treatment has been found for depressed patients. Therefore, targeting neural plasticity in depression may lead to novel breakthroughs.

Keywords: depression, hipokampus, gyrus dentatus

Úvod

Na celom svete trpí depesiou viac ako 264 miliónov ľudí všetkých vekových skupín a sociálnych vrstiev. Depresia sa môže stať vážnym zdravotným stavom, najmä ak je dlhotrvajúca a strednej alebo silnej závažnosti. Z individuálneho hľadiska prináša vysokú mieru subjektívneho utrpenia a zníženej kvality života, či už pracovného i súkromného. Depresia je stav, ktorý je charakterizovaný stratou potešenia alebo záujmu o zvyčajne príjemné činnosti (anhedónia), spolu s radom ďalších symptómov, vrátane anergie, porúch spánku a chuti do jedla, stratou sebaúcty. Napriek rozsiahlym výskumom, presné neurobiologické procesy vedúce k depresii nie sú úplne pochopené. Je však všeobecne známe, že stresujúce životné udalosti patria medzi hlavné predispozičné rizikové faktory rozvoja depresie.

Schopnosť mozgu podstúpiť funkčne relevantné úpravy po vonkajších prípadne vnútorných stimuloch sa označuje ako nervová plasticita. Tieto dynamické procesy sú založené na schopnosti nervových systémov, mozgových jadier, jednotlivých neurónov, synapsí a receptorov prispôbiť sa a zmeniť svoj štrukturálny alebo funkčný repertoár v reakcii na zmeny vo vnútornom a / alebo vonkajšom prostredí [1]. Neurálna plasticita je nevyhnutná pre adekvátne fungovanie jedinca v neustále sa meniacom prostredí. Nie vždy je však prospešná, čo dokazuje zmena štruktúry a funkcie v mozgu pacientov s depesiou.

Hipokampus je už dlhodobo spájaný s patofyziológiou depresie [2]. Súčasné poznatky naznačujú, že depresia môže súvisieť práve s narušením štrukturálnej plasticity a

nervovej bunkovej odolnosti hipokampu [3]. Podľa dostupnej literatúry sú zmeny rozsiahlejšie u pacientov s recidívou, oproti pacientom u ktorých sa vyskytla prvá epizóda depresie. Tieto zistenia svedčia o procese postihnutia hipokampu u pacientov s depresiou. A preto by sa hipokampus mohol stať potenciálny, markerom progresie tohto ochorenia.

Od uverejnenia prvej správy, ktorá zistila menšie objemy hipokampu u pacientov s depresiou v porovnaní so zdravými kontrolami [4], sa v literatúre uskutočnili stovky štúdií, pričom väčšina túto skutočnosť potvrdili [5]. Z aktuálnych klinických a predklinických štúdií zatiaľ nie je možné rozhodnúť, či zlyhanie štruktúrnej plasticity je „príčinou, výsledkom alebo koreláciou depresie“ [6]. Odpoveď na tieto otázky je však rozhodujúca, aby bolo možné úplne pochopiť etiológiu a patofyziológiu porúch, ktoré sú významné a klinicky relevantné ako závažná depresia. Štúdie podporujúce úlohu epizód depresie vedúce k menším objemom hipokampu zistili, že so stratou objemu hipokampu je spojené dlhšie kumulatívne trvanie celoživotnej depresie, celkový počet opakujúcich sa epizód a skorší vek nástupu depresie [7]. Na druhej strane získané poznatky naznačujú pravdepodobnosť hypotézy smerujúcej opačným smerom. Štúdie podporujúce úlohu štruktúrneho poškodenia hipokampu v etiológii depresie zistili, že menší hipokampus predpovedá horší klinický výsledok a v dvojitych štúdiách sa zistili genetické vplyvy na mozgové štruktúry vrátane hipokampu [8].

Hypotéza neurotoxicity

Jedným z vysvetlení vzťahu medzi depresiou a menšími objemami hipokampu je hypotéza neurotoxicity [9], ktorá naznačuje, že dlhodobá expozícia glukokortikoidom zvyšuje zraniteľnosť neurónov, čím zvyšuje mieru poškodenia toxickými vplyvmi alebo bežným opotrebovaním. Podľa tejto hypotézy je zníženie objemu hipokampu kumulatívnym procesom pôsobenia dlhoročnej depresie alebo chronického stresu. Okrem abnormalít v osi HPA sa nedávno preukázalo, že k úbytku objemu hipokampu prispievajú aj ďalšie biologické abnormality: zníženie neurotrofických faktorov, najmä neurotrofický faktor odvodený z mozgu (BDNF), ktoré je vyvolané stresom, a tento faktor je neuroprotektívny [10]. Ďalším mechanizmom konzistentným so stratou objemu hipokampu pri opakujúcej sa depresii je faktor uvoľňujúci kortikotropín (CRF), ktorý má neurotoxické účinky. Tieto mechanizmy - glukokortikoidová toxicita, neurotoxicita CRF a strata BDNF, ktoré vedú k zvýšenej zraniteľnosti neurónov - sa vzájomne nevylučujú a všetky by mohli fungovať tak, aby spôsobili zmeny hipokampu.

Hypotéza zraniteľnosti

Táto hypotéza na rozdiel od hypotézy neurotoxicity naznačuje, že znížený objem hipokampu u dospelých nie je spôsobený kumulatívnou expozíciou depresiou alebo chronického stresu, ale skôr to, že znížený objem hipokampu je pre- existujúci rizikový faktor pre rozvoj tohto ochorenia.

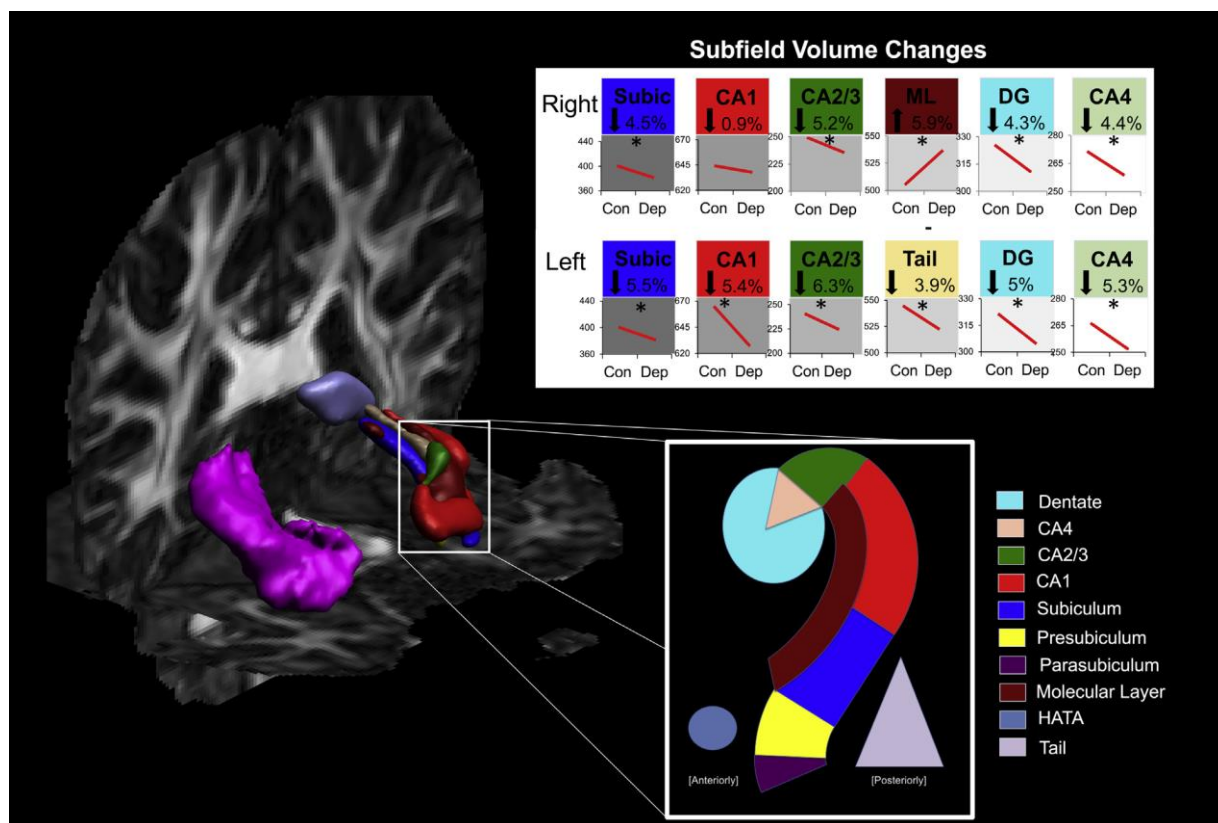
Gyrus dentatus

Unikátnym znakom hipokampálneho gyrus dentatus je prítomnosť neurogenézy dospelých, ktorá je sprevádzaná bunkovou smrťou, a teda vedie k nepretržitému bunkovému obratu v tejto oblasti mozgu. Akútna a chronická expozícia stresu môže potlačiť proliferáciu a prežitie neurónov generovaných v dospelosti [12]. Opakujúce sa depresívne epizódy vedú k zníženiu objemu a pravdepodobne k zníženiu hladín hipokampálnej neurogenézy. Mnohé štúdie preukázali silnú koreláciu medzi gyrus dentatus a progresiou opakujúcej sa depresie. Gyrus dentatus a hipokampus ako celok, majú inhibičný vplyv na funkciu osi hypotalamus - hypofýza - nadobličky. Táto

negatívna spätná väzba slúži na ukončenie stresovej reakcie a je regulovaná stresovými hormónmi produkovanými v nadobličkách, ktoré pôsobia na receptory glukokortikoidov a mineralokortikoidov, ktoré sú husto exprimované v bunkách gyrus dentatus. Stresové hormóny sú tiež rozhodujúce pre prežitie gyrus dentatus, pretože adrenalectómia vedie k selektívnej degenerácii buniek zrn [13]. Celkovo tieto údaje naznačujú, že gyrus dentatus je jedným z najcitlivejších miest v mozgu na stres a že tiež reguluje stresovú reakciu. Tieto zmeny sú čiastočne zvrátané terapiou antidepresívami, napríklad u tricyklického antidepresíva Tialeptín sa ukázali veľmi sľubné výsledky obnovenia plasticity, čo môže viesť k antidepresívnemu účinku.

Subiculum

Štrukturálna anomália v subikule by mohla mať dôsledky na patofyziológiu depresie. Subikulum prijíma vstupy z CA1 a iných hipokampových podpolí a je to pôvodcom mnohých výstupov z hipokampu, vrátane projekcií do ventromediálnej prefrontálnej kôry, talamu, hypotalamu a striata. Existujú tiež podstatné axonálne spojenia s inými limbickými štruktúrami, ako sú amygdala a entorhinalna kôra [14]. Abnormalita v subikule by mohla mať rozsiahle účinky v týchto štruktúrach. Ďalšia štúdia [15] poskytla dôkaz apoptózy v subikule u pacientov so závažnou depresívnou poruchou. U subjektov s poruchou nálady je potrebné ďalej charakterizovať štrukturálne a funkčné abnormality v subikulách a ďalšie súvisiace štruktúry.



Obr. 1 Výstup z programu FreeSurfer a % zmeny v jednotlivých subštruktúrach, pravý (magenta) a ľavý hipokampus (prevzaté [18]). Schématický priečný rez ľavým hipokampom, kde diagram znázorňuje relatívnu veľkosť subštruktúr. Con, kontrolná skupina; Dep, pacienti s depesiou; CA, cornu ammonis; DG, dentate gyrus; HATA, hippocampal amygdalar transition area; ML, molecular layer; Subic, subiculum.

Cornu amonis

Rôzne definície hipokampu sú známym problémom pri neuroimagingovom výskume [16], pričom doteraz sa použilo až 60 rôznych definícií. Variabilné objemy hipokampu môžu tiež predstavovať ťažkosti pri zovšeobecňovaní predklinického výskumu hipokampu v klinickej populácii. Základný výskum hipokampu často skúma funkciu hipokampu v individuálnych subštruktúrach. Veľkým prínosom je využitie magnetickej rezonancie, MRI metódy, ktorá umožňuje prepojenie základného výskumu s funkčným neuroimagingovým obrazom, kedy možno sledovať priamo funkčné zmeny v jednotlivých oblastiach hipokampu. Softvérový program, ako napríklad FreeSurfer 6.0 (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>) je možné využiť pre multimodálne T1- a T2 vážené MRI údaje, kedy s použitím pravdepodobnostného atlasu *in vivo* a *ex vivo* segmentácie je možné s lepšou presnosťou identifikovať ďalšie podoblasti [17].

Nedávna práca [18] naznačuje že ľavý cornu amonis (CA1) sa objavil ako potenciálny marker depresie. Práca popisuje, že pacienti s so závažnou depresívnou poruchou vykazovali obojstranný profil zníženia objemu v hlavných hipokampálnych subštruktúrach: cornu ammonis (CA1 – CA4), dentate gyrus a subikulum; pričom zmeny boli výraznejšie pri opakujúcej sa rekurentnej depresii. CA2 až CA4 boli jediné subštruktúry znížené pri prvej prezentácii ochorenia. Keďže zmeny boli rozsiahlejšie u pacientov s recidivujúcou formou ochorenia na rozdiel od prvej prezentácie depresie, toto svedčí o procese hipokampálneho ochorenia. Avšak celkové zmeny boli najvýraznejšie v ľavom CA1 a objem CA1 oblasti bol vyhodnotený ako prediktor trvania ochorenia.

Zhrnutie a záver

Depresia je oslabujúca a komplexná psychiatrická porucha, ktorá zahŕňa viaceré nervové okruhy a genetické i negenetické rizikové faktory. V snahe objasniť neurobiologický základ depresie sa ako kandidátový substrát objavila hipokampálna neurogenéza, a to tak pre etiológiu, ako aj pre liečbu. Depresia ovplyvňuje mnoho rôznych štruktúr mozgu, často v rôznom rozsahu. Aj keď podľa dostupnej literatúry sú zmeny najvýraznejšie v hipokampe, zmeny mozgu spojené s depresiou môžu byť prítomné v amygdale, jadre caudate, putamene a frontálnej kôre. Všetky tieto štruktúry sú značne vzájomne prepojené. Zahŕňajú neuroanatomický obvod nazývaný limbicko-kortikálny-striálny-palidálno-thalamický trakt. Avšak zmeny hipokampu, najmä CA1 oblasti je potrebné pozorovať v širšom kontexte, pretože je nepravdepodobné, že štrukturálne zmeny v samotnom hipokampe úplne vysvetľujú poruchu tak zložitú, ako je depresia.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: "Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení", ITMS kód projektu: 26220220153, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Zilles, *Ann Anat.* **1992**, 174:383-391.
- [2] Manji, *Nat Med.* **2001**, 7:541-547.
- [3] Lucassen, *Neuropharmacology.* **2010**, 58:940-949 .
- [4] Sheline, *Proc Nat'l Academy of Sciences USA.* **1996**, 93:3908-3913.
- [5] Sheline, *J Neuroscience.* **1999**, 19:5034-5043.
- [6] Gage, *Biol Psychiatry.* **2000**, 48:713-714.
- [7] MacQueen, *Mol Psychiatry.* **2011**, 16:252-264.
- [8] Peper, *Hum Brain Mapp.* **2007**, 28:464-473.
- [9] Sapolsky, *Endocr Rev.* **1986**, 7:284-301.

- [10] Mamounas, *Eur J Neurosci.* **1995**, 15:7929-7939.
- [11] Pham, *Eur J Neurosci.* **2003**, 17:879-886.
- [12] Samuels, *Eur J Neurosci.* **2011**, 33:1152-1159.
- [13] Dranovsky, *Behav Brain Res.* **2012**, 227:371-375
- [14] Amaral, *The Human Nervous System: Second Edition*, Elsevier Inc. **1990**, 871-914.
- [15] Lucassen, *Am J Pathol.* **2001**, 158:453-468.
- [16] Engelhardt, *Dement Neuropsychol.* **2016**, 10:58-62.
- [17] Iglesias, *Neuroimage.* **2015**, 115:117-137.
- [18] Darren, *Biological Psychiatry.* **2019**, 85:487-497.

Systémová vaskulitída detského veku

Neuschlová, M., Kompaníková, J.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav mikrobiológie
a imunológie, Martin
martina.neuschlova@uniba.sk

Abstract

Kawasaki disease is an acute vasculitis of unknown etiology predominantly affecting medium and small vessels that has a predilection for the coronary arteries. It is the leading cause of acquired heart disease in infants and young children in developed countries. In the course of the disease, the artery wall goes through several inflammatory histopathological phases. The prognosis is related to the development of coronary aneurysms.

Keywords: vasculitis, Kawasaki disease, coronary artery, aneurysm

Úvod

Kawasakiho choroba (KD) je akútna systémová vaskulitída detského veku, ktorú prvýkrát popísal japonský detský lekár Tomisaku Kawasaki v r. 1967 [1]. Prvý prípad mimo tohto územia bol zaznamenaný na Havaji v roku 1976 [2]. Ochorenie je typicky sprevádzané vysokou horúčkou, konjunktivitídou, enantémom sliznice ústnej dutiny a faryngu, kožným exantémom v rôznych oblastiach tela, opuchom dlaní a chodidiel a jednostranne zväčšenými krčnými lymfatickými uzlinami. Pôvodne bolo známe ako mukokutánný uzlinový syndróm, pretože sa počas ochorenia vyskytoval opuch lymfatických uzlín. O niečo neskôr boli popísané vážne komplikácie, vedúce k infarktu myokardu v detskom veku [1]. Približne u 15 až 25 % neliečených detí sa môže rozvinúť ischemická choroba srdca alebo môže dôjsť k náhlej smrti dieťaťa [3].

Na základe najznámejšej revízie medzinárodnej klasifikácie systémových vaskulitíd Chapel Hill Consensus Conference (CHCC2012) z roku 2012 bola zaradená KD medzi vaskulitídy postihujúce cievy stredného kalibru [4]. Podľa uvedenej nomenklatúry je definovaná ako arteritída u dojčiat a malých detí spojená s mukokutánnym uzlinovým syndrómom, prednostne poškodzuje cievy stredného a malého kalibru, koronárne artérie, ale môže zasiahnuť aj aortu a veľké artérie [4]. Táto nomenklatúra bola neskôr doplnená aj o kožné vaskulitídy [5].

Epidemiológia a etiológia

KD sa vyskytuje celosvetovo a je hlavnou príčinou ochorenia srdca u malých detí vo vyspelých krajinách [6]. Typicky sa vyskytuje u detí do 5 rokov, najčastejšie medzi 9-11 mesiacom [7]. Je zriedkavá u starších detí a dospelých. 1,5-krát častejšie postihuje chlapcov ako dievčatá [6]. Nízky výskyt ochorenia u dojčiat mladších ako 3 mesiace je pravdepodobne spôsobený ochranným vplyvom materských protilátok prenesených transplacentárne [8, 9]. Pozorovaná bola sezónnosť výskytu s prevahou v zimných a jarných mesiacoch [6].

Napriek dlhoročným výskumom nebola dodnes objasnená príčina KD. Existuje niekoľko teórií, ktoré naznačujú možný vplyv genetických faktorov, infekčnú aj imunopatologickú etiológiu, vplyv expozície environmentálnym alergénom, či patogénom prenášaných vetrom a vodou [6, 10-13]. Neexistuje však dôkaz, že by sa ochorenie prenášalo z človeka na človeka [12]. Na pravdepodobnosť vplyvu

genetických faktorov poukazuje zvýšený výskyt ochorenia u japonských detí, ako aj zvýšený výskyt u ich rodičov, medzi súrodencami a ďalšími rodinnými príslušníkmi [6]. Hoci sa ochorenie vyskytuje celosvetovo, viacerými štúdiami bol dokázaný až približne 10-krát vyšší výskyt ochorenia u japonskej a ázijskej populácie v porovnaní s kaukazskou populáciou. V tejto súvislosti bolo identifikovaných niekoľko génov alebo génových oblastí. Zistilo sa, že vnímavosť na KD je ovplyvnená polymorfizmami viacerých génov [6]. Ďalšou teóriou vzniku ochorenia je pôsobenie superantigénov ako spúšťačov imunitnej odpovede, pretože tieto dokážu aktivovať naraz veľké množstvo lymfocytov a spustiť masívnu produkciu prozápalových cytokínov. Úloha stafylokokových a streptokokových superantigénov však zostala nejednoznačná [10]. Vo včasných štádiách ochorenia sa zvyšuje počas aktivácie vrodenej imunitnej odpovede množstvo cirkulujúcich neutrofilov a interleukínov IL-1, IL-6, TNF- α a IFN- γ [8, 14]. Dôležitú úlohu v akútnej fáze KD pravdepodobne zohráva atypická aktivácia monocytov v periférnej krvi a ich diferenciácia na makrofágy, čo sa považuje za príčinu vaskulárnych lézií [10, 13]. Všeobecne akceptovanou hypotézou je, že KD je spúšťaná nejakým infekčným agensom, ktorý vyvolá aktiváciu imunitného systému u geneticky predisponovaných jedincov [8]. Až 40% detí s KD malo respiračnú vírusovú infekciu [15]. V priebehu niekoľkých desaťročí boli testované viaceré bakteriálne aj vírusové patogény ako potencionálne spúšťače ochorenia. Dodnes sa však nepodarilo identifikovať žiadnu konkrétnu baktériu alebo vírus ako vyvolávateľa. Existuje hypotéza, že by mohlo ísť o infekčného vyvolávateľa, ktorý spôsobuje bežnú respiračnú infekciu u veľkej väčšiny detí, môže sa ľahko šíriť a viesť v podskupine geneticky predisponovaných jedincov k vzniku KD [11]. Intenzívne sa tejto problematike venoval Rowley so spolupracovníkmi, ktorí analyzovali bronchiálny epitel v pitevnom materiáli pomocou imunohistochemických, imunofluorescenčných metód, transmisnou elektrónovou mikroskopiou a Real Time PCR a hoci sa im nepodarilo presvedčivo identifikovať žiadny známy mikroorganizmus, zistili, že v bunkách bronchiálneho epitelu sa nachádzali intracytoplazmatické inklúzne telieska. Tieto špecificky sa farbiace útvary sa vyskytujú v bunkách infikovaných niektorými vírusmi. Štruktúrne ide o nahromadenie stavebných jednotiek viriónov tvoriacich sa v bunke, avšak nejde ešte o kompletne vírusové častice. V tomto prípade boli pozorované iba v cytoplazme a obsahovali zhluky vírusu-podobných častíc, pričom ich morfológické znaky boli spoločné pre viaceré RNA vírusy. Na základe týchto zistení predpokladali, že existuje možnosť, že KD by mohla byť výsledkom pľúcnej infekcie nejakým zatiaľ neidentifikovaným RNA vírusom, ktorý je vo vysokej miere rozšírený vo svetovej populácii a u vnímavých detí sa môže šíriť intravaskulárne a viesť k rozvoju vaskulitídy s významným postihnutím koronárnych artérií. Prítomnosť intracytoplazmatických inklúzných teliesok homogénnej štruktúry považovali za možnú „stopu“ vírusovej infekcie, ktorá môže v organizme perzistovať [11].

Klinický obraz

KD je charakterizovaná ako systémový zápal v stredne veľkých cievach viacerých orgánov a tkanív počas akútnej febrilnej fázy a môže byť spojená s klinickými prejavmi v rôznych orgánoch [6]. Pacienti si zvyčajne vyžadujú dôsledné dlhodobé monitorovanie [16]. Ochorenie môže prebiehať ako klasická alebo inkompletná forma, a to vo viacerých fázach. Akútna fáza trvá prvé 2 týždne, dominuje horúčka, ktorá môže dosahovať až 40°C a trvá viac ako 5 dní. Podstatné je, že nereaguje na podávanie antibiotík. Medzi hlavné typické klinické príznaky v tejto fáze patria:

- difúzny exantém na koži rôznych častí tela
- edém a začervenanie na dlaniach rúk a na chodidlách

- konjunktivitída bez hnisania a začervenané bielka očí
- jednostranné zväčšenie krčných lymfatických uzlín v priemere 1,5 cm a viac.
- enantém ústnej dutiny, hrdla, popraskané pery, jahodovo sfarbený jazyk.

V subakútnej fáze, ktorá trvá približne od 2. do 4. týždňa, horúčka pozvoľna klesá, dochádza k periunguálnej deskvamácii pokožky prstov a dlaní, laboratórne je výrazná trombocytóza a v tomto období hrozí najvyššie riziko srdcových komplikácií. Vo fáze rekonvalescencie od konca 1. do 3. mesiaca sa postupne upravuje klinický stav pacienta, pacient sa zotavuje [6, 13].

Histopatologické procesy poškodenia cievnej steny

V priebehu ochorenia dochádza v stene ciev k niekoľkým histopatologickým procesom, ktorých výsledkom je poškodenie cievnej steny. Identifikované boli tri patologické procesy [6]:

1. fázou je nekrotizujúca arteritída, ktorá v prvých 2 týždňov po nástupe horúčok vedie k zápalu s infiltráciou neutrofilmi. Je to samolimitujúci proces, pri ktorom dochádza k progresívnemu poškodzovaniu cievnej steny až po adventíciu a zodpovedá za vznik aneuryziem.

2. fázou je subakútna vaskulitída, ktorá síce začína v prvých 2 týždňoch po vzostupe teploty, ale u malej časti pacientov môže pretrvávať mesiace až roky. Charakterizovaná je infiltráciou lymfocytmi, plazmatickými bunkami, eozinofilmi a makrofágmi.

3. fáza je luminálna myofibroblastická proliferácia, ktorá sa začína v prvých dvoch týždňoch a pretrváva mesiace až roky. Postihuje bunky hladkej svaloviny médiu cievnej steny a môže viesť k progresívnej arteriálnej stenóze [6]. Následky poškodenia koronárnych artérií závisia od závažnosti lézie. Veľmi mierne dilatované a zapálené artérie sa môžu vrátiť do normálu. Ale pri veľkých vakovitých aneuryzmách, kde došlo k strate intímy, médiu aj k strate lamina elastica cievnej steny, už nie je možná regenerácia. Hrozí riziko pretrhnutia zostávajúcej adventície obrovských aneuryziem najmä v prvých 2-3 týždňoch po vzostupe horúčok, alebo dochádza k trombotizácii, prípadne rekanalizácii a tvorbe kalcifikátov v okrajových častiach vo zvyškoch adventície. Vo fusiformných aneuryzmách s čiastočne zachovanou médiou môže dôjsť k trombotizácii alebo k progresívnej arteriálnej stenóze spôsobenej luminálnou myofibroblastickou proliferáciou. Uvedené procesy môžu vyústiť do infarktu myokardu [6, 17, 18] alebo ischemickej choroby srdca už v detskom veku [3].

Diagnostika

V súčasnosti neexistujú špecifické laboratórne ukazovatele, ktoré by jasne potvrdili túto diagnózu. Z laboratórnych nálezov bývajú zvýšené ukazovatele zápalovej aktivity. (sedimentácia erytrocytov, C-reaktívny proteín), zvýšená je hladina leukocytov s prevahou neutrofilov. Z ďalších nálezov sú zistené anémia, nízka hladina sodíka a albumínu v sére, zvýšené pečenné enzýmy, sterilná pyúria a od druhého týždňa ochorenia výrazná trombocytóza [3, 6, 8]. Keďže ide o nešpecifické ukazovatele, na stanovenie diagnózy je nutná vždy prítomnosť niekoľkých hlavných kritérií. Hlavné klinické príznaky nemusia byť všetky naraz prítomné, čo sťažuje diagnostiku. Pri klasickej forme KD je to vždy prítomnosť horúčky najmenej 5 dní a súčasne najmenej 4 z piatich hlavných príznakov [6, 18]. Problém pri stanovení diagnózy nastáva pri tzv. inkompletnej forme, kedy chýbajú typické hlavné klinické prejavy, čo spravidla sťažuje a oddiali určenie správnej diagnózy a začiatok adekvátnej liečby, čím sa zvýši riziko vzniku závažných komplikácií. Diagnóza inkompletnej KD by mala byť zvážená u každého dieťaťa s dlhotrvajúcou nevysvetliteľnou horúčkou a menej ako 4 z hlavných

klinických príznakov a s adekvátnymi laboratórnymi a echokardiografickými nálezmi. Pre tieto prípady bol skupinou odborníkov v r. 2017 vypracovaný podrobný algoritmus ako postupovať pri diagnostikovaní inkompletnej formy KD [6].

Liečba

Ukázalo sa, že prognóza ochorenia významne závisí od toho, ako rýchlo sa začne liečba. V prípade včasného podania intravenózných imunoglobulínov (IVIG) a vysokých dávok kyseliny acetylsalicylovej v akútnej fáze ochorenia sa významne znižuje riziko tvorby aneuryziem koronárnych ciev z 25% na 4% [3, 6]. Mechanizmus pôsobenia IVIG síce nie je celkom objasnený, ale zistilo sa, že znižujú absolútny počet cirkulujúcich monocytov/makrofágov [19]. Pri zlyhaní tejto iniciálnej liečby sa pristupuje k opakovanému podaniu IVIG, alebo kombinácii IVIG s kortikosteroidmi, alebo k aplikácii antagonistov TNF- α (infliximab). Ak zlyhá aj táto liečba, pristupuje sa k podaniu cyklosporínu alebo inej alternatívnej liečby: cyklofosfamid, anakinra, výmena plazmy [3, 6, 8]. S liečbou sa má začať čo najskôr po stanovení diagnózy, najlepšie do 10 dní od nástupu horúčky, kedy sa najvýznamnejšie znižuje riziko poškodenia koronárnych artérií. Ale aj pacienti, u ktorých sa ochorenie diagnostikovalo neskôr, by mali podstúpiť túto liečbu, ak majú zvýšenú zápalovú aktivitu, pretrvávajúcu horúčku nejasnej etiológie alebo majú aneuryzmy koronárnych artérií. Tiež pacienti s recidivujúcou KD by mali podstúpiť štandardnú liečbu IVIG a kyselinou acetylsalicylovou [3, 6].

Záver

Napriek úsiliu mnohých vedcov zostáva príčina KD stále neznáma. Táto primárna systémová vaskulitída sa môže prejavovať širokým spektrom príznakov, čo sťažuje diagnostiku a neexistujú ani jednoznačné špecifické laboratórne ukazovatele. KD je potrebné rýchlo a správne diagnostikovať a včas začať s liečbou, aby sa predišlo závažným komplikáciám, vrátane dilatácie koronárnych artérií a aneuryziem, ktoré ohrozujú život dieťaťa, a môžu viesť k infarktu myokardu alebo ischemickej chorobe srdca u detí. Včasnou diagnostikou a adekvátnou liečbou je potrebné predchádzať trvalému poškodeniu koronárnych artérií, pretože diagnóza stanovená príliš neskoro môže mať fatálne následky pre pacienta.

Podporené projektmi KEGA 038UK-4/2019 a KEGA 032UK-4/2019 MŠVVaŠ SR.

Literatúra

- [1] Kawasaki, *Jpn J Allergol.* **1967**, 16:178-222.
- [2] <https://www.cdc.gov/kawasaki/about.html> Updated April 28. **2020**.
- [3] Newburger, *Pediatrics.* **2004**, 114/6:1708-1733.
- [4] Jennette, *Arthritis Rheum.* **2013**, 65/1:1-11.
- [5] Sunderkötter, *Arthritis Rheumatol.* **2018**, 70/2:171-184.
- [6] McCrindle, *Circulation.* **2017**, 135/17:927-999.
- [7] Yashiro, *J Epidemiol.* **2010**, 20/4:302-307.
- [8] Dimitriades, *Curr Rheumatol Rep.* **2014**, 16/6:423.
- [9] Gedalia, *Curr Rheumatol Rep.* **2007**, 9/4:336-341.
- [10] Matsubara, *Clin Exp Immunol.* **2005**, 141/3:381-387.
- [11] Rowley, *J Infect Dis.* **2011**, 203:1021-1030.
- [12] Manliot, *PLoS ONE.* **2018**, 13/2:e0191087.
- [13] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537163/> Updated April 30. **2020**.
- [14] Meissner and Leung, *Ped Infect Dis J.* **2000**, 19:91-94.
- [15] Turner, *Pediatrics.* **2015**, 136/3:609-614.
- [16] Denby, *Heart.* **2017**, 103 (22): 1760-1769.
- [17] Orenstein, *PLoS One.* **2012**, 7:38998.
- [18] Kaldarárová M. *Kardiolog Prax.* **2018**, 16/3:158-163.
- [19] Furukawa, *Eur J Pediatr.* **1990**, 150:43-47.

Klinické a histopatologické prejavy psoriázy

Kunertová, L., Mellová, Y., Výbohov, D.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin
kunertova@lefa.sk

Abstract

Psoriasis vulgaris is a primary inflammatory skin disease with a chronically stationary or acutely exacerbating course [1]. The etiology of this disease is multifactorial and not entirely clear, but genetic predisposition, endogenous and exogenous provocative factors [1, 2] contribute significantly to the prevalence. Psoriasis signs and symptoms can vary from person to person. Common signs and symptoms include red patches of skin covered with thick, silvery scales, small scaling spots, commonly seen in children, dry, cracked skin that may bleed, itching, burning or soreness, thickened, pitted or ridged nails, swollen and stiff joints. The pathogenesis of psoriasis includes hyperproliferation of keratinocytes with abnormal differentiation along with inflammatory infiltration of T-cells in epidermis and dermis [3, 4], dysregulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. The great importance in angiogenesis and lymphangiogenesis has growth factor. Growth factor active in angiogenesis, and endothelial cell growth, stimulating their proliferation and migration and also has effects on the permeability of blood vessels, venous and lymphatic vascular systems during embryogenesis, and also in the maintenance of differentiated lymphatic endothelium in adults.

Keywords: psoriasis, angiogenesis, lymphangiogenesis, changes of keratinocytes, inflammatory cells

Úvod

Psoriáza je imunitne sprostredkované zápalové ochorenie kože charakterizované zhrubnutím epidermy v dôsledku proliferácie keratinocytov [1, 4, 5], infiltrácie zápalových buniek [6, 7] a zvýšenej vaskularity kože [8, 9]. Existujú rôzne formy psoriázy, ktoré sa odlišujú podľa miesta výskytu a vzhľadu ložiska. Výskyt a rozloženie psoriatických ložísk je rôznorodé.

Ložisková psoriáza – psoriasis vulgaris je najčastejšia forma psoriázy, postihujúca 95 percent ľudí s týmto ochorením. Choroba sa môže vyskytovať na rozličných miestach tela, líšia sa počtom a veľkosťou a môžu byť tenké i hrubé. Škrabanie má za následok objavenie sa drobných kvapôčok krvi. Ložiská sa často nachádzajú na vonkajšej strane horných a dolných končatín, hlavne na oboch lakťoch alebo kolenách.

Psoriasis guttata - pre túto formu psoriázy sú typické malé červené šupinaté bodky, ktoré vyzerajú ako kvapky vody rozprsknuté po tele. Častejšie sa vyskytuje u detí. Tento typ má sklon spontánne vymiznúť po niekoľkých týždňoch a môže sa opätovne objaviť v rovnakej podobe alebo ako klasická ložisková psoriáza.

Psoriasis nummularis sa vyznačuje okrúhlymi ložiskami s priemerom až niekoľkých centimetrov. Tvarom a veľkosťou sa podobajú minci.

Psoriasis pustulosa. Tento druh postihuje menej ako 10 percent pacientov. Môže sa objaviť ako komplikácia ložiskovej psoriázy alebo ako dôsledok užívania alebo náhleho vysadenia istých liekov. Lézie charakterizujú skalené pľuzgieriky naplnené hnisom, bez prítomnosti infekcie. Najčastejšie bývajú postihnuté dlane rúk, šľapy, prsty a nechty.

Psoriasis erythrodermica postihuje väčšinu plochy tela a kožu pokrývajú červené, odšupujúce sa plochy. Ojedinele sa môžu vyskytnúť na postihnutých plochách pluzgieriky so sterilným hnisovým obsahom.

Psoriasis arthritica. Po niekoľkých rokoch od vypuknutia psoriázy môže pacienta postihnúť psoriasis arthropatica. Ide o zápalovú, chronickú artritídu s rôznym stupňom postihnutia kĺbov.

Psoriasis

Podľa najnovších poznatkov je psoriáza polygénne ochorenie považované za ochorenie s primárnou poruchou keratinizácie, s epidermálnou hyperpláziou a poruchami diferenciácie keratinocytov v kvalitatívnom (parakeratóza) aj kvantitatívnom (hyperkeratóza) zmysle. K ďalším typickým prejavom patrí akumulácia zápalových buniek a nadmerná angiogenéza a lymphangiogenéza so zväčšenými, kľukatými a hyperpermeabilnými dermálnymi krvnými cievami [7]. Jednou z prvých prejavov pri vývoji psoriatických plakov je práve rozšírenie vaskulárnej siete, ktoré sa vyskytuje ešte pred vznikom epidermálnych zmien [8, 9] a pretrváva aj po odznení klinických prejavov. Hlavnými stimulačnými faktormi angiogenézy a lymphangiogenézy sú predstavitelia skupiny VEGF (vaskulárny endotelový rastový faktor), predovšetkým VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F a placentárny rastový faktor [10, 11].

Pre psoriázu sú typické poruchy diferenciácie keratinocytov, čo dokazuje zvýšená prítomnosť cytokeratínu, ktorý je spojený s vyššou proliferáciou a na druhej strane s nižšou tvorbou diferencovaného keratínu. Príčina porúch epidermálnej proliferácie a diferenciácie však nie je zatiaľ presne objasnená. Predpokladá sa že hlavnou príčinou je porucha homeostázy v epidermis, pravdepodobne vyvolaná zmenami v systéme cAMP/cGMP, ktoré pôsobia chemotakticky na zápalové bunky a stimulačne na proliferačnú aktivitu keratinocytov. Proliferačnú aktivitu keratinocytov podporuje aj prítomnosť rastových faktorov ako EGF (epidermal growth factor) a TGF- α (transforming growth factor – α) [1]. Zmenené psoriatické keratinocyty sú rezistentné voči apoptóze.

Psoriáza je ochorenie viazané na T-lymfocyty a má tri charakteristické fázy. Prvá fáza prebieha v epidermis a regionálnych lymfatických uzlinách, kde prichádzajú antigén prezentujúce bunky do kontaktu s nešpecifikovaným antigénom resp. superantigénom. Antigén prezentujúce bunky následne dozrievajú a migrujú do regionálnej lymfatickej uzliny, kde prebieha interakcia s nezrelými T-lymfocytmi, čo vyúsťuje do ich diferenciácie. Druhá fáza prebieha v cievach, nastáva po aktivácii a diferenciácii T-lymfocytov, keď dochádza k migrácii periférnou krvou a k adhezii k cievnej stene. Po adhezii k cievnej stene T-lymfocyty prestupujú do dermis a migrujú aj do epidermis. V epidermis produkujú cytokíny, ktoré zasa zvyšujú proliferáciu keratinocytov [1, 6]. Tretia fáza - reaktivácia T-buniek v epidermis a dermis, je opakovaním procesu aktivácie T-lymfocytov antigén prezentujúcimi bunkami [6]. Keratinocyty na svojom povrchu aktivujú adhezívne receptory, čím uľahčujú epidermálnu infiltráciu imunitnými bunkami. T-lymfocyty stimulované antigén prezentujúcimi bunkami aktivujú cytotoxické T-lymfocyty, ktoré sú schopné poškodzovať a likvidovať keratinocyty navodením apoptózy tým, že uvoľnia perforín a granzým B. Perforín vytvorí póry v cytoplazmatickej membráne a granzým B po uvoľnení do cytoplazmy bunky indukuje proces apoptózy. Tieto typy buniek majú v procese patogenézy psoriázy dôležitú regulačnú funkciu. Aj keratinocyty sú schopné regulovať zápalovú reakciu, nakoľko po aktivácii cytokínmi exprimujú chemotaktické faktory ovplyvňujúce migráciu zápalových buniek [6].

V patogenéze psoriázy má významnú úlohu aj mikrocirkulácia. V počiatočnej fáze fyziologickej angiogenézy a lymphangiogenézy je vzrast hladiny stimulujúcich faktorov v koincidencii so zníženou hladinou inhibítorov. Počet endotelových buniek podliehajúcich apoptóze klesá vďaka redukovanej hladine inhibítorov angiogenézy a lymphangiogenézy a zvyšujúcej sa rezistencii endotelových buniek na proapoptotické účinky inhibítorov. Keď sú metabolické nároky tkaniva nasýtené, hladina stimulujúcich faktorov v tkanive klesá a hladina inhibítorov začína rásť, čo vedie k ukončeniu procesu. Proces fyziologickej angiogenézy a lymphangiogenézy trvá dni až týždne. Patologickú charakterizuje proťahovaná odpoveď na signály, a preto môže pretrvávať mesiace až roky [16, 17]. Cievky, ktoré sú vytvorené za patologických podmienok môžu vykazovať morfológické a funkčné odlišnosti od fyziologických ciev [18].

V klinickom obraze sa psoriáza prejavuje najskôr prítomnosťou solitárnych alebo mnohopočetných malých červenastých makúl, ktoré sa postupne rozvíjajú do zreých ostro ohraničených erytematóznych plakov s charakteristickými strieborno-bielymi šupinkami na povrchu, ktoré sa môžu spontánne odlučovať. Traumatické odstránenie šupinek spôsobí bodkovité krvácanie, pretože sa narušia kapiláry v dermálnych papilách. Predilekčné miesta psoriatických lézií sú oblasti nad extenzormi, lakťe, kolená, kapilícium, ale aj ušnice, dlane, stupaje, či nechty. Nové lézie sa vytvárajú aj na miestach vystavených častým mechanickým traumám. Opísaný klinický obraz je typický pre psoriasis vulgaris, ale psoriáza má aj osobité formy ako sú psoriasis pustulosa a psoriasis arthropathica [2]. Psoriasis vulgaris môže prebiehať v troch typoch a to ako eruptívno- exantematická forma, chronicko- stacionárna forma a exsudatívna forma [1].

Histopatologický obraz závisí od vývojového štádia psoriatickej lézie. Vo včasných štádiách, je viditeľný perivaskulárny lymfocytárny infiltrát, makrofágy a výraznejšie cievne štruktúry v edematózných papilách. V epidermis je akantóza ale bez parakeratózy. Neskoršie štádia sa vyznačujú už epidermálnou hyperpláziou s parakeratózou, infiltráciou neutrofilov a tvorbou Munrových mikroabscesov. V zrelom psoriatickom plaku dominuje epidermálna hyperplázia, akumulácia zápalových buniek a kapilárne zmeny plexus superficialis. Epidermálna hyperplázia má znaky parakeratózy, spongiózy, hypogranulózy a akantózy. V stratum basale nachádzame bazaloidnú hyperpláziu a časté sú suprabazálne mitózy. Zápalové bunky sa hromadia perivaskulárne v dermis, ale môžu sa cez hroty papíl presunúť aj do epidermis. Dermálne papily sú typicky predĺžené smerom k povrchu lézie s rozšírenými a stočenými kapilármi. Priamo nad výrazne predĺženými dermálnymi papilami je epidermis iba tenká a fragilná, pričom pri jej poškodení resp. odlúpnutí môže dôjsť ku krvácaniu poranením ciev zasahujúcich až tesne pod dermo-epidermálnu junkciu [1, 6, 9]. Mikrovaskulárne zmeny v psoriatických léziách už v skorých fázach vývoja psoriatických lézií a sú prítomné iba na cievach povrchovej spleti – plexus subpapillaris [9]. Kapilárne zmeny samotné síce nie sú príčinou vývoja psoriatických lézií, ale výrazne prispievajú k pretrvávaniu psoriatických lézií. O úlohe a zmenách lymfatickej mikrocirkulácie je zatiaľ známych iba málo informácií. Je ale pravdepodobné, že tak ako má lymfangiogenéza úlohu v experimentálnom zápale, mohla by byť súčasťou zápalového procesu aj pri psoriáze.

Záver

Psoriáza nie je iba kozmetický problém, ale pretrvávajúce, chronické a často stresujúce ochorenie, ktoré môže ovplyvniť aj tie najjednoduchšie činnosti každodenného života, preto je dôležitá včasná a správna diagnóza a následne nastavenie správnej a účinnej terapie. Toto je komplexný proces zahŕňajúci

pochopenie etiopatogenézy, histopatológie tohto ochorenia, je potrebné určenie stupňa závažnosti ochorenia, posúdenie rozsah postihnutia, intenzitu prejavov, funkčné obmedzenie, kvalitu života pacienta a účinnosť predchádzajúcej liečby. Ľahkú formu psoriázy charakterizuje výskyt stacionárnych ložísk na predilekčných miestach. Plošný rozsah postihnutia pri ľahkej psoriáze nepresahuje 5% telesného povrchu. Pri ťažkej forme psoriázy je postihnutých viac ako 10% telesného povrchu alebo index rozsahu a závažnosti PASI (psoriasis area and severity index) je vyšší ako 12 [6].

Literatúra

- [1] Braun-Falco, *Martin: Vydavateľstvo Osveta*, **2001**, 1474 s., ISBN 8080630801
- [2] Buchvald, *Martin: Vydavateľstvo Osveta*, **1992**.
- [3] Chaudhari, *Lancet*. **2001**, 357:1842-1847.
- [4] Bos, *British Journal of Dermatology*. **2005**, 152:1098-1107.
- [5] Griffiths, *Lancet*. **2007**, 370:263-271.
- [6] Péč, *Banská Bystrica : Dali.*, **2006**, 182 s., ISBN 9788089090211
- [7] Braverman, *Invest Dermatol*. **1977**, 68:53-60.
- [8] de la Brassinne, *Acta Derm Venereol*. **1975**, 55:171–174 .
- [9] Creamer, *Angiogenesis*. **2002**, 5:231-236.
- [10] Detmar, *Journal of Investigative Dermatology*. **1995**, 105:44-50.
- [11] Takahashi, *Clinical Science*. **2005**, 109:227-241.
- [12] Hirakawa, *J Dermatol Sci*. **2004**, 35:1-8.
- [13] Banerji, *J Cell Biol*. **1999**, 144:789-801.
- [14] Jackson, *Trends Immunol*. **2001**, 22:317-321.
- [15] Astarita, *Frontiers in Immunology*. **2012**, 3:283.
- [16] Carmeliet, *Nature Medicine*. **2003**, 9:653-660.
- [17] Polverini, *Journal of Dental Education*. **2003**, 66:962-975.
- [18] Nagy, *J Exp Med*. **2002**, 196:1497-1506.

K histologickému pozadiu nádorovej progresie

Mešťanová, V., Csizmárová, S., Krajňáková, B., Adamkov, M.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie
a embryológie, Martin
veronika.mestanova@uniba.sk

Abstract

Directed migration of cancer cells into surrounding microenvironment, is one of the cancer-specific features and usually represents the progression of disease into another stage – metastasis. To invade into underlying tissue, tumour cells must acquire invasive, more aggressive morphology and phenotype. The process of transformation is called the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Depending on the key structural features of adjacent extracellular matrix (ECM), tumour cells might possibly switch into either mesenchymal or amoeboid type of migration. This cellular plasticity is regulated via various signaling pathways facilitating the intercellular junction complexes in/stability, cytoskeleton reorganisation and ECM remodeling. Under control of EMT, the aforementioned processes might become a life-threatening combination resulting in distant metastasis development, subsequently worse prognosis and overall outcome for the oncological patient.

Keywords: tumour progression, invasivity, epithelial-mesenchymal transition, epithelial-amoeboid transition

Úvod

Metastazovanie predstavuje významný prejav nádorového ochorenia a kľúčový krok v progresii nádoru [1]. Je to komplexná kaskáda striktna na seba naväzujúcich procesov potenciálne vyúsťujúcich do ťažkého zlyhávania orgánov, často s fatálnymi následkami. Aktivácia invazivity alebo riadeného prestupu nádorovej bunky, prípadne skupiny nádorových buniek do okolitého tkaniva je významným spúšťačom a zároveň nosným faktorom metastazovania primárneho nádoru [2, 3]. Z pohľadu morfológie ide o transformáciu alebo stratu medzibunkových spojovacích komplexov nádorovej bunky / buniek s okolím, čím dochádza k výraznému rozvratu lokálnej homeostázy, odlúčeniu malígnej bunky / buniek z nádorovej masy. Invadujúca bunka / bunky súčasne nadobúdajú schopnosť aktívneho pohybu a narušením kontinuity prirodzenej bariéry v podobe bazálnej membrány prenikajú do okolitých štruktúr [4-6]. Konečné štádium nádorovej progresie, čiže založenia sekundárneho ložiska vo vzdialených tkanivách a orgánoch, je determinované širokým spektrom procesov, ako je modifikácia vlastností a charakteru extracelulárnej hmoty (ECM) pod vplyvom invadujúcej nádorovej bunky / buniek, intravazácia, schopnosť prežitia nádorovej bunky / buniek v krvnej, resp. lymfatickej cirkulácii, následná extravazácia, únik z imunologického dohľadu, časté nadobudnutie chemo / rádiorezistencie a zároveň renesancia tzv. „stemness“, čiže črty typickej pre kmeňové bunky, ktorá je pravdepodobne zodpovedná za reštart princípu klonality definujúceho iniciáciu ako aj ďalšiu progresiu nádoru, či relaps ochorenia [7-9].

Perzistujúci a zdanlivo nezávislý rast lézie je významne podmienený interakciami so štruktúrami ECM. Nezriedka práve fenotypovo agresívnejšie bunky invazívneho okraja lézie iniciujú remodeláciu mikroprostredia a aktívne sa tým snažia získať akúsi konkurenčnú výhodu oproti ECM, v ktorej sa spúšťajú procesy pre zachovanie

histologicko-funkčnej integrity [10, 11]. Popri pasívnej invazivite nádoru, kedy bunky prenikajú do okolitého tkaniva pod vplyvom iných proliferujúcich buniek lézie (expanzívny rast), či pod vplyvom zvyšujúcej sa hustoty ECM v dôsledku akumulácie fibronektínu a kolagénu syntetizovaných s nádorom asociovanými fibroblastami, vedecké práce popisujú aj aktívny invazívny rast, migráciu a rozsev nádorových buniek [12]. Schopnosť nádorových buniek prestúpiť do okolitého tkaniva je závislá na rôznych molekulových a bunkových mechanizmoch, ktoré sú asociované s biologickým fenoménom označovaným ako epiteliálno-mezenchýmová tranzícia (EMT).

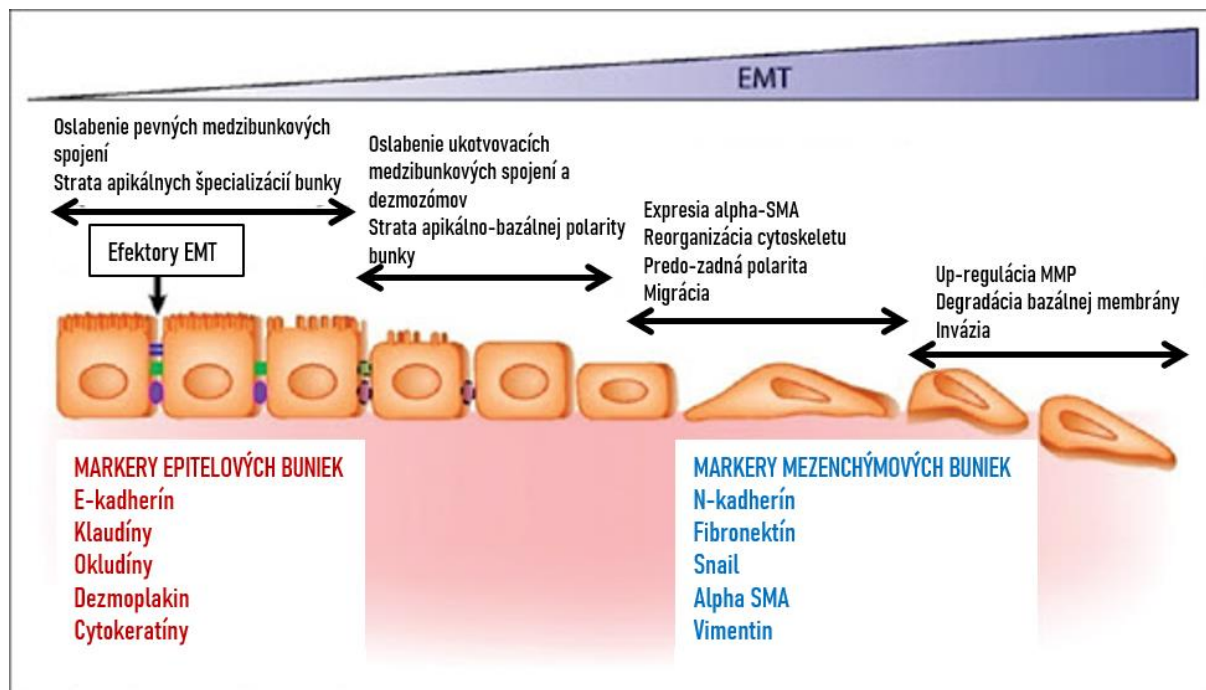
Epiteliálno-mezenchýmová tranzícia – program viacerých tvárí

Vzhľadom k biologickému kontextu výskytu epiteliálno-mezenchýmovej tranzície (EMT), odborná literatúra klasifikuje tri hlavné typy: typ I asociovaný s embryogenézou, typ II s hojením rán a typ III s patológiou nádorov [13]. Práve posledný typ EMT súvisiaci s biologickým chovaním nádorových buniek sa stáva nosnou témou vedeckých štúdií, keďže stratégie metastazovania primárnych lézií sú mimoriadne komplikované, s prihliadnutím na niekoľkoúrovňovú reguláciu tohto komplexného procesu a možnému „prepínaniu“ medzi jednotlivými typmi EMT vďaka značnej adaptabilite a plasticite buniek [5, 8]. Predložený príspevok sumarizuje najmä histomorfologické modifikácie epitelových buniek podstupujúcich mezenchýmovú alebo améboidnú transformáciu.

Počas karcinogenézy, transformácia buniek solídneho tumoru môže byť indukovaná rôznymi onkogénmi. Nádorové bunky sa v priebehu EMT dezintegrujú z epitelovej vrstvy v dôsledku narušenia pevných medzibunkových spojení a straty expresie markerov bunkovej adhezivity (napr. E-kadherin, integríny,...), čo má za následok zmenu apikálno-bazálnej polarite bunky. Aktínový cytoskelet bunky podlieha remodelácií vyúsťujúcej do tvorby „stresových“ vlákien s akumuláciou v blízkosti plazmatickej membrány, čím sa podieľajú na formovaní špecifických bunkových výbežkov - lamellipodií. Simultánne s popísanými dejmi dochádza k degradácii bunkovej membrány epitelu, čím sa pre nádorové bunky s nízkou až absentujúcou schopnosťou adhézie otvára cesta do okolitého spojivového tkaniva, spravidla s bohatou cievnu a lymfatickou cirkuláciou [5, 14]. Taddei a kol. [15] pripisuje aktiváciu EMT signálnym dráham s kľúčovými transkripčnými faktormi TWIST, Snail a Slug, ktoré popri uvedených modifikáciách aktivujú proteolytickú degradáciu ECM štruktúr sekréciou proteáz (napr. matrix metalloproteinázy [MMP], serin, katepsiny). Súčasne zachovávajú funkciu receptorov pre integríny – proteíny podieľajúce sa na tvorbe fokálnych kontaktných miest medzi nádorovou bunkou a ECM. Podstatným krokom v EMT procese je aktivácia expresie vimentinu – typického antigénu pre bunky mezenchýmového typu, čo v kombinácii s uvedenými markermi napomáha rozvoju migračného potenciálu a tým zvyšuje invazivitu transformovaných nádorových buniek [16].

Nádorové bunky invadujúce do okolitých štruktúr prostredníctvom mezenchýmového typu migrácie môžu za určitých podmienok zmeniť svoj fenotypový charakter a spôsob pohybu na améboidný [5]. Takýto prerod môže stimulovať intenzívna interakcia, cross-talk medzi nádorovými bunkami a zmenenými podmienkami ECM (usporiadanie vláknitej zložky, zmeny v pomeroch amorfnej zložky, chemické väzby medzi jednotlivými komponentami ECM). Améboidný mechanizmus migrácie nádorových buniek sa vyznačuje zníženou väzobnosťou na ECM a poklesom proteolytickej aktivity rozrušujúcej ECM. Améboidné bunky sa vyznačujú okrúhlym tvarom, typickou morfológickou plasticitou, adaptáciou tvaru existujúcim štruktúram okolitej ECM.

K relokácií dochádza tvorbou drobných cytoplazmových mechúrikov, ktoré skúmajú mikroprostredie migrujúcej bunky s cieľom nájsť najvhodnejšiu „trasu“ v rámci ECM. Táto vlastnosť bunky s améboídnym typom migrácie si vyžaduje reorganizáciu aktínového cytoskeletu v porovnaní s bunkou s mezenchýmovým typom migrácie [10, 17].



Obr. 1 Schéma transformácie fenotypových prejavov epiteliálno-mezenchýmovej tranzície (EMT). Kľúčové kroky, ktoré sú nevyhnutné k dokončeniu celého procesu EMT. Tabuľky znázorňujú charakteristické markery epiteliálnych a mezenchýmových buniek. SMA – smooth muscle actin / hľadko-svalový aktín; MMP – matrix metalloproteinázy. (upravené podľa Aroeira a kol. [21]).

Tab. 1 Porovnanie fenotypových prejavov mezenchýmovej a améboídejnej migrácie nádorových buniek (upravené podľa Paňková a kol. [17]).

	EMT	EAT
<i>Morfológia</i>	predĺžený tvar	okrúhly tvar
<i>Väzby s ECM</i>	zhluky integrínov – fokálne spoje	pokles exprese integrínov difúzne uložených v membráne
<i>Migrácia v ECM</i>	degradácia ECM, remodelácia	pohyb nezávislý na proteolytickej aktivite
<i>Organizácia cytoskeletu</i>	„sieťovina“ aktínových mikrofilamentov	kortikálna poloha aktínu
<i>Rýchlosť pohybu</i>	nízka	vysoká
<i>Výbežky bunkovej membrány</i>	filopodia / lamellipodia	„blebbing“

Uvedená diverzita v migrácií nádorových buniek a fakt adaptácie bunkovej tranzície podľa zloženia okolitej extracelulárnej matrix, môže viesť k rozvoju heterogenity vnútrónádorového mikroprostredia. Následne sa tento fenomén môže odraziť v zhoršenej odpovedi pacienta na aplikovanú liečbu, resp. vyústiť do relapsu či recidívy onkologického ochorenia [18, 19].

Záver

Napriek tomu, že mechanizmy a typy migrácie či invazivity nádorových buniek sú relatívne detailne popísané, v súčasnosti vystupuje do popredia opodstatnená a naliehavá potreba identifikácie prediktívnych a prognostických markerov s kľúčovým postavením v hodnotení metastatického potenciálu nádorových buniek. Súbor vhodných prediktorov by mohol priniesť odpovede pri špecifikácii pacientov s vyšším rizikom rozvoja vzdialených metastáz a nastavenia liečby cielenej proti metastatickému procesu. Hlbšie pochopenie a objasnenie mechanizmov regulujúcich proces metastazovania solídnych nádorov, môže významne zlepšiť manažment pacienta, keďže mortalita súvisiaca s onkologickými ochoreniami sa zvyšuje práve v dôsledku progresie a disseminácie primárnych nádorov [10, 20].

Literatúra

- [1] Hanahan and Weinberg, *Cell*. **2011**, 144:646-674.
- [2] Paul, *Nat Rev Cancer*. **2017**, 17/2:131–140.
- [3] Jiang, *Semin Cancer Biol*. **2015**, 35:244-275.
- [4] Sahai, *Curr Opin Genet*. **2005**, 15:87-96.
- [5] Krakhmal, *Acta Naturae*. **2015**, 2/25:17-28.
- [6] Janiszewska, *J Biol Chem*. **2020**, 295/8:2495-2505.
- [7] Monteiro and Fodde, *Eur J Cancer*. **2010**, 46/7:1198-1203.
- [8] Stefania and Vergara, *Front. Oncol*. **2017**, 7:274.
- [9] Prasad, *BBA – Mol Basis Disease*. **2020**, 1866/4:165424.
- [10] Gerashchenko, *J Clin Med*. **2019**, 8:1092.
- [11] Vinod, *J Oral Maxillofac Pathol*. **2019**, 23/1:10-16.
- [12] Moss, *Mol Cancer Res*. **2009**, 7/6:809-820.
- [13] Zeisberg and Neilso, *J Clin Invest*. **2009**, 119:1429-1437.
- [14] Jung, *Clin Endosc*. **2019**, 52/5:464-471.
- [15] Taddei, *Cell Commun Signal*. **2014**, 12:24.
- [16] Eble and Niland, *Clin Exp Metastasis*. **2019**, 36/3:171-198.
- [17] Paňková, *Cell Mol Life Sci*. **2010**, 67:63-71.
- [18] Škovierová, *Int J Mol Med*. **2018**, 41/3:1187-1200.
- [19] Pal, *Scientific Reports*. **2019**, 9:8997.
- [20] Jiang and Ablin, *Front Biosci (Elite Ed.)*. **2011**, 3:391-394.
- [21] Aroeira, *JASN*. **2007**, 18/7:2004-2013.

Využitie anti-PD-1/PD-L1 imunoterapie pri karcinóme pľúc

Petráš, M.¹, Šarlinová, M.¹, Škorvanová, M.², Mušák, Ľ.¹, Matáková, T.²,
Bieliková, S.³, Skaličanová, M.⁴, Hamada, Ľ.⁴, Halašová, E.^{1, 5}

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed, Martin;

² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ³ Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Bratislava; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin, Klinika hrudníkovej chirurgie, Martin; ⁵ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin
martin.petras@uniba.sk

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths worldwide, usually because of the advanced stage at the time of diagnosis. Although great progress in the diagnosis and treatment of lung cancer in the past two decades, the prognosis of lung cancer patients remains unsatisfactory with relatively high mortality. Agents targeting immune checkpoints have shown potential to improve therapeutic outcomes in patients with lung cancer and has rapidly gained acceptance as a therapeutic strategy for a growing number of malignancies. Inhibitors of the programmed cell death-1 protein receptor/programmed cell death-1 protein ligand (PD-1/PD-L1) have been approved for the treatment of different types of lung cancer. Testing for expression of PD-L1 in tumor cells and immune cells has been used as a companion or complementary test for drugs targeting the PD-1/PD-L1 pathway. In this review, we discuss mechanisms of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy as well as its use in immunohistochemical analysis.

Keywords: immunotherapy, lung cancer, PD-1/PD-L1

Úvod

Karcinóm pľúc patrí medzi hlavné príčiny úmrtí na rakovinu na svete [1], najmä preto, že je zvyčajne diagnostikovaný až v pokročilom štádiu. Rozdeľujeme ho na malobunkový karcinóm pľúc (SCLC) predstavujúci asi 20 % úmrtí a a nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC) zahŕňajúci asi 80% úmrtí [2]. Medzi hlavné podtypy NSCLC patrí pľúcny adenokarcinóm (LUAD), skvamocelulárny karcinóm (SCC) a veľkobunkový karcinóm pľúc (LCC) [2]. Štúdie naznačujú, že všetky typy rakoviny pľúc úzko súvisia s fajčením tabaku, keďže cigaretový dym obsahuje množstvo známych mutagénov a karcinogénov spôsobujúcich významné genetické zmeny [3].

Určenie vhodnej liečebnej stratégie (vrátane rádioterapie, chemoterapie a chirurgickej resekcie) u pacientov s karcinómom závisí od miesta nádoru a od toho, či je resekovateľný, čo si vyžaduje účasť viacerých odborníkov [4]. Vďaka svojej povrchovej modifikácii a malej veľkosti sa vhodným terapeutickým prostriedkom pri liečbe karcinómu pľúc javí využitie nanočastíc, ktoré sa vyznačujú selektívnym vstupom do nádorových buniek [5]. Potenciál na zlepšenie terapeutického účinku ukázala aj protinádorová imunoterapia, a to najmä inhibítory imunitného kontrolného bodu zamerané na proteínový receptor 1 programovanej smrti (PD-1) a jeho ligandu (PD-L1) pri NSCLC. Monoklonálne protilátky PD-1 a PD-L1 sa vyznačujú antineoplastickou aktivitou, indukciou dlhotrvajúcich reakcií a bezpečnosťou. Napriek tomu, že sa táto imunoterapia využíva u stále väčšieho počtu pacientov s onkologickými ochoreniami, na liečbu anti-PD-1/PD-L1 reaguje len podskupina pacientov s rakovinou pľúc a zaznamenané boli vedľajšie účinky a faktory ovplyvňujúce terapiu [6].

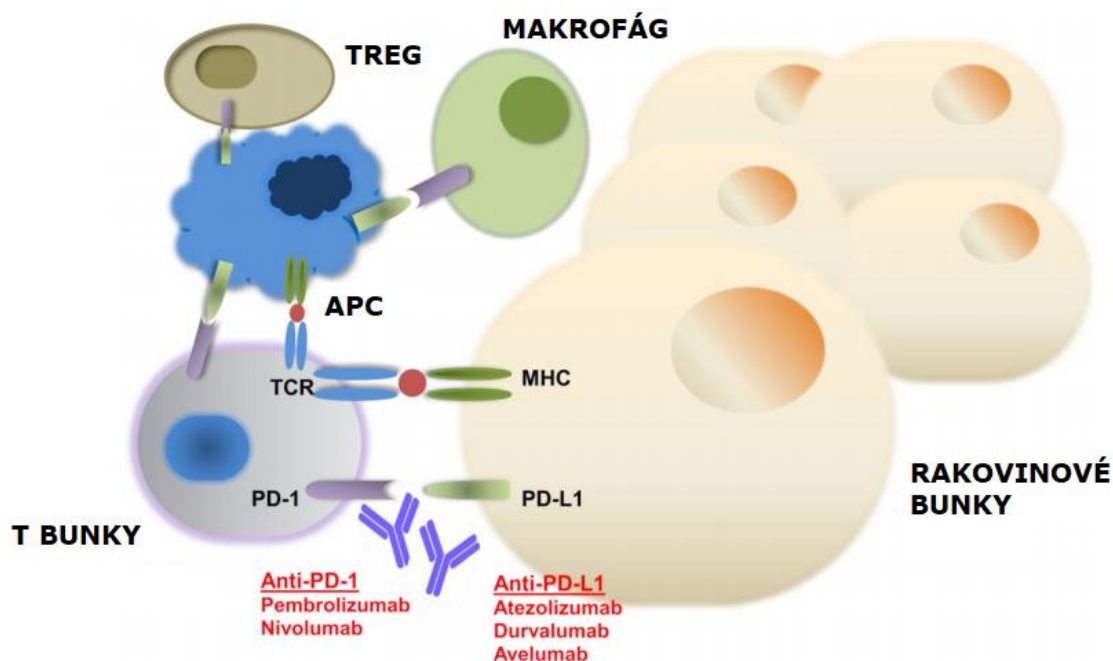
Mechanizmy anti-PD-1/PD-L1 imunoterapie

Za normálnych fyziologických podmienok vyvoláva interakcia PD1/PD-L1 špecifické konformačné zmeny, ktoré chránia normálne bunky pred imunitným rozpoznávaním a inhibujú následnú deštrukciu cytotoxickými T bunkami, čo by inak viedlo k autoimunitnej reakcii. V dôsledku tejto inhibície sa reaktívne T bunky vyčerpávajú prostredníctvom signálnych dráh, čo má za následok kombináciu zastavenia delenia a proliferácie a programovanú bunkovú smrť alebo apoptózu [7].

Signálna dráha PD-1/PD-L1 hrá dôležitú úlohu v nádorových bunkách unikajúcich z imunosurvencie [8]. Pre zabránenie imunitnému dohľadu hostiteľa, nádory exprimujú PD-L1, ktoré interagujú s PD-1 na T bunkách, aby sa znížili imunitné reakcie. Klinické údaje naznačujú, že vysoká expresia PD-1 a PD-L1 môže byť indikátorom agresivity nádoru [9].

V súvislosti s imunoterapiou rakoviny boli vyvinuté monoklonálne protilátky zlepšujúce funkciu T lymfocytov blokovaním väzby PD-1 na PD-L1. Úspešná imunoterapia anti-PD-1/PD-L1 vyžaduje dostatočný počet špecifických T buniek v mikroprostredí nádoru (TME) a schopnosť T buniek získať primeranú výživu [10]. Preto je dôležitá aeróbna glykolýza umožňujúca T bunkám vylučovať prozápalový cytokínový interferón- γ (IFN- γ) a likvidovať rakovinové bunky [11]. Anti-PD-1/PD-L1 liečba môže podporovať T-bunky, aby súťažili o glukózu v TME, čím sa podporí glykolýza T-buniek a sekrécia IFN- γ [12].

V súčasnosti existuje na trhu päť schválených terapeutických látok zameraných na os PD1/PD-L1, z ktorých dve (nivolumab a pembrolizumab) sú humanizované monoklonálne protilátky zamerané na receptor PD-1, zatiaľ čo ďalšie tri (atezolizumab, durvalumab a avelumab) sú humanizované monoklonálne protilátky zamerané na receptor pre PD-L1. Každé z týchto liečiv sa viaže na odlišný epitop na príslušnom ciele, a preto sa vyznačujú odlišným imunogénnym profilom, a teda svojím vlastným dynamickým rozsahom [13]. Na základe výsledkov rozsiahlych klinických štúdií, ktoré ukazujú štatisticky významnú mieru odozvy a zlepšenie celkového prežívania v kontexte rôznych solídnych nádorov, vrátane NSCLC, gastrointestinálnych, skvamocelulárnych karcinómov hlavy a krku, karcinómov obličkových buniek, uroteliálnych karcinómov, karcinómov krčka maternice a prsníka, ako aj lymfómov a melanómov, všetky boli schválené na použitie ako liečba druhej línie u pacientov, ktorých nádory prestali reagovať na konvenčnú chemoterapiu. Navyše, pembrolizumab nedávno získal povolenie na použitie ako terapia prvej línie pre pokročilé/metastatické NSCLC, pri ktorých nádorové bunky vykazujú >50% expresiu PD-L1. Preukázalo sa totiž, že je asociovaný s významne dlhším časom bez progresie a celkovým prežívaním s menším počtom nepriaznivých udalostí ako u pacientov dostávajúcich chemoterapiu na báze platiny [14, 15].



Obr. 1 Mechanizmus akcie inhibítorov PD-1 a PD-L1. PD-1 je exprimovaný na T bunkách, B bunkách, makrofágoch a regulačných T bunkách (Treg). Aktivácia signalizácie PD-1/PD-L1 slúži ako hlavný mechanizmus, ktorým nádory unikajú antigén špecifickým imunologickým odpovediam sprostredkovaným T bunkami. Blokáda protilátok PD-1 a PD-L1 zvyšuje protinádorovú imunitnú aktivitu. TCR, receptor T-buniek; MHC, hlavný histokompatibilný komplex; APC, antigén prezentujúca bunka (upravené podľa Gong a kol., [16]).

Imunohistochemická detekcia pri anti-PD-1/PD-L1 imunoterapii

Cieľom prvých imunohistochemických (IHC) testov schválených Úradom pre potraviny a liečivá USA (FDA) bolo detegovať proteín PD-L1 prítomný v histologických rezoch alebo cytologických vzorkách s konečným cieľom vybrať pacientov, ktorí by boli najlepšími kandidátmi na využitie inhibítorov imunitného bodu [17].

Expresia PD-L1 v nádoroch a v imunitných bunkách, hodnotená IHC farbením, je v súčasnosti často používaným testom v spojení s anti-PD1/PD-L1 terapiami. IHC farbenie umožňuje ľahkú identifikáciu rôznych bunkových membránových, cytoplazmatických alebo jadrových oblastí v porovnaní s metódou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) [14]. Pri vyhodnocovaní expresie PD-L1 na nádorových bunkách bola preukázaná dobrá až vynikajúca spoľahlivosť, hoci skóre imunitných buniek má nižšiu spoľahlivosť [18]. PD-L1 môže byť exprimovaný v mnohých histiocytoch/makrofágoch v rôznych miestach organizmu. Medzi ďalšie bunky, ktoré sú zvyčajne alebo vždy pozitívne na farbenie PD-L1, patria perineuriálne bunky, nervové vlákna, plazmatické bunky, folikulárne dendritické bunky, žírne bunky a megakaryocyty. Zatiaľ čo PD-L1, najmä pri vysokých hladinách expresie, môže naznačovať väčšiu pravdepodobnosť odpovede na terapiu anti-PD-1/PD-L1, korelácia medzi expresiou PD-L1 pomocou IHC sa líši na základe histologických znakov tumoru a priestorových a časových faktorov týkajúcich sa umiestnenia či biopsie [18,19].

Hodnotenie IHC expresie PD-L1 na bunkovom povrchu predstavuje účinný prediktívny biomarker inhibítorov imunitného kontrolného bodu PD1/PD-L1, vrátane pembrolizumabu [20]. Liečba NSCLC pembrolizumabom vyžaduje imunohistochemickú detekciu PD-L1 [21]. A práve ten preukázal pozitívny efekt u pacientov s pokročilým NSCLC, u ktorých bol PD-L1 exprimovaný najmenej u 50% rakovinových buniek. Výsledky naznačujú, že účinnosť inhibítorov PD-1/PD-L1 môže

významne súvisieť s hladinou PD-L1 [21]. Napriek hodnoteniu expresie PD-L1 v rutinej praxi, stále existujú výzvy kvôli jeho heterogenite v priestore a čase. U pacientov s NSCLC môže byť histologickou vzorkou malé bioptické tkanivo: vzorka negatívnej oblasti pozitívneho nádoru môže negovať prospešnú liečbu pacienta [22]. Štúdie tiež ukázali, že existujú výrazné rozdiely v expresii PD-L1 v primárnych a metastatických nádorových miestach [23], pričom aj predchádzajúca chemoterapia môže okrem toho zmeniť expresiu PD-L1 pri NSCLC [24]. Takisto aj metóda odberu vzoriek môže ovplyvniť výsledky vyhodnotenia expresie PD-L1 pri NSCLC. Preto je potrebné ďalej zlepšovať detekčnú metódu PD-L1.

Medzi potenciálne prediktívne biomarkery pri liečbe pacientov s inhibítormi imunitného kontrolného bodu patrí aj dôležitý biomarker v rámci imunoterapie : Tumor mutation burden (TMB - mutačná nálož nádoru). Spolu s využitím sekvenovania novej generácie (NGS) u pacientov s NSCLC môže byť TMB použité na predpovedanie odpovede na imunosupresívnu liečbu [25]. Štúdia ukázala klinický benefit pri podaní Nivolumabu u pacientov bez progresie, zatiaľ čo expresia PD-L1 (skóre nádorového pomeru definované ako percento nádorových buniek pozitívnych na PD-L1 z celkového počtu nádorových buniek vo vzorke $TPS \geq 50\%$) bola najvýznamnejšia u pacientov s vysokou TMB [26]. TMB má však pri imunoterapii obmedzenia a stále je vo fáze výskumu. Aj keď TMB môže byť komplementárna s IHC analýzou PD-L1, na vyhodnotenie klinického využitia TMB ako prediktívneho biomarkera pre inhibítory anti-PD-1/PD-L1 sú potrebné ďalšie randomizované štúdie. S rýchlym rozvojom precíznej medicíny však môže stále viac lekárskeho zariadení poskytovať malé panely na vysoko výkonné sekvenovanie génov [27].

Okrem odpovede na anti-PD-1/PD-L1 terapiu a IHC markerov mikroprostredia bola TMB korelovaná a významne spojená aj s klinickými premennými a driver mutáciami súvisiacimi s karcinómom pľúc. Vyššie TMB skóre bolo významne asociované aj s väčším počtom opravných mutácií DNA [28]. TMB je teda potenciálnym biomarkerom odpovede na anti-PD-1/PD-L1 terapiu založenú na vyššom skóre TMB predpovedajúcim dlhšie celkové prežitie u pacientov liečených inhibovaním imunitného kontrolného bodu.

Záver

Rýchly vývoj anti-PD-1 /PD-L1 inhibítorov poskytol nádej na liečbu karcinómu pľúc, aj keď nie je účinná pre všetkých pacientov. Identifikácia pacientov, ktorí môžu reagovať na túto liečbu, je dôležitá pre zlepšenie terapeutických výsledkov a predĺženie života pacientov. Napriek tomu, že sú vzhľadom k významným terapeutickým účinkom pri liečbe rakoviny pľúc s využitím imunoterapie anti-PD1/PD-L1 schválené štyri látky (Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab a Durvalumab), pri liečbe pretrvávajú určité výzvy. Patrí medzi ne identifikácia pacientov, ktorí môžu mať benefit z liečby, zlepšenie terapeutického účinku a zníženie nepriaznivých udalostí súvisiacich s imunitou. Preto je nevyhnutné skúmať a identifikovať spoľahlivé prediktívne biomarkery. V konečnom dôsledku môže byť personalizovaný imunoterapeutický program kľúčovým kameňom budúcej liečby rakoviny. Posúdenie biomarkerov súvisiacich s imunitou pred liečbou, expresia PD-L1 môžu pomôcť pri informovaní o najlepšej stratégii liečby pre každého pacienta. Preto je potrebné ďalej skúmať kombinovanú liečbu. Na vyhodnotenie expresie PD-L1 pri nádoroch existuje veľké množstvo testov. Účinnosť tohto testovania koordinovaným spôsobom s použitím najúčinnnejších protilátok spolu s doplnkovým diagnostickým testovaním, môže poskytnúť lepšie a jednotnejšie pochopenie expresie PD-L1 v nádorových a imunitných bunkách.

Práca bola podporená projektom "Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení", ITMS kód projektu: 26220220153 a projektom Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin), ITMS: 26220220187 spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Updated March. **2019**.
- [2] Zheng, *Surg Oncol Clin N Am*. **2016**, 25/3:447-468.
- [3] Proctor, *Tob Control*. **2012**, 21/2:87-91.
- [4] Tabchi, *Semin Oncol*. **2017**, 44/3:163-177.
- [5] Madni, *J Drug Target*. **2017**, 25/6:499-512.
- [6] Wang, *Int Immunopharmacol*. **2020**, 79:106088.
- [7] Yokosuka, *J Exp Med*. **2012**, 209/6:1201-1217.
- [8] Iwai, *Proc Natl Acad Sci*. **2002**, 99/19:12293-12297.
- [9] Thompson, *Proc Natl Acad Sci*. **2004**, 101/49:17174-17179.
- [10] Sukumar, *Curr Opin Immunol*. **2017**, 46:14-22.
- [11] Peng, *Science*. **2016**, 354/6311:481-484.
- [12] Yang, *Front Oncol*. **2018**, 28/8:563.
- [13] Rizvi, *Science*. **2015**, 348/6230:124-128.
- [14] Garon, *N Engl J Med*. **2015**, 372/21:2018-2028.
- [15] Reck, *N Engl J Med*. **2016**, 375/19:1823-1833.
- [16] Gong, *J Immunother Cancer*. **2018**, 6/1:8.
- [17] Morgensztern, *Clin Cancer Res*. **2016**, 22/15:3713-3717.
- [18] Chae, *Clin Lung Cancer*. **2016**, 17/5:350-361.
- [19] Reck, *N Engl J Med*. **2016**, 375/19:1823-1833.
- [20] Francisco, *Immunol Rev*. **2010**, 236:219-242.
- [21] Büttner, *J Clin Oncol*. **2017**, 35/34:3867-3876.
- [22] Evans, *Transl Lung Cancer Res*. **2018**, 7/6:682-690.
- [23] Uruga, *J Thorac Oncol*. **2017**, 12/3:458-466.
- [24] Fujimoto, *Sci Rep*. **2017**, 7/1:11373.
- [25] Alborelli, *J Pathol*. **2020**, 250/1:19-29.
- [26] Carbone, *N Engl J Med*. **2017**, 376/25:2415-2426.
- [27] Liu and Liu, *Pathol Res Pract*. **2020**, 216/2:152797.
- [28] Chae, *Clin Lung Cancer*. **2019**, 20/2:88-96.

Úloha HPV a onkoproteínov pri léziách krčka maternice

Csizmárová, S., Krajňáková, B., Mešťanová, V., Adamkov, M.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
csizmarova5@uniba.sk

Abstract

Human papillomavirus (HPV) is a DNA virus that causes skin and mucosal epithelial proliferation. There are more than 100 different types of viruses, of which 30-40 strains infect primarily the genital tract. HPV replication occurs in host cells, in the part of the dividing basal cells and continues to undifferentiated cells of the stratum spinosum layer as it does not encode its own DNA polymerase. High-risk viruses (16, 18) are involved in the pathogenesis of cervical lesions. The HPV genome encodes proteins that are able to induce unorganized cell proliferation while preventing apoptosis. Low and high grade cervical intraepithelial neoplasia may regress or progress into invasive cervical cancer. Cervical tumors are divided into two major histological subtypes: squamous cell carcinoma (85-90% cases) and adenocarcinoma (10-25%).

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia, HPV, oncoproteins

Úvod

Doteraz bolo popísaných okolo 100 rôznych podtypov HPV s odlišnými variáciami v ich genetickom a onkogénnom potenciáli. Podtypy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 a 69 špecificky ovplyvňujú anogenitálny trakt. Podľa ich schopnosti vyvolávať neoplastické zmeny sa tieto špecifické podtypy ďalej klasifikujú na vysokorizikové (HR-HPV) a nízkorizikové podtypy (LR-HPV). HPV typu 6 a 11 sa považujú za LR-HPV, zatiaľ čo HPV 16 a 18 za HR-HPV, keďže prispievajú k malignite. Rozvoj malígnej lézie v cervikálnej oblasti je spravidla predchádzaný rozvojom cervikálnej intraepiteliálnej neoplázie (CIN) [1, 10].

Morfologické a genetické aspekty HPV

HPV vírusové častice sú malé, neobalené virióny so stálou ikozahedrickou stavbou s priemerom 50-55nm a molekulovou hmotnosťou 5x10⁶ Da. HPV je evolučne stabilným vírusom s mierou divergencie asi 1% na 40,000-80,000 rokov. HPV má cirkulárnu dvojreťazovú DNA s približne 8000 bp. Vírusová DNA je asociovaná s proteínmi podobnými histónom, ktoré sú zabalené do 72 kapsomér zložených z 2 štrukturálnych proteínov L1 a L2 [2, 3].

Molekulárne klonovanie a sekvenovanie papillomavírusov odhalilo typickú genomickú organizáciu všetkých členov rodiny HPV. Obsahujú 8 alebo 9 regiónov ORF (otvorený čítací rámec) na rovnakom reťazci DNA. Genóm HPV môžeme rozdeliť na 3 rôzne oblasti, na základe ich umiestnenia a funkčných vlastností. Prvou je kódujúca oblasť obsahujúca skoro prepisujúce gény na regióne E (early). E región obsahuje až 6 génov (E1, E2, E4, E5, E6, E7), ktoré sú zodpovedné za replikáciu HPV (E1 a E2), transkripciu DNA (E2), dozrievanie a uvoľnenie vírusových častíc (E4), transformáciu buniek (E5, E6, E7) a imortalizáciu (E6 a E7). Gény E6 a E7 taktiež kódujú proteíny spojené s malígnymi léziami. Oblasť s neskôr prepisujúcimi génmi kóduje hlavné L1 a minoritné L2 kapsidové proteíny. L2 proteín spolu s L1 prispievajú k začleneniu vírusovej DNA do viriónu. Nekódujúca oblasť nazývaná dlhá kontrolná oblasť (LCR),

má asi 500-1000 báz a je lokalizovaná medzi ORF L1 a E6, obsahuje väčšinu regulačných prvkov zapojených do replikácie a transkripcie vírusovej DNA [2, 4, 14].

Životný cyklus

Ľudský papillomavírus infikuje výlučne epitelové bunky a je závislý na diferenciácii týchto buniek pre dokončenie svojho životného cyklu. HPV infikuje bunky v bazálnej vrstve epitelu, pravdepodobne cez mikroabrázie na povrchu epitelu. Internalizácia vírusu do bunky trvá aj niekoľko hodín, následne sa vírusová DNA uvoľní z kapsidu a transportuje do jadra ako voľný genetický materiál alebo extrachromozomálny epizóm. Replikácia sa vyskytuje iba v parabazálnych bunkách, ktoré sa diferencujú a zrejú, teda prirodzene už u nich nedochádza k replikácii, na ktorej je tento vírus závislý. HPV kóduje dva proteíny E6 a E7, ktoré spoločne podporujú proliferáciu buniek, predlžujú progresiu bunkového cyklu a bránia apoptóze. Vďaka týmto proteínom bunka toleruje replikáciu vírusu a stovky až tisíce HPV genómov sú produkované v jednej bunke. Gény kódujúce kapsidové proteíny L1 a L2 sú exprimované predominantne v superficiálnej vrstve epitelu, kde dochádza k zostavovaniu vírusu a následné sú nové infekčné vírusové častice (virióny) uvoľňované z epitelového povrchu. Celková dĺžka životného cyklu HPV trvá približne 2 až 3 týždne, čo je čas potrebný pre migráciu bunky z bazálnej po povrchovú vrstvu epitelu, jej diferenciáciu, starnutie až smrť [5, 13].

Úloha HPV pri malígnej transformácii a funkcia E5, E6 a E7

Na dokončenie infekčného životného cyklu vírusu, sa bunka musí podrobiť terminálnej diferenciácii, ktorá je nevyhnutným predpokladom pre kompletné zostavenie a uvoľnenie viriónu. Avšak, efektivita E6 a E7 proteínov u niektorých HR-HPV infekcií účinne inhibuje negatívne regulačné mechanizmy bunkového cyklu, a tým blokuje terminálnu diferenciáciu infikovaných buniek. Takéto bunky zostávajú aktívne zapojené do progresie bunkového cyklu a nedochádza k apoptóze. Výsledná genomická nestabilita umožňuje hromadenie genetických zmien, vedúcich k malígnej transformácii bunky infikovanej HPV.

Proteíny E6 a E7 začínajú onkogenézu pomocou charakterizovaných jasne definovaných interakcií s produktmi tumor supresorových génov TP53 pre E6 a proteín retinoblastoma pre E7. Inkorporácia vírusovej DNA narušuje aktivitu proteínu E2. Všeobecne proteín E2 má schopnosť potlačiť transkripciu E6 a E7, a preto prerušenie jeho funkcie spôsobuje dysreguláciu expresie týchto onkoproteínov. Onkoproteíny E6 a E7 sú schopné immortalizovať bunky, tak že bunky si zachovávajú svoju mitotickú schopnosť a vytvárajú klony, ktoré nesú identický immortalizovaný fenotyp a nedochádza k ich terminálnej diferenciácii. Je potrebné podotknúť, že imunitná reakcia je kľúčovým faktorom v boji proti HPV infekcii a následnej rakovine krčka maternice. HPV je však schopný uniknúť pred imunitným dohľadom cez expresiu E5 onkogénu, ktorý je zodpovedný za moduláciu imunitných mechanizmov vrátane prezentácie antigénu a zápalových pochodov. Ak sú HPV infikované bunky rýchlo eliminované imunitným systémom, nedochádza k akumulácii chromozomálnych abnormalít a zisku malígneho fenotypu bunky napriek transformačným vlastnostiam E6 a E7. Dlhodobá chronická infekcia je podmienkou pre vývoj zhubných ochorení spojených s HPV [4, 5, 6].

E5 je hydrofóbny transmembránový proteín, klasifikovaný ako vioporín, kanálový proteín schopný modulovať iónovú homeostázu, prechod vezikúl, produkciu viriónov a vstup vírusového genómu do bunky. Onkoproteín E5 je schopný interagovať so 16kDa zložkou vákuolárnej protónovej ATPázy, zvyšujúc tak endozomálne pH z 5,9 na 6,9. Toto zvýšenie pH spôsobuje inhibíciu degradácie EGF (epidermal growth factor)

receptoru v endozomálnych kompartmentoch po endocytóze, čím sa zvyšuje počet recyklovaných receptorov späť na bunkovej membráne. Teda E5 účinkuje synergicky s EGF, čo vedie k proliferácii buniek. Avšak účinky E5 nie sú limitované len na bunkovú membránu. E5 sa vyskytuje aj v Golgiho aparáte (GA) a endoplazmatickom retikule. Interakcia E5 s GA spôsobuje retenciu hlavných komplexov histokompatibility I. triedy (HLA) a zabraňuje ich transportu na bunkový povrch, čím prispieva k únikovým mechanizmom pred imunitou [3, 6, 11].

E6 je malý onkoproteín obsahujúci 151-158 aminokyselín bez enzymatickej aktivity. Štrukturálne štúdie reflektujú vlastnosť E6 proteínu spájať sa s veľkým množstvom bunkových proteínov. Hlavnou charakteristickou vlastnosťou E6 je schopnosť stimulácie proteozomálnej degradácie p53 závislej na ubikvitíne. p53 je produktom tumor supresorového génu (TP53), ktorý zabraňuje hromadeniu deštruktívnych mutácií spôsobujúcich rozvoj neoplastických zmien. Po identifikácii abnormálnej DNA alebo pri bunkovom strese (napr. hypoxia) dochádza k aktivácii p53, blokovaní bunkového cyklu a reparácii DNA. E6 onkoproteín má teda schopnosť redukovať hladiny p53. Dochádza k tomu v dôsledku schopnosti E6 tvoriť ternárny komplex s E6AP ubikvitín ligázou a p53 (E6-E6AP-p53). Táto reakcia vyvoláva následnú degradáciu p53. Väzba E6 na p53 nie je automatická, je regulovaná proteínom spojeným s E6 (E6AP) a proteínom ligázy ubikvitínu E3. E6/E6AP komplex sa následne viaže na centrálnu oblasť (hlavnú doménu) p53, ktorý sa rýchlo ubikvitínuje a posúva proteázómom. Koncentrácia p53 v bunkách s E6, vrátane rakovinových buniek krčka maternice je asi 2-3 krát nižšia ako v zdravých bunkách. Výrazne sa znižuje aj jeho polčas rozpadu. V dôsledku toho nenastáva typická reakcia p53 na poškodenie DNA. Mutácie DNA zostávajú v genóme buniek neopravené a prenášajú sa z jednej bunkovej generácie na druhú [3, 4, 6].

E7 je štrukturálne a funkčne príbuzný s adenovírusovým E1A proteínom a na základe tejto podoby je rozdelený na 3 domény, konzervované regióny (CR 1-3). Je známe, že E7 sa viaže na produkt retinoblastoma tumor supresorového génu, pRb, a členov jeho rodiny, p107 a p130. V defosforylovanom stave sa proteíny rodiny pRb môžu viazať na transkripčné faktory, ako sú členovia rodiny E2F a potláčať tak transkripciu konkrétnych génov zapojených do syntézy DNA a progresiu bunkového cyklu. Pretože E7 je schopný väzby s nefosforylovaným pRb, môže predčasne indukovať vstup bunky do S fázy, keďže k väzbe na E2F nedôjde. Spojenie E7 s pRb vedie k degradácii pRb prostredníctvom proteazomálnych dráh, s následnou aktiváciou transkripcie regulovanej E2F. E7 umožňuje takto replikáciu HPV v horných vrstvách epitelu, kde sa prirodzene zdravé bunky diferencujú a úplne opúšťajú bunkový cyklus. Inhibitor cyklín dependentnej kinázy (p16^{INK4a}), ktorý bráni fosforylácii pRb, je nadmerne exprimovaný práve v prípadoch, keď je pRb inaktivovaný onkoproteínom E7. Za fyziologických podmienok nadmerná expresia p16^{INK4a} vedie k zastaveniu bunkového cyklu, ale pri prítomnosti E7 sa tak nestane [3, 4, 6, 7].

Bunkové biomarkery v cervikálnych léziách p16 a Ki-67

Funkčná inaktivácia onkosupresorov p53 a pRb vplyvom E6 a E7, spôsobuje zmenu niekoľkých bunkových dráh relevantných pre transformáciu buniek a vývoj onkologického ochorenia. Expresia E7 spôsobuje inaktiváciu pRb s následným zvýšením voľného E2F v bunke, čo vedie k zvýšeniu cyklín-dependentného inhibítora kinázy p16 (p16^{INK4a}) a aberantnej proliferácii buniek, sprevádzanej zvýšenou expresiou Ki-67. Využitie detekcie nadmernej expresie p16 a Ki-67 pomocou imunohistochemických metód alebo ELISA diagnostiky sa preto považuje za marker

prítomnosti HPV infekcie, aktivácie vírusových onkogénov a vírusom indukovanej deregulácie bunkového cyklu [9].

Onkoproteíny E6 a E7 ako biomarkery

Onkoproteíny E6 a E7 kódované HR-HPV so špecifickou expresiou v HPV transformovaných cervikálnych bunkách tiež slúžia ako biomarkery pri imunohistochemickom hodnotení vzoriek krčka maternice. Expresia E6 onkoproteínu sa preukáže intenzívnym farbením cytoplazmy nádorových buniek, pričom okolité spojivové tkanivo je negatívne, čo zvyšuje špecificitu tejto metódy. Intenzita imunoreakcie v karcinóme cervikálneho tkaniva je intenzívnejšia v porovnaní s CIN léziami. Takto sa správajú lézie aj pri hodnotení onkoproteínu E7 [15]. Onkoproteíny E6 a E7 sú exprimované len v transformovaných bunkách, preto sa považujú za ideálne biomarkery pre včasnú detekciu prekancerózných lézií. Detekcia ich expresie môže účinne odlíšiť zhubné transformácie od prechodných infekcií HPV. Tento spôsob identifikácie onkoproteínov sa môže aplikovať pri imunocytologických ako aj imunohistochemických analýzach vzoriek krčka maternice. Vzhľadom na svoju špecifickú expresiu v transformovaných cervikálnych bunkách tieto onkoproteíny poskytujú spoľahlivejšie výsledky na zlepšenie účinnosti skrínungu včasnej diagnostiky [16].

Testovanie samotných onkoproteínov imunochromatografiou je diagnostickou metódou, ktorá sa dostáva do popredia mnohých štúdií. Ukazuje sa, že testovanie HPV 16 E6/E7 má uspokojujúcu diagnostickú hodnotu pri skrínungu ochorenia a zároveň preukazuje lepšiu citlivosť ako cytologické testovanie a lepšiu špecificitu ako HPV DNA testy [13]. Mnohé štúdie naznačujú, že tieto testy majú mnohé výhody pre oblasti s obmedzenými možnosťami testovania alebo HPV vakcinácie, keďže nevyžadujú zložité vybavenie a sú časovo menej náročné [8, 12].

Záver

Testovanie HPV a s ním spojenými markermi je veľmi dôležitou súčasťou skrínungu a diagnostiky lézií krčka maternice. Existuje veľké množstvo možností testovania, ktoré zahŕňajú molekulárne, genetické, imunocytologické ako aj imunohistologické metódy. Vzhľadom na úlohu HPV a jeho onkoproteínov pri vzniku ochorenia, je dôležité nájsť najvhodnejšiu metódu a biomarkery pre rýchly, cenovo dostupný a efektívny skrínung a diagnostiku.

Literatúra

- [1] Faridi, *Viol.J.* **2011**, 8:269.
- [2] Leto, *An. Bras. Dermatologia.* **2011**, 306-317.
- [3] Araldi, *Biomedicine & Pharmacotherapy.* **2018**, 106:1537-1556.
- [4] Tommasino, *Seminars in Cancer Biology.* **2013**, 26:13-21.
- [5] Crosbie, *The Lancet.* **2013**, 382/9895:889-899.
- [6] Wang, *Front. Microbiol.* **2018**, 9:2896.
- [7] Narisawa-Saito, *Cancer Science.* **2007**, 98/10:1505-1551.
- [8] Ferrera, *International Journal of Cancer.* **2019**, 145:2042-2050.
- [9] Tornesello, *BioMed International.* **2013**, 1-10.
- [10] Luria, *StatPearls Publishing.* **2020**, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448132/>
- [11] Müller, *Future Virol.* **2015**, 27-39.
- [12] Zhang, *The Journal of international medical research.* **2018**, 46/3:1033-1042.
- [13] Pinidis, *Maedica (Buchar).* **2016**, 11/1:48-54.
- [14] Okunade, *Journal of Obstetrics and Gynaecology.* **2019**, 1-7.
- [15] Stiasny, *Anticancer research.* **2016**, 36:3195-3198.
- [16] Shi, *Molecular Medicine Reports.* **2018**, 18/4:1791-3004.

Epigenetics in prostate cancer: Review

Dušenka, R.¹, Eliáš, B.², Dušenková, S.², Marcinek, J.³, Kmet'ová Sivoňová, M.⁴, Burjaninova, T.⁵, Švihra st., J.¹, Ľupták, J.¹

¹ Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Department of Urology, Martin; ² University Hospital Martin, Department of Urology, Martin; ³ Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Department of Pathological anatomy, Martin; ⁴ Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Department of Medical Biochemistry, Martin; ⁵ Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Department of Molecular Biology and Genomics, Martin
rdusenka@gmail.com

Abstract

Epigenetics is referred to as genomic mechanism reversibly influencing gene expression without affection of DNA sequence itself. Extended research regarding carcinogenesis implicates DNA methylation as an important regulator of gene transcription. Neoplastic phenotype of prostate cancer is acquired and maintained by promoter hypermethylation as means of gene repression. The process of hypermethylation represses transcription of CpG-rich promoter regions of tumor suppressor genes which lead to gene silencing. Another mechanism is histone modification which is composed of several regulators predictive of the clinical outcome of prostate cancer. It is independent of features such as tumor stage, preoperative prostate-specific antigen (PSA) levels and prostatic capsule invasion. Prostate cancer detection and classification can be detected by the level of altered DNA methylation, changes in the expression of chromatin proteins and posttranslational histone modifications. The basis of epigenetic cancer therapy is formulated by the reversible nature of DNA methylation. The mechanism as well as the clinical/therapeutic level must be studied much deeper and more remains to be learned. The challenging era of cancer therapeutics is promising.

Keywords: prostate cancer, epigenetics, genetics, methylation

Introduction

The term of epigenetics was first introduced in 1942 by Conrad Waddington who tried to interpret the connection between genotype and phenotype [1]. Inherited differences in mitosis and meiosis which could explain the changes in phenotypes was interpreted as epigenetics. Epigenetics is referred to as genomic mechanism reversibly influencing gene expression without affection of DNA sequence itself. In classic genetics, the discovery of DNA and its double helix structure led to assumption that the sequence of DNA determines the phenotype of cells. Fundamental repeating unit of a cell is nucleosome which is packaged with DNA as chromatin. Octamer is formed of four-core histones (H2A, H2B, H3, and H4) which is then wrapped by a 147-base-pair (bp) segment of DNA. Nucleosomes themselves are separated by 10-60bp DNA. Epigenetics by Holliday et al. assumes that it is mitotically and/ or meiotically heritable with no DNA sequence changes. DNA methylation could be repaired through meiosis, even though some of the patterns are transmitted to offspring [2] which reflects many cellular activities as cell growth, differentiation and disease development – it is heritable [3]. Steps in epigenetics include events as DNA methylation, histone modification, readout of these modifications, chromatin remodeling and events of noncoding RNA. These steps would lead to different modification patterns which we can be divided into

“writer“, “reader“ and “eraser“. “Writers“ and “erasers“ are referred as enzymes that transfer or remove chemical groups to or from DNA or histones. “Readers“ are proteins that recognize modified DNA or histones. Epigenome cooperates with regulatory factors as transcription factors and noncoding RNAs coordinate with multiple biological processes to regulate the expression or repression of the genome. Epigenetics can be influenced by cellular signaling pathway and extracellular stimuli. Resulting effects are temporary and long-standing. The etiology of cancerogenesis is unique and involves both environmental and hereditary influences. The alteration of genomic information in cancer cells is most of the time detectable. Epigenome dysregulation is ongoing process of tumorigenesis. Some of these alterations would determine function of a cell and still would be involved in oncogenic transformation. Epigenetic changes are responsible for tumorigenesis, a theory proposed by Holliday et al. The probability of malignant transformation is explained by the alteration in cellular methylation status by specific methyltransferase [4]. We know that the same staging and grading among cancer patients can be shared and yet the outcome may be completely different. Partly that is explained by epigenetic heterogeneity of different patterns of histone modification and genes at the cellular level [6]. There is a variety of multiple epigenetic events important in tumorigenesis. Some of which may be repression of tumor suppressor gene caused by methylation of DNA CpG islands with hypoacetylated and hypermethylated histones [5]. Other event would be gene silencing including several epigenetic events as histone H3 and H4 hypoacetylation, histone H3K9 methylation and cytosine methylation [6]. Epigenetics thus enables us to search for potential mechanisms of cancer phenotypes as well as options for targeted treatment opportunities.

DNA Methylation

Extended research regarding carcinogenesis implicating DNA methylation as an important regulator of gene transcription has been considered. The process of hypermethylation represses transcription of CpG-rich promoter regions of tumor suppressor genes which lead to gene silencing. It is a covalent chemical modification of cytosine ring. This reaction is catalyzed by DNA methyltransferase (DNMT) in the sequence 5'-CG-3', called as CpG dinucleotide [5]. Approximately 1% of all human DNA consists of nonrandom distribution of CpGs-dense sequences called CpG islands. In the unmethylated state, chromatin and CpG island regions can be formed to active conformational state that can facilitate the loading of RNA polymerases onto gene promoters. In the adult human genome about 60-90% of CpG dinucleotides are methylated. This modification would lead to spontaneous deamination of 5-methylcytosine to thymine with resulting changes to chromatin structure and it represents significant barrier to transcription. About 50% of the human genome consists of CpG islands which are present in both housekeeping genes and genes responsible for tissue-specific expression. In the normal tissue, promoter region CpG islands are usually unmethylated despite of the transcriptional gene activity. There is one exception and that is nontranscribed genes on the inactive X-chromosome and imprinted autosomal genes [7]. There are three major active DNA methyltransferases: DNMT1, DNMT3A and DNMT3B. DNMT1 is responsible for maintenance of the cell methylation profile with less extent to de novo methylation of tumor suppressor genes. This results to stimulate de novo activity of DNMT1 by aberrant DNA structures. Methylation processes in embryogenesis are under control of DNMT3A and DNMT3B which are responsible for maintenance and de novo methylation activities [2]. Recent research suggests more multicomponent epigenetic regulatory complex in which DNA

methylation and histone modification machineries function in a highly cooperative manner in regulation chromatin structure and gene expression [8].

DNA hypermethylation in prostate cancer

Neoplastic phenotype of prostate cancer is acquired and maintained by promoter hypermethylation as means of gene repression. Many classic tumor suppressor genes function as hormone signaling, DNA repair, cell adhesion and cell-cycle control including apoptosis are silenced [9].

Hormone signalling

The androgen receptor (AR) is by far the most studied transcriptional activator in prostate cancer. It is a nuclear hormone receptor, which is activated by binding of androgen ligands. It critically effects prostate cancer development and progression of the disease. Prostate cancer is initially androgen sensitive. The goal of treatment in metastatic state of the disease is androgen deprivation. Later on in the malignant process a state of castration-resistance occurs. Epigenetic changes emerging in AR pathway signalling regulation that include CpG methylation and histone acetylation. Hypermethylation of AR gene is much more frequent in castration resistant prostate cancer (CRPC) accounting for about 29% compared to untreated primary tissue of prostate accounting for about 10%. This suggests that hypermethylation may play a crucial role in progression to castrate-resistant phenotype [11].

DNA repair genes

CpG island hypermethylation at the glutathione S-transferase (GSTP1) gene is one of the earliest changes in the pathogenesis of prostate cancer process. GSTP1 is involved in many cellular processes of metabolism including detoxication and elimination of potentially foreign genotoxic compounds, thus acting to protect cells from DNA damage and initiating cancerogenesis. Most types of the prostate cancer have their CpG island promoter region throughout GSTP1 gene methylated. In comparison, in normal tissues gene is expressed and unmethylated. There have been no mutations nor deletions reported for GSTP1 gene in prostate cancer, even though there is GSTP1 gene inactivation and both alleles are methylated. The GSTP1 gene itself encodes π -class glutathione S-transferase (GST), an enzyme responsible for detoxifying electrophilic and oxidant carcinogens, making it enzyme of biotransformation [12]. There may be well-documented contribution of diet and lifestyle modifications to prostatic carcinogenesis by the associating loss of π -class GST function which proposes to sensitise prostatic epithelial cell to cell and genome damage [10]. Circulating tumor cells (CTCs) would be detected in premalignant/ malignant prostate and all stages of prostate cancer which would differentiate it from benign prostate tissue by detecting GSTP1 methylation. The class of repair proteins, represented by methylguanine DNA methyl-transferase (MGMT) which removes alkyl adducts from the O⁶ position of guanine. In tumor tissue, MGMT expression is decreased. Methylation of regions for CpG islands of MGMT has been associated with the silencing of the gene [13]. Hypermethylation of MGMT is important in prostate cancer development.

Tumor suppression genes

A marker of prostate cancer prognosis is methylation of promoter in APC. The APC complex is well known for colorectal cancer as a gatekeeper in the cell. Thus preventing the transcription of gene products promoting cell proliferation and survival.

APC hypermethylation silences gatekeeper function and cell becomes more vulnerable to epigenetic and genetic changes even to state of more invasive cancer. Methylation in APC is associated with higher mortality due to prostate cancer when compared to unmethylated [15]. Another gene representing this class of genes is retinoic acid receptor beta (RAR β) and PDLIM4. Promoter regions of RAR β and PDLIM4 are often hypermethylated during the progression of prostate carcinogenesis [17]. Biological affect of retinoid acid (RA) is exerted through two families of nuclear receptors – RA receptors (RAR α , β , γ and retinoid X receptors (RXR α , β , γ), given its ligand-dependency as transcription factors of steroid hormone nuclear receptor superfamily. Chromosomal region 3p24 harbors RAR β 2 which is rich in CpG region in its promoter [18], which is often hypermethylated in prostate cancer [14]. This has been proved by Jeronimo a kol. in 97.5% of prostate cancer, 94.7% of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN), and 23.3% in BPH. There has been high positive statistical correlation between levels of hypermethylation which has been higher in prostate cancer compared to HGPIN and BPH ($p < 0.00001$) [16]. RAR-responsive 1 gene, known as tazarotene-induced gene 1 (TIG1) is downregulated in prostate cancer. Promoter methylation of RAR β silences this, thus making the process as crucial step in prostate cancer progression and making epigenetics changes to TIG1 promoter region and promoters of retinoid response genes are downstream events to RAR β deficiency. Silencing TIG1 gene affects cell-cell contacts with resulting increased proliferation and invasiveness of tumor cells [19]. Hypermethylation of CpG-island promoter region has been associated with inactivation of tumor suppressor gene RASSF1A. Methylation of promoter region of the RASSF1A has been detected in 53% of prostate cancer and has been associated with higher Gleason score and serum PSA levels [14]. RASSF1A protein interacts with DNA repair protein XPA. Also, it has been associated with counteracting stimulation of cell proliferation by RAS-linked pathways and inhibit the accumulation of cyclin D1, thus inducing cell cycle arrest [20].

Cell adhesion genes

The process of carcinogenic invasion and metastatic spread are acquired properties during progression of prostate cancer. Cancerous cells are losing intercellular contact and becoming motile and invading surrounding tissues. A strong suppressor of invasion is e-cadherin (CDH1). Prostate cancer metastases and poor overall survival is associated with decreased CDH1 expression. The CDH1 5'-CpG island region is highly methylated in prostatic cancer cells [21]. CD44 is an important mediator of prostate carcinogenesis. CD44 encodes for another membrane protein involved in matrix adhesion and signal transduction. CD44 hypermethylation is seen in 78% in prostate cancer patients compared to 10% noncancerous patients [22].

Cell cycle and Proapoptotic genes

CCND2 gene proteins belongs to cyclin family, members are characterized by periodicity in protein abundance in the cell cycle. Cyclin D forms a complex that function as a regulatory subunit of CDK4 or CDK6, whose activity is needed from G1 to S phase of cell cycle transition. There has been proved significant positive correlation of hypermethylation of CCND2 promoter region which is increased in prostate cancer compared to normal tissues (32%, 6%; $p = 0.004$); concordances between CCND2 methylation and RAR β , GSTP1, CDH13, RASSF1A and APC genes [23]. Clinicopathological correlation of prostate cancer aggressiveness is characterized by high CCND2 methylation [49]. Tumor suppressor gene playing role in maintenance of genomic stability, DNA repair and cell-cycle control is *GADD45a* (growth arrest and

DNA damage inducible gene 45). It modulates DNMT1 activity at the repair site for double-stranded DNA repair during homologous recombination [24]. GADD45 α mediates docetaxel cytotoxicity and causes active hypomethylation of CpG residues without the need for DNA replication. Prostate cancer tissue has GADD45 α four methylated CpG sites proximal to promoter region. Clinical application is due to enhanced sensitivity to docetaxel by upregulation of GADD45 α by recombinant expression of GADD45 α or pretreatment with 5-azacitidine. Apoptosis Speck-like protein containing Card (ASC), also known as TMS1 (Target of Methylation Induced Silencing 1) is a proapoptotic gene which plays an important role in cancer progression including prostate cancer. A protein-containing pyrin domain (PYD) in the N-terminus which is encoded by TMS1 and a caspase recruitment domain (CARD) in the C-terminus, both of them are members of the death domain-fold superfamily. TMS1 induces apoptosis via the caspase-9 pathway [25]. Prostate cancer tissue comprises methylation of TMS1 and loss of TMS1/ ASC gene expression of promoter region in prostate cancer cells [26].

Hypomethylation in prostate cancer

The second methylation defect observed in many of malignancies including prostate cancer is hypomethylation. Hypermethylated changes are preceding hypomethylated changes, which can be detected in high-stage cancers and histologic grade; it occurs heterogeneously during progression of prostate cancerogenesis and metastatic dissemination. LINE-1 retrotransposons are diminished methylation of abundant repetitive sequences resulted in hypomethylation [27]. Hypomethylation contributes to oncogenesis through multiple steps – activation of oncogenes as c-MYC and H-RAS, activation of latent retrotransposons and by chromosome instability [5]. MYC gene is required for androgen-dependent growth, it has ectopic expression that can induce androgen-independent cell growth in prostate cancer tissue. MYC gene overexpression is demonstrated in prostate cancer and clinical progression [28]. The PLAU gene is highly expressed in prostate cancer cells and invasive prostate tissue cell lines [61]. It encoded urokinase plasminogen activator that promotes tumor invasion and metastatic malignant states including prostate cancer [3]. Increased rates of genomic instability are associated with DNA hypomethylation. Chromosome 8 with its alterations and genome-wide hypomethylation are strongly associated. It suggests that PLAU hypomethylation and chromosome 8 alterations are linked together in prostate cancer [29].

Histone modification

Histone modification is composed of three major regulators – histone deacetylases (HDACs), histone acetyltransferases (HAT) and histone methyltransferases [30]. Acetylation status of histones is determined in conjunction of HDACs and HATs. Histones themselves are viewed as so called dynamic regulators of gene activity that undergo posttranslational chemical modifications (acetylation, methylation and phosphorylation), histones are no longer perceived as simple “DNA-packaging”. N-terminal tails of histone proteins protrude out of the nucleosome. They are rich in positively charged amino acids subjecting them to reversible posttranslational modifications. Gene expression as well as regulation of chromatin structures is under control of status of acetylation and methylation of lysine residues with the tails of nucleosomal core histones [31]. Nuclear architecture is organized by histone modifications with DNA methylation, involved in regulation of transcription and other nuclear mechanisms. Various changing patterns in histone modification carry potential

to affect the structure and integrity of the genome and can disrupt normal patterns of gene expression, making them susceptible to cancerogenesis [66]. Acetylation of histone under the influence of HATs is correlated with transcriptional activation and histone deacetylation influenced by HDACs which is linked to gene silencing. When acetyl groups are removed from histones, HDACs create a nonpermissive chromatin conformational change that prevents the gene transcription encoding proteins of tumorigenesis. Based on the amino acid position and the number of methylated residues, we see either gene activation or suppression which is carried out by histone methylation on arginine and lysine [32]. Many of genes are silenced by Polycomb proteins which are chromatin-modifying complexes implementing transcriptional silencing. Two of the major families complexes are called Polycomb repressive complex 1 (PRC1) and PRC2 are aimed to repressed regions.

Histone modification in Prostate cancer

Histone modification plays an important role during prostate cancer tumorigenesis. Changes in levels of histone modifications are predictive of the clinical outcome of prostate cancer, it is independent of features such as tumor stage, preoperative prostate-specific antigen (PSA) levels and prostatic capsule invasion [35]. These changes may help to identify patients with unfavourable prognosis and high-risk for recurrence. H3K4 methylation and histone H3 lysine 18 acetylation (H3K18Ac) are independent predictor for recurrence in low-grade prostate cancer disease [36]. Prostate cancer cells' methylation of lysine 9 in histone 3 (H3K9) is connected with repression of AR genes. Histone H3K4 methylation is associated with AR gene activation in CRPC cells. H3K4 is highly methylated at the AR enhancer of the protooncogene UBE2C gene in CRPC which results in AR binding and UBE2C gene expression. Androgen-induced and independent nuclear localization and activation of AR is carried by heat shock protein 90 (TRAP1). Histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates AR hypersensitivity and nuclear localization through modulation of acetylation of TRAP1 [33]. Cellular androgen sensitivity is increased by upregulation of two AR coactivators. Most studied AR coactivators are members of SRC1 and transcriptional intermediary factor 2 (TIF2) family [34]. Proteins encoded by SRC1 and TIF2 have histone acetylase activities. They are able to recruit other histone acetylases as CREB-binding protein p300 and PCAF. Prostate cancer patients who do not respond to endocrine therapy show expression of SRC1 and TIF2 in elevated levels compared to benign prostatic hyperplasia tissue [34]. Transcriptional repressor inhibiting development regulators in stem cells and silence tumor suppressor genes in cancer are named polycomb group (PcG) proteins [80]. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is a subunit of polycomb-repressive complex 2 (PRC2), which catalyses the trimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27) – it is involved in genes repression. Amplification and overexpression of EZH2 is moderately increased in tumors with localized growth pattern and high expression in metastatic prostate cancer cells. EZH2 overexpression is associated with the invasion and progression of prostate cancer disease [37]. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes as ADRB2, CDH1, PSP94 and DAB21P promote tumorigenesis by the action of EZH2. Overexpression of EZH2 trimethylates H3K27 inhibits gene expression. DAB21P is GTPase-activating protein to modulate Ras-mediated signal pathway and apoptosis associated with tumor necrosis factor (TNF). On the other hand, loss of DAB21P expression is high in metastatic prostate cancer disease [38]. Epigenetic silencing of DAB21P is the major mechanism of EZH2 by which it activates Ras and NF- κ B and triggers metastatic spread [39].

Conclusion

Prostate cancer disease is driven by genetic and epigenetic processes and changes. DNA methylation, histone acetylation are linked together. Hypomethylation is expected to lead to alterations in the level of histone acetylation. Thus, therapeutic development and research is now on a rise indicated by the fact that the entire epigenome is disturbed in prostate cancerogenesis. Prostate cancer detection and classification can be detected by the level of altered DNA methylation, changes in the expression of chromatin proteins and posttranslational histone modifications. The basis of epigenetic cancer therapy is formulated by the reversible nature of DNA methylation. Epigenetic targeted therapy is in its early stages. The mechanical as well as the clinical/therapeutic level must be studied much deeply and more remains to be learned. The challenging era of cancer therapeutics is promising.

Tab. 1 Hypermethylated genes in prostate cancer.

<i>DNA repair</i>	
<i>Tumor-suppressor</i>	GSTP1
	MGMT
	APC
<i>Hormone receptor</i>	BAR β
	RASSF1
	AR
<i>Cell adhesion</i>	ESR1,2
	CDH1
	CDH13
<i>Cell-cycle control</i>	CDH44
	CCND2
	CDKN1B
<i>Apoptotic</i>	SFN
	GADD45a
	PYCARD
	RPRM

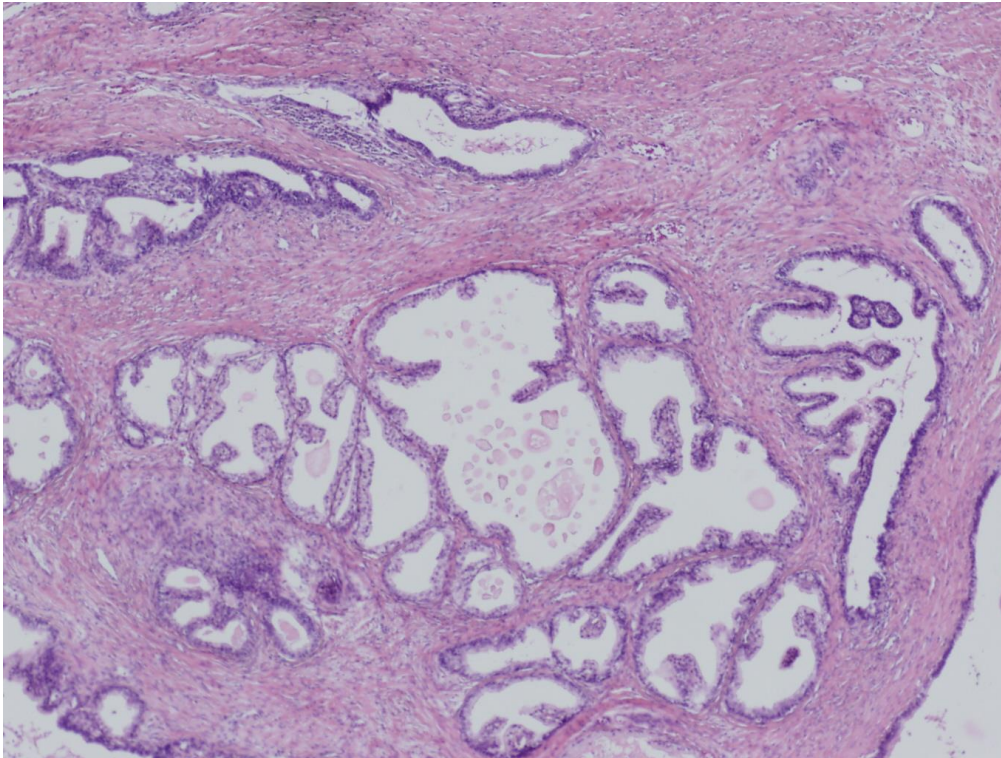


Fig. 1 Benign prostate tissue, slightly proliferated and dilated prostate glands accompanied by fibromuscular stroma, HE staining, magnification 40x.

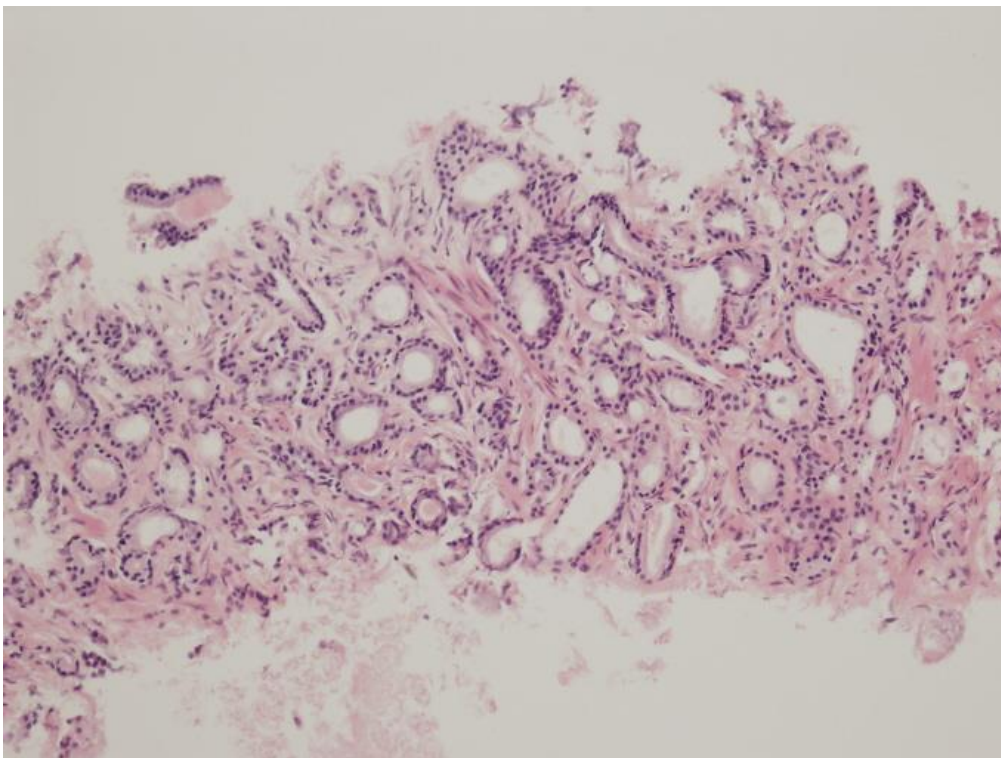


Fig. 2 Low malignant potential of acinar prostate cancer (Gleason 6 (3+3)), slightly irregular glandular formations in the absence of basal cells accompanied by fibrous stroma, HE staining, magnification 100x.

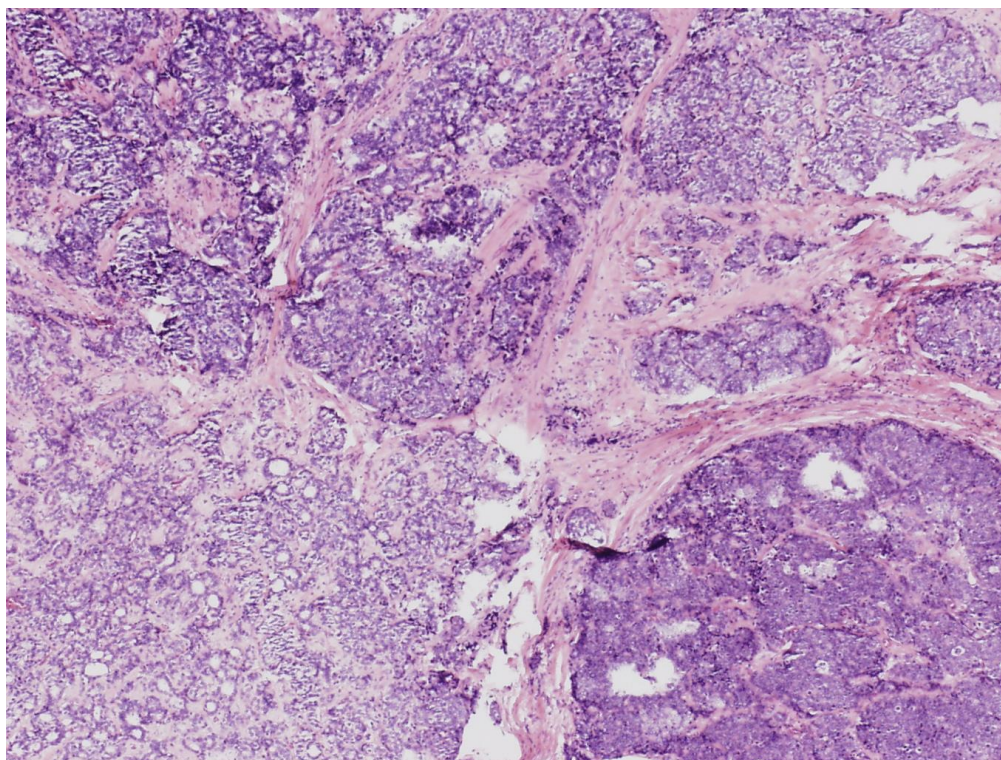


Fig. 3 Highly malignant acinar prostate cancer (Gleason 4 + 3 + tertiary growth pattern 5), left lower corner - tubular growing carcinoma with a growth pattern 3, upper half of the picture - cribriform to microacinar formations of adenocarcinoma (growth pattern 4), right lower corner - solid growing adenocarcinoma (growth pattern 5), HE staining, magnification 40x.

References

- [1] Siegel, *Cancer J Clin.* **2017**, 67:7-30.
- [2] Massenkell, *Anticancer Res.* **1994**, 14:2785-2790.
- [3] Phin, *Front Oncol.* **2013**, 3:240.
- [4] Boysen, *Elife.* **2015**, 4:254-257.
- [5] Robertson, *Nat Rev Genet.* **2005**, 6:597-610.
- [6] Kumar, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22:1-10.
- [7] Ikeda, *Chromosoma.* **2009**, 118:37-41.
- [8] Curradi, *Mol Cell Biol.* **2002**, 22:3157-3173.
- [9] Baubec, *Nature.* **2015**, 520:243-247.
- [10] Luo, *Am J Pathol.* **2013**, 182:2028-2036.
- [11] Maruyama, *Clin Cancer Res.* **2002**, 8:514-519.
- [12] Schulz, *Genes Chromosomes Cancer.* **2002**, 35:58-65.
- [13] Bello, *Mutation Research.* **2004**, 554:23-32.
- [14] Alva, *Future Oncology.* **2011**, 7:447-463.
- [15] Richiardi, *Journal of Clinical Oncology.* **2009**, 27:3161-3168.
- [16] Jeronimo, *Clinical Cancer Research.* **2004**, 10:4010-4014.
- [17] Vanaja, *Clinical Cancer Research.* **2006**, 12:1128-1136.
- [18] Frommer, *National Academy of Sciences of the United States of America.* **1992**, 89:1827-1831.
- [19] Zhang, *Oncogene.* **2004**, 23:2241-2249.
- [20] Dammann, *Histology and Histopathology.* **2005**, 20:645-663.
- [21] Graff, *Cancer Research.* **1995**, 55:5195-5199.
- [22] Woodson, *Prostate.* **2003**, 55:199-205.
- [23] Padar, *Clinical Cancer Research.* **2003**, 9:4730-4734.
- [24] Mortusewicz, *National Academy of Sciences of the United States of America.* **2005**, 102:8905-8909.
- [25] McConnell, *Cancer Research.* **2000**, 60:6243-6247.
- [26] Das, *Molecular Cancer.* **2006**, 5:25-28.
- [27] Santourlidis, *Prostate.* **1999**, 39:166-174.
- [28] Gurel, *Modern Pathology.* **2008**, 21:1156-1167.

- [29] Schulz, *Genes Chromosomes and Cancer*. **2002**, 35:58-65.
- [30] Kuo, *BioEssays*. **1998**, 20:615-626.
- [31] Esteller, *Nature Reviews Genetics*. **2007**, 8:286-298.
- [32] Martin, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2005**, 6:838-849.
- [33] Wang, *Molecular Endocrinology*. **2009**, 23:1968-1972.
- [34] Gregory, *Cancer Research*. **2001**, 61:4315-4319.
- [35] Seligson, *Nature*. **2005**, 435:1262-1266.
- [36] Zhou, *Asian Journal of Andrology*. **2010**, 12:171-179.
- [37] Varambally, *Nature*. **2002**, 419:624-629.
- [38] Xie, *National Academy of Sciences of the United States of America*. **2010**, 107:2485-2490.
- [39] Min, *Nature Medicine*. **2010**, 16:286-294.

Strata funkcie proteínov *PTEN* a *CDKN1B* v karcinogénze prostaty

Holečková, K.^{1, 2}, Híveš, M.³, Mušák, Ľ.², Kliment, J. sr.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Urologická klinika a Univerzitná nemocnica Martin, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin
holeckova17@uniba.sk

Abstract

Prostate cancer (PC) is the second most commonly diagnosed malignant disease in Slovak men, increasing in numbers worldwide. Currently, more than 2000 new cases are diagnosed annually in Slovakia, with around 530 patients succumbing to the disease. A family history of PC increases the risk of developing the disease. Tumour suppressor genes play important role in cancer susceptibility and are particularly important in familial and hereditary forms of cancer. The tumour suppressor genes, *PTEN* and *CDKN1B* have been the subject of many studies. Their chromosomal regions are commonly deleted in PC. Both genes are involved in regulation of PI3K/Akt/mTOR signalling pathway, which regulates growth and surviving of tumour cells by stimulating proliferation process and inhibition of apoptosis. In this review, we describe functions of tumour-suppressor genes *PTEN* and *CDKN1B* in PI3K/Akt pathway and cell cycle regulation, loss of function of both genes and its impact on development, aggressiveness and poor prognosis, characteristic of PI3K/Akt signalling pathway and options of curative treatment for patients with PC.

Keywords: prostate cancer, tumor suppressor genes, *PTEN*, *CDKN1B*

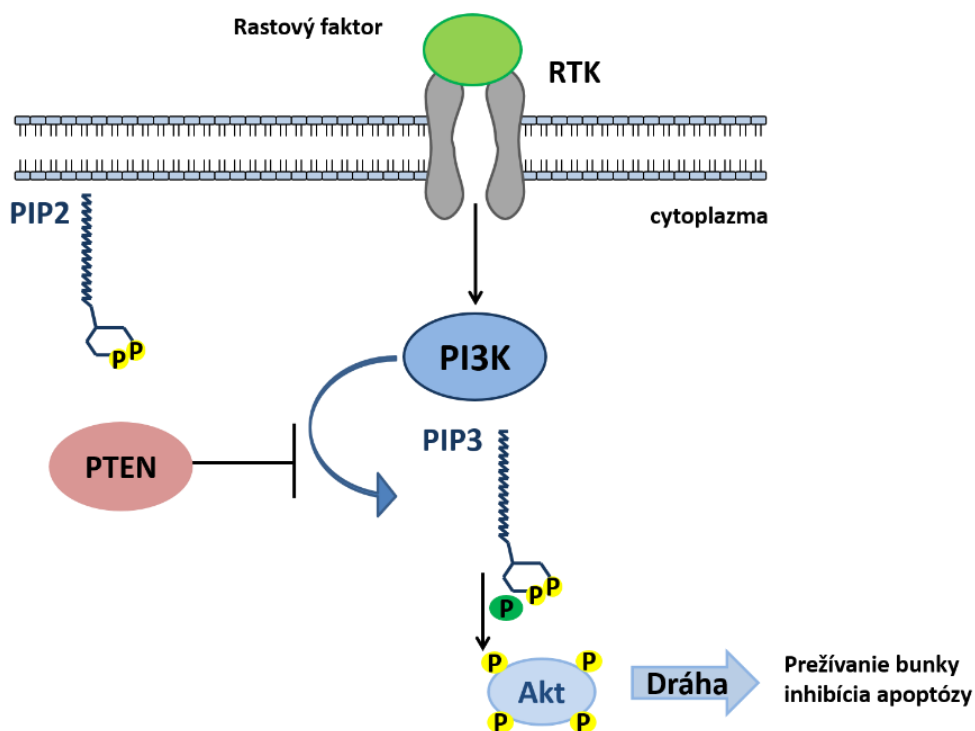
Úvod

Karcinóm prostaty (KP) je významným celosvetovým medicínskym problémom a druhou najčastejšou príčinou úmrtí slovenských mužov. V poslednom štatisticky publikovanom roku 2011 bolo na Slovensku diagnostikovaných viac ako 2000 nových prípadov KP, čo predstavuje štandardizovanú incidenciu 53,0/100 000; a 536 registrovaných úmrtí, čo predstavuje štandardizovanú mortalitu 13,4/100 000 [1]. Vyššiu incidenciu sledujeme u mužov vo veku >65 rokov, a nezávisle od veku u negroidnej rasy, kde je vyššia incidencia spojená s agresívnejším fenotypom KP v porovnaní s kaukazskou rasou. KP je heterogénne ochorenie, na ktorom sa podieľajú exogénne faktory i genetické predispozície jedinca, avšak hlavná príčina vzniku nie je doteraz známa [2]. V posledných rokoch došlo k výraznému rozvoju v oblasti diagnostiky a liečby lokalizovaného KP. Diagnosticky problematickými sú pacienti s familiárnym a hereditárnym výskytom KP. Súčasný výskum sa zameriava na odhalenie genetických predispozícií jedinca k vzniku tohto ochorenia. Doteraz bolo identifikovaných viacero kandidátnych génov. Zmeny na funkčnej úrovni dôležitých proteínov sú asociované so skorším nástupom ochorenia, vyšším Gleasonovým skóre, agresívnejším fenotypom a zlou prognózou [3]. V priebehu vývoja a progresie karcinómu podliehajú tumor-supresorové gény strate svojej funkcie. Perspektívnym prognostickým markerom KP sa javí interakcia dvoch tumor-supresorových génov – *PTEN* a *CDKN1B*. Zmeny v proteínových oblastiach kódovanými spomínanými génmi sa vyskytujú u 50-62% pacientov s KP [4]. V tomto prehľadnom článku sa zaoberáme úlohou proteínov PTEN a CDKN1B ako potenciálnych markerov agresivity KP, zlej

prognózy pacientov s týmto ochorením a možnosťami kuratívnej liečby pacientov so stratou funkcie daných proteínov.

Fosfatázový a tenzinový homológ – PTEN

PTEN je tumor-supresorový gén lokalizovaný na dlhom ramene chromozómu 10, v oblasti 10q23.31. Kóduje proteín nazývaný fosfatidylinozitol-3,4,5-trifosfát 3-fosfatáza, ktorý reguluje aktiváciu signálnej dráhy fosfoinozitol-3-kináz (PI3K). Táto dráha zohráva významnú úlohu pri rozličných bunkových procesoch [5]. Strata funkcie *PTEN* vedie k akumulácii fosfoinozitol-3,4,5-trifosfátu, čím negatívne reguluje aktiváciu signálnej dráhy PI3K/Akt/mTOR, ktorá sa podieľa na regulácii bunkovej fyziológie. Narušením funkcie tejto dráhy dochádza k nekontrolovateľnému rastu a prežívaniu nádorových buniek a k inhibícii apoptózy [6]. Metabolické preprogramovanie indukované stratou funkcie *PTEN* podporuje rast tumoru a proliferáciu buniek KP. V porovnaní s inými karcinómami, pri KP sú prítomné rozsiahlejšie zmeny v metabolizme lipidov. Strata funkcie *PTEN* môže viesť k nadmernej expresii syntázy mastných kyselín, ktorá úzko súvisí s biosyntézou cholesterolu a mastných kyselín hlavne pri KP [7]. *PTEN* je najfrekvencovanejšie sa vyskytujúci mutovaný gén u pacientov s KP. Mutácie v tomto géne sa vyskytujú v 10% pacientov s primárnym KP, a až v 40% pacientov s metastatickým kastračne-rezistentným KP (mKRKP) [4,5]. Narušenie alebo strata funkcie tohto proteínu je asociovaná s progresiou tumoru, vyšším Gleasonovým skóre, zlou prognózou, expanziou tumoru do okolitých tkanív [4],



Obr. 1 Signálna dráha PI3K/PTEN/Akt (upravené podľa [11]).

väčším rizikom biochemickej recidívy lokalizovaného KP po radikálnej prostatektómii [5].

Signálna dráha PI3K/Akt

Dráha PI3K/AKT (Obr. 1) je evolučne konzervovaná, vnútrobunková signálna dráha, ktorá reguluje rôzne bunkové procesy – bunkový rast, proliferáciu, prežívanie, metabolizmus, apoptózu, bunkovú migráciu a progresiu bunkového cyklu. Taktiež hrá

dôležitú úlohu v nádorovej progresii a rezistencii k terapii. Kľúčovými proteínmi tejto dráhy sú fosfatoinozitol-3-kináza (PI3K), proteín kináza B (Akt), tyrozín kinázové receptory (RTK), fosfatidylinozitol-4,5-bifosfát (PIP2) a fosfatidylinozitol-3,4,5-trifosfát (PIP3). Aktivovaná PI3K (RTK alebo G proteínmi) fosforyluje PIP2, pričom vzniká PIP3, úlohou ktorého je aktivácia Akt kinázy [8]. Táto kináza je dôležitá pre prežitie buniek – reguluje viacero transkripčných faktorov a kináz zastúpených v bunkovom metabolizme a proteínovej syntéze. Aktivovaná Akt-kináza fosforyluje pro-apoptotické faktory a inhibitory bunkového cyklu. Centrálnym regulátorom tejto dráhy je lipidová fosfatáza PTEN, ktorá katalyzuje premenu PIP3 na PIP2, čím znemožňuje aktiváciu Akt kinázy, a tým aj proliferáciu a prežívanie nádorových buniek. V prípade narušenia funkcie PTEN dochádza ku akumulácii PIP3 a aktivácii Akt-kinázy, ktorá je súčasťou dráhy PI3K/AKT/mTOR [9]. Táto dráha patrí k hlavným dráham podieľajúcim sa na karcinogenéze. Stimuláciou kinázy mTOR (angl. *mammalian target of rapamycin*) dochádza k zvýšenej translácii mRNA, ktorá kóduje rastové faktory, regulátory bunkového cyklu, proteíny prežívania bunky a angiogénne faktory [10].

Inhibitor cyklín-dependentnej kinázy 1B – CDKN1B

Tumor-supresorový gén *CDKN1B* je lokalizovaný na krátkom ramene chromozómu 12, v oblasti 12p13.1. Kóduje inhibitor cyklín-dependentnej kinázy p27, ktorý je dôležitým kontrolným bodom G1/S bunkového cyklu. Narušenie alebo strata funkcie p27 sa vyskytuje približne v 50% pacientov s KP, koreluje s vyšším Gleasonovým skóre a skorším nástupom ochorenia [12]. p27 je multifunkčný proteín, ktorý má dôležité postavenie vo viacerých bunkových procesoch – regulácia bunkového cyklu, bunkovej proliferácie, diferenciácie a apoptózy. Zmeny v expresii génov *PTEN* a *p27* môžeme sledovať najmä pri pacientoch s pozitívnou rodinnou anamnézou KP [3, 12]. Viaceré štúdie poukázali na prepojenie medzi génmi *PTEN* a *CDKN1B* a ich spoločný dopad na agresivitu KP.

PTEN a CDKN1B

Z posledných výskumov vyplýva, že obidva gény *PTEN* aj *CDKN1B* majú spoločne silnejšiu tumor-supresorovú funkciu ako každý samostatne. Funkčne sa zúčastňujú v rámci rovnakej regulačnej dráhy bunkového cyklu, kde vykonávajú svoju tumor-supresorovú funkciu. Úloha génu *PTEN* v supresii bunkového rastu je sprostredkovaná vďaka jeho schopnosti blokať kontinuitu bunkového cyklu prostredníctvom zvýšených funkčných hladín *CDKN1B*; a účinok *PTEN* na hladiny *CDKN1B* závisí od supresie dráhy PI3K/Akt [4], t.j. inhibícia signálnej dráhy PI3K/Akt nadmernou expresiou *PTEN* môže viesť k akumulácii p27 v jadre a následne k zastaveniu bunkového cyklu v G1-fáze [13]. *CDKN1B* je inaktivovaný stratou *PTEN*, inhibíciou kináz v S-fáze bunkového cyklu spôsobuje zastavenie v G1-fáze [14, 15]. Mechanizmus, prostredníctvom ktorého by *PTEN* mohol kontrolovať progresiu bunkového cyklu, predstavuje regulácia hladín p27 cez kontrolu aktivity Akt-kináz [16]. Cristofano a kol. [15] vo svojej štúdii uvádza, že *PTEN* a *p27* majú kľúčovú kooperatívnu úlohu pri supresii tumoru v tkanivách, a kombinovaná strata funkcie týchto dvoch génov predstavuje kľúčový proces v patogenéze karcinómu; tieto gény spoločne negatívne kontrolujú mieru proliferácie epitelových prostatických buniek a mutácie *PTEN* v kombinácii so zníženou expresiou *p27* majú prognostickú hodnotu v diagnostike karcinómu prostaty.

Možnosti liečby

Dysfunkcia tumor-supresorového génu *PTEN* je prítomná približne v 40-60% pacientov s mKRP. Táto strata iniciuje aktiváciu dráhy PI3K/Akt/mTOR, ktorá je vzájomne regulovaná s dráhou androgénového receptora (AR). Stratou funkcie *PTEN* môže dôjsť k potlačeniu transkripčnej aktivity AR v tumoroch a je asociovaná so zlou prognózou a pokročilým stupňom ochorenia. Bono a kol. [17] vo svojom výskume uvádza, že kombináciou liekov *Ipataserib* (inhibitor Akt) s *Abiraterone acetátom* a *prednizónom* dochádza k zlepšeniu prežívania bez rádio-grafickej progresie pri pacientoch s mKRP.

Pacienti po radikálnej prostatektómii s deficitom *PTEN* majú väčšie riziko biochemickej rekurencie ochorenia a sú tiež rezistentní voči androgén-deprivačnej terapii (ADT). V takýchto prípadoch sa odporúča kombinovaná liečba ADT s inhibítormi mTOR dráhy [18, 19]. Vynikajúcim príkladom je vývoj rapamycínu a jeho derivátov ako sľubných terapeutických látok, ktoré inhibujú mTOR proteín-kinázu v evolučne konzervovanej signálnej dráhe, ktorá riadi bunkový cyklus v reakcii na meniace sa hladiny živín [20]. Ďalšou z možností prevencie a liečby rakoviny je podľa Zhou a kol. [7] inhibícia metabolického preprogramovania vyvolaná stratou funkcie *PTEN*.

Záver

Karcinóm prostaty je v súčasnosti predmetom mnohých štúdií, ktorých úlohou je pochopiť etiológiu tohto ochorenia a identifikovať molekulárne markery, ktoré by pomohli pri diferenciácii indolentných a agresívnych foriem karcinómu prostaty. Jedným z potenciálnych markerov by mohla byť spoločná dysfunkcia tumor-supresorových génov *PTEN* a *CDKN1B* v kombinácii s inými genetickými zmenami, ktoré môžu odštartovať celé spektrum procesov vedúcich ku karcinómu prostaty – od samotného vzniku nádoru až po tvorbu metastáz. Neistota o agresivite detegovaných karcinómov prostaty je pretrvávajúcou dilemou a identifikáciou významných markerov by došlo k zlepšeniu diagnostiky a kuratívnej liečby pacientov.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-15-0181.

Literatúra

- [1] Hlodáková a Chakameh, *Národný onkologický register SR*, **2018**, 198 s., ISBN 978-80-89292-64-6
- [2] Prashanth, *World J Oncol.* **2019**, 10/2:53-89.
- [3] Schmidt, *Česká Urológia*. **2010**, 14/3:129-13.
- [4] Xu, *Hum Genet.* **2004**, 115:255-62.
- [5] Geybels, *Oncotarget*. **2017**, 8/48:84338-48.
- [6] Chaux, *Mod Pathol.* **2012**, 25/11:1543-9.
- [7] Zhou, *Oncology Letters*. **2019**, 17:2856-66.
- [8] Chalhoub and Baker, *Annu Rev Pathol.* **2009**, 4:127-50.
- [9] Haddadi, *Molecular Cancer*. **2018**, 17:37-51.
- [10] Študentová a Melichar, *Onkológia*. **2010**, 5/5:270-4.
- [11] Mollinari and Frattini, *Gastrointestinal Cancers*. **2014**, 3:326-34.
- [12] Kibel, *Genes Chromosomes Cancer*. **1999**, 25:270-6.
- [13] Prasad, *Cell Oncol.* **2015**, 38:215-25.
- [14] Ronen, *Human Pathology*. **2017**, 65:85-91.
- [15] Cristofano, *Nature Genetics*. **2001**, 27:222-4.
- [16] Li and Sun, *Proc Natl Acad Sci.* **1998**, 95:15406-11.
- [17] Bono, *Clin Cancer Res.* **2019**, 25/3:928-36.
- [18] Carver, *Cancer Cell*. **2011**, 19:575-86.
- [19] Mulholland, *Cancer Cell*. **2011**, 19:792-804.
- [20] Dong, *Journal of Cellular Biochemistry*. **2006**, 97:433-47.

**Príspevky zborníka boli podporené projektom BIOMED
Martin (ITMS 26220220187)**



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja



Agentúra
Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR
pre štrukturálne fondy EÚ

Vydanie zborníka bolo podporené projektami

VEGA 1/0171/18 a VEGA 1/0243/18.