

NOVÉ TRENDY A PERSPEKTÍVY V HISTOLÓGII VIII



Nové trendy a perspektívy v histológii VIII

Recenzovaný zborník prác

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

Recenzenti: prof. RNDr. Erika Halašová, PhD.
prof. MUDr. Dušan Dobrota, CSc.

Grafická úprava: RNDr. Mária Kovalská, PhD.

Obálka zborníka: RNDr. Mária Kovalská, PhD.

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: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martin 2022

Tlač: Tlačiareň P+M, s.r.o., Turany 2022

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

ISBN 978-80-8187-120-7

EAN 9788081871207

IPSA SCIENTIA POTESTAS EST

Sir Francis Bacon

OBSAH

	Predhovor	4
EXPERIMENTÁLNE ŠTÚDIE		
Báľentová S.	<i>Vedľajší efekt frakcionovaného ožiarovania cervikálnej miechy na neurogénne oblasti v mozgu starnúcich potkanov</i>	5
Oravcová B.	<i>Zmeny metabolómu plazmy s histopatologickými alteráciami mozgu potkanov v hyperhomocysteinemických podmienkach</i>	8
Adamčáková J.	<i>Vplyv prírodného polyfenolu epigalokatechín galátu (EGCG) na niektoré markery zápalu a histopatologické zmeny v modeli pľúcnej silikózy u potkanov</i>	13
Koklesová L.	<i>Účinok Salvia officinalis na posttranslačné modifikácie histónov v experimentálnom modeli karcinómu prsníka</i>	18
Mazuráková A.	<i>Účinok Šalvie lekárskej na expresiu vybraných parametrov nádorových kmeňových buniek v chemopreventívnom modeli chemicky indukovanej mamárnej karcinogenézy in vivo</i>	23
Samec M.	<i>Modulačný aspekt škorice v regulácii expresie vybraných miRNA v chemopreventívnom modeli rakoviny prsníka in vivo</i>	27
Holovská K.	<i>Štúdium ultraštruktúry pečene kuracieho embrya na 9. Deň inkubácie</i>	32
Tirpáková Z.	<i>Vplyv DMSO na vyvíjajúcu sa pečeň kuracieho embrya</i>	35
Demčišáková Z.	<i>Morfologická analýza vtáčej chorioalantoickej membrány (CAM) so zameraním sa na vývinové štádiá používané pre testovanie biokompatibility inovatívnych materiálov</i>	40
KLINICKÉ A HISTOMORFOLOGICKÉ ŠTÚDIE		
Bartoš V.	<i>Epiteloidný/plexiformný leiomyóm maternice: opis prípadu a problematika histopatologickej diagnostiky nádorov svaloviny maternice s epiteloidnobunkovou morfológiou</i>	44
Hurta Csizmár S.	<i>EMT asociovaný biomarker Rac1 v léziách krčka maternice</i>	51
PREHL'ADOVÉ PRÁCE		
Kašubová I.	<i>Možnosti využitia metód molekulovej biológie na detekciu metylácie u viacerých typov nádorových ochorení</i>	55
Túryová E.	<i>Význam splicingových variantov génu kmeňovosti a pluripotencie POU5F1 v karcinogenéze</i>	62
Dušenka R.	<i>Liquid prostate biopsy</i>	68
Dušenka R.	<i>Multiparametric magnetic resonance imaging in prostate cancer</i>	74
Graňák K.	<i>Diagnostika a moderná liečba chronických glomerulonefritíd</i>	82
Parvanovová P.	<i>Mikrobiom v patogenéze amyotrofickéj laterálnej sklerózy - príčina či dôsledok</i>	86
Neuschlová, M.	<i>Biologické toxíny ako zbrane</i>	91
Adamkov M.	<i>Towards understanding the principles of life: Short review</i>	96

Predhovor

Zostavovatelia zborníka Nové trendy a perspektívy v histológii naplnili svoje každoročné predsavzatie a prezentujú čitateľom jeho ôsmu edíciu. Zborník je publikovaný tak v klasickej tlačenej forme ako aj elektronicky. Cieľom zborníka je (tak ako aj po minulé roky) predstaviť širšiemu okruhu čitateľov výsledky vedeckých aktivít výskumných kolektívov a publikačne aktívnych jednotlivcov z celého Slovenska. Veríme, že to môže vyvolať užitočnú diskusiu a to nielen v prípade riešenia podobných výskumných tém.

Rozsah príspevkov do zborníka sme neobmedzovali počtom strán, čím sme dali možnosť publikovať práce v takom rozsahu, aký autori považujú za optimálny.

Musíme však konštatovať, že prijatie práce do zborníka nie je automatické, pretože príspevky musia spĺňať určité základné kritériá, či už obsahové alebo aj formálne. Z toho dôvodu boli niektoré zaslané práce, žiaľ, neakceptované.

Stalo sa už tradíciou, že najlepšie práce uverejnené v zborníku odmeňujeme vecnými cenami. Väčšinou ide o odborné publikácie z oblasti medicíny, ale vždy je súčasťou odmeny aj poézia a / alebo próza slovenských autorov.

Martin, Jún 2022

Zostavovatelia zborníka

Vedľajší efekt frakcionovaného ožiarovania cervikálnej miechy na neurogénne oblasti v mozgu starnúcich potkanov

Báľentová, S.¹, Kalenská, D.², Muriň, P.³, Hajtmanová, E.³, Adamkov, M.¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³Univerzitná nemocnica Martin, Onkologické centrum, Martin
sona.balentova@uniba.sk

Abstract

In our study, we focused on the side effect of spinal cord irradiation on a population of cells inhabiting brain regions with persistent adult neurogenesis. Adult male Wistar rats received fractionated irradiation of the cervical and thoracic spinal cord segments (C1 – Th1) with a total dose of 24 Gy delivered in 3 fractions (dose 8 Gy per fraction) once a week on the same day for 4 consecutive weeks. We used immunofluorescence staining, confocal microscopy and image analysis of brain slides to determine neuronal changes in two neurogenic areas: the anterior subventricular zone (SVZa) in the wall of the lateral ventricles and hippocampal dentate gyrus (DG). After fractionated irradiation, the population of neuroblasts in both neurogenic areas were preserved. Although we do not yet have complete results of quantitative analysis of other cell markers, the results showed age-related subacute changes 4-5 weeks after fractionated irradiation.

Keywords: rat brain, neurogenesis, fractionated irradiation, senescence

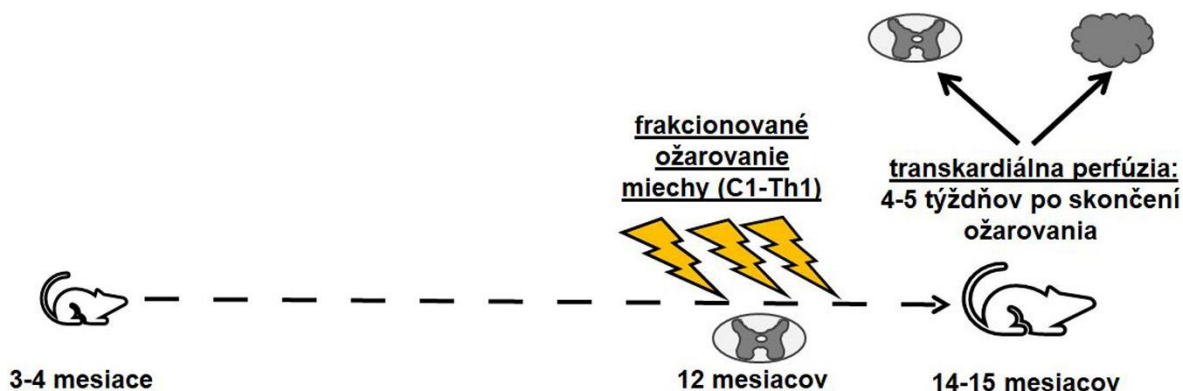
Úvod

V klinickej rádioterapii sa u pacientov s metastázujúcimi nádormi mozgu a nádormi hlavy a krku najviac používa kraniálne frakcionované ožiarovanie. Používanie modernej ožarovacej techniky zvyšuje konformitu ožarovacieho procesu a vedie k dlhšiemu mediánu prežívania pacientov [1]. Napriek tomu frakcionované ožarovanie spôsobuje závažné histopatologické a funkčné, kognitívne zmeny. Kognitívne dysfunkcie sa u pacientov prejavujú zmenami verbálnej a priestorovej pamäte, poruchami pozornosti, ktoré niekedy vedú až k demencii [2]. V predklinických štúdiách na animálnych modeloch boli zistené významné histopatologické zmeny, napr. poškodenie endotelu, narušenie hematoencefalickej bariéry, astroglióza, aktivácia mikroglie, apoptóza prekursorov oligodendrocytov a zápalová odpoveď [3, 4, 5].

Materiál a metodika

V experimente sme použili dospelé, biele samce potkanov, kmeň Wistar (n=20), ktoré mali na začiatku experimentu vek približne 3-4 mesiace. Potkany sme rozdelili na kontrolnú skupinu (n=10) a druhú skupinu (n=10) sme ožarovali frakcionovanou dávkou (cD=24 Gy, rozdelenou na 3 frakcie, 1 frakcia=8 Gy), 1-krát za týždeň. Na ožarovanie sme použili lineárny urýchľovač Clinac iX (Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, USA) s energiou 6 MeV. Ožarovaný objem predstavoval krčné a časť hrudníkových miechových segmentov (C1 – Th1). U oboch skupín zvierat sme po 4-5 týždňoch vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu pomocou fyziologického roztoku a následne 4 % paraformaldehydu (Obrázok 1). Po dekapitácii a vybratí orgánov sme z mozgových hemisfér narezali sériové, sagitálne kryorezy. Pomocou imunofluorescenčného farbenia sme v preparátoch identifikovali marker pre nezrelé

neuróny, neuroblasty – doublecortin (DCX). Preparáty sme fotili na fluorescenčnom konfokálnom mikroskope Olympus Fluoview FV10i (Olympus, Japonsko) a hodnotili sme zastúpenie DCX-imunoreaktívnych (DCX-IR) neuroblastov v dvoch neurogénnych oblastiach: GD hipokampálnej formácie, prednej stene subventrikulárnej zóny (SVZa) a následne v jednotlivých oblastiach rostrálnej migračnej dráhy (RMS), t.j. vertikálnom ramene, ohybe a horizontálnom ramene.



Obrázok 1 Schéma experimentálnej štúdie

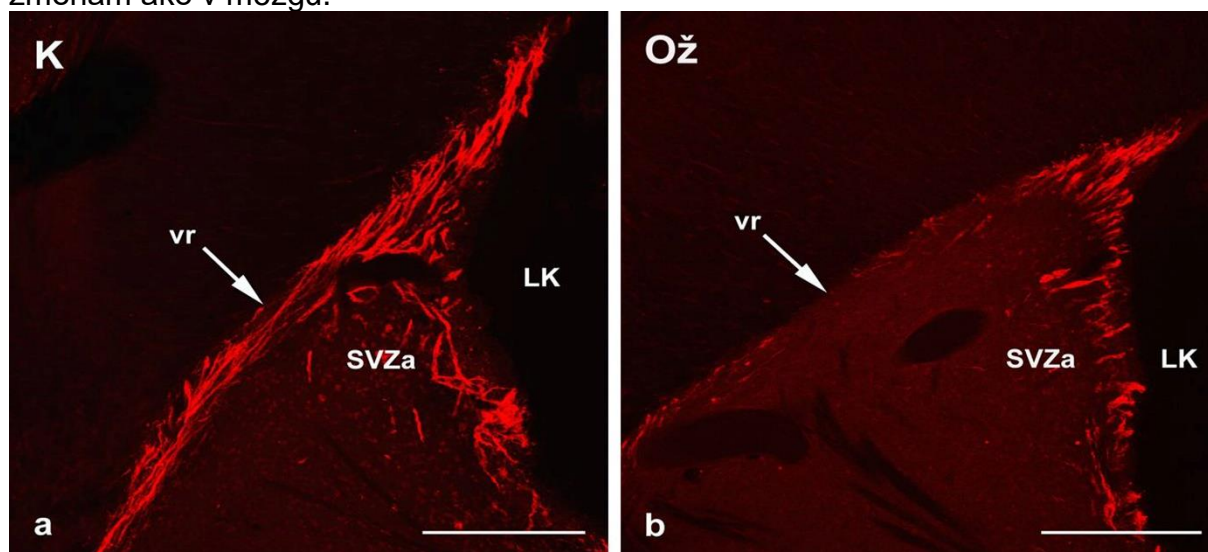
Výsledky

Priebežné výsledky analýzy preparátov ukazujú, že frakcionované ožiarenie potkanov v staršom veku viedlo k zachovaniu neurogenézy v obidvoch hodnotených oblastiach. V SVZa sme identifikovali len mierny pokles imunoreaktivity alebo takmer žiadne zmeny v expresii DCX (Obrázok 2). Podobný histologický nález sme identifikovali aj v ďalších hodnotených oblastiach v rámci RMS a tiež v GD hipokampálnej formácie. Pre konkrétnejšie závery je výsledky potrebné porovnať so zmenami expresie markerov kmeňových a progenitorových buniek, astrocytov, mikrogliových buniek a úrovňou neurodegeneratívnych zmien.

Diskusia

Výsledky našej štúdie naznačujú, že neurogenézu v mozgu dospelých hlodavcov významne ovplyvňuje viacero faktorov. Staršie práce ukazujú, že po ožiarení mozgu potkanov vo veku 18 a 28 mesiacov prekvapujúco nedošlo k významnému poklesu počtu nezrelých neurónov v GD hipokampálnej formácie [6, 7]. U starších jedincov bol identifikovaný nárast aktivovaných foriem mikrogliových buniek v neurogénnych oblastiach, ktorý spolu so zmenami ďalších parametrov predstavoval prejav chronického zápalu. Ten môže negatívne ovplyvniť kognitívne funkcie, napr. zhoršenie pamäťových schopností. V predchádzajúcich štúdiách bol kognitívny deficit identifikovaný bez rozdielu veku, avšak chronický zápal u starších jedincov viedol k progresívnemu zhoršeniu pamäťových schopností [6, 7]. Získané výsledky sú diametrálne odlišné od záverov našich predchádzajúcich štúdií, v ktorých sme ožiarovali potkanov v mladšom veku a zvolený interval prežívania bol dlhší [8, 9, 10]. Ďalší významný faktor, ktorý ovplyvnil zastúpenie populácie v neurogénnych oblastiach bola zvolená ožarovaná oblasť. Jednotlivé frakcie dávok sme aplikovali na vybrané miechové segmenty, pričom sme chceli porovnať účinok žiarenia na miechu a zároveň na vybrané oblasti mozgu. Keďže toho času nemáme k dispozícii výsledky kvantitatívnej analýzy zastúpenia markerov astrocytov a mikroglie v preparátoch

miechy nemôžeme jednoznačne potvrdiť, že v tkanive miechy došlo k podobným zmenám ako v mozgu.



Obrázok 2 Mikrofotografie sagitálnych rezov mozgu kontrolných (K) a ožiarených potkanov (Ož) prežívajúcich 4-5 týždňov po frakcionovanom ožiarení miechy. Imunofluorescenčné farbenie na detekciu doublecortinu (DCX) – markera neuroblastov (červená fluorescencia) v subventrikulárnej zóne (SVZa) v stene laterálnych mozgových komôr (LK) a vertikálnom ramene (vr). Po ožiarení nastal mierny pokles neuroblastov v SVZa a vr. Mierky: a, b = 200µm

Záver

Frakcionované ožarovanie v staršom veku viedlo k zachovaniu populácie neurónov v oboch neurogénnych oblastiach mozgu potkanov. Je otázne, ako tento fakt súvisí s funkčnosťou neurónov najmä z hľadiska predpokladaného vývoja neskorých kognitívnych zmien. Výsledky základného výskumu a skúsenosti z rádioterapie potvrdzujú, že histopatologické nálezy sú úzko spojené s funkčnými zmenami mozgu. Práve funkčné, kognitívne zmeny patria k najzávažnejším prejavom, ktoré výrazne zhoršujú kvalitu života onkologických pacientov.

Práca bola financovaná z prostriedkov grantu Vedeckej grantovej agentúry MŠVV a Š SR (VEGA č. 1/0131/22).

Literatúra

- [1] Moraes, *Appl. Rad. Oncol.* **2017**, 6(1):6-10.
- [2] Greene-Schloesser, *Front. Oncol.* **2012**, 2:73.
- [3] Yuan, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2006**, 66:860-866.
- [4] Kalm, *Radiat. Res.* **2009**, 171:66-76.
- [5] Lumniczky, *Front. Immunol.*, **2017**, 8:517.
- [6] Lamproglou, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2002**, 80:679-685.
- [7] Schindler, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2008**, 70(3):826-834.
- [8] Bálintová, *Neurotoxicology*. **2017**, 60:70-81.
- [9] Bálintová, *Brain Res.* **2019**, 1708:146-159.
- [10] Bálintová, *Neurochem. Int.* **2021**, 145:104985.

Zmeny metabolómu plazmy s histopatologickými alteráciami mozgu potkanov v hyperhomocysteinemických podmienkach

Oravcová, B.¹, Kalenská, D.², Baranovičová, E.³, Adamkov, M.¹, Lehotský, J.^{3,4}, 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, Ústav anatómie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Biomed, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin
maria.kovalska@uniba.sk

Abstract

L-methionine (Met) is an essential proteinogenic amino acid. It is a significant part of the Western diet, the intake of which plays a critical role in cellular physiology. High intake and/or dysregulation in Met metabolism leads to the accumulation of its intermediates in plasma, encompassing homocysteine (Hcy). A high level of Hcy in plasma, hyperhomocysteinemia (hHcy), is considered to be an independent risk factor for cerebrovascular diseases, such as stroke and dementia. Mild hHcy was induced in adult male Wistar rats with Met enriched diet at a dose of 2 g/kg of animal weight/day for 4 weeks. Our study contributes to the exploration of the effect of a Met enriched diet inducing mild hHcy on nervous tissue. An altered plasma metabolomic profile modified spatial and learning memory acquisition as well as a decrease in neurons vitality, and alterations in the morphology of neurons in the selective vulnerable hippocampal CA 1 area of animals treated with Met enriched diet were detected. These results suggest that the mild hHcy alters plasma metabolome, behavioural and histomorphological patterns in rats, belike due to the potential Met induced changes in the "methylation index" of the hippocampal brain area, which eventually aggravates the noxious effect of high Met intake.

Keywords: hippocampus, methionine diet, hyperhomocysteinemia, neurodegeneration, NMR analysis

Úvod

So zvyšujúcou sa dĺžkou života sa zvyšuje aj výskyt neurodegeneratívnych ochorení (ND), ako dôsledok metabolických porúch [1-3]. ND predstavujú veľkú skupinu neurologických porúch s heterogénnymi klinickými a patologickými manifestáciami, postihujúce špecifické podskupiny neurónov. Tieto zmeny sú charakterizované progresívnou dysfunkciou a stratou štruktúry a funkcie nervových buniek, čo môže viesť k ich bunkovej smrti. V súčasnosti je známych množstvo genetických faktorov, ktoré môžu ovplyvniť riziko vzniku ND. Nové zistenia naznačujú, že pri vzniku a progresii neurodegenerácie môže zohrávať podstatnú úlohu aj životný štýl a s ním spojené stravovanie [1, 3, 4].

L-metionín (Met) je esenciálna aminokyselina obsahujúca síru, ktorá má rozhodujúcu funkciu v bunkovej fyziológii [1, 3, 4]. Normoplazmatická koncentrácia Met sa pohybuje od 13 do 45 $\mu\text{mol/l}$ [5, 6] a je výsledkom metabolizmu Met, denného príjmu sírnych aminokyselín a degradácie endogénnych bielkovín.

Zistenia viacerých experimentálnych ako i klinických štúdií naznačujú, že nadmerný príjem Met v strave môže viesť k zvýšeniu rizika vzniku niektorých ochorení, ako sú

diabetes mellitus 2. typu [7], kardiovaskulárne ochorenia, určité typy nádorových ochorení [8], ako aj zmeny v nervovom tkanive. Experimentálne štúdie ukázali, že Met môže pôsobiť neurotoxicky [4, 10]. Vyvoláva oxidačný stres, poškodzuje DNA, znižuje aktivitu Na⁺, K⁺-ATPázy, hustotu dendritovej arborizácie, zmeny v β -amyloidných oligoméroch, fosforyláciu tau, signalizáciu Wnt (Wingless-related integration site) a synaptickú remodeláciu [4, 9, 10]. V klinických štúdiách bola u pacientov s hypermetioninémiou (hMet) zaznamenaná exacerbácia psychopatologických symptómov pri schizofrénii [11], neurologická dysfunkcia a mozgový edém [5, 6].

Poruchy metabolizmu Met vedú k akumulácii jeho medziproduktov v plazme, pričom homocystein (Hcy), ako súčasť cyklu Met-Hcy, predstavuje jeden z najčastejších. Okrem toho, ak je príjem Met v strave vysoký, je prekročená transsulfuračná kapacita. Hcy sa vylučuje z buniek a koncentrácia celkového Hcy (tHcy) v krvi sa zvyšuje [1, 4, 7] a u pacientov sa môže objaviť hypehomocysteinémia (hHcy). V priebehu rokov sa vyvinuli rôzne hypotézy zamerané na toxicitu Hcy. Napriek úsiliu, však žiadny z nich jasne nevysvetľuje biotoxicitu Hcy.

Nedávne práce naznačujú, že hHcy spôsobená diétou s vysokým obsahom Met vedie k neurozápalu, cerebrovaskulárnym mikrohemoragiám, poruchám pamäte [4], ako aj autofágii, apoptóze a synaptickej remodelácii [10] v rôznych experimentálnych modeloch. Je však potrebné objasniť, ako vplyv miernej hHcy, ako výsledok Met diéty, ovplyvňuje selektívne vulnerabilné oblasti mozgu.

Materiál a metódy

V experimente sme použili samcov potkana kmeňa Wistar (n=10) vo veku 5 až 6 mesiacov, s priemernou hmotnosťou 342g, ktoré boli chované v štandardných podmienkach v CZ JLF UK. Manipulácia s týmito zvieratami bola schválená Etickou komisiou JLF UK ako aj ŠVPS SR pod číslom 3033-3/2020-220. Zvieratá boli rozdelené do 2 skupín. Prvá skupina zvierat slúžila ako kontrola (K). Druhej skupine bola počas 28 dní podávaná pitná voda obohatená o Met v dávke 2 g/kg váhy zvierat (Met-K), čím sa u nich vyvolala mierna hHcy. Na 29. deň sa u kontrolných zvierat a zvierat s Met diétou (10–12 hodín po poslednej Met dávke) odobrali vzorky periférnej krvi (1,5 ml) z retroorbitálneho venózneho plexu, ihneď sa ochladili na ľade a odstredili. Potkany boli usmrtené dekapitáciou v hlbokoj anestéze v súlade s etickými zásadami práce s laboratórnymi zvieratami. Mozgy boli následne vypreparované, hlbokozmrazené a narezané na kryostate. Pre ďalšie spracovanie a histomorfologické vyhodnocovanie preparátov sme použili krezylovú violet. Histologické vzorky sme podrobili analýze na svetelnom mikroskope Zeiss Axioscope A1. Zamerali sme sa na oblasť *cornu ammonis 1* (CA1) hipokampu. Výsledky sme hodnotili v programe GrafPhad InStat V3.01 a pre vyjadrenie štatistickej významnosti sme použili Studentov *t*-test. Plazma zvierat bola spracovaná a vyhodnotená identicky s našou predchádzajúcou prácou [11] pomocou NMR (nukleárna magnetická rezonancia) analýzy.

Výsledky

1. NMR analýza plazmatických metabolitov

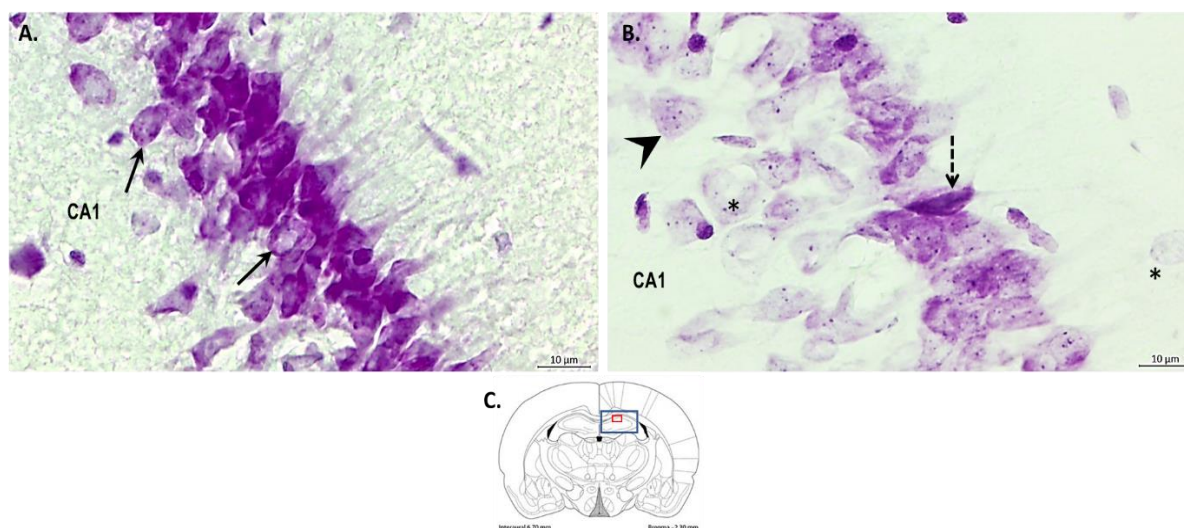
Z 22 hodnotených metabolitov (laktát, glutamín, histidín, izoleucín, leucín, lyzín, fenylalanín, treonín, tryptofán, tyrozín, valín, pyruvát, citrát, acetát, alanín, glukóza, sukcinát, 3-hydroxybutyrát, 2-hydroxybutyrát, 2-hydroxybutyrát, 2-oxovalerát 2-oxovalerát, 2-oxoisoisois 3-metyl-2-oxovalerát a frakcia lipoproteínov), plazmatické hladiny ôsmich metabolitov boli detegované so štatisticky signifikantnými zmenami

u potkanov, ktorým bola podávaná Met diéta v porovnaní s kontrolami. Zistili sme zvýšenie hladiny glukózy o 21 %, acetátu o 20 %, 3-hydroxybutyrátu o 53 % ($p < 0.05$) v Met-K skupine. Zníženie hladiny bolo zaznamenané u frakcie lipoproteínov o 59 %, fenylalanínu o 17 %, tryptofánu o 39 %, tyrozínu o 23 % a histidínu o 11 % ($p < 0.05$) v Met-K skupine. Zmeny pozorované v plazmatických hladinách troch metabolitov sa blížili k hranici významnosti s $p < 0,08$, pričom sme sledovali zníženie hodnôt pre leucín o 14 %, izoleucín o 11 % a valín o 14 % v Met-K skupine.

2. Výsledky histomorfologickej analýzy

Aby sme zhodnotili vplyv hHcy (ktorá bola vyvolaná Met diétou) na rozsah poškodenia neurónov, použili sme farbenie kresylovou violetou. Táto metóda farbenia sa bežne používa na identifikáciu najmä tel nervových buniek v CNS, pričom špecificky farbí Nisslovu substanciu. V kontrolnej skupine (K) sme pozorovali nervové bunky v oblasti CA1 s okrúhlymi, bledo zafarbenými jadrami a silno bazofilne ofarbenou Nisslovou substanciou (Obrázok 1A).

Na druhej strane, v skupine s Met diétou boli detegované rané histomorfologické zmeny (nižšia intenzita farbenia, mikrovakuolizácia cytoplazmy). Neuróny v CA1 oblasti hipokampu vykazovali morfológické zmeny so známami opuchu buniek (Obrázok 1B). Konkrétnejšie, pozorovali sme značnú dezintegráciu proteosyntetického aparátu sprevádzanú zmršťovaním cytoplazmy alebo mikrovakuolizáciou tel neurónov. Napriek neuropatologickým zmenám, kvantitatívna analýza prežívajúcich neurónov v skupine Met-K nevykazovala žiadne štatisticky významné zmeny. Avšak po spočítaní počtu neurónov v CA1 oblasti hipokampu na 5 po sebe idúcich snímkach, ktoré vykazovali známky vyššie uvedených morfológických zmien, sme zaznamenali štatistickú významnosť v skupine zvierat Met-K, a síce 16,8-násobné zvýšenie počtu neurónov s histopatologickým profilom oproti kontrolnej skupine; $p < 0,001$.



Obrázok 1 Details mozgu potkanov ofarbené kresylovou violetou v oblasti CA1 hipokampu. (A) Mikrofotografia oblasti CA1 hipokampu predstavujúce kontrolu (K) a skupinu Met-K (B). Morfológické zmenené neuróny sú označené prerušovanou šípkou (scvrknutie neurónu) a hviezdíčkou (mikrovakuolizácia a opuch buniek), zatiaľ čo šípky ukazujú vitálne neuróny. Úsečka zodpovedá 10 μm ; $n = 5$ /podskupina. (C) Schematický koronárny rez mozgu potkana, prekreslený podľa Paxinosa a Watsona [12] predstavujúci hipokampus (modrý obdĺžnik) a oblasť CA1 hipokampu (červený obdĺžnik), z ktorej boli snímky tvorené a vyhodnocované

Diskusia

Klinické štúdie ukázali, že akútna indukcia prechodnej hHcy suprafyziologickou perorálnou administráciou Met a štúdie na experimentálnych modeloch hHcy [9, 10] odhalili poškodenie endotelu ciev a zmeny v produkcii/biologickej dostupnosti oxidu dusnatého, čo viedlo k iniciácii aterosogenézy [5, 6]. Okrem toho výsledky z klinických štúdií naznačujú, že hHcy je spojená s vaskulárnou demenciou, záchvatmi, epilepsiou a mozgovou príhodou. Všetky tieto ochorenia majú spoločného menovateľa – mikrohemorágie, ktoré zohrávajú úlohu v akcelerácii rozvoja mozgovej atrofie u pacientov bez demencie [5, 6, 10]. Množstvo prác z iných laboratórií [10, 13], ale aj výsledky našich predchádzajúcich experimentov, [1, 2, 14] preukázali pleiotropnú neurotoxicitu hHcy.

V novo vyvinutom modeli miernej hMet spojenej s hHcy (vyvolaná 2 g/kg Met diétou) sme v predchádzajúcich prácach popísali edém v hipokampe s významnými zmenami metabolického pomeru, ako aj značné neuropatologické zmeny [2]. V tejto práci v rovnakom modeli dokumentujeme zvýšený počet neurónov s neurodegeneratívnym vzorom ofarbených kresylovou violetou (Nisslova substancia) špecificky v CA 1 oblasti hipokampu potkanov. Tieto zistenia podporujú hypotézu o potenciálne toxickom účinku pretrvávajúcej vysokej hladine Met a následnej hHcy a je v súlade s našimi predchádzajúcimi experimentami [2, 14]. Diéta s vysokým obsahom Met tiež vyvoláva zmenu v produkcii sírovodíka, zápalových faktoroch, funkcii a morfológii mitochondrií u dospelých samcov potkanov [15]. Met diéta počas 28 dní bola tiež spojená s indukciou miernej hHcy u dospelých potkanov divokého typu, čo sa ukázalo aj v našich predchádzajúcich prácach [2, 14] a podobných štúdiách [16]. Nezistili sme však žiadny rozdiel v celkovom počte neurónov u zvierat s Met diétou, čo koreluje s výsledkami štúdie Zhang et al. [10]. Podobne Singhal a kol. [17] zdokumentovali, že vysoké koncentrácie Met a Met sulfoxidu nespôsobujú priamo bunkovú smrť, ale vyvolávajú značné zmeny vo funkcii astrocytov a/alebo poškodenie astrocytických perivaskulárnych pediklov. Sudduth a kol. [18] spájali hHcy aj s vaskulárnym kognitívnym poškodením, neurozápalom, zníženým synaptofyzínom a fosforyláciou tau [19]. Kombinácia všetkých spomínaných procesov by v konečnom dôsledku mohla na morfolologickej úrovni ovplyvniť astrocyty [2, 14] alebo mikroglia a následne neuróny [20]. Na druhej strane, morfologické zmeny vo vitalite neurónov, mikrovakuolizácia alebo zmršťovanie buniek v oblasti CA1 pozorované v tejto štúdii by mohli dokončiť neuropatológiu bunkového poškodenia alebo oneskorenej bunkovej smrti, čo je v súlade s inými štúdiami s použitím vysokej alebo chronickej dávky Met v diéte [4, 10, 21].

NMR metabolická analýza plazmy ukázala zmenu energetického metabolizmu u potkanov s Met diétou. Znížená utilizácia glukózy je vyvážená zvýšenou utilizáciou triacylglycerolov (ako hlavnej zložky lipoproteínovej frakcie) na koordináciu bunkových funkcií prostredníctvom epigenomickej regulácie, a teda jej vplyvom na epigenetickú acetyláciu histónov, na koordináciu, rast, apoptózu a prežívanie gliových buniek a neurónov [22, 23]. Okrem toho relatívne hladiny plazmatických aminokyselín: fenylalanínu, tryptofánu, tyrozínu a histidínu boli u potkanov s Met diétou významne znížené. Navyše sme hranične významný ($p < 0,08$) pokles pozorovali pri plazmatickom leucíne, izoleucíne a valíne. Všetky uvedené aminokyseliny sú pre normálnu funkciu organizmu obľúbene, čo môže naznačovať znížený príjem bielkovín u potkanov s Met diétou. Keďže esenciálne aminokyseliny sú základnými stavebnými kameňmi bielkovín, pozorované zmeny môžu pôsobiť zníženú syntézu

bielkovín, čo je v korelácii so zisteniami z histomorfologickej analýzy (farbenie krezylovou violetou).

Záver

Naše údaje ukazujú, že model miernej hHcy ako výsledok 2 g/kg Met diéty ovplyvňuje nástup a možnú progresiu hipokampálnej neuropatológie a mení plazmatický metabolóm. Tieto výsledky môžu prispieť k zatiaľ dostupným poznatkom týkajúcich sa metabolických neurodegeneratívnych procesov, keďže ich presný patomechanizmus stále nie je úplne objasnený. Dopĺňanie informácií týkajúcich sa rizikových faktorov, ktoré vedú k rozvoju či akcelerácii neurodegenerácie, môže zohrávať významnú úlohu v prevencii, diagnostike aj liečbe korelujúcich neuropsychiatrických ochorení z humánnej medicíny. Predpokladáme, že udržiavanie a kontrola fyziologickej plazmatickej koncentrácie Hcy môžu mať preventabilnú funkciu pri ND.

Práca bola podporená projektami VEGA 1/0230/20 a VEGA 1/0192/22.

Literatúra

- [1] Lehotsky, *Nova Science Pub. Inc.*, **2019**, pp. 115-156, ISBN-13: 978-1536151633
- [2] Kovalska, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20: 6234.
- [3] Cavallaro, *Int. J. Clin. Nutr. Diet.* **2016**, 2:109.
- [4] Tapia-Rojas, *Mol. Neurodegener.* **2015**, 10:62.
- [5] Cao, *Int. J. Neurosci.* **2020**, 22(9):4961.
- [6] Zhang, *Medicine.* **2020**, 99:e19467.
- [7] Aune, *Diabetologia.* **2009**, 52:2277-2287.
- [8] Micha, *Circulation.* **2010**, 121:2271-2283.
- [9] Nuru, *Metab. Brain Dis.* **2018**, 33:1923-1934.
- [10] Zhang, *Pathol. Res. Pract.* **2020**, 216:152953.
- [11] Baranovicova, *IUBMB Life.* **2020**, 72:2010-2023.
- [12] Paxinos, *Academic Press*, **2013**, 472 s., ISBN: 978-0-12-415752-1
- [13] Tchanchou, *Cell. Mol. Neurobiol.* **2021**, 41:487-503.
- [14] Kovalska, *Biomolecules.* **2020**, 10:1128.
- [15] Ji, *Front. Neurosci.* **2020**, 14:582851.
- [16] Wang, *Mol. Nutr. Food Res.* **2020**, 64(17):2000190.
- [17] Singhal, *Neurochem. Int.* **2018**, 112:1-4.
- [18] Sudduth, *Neuroscience.* **2017**, 341:42-51.
- [19] Weekman, *J. Neuroinflamm.* **2019**, 16:284.
- [20] Seminotti, *Mol. Neurobiol.* **2019**, 56:2760-2773.
- [21] Belloli, *J. Neuroinflamm.* **2018**, 15:33.
- [22] Ruan, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2018**, 21:260-266.
- [23] Yang, *Front. Neurol.* **2019**, 10:585.

Vplyv prírodného polyfenolu epigalokatechín galátu (EGCG) na niektoré markery zápalu a histopatologické zmeny v modeli pľúcnej silikózy u potkanov

Adamčáková, J.¹, Báľentová, S.², Hanusrichterová, J.¹, Mikolka, P.^{1,3}, Adamkov, M.², Kalenská, D.⁴, Kunertová, L.⁴, Mokrá, D.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav fyziológie, 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, Ústav anatómie, Martin

daniela.mokra@uniba.sk

Abstract

Lung silicosis is a serious chronic fibrotizing disease caused by intensive or long-term inhalation of silicon oxide (or silica). Because of a lack of effective therapy and a growing information on the potentials of natural polyphenols in various respiratory disorders, the purpose of this pilot study was to evaluate effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on several markers of inflammation and lung fibrosis in a rat model of silicosis. The model of silicosis was induced by a single oropharyngeal instillation of silica (50 mg/ml/animal). The treatment with intraperitoneal (i.p.) EGCG initiated a next day after silica instillation and was given 2-times a week at a dose of 20 mg/kg. Animals were euthanized 14 or 28 days after the treatment onset. Differential counts of leukocytes in the blood and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid were evaluated microscopically. Immunohistochemical analysis was used for verification of presence of collagen (by Sirius red staining) and smooth muscle mass (detection of smooth muscle actin) in the walls of bronchioles and vessels. EGCG treatment slightly decreased numbers of neutrophils, eosinophils and lymphocytes in the BAL fluid and decreased a formation of collagen and smooth muscle mass in the bronchiolar and vascular walls, demonstrating a therapeutic potential of EGCG in the lung silicosis.

Keywords: lung silicosis, inflammation, fibrosis, epigallocatechin gallate

Úvod

Pľúcna silikóza je závažné, ireverzibilné ochorenie pľúc, ktoré končí fibrózou pľúc a smrťou pacienta [1,2]. Významnú úlohu v patofyziológii tohto ochorenia zohráva interakcia inhalovaných častíc siliky s imunitnými bunkami, čo vedie ku zvýšenej tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS), aktivácii prozápalových a proapoptotických kaskád a stimulácii fibrotických procesov [3]. Výsledkom je akumulácia a aktivácia buniek v interstíciu, zhrubnutie interstícia, tvorba fibrotických nodulov a depozícia kolagénových vlákien [1-3]. Napriek rozširujúcim sa poznatkom o patogenetických mechanizmoch silikózy kauzálna liečba tohto ochorenia prakticky neexistuje. Pribúdajúce informácie o pozitívnom efekte EGCG v liečbe viacerých ochorení nás inšpirovali k použitiu tohto polyfenolu v liečbe experimentálne navodenej silikózy.

Materiál a metódy

V našich experimentoch sme použili samce potkanov SPF kmeňa Wistar s hmotnosťou 250-400 g. Na vyvolanie modelu pľúcnej silikózy sme použili koncentráciu siliky 50 mg/ml/zviera, ktorú sme jednorazovo orotracheálne podali v

inhalačnej anestéze. EGCG sme podávali 2-krát týždenne v dávke 20 mg/kg i.p., pričom prvá dávka bola podaná do 24 h od podania siliky a posledná deň pred usmrtením. Po 14 resp. 28 dňoch od začiatku podávania liečby sme zvieratá usmrtili letálnou dávkou anestetík. Po otvorení hrudníka sme priamou punkciou srdca odobrali vzorku krvi, v ktorej sme následne po farbení podľa May-Grünwalda/Giemsu-Romanovského mikroskopicky určili diferenciálny rozpočet leukocytov. Po podviazaní pravého bronchu sme ľavé pľúca lavážovali 0,9% NaCl (2x10 ml/kg). Bronchoalveolárnu lavážnu (BAL) tekutinu sme centrifugovali (15 min, 1500 ot./min.), sediment naniesli na podložné sklíčko, farbili podľa May-Grünwalda/Giemsu-Romanovského a mikroskopicky určili diferenciálny počet leukocytov.

Stredný lalok pravých pľúc sme fixovali v 4% formaldehyde. Po fixácii boli vzorky pľúc parafinizované, narezané a ofarbené Weigertovým hematoxylínom na vizualizáciu bunkových jadier. Po opláchnutí tečúcou vodou sme rezy farbili pomocou farbiva Picro-Sirius red (Millipore Sigma, USA) počas 1 h. Po dvojito oplachu kyslou destilovanou vodou a dehydratáciou v 100% etanole sme rezy montovali pomocou Entellanu (Merck, USA). Farbením sa vizualizovali červené kolagénové vlákna na bleďožltom pozadí. Ďalšiu časť vzoriek pľúc sme po narezaní inkubovali v 3% roztoku 3% H₂O₂ počas 10 min. a farbili imunohistochemicky pomocou primárnej polyklonálnej protilátky smooth muscle actin (SMA; 1:300, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 30 min. pri izbovej teplote. Rezy sme následne inkubovali pomocou duálneho detekčného systému LSAB2 System-HRP for use on rat specimens (Dako, Dánsko) počas 10 min. Výsledok reakcie, resp. tmavo hnedo sfarbenú cytoplazmu hladkosvalových buniek sme vizualizovali pomocou DAB and Envision Flex HRP magenta substrate chromogen system (Dako). Jadrá buniek sme dofarbili Mayersovým hematoxylínom (Himedia Laboratories) a montovali pomocou Entellanu (Merck). Hrúbku vrstvy spojivového tkaniva (lamina propria) steny bronchiolov a hrúbku tunica adventitia steny ciev mikroskopicky hodnotil skúsený histológ pomocou softvéru Quick Photo Micro software, version 3.2 (Olympus) a údaje vyjadril v μm .

Výsledky sme hodnotili pomocou Studentovho t-testu a vyjadrili ako priemer \pm SD, pričom za štatisticky významné sme považovali hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky

V neliečených skupinách so silikózou sme zaznamenali zvýšenie percenta monocytov v krvi ($p < 0,05$) a zvýšenie percenta eozinofilov ($p < 0,05$) a lymfocytov ($p > 0,05$) v BAL tekutine po 28 dňoch v porovnaní so 14 dňami vývoja modelu (Tabuľka 1).

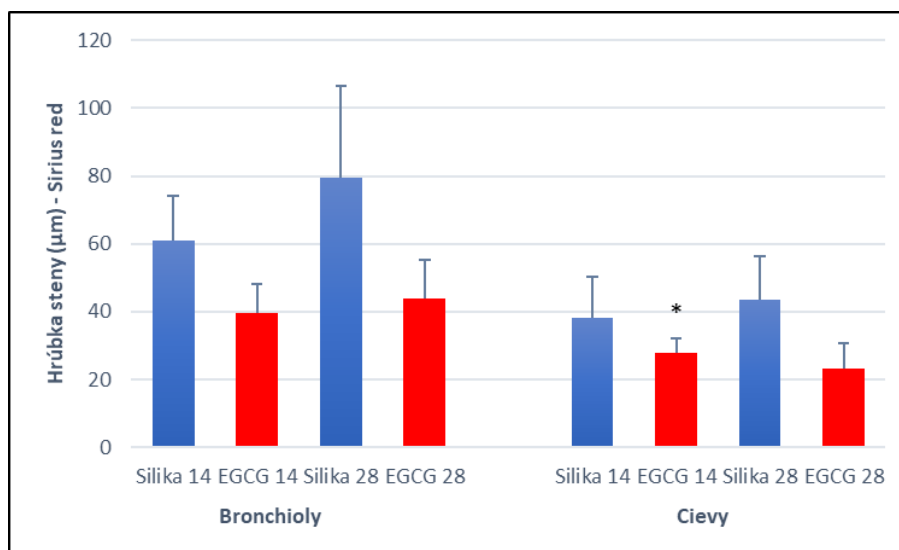
Tabuľka 1 Diferenciálne počty leukocytov v krvi a BAL 14 resp. 28 dní od podania liečby v neliečených skupinách (Silika 14 resp. Silika 28) a v skupinách liečených EGCG (EGCG 14 resp. EGCG 28)

Diferenciálny počet leukocytov v krvi (%)				
	Silika 14	EGCG 14	Silika 28	EGCG 28
Lymfocyty	81,3±4,4	67,3±10,5 ^c	83,3±6,0	67,0±9,4
Neutrofily	17,1±4,4	30,6±10,1 ^c	14,3±5,8	31,5±9,1
Monocyty	0,6±0,2	0,8±0,4 ^c	1,0±0,4 ^a	0,8±0,4
Eozinofily	1,0±0,8	1,3±0,8	1,3±0,8	0,7±0,6
Diferenciálny počet leukocytov v BAL tekutine (%)				
	Silika 14	EGCG 14	Silika 28	EGCG 28
Monocyty-makrofágy	82,6±6,4	92,9±4,4	77,0±8,9	87,2±5,8
Neutrofily	14,7±6,9	4,6±3,4	17,4±6,9	10,2±5,2
Eozinofily	0,8±0,2	0,8±0,4	1,8±1,4 ^b	0,8±0,6 ^d
Lymfocyty	1,9±1,1	1,7±1,3	3,9±1,8	1,8±1,2

Pre štatistické porovnania medzi skupinami $p < 0,05$: ^aSilika 14 vs Silika 28, $p < 0,001$: ^bSilika 14 vs Silika 28, ^cSilika 14 vs EGCG 14, ^dSilika 28 vs EGCG 28.

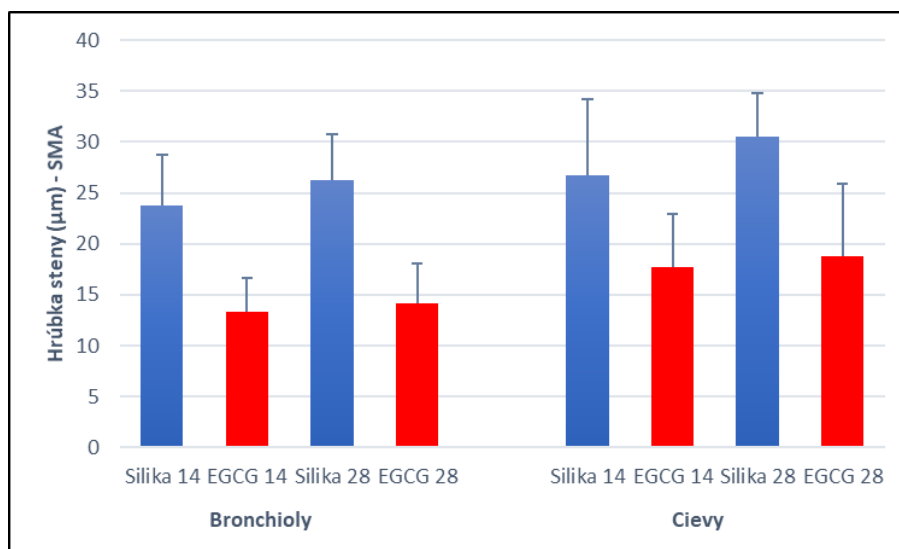
Po podaní EGCG sme pozorovali tendenciu znížiť percento neutrofilov, eozinofilov a lymfocytov v BAL, zatiaľ čo sa percento monocytov-makrofágov mierne zvýšilo. Zmeny percenta krvných leukocytov pritom vykazovali opačný trend (Tabuľka 1).

Analýzou prítomnosti spojivového tkaniva sme u neliečených zvierat zistili postupne sa zvyšujúcu akumuláciu kolagenových vlákien (farbenie Sirius red) a aktívnu hladkej svaloviny (SMA) v stene bronchiolov a ciev, pričom podanie EGCG znížilo hromadenie spojivového tkaniva v stene bronchiolov aj ciev (Obrázok 1 a Obrázok 2).



Obrázok 1 Hrúbka steny bronchiolov a ciev 14 resp. 28 dní od podania liečby v neliečených skupinách (Silika 14 resp. Silika 28) a v skupinách liečených EGCG (EGCG 14 resp. EGCG 28) – farbenie Sirius red

Pre porovnania medzi skupinami: * $p < 0,05$ Silika 14 vs EGCG 14



Obrázok 2 Hrúbka steny bronchiolov a ciev 14 resp. 28 dní od podania liečby v neliečených skupinách (Silika 14 resp. Silika 28) a v skupinách liečených EGCG (EGCG 14 resp. EGCG 28) – farbenie na SMA
Pre porovnania medzi skupinami: všetky $p > 0,05$

Diskusia

Podanie siliky do pľúc spúšťa výraznú zápalovú reakciu, na ktorej sa v akútnej fáze (prvých 14 dní od podania siliky) podieľajú najmä alveolárne makrofágy a neutrofily, ktoré po inzulte vo zvýšenej miere prenikajú do pľúcneho interstícia. Aktivácia týchto buniek vedie k zvýšenej tvorbe ROS a prozápalových cytokínov (IL-1 β , TNF α , IL-6 atď.) [4,5]. Akútny zápal postupne prechádza do štádia chronického zápalu a včasnej fibrózy (15-28 dní od podania siliky), ktoré je charakterizované zvýšením počtu lymfocytov v BAL a tiež proliferáciou myofibroblastov, zmnožením extracelulárnej matrix a ukladaním depozitov kolagénu a zhrubnutím vrstvy hladkej svaloviny bronchiolov a pľúcnych ciev [6-9]. Naše výsledky sú plne v súlade s výsledkami vyššie uvedených autorov. Zistili sme, že kým v prvých 14 dňoch sa v BAL najvýraznejšie zvyšujú neutrofily, v ďalších 14 dňoch sme pozorovali výraznejšie zvýšenie lymfocytov. Zvýšenie akumulácie kolagénu sme zaznamenali už po 2 týždňoch od podania siliky, pričom sa tieto zmeny ešte zvýraznili po 28 dňoch od podania siliky. S progresiou ochorenia sa tiež postupne zvyšovalo hromadenie kolagénových vlákien a zhrubnutie vrstvy hladkej svaloviny v stene bronchiolov a ciev, a to už vo včasnej fáze ochorenia. V našej štúdii sme hodnotili možný benefit podania prírodného polyfenolu EGCG, ktorý je zložkou zeleného čaju. Predchádzajúce štúdie ukázali široké spektrum protizápalových, antioxidačných a antifibrotických účinkov vrátane inhibície transkripčného faktora NF- κ B a následne aj tvorby prozápalových cytokínov TNF α a IL-1 β , indukcie antioxidačného systému Nrf2, zníženia expresie matrix metaloproteinázy (MMP)-2, blokady aktivácie epidermálneho rastového faktora (EGF), či zníženia tvorby kolagénu a expresie SMA [10-12]. Podanie EGCG v našich experimentoch malo vplyv na cirkulujúce leukocyty i zastúpenie leukocytov v BAL, a to v zmysle tendencie znížiť percento neutrofilov, eozinofilov a lymfocytov v BAL. Zároveň sme pozorovali výrazný trend znížiť akumuláciu kolagénu v stene bronchiolov a ciev ako aj tendenciu zmierniť narastanie masy hladkej svaloviny v týchto pľúcnych štruktúrach.

Záver

Naša pilotná štúdia ukázala, že EGCG vykázal protizápalový, antifibotický a antiremodelačný efekt v modeli pľúcnej silikózy, čo naznačuje možné perspektívy jeho použitia v liečbe včasnej fibrózy resp. v rámci preventívnych opatrení u ľudí vystavených dlhodobej alebo intenzívnej akútnej expozícii silike.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0131/22 a APVV-15-0075.

Literatúra

- [1] Greenberg, *Dis. Mon.* **2007**, 53:394-416.
- [2] Barnes, *Respirology*. **2019**, 24:1165-1175.
- [3] Adamcakova and Mokra, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22:4162.
- [4] Øvrevik, *Biomolecules*. **2015**, 5:1399-1440.
- [5] Sayan and Mossman, *Part. Fibre. Toxicol.* **2016**, 13:51.
- [6] Fubini and Hubbard. *Free Radic Biol Med.* **2003**, 34:1507-1516.
- [7] Sugimoto, *Am J Respir Cell Mol. Biol.* **2019**, 60:232-243.
- [8] Du, *Theranostics*. **2019**, 9:1878-1892.
- [9] Guo, *Toxicol. Lett.* **2019**, 300:59-66.
- [10] Sriram, *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2009**, 22:221-236.
- [11] Tipoe, *Toxicology*. **2010**, 273:45-52.
- [12] Kitamura, *Chem. Biol. Interact.* **2012**, 195:95-104.

Účinok *Salvia officinalis* na posttranslačné modifikácie histónov v experimentálnom modeli karcinómu prsníka

Koklesová, L.¹, Líšková, A.¹, Samec, M.², Výbohová D.³, Péč M.⁴, Adamkov M.⁵, Kubatka, P.⁴

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej fyziológie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin; ⁵Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
koklesova5@uniba.sk, peter.kubatka@uniba.sk

Abstract

Female breast cancer has surpassed lung cancer as the most diagnosed cancer, with an estimated 2.3 million new cases in 2020 (GLOBOCAN 2020). Therefore, new prevention strategies are important in order to minimize the risk of breast cancer development. Phytochemicals presented in whole plant food exert several beneficial properties in various cancer types, including anti-cancer, preventive, anti-inflammatory, anti-microbial, or anti-oxidant effects. In our study, we focused on the epigenetic analysis (posttranslational modifications of histones) of potential chemopreventive and anti-cancer effects of *Salvia officinalis* in chemically-induced rat model of mammary carcinoma. Chemoprevention by salvia was achieved by dietary administration in two groups at concentration 0.1 % and 1 %. Chemoprevention was not administered in the control group. The molecular analysis of histone modifications in rat tumor cells revealed significant decrease in lysine methylation status of H3K4me3 and increase in lysine acetylation status of H4K16ac after administration of salvia at both concentrations; however, results were not observed in dose-dependent manner. Our results demonstrated that salvia can influence posttranslational modifications of histones and also exerts chemopreventive and anti-cancer activities in rat breast carcinoma cells *in vivo*.

Keywords: breast cancer, posttranslational histone modifications, salvia, chemoprevention

Úvod

Podľa globálnej štatistiky rakoviny (GLOBOCAN) 2020 sa rakovina prsníka umiestnila na prvom mieste z hľadiska počtu nových prípadov, ale aj počtu úmrtí v ženskej populácii [1]. Aj napriek jej skorej diagnostike sú obmedzené terapeutické stratégie, ktoré často vedú k rezistencii [2]. Preto je dôležité dbať na prevenciu nádorových ochorení. Významnou formou prevencie rakoviny prsníka je chemoprevencia, ktorá predstavuje použitie netoxických nutričných látok s cieľom zvrátiť alebo aspoň oddialiť karcinogénny proces v organizme [3]. Takýmito látkami sú rastlinné funkčné potraviny, ktoré sú bohaté na fytochemikálie vykazujúce mnohé zdravie prospešné účinky (antioxidačné, antiinflamačné či imunomodulačné...) [4]. Fytochemikálie navyše ovplyvňujú aj mnohé epigenetické mechanizmy, vrátane metylácie DNA, histónových modifikácii a regulácie expresie miRNA [5].

Salvia officinalis (šalvia lekárska) je rastlina z čeľade Labiatae/Lamiaceae pochádzajúca z oblastí Stredného východu a Stredomoria, hoci dnes je pestovaná po

celom svete. Je bohatá na rôzne fytochemikálie, vrátane flavonoidov, trieslovín, terpénov, terpenoidov, alkaloidov či kumarínov, a aj preto vykazuje mnohé protirakovinové, antiinflamačné, antioxidačné, antimikrobiálne, antimutagénne, hypoglykemické a hypolipidemické účinky [6-7]. Nakoľko nebol chemopreventívny účinok šalvie skúmaný v modeloch karcinómu prsníka *in vivo*, cieľom našej štúdie bolo sledovať epigenetické zmeny, predovšetkým metylácie a acetylácie histónov v bunkách karcinómu prsníka potkanov, ktorým bola šalvia podávaná v diéte.

Materiál a metódy

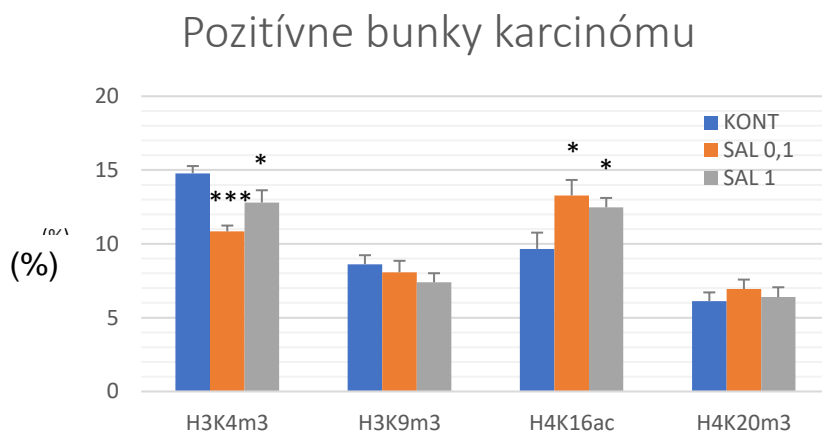
V experimente sme použili samice potkanov Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Nemecko) vo veku 5 týždňov a váhou v rozmedzí 125-140 g. Zvieratá boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca pri teplote 23 ± 2 °C, relatívnej vlhkosti 40-60 % a umelom svetelnom režime svetlo/tma 12:12 h). Karcinogézu sme u potkanov indukovali intraperitoneálne, a to jednorazovou dávkou (50 mg/kg telesnej hmotnosti na 42. postnatálny deň) N-nitroso-N-methylurey (NMU, Sigma, Deisenhofen, Nemecko). Samice potkanov imitujú premenopauzálne obdobie žien s vysokým rizikom rozvoja rakoviny prsníka. Chemoprevencia šalviou (*S. officinalis*) sa aplikovala v diéte (Ssniff, Soest, Nemecko) týždeň pred podaním karcinogénu a trvala 14 týždňov. Zvieratá boli rozdelené do 3 skupín: kontrolná skupina bez aplikácie fytosubstancie (KONT), skupina s obsahom šalvie v potrave s nižšou koncentráciou (1 g/kg) (SAL 0,1) a skupina so šalviou v potrave s vyššou koncentráciou (10 g/kg) (SAL 1). Zvieratá boli raz týždenne vážené a palpované za účelom zistenia výskytu, lokalizácie a frekvencie nádorov mliečnej žľazy. Posledný týždeň experimentu sme zvieratá usmrtili rýchlou dekapitáciou. Odobrané nádorové tkanivo sme zafixovali formalínom a zaliali do parafínu.

Pre imunohistochemickú analýzu sme vybrali najvýznamnejšiu 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. Nepriamu imunohistochemickú metódu sme použili pre detekciu vybraných markerov pre mechanistickú štúdiu na celých parafínových rezoch s použitím komerčne dostupných protilátok špecifických pre potkany. Imunohistochemické farbenie (Autostainer Link 48 /Hermes/) sme vykonali 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 sme vizualizovali sekundárnym farbením (EnVision, Dual Link System-HRP, kat. č. K060911, Dako North America, Carpinteria, CA, USA) s použitím substrátu (diaminobenzidín tetrahydrochlorid). U negatívnych kontrol sme vynechali farbenie primárnymi protilátkami. Morfometrickú metódu sme použili na vyhodnotenie imunohistochemickej expresie antigénu. Digitálne obrázky sme pozorovali 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 sme porovnávali medzi ošetrovanými (SAL 0,1 a SAL 1) a neošetrovanými (KONT) vzorkami nádorových tkanív samíc potkanov, pričom sme analyzovali najmenej 60 vzoriek nádoru na jeden marker.

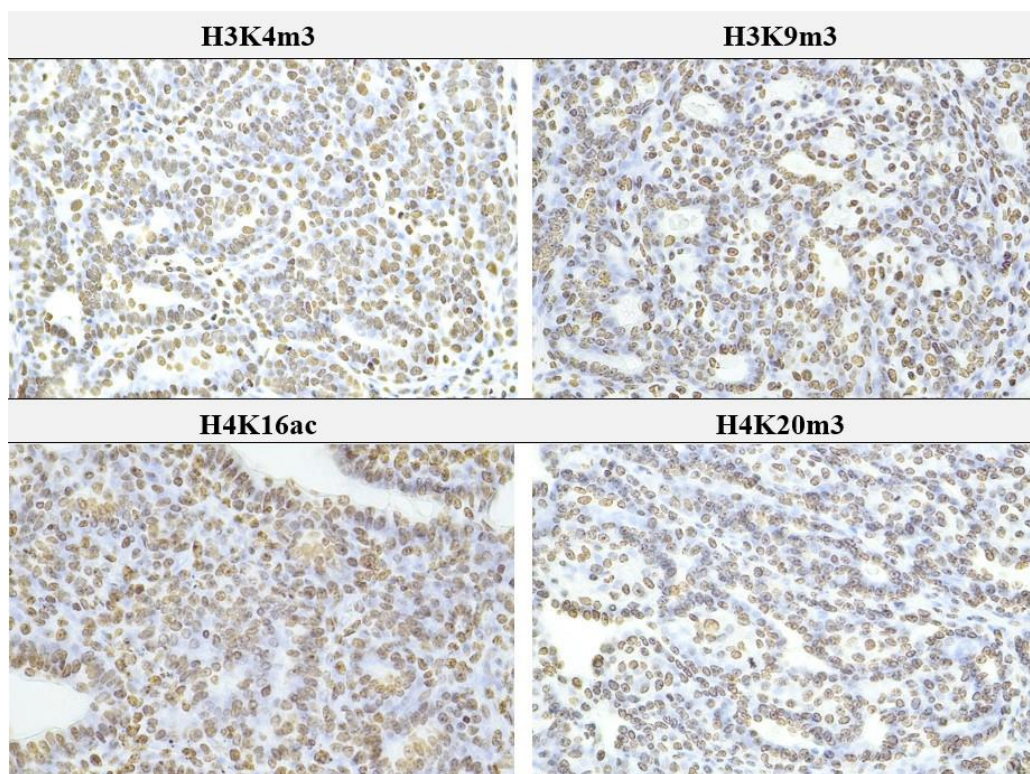
Výsledky

Z hľadiska posttranslačných chemických modifikácií histónov 3 a 4 v bunkách karcinómu prsníka potkanov v porovnaní s kontrolami, šalvia významne znížila hladiny H3K4m3 o 26,5 % (skupina SAL 0,1, $p < 0,001$) a o 13,5 % (skupina SAL 1, $p < 0,05$).

Okrem toho šalvia zvýšila hladiny H4K16ac o 37,5 % (skupina SAL 0,1, $p < 0,05$) a o 29 % (SAL 1 skupina, $p < 0,05$). Hladiny H3K9m3 a H4K20m3 v liečených skupinách (SAL 0,1 a SAL 1) neboli významne pozmenené v porovnaní s kontrolnou skupinou (KONT). Zmeny v posttranslačných modifikáciách histónov H3 a H4 v karcinómoch potkanov *in vivo* po liečbe šalviou sú znázornené na obrázku 1. Obrázok 2 znázorňuje reprezentatívne zábery exprese epigenómových markerov posttranslačných modifikácií histónov v nádorovom tkanive potkana.



Obrázok 1 Imunoexpresia epigenómových markerov (metylácie a acetylácie histónov) v bunkách karcinómu prsníka potkana po liečbe *S. officinalis*. 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 sa porovnávali medzi ošetrovanými (SAL 0,1 a SAL 1) a neošetrovanými (KONT) karcinómovými bunkami samíc potkanov. Analyzovalo sa aspoň 60 obrázkov pre jeden marker



Obrázok 2 Reprezentatívne zábery exprese epigenómových markerov posttranslačných modifikácií histónov v nádorovom tkanive potkana

Diskusia

Meta-analýzy klinických štúdií hodnotiacich pravidelnú konzumáciu rastlinných potravín alebo fytochemikálií pochádzajúcich z rastlín poukázali na priaznivé účinky pre populáciu [8]. Aj napriek neustálemu pokroku v protirakovinových stratégiách zostáva rozvoj rezistencie na rakovinu hlavnou príčinou úmrtnosti. Výnimkou nie je ani rakovina prsníka [2]. Nové preventívne alebo terapeutické stratégie by mohli byť založené na analýze zmien v posttranslačných modifikáciách histónov, pretože sú často deregulované v rôznych chronických chorobách (vrátane rakoviny). Tieto zmeny by mohli slúžiť ako prediktívne a prognostické markery [9]. Cieľom našej štúdie bolo hodnotiť protinádorové účinky *S. officinalis* prostredníctvom epigenetických zmien histónov v chemopreventívnom modeli karcinómu prsníka. Šalvia v oboch dávkach (SAL 0,1 a SAL 1) významne znížila hladiny H3K4m3 a zvýšila hladiny H4K16ac vo vzorkách rakoviny potkanov. V rovnakom animálnom modeli rakoviny prsníka sme odhalili prospešné zmeny v modifikáciách histónov v nádorových bunkách potkana po aplikácii klinčeka [10], tymiánu [11], škorice [12] a sumaku [13] v diéte. V inej štúdii resveratrol indukoval cytotoxicitu v bunkách MCF-7 a MDA-MB-231, a to prostredníctvom zníženia hladín H4R3me2s a H3K27me3 a zvýšenia hladín H3K9ac a H3K27ac [14]. Iní autori zistili, že epigalokatechín-3-galát reaktivoval umlčaný tumor-supresorový gén prostredníctvom zníženia aktivity históndeacetylázy a zvýšením hladín acetylovaného lyzínu 9 a 14 na históne H3 a acetylovaného lyzínu 5, 12 a 16 na históne H4 a prostredníctvom znížených hladín metylovaného lyzínu 9 na históne H3 [15]. Napriek tomu, že naša štúdia neodhalila presné mechanizmy, ktorými šalvia moduluje posttranslačné modifikácie histónov v použitom modeli rakoviny prsníka *in vivo*, komplexné predklinické a klinické údaje jasne poukazujú na preventívne a protinádorové účinky dietetických fytochemikálií, resp. celistvých rastlinných potravín [16]. Avšak pre detailnejšie pochopenie procesov spojených s posttranslačnými modifikáciami histónov v rámci progresívnych protirakovinových terapií je potrebný ďalší výskum.

Záver

Fytochemikálie obsiahnuté v rastline *S. officinalis* v našej štúdii karcinómu prsníka samíc potkanov odhalili významný chemopreventívny a protinádorový účinok, predovšetkým na epigenetické zmeny - postranslačné modifikácie histónov. Šalvia v nižšej (SAL 0,1) aj vyššej (SAL 1) koncentrácii výrazne znížila metylácie histónov H3K4m3 a zvýšila acetylácie histónov H4K16ac.

Experimenty boli schválené Etickou komisiou JLF UK (No. EK1860/2016) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. Ro-2548/18-221/3) a finančná podpora bola zabezpečená grantami VEGA 1/0136/19.

Literatúra

- [1] Sung, CA *Cancer J. Clin.* **2021**, 71(3):209-249.
- [2] Fisusi, *Pharm. Nanotechnol.* **2019**, 7(1):3-23.
- [3] Kubatka, *Univerzita Komenského v Bratislave*, **2017**, 204 s., ISBN 978-80-223-4373-2
- [4] Chen, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19(9):2729.
- [5] Arora, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20(18):4567.
- [6] Ghorbani, *J. Tradit. Complement. Med.* **2017**, 7(4):433-440.
- [7] Hosseini, *Avicenna J. Phytomed.* **2015**, 5(2):84-97.
- [8] Poorolajal, *J. Res. Health. Sci.* **2021**, 21(1):e00502.
- [9] Romanowska and Joshi, *Genes (Basel)*. **2019**, 10(2).
- [10] Kubatka, *J. Cell. Mol. Med.* **2017**, 21:2837-51.
- [11] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20:1749.
- [12] Kubatka, *Molecules*. **2020**, 25(6):1399.

- [13] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 22(1):183.
- [14] Chatterjee, *Biofactors*. **2019**, 45(5):818-829.
- [15] Nandakumar, *Carcinogenesis*. **2011**, 32(4):537-44.
- [16] Samec, *Biomolecules*. **2019**, 5:9(12).

Účinok Šalvie lekárskej na expresiu vybraných parametrov nádorových kmeňových buniek v chemopreventívnom modeli chemicky indukovanej mamárnej karcinogenézy *in vivo*

Mazuráková, A.¹, Koklesová, L.¹, Samec, M.², Vybohová, D.³, Adamkov, M.⁴, Péč, M.⁵, Kubatka, P.⁵

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej fyziológie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ⁵Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin
liskova80@uniba.sk; peter.kubatka@uniba.sk

Abstract

Phytochemicals, isolated or their mixtures in whole plants, are associated with significant anti-cancer efficacy through modulation of multiple cancer-related signaling, including cancer stem cells (CSCs). Our experiment deals with the antineoplastic effects of *Salvia officinalis* L. (sage) via a modulation of expression of selected CSCs markers (CD24, CD44, CD133, ALDH1, and EpCam) in chemopreventive rat model of experimental mammary carcinogenesis. Experimental animals were divided into three groups: control group without chemoprevention, chemoprevention with sage at a concentration of 0.1 % (SAL 0.1) and chemoprevention with sage at a concentration of 1 % (SAL 1). Immunohistochemical analysis of treated rat tumor specimens showed a significant decrease in ALDH1 expression in higher sage group compared to control. We also observed a significant dose-independent decrease in EpCam expression in groups administered with sage compared to control. In conclusion, sage demonstrated a capacity to affect the multistep process of mammary carcinogenesis via modulation of cancer stem cells. The significant antineoplastic action of whole plant foods is probably the result of additive or synergistic effects of mixture of phytochemicals present in the whole plant.

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

Úvod

Rakovina prsníka sa na celosvetovej ako aj národnej úrovni dlhodobo umiestňuje na popredných priečkach v rámci incidencie a mortality [1,2]. Chemoprevenca predstavuje významný spôsob znižovania incidencie rakoviny prsníka. Fytochemikálie nachádzajúce sa v celistvých rastlinách vykazujú významné protirakovinové účinky sprostredkované pôsobením na bunkové signalizácie spojené s procesom karcinogenézy [3,4]. Nádorové kmeňové bunky sú charakterizované ako subpopulácia buniek s možnosťou sebaobnovy a diferenciácie do rôznych typov nádorových buniek. Nádorové kmeňové bunky sa významne podieľajú na mnohostupňovom procese karcinogenézy, vrátane nádorovej iniciácie a promócie ako aj progresie ochorenia, vzniku metastáz či rezistencie na terapiu [5]. Existuje niekoľko zavedených markerov nádorových kmeňových buniek, vrátane CD24, CD44, CD133, ALDH1 a EpCam [6,7]. Šalvia lekárska (*Salvia officinalis* L.) je rastlina z čeľade *Lamiaceae* (hluchavkovité), ktorá sa pôvodne vyskytovala v oblastiach Stredného východu a Stredozemného

mora, avšak dnes je možné šalviu nájsť takmer na celom svete. Najvýznamnejšie fytochemikálie v kvetoch, listoch a stonke šalvie zahŕňajú flavonoidy, triesloviny a terpény / terpenoidy, alkaloidy a kumaríny [8]. Protirakovinové účinky šalvie neboli doposiaľ v modeli rakoviny prsníka s použitím hlodavcov hodnotené. Na základe uvedeného sme sa rozhodli zhodnotiť vplyv šalvie 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 šalviou (*S. officinalis*) (sušená vňať, Calendula, Nová Ľubovňa, Slovenská republika; krajina a oblasť pôvodu – Slovensko, Spiš) 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 šalvie v potrave v nižšej koncentrácii (1 g/kg) (ŠAL 0.1) a skupina so šalviou v potrave vo vyššej koncentrácii (10 g/kg) (ŠAL 1). V závere experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Pri hodnotení protinádorového účinku šalvie u samíc potkanov sme sa zamerali na imunohistochemické stanovenie vybraných parametrov nádorových kmeňových buniek (CD24, CD44, CD133, ALDH1, 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 ($0,5655 \text{ mm}^2$) nádorových "hot spot" oblastí. Morfometrická analýza digitálnych záberov bola uskutočnená za použitia softvéru QuickPhoto Micro, verzie 3.1 (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-2548/18-221/3).

Výsledky

Hodnotenie parametrov nádorových kmeňových buniek preukázalo signifikantný pokles o 43,5 % ($p < 0,05$) pri vyššej dávke šalvie v porovnaní s kontrolou (KONT). Taktiež sme preukázali dávkovo nezávislé zníženie expresie EpCam o 31 % ($p < 0,01$) a 23 % ($p < 0,05$) v skupinách s aplikovanou šalviou v porovnaní s kontrolnou skupinou

(KONT) (Obr. 1). Reprezentatívne zábery imunohistochemickej analýzy expresie CD24, CD44, CD133, ALDH1 a EpCam ako parametrov hodnotenia účinku šalvie na nádorové kmeňové bunky v mamárnych nádoroch potkanov zobrazuje Obrázok 2.

Diskusia a záver

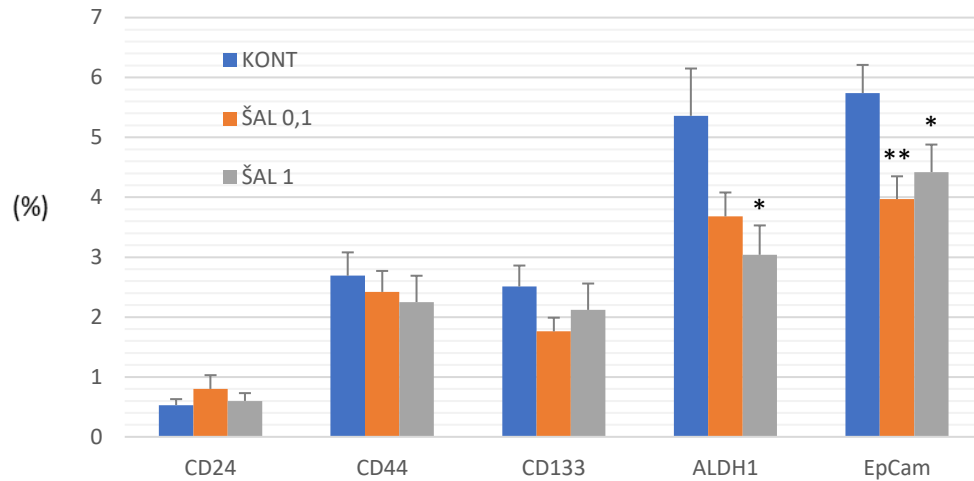
Aktuálne celosvetové trendy v incidencii a mortalite si vyžadujú zavedenie efektívnych prístupov v liečbe a prevencii rakoviny prsníka. Rastlinné funkčné potraviny predstavujú zdroj bioaktívnych fytochemikálií s významnými účinkami pre ľudské zdravie, pričom sú zároveň charakterizované ľahkou dostupnosťou a relatívne nízkou toxicitou. Fytosubstancie dokážu preukázateľne regulovať mnohostupňový proces mamárnej karcinogenézy prostredníctvom modulácie mnohých bunkových signalizácií zapojených do nádorového procesu. Na základe uvedeného predstavujú fytochemikálie potenciálne efektívne substancie v liečbe a prevencii rakoviny prsníka [3,4,9]. Výsledky nášho experimentu preukázali signifikantný účinok šalvie na parametre nádorových kmeňových buniek v chemopreventívnom modeli chemicky indukovanej mamárnej karcinogenézy *in vivo*. Pozorovali sme signifikantné zníženie expresie ALDH1 pri vyššej dávke šalvie a dávkovo nezávislé zníženie expresie EpCam v porovnaní s kontrolnou skupinou. Použitím rovnakého animálneho modelu sme v nedávnej dobe preukázali aj významný vplyv oregana, klinčeka, tymianu a škoric na parametre nádorových kmeňových buniek [10–13]. Predklinické štúdie poukazujú na vyššiu protinádorovú účinnosť (vrátane účinkov na nádorové kmeňové bunky) celistvých rastlín charakterizovaných obsahom širokého spektra bioaktívnych fytochemikálií v porovnaní s izolovanými sekundárnymi rastlinnými metabolitmi [3,14]. Využitie chemopreventívnych vlastností celistvých rastlinných potravín charakterizovaných obsahom širokého spektra bioaktívnych fytochemikálií je považované za prínosné predovšetkým v rámci primárnej prevencie z dôvodu významnej protirakovinovej aktivity, relatívne jednoduchšej dostupnosti a tiež nízkej toxicity.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0136/19.

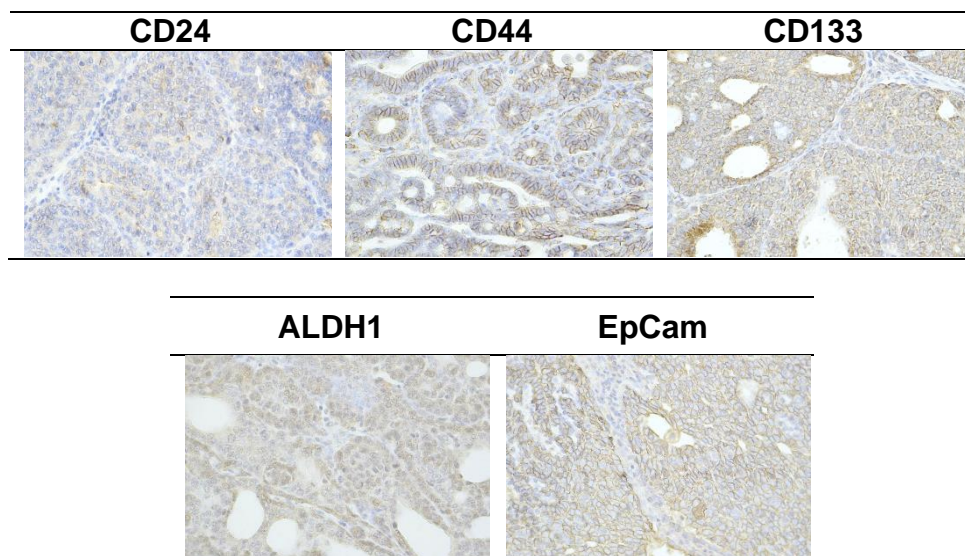
Literatúra

- [1] Sung, *CA Cancer J. Clin.* **2021**, 71(3):209-249.
- [2] <https://iszi.nczisk.sk/nor.sr/>; citované dňa 20.5.2022
- [3] Kapinova, *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 96:1465-1477.
- [4] Mazurakova, *EPMA Journal.* **2022**, doi:10.1007/s13167-022-00277-2.
- [5] Crabtree, *Biomedicines.* **2018**, 6.
- [6] Shima, *Gland. Surg.* **2017**, 6.
- [7] Liu, *Cancer Biomark.* **2020**, 28.
- [8] Hosseini, *Avicenna J. Phytomed.* **2015**, 5:84-97.
- [9] Kubatka, *Bratislava*, **2017**, ISBN 978-80-223-4373-2
- [10] Kubatka, *Eur. J. Nutr.* **2017**, 56:1303-1316.
- [11] Kubatka, *J. Cell. Mol. Med.* **2017**, 21:2837-2851.
- [12] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20.
- [13] Kubatka, *Molecules.* **2020**, 25:1399.
- [14] Liskova, *Molecules.* **2019**, 24.

Pozitívne bunky karcinómu



Obrázok 1 Imunohistochemické hodnotenie expresie parametrov nádorových kmeňových buniek CD24, CD44, CD133, ALDH1 a EpCam v mamárnych nádorových bunkách potkanov po aplikácii šalvie (*S. officinalis*). Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetické priemery \pm SEM. KONT – kontrolná skupina, ŠAL 0,1 – skupina so šalviou aplikovanou v nižšej dávke, ŠAL 1 – skupina so šalviou aplikovanou vo vyššej dávke. Signifikantný rozdiel: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. KONT



Obrázok 2 Reprezentatívne zábery imunohistochemickej analýzy parametrov nádorových kmeňových buniek (CD24, CD44, CD133, ALDH1, EpCam) v nádorových mamárnych tkanivách potkanov pri hodnotení účinkov šalvie. Zväčšenie 400x

Modulačný aspekt škorice v regulácii expresie vybraných miRNA v chemopreventívnom modeli rakoviny prsníka *in vivo*

Samec, M.¹, Mazuráková, A.², Koklesová, L.², Péč, M.³, Péčová, R.¹, Adamkov, M.⁴, Kubatka, P.³

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej fyziológie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, 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
marek.samec@uniba.sk

Abstract

Phytochemicals are defined as bioactive compounds of plants representing an important source of various molecules with a wide range of therapeutic applications. Recent evidence suggests anti-cancer abilities of phytochemicals via modulation of different cancer-associated pathways such as proliferation, growth, invasiveness, and metastasis, as well as metabolic reprogramming of cancer cells. Moreover, phytochemicals can act as epigenetic modifiers due to the fact that epigenetic changes tend to alter during the course of carcinogenesis. Aberrant expression of specific microRNA (miRNA) has been connected etiologically with breast cancer initiation and promotion. The main aim of our experimental study was to evaluate the potential chemopreventive and therapeutic effects of *Cinnamomum zeylanicum* L. via the modulation of miRNA expression (miR-21, -22, -34a, -155, -210) in an animal model of mammary carcinogenesis. Carcinogenesis in rats was induced by N-methyl-N-nitrosourea (NMU). Chemoprevention by *Cinnamomum zeylanicum* L. started one week before administration of carcinogen and lasted 15 weeks until the decapitation of animals. Removed tumor tissues were further processed for miRNA analysis. Experimental data revealed that *Cinnamomum zeylanicum* L. significantly decreased the expression of oncogenic miR-21 ($p < 0.001$) and miR-155 ($p < 0.05$) in the lower dose treatment group compared to the control group without chemoprevention. In conclusion, our results show the potential chemopreventive effect of *Cinnamomum zeylanicum* L. via modulation of epigenetic signaling cascade contributing to breast cancer development.

Keywords: phytochemicals, microRNA, epigenetics, rats, cinnamon

Úvod

Rakovina predstavuje v súčasnosti závažný problém verejného zdravia, ktorý má významný dopad na rozvinutý ako aj rozvojový svet. Počet novo diagnostikovaných prípadov nádorových ochorení, identifikovaných v roku 2018 predstavoval odhadom 18,1 milióna ľudí s rakovinou. Odhady na rok 2030 predpokladajú ročný nárast nových prípadov malígnych ochorení až na 23,6 milióna pacientov (1). Nádorové ochorenie prsníka predstavuje najčastejšie diagnostikovaný typ rakoviny v ženskej časti populácie. Podľa *World Health Organization* (WHO) bolo celosvetovo v roku 2020 diagnostikovaných približne 2.3 milióna nových prípadov rakoviny prsníka, pričom bolo zaznamenaných 685 000 úmrtí na toto ochorenie (2). V súčasnosti dostupné možnosti liečby nádorových ochorení zahŕňajú chirurgické odstránenie nádorovej masy a radiačnú terapiu po ktorej zvyčajne nasleduje systémová chemoterapia. Primárne dostupné chemoterapeutické látky zahŕňajú antimetabolity ako je metotrexát (3), DNA

interkalačné činidlá (napríklad cisplatina a doxorubicin) (4,5), antitubulínové látky (napr. taxány) (6), hormóny a molekulárne agensy zacielené na molekuly zapojené v raste a proliferácii nádoru (7). Z pohľadu negatívnych aspektov aplikácie chemoterapeutickej liečby sú najčastejšie definované získanie rezistencie nádoru na liečiva a toxicita pre nenádorové tkanivá, čo vedie k znižovaniu kvality života pacientov s nádorovým ochorením (8). Na prekonanie limitácií súčasnej chemoterapie sa preto vyvíja enormné úsilie na identifikáciu nových a účinných protirakovinových látok s lepšou účinnosťou a zároveň s minimalizáciou vedľajších účinkov.

Fytochemikálie sú sekundárne metabolity rastlín, ktorých pozitívny dopad na ľudské zdravie bol preukázaný v mnohých predklinických a klinických štúdiách (1,9). Mnohé z týchto fytochemikálií sú prirodzene sa vyskytujúce biologicky aktívne zlúčeniny s významným antineoplastickým potenciálom (10). Tumor supresívne vlastnosti fytochemikálií sú asociované s inhibíciou nádorovej proliferácie (11), angiogenézy (12), invazivity (13) ako aj s indukciou apoptózy (14). Okrem toho bol preukázaný modulačný potenciál sekundárnych metabolitov rastlín v regulácii epigenetických procesov vrátane exprese miRNA, ktoré sú úzko spojené s rozvojom karcinogenézy a predstavujú dôležitý faktor asociovaný s rozvojom rezistencie a agresívnej formy rakoviny prsníka (15–17). Práve aberantná expresia miRNA v nádorovom tkanive indukuje a podporuje procesy ako je intratumorová hypoxia (18), invazivita a tvorba metastáz (19), ale aj zmeny na úrovni bunkového metabolizmu (20). Z tohto hľadiska predstavuje analýza zmien exprese miRNA ideálny prediktívny a prognostický marker karcinogenézy.

Materiál a metódy

Animálne modely a indukcia karcinogenézy

V experimente boli použité samice potkanov kmeňa *Sprague-Dawley* (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Nemecko) ($n=75$) vo veku 30-34 dní s telesnou hmotnosťou 115 – 140 g. Aklimatizácia zvierat prebiehala v štandardných podmienkach vo viváriách s teplotou prostredia 23 ± 2 °C, relatívnou vlhkosťou vzduchu 40 – 60 % s umelým režimom svetlo/tma (L/D 12 : 12 h). Svetlo žiarovkovej lampy (40 W) sa spúšťalo automaticky o 7:00 ráno. Karcinogenéza sa u potkanoch indukovala intraperitoneálnym podaním karcinogénu *N-nitroso-N-methylurey* (NMU, Sigma, Deisenhofen, Nemecko) v jednorazovej dávke 50 mg/kg telesnej hmotnosti v 42. deň postnatálneho vývoja. Chemoprevencia škoricou (*Cinnamomum zeylanicum* L. - kôra, Calendula, Nová Ľubovňa, Slovenská republika; krajina pôvodu – Indonézia) začala týždeň pred aplikáciou karcinogénu a trvala kontinuálne 15 týždňov. Škorica bola podávaná v diéte v dvoch koncentráciách a to konkrétne 1 g/kg potravy (0,1 %, čo predstavuje nižšiu koncentráciu fytofarmaka v potrave) a 10 g/kg potravy (1 %, čo predstavuje vyššiu koncentráciu fytofarmaka v potrave). Zvieratá boli náhodne rozdelené do 3 experimentálnych skupín: 1) kontrolná skupina bez chemoprevencie; 2) skupina s nižšou koncentráciou škoric v potrave; 3) skupina s vyššou koncentráciou škoric v potrave.

Pitva zvierat odber a procesovanie nádorového tkaniva pre ďalšie analýzy

Posledný (15.) týždeň boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou, pričom im bolo odobraté nádorové tkanivo na ďalšie expertízy. Tkanivo bolo odobraté s prihliadnutím na maximálnu snahu o elimináciu prípadnej kontaminácie tkaniva s použitím jednorazových sterilných čepielok (Medplus, Nitra). Takto odobraté tkanivo sme následne vložili do stabilizačného roztoku *RNAlater* (Thermo Fisher Scientific) na

stabilizáciou bunkovej RNA bez nutnosti použitia tekutého dusíka. Ďalší krok spočíval v homogenizácii tkaniva s použitím *TissueLyser* LT (Qiagen, Nemecko).

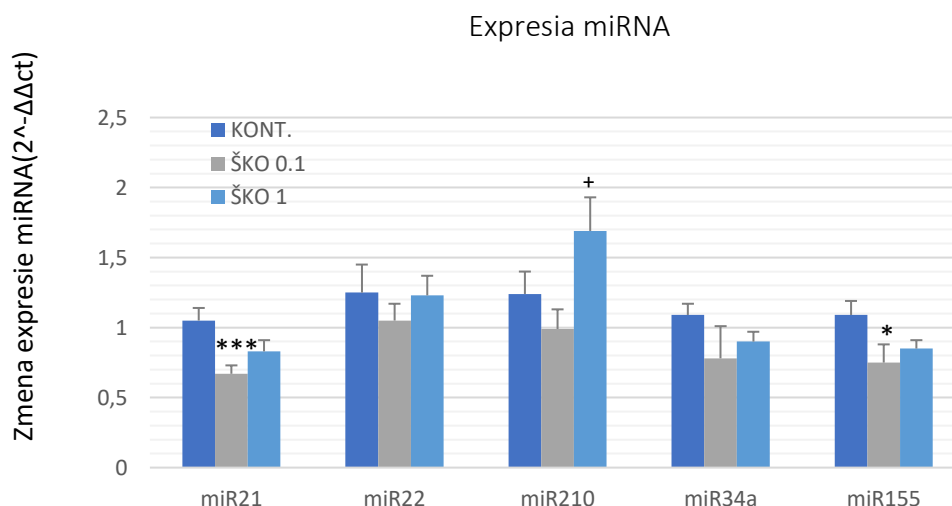
Procesovanie RNA a analýza expresie miRNA

Samotná RNA bola izolovaná s použitím komerčne dostupného izolačného kitu *miRVana microRNA isolation kit* (Thermo Fisher Scientific), pričom sme postupovali podľa protokolu dodaného výrobcom. Koncentrácia vyizolovanej RNA bola zmeraná prostredníctvom spektrofotometra *NanoDrop ND-2000* (Thermo Scientific). V ďalšom kroku sme konvertovali vyizolovanú RNA na cDNA prostredníctvom komerčného kitu *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) podľa protokolárnych odporúčaní výrobcu. Pre kvantitatívnu real-time PCR analýzu sme použili *TaqMan™ Advanced miRNA assays Kit* (Thermo Fisher Scientific) pre tumor supresorové miR-22, -34a a pre onkogénne miR-21, -210, -155. Na normalizáciu výsledkov sme použili miR-191. Samotná analýza expresie prebiehala na zariadení *AB7500 Real Time System* (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

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

V rámci analýzy regulačného potenciálu škoric v modulácii epigenetických dráh sme sa zamerali na analýzu piatich miRNA asociovaných s mamárnou karcinogénou. Škorica v nižšej koncentrácii v potrave (ŠKO 0.1) významne znížila expresiu onkogénnej miR-21 o 36 % ($p < 0.001$) a miR-155 o 31 % ($p < 0.05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. V prípade vyššej koncentrácie škoric v potrave (ŠKO 1) sme zaznamenali nárast expresie miR-210 o 70,5 % ($p < 0.05$) v porovnaní s nižšou dávkou škoric v potrave (ŠKO 0.1). V prípade expresie tumor-supresorových miR-22 a miR-34a sme neznamenali žiadnu signifikantnú zmenu medzi jednotlivými skupinami zvierat (Obr.1).



Obrázok 1 Relatívna úroveň expresie miR-22, miR-34a, miR-210, miR-155 a miR-21 v nádorových tkanivách v animálnom modeli mamárnej karcinogenézy – efekt škoric. Ako interná kontrola pre normalizáciu získaných výsledkov bola použitá miR-191-5p. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetické priemery \pm SEM. Signifikantný rozdiel, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs. KONT, + $P < 0,05$ vs. ŠKO 0.1

Diskusia

V poslednom desaťročí bola potvrdená významná úloha epigenetických modifikácií pri rozvoji a progresii rôznych foriem nádorových ochorení, vrátane rakoviny prsníka (21). Aberantné zmeny v expresii špecifických miRNA sú spojené s reguláciou génovej expresie na posttranskripčnej úrovni spôsobom degradácie alebo represie cieľovej mRNA (22). Špecifické miRNA sú zapojené do rozvoje a progresie rakoviny prsníka reguláciou kritických procesov zapojených do rastu, proliferácie, apoptózy, bunkového cyklu alebo metabolizmu (23). Nami zvolené miRNA (miR-21, -22, -210, -34a, -155) predstavujú malé nekódujúce RNA často detegované v tkanive a plazme, ktoré vykazujú zmeny v expresii počas rozvoja rakoviny prsníka v predklinických ako aj klinických štúdiách (24–26). Aberácie v expresii miR-210 sú často spojené s nádorovou progresiou v hypoxickom prostredí, zatiaľ čo v normoxickom prostredí ma charakter tumor-supresoru (27). V našom experimente so škorice sme zaznamenali nárast expresie miR-210 v skupine s vyššou dávkou fytosubstancie v porovnaní so skupinou, ktorá bola kŕmená nižšou dávkou škorice. V inej štúdii komponent zeleného čaju epigallocatechin-3-gallat zvýšil expresiu miR-210, ktorá bola spojená so zníženou proliferáciou buniek rakoviny pľúc (28). Zvýšená hladina onkogénnych miR-21 a miR-155 je na základe *in vitro* a *in vivo* analýz spojená s rozvojom invázívnej formy a vznikom metastáz v rôznych typoch malígnych ochorení (29,30). V prípade hodnotenia onkogénnych miR-21 a miR-155 sme detegovali signifikantné zníženie expresie v skupine s nižšou dávkou škorice v porovnaní so skupinou bez chemoprevenencie. V prípade tumor-supresorových miR-22, -34a sme nezaznamenali žiadne signifikantné zmeny medzi testovanými skupinami.

Záver

Predklinický výskum zameraný na prevenciu nádorových ochorení predstavuje nenahraditeľnú súčasť vedeckého poznania. Výskum využívajúci animálne modely predstavuje zásadnú súčasť vedeckého poznania molekulárnej podstaty ochorenia. Využitie modelových organizmov dáva experimentátorom ucelený obraz o vstrebávaní, distribúcii a metabolizmu daného liečiva. Z tohto pohľadu predstavuje analýza *in vivo* logický krok od základnej expertízy *in vitro*. V predkladanej experimentálnej štúdii sme preukázali chemopreventívny účinok škorice v animálnom modeli mamárnej karcinogenézy prostredníctvom modulácie epigenetických modifikácií, konkrétne reguláciou expresie miRNA. Na základe získaných dát je preukázané, že pravidelná konzumácia škorice v stanovených koncentráciách môže znížiť riziko vzniku nádorového ochorenia v populácii žien s vysokým rizikom rozvoja rakoviny prsníka. Ďalší výskum v oblasti regulácie génovej expresie a identifikácia nových markerov zapojených v iniciácii a promócii malígnej transformácie prostredníctvom využitia inovatívnym prístupov molekulárnej biológie predstavuje prístup, ktorý charakterizuje 21. storočie v kontexte prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0136/19.

Literatúra

- [1] Choudhari, *Front. Pharmacol.* **2020**, 10.
- [2] Sung, *CA Cancer J. Clin.* **2021**, 71:209-49.
- [3] Koźmiński, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 14;21:3483.
- [4] Suryadi, *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2012**, 18:12926-34.
- [5] Yang, *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, 1845:84-9.
- [6] Naaz, *Eu.r J. Med. Chem.* **2019**, 171:310-31.

- [7] Nussbaumer, *Talanta*. **2011**, 85:2265-89.
- [8] Zanuso, *Future Sci. OA*. **2020**, 6(9):FSO617.
- [9] Hosseini, *Avicenna J. Phytomedicine*. **2015**, 5:84-97.
- [10] Liskova, *Clin. Exp. Med.* **2020**, 20:173-90.
- [11] Al-Menhali, *J. Med. Food*. **2015**, 18:54-9.
- [12] Varghese, *Biomolecules*. **2020**, 10(2); 191.
- [13] Go, *Int. J. Mol. Med*. **2018**, 42:1899-908.
- [14] Abotaleb, *Cancers*. **2018**, 11:28.
- [15] Samec, *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **2019**, 145:1665-79.
- [16] Jasek, *Biomolecules*. **2019**, 9(7):289.
- [17] Samec, *Biomolecules*. **2019**, 9(12):829.
- [18] Balamurugan, *J. Int. Cancer*. **2016**, 138:1058-66.
- [19] Zou, *Exp. Ther. Med.*, **2017**, 14:1009-16.
- [20] Lebelo, *Arch. Pharm. Res.* **2019**, 42:833-47
- [21] Stefansson, *Am. J. Pathol.*, **2013**, 183:1052-63
- [22] Loh, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20.
- [23] Byler, *Anticancer Res.* **2014**, 34:1071-7.
- [24] Zhang, *OncoTargets Ther.* **2019**, 12:7993-8002.
- [25] Ding, *Medicine*. **2021**, 100:e25964.
- [26] Gorur, *Mol. Ther - Nucleic Acids*. **2021**, 23:930-43.
- [27] Dang, *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, 16:6353-72.
- [28] Wang, *Carcinogenesis*. **2011**, 32:1881-9.
- [29] Matiske, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. **2012**, 21:1236-1243.
- [30] Wang, *BMC Cancer*. **2019**, 19:1-13.

Štúdium ultraštruktúry pečene kuracieho embrya na 9. deň inkubácie

Holovská, K.¹, Andrašková, S.¹, Petrovová, E.¹, Almášiová, V.¹

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Katedra morfológických disciplín, Košice
katarina.holovska@uvlf.sk

Abstract

The aim of this study was to observe the liver ultrastructure of chicken embryo on day 9 of incubation. It is known that avian liver is morphologically different from the liver of mammals. In our experiment, we observed that liver parenchyma consisted of two types of hepatocytes, dark and light. Hepatocytes had very well developed mitochondria and granular endoplasmic reticulum. At the bile pole, the cytoplasmic membrane of the hepatocytes formed microvilli that protruded into the lumen of the bile canaliculus. At the vascular pole, the hepatocyte membrane was smooth, without microvilli, and space of Disse was not developed yet.

Keywords: chick embryo, ultrastructure, liver, hepatocyte

Úvod

V súčasnej dobe sa stretávame s čoraz častejším využívaním alternatívnych zvieracích modelov v rôznych vedných disciplínach. Medzi najčastejšie využívané modely patria embryá rôznych zvierat [1, 4, 7]. V súčasnej dobe je dostatok morfológických prác, ktoré sú zamerané na detailný opis cicavčích embryí [2, 8], avšak chýbajú práce zamerané na štúdium štruktúry a ultraštruktúry tkanív a orgánov u vtáčích embryí. Naším cieľom je sledovať morfológický obraz jednotlivých tkanív a orgánov v rôznych štádiách vývoja u kuracieho embrya za fyziologických podmienok. Tieto pozorovania následne využijeme v našich nasledujúcich experimentoch, ktoré sa týkajú účinku neionizujúceho elektromagnetického žiarenia a jeho vplyvu na štruktúru a ultraštruktúru tkanív a orgánov u kuracieho embrya.

V tejto pilotnej práci sme sa konkrétne zamerali na ultraštruktúru pečene kuracieho embrya na 9. deň inkubácie.

Materiál a metódy

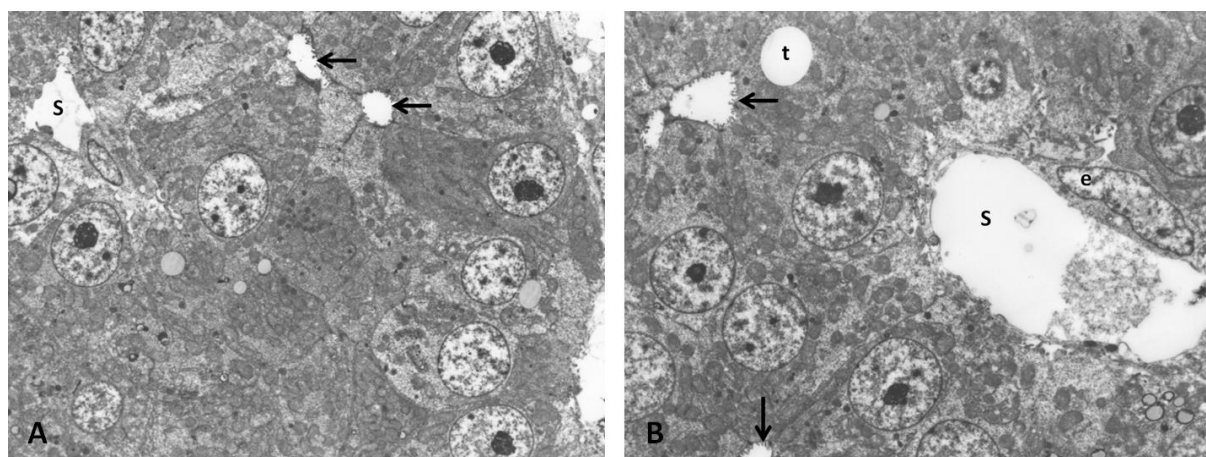
Vzorky pečene kuracích embryí o veľkosti 3 mm³ boli odobrané na 9. deň inkubácie a spracované pre elektrónovú mikroskopiu podľa metodiky Mráz a Polóny [6]. Vzorky boli fixované 2h v 3% glutaraldehyde (v kakodylátovom tlmivom roztoku pH = 7,2 - 7,4), postfixované v 1% OsO₄, odvodnené v acetóne a následne zaliate do Durkupanu ACM. Na elektrónovú mikroskopiu boli použité ultratenké rezy o hrúbke 60-120 nm, kontrastované uranyl acetátom a citrátom olovnatým a sledované transmisným elektrónovým mikroskopom Tesla BS 500.

Výsledky

Na 9. deň inkubácie sme v pečeni kuracieho embrya pozorovali výskyt svetlých a tmavých hepatocytov. Bunky mali cylindrický, alebo pyramídový tvar s okrúhlym euchromatickým jadrom. Vonkajšia aj vnútorná jadrová membrána bola hladká a súvislá. Cytoplazma hepatocytov obsahovala množstvo dobre vyvinutých mitochondrií, oválneho, alebo tyčinkovitého tvaru. V blízkosti mitochondrií sa nachádzalo granulované endoplazmatické retikulum (GER). Cytoplazma tmavých

hepatocytov obsahovala vysoký počet bunkových organel. GER v týchto bunkách prebiehalo aj pozdĺž cytoplazmatickej membrány. Cytoplazma svetlých hepatocytov bola chudobnejšia na organely. V niektorých hepatocytoch sme pozorovali malé množstvo drobných tukových vakuol, kým v iných bunkách veľké tukové vakuoly.

Hepatocyty boli usporiadané do acinov, alebo tubulov. V centrálnej časti týchto útvarov sa nachádzali žľčovú kapiláry. Mali pomerne široký lúmen, do ktorého vyčnievali krátke mikrokylky (Obr. 1A). Cytoplazmatická membrána hepatocytov na vaskulárnom póle bola hladká, bez mikrokylkov. Pečeňové sínusoidy mali rôzny tvar a veľkosť a boli vystlané endotelovými bunkami. Endotelové bunky boli pomerne veľké s oválnym, euchromatickým jadrom a s výrazným jadriekom. Boli priamo v kontakte s hepatocytmi. Disseho priestor na 9. deň inkubácie nebol ešte vyvinutý (Obr. 1B).



Obrázok 1 Elektronogram pečene kuracieho embrya na 9. deň inkubácie. A: V parenchýme pečene boli tmavé a svetlé hepatocyty (zväčšenie 4 500x). B: Endotelové bunky boli v tesnom kontakte s hepatocytmi. Disseho priestor ešte nebol vyvinutý (zväčšenie 4 800x)

S - pečeňové sínusoidy, e - endotelová bunka, t - tuková vakuola, ↑ - žľčovú kapilára

Diskusia

V súčasnej dobe patria vtáacie embryá medzi často využívané alternatívne zvieracie modely. Naša práca sa venuje ultraštruktúre parenchýmu pečene na 9. deň inkubácie. V tomto období sme vo vyvíjajúcej sa pečeni pozorovali svetlé a tmavé hepatocyty. V ich cytoplazme boli dobre vyvinuté organely, avšak ich množstvo a zastúpenie sa líšilo. Hashemnia a kol. [3] taktiež pozorovali výskyt svetlých a tmavých hepatocytov v pečeni u kuropta čukary (*alectoris chukar*) od 5. do 22. dňa inkubácie. Autori zistili, že množstvo a rozloženie svetlých a tmavých buniek záviselo od doby inkubácie. Zo začiatku sa predpokladalo, že tmavé hepatocyty sú odumierajúce bunky. Až elektrónová mikroskopia odhalila dôvod výskytu týchto rozdielov. Tie sú spôsobené zastúpením jednotlivých organel v bunkách. Wong a Cavey [11] pozorovali v cytoplazme svetlých hepatocytov dobre vyvinuté agranulované endoplazmatické retikulum, avšak málo ribozómov a polyribosómov. V tmavých hepatocytoch sa vyskytovalo množstvo GER. Aj my sme v tmavých hepatocytoch pozorovali dobre vyvinuté GER a to hlavne v okolí mitochondrií, ako aj pozdĺž cytoplazmatickej membrány buniek.

Súčasťou cytoplazmy niektorých hepatocytov na 9. deň inkubácie boli tukové vakuoly. V niektorých bunkách sme pozorovali len zopár drobných tukových vakuol, alebo jednu veľkú vakuolu. Sandström a Westman [10] v pečeni kuracieho embrya už na 4. deň inkubácie pozorovali tukové vakuoly. Vakuoly boli ohraničené membránou a ich

veľkosť bola približne 0,5 μm . Do 16. dňa inkubácie sa tieto vakuoly postupne zväčšovali a došlo k výraznému zvýšeniu aj ich množstva. Na 12. deň inkubácie mali tukové vakuoly priemer 2 μm . Ich centrálna časť sa javila prázdna, kým periférna zóna bola tmavá (elektrón denzná). Na druhej strane Shand a kol. [10] pozorovali v pečeni kuracieho embrya na 13. deň inkubácie len zopár malých tukových vakuol, ktoré tesne susedili s mitochondriami. Na 19. deň inkubácie však došlo k ich výraznému nahromadeniu. Analýzou zloženia tuku zistili, že ide o estery cholesterolu, ktoré sa hromadia v bunkách počas poslednej fázy vývoja [10].

Ďalšou dôležitou štruktúrou v pečeni je Disseho priestor. Je to úzky priestor, ktorý vzniká medzi hepatocytmi a endotelovými bunkami. Ako sme pozorovali v našom experimente, na 9. deň inkubácie Disseho priestor nebol ešte vytvorený. Hepatocyty na krvnom póle boli v priamom kontakte s endotelovými bunkami. Rovnako Karrer a Cox [5] pozorovali na 8. deň inkubácie priamy kontakt medzi hepatocytmi a endotelovými bunkami. Podľa sledovaní Sandström a Westman [9] tento stav pretrvával až do 16. dňa inkubácie a je závislý od formovania sa mikrokľkov na vaskulárnom póle cytoplazmatickej membrány hepatocytov.

Záver

V súčasnej dobe patria kuracie embryá medzi najčastejšie využívané alternatívne zvieracie modely v rôznych vedných oblastiach. Cieľom našej práce bolo sledovať ultraštruktúru pečene kuracích embryí na 9. deň inkubácie. Naše pozorovania následne využijeme v nasledujúcich experimentoch, ktoré sa týkajú účinku neionizujúceho elektromagnetického žiarenia a jeho vplyvu na štruktúru a ultraštruktúru tkanív a orgánov u kuracieho embrya.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0036/22

Literatúra

- [1] Fonseca, *Lab. Anim.* **2021**, 50:138-139.
- [2] Gilbert, *Sinauer Associates.* **2000**, 253 s., ISBN-10: 0-87893-243-7
- [3] Hashemnia, *Anatomical Sciences.* **2015**, 2(3):129-136.
- [4] Kain, *Development Dynamics.* **2014**, 243(2):216-228.
- [5] Karrer and Cox, *Journal Ultrastructure Research.* **1960**, 4:149-165.
- [6] Mráz a Polónyi, *VEDA.* **1988**, 71 s.
- [7] Mu, *Commun. Biol.* **2020**, 3(642):1-12.
- [8] Płusa and Piliszek, *Development.* **2020**, 147(14):1-16.
- [9] Sandström and Westman, *Z. Zelforsch.* **1971**, 117:516-525.
- [10] Shand, *Biochemica et Biophysica Acta.* **1994**, 1213:224-230.
- [11] Wong and Cavey, *Anatomical Record.* **1993**, 235(1):131-143.

Vplyv DMSO na vyvíjajúcu sa pečeň kuracieho embrya

Tirpáková, Z.¹, Luptáková, L.¹, Holovská K.², Demčišáková, Z.², Petrovová, E.²

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice;

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfológických disciplín, Košice
zuzana.tirpak@gmail.com

Abstract

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is a by-product of paper making. It comes from a substance found in wood. DMSO has been used as an industrial solvent since the mid-1800s. From about the mid-20th century, researchers have explored its use as an anti-inflammatory agent. The FDA has approved DMSO as a prescription medication for treating symptoms of painful bladder syndrome. DMSO is easily absorbed by the skin. It's sometimes used to increase the body's absorption of other medications. Also DMSO is widely used as a solvent for small hydrophobic drug molecules. However, the safe volume allowing to avoid its embryotoxic effect has been poorly studied. In this study, we documented the effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) in the developing chicken embryo at histological level using various volumes (5, 10, 25 and 50 µL) administered onto the eggshell membrane (*membrana papyracea*) on 4th embryonic day (ED).

Keywords: Dimethyl sulfoxide, histology, chicken embryo

Úvod

Dimetylsulfoxid (DMSO) je jednoduchá organická polárna aprotická molekula, ktorá vo vedeckej oblasti podnietila veľké množstvo diskusií. Čistý DMSO má usporiadanú štruktúru, ktorá je v rozmedzí teplôt 40-60 °C tepelne nestabilná a už pri teplote 37 °C vykazuje výrazné štrukturálne zmeny. Má široké spektrum farmakologických vlastností, ktoré okrem priaznivého vplyvu majú aj výrazné negatívne vlastnosti na organizmus. Jeho hlavnými vlastnosťami sú indukcia protizápalových reakcií, blokáda nervov, svalová relaxácia, penetračný prostriedok pre rôzne liečivá, ako aj jeho pôsobenie ako rozpúšťadla malých hydrofóbných molekúl liečiva vďaka jeho amfipatickej povahe. Okrem toho sa DMSO používa aj v bunkovej biológii ako induktor bunkovej diferenciácie, zachytávač voľných radikálov a na kryokonzerváciu [1,2]. Vo všeobecnosti je DMSO akceptovaný ako netoxická látka v koncentrácii pod 10 % (v/v). V praxi sa predpokladá, že účinky DMSO sú zanedbateľné. Verheijen a kol. 2019 zverejnili, že hodnota LD50 u opíc bola 880 g pri aplikácii na kožu alebo 320 g pri intravenózne iniekcii u 80 kg ľudí [2]. Na druhej strane je dobre zdokumentované, že DMSO je pri vyšších koncentráciách cytotoxický. Preto je potrebné stanoviť prahové koncentrácie DMSO pre bunky a organizmy a prehliť naše znalosti o účinkoch DMSO na molekulovej úrovni. Chen a kol. (2011) sledovali účinky 0,01, 0,1 a 1 % DMSO na embryo *Danio* pruhovaného. Pri použití 0,01 a 0,1 % koncentrácií neboli pozorované žiadne vývojové defekty, ale 1 % DMSO vyvolalo závažné deformácie [3]. Vylučovanie DMSO sa uskutočňuje väčšinou obličkami a malá časť sa vylučuje pľúcami a pečeňou. Časť DMSO sa po vylúčení metabolizuje na prchavý metabolit dimetylsulfid, ktorý má charakteristický zápach podobný cesnaku alebo ustrici. Zdá sa, že výskyt nežiaducich reakcií súvisí s vyššími dávkami DMSO pre bezpečnosť je nutné používať iba malé dávky DMSO [4]. Kuracie embryo predstavuje alternatívny model pre vedecký výskum, ktorý rešpektuje zásady 3R. Podľa právnych predpisov SR sa kuracie embryo

nepovažuje za živé zviera až do 17. dňa vývoja [4], a preto pre experimentálne účely predstavuje etickejšiu voľbu. Použitie kuracieho embrya vo výskume ako alternatívny model je primárne spôsobené tým, že vývoj kuracieho embrya je podobný vývoju cicavca. Kuracie embryá sú lacné, ľahko dostupné a majú krátky inkubačný čas, čo umožňuje rýchly priebeh výskumu [5]. Kuracie embryá sú ideálnymi modelmi na hodnotenie vplyvu chemikálií a biomateriálov so zameraním sa na ich teratogénne alebo embryotoxické vlastnosti [6,7].

Na základe širokého využitia DMSO ako rozpúšťadla pre rôzne chemické látky a liečivá, ktoré sú testované na vtáčích embryách, sme hodnotili biologický účinok DMSO na kuracie embryo a najmä jeho vyvíjajúcu sa pečeň ako dôležitý orgán pre detoxikáciu na histologickej úrovni.

Materiál a metódy

Oplozené násadové kuracie vajcia plemena Lohmann Brown boli zakúpené v Liaharenskom podniku Nitra AS (Parovské Háje, Slovensko). Vajcia boli inkubované tupým koncom hore v termostate s nútenou cirkuláciou pri konštantnej vlhkosti 60 % a teplote 37,5 °C s nepretržitým otáčaním až do 4. embryonálneho dňa (ED4). Na 4. embryonálny deň sa vajcia otvorili na tupom konci a DMSO v objeme (5, 10, 25 a 50 µL) bol aplikovaný na povrch vnútornej podškrupinovej membrány (*membrana papyracea*). Kontrolnej skupine bola aplikovaná voda pre injekciu v objeme 50 µL. Otvor v škrupine bol uzavretý pomocou izolačnej pásky [8], a vajcia sa vrátili do inkubátora bez otáčania s rovnakými nastaveniami teploty a vlhkosti až do odberu vzoriek na 9. embryonálny deň (ED 9). V čase odberu vzoriek boli embryá z vajec vybraté, odvážené a bola im odobratá pečeň pre histologické vyšetrenie.

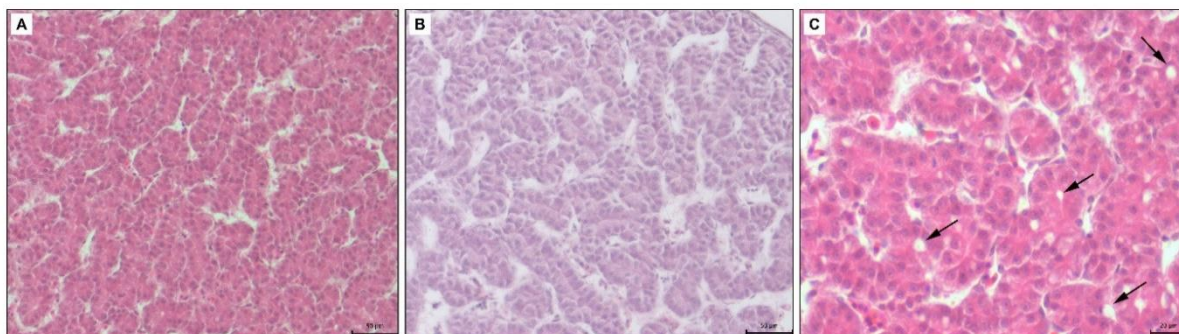
Vzorky pečene boli spracované štandardnou histologickou technikou. Na fixáciu bol použitý 4 % neutrálny formalín a vzorky boli následne zaliate do parafínu a rezané s hrúbkou 5–7 µm. Pre farbenie bol použitý hematoxylín a eozín (HE) s následným hodnotením vzoriek s použitím svetelného mikroskopu Olympus CX 43 (Japonsko) s kamerou Promicam (Tokio, Japonsko).

Na farbenie polotenných rezov (1 µm) toluidínovou modrou boli vzorky fixované v 3 % glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, Bratislava, Slovenská republika) a postfixované v 1 % oxide osmičelom (obe v 0,1 M kakodylátovom pufri, pH 7,3, Fluka Chemie AG, Buchs, Švajčiarsko). Po dehydratácii v acetóne boli vzorky prenosené do propylénoxidu a vložené do Durcupanu™ ACM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Nemecko). Rezy boli narezané pomocou ultramikrotómu LKB Nova (Bromma, Švédsko) a skúmané pod svetelným mikroskopom Olympus CX 43 (Tokio, Japonsko) s kamerou Promicam (Japonsko).

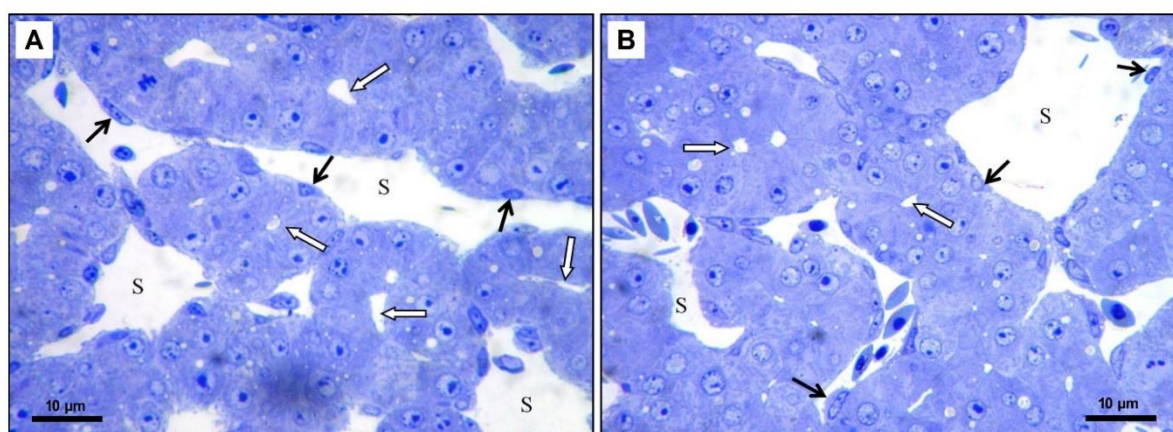
Výsledky

V kontrolnej skupine mala pečeň klasický morfológický vzhľad. Hepatocyty cylindrického alebo pyramídového tvaru mali okrúhle euchromatické jadrá s jadierkami. Ich cytoplazma bola silne acidofilná. Bunky boli usporiadané do tubulov, ich zväčšená časť (cievny pól) bola orientovaná smerom k sínusoidám pečene a ich zúžená časť (biliárny pól) tvorila žľčovú kanál. Pečeňové sínusoidy mali nepravidelný lúmen a boli lemované endotelovými bunkami (Obr. 1A). V experimentálnej skupine 5 µL (5 DMSO-HE) bola štruktúra pečene nezmenená. Veľkosť a tvar hepatocytov sa zachovali, ale sínusoidy pečene boli mierne rozšírené (Obr. 1B). V experimentálnej skupine 10 µL (10 DMSO-HE) bola štruktúra pečene porovnateľná s predchádzajúcou skupinou. V niektorých častiach pečene boli žľčové kanáliky mierne rozšírené (Obr.

1C). V experimentálnej skupine 25 μ L (25 DMSO - toluidínová modrá), niektoré hepatocyty obsahovali niekoľko malých lipidových kvapôčky. Žlčové kanáliky boli rozšírené s nepravidelným lúmenom (Obr. 2A). V experimentálnej skupine 50 μ L (50 DMSO – toluidínová modrá) sa štruktúra pečene výrazne nezmenila. Hepatocyty obsahovali malé lipidové kvapôčky, žlčové kanáliky a pečeňové sínusoidy boli rozšírené (Obr. 2B).



Obrázok 1 Mikrofotografia pečene kuracieho embrya. A-kontrolná skupina, farbenie H-E, mierka: 50 μ m, B-experimentálna skupina 5 μ L DMSO, farbenie H-E, mierka: 50 μ m, C-experimentálna skupina 10 μ L DMSO, šípky – rozšírené žlčové kanáliky, farbenie H-E, mierka: 20 μ m



Obrázok 2 Mikrofotografia pečene kuracieho embrya. A: experimentálna skupina 25 μ L DMSO, mierka: 10 μ m, B: experimentálna skupina 50 μ L DMSO, mierka: 10 μ m; S – sínusoida pečene, čierne šípky – endotelové bunky, biele šípky – rozšírené žlčové kanáliky, farbenie toluidínovou modrou

Diskusia

DMSO patrí medzi xenobiotiká so širokým spektrom pozitívnych, ale aj negatívnych účinkov. Početné *in vitro* a *in vivo* experimenty sa zameriavajú na účinok látok rozpustených v DMSO, ale toxický účinok DMSO sa vo všeobecnosti nesleduje. Akútny toxický účinok DMSO bol študovaný na myšiach, potkanoch, králikoch a psoch. 50 % DMSO zriedený fyziologickým roztokom sa podával subjektom orálne, intravenózne, intraperitoneálne alebo subkutánne. Toxický účinok 50 % DMSO bol okamžitý, ale mierny. Typickými príznakmi, ktoré sa vyskytli, bol stuhnutý chvost, hypotermia a výrazná sekrécia slinných žliaz. Diuretický účinok sa pozoroval aj u myší a potkanov. U králikov bola pozorovaná zvýšená srdcová aktivita s výrazným zvýšením krvného tlaku. Úbytok hmotnosti bol tiež pozorovaný. Mikroskopické vyšetrenie odhalilo nekrózu hepatocytov a zápal portálneho systému [9]. DMSO zasahuje do bunkového cyklu, ovplyvňuje bunkovú proliferáciu a diferenciáciu

[10]. Môže viesť k poškodeniu mitochondriálneho membránového potenciálu, uvoľneniu cytochrómu c (z mitochondrií) a aktivácii kaspáz 9 a 3 [11]. Za jeden z možných mechanizmov účinku DMSO sa považuje zmena koncentrácie cytoplazmatického Ca^{2+} . Koncentrácia vápnika je prísne regulovaná a endoplazmatické retikulum (ER) je hlavným miestom ukladania vápnika, preto je nevyhnutné na udržanie jeho homeostázy v bunkách. Organely ako ER a mitochondrie spolu funkčne úzko súvisia. Potvrdili to aj štúdie účinku xenobiotík, kde boli pozorované morfológické a funkčné zmeny na týchto organelách. Uvoľňovanie Ca^{2+} z ER do cytoplazmy malo priamy vplyv na mitochondriálnu funkciu [12]. Kang a kol. (2017) pozorovali, že DMSO významne zvýšilo hladiny Ca^{2+} v mitochondriách a zároveň spôsobilo mitochondriálnu depolarizáciu a dysfunkciu. To sa prejavilo aj v ultraštruktúre mitochondrií, ktoré boli výrazne rozšírené. Okrem mitochondriálnej dilatácie sa v hepatocytoch hromadili tukové kvapôčky. Podľa niektorých literárnych zdrojov patria tukové kvapky medzi najdynamickejšie organely [13,14]. Hrajú dôležitú úlohu v metabolizme lipidov a bunkovej homeostáze. Sú zásobárňou lipidov, ktoré poskytujú voľné mastné kyseliny v procese lipolýzy. Tie môžu následne využiť mitochondrie ako substrát pri β -oxidácii, pri tvorbe ATP alebo v ER pri syntéze fosfolipidov. Príčiny akumulácie tukových kvapiiek môžu byť rôzne. V našom experimente mohlo byť ich zvyšujúce sa množstvo v hepatocytoch spôsobené poruchou mitochondriálnej funkcie, ako uviedli niektorí autori [15]. Zvyšujúca sa koncentrácia DMSO na ED3 spôsobila najskôr dilatáciu mitochondrií a neskôr, so zvyšujúcou sa intenzitou mitochondriálneho poškodenia, sa zvýšil aj počet tukových kvapôčok v hepatocytoch. Mitochondrie sú známe ako hlavní producenti reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Narušenie rovnováhy medzi produkciou a degradáciou ROS môže viesť k oxidačnému stresu. Zvyšujúce sa množstvo radikálov môže spôsobiť poškodenie DNA, proteínov, cytoplazmatickej membrány atď. [16]. Sekvestrácia nadbytočných lipidov a oneskorené uvoľňovanie lipidov je obzvlášť dôležité pre bunky vystavené rýchlo sa meniacim podmienkam nutričného a oxidačného stresu. Lipidové kvapôčky sa podieľajú na regulácii distribúcie a spotreby lipidov počas stresu za účelom udržania energie a redoxnej homeostázy. V bunkách vystavených oxidačnému stresu sa hromadia na ochranu membrány pred peroxidačnou reakciou, udržiavajú saturáciu membrány a homeostázu organel a umožňujú dlhodobý prísun lipidov na produkciu energie a prežitie buniek [17,18].

Záver

Kuracie embryo ako alternatívny zvierací model sa používa v rámci princípov 3R na testovanie hydrofóbných látok, ktoré využívajú DMSO ako rozpúšťadlo alebo penetračný prostriedok pre rôzne lieky. Pokiaľ ide o naše výsledky, použiteľný objem DMSO je obmedzený a môže ovplyvniť embryonálny vývin kurčiat pri dávkach vyšších ako 10 μL (významné zníženie telesnej hmotnosti, výskyt malformácií). Súčasné zistenia naznačujú, že expozícia DMSO spôsobila histopatologické zmeny vo vyvíjajúcej sa pečeni s použitím objemu DMSO vyššieho ako 25 μL . Naše zistenia je tak možné brať do úvahy pri používaní vtáčieho experimentálneho modelu v raných štádiách vývinu pri testovaní rôznych látok rozpustných v DMSO. V prípade, že použitie DMSO je v biologickom experimente nevyhnutné, je potrebné udržiavať jeho pracovnú koncentráciu čo najnižšiu, aby nedošlo k ovplyvneniu vnútornej homeostázy buniek.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0050/19.

Literatúra

- [1] Galvao, *FASEB J.* **2014**, 28:1317-1330.
- [2] Verheijen, *Sci. Rep.* **2019**, 9:1-12.
- [3] Chen, *Aquat. Toxicol.* **2011**, 102:162-166.
- [4] Ribatti, *Microvasc. Res.* **2020**, 131:104026.
- [5] Tavakkoli, *Biomed. Pharmacother.* **2019**, 118:109240.
- [6] Kiecker, *Dev. Biol.* **2016**, 415:314-325.
- [7] Merckx, *Tissue Eng. Part B Rev.* **2020**, 26:519-539.
- [8] Sedmera, *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* **2002**, 267:137-145.
- [9] Caujolle, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1967**, 141:110-125.
- [10] Srinivas, *Exp. Cell Res.* **1991**, 196:279-286.
- [11] Liu, *Int. Immunopharmacol.* **2001**, 1:63-74.
- [12] La Rovere, *Cell Calcium.* **2016**, 60:74-87.
- [13] Kang, *Theranostics.* **2017**, 7:4735-4752.
- [14] Welte, *Trends Cell Biol.* **2007**, 17: 363–369
- [15] Murphy, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* **2009**, 1791:441-447.
- [16] He, *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, 44:532-553.
- [17] Jarc and Petan, *Yale J. Biol. Med.* **2019**, 92:435-452.
- [18] Nguyen, *Dev. Cell.* **2017**, 42:9-21.e5.

Morfologická analýza vtácej chorioalantoickej membrány (CAM) so zameraním sa na vývinové štádiá používané pre testovanie biokompatibility inovatívnych materiálov

Demčišáková, Z.¹, Luptáková, L.², Kvasilová, A.³, Petrovová, E.¹

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfologických disciplín, Košice;

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice;

³Univerzita Karlova, Ústav anatómie 1. lekárskej fakulty Univerzity Karlovej, Praha

zuzana.demcisakova@gmail.com

Abstract

The chorioallantoic membrane (CAM) is a highly vascularized extraembryonic membrane of the avian embryo, which is commonly used for the study of angiogenesis, and its inhibition, tumor growth and metastasis, as well as drug efficacy. In this study, we evaluated the morphological characteristics and angiogenic features of the quail (*Coturnix coturnix japonica*) and chicken (*Gallus gallus domesticus*) CAM regarding to days which are used for implantation of tested materials and the retrieval of samples (quail: ED6q/ED9q, chicken: ED7ch/ED10ch). We evaluated the number and diameter of vessels and thickness of CAM layers using standard H-E sections in combination with Alcian blue. For the visualization of the vascular network, we used WGA marker of embryonic endothelium. The morphometric analysis showed the differences between the average number of vessels at the day of implantation (quail: 16.93 ± 0.88 , chicken: 12.83 ± 0.99) compared to the day of sampling when the number of vessels increase in both models (quail: 31.39 ± 1.54 , chicken: 19.56 ± 1.04). The most represented group of CAM vessels was up to 50 μm (ED6q: 71.27%, ED9q: 73.30%, ED7ch: 60.01%, ED10ch: 75.55%). The number of vessels up to 100 μm was approximately the same for each group, but the number of vessels above 100 μm was higher at the day of implantation (ED6q: 18.46%, ED7ch: 24.54%), and decrease at the day of sampling (ED9q: 13.14%, ED10ch: 12.64%). The thickness of the mesoderm increased depending on the ED from $38.59 \pm 5.69 \mu\text{m}$ to $83.58 \pm 6.37 \mu\text{m}$ in the quail CAM and $48.31 \pm 8.20 \mu\text{m}$ to $63.15 \pm 11.19 \mu\text{m}$ in the chicken CAM. We conclude that the observed morphological parameters of the CAM are dependent on the avian species as well as on ED when the CAM is used for material testing.

Keywords: angiogenesis, chicken embryo, chorioallantoic membrane, quail embryo

Úvod

Chorioalantoická membrána (CAM) je vtáčia extraembryonálna membrána, ktorá vzniká fúziou dvoch extraembryonálnych membrán, chorionu a alantoisu, na štvrtý deň embryonálneho vývinu (ED4) [1]. Predstavuje primárny respiračný a exkretory orgán vtáčieho embrya, ktorý sa v priebehu embryonálneho vývinu podieľa na transporte sodíka a chloridu z alantoisu, transporte vápnika z vaječnej škrupiny do embryonálnej vaskulatúry (mineralizácia kostí), udržiava homeostázu, formuje stenu alantoisového vaku (rezervoár produktov exkrécie), a podieľa sa na spätnej resorpcii vody a iónov z alantoisu [2,3]. Z histologického hľadiska pozostáva CAM z troch vrstiev: chorionu, mezodermy a alantoisu. Chorion prilieha na vnútornú škrupinovú membránu a je tvorený epitelovými bunkami ektodermálneho pôvodu. Strednú vrstvu tvorí vysokovaskularizované tkanivo mezenchýmu, ktoré vzniká fúziou mezodermálnej vrstvy chorionu s mezodermálnou vrstvou alantoisu. Alantois, derivát endodermy, je

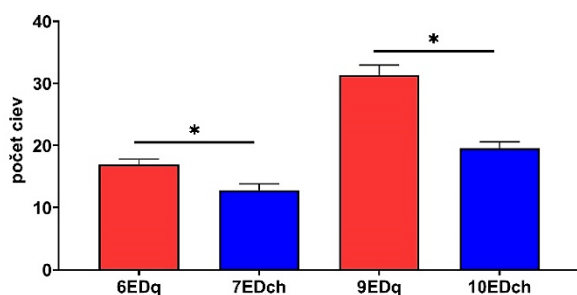
tvorený vrstvou skvamózných, fibroblastom podobných buniek, a je lokalizovaný najhlbšie v CAM [4-6]. CAM reprezentuje alternatívny animálny model, ktorý predstavuje medzistupeň medzi jednoduchým *in vitro* a komplexným *in vivo* modelovým systémom, ktorého použitie na experimentálne účely je v súlade s princípmi 3R [7]. Uplatnenie nachádza najmä v oblasti bioinžinierstva, v štúdiu tkanivových transplantátov, onkologickom výskume, nádorovej biológii a genomike [8,9]. V posledných rokoch sa štúdium CAM stalo populárnym v rámci experimentálnych štúdií v oblasti tkanivového inžinierstva, ktoré sú orientované najmä na využitie jej potenciálu pre štúdium biologickej kompatibility materiálov. Biokompatibilita materiálu je hodnotená z hľadiska angiogénnej odpovede CAM vo vzťahu k implantovanému materiálu na základe neovaskularizácie v mieste implantácie materiálu [10]. V rámci štúdie sme hodnotili morfológiu CAM z hľadiska počtu ciev, priemeru ciev a hrúbky vrstiev, v závislosti od embryonálnych dní, ktoré sú používané na testovanie biologickej kompatibility materiálov, určených pre klinické použitie v oblasti regenerácie tvrdých tkanív.

Materiál a metódy

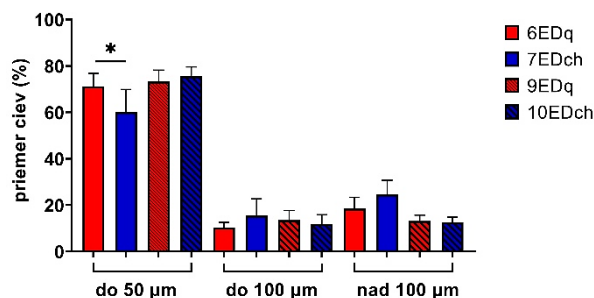
Oplozené vajcia kury domácej (*Gallus gallus domesticus*) a prepelice japonskej (*Coturnix coturnix japonica*) boli zakúpené v chovnom zariadení Párovské Háje, Nitra a Farma Malá Ida, Košice. Do laboratórnych podmienok boli prepravené za dodržania prepravných podmienok s ohľadom na ich životaschopnosť. Následne boli vajcia očistené 70 % etanolom a umiestnené do inkubátora s núteným obehom vzduchu za štandardných inkubačných podmienok, a to v závislosti od druhu (kura domáca: 37,5 °C, 60 % relatívna vlhkosť; prepelica japonská: 38,2 °C, 58 % relatívna vlhkosť). Po 56. hodinách od začiatku inkubácie boli vajcia prepelice japonskej očistené 70 % etanolom a embryá po otvorení škrupiny prenesené do 6-jamkových platní (TPP, Švajčiarsko). Platne boli následne vložené do inkubátora na dobu ďalších 3 dní, resp. 6 dní. Vajcia kury domácej boli z inkubátora vybrané 72 hodín od začiatku inkubácie a metódou *ex ovo* boli embryá s obsahom vajca prenesené do plastových misiek. Kuracie vajcia boli vrátené do inkubátora na dobu ďalších 4, resp. 7 dní. Vzorky CAM boli odoberané v dni, ktoré sú používané na aplikáciu materiálu (6EDq/7EDch) a dni, ktoré sa používajú na odber materiálu (9EDq/10EDch). Vzorky boli fixované vo fixačnom roztoku, histopatologicky a imunohistochemicky spracované. Morfometricky sme hodnotili počet ciev a priemer ciev, ako aj hrúbku jednotlivých vrstiev CAM v parafínových rezoch ofarbených histopatologickou metódou hematoxylín-eozín v kombinácii s Alcianovou modrou. Na vizualizáciu vaskulárnej siete sme použili marker embryonálneho endotelu (WGA). Získané dáta sme štatisticky analyzovali pomocou štatistického programu GraphPad Prism 9.3.1 (jednocestná ANOVA, Šidákov test). Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SD (štandardná odchýlka). Hodnoty $p < 0,05$ boli považované za štatisticky významné.

Výsledky

Morfometrickou analýzou CAM sme zistili rozdiely medzi priemerným počtom ciev CAM v implantačný deň (prepelica japonská: $16,93 \pm 0,88$, kura domáca: $12,83 \pm 0,99$) v porovnaní s dňom odberu (prepelica japonská: $31,39 \pm 1,54$, kura domáca: $19,56 \pm 1,04$) ($p < 0,05$; Graf 1). Najviac zastúpenou skupinou ciev CAM boli cievy s priemerom do 50 μm . Počet ciev s priemerom do 100 μm bol vo všetkých skupinách porovnateľný, pričom počet ciev nad 100 μm bol vyšší v deň implantácie a klesal ku dňu odberu ($p < 0,05$; Graf 2).



Graf 1. Morfometrická analýza počtu ciev (*<0,0001)



Graf 2. Percentuálne zastúpenie ciev v závislosti od ich priemeru (*<0,0001)

Hrúbka ektodermu CAM sa u prepelice japonskej zvýšila z $8,14 \pm 1,97 \mu\text{m}$ na $12,64 \pm 1,84 \mu\text{m}$ a u kury domácej z $7,25 \pm 1,52 \mu\text{m}$ na $8,64 \pm 2,84 \mu\text{m}$. Najvyšší nárast v hrúbke bol pozorovaný v strednej, mezodermálnej vrstve, a to v prípade oboch vtáčích druhov (prepelica japonská: $38,59 \pm 5,69 \mu\text{m}$ na $83,58 \pm 6,37 \mu\text{m}$, kura domáca: $48,31 \pm 8,20 \mu\text{m}$ na $63,15 \pm 11,19 \mu\text{m}$). Štatistická významnosť v hrúbke endodermu nebola pozorovaná ($p < 0,05$; Tabuľka 1).

Tabuľka 1 Hrúbka vrstiev CAM

Vzorka	Ektoderm	Mezoderm	Endoderm
6EDq	$8,14 \pm 1,97$	$38,59 \pm 5,69$	$4,84 \pm 1,37$
9EDq	$12,64 \pm 1,84$	$83,58 \pm 6,37$	$5,33 \pm 1,20$
7EDch	$7,25 \pm 1,52$	$48,31 \pm 8,20$	$5,28 \pm 1,51$
10EDch	$8,64 \pm 2,84$	$63,15 \pm 11,19$	$5,53 \pm 1,41$

*hrúbka vrstiev CAM je vyjadrená v $\mu\text{m} \pm \text{SD}$

Diskusia

CAM vtáčieho embrya je jedným z najviac rozšírených *in vivo* testov používaných na štúdium angiogenézy. K metódam hodnotenia procesu neovaskulizácie patria kvantitatívne a kvalitatívne metódy hodnotiace topografiu a štruktúru vaskulárnej siete, predovšetkým morfometrická analýza, štúdium štruktúry a vetvenia krvných ciev [11]. Napriek tomu však existuje málo štúdií, ktoré sú orientované na morfometrickú analýzu CAM v odlišných štádiách embryogenézy [5]. Ide predovšetkým o štúdie, ktoré sú zamerané na zmeny v celkovom objeme CAM v priebehu embryonálneho vývinu, ktoré kvantitatívne hodnotia efekt medzi molekulami s proangiogénnym a antiangiogénnym efektom [12]. V priebehu embryonálneho vývinu dochádza k zmenám v štruktúre CAM. Jednotlivé štádia vývinu možno rozdeliť do troch fáz. Prvá fáza (ED8 – ED13) je charakterizovaná vysokou proliferačnou aktivitou a rýchlym rastom CAM. Druhá fáza (ED13 – ED18) je štádiom diferenciácie a expanzie komponentov CAM. V priebehu tretej fázy (ED18 – ED21) dochádza k regresii a degenerácii tkaniva. Angiogenéza je sledovaná v intervale od ED5 do ED14 [13,14]. Na ED7 pokrýva CAM takmer $\frac{1}{2}$ žltkového vaku. Jednotlivé vrstvy sú dobre diferencované a odlišiteľné. Hlavné krvné cievy sú na ED10 prítomné v mezoderme, uložené bližšie k alantoisu. Chorionový epitel (ektoderm) v CAM je tvorený vrstvou malých krvných ciev, ktoré tu vytvárajú kapilárnu sieť s vysokou denzitou. Táto kapilárna sieť prilieha na vnútornú škupinovú membránu a v priebehu vývinu dosahuje hrúbku maximálne $13,7 \pm 2,2 \mu\text{m}$ [5,6].

Maksimov a kol. [5] sledoval morfológické parametre kuracieho embrya a CAM v závislosti od štádia embryonálneho vývinu. Hrúbka jednotlivých vrstiev CAM (ED7: ektoderm $8,40 \pm 0,25 \mu\text{m}$, mezoderm $49,10 \pm 2,38 \mu\text{m}$, alantois $4,00 \pm 0,11 \mu\text{m}$; ED10: chorion $10,00 \pm 0,29 \mu\text{m}$, mezoderm $68,20 \pm 4,91 \mu\text{m}$, alantois $4,40 \pm 0,21 \mu\text{m}$) dosiahla maximálne hodnoty na ED12 [6,14]. V neskorších štádiách embryonálneho vývinu vtáčieho embrya boli pozorované patomorfologické zmeny CAM (napr. redukcia a devastácia kapilárnej siete a degeneratívne zmeny mezodermálnych ciev), ktoré súvisia so stratou respiračnej funkcie CAM. Úlohu primárneho respiračného orgánu preberajú pľúca od ED18 [15].

Záver

V našej práci sme hodnotili morfológické parametre chorioalantoickej membrány kury domácej a prepelice japonskej v závislosti od štádia embryonálneho vývinu, ktorý je používaný pre implantáciu a odber materiálu pri testovaní biokompatibility materiálov. V oboch prípadoch sme zaznamenali fyziologický nárast v počte ciev, ako aj zmeny v hrúbke jednotlivých vrstiev CAM. Model kuracej CAM je jedným z najviac používaných modelov vo vedeckej experimentálnej práci, no napriek tomu, využitie nekonvenčného vtáčieho CAM modelu, ako je prepelica, môže ponúknuť viac možností v experimentálnej práci a prinášať aj výhodné podmienky pre štúdium biokompatibility materiálov. Model prepelice si vyžaduje menší priestor, a tým umožňuje využitie vyššieho počtu embryí v priebehu experimentu. Rovnako aj rozdielny čas vývoja medzi sledovanými druhmi s prihliadnutím na odlišnosti v stavbe CAM a vaskulárnej siete môže byť výhodnejší v závislosti od experimentu. Detekcia zmien v procese angiogenézy robí z tohto modelu vhodný modelový systém pre rýchly skríning biokompatibility materiálov špeciálne navrhnutých pre oblasť tkanivového inžinierstva pred ich použitím na vyšších stavovcoch ako experimentálnych zvieratách.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0050/19 a APVV-20-0073.

Literatúra

- [1] Kundekova, *Biology*. **2021**, 10:301.
- [2] Ribatti, *Reproductive Toxicology*. **2017**, 70:97-101.
- [3] Maina, *Springer*, **2017**, 250 s., ISBN 978-3-319-44153-5
- [4] Valdes, *Journal of Biomedical Materials Research*. **2002**, 62:273-282.
- [5] Maksimov, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. **2006**, 142:367-371.
- [6] Makanya, *Plos One*. **2016**, 11(4):e0152821.
- [7] Chen, *Cells*. **2021**, 10:463.
- [8] Zwaldo-Klarwasser, *Journal of Material Science: Materials in Medicine*. **2001**, 12:195-199.
- [9] Liu, *Experimental Animals*. **2018**, 67:1-6.
- [10] Nowak-Sliwinska, *Angiogenesis*. **2014**, 17:779-804.
- [11] McKay, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **2008**, 49:1184-1190.
- [12] Talavera-Adame, *Journal of Biomedical Optics*. **2008**, 13:064017-1-064017-7.
- [13] Koning, *Plenum Press*. **1997**, 411:353-358.
- [14] Romanoff, *Science*. **1960**, 131:1219-1305.
- [15] Reizis, *The Journal of Experimental Biology*. **2005**, 208:2483-2488.

Epiteloidný/plexiformný leiomyóm maternice: opis prípadu a problematika histopatologickej diagnostiky nádorov svaloviny maternice s epiteloidnobunkovou morfológiou

Bartoš, V.¹

¹ Martinské bioptické centrum, s.r.o., Martin
vladim.bartos@gmail.com

Abstract

Epithelioid leiomyoma is a rare histologic type of uterine leiomyoma that is subcategorized into leiomyoblastoma, clear cell and plexiform variant. The aim of this paper was to describe a case of epithelioid/plexiform uterine leiomyoma with emphasis on histomorphology of the lesion. The study material consisted of biopsy samples from an intramural uterine tumor obtained from a 45-year-old woman. The lesion composed of uniform epithelioid tumor cell population in a fibrohyalinized stroma with thickened walled blood vessels. The tumor cells had a round shape, scant cytoplasm and a relatively large nuclei with central nucleoli. A mild degree of nuclear atypia was focally seen. The cell population was mostly arranged in anastomosing strands (plexiform pattern). It was reactive for desmin, smooth muscle actin, estrogen and progesterone receptors, and negative for melan A. Proliferation Ki-67 index did not exceed 1%. Mitoses or necrosis were not found. In routine biopsy practice, epithelioid uterine leiomyoma may cause diagnostic difficulties. This work highlights the need for a complex histopathological differential-diagnostic approach to the uterine smooth muscle tumors with epithelioid cell morphology.

Keywords: uterine leiomyoma, epithelioid cells, plexiform pattern

Úvod

Leiomyómy maternice sú u žien najčastejším tumorom lokalizovaným v panvovej oblasti [1,2]. V reprodukčnom veku dosahuje ich prevalencia celosvetovo hodnoty vyše 50 % a v závislosti od etnika až do 80 % žien [1,2]. Etiopatogenéza ochorenia je veľmi komplexná a stále nedostatočne objasnená. Uterinné leiomyómy sú totiž heterogénnou skupinou nádorov, ktoré sa aj v rámci jednej maternice genotypovo a fenotypovo odlišujú [1,2]. Systematický prehľad molekulovo-genetických alterácií pri vzniku tohto ochorenia publikoval vo svojich prácach kolektív martinských autorov [1,2]. Prevažnú väčšinu prípadov predstavujú „konvenčné“ leiomyómy, ktorých bioptická diagnostika je zvyčajne jednoduchá. Histologicky pozostávajú z populácie proliferovaných hladkosvalových buniek vretenovitého tvaru s jemne eozinofilnou cytoplazmou a elongovaným jadrom [3]. Okrem nich však existujú aj viaceré zriedkavejšie histologické typy a varianty so špecifickou morfológiou [3] (Tabuľka 1). Do tejto kategórie patrí epiteloidný typ leiomyómu, ktorý pre svoj atypický vzhľad a zriedkavý výskyt môže spôsobiť v bioptickej praxi diagnostické ťažkosti. Cieľom prezentovaného príspevku je opis prípadu z praxe so zameraním na problematiku histomorfologickej diagnostiky a správneho určenia dignity lézie.

Materiál a metódy

Analyzovaný materiál pozostával z bioptických vzoriek maternice od 45-ročnej ženy, ktorá podstúpila hysterektómiu s obojstrannou adnexektómiou pre uterus myomatosus. Po chirurgickej resekcii boli orgány štandardne fixované vo formalíne.

Uterus mal rozmer 11 x 10 x 5 cm a po prerezaní obsahoval ostro ohraničený intramurálny uzol priemeru 4 cm, tuhšej konzistencie, hnedobelavej farby s naznačenou pruhovanou štruktúrou. Excidované vzorky tkaniva sme spracovali v parafínových bločkoch a ďalej podľa konvenčných laboratórnych postupov formou histologických rezov. Okrem štandardného farbenia hematoxylínom a eozínom sme vykonali aj imunohistochemickú analýzu monoklonálnymi protilátkami proti dezminu (klon D33), hladkosvalovému aktínu alfa (α SMA, klon 1A4), estrogénovým receptorom (ER α , klon 1D5), progesterónovým receptorom (PR, klon PgR 636), melan A (klon A103) a proliferáčnemu antigénu Ki-67 (klon MIB1).

Výsledky

Intramurálny tumor histologicky pozostával z uniformnej epiteloïdnobunkovej nádorovej populácie v teréne výrazne fibrohyalinizovanej strómy s prítomnými hrubostennými krvnými cievami. Nádorové bunky mali okrúhly tvar, chudobnú bazofilnejšiu cytoplazmu a pomerne veľké okrúhle jadrá s centrálnymi jadierkami (Obrázok 1). Fokálne bol viditeľný ľahký stupeň nukleárnej atypie. Táto bunková populácia bola usporiadaná prevažne v anastomózujúcich pruhovitých (spleťových) formáciách (Obrázok 2), ktoré často obkružovali hyalinizované hrubostenné cievy (Obrázok 3). V iných úsekoch boli bunky v stróme distribuované v klastroch alebo disociované. Imunohistochemicky vykazovali difúziu reaktivitu na dezmin (Obrázok 4), hladkosvalový aktín, estrogénové aj progesterónové receptory a boli negatívne na melan A. Proliferačný Ki-67 antigén nepresahoval 1 %. Mitózy ani nekrózy sa nevyskytovali. Od okolitého myometria bol nádor ostro ohraničený. Spektrum nálezov a imunofenotypu zodpovedalo plexiformnému variantu epiteloïdného uterinného leiomyómu. Bez morfológických atribútov malignity.

Diskusia

Leiomyómy maternice sú v biopstickej praxi rutínnou diagnózou. Približne 87 - 95 % z nich predstavujú „konvenčné“ leiomyómy [4-5], ktoré majú charakteristický mikroskopický obraz. Špecifické histologické typy a varianty sú pomerne zriedkavé, avšak odhadnúť ich zastúpenie je obtiažne. V literatúre je publikovaných málo prác analyzujúcich väčší súbor uterinných leiomyómov so zameraním na ich histologickú subtypizáciu, z ktorých možno odhadnúť približný výskyt epiteloïdného typu. Manjula et al. [6] v súbore 439 leiomyómov a Abraham et al. [5] v súbore 545 leiomyómov maternice potvrdili iba po jednom prípade, čo predstavuje cca 0,2 %. Vyššie zastúpenie reportujú českí autori [4], ktorí porovnávali histologické typy uterinných leiomyómov u žien v reprodukčnom veku a v menopauze. Z celkového súboru 668 pacientiek sa epiteloïdný leiomyóm vyskytoval u pätnástich z nich (2,2 %). Zaujímavé je, že ako jediný z histologických typov sa signifikantne častejšie vyskytoval u žien po menopauze v porovnaní s fertilným vekom. Pre porovnanie autor tohto príspevku retrospektívne analyzoval všetky prípady uterinných leiomyómov, ktoré diagnostikoval na svojom pracovisku (Martinské biopstické centrum) od júla 2019 do februára 2022. V tomto období registroval 178 pacientiek s leiomyómami maternice, pričom epiteloïdný typ potvrdil iba v tomto jednom prípade (0,5 %). Uvedé dáta dokazujú, že v bežnej patologickej praxi ide o veľmi zriedkavú nozologickú jednotku.

Epiteloïdný leiomyóm sa kategorizuje na 3 varianty: a) leiomyoblastóm, b) svetlobunkový (clear cell) leiomyóm a c) plexiformný leiomyóm [3]. Leiomyoblastóm pozostáva z okrúhlych buniek s eozinofilnou cytoplazmou [3]. „Clear cell“ leiomyóm je tvorený polygonálnymi bunkami s bohatou svetlou cytoplazmou a dobre kontúrovanou

membránou. Cytoplazma obsahuje glykogén alebo malé množstvo lipidov. Jadrá sú utlačené na perifériu a bunky môžu nadobúdať „signet-ring“ vzhľad [3]. Plexiformný leiomyóm pozostáva z okrúhlych alebo polygonálnych buniek s chudobnou cytoplazmou, ktoré sú zvyčajne aranžované v anastomózujúcich pruhoch a klastroch [3]. Jadrá sú okrúhle, relatívne veľké a centrálné lokalizované. Malé plexiformné leiomyómy, ktoré sú detegované iba mikroskopicky sa nazývajú plexiformné tumorlety [3].

Bez ohľadu na histologický variant je epiteloidný leiomyóm maternice benígny tumor, ktorý neovplyvňuje klinický manažment pacientiek s uterus myomatosis. Z biotického hľadiska však môže byť problematické odlíšenie epiteloidného leiomyómu od leiomyosarkómu a najmä od pomerne nejasne definovanej jednotky hladkosvalového nádoru maternice s neurčitým malígnym potenciálom (STUMP, uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential). Doteraz bolo reportovaných niekoľko histopatologických kritérií na ich odlíšenie [3,7,8]. V najnovšej (zatiaľ len „online ahead of print“ publikovanej) práci americkí autori [8] navrhujú diagnostický algoritmus zahrňujúci tri základné „cut-off“ parametre (minimálne stredne výraznú atypiu jadier, minimálne 4 mitózy/10HPF, nekrózy nádorového tkaniva) a ďalšie štyri doplnkové parametre (infiltratívne okraje lézie, atypické mitózy, veľkosť tumoru ≥ 5 cm, nádorová propagácia v lymfatických cievach). Prítomnosť či absencia jednotlivých nálezov je určujúcim kritériom stanovenia diagnózy epiteloidného leiomyómu, epiteloidného STUMP a epiteloidného leiomyosarkómu (Tabuľka 2). Samotní autori článku však upozorňujú na (zatiaľ) limitovanú spoľahlivosť tohto algoritmu a potrebu jeho validácie v praxi. Podľa uvedených kritérií náš prípad jednoznačne spadal do kategórie benígnej lézie. V rámci spektra nádorov svaloviny maternice s epiteloidnobunkovou morfológiou (predovšetkým ich malígnych foriem) pripadá diferenciálno-diagnosticky do úvahy najmä nádor z perivaskulárnych epiteloidných buniek (PECóm), o ktorom sme uvažovali aj v našom prípade, ďalej endometriálny stromálny sarkóm (ESS), alveolárny sarkóm mäkkých tkanív (ASPS) a metastatický karcinóm alebo melanóm. Podrobnejší opis histopatologického obrazu a imunofenotypu týchto nádorov by presahoval rámec tohto článku, ale prehľad imunohistochemickej expresie ich najdôležitejších molekulových markerov je uvedený v Tabuľke 3 [9].

Záver

Epiteloidný leiomyóm maternice je zriedkavý benígny nádor, ktorý spôsobuje v biotickej praxi diagnostické rozpaky. Problematické môže byť správne stanovenie biologickej povahy lézie, ktoré zásadne ovplyvňuje ďalší klinický manažment pacientky. Prezentovaný príspevok poukazuje na potrebu komplexného diferenciálno-diagnostického prístupu pri histopatologickom hodnotení hladkosvalových tumorov maternice s epiteloidnobunkovou morfológiou.

Literatúra

- [1] Dvorská, *Čes. Gynek.* **2016**, 81(1):48-52.
- [2] Dvorská, *Tumour Biol.* **2017**, 39(6):1010428317710226.
- [3] Kurman, *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract.* **2011**, s.465-466.
- [4] Kadlecová, *Čes. Gynek.* **2015**, 80(5):360-364.
- [5] Abraham and Saldanha, *Int. J. Biomed. Res.* **2013**, 4(12):639-645.
- [6] Manjula, *J. South Asian Feder. Obst. Gynae.* **2011**, 3(2):89-92.
- [7] Toledo, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2008**, 132(4):595-605.
- [8] Chapel, *Am. J. Surg. Pathol.* **2021**, Aug 23. doi: 10.1097/PAS.0000000000001795.
- [9] Armah and Parwani, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2009**, 133(4):648-654.

TABUĽKY

Tabuľka 1 Histopatologická klasifikácia leiomyómov maternice (sumarizované z ref. 3)

A. „Konvenčný“ leiomyóm
B. Špecifické histologické typy a varianty leiomyómu <ul style="list-style-type: none"> • celulárny leiomyóm • mitoticky aktívny leiomyóm • apoplektický (hemoragický celulárny) leiomyóm • atypický (symplastický) leiomyóm • myxoidný leiomyóm • leiomyóm s prímiesou hemopoetických buniek • epiteloidný leiomyóm <ul style="list-style-type: none"> - lipoblastóm - svetlobunkový (clear cell) leiomyóm - plexiformný leiomyóm • vaskulárny leiomyóm (angioleiomyóm) • lipoleiomyóm • angiolipoleiomyóm

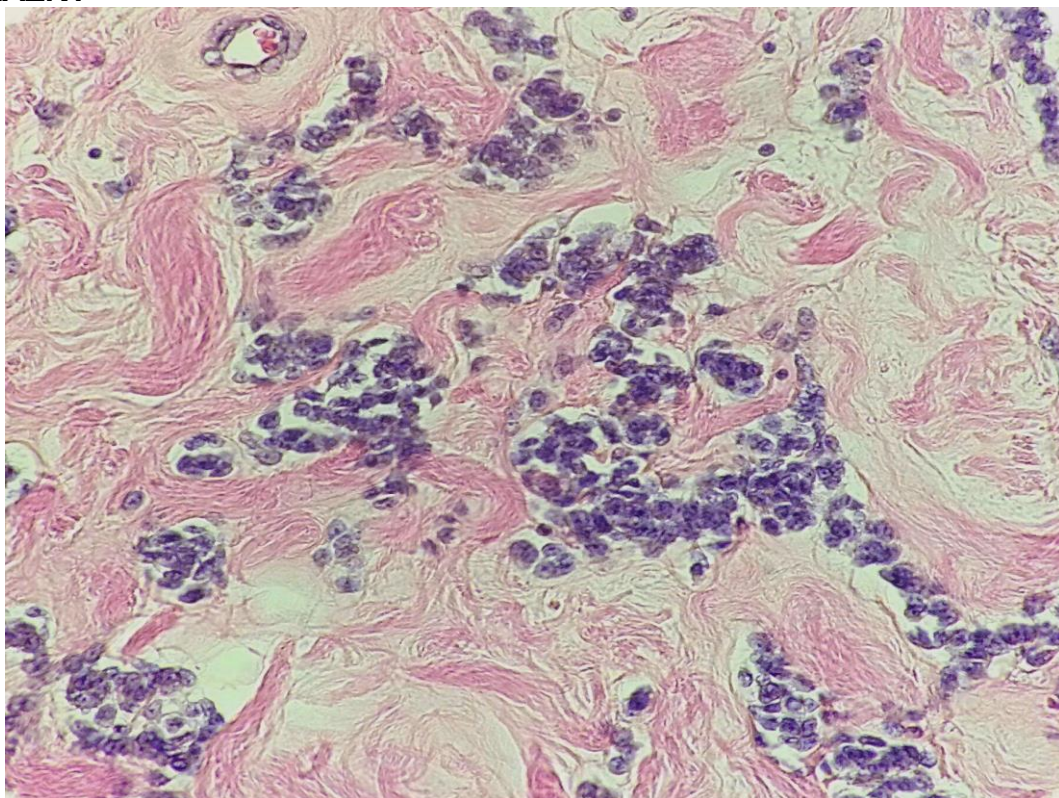
Tabuľka 2 Algoritmus a navrhované kritériá pre diagnostiku epiteloidných hladkosvalových tumorov maternice (prevzaté z ref. 8). ^aAtypie jadier sú definované ako 1+ (uniformné jadrá ≤ 2-násobok veľkosti jadier normálnych myocytov), 2+ (jadrá > 2-násobok veľkosti jadier normálnych myocytov, nenápadné nukleárne variácie), 3+ (jadrá > 2-násobok veľkosti jadier normálnych myocytov, pleomorfné jadrá prítomné disperzne), 4+ (pleomorfné jadrá prítomné difúzne); HPF - high power field; LVNI – lymfovaskulárna nádorová invázia; STUMP – hladkosvalový nádor maternice s neurčitým malígnym potenciálom

≥ 2+ atypia jadier ^a ≥ 4 mitózy/10HPF nádorové nekrózy	neprítomné	aspoň 1 z nálezov	nie	→	epiteloidný leiomyóm
		• infiltratívne okraje • atypické mitózy • nádor ≥ 5 cm • LVNI	áno	→	epiteloidný STUMP
	prítomný 1 nález	→ epiteloidný STUMP			
	prítomné ≥ 2 nálezy	→ epiteloidný leiomyosarkóm			

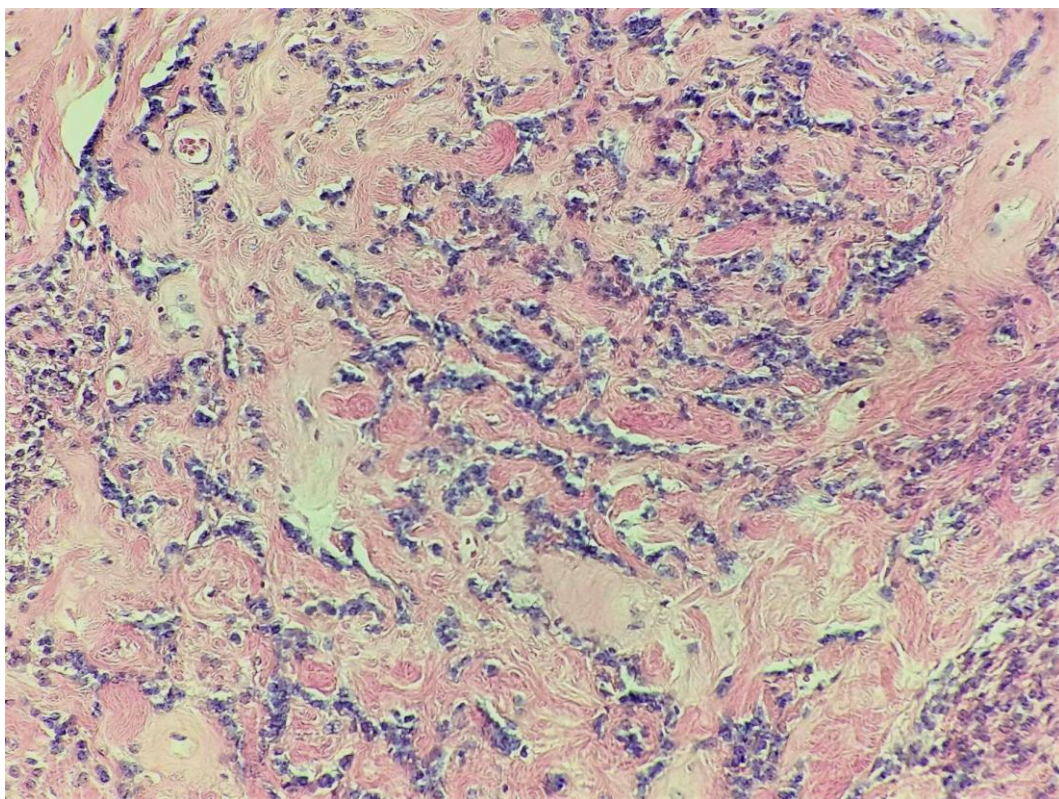
Tabuľka 3 Imunohistochemický profil epiteloidných hladkosvalových tumorov maternice a ich základných diferenciálno-diagnostických jednotiek (prevzaté z ref. 9). ESMT – epiteloidný hladkosvalový tumor maternice, PECóm – nádor z perivaskulárnych epiteloidných buniek, ESS – endometriálny stromálny sarkóm, ASPS – alveolárny sarkóm mäkkých tkanív, MM – malígny melanóm, Ca^{nedifer.} – nediferencovaný karcinóm, bližšie nešpecifikovaný; +++ (pozitívnych > 75 % prípadov), ++ (pozitívnych 50 – 75 % prípadov), + (pozitívnych 25 – 50 % úrpadov), +/- (pozitívnych < 25 % prípadov), - (žiadny pozitívny prípad), N (neuvedené)

	PECóm	ESMT	ESS	ASPS	MM	Ca ^{nedifer.}
HMB-45	+++	+/-	+/-	-	+++	-
melanA	+++	-	-	N	+++	-
S100	+	+/-	+/-	+	+++	-
Mitf	++	+	-	-	+++	-
SMA	+++	+++	+/-	+/-	+/-	-
MSA/HHF35	+++	+++	+	+	-	-
dezmin	++	++	+/-	++	-	+/-
EMA	-	+/-	+++	N	+/-	+++
AE1/AE3	+/-	+/-	+++	-	+/-	+++
CD31	+++	+/-	+/-	-	-	N
CD10	+	+	+++	N	N	N
CD117	+	+/-	+/-	-	+	N
synaptofyzín	+/-	N	+/-	-	+/-	-
chromogranín	-	N	-	++	-	+

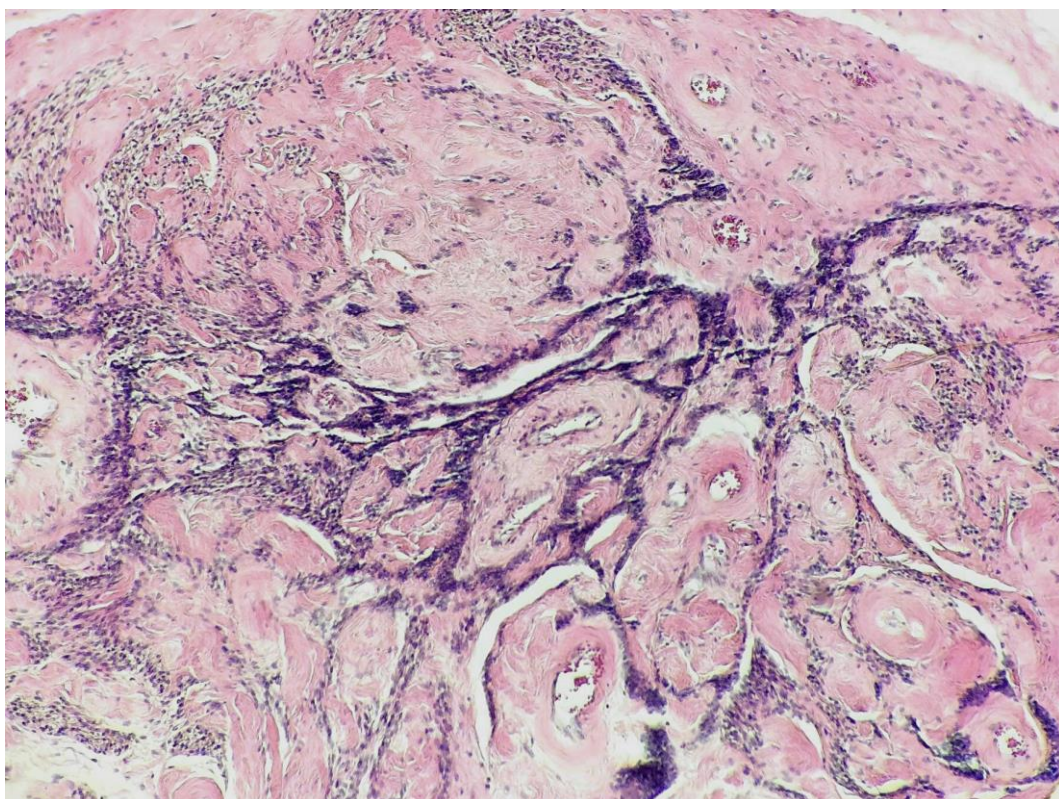
OBRÁZKY



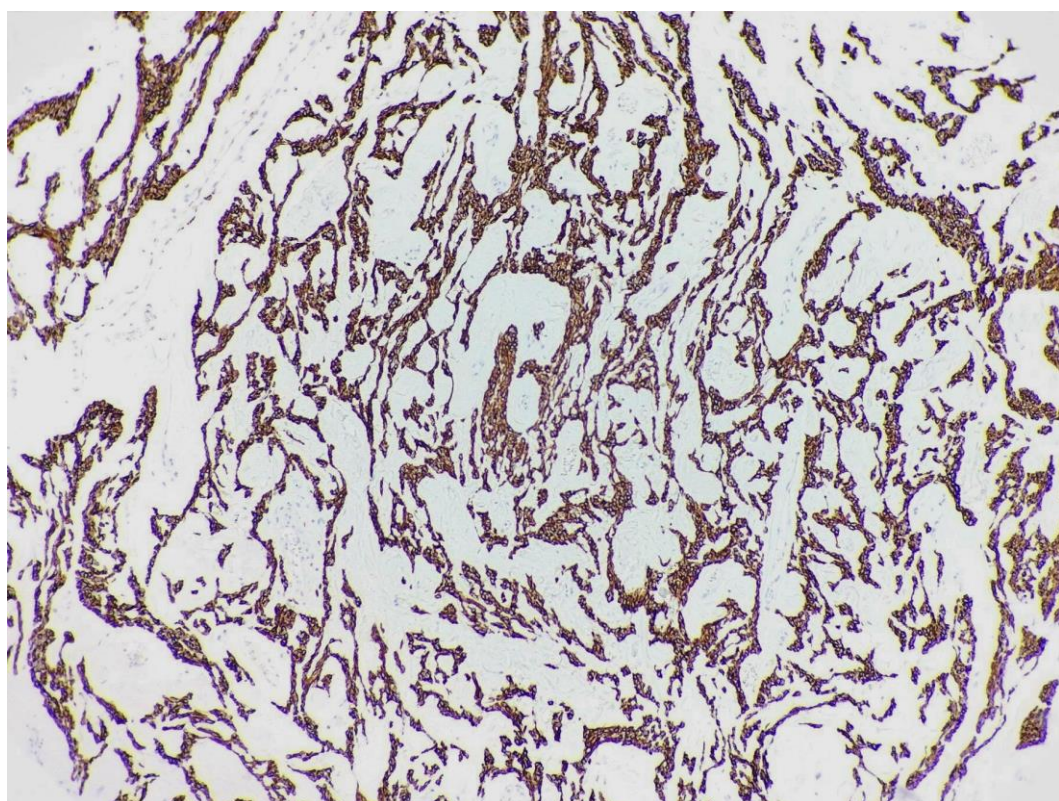
Obrázok 1 Detail na zoskupenia uniformných nádorových buniek epiteloideho vzhľadu (hematoxylín & eozín, zväčšenie 40x)



Obrázok 2 Nádorobunková populácia rastúca v trabekulárných formáciách vo fibrohyalinizovanej stróme (hematoxylín & eozín, zväčšenie 20x)



Obrázok 3 Spleťové (plexiformné) zoskupenia nádorových buniek koncentrované okolo hrubostenných hyalinizovaných krvných ciev (hematoxylín & eozín, zväčšenie 10x)



Obrázok 4 Difúzna cytoplazmatická pozitivita nádorovobunkovej populácie na dezmin (zväčšenie 10x)

EMT asociovaný biomarker Rac1 v léziách krčka maternice

Hurta Csizmár, S.¹, Mešťanová, V.¹, Krajňáková, B.¹, Kajo, K.², Adamkov, M.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ²Slovenská Zdravotnícka Univerzita a Onkologický ústav sv. Alžbety v Bratislave, Ústav patológie, Bratislava
csizmarova5@uniba.sk

Abstract

Cervical cancer is one of the leading causes of death among women in the world. Despite the great advances in diagnosis, therapy and prevention, the prognosis of patients is still not satisfactory. Many patients are diagnosed late and the challenge of determining the behavior and future progression of tumor remains. Therefore many studies focus on identifying novel biomarkers that could be helpful in more accurate therapy selection and prognosis. Studies of many epithelial-mesenchymal transition (EMT) related biomarkers are currently coming to the fore. EMT ensures elevated metastatic activity of tumor lesions. Such biomarkers include Rac1 from Rho GTPases family. Biomarkers of this family participate in cell proliferation, angiogenesis, migration, and cancer progression. Rac1 is a regulator of cytoskeleton and plays one of the crucial roles in cell cycle progression, cell adhesion, cell migration and tumor formation. Our study focuses on the role of Rac1 in lesions of uterine cervix.

Keywords: Rac1, cervical cancer, immunohistochemistry

Úvod

Rakovina krčka maternice sa naďalej zaraďuje medzi jedno z najčastejšie diagnostikovaných gynekologicko-onkologických ochorení u žien. Aj napriek zavedenému skriningovému programu a dostupnosti vakcíny ročne pribudne cez 600,000 novo diagnostikovaných pacientiek a eviduje sa viac ako 300,000 úmrtí celosvetovo [1]. Na Slovensku je ročne diagnostikovaných s rakovinou krčka maternice skoro 700 žien [2]. Perzistentná infekcia HPV a ďalšie rizikové faktory vedú prvotne k rozvinutiu prekancerózných lézií. Po integrácii HPV genómu do epitelových buniek krčka dochádza k výraznej progresii cervikálnych lézií. Na genómovej nestabilite sa podieľa veľké množstvo bunkových dráh a rozličných molekúl, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu pri proliferácii lézie. Jednou z takýchto molekúl je proteín Rac1 (Ras-príbuzný C3 botulotoxínový substrát 1) z rodiny GTP-áz, ktoré zohrávajú dôležitú rolu pri mnohých bunkových funkciách či už počas embryonálneho vývoja, alebo pri zdravých bunkách a neoplastických stavoch [3].

Rac1

Rac1 je členom rodiny Rho GTP-áz, ktoré majú schopnosť modulovať dynamiku aktínu v bunke. Ich hlavná úloha spočíva v regulácii polarite buniek a ich pohyblivosti prostredníctvom pôsobenia na cytoskelet, membránu a bunkovú adhezivitu [4]. Rac1 je známy ako modulátor cytoskeletu pre mnoho fyziologických bunkových aktivít ako fagocytóza, axonálny rast, adhézia buniek, migrácia podobnej mezenchýmu a diferenciácia viacerých typov buniek. Rac1 existuje v aktívnej forme viazaný na GTP (guanozíntrifosfát) a neaktívnej forme viazaný na GDP (guanozín difosfát). K aktivácii dochádza pôsobením chemoatraktantov, fagocytárnych častíc, chemokínov či rôznych upstream regulátorov. Rac1 sa prvotne disociuje od GDI (inhibitor disociácie

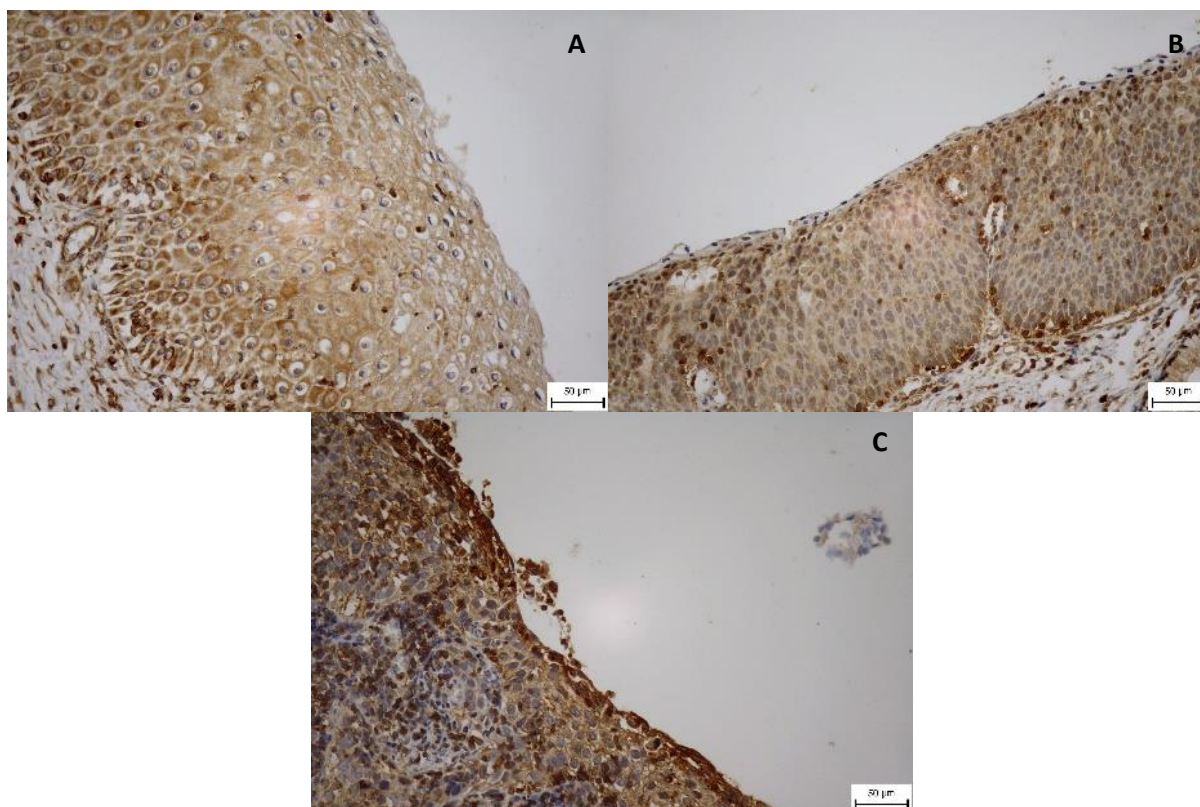
guanínových nukleotidov) a následne dochádza k zámene GDP za GTP a Rac1 sa viaže na membránu bunky [5]. Práve aberantná aktivácia Rac1 sa podieľa častokrát na vývoji a progresii nádoru [6]. Mnohé štúdie dobre opísali úlohu Rac1 ako organizátora cytoskeletu, ale prichádzajú ďalšie štúdie s novými zisteniami o úlohe Rac1 v nádoroch. Rac1 reguluje rozmanité spektrum procesov ako angiogenéza, tumorigenéza a metastazovanie [7]. Zvýšená expresia Rac1 bola zistená vo viacerých nádoroch napr. prsníka [8], močového mechúra [9], , prostaty [11] a hrubého čreva [12]. Niektoré štúdie potvrdili koreláciu expresie Rac1 so zvýšenou agresivitou a metastazovaním nádorov [7,10]. Ďalšie štúdie potvrdili expresiu Rac1 v jadrách neoplastických buniek krčka maternice, kde zohráva dôležitú úlohu pri ich proliferácii [13, 14].

Materiál a metódy

Tkanivo z lézií krčka maternice vo forme parafínových bločkov sme získali od 85 pacientiek. Súbor obsahuje 30 vzoriek skvamózných intraepiteliálnych lézií nízkeho stupňa (LSIL), 28 vzoriek skvamózných intraepiteliálnych lézií vysokého stupňa (HSIL) a 27 vzoriek skvamocelulárneho karcinómu (SCC). Pripravili sa rezy o hrúbke 3 μ m, ktoré sa deparafinizovali a rehydratovali. Revitalizácia antigénov sa uskutočnila za pomoci PT Link-u (Pre-Treatment, Module for Tissue Specimens, Dako). Vzorky sa imunohistochemicky spracovali podľa návodu od výrobcu a na vizualizáciu sa použil chromogén 3,3-diaminobenzidín (DAB). Na vyhodnotenie sme použili počítačovo-asistovanú morfolometrickú analýzu. Vyhotovili sa mikrofotografie za pomoci svetelného mikroskopu (OlympusEvol+E-420) a fotoaparátu (Olympus BX41N). Mikrofotografie sa budú analyzovať za pomoci softvéru QuickPhotoMicro Version 3.2 (Promicra, Praha, Česká republika). Každá vzorka sa posúdi dvoma nezávislými pozorovateľmi (SHC, VM). Vyberie sa aspoň 5 plôch (hot-spot areas) s najvyššou expresiou pre vyhodnotenie. Expresia Rac1 je definovaná ako percento pozitívnych buniek v lézii. Zároveň sme semikvantitatívne ohodnotili nasledovné parametre: intenzita imunoreakcie 0 (žiadna), 1 (slabá), 2 (mierna/stredná), 3 (silná) a subcelulárna lokalizácia biomarkeru. Tieto získané výsledky budeme v ďalšej časti práce štatisticky vyhodnocovať pomocou štandardných štatistických metód ako Chi-square test (χ^2), Spearmannov korelačný koeficient a Kruskal-Wallisov test.

Predbežné výsledky

Rac1 sme detekovali imunohistochemicky v LSIL, HSIL a SCC vzorkách. Subcelulárna lokalizácia Rac1 bola vo väčšine vzoriek cytoplazmová a v menšom množstve kombinovaná jadrová a cytoplazmová (obr. 1). Pri LSIL vzorkách sme zaznamenali slabú (37%) a strednú (53%) intenzitu imunoreakcie. Expresia bola prítomná v celej vrstve epitelu LSIL. HSIL vzorky vykazovali predovšetkým strednú (46%) a vysokú (32%) intenzitu imunoreakcie. Intenzita imunoreakcie u vzoriek skvamocelulárneho karcinómu bola vo väčšine prípadov stredná (44%) až vysoká (33%). Expresia biomarkeru bola výrazná aj v okolitom spojivovom tkanive lézií. Naše výsledky budeme následne hodnotiť počítačovým softvérom pre presné určenie percenta pozitívnych buniek. Zároveň sa posúdi vzťah expresie Rac1 a cytologickej morfológie, hĺbky invázie lézie a reaktívnych elementov strómy. Po vyhodnotení uvedených parametrov nás čaká štatistická analýza údajov a korelácia klinicko-morfológických charakteristík (vek, pohlavie, TNM klasifikácia a grading) a ďalších rutine využívaných biomarkerov p16 a Ki67.



Obrázok 1 Expresia Rac1 v LSIL (A), HSIL (B) a SCC (C)

Diskusia

V našej práci sledujeme expresiu viacerých proteínov podieľajúcich sa na procese epiteliálno-mezenchýmalnej tranzície v léziách krčka maternice. Tento proces je dôležitý pre prekonanie jednotlivých krokov metastatickej kaskády. Aj proteín Rac1 sa zapája do procesu EMT a prispieva k progresii lézií a častokrát k vzniku rezistencie u rôznych typov solídnych nádorov [3]. Viaceré štúdie popisujú zvýšenú expresiu Rac1, ktorá koreluje so zhoršujúcou sa prognózou lézie a EMT [15]. Naše predbežné výsledky sú podobné výsledkom iných štúdií, ktoré popisujú zvyšujúcu sa expresiu biomarkeru so zvyšujúcou sa závažnosťou lézie napr. pri ovariálnom karcinóme [16], karcinóme žalúdka [7, 10] či pľúcnom karcinóme [15]. Taktiež subcelulárna lokalizácia, ktorá bola cytoplazmová alebo kombinovaná jadrová a cytoplazmová bola pozorovaná aj v ďalších štúdiách [13]. Práve kvôli zvýšenej imunoreakcii pri invazívnych léziách a korelácii s pokročilými štádiami by mohol byť Rac1 indikátorom invazivity [13, 14].

Záver

Naše predbežné výsledky poukazujú na zvýšenú expresiu Rac1, ktorý zohráva úlohu v komplexnom procese EMT, ktorý zabezpečuje zmenu epitelového fenotypu nádorových buniek na mezenchýmový. Bude potrebné ďalej zhodnotiť možnosť využitia Rac1 ako potenciálneho diagnostického, prognostického markera či terapeutického cieľa. V našej práci budeme ďalej hodnotiť expresiu nielen Rac1, ale aj ďalších biomarkerov zapojených do EMT. Budeme sledovať ich vzájomné korelácie ako aj s ďalšími klinicko-morfologickými parametrami.

Práca bola financovaná z grantu VEGA č. 1/0129/16 a UK/21/2020.

Literatúra

- [1] Sung, *Cancer J. Clin.* **2021**, 79:209-249.
- [2] Bruni, *HPV Information Center.* **2021**, 24.5.2022 accessed.
- [3] De, *Cells.* **2019**, 8(5):382.
- [4] Ridley, *Trends Cell Biol.* **2006**, 16(10):522-529.
- [5] Yamauchi, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280(2):953964.
- [6] Jansen, *Pharmacol. Ther.* **2018**, 183:1-21.
- [7] Ji, *Int. J. Oncol.* 2015, 46(3):1343-1353.
- [8] Fritz, *Int. J. Cancer.* **1999**, 81:682-687.
- [9] Kamai, *BMC Cancer.* **2010**, 10:1642010.
- [10] Zhan, *Onkologie.* **2013**, 36:102-107.
- [11] Kato, *PloS One.* **2014**, 9:e977492014.
- [12] Zhu, *Oncogene.* **2012**, 31:1001-1012.
- [13] Mendoza-Catalán, *BMC Cancer.* **2012**, 12:116.
- [14] Xu, *Tumor Biol.*, **2017**, 41(4):10371048.
- [15] Zhou, *J. Cancer.* **2016**, 7(14):2100-2109.
- [16] Leng, *Med. Oncol.* **2015**, 32(2):329.

Možnosti využitia metód molekulyvej biológie na detekciu metylácie u viacerých typov nádorových ochorení

Kašubová, I.¹, Samec, M.³, Kapinová, A.¹, Dvorská D.¹, Lukáčová E.²

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

²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav molekulyvej biológie a genetiky, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej fyziológie, Martin

ivana.kasubova@uniba.sk

Abstract

The development of various oncological diseases is initiated and accelerated by epigenetic changes at the DNA level, especially alterations that affect its methylation status. Evaluating DNA methylation status of the sample obtained from the patient seems to be a promising biomarker for the early detection of the disease. We focused on introducing appropriate molecular methods to identify changes in DNA methylation patterns associated with carcinogenesis. We have introduced several methods appropriate to different types of biological material, such as tissue, serum, and plasma. Routinely, we use techniques with quantitative character with the necessary bisulfite conversion as well as methodologies without the need for DNA treatment appropriate for semiquantitative analysis. The scope of our manuscript is to present the possibilities of using the methods of molecular biology as a suitable approach for detecting epigenetic changes at the DNA level.

Keywords: methylation, MLPA, pyrosequencing, NGS

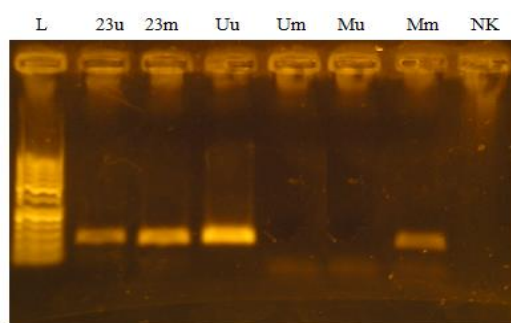
Úvod

V súčasnosti je na základe vedeckých poznatkov všeobecne známe, že za vznikom nádorového ochorenia stoja rôznorodé genetické a epigenetické alterácie [1]. Epigenetické alterácie zahŕňajú dedičné reverzibilné zmeny v DNA, modifikácie histónov a chromatínu, a tiež zmeny v regulácii nekódujúcich RNA, pričom tieto zmeny ovplyvňujú aktivitu génov bez zmeny sekvencie DNA [2]. Doteraz najviac skúmanou epigenetickou modifikáciou je metylácia DNA, ktorá predstavuje kovalentnú modifikáciu DNA charakterizovanú väzbou metylovej skupiny na cytozín v dinukleotidoch CpG (v pozícii C5), ktoré sú roztrúsené po celom genóme, avšak najčastejšie sú akumulované v podobe tzv. CpG ostrovčekov (CGI) v oblasti promótorov génov, kde sú väčšinou nemetylované [3,4]. DNA metylácia CGI reguluje génovú expresiu prostredníctvom génovo špecifickej represie transkripcie, čo bolo napríklad preukázané aj u tumorsupresorových génov, ktoré za normálnych okolností inhibujú rozvoj nádorového ochorenia. Aberantná metylácia ich promótorových oblastí je veľmi častou a skorou udalosťou v procese karcinogenézy [5, 6]. Výsledky mnohých klinických onkologických štúdií poukazujú na fakt, že metylácia DNA môže byť sľubným biomarkerom včasného záchytu nádorového ochorenia, má vplyv na jeho prognózu a predikciu, a môže byť potenciálne efektívnym cieľom v protinádorovej terapii [7,8, 9,10,11]. Avšak v rámci perspektív do budúcnosti sú nevyhnutné a žiadúce ďalšie retrospektívne a prospektívne klinické štúdie zamerané nielen na detekciu a validáciu nových biomarkerov u rôznych nádorových ochorení, ale aj štandardizáciu použitých metód a pracovných postupov [12]. V súčasnej dobe je dostupných niekoľko inovatívnych metód a vysokokapacitných technológií molekulyvej biológie a genetiky umožňujúcich detekciu stupňa metylačného stavu DNA [13,14]. Niektoré z týchto

metód sme v tomto zmysle úspešne zaviedli a optimalizovali aj v našich laboratórnych podmienkach u viacerých typov nádorových ochorení, ako je napríklad kolorektálny karcinóm, karcinóm prsníka, ovárií, krčka maternice, či karcinóm prostaty. Cieľom nášho príspevku je v stručnosti priblížiť ich pozadie vzniku, ďalej princíp na ktorom sú založené, a v neposlednom rade výhody a nevýhody ich použitia, a to i na základe našich osobných skúseností.

Metylačne špecifická PCR

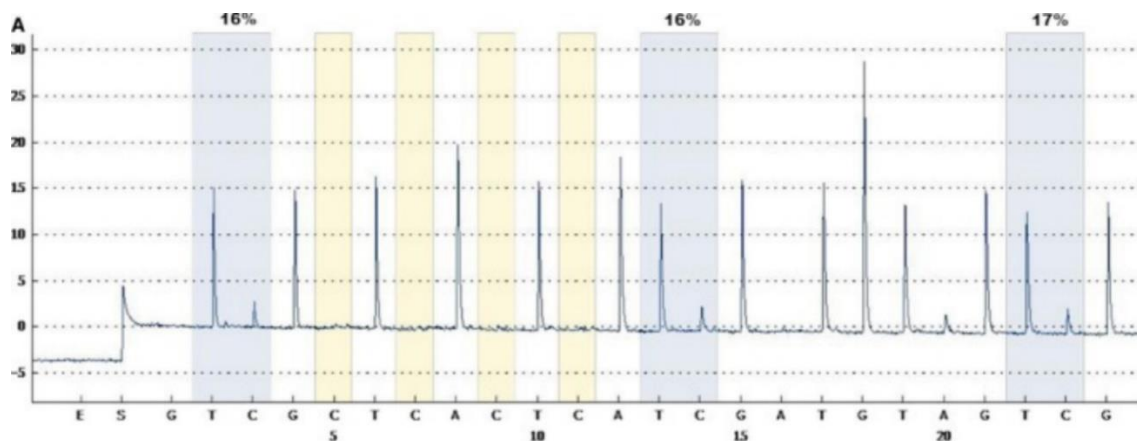
Metylačne špecifická polymerázová reťazová reakcia (MSP) je metóda detekcie metylačného profilu DNA založená na princípe bežne využívannej PCR reakcie. Zásadným krokom, ktorý je esenciálny pre MSP je bisulfidová konverzia [15]. Opracovanie denaturovanej DNA bisulfidom sodným vedie ku deaminácii nemetylovaných zvyškov cytozínu, pričom metylovaný cytozín (5-mC alebo 5-hmC) zostáva nezmenený. Uracily sú následne amplifikované v následnej PCR reakcii ako tymíny, zatiaľ čo 5-mC/5-hmC sú amplifikované ako cytozíny. Následne porovnanie sekvenčných informácií medzi referenčným génom a DNA ošetrovanou bisulfidom sodným nám môže poskytnúť informáciu o metylačnom stave cytozínu v CpG dinukleotidoch lokalizovaných v promótorových oblastiach génov [16]. Pre MSP experiment sú potrebné 2 páry primerov, pričom jeden pár je komplementárny s metylovanou DNA a druhý pár je komplementárny s nemetylovanou DNA [17]. Úspešná amplifikácia z páru primerov pre metylovanú DNA indikuje, že DNA je metylovaná, zatiaľ čo vznik PCR produktu s použitím primerov pre nemetylovanú DNA poukazuje na absenciu metylácie v CpG dinukleotidoch v oblasti nasadenia primerov. V rámci nášho pracoviska sme použili dvoj-krokovú nested-PCR, kde sme použili set vonkajších primerov (metylačne nešpecifických) na vylepšenie senzitivity a špecificity samotnej MSP reakcie pri analýze promótorovej oblasti génu *MLH1*, ktorého zvýšená frekvencia metylácie je asociovaná s rozvojom a progresiou kolorektálneho karcinómu. Samotná realizácia MSP je finančne nenáročná v porovnaní s ostatnými metódami analýzy metylácie. Aj v otázke prístrojového vybavenia laboratória predstavuje MSP relatívne jednoduchú metodiku, kedy je potrebný PCR cyklér (v našom prípade GeneAmp PCR System 9700), a elektroforetickú aparatúru na vizualizáciu výsledkov (PowerPac, Bio-Rad) (obr.1).



Obrázok 1 Vizualizácia MSP s využitím gélovej elektroforézy (1,75% agarózový gél). **L**-veľkostný štandard; **23u**- amplifikovaný úsek DNA pacienta s použitím primerov pre nemetylovanú DNA indukuje prítomnosť nemetylovanej DNA; **23m**-amplifikovaný úsek DNA pacienta s použitím primerov pre metylovanú DNA indukuje prítomnosť metylovanej DNA; **Uu**-kontrolná nemetylovaná DNA s použitím primerov pre nemetylovanú DNA; **Mu**-kontrolná metylovaná DNA s použitím primerov pre nemetylovanú DNA; **Mm**-kontrolná metylovaná DNA s použitím primerov pre metylovanú DNA; **NK**-negatívna kontrola

Pyrosekvenácia

Pyrosekvenácia je unikátna metóda, ktorá umožňuje analýzu mnohých genetických a epigenetických variácií. Tie zahŕňajú stanovenie jednonukleotidových polymorfizmov, inzercií, delécií, krátkych opakovaní, hodnotenie alelickej nerovnováhy a v neposlednom rade stanovenie úrovne metylácie DNA [18, 19]. Kľúčovým aspektom pyrosekvenácie je, že k tomuto procesu nie je nutné použiť značené nukleotidy a primery. Rovnako nevyžaduje gelovú elektroforézu pri detekcii inkorporovaného nukleotidu. Je možné ňou stanoviť sekvenciu nasledujúcu za miestom väzby primeru, zatiaľ čo sangerovým sekvenovaním je možné detekovať poradie až 20-30 báz za primerom [20, 21, 22]. Univerzálnosť metódy sa prejavuje aj v možnosti paralelného sekvenovania a automatizácie celého procesu [20,22]. V prípade stanovenia úrovne metylácie možno pyrosekvenáciu považovať za vhodný kompromis. Oproti klasickým metódam, akou je metylačne špecifická PCR poskytuje kvantitatívne výstupy. V komparácii so sekvenovaním druhej generácie je metodicky aj finančne menej náročná a praktická [20,21,22]. Pyrosekvenovanie predstavuje univerzálnu platformu pre rýchle kvantitatívne výsledky bez väčšej časovej náročnosti a minimom technických komplikácií a vysokou presnosťou [20, 21, 22]. Za nevýhody možno považovať nižšiu citlivosť pri výrazne homopolymérnych úsekoch a schopnosť analyzovať iba relatívne krátke úseky. Práve preto dizajn experimentu musí byť zameraný iba na jednu konkrétnu oblasť záujmu [20,23]. Pyrosekvenácia založená na syntéze nových sekvencií DNA [23, 24]. Nevyužíva však termináciu polymerizácie. Pred samotným sekvenovaním je potrebná bisulfidová konverzia DNA. Na našom pracovisku sa zameriavame prioritne na stanovenie metylačného statusu na zariadení Pyromark Q96ID vo vzorkách tkanív tumorov – mezenchymálnych tumorov, prsníka (*RASSF1*, *TIMP3*) a ovariálneho karcinómu (*PTEN*, *PAX1*). V prípade vzoriek ovariálneho karcinómu boli schopní stanoviť aj úroveň metylácie zo vzoriek tekutej biopsie a tie asociovať s výsledkami tkanivových vzoriek. Okrem toho sme určili metylačný status na vzorkách gastrointestinálnych tumorov, uveálneho melanómu (*ADAM23*, *CDH1*) viacerých typoch bunkových línií, a aj na tkanivách odobratých zo zvieracích modelov po experimentálnej liečbe (Obrázok 2).

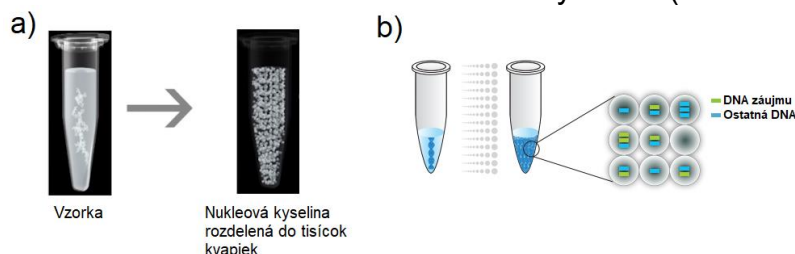


Obrázok 2 Grafický výstup zo zariadenia Pyromark Q96ID. Metylácia génu *RASSF1A* (hodnotené boli 3 CpG dinukleotidy v promótorovej oblasti) v nádore odobratom z animálneho modelu mamarnej karcinogenézy

Droplet digital PCR

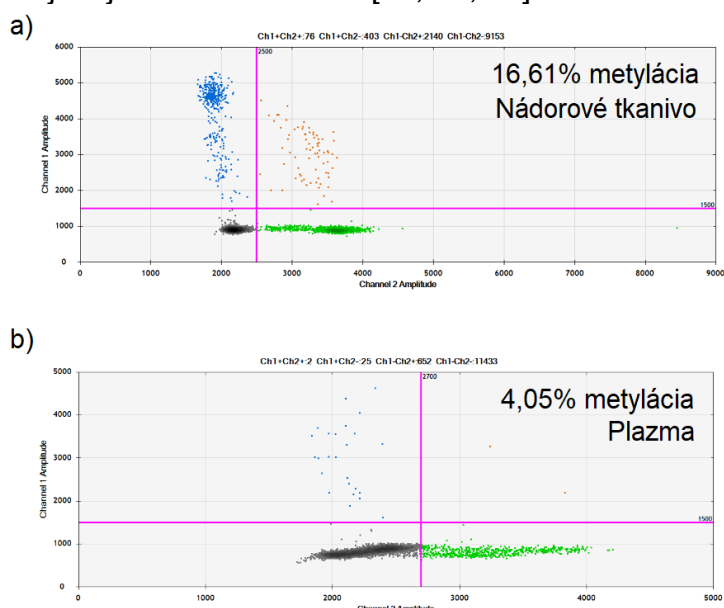
Droplet digital PCR (ddPCR)) je vysoko senzitivná metóda absolútnej kvantifikácie DNA, ktorá nevyžaduje ani kalibračné štandardy, ani referenciu (metóda $\Delta\Delta Cq$).

Masívne rozdelenie vzorky do približne 20 000 kvapiek veľkosti nanolitrov, tzv. dropletov, je kľúčovým aspektom tejto metódy [25]. Nukleová kyselina je zaobalená do tzv. kvapky-generujúceho oleja a v každej jednotlivéj kvapke prebieha PCR amplifikácia (Obrázok 3). Ešte pred vytvorením kvapiek sa ddPCR reakcia pripraví podobným spôsobom ako reakcia RT-PCR, využívané sú hydrolyzačné sondy TaqMan značené reportérovými fluorofórmami FAM (modrá) a HEX/VIC (zelená) alebo interkalačným farbivom, ako je EvaGreen. Následne je každý „droplet“ analyzovaný samostatne, pomocou fluorescenčného detekčného systému (Obrázok 3).



Obrázok 3 Droplet digital PCR - spracovanie a analýza vzorky: a) rozdelenie vzorky nukleovej kyseliny na tisíce kvapiek veľkosti nanolitrov; b) každá kvapka je analyzovaná samostatne pomocou fluorescenčného detekčného systému [26]

Táto technika vyžaduje menšie vstupné množstvo DNA ako iné komerčne dostupné digitálne systémy PCR, čo znižuje náklady a zachováva cenné vzorky. Okrem detekcie metylačného statusu u tkanivových vzoriek (Obrázok 4), buniek a bunkových línií [27, 28, 29] je vďaka svojej citlivosti vhodná analytická metóda pre nízko koncentrované vzorky, napr. vzorky tekutej biopsie ako plazma (Obrázok 4) či stolica, kde je koncentrácia cirkulujúcej DNA veľmi nízka [28, 30, 31].



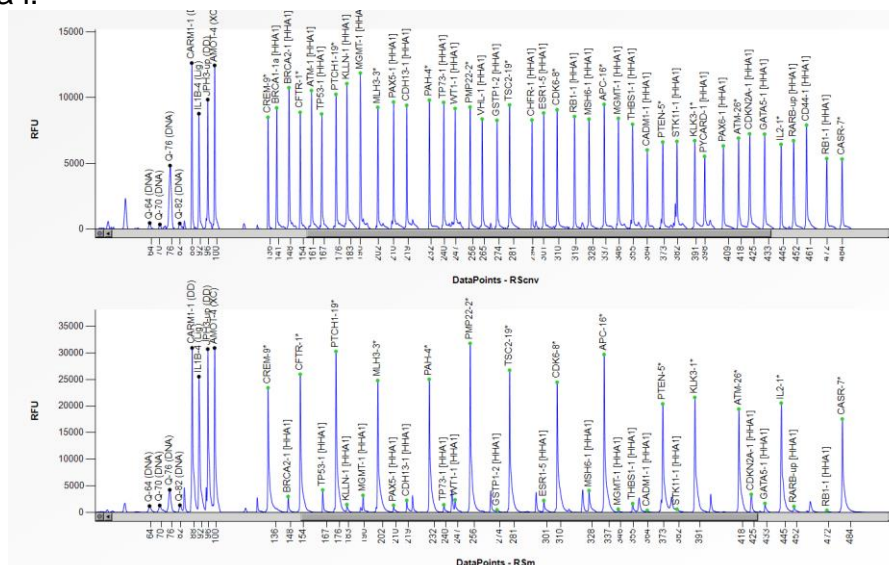
Obrázok 4 Výstupy z QuantaSoft™ softvéru: detekcia hypermetylácie génu GRIA4 u dvoch nezávislých pacientov s kolorektálnym karcinómom; a) nádorové tkanivo, b) plazma. Modré droplety obsahujú metylovanú DNA, nemetylovaná je zobrazená zelenou farbou. Oba typy, metylovaná i nemetylovaná, sa nachádzajú v oranžových dropletoch, tmavo sivé neobsahujú ani jeden templát

MS MLPA – Methylačne špecifická multiplexná amplifikácia závislá na ligácii sond

Táto metóda bola vyvinutá pod záštitou firmy MRC Holland, ktorá metódu opísala v roku 2002. V prípade tejto metodiky na detekciu metylačného statusu nie je potrebná

bisulfidová konverzia. Ide o semikvantitatívnu metódu pre analýzy vzoriek DNA či už z krvi pacienta, alebo tkaniva [32]. Výhodou MS MLPA je kombinácia detekcie metylačného statusu vzorky a tiež možnosť detekcie homozygotných alebo heterozygotných delécií a duplikácií (CNV- copy number variants). MLPA metodika má uplatnenie v nádorovej genetike, v prípade testovania somatických variantov, ako aj v zachytení predispozícií k nádorovým syndrómom pri germline testovaní (Prader-Willi syndróm,...) [33].

Princíp multiplexnej metódy spočíva v primárnej denaturácii malého množstva DNA (50ng) s následnou ligáciou prôb a niekoľkohodinovou hybridizáciou. Po hybridizácii je MS-MLPA reakcia rozdelená do dvoch skúmaviek, v jednej prebieha klasická MLPA pre detekciu CNV a druhá je inkubovaná s pridaním *HhaI* restriktívnej endonukleázy. V ďalšom kroku prebehne PCR amplifikácia s fluorescenčne značenými primermi a následná fragmentová analýza produktov. Vyhodnotenie výsledkov prebieha pomocou softvéru Coffalyser.Net (MRC holland, Holandsko). Pokiaľ štiepne miesto nie je metylované, endonukleáza poštiepi vzorku a PCR produkt nebude detegovaný (Obr.5). Naopak v prípade metylovanej vzorky je štiepne miesto pre endonukleázu chránené metylovou skupinou, k štiepeniu nedôjde a signál PCR produktu je zachytený. Analýza porovnáva vzorku oproti svojmu náprotivku z prvej reakcie (CNV) a tiež voči referenčnej vzorke [34]. Na našom pracovisku sa nám túto metodiku úspešne podarilo zaviesť pre detekciu CNV (*BRCA1,2*) ako aj metylačného statusu tumorsupresorových génov (*TP53*, *MGMT*, *APC*,...) mismatch repair génov (*MLH1*, *MSH2*,...) a i.



Obrázok 5 Kontrolná vzorka pred a po štiepení endonukleázou. Nemetylovaná vzorka po štiepení negeneruje signál. Použitý bol komerčný kit na detekciu metylácie 25 tumor.-supresor. génov

Iné možnosti detekcie metylácie

Okrem vyššie spomenutých metód detekcie zmien v metylačnom profile DNA (MSP, MLPA, pyrosekvenovanie a ddPCR) existujú iné prístupy molekulárnej biológie, ktoré sú využívané v experimentálnej ako aj v klinickej praxi. Naše pracovisko disponuje zariadeniami ako je RT PCR (ABI- 7500, BioRad CFX 96) prípadne sekvenátormi novej generácie (NGS) (NextSeq550Dx), prostredníctvom ktorých vieme detegovať zmeny na úrovni metylácie DNA. V prípade analýzy metylácie pomocou real-time PCR je podobne ako v predošlých prístupoch (okrem MS-MLPA) potrebné opracovanie DNA bisulfidom sodným. Tento metodický prístup je vhodný na detekcie metylácie DNA v nádorových tkanivách ako aj v plazme [35]. V prípade využitia NGS prístupov sú

k dispozícii komerčné panely ako je Infinium Methylation EPIC Array Scanning na analýzu viac ako 850 000 metylačných miest v genóme.

Záver

Zmeny v metylačnom statuse DNA (najmä promótorovej oblasti) sú asociované s iniciáciou, promóciou a progresiou nádorových ochorení. Metódy detekcie metylácie DNA predstavujú progresívnu oblasť molekulárnej medicíny a v súčasnosti zahrňujú rôzne metodické prístupy. Využitie metód molekulárnej biológie na analýzu zmien metylačného paternu DNA umožňuje identifikovať špecifické metylačné vzory a tým stanoviť prognózu a prípadne optimálnu terapiu ochorenia. Okrem metylačných zmien v nádorovom tkanive nám umožňujú tieto inovatívne prístupy molekulárnej biológie identifikovať zmeny DNA metylácie na úrovni cirkulujúcej DNA a tým redukovať potreby chirurgickej biopsie. V Martinskom centre pre biomedicínu sme za 7 rokov jeho existencie zaviedli a optimalizovali rôzne spôsoby detekcie metylačných zmien, analyzovaných priamo z nádorového tkaniva alebo s využitím tekutej biopsie. Nami vymenované metódy predstavujú sumár rôznych metodických prístupov, ktoré sa od seba líšia spôsobom detekcie, prístrojovým vybavením ako aj potrebou opracovania vstupnej DNA. Pri výbere vhodnej metódy je potrebné zvážiť charakter zvoleného experimentu a na základe toho realizovať semikvantitatívne alebo kvantitatívne metódy analýzy. Každá z vyššie definovaných metodík má svoje klady (nie je potrebné opracovanie DNA, relatívne lacná metóda), ale aj zápory (časová, technická a finančná náročnosť, následná analýza získaných dát). Technické vybavenie ako aj dlhoročné skúsenosti vedeckých pracovníkov Martinského centra pre biomedicínu umožňujú realizovať rôzne vedecko-výskumné spolupráce zamerané na detekciu zmien v metylácii DNA, nielen v prípade nádorových ochorení, ale aj v mnohých iných patologických stavoch, kde bola preukázaná asociácia so zmenou metylačného profilu.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Integrovaná stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života, kód ITMS: 313011V446, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Feng, *FEBS J.* **2022**, 289:1214-1239.
- [2] Lu, *Mol. Cancer.* **2020**, 19:79.
- [3] Kim, *Exp. Mol. Med.* **2017**, 49:e322.
- [4] Mikeska, *Genes (Basel).* **2014**, 5: 821-864.
- [5] Liang, *Nucleic Acids Res.* **2021**, 49:8556-8572.
- [6] Curradi, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22:3157-73.
- [7] Tian, *Front. Immunol.* **2021**, 12:761326.
- [8] Wei, *Sci. Rep.* **2021**, 11:16782.
- [9] Kerachian, *Sci. Rep.* **2020**, 10:2813.
- [10] Jensen, *Clin. Epigenetics.* **2019**, 11:158.
- [11] Locke, *Front. Genet.* **2019**, 10:1150.
- [12] Taryma-Leśniak, *Clin. Epigenetics.* **2020**, 12:100.
- [13] Martisova, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22:4247.
- [14] Kurdyukov, *Biology.* **2016**, 5:3.
- [15] Ku, *Epigenetics Protocols.* **2011**, 791:23-32.
- [16] Fneich, *Parasit. Vectors.* **2013**, 6(1):167.
- [17] Sestakova, *Biol. Proced. Online.* **2019**, 21(1):19.
- [18] Harrington, *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* **2013**, 137(9):1296-1303.
- [19] Fakruddin, *Int. J. Life Sci. Pharma. Res.* **2012**, 2(1):L-65.
- [20] Fakruddin, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* **2012**, 8(1):14-20.

- [21] Tsiatis, *The Journal of Molecular Diagnostics*. **2010**, 12(4):425-432.
- [22] Ronaghi, *Genome research*. **2001**, 11(1):3-11.
- [23] Li, *Methods Mol. Biol.* **2011**, 791:11-21.
- [24] Tost, *Nature protocols*. **2007**, 2(9):2265-2275.
- [25] Hindson, *Analytical chemistry*. **2011**, 83.22: 8604-8610.
- [26] Droplet Digital PCR (ddPCR) Technology, www.bio-rad.com; updated May 6. **2022**
- [27] Van Wesenbeeck, *Epigenetics*. **2018**, 13.3:207-213.
- [28] Yu, *Epigenetics*. **2015**, 10.9:803-809.
- [29] Fung, *Head & neck*. **2021**, 43.6:1812-1822.
- [30] Sato, *International journal of oncolog*. **2019**, 54.6:2139-2148.
- [31] Vega-Benedetti, *International journal of molecular sciences*. **2020**, 21.12:4494.
- [32] Nygren, *Nucleic Acid Res*. **2005**, 33(14):e128.
- [33] Moelans, *Methods In Molecular Biology*. **2018**, 537-549.
- [34] Gomes, *Pediatric Cancer Genetics*. **2018**, 47-64.
- [35] Aparicio, *Epigenetics*. **2009**, 4(3):176-184.

Význam splicingových variantov génu kmeňovosti a pluripotencie *POU5F1* v karcinogenéze

Túryová, E.¹, Lasabová, Z.¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav molekulovej biológie a genetiky
Turyova10@uniba.sk

Abstract

The gene *POU5F1* encode a well known transcription factor also called the OCT4, that belongs to the POU protein family. The OCT4 has a role in the cell pluripotency and is expressed in many stem-like cells, where regulates expression of the other genes. Through its DNA-binding domain, it binds to the octamer motif ATGCAAAT and can modulate expression of the genes which play a role in the maintaining pluripotency and block the differentiation of the cells. The *POU5F1* gene is composed of 5 exons that can create several isoforms by various mechanisms such as the alternative transcription initiation or the alternative splicing. There are clear evidences that the most famous isoform, called OCT4A is a factor of pluripotency and is expressed in various types of the stem cells. Other transcription variants, namely *OCT4B-OCT4B5*, *OCT4C-OCT4C1* and *OCT4D* was discovered recently and we still do not know if all of them also create a protein products. Nowadays we know that the *OCT4B* splicing variants have different properties and subcellular localization compared to the *OCT4A* isoform, so we can expect that their role in the cell is different. In last years, research groups started explore the role of the *OCT4* isoforms in the tumorigenesis, because of the stem cell theory of cancer. Many published results suggests that in the carcinoma cells is expression of the *OCT4* isoforms higher than in the adjacent non-cancerous tissue. This reveal its possible role in prediction of prognosis but it also suggests that it may be involved in tumorigenesis. There is no doubt that we need more information and more clear evidences on the role of the *OCT4* isoforms in the cells and in the tumorigenesis.

Keywords: *POU5F1*, OCT4 isoforms, alternative splicing, tumorigenesis

Úvod

Gén *POU5F1* kóduje proteín OCT4, ktorý v jadre buniek funguje ako transkripčný faktor a dokáže regulovať expresiu génov dôležitých pre udržiavanie fenotypu pluripotentných kmeňových buniek a to nie len v embryonálnych kmeňových bunkách (ESC) ale napríklad aj v embryonálnych nádorových kmeňových bunkách (ECC). Alternatívnym splicingom *POU5F1* mRNA však môžu vznikať viaceré splicingové varianty, ktoré sa líšia nie len funkciou, ale aj bunkovou lokalizáciou. V posledných rokoch bolo preukázané, že rôzne izoformy OCT4 sa môžu určitým spôsobom podieľať na procese tumorigenézy, ale aj to, že v budúcnosti môžu byť využívané ako markery na stanovenie prognózy ochorenia. Práve z tohto dôvodu je dôležité venovať im pozornosť a snažiť sa objasniť možnú úlohu jednotlivých izoform pri vzniku, ale aj progresii nádoru.

Transkripčný faktor OCT4 – produkt génu *POU5F1*

Transkripčný faktor OCT4 (octamer binding transcription factor 4) je kódovaný génom *POU5F1* (známy tiež ako *OCT3*, *OCT4*), ktorý je lokalizovaný na krátkom ramienku

6. chromozómu [1]. Podobne ako ostatné proteíny z POU proteínovej rodiny, obsahuje tzv. POU domény, prostredníctvom ktorých je schopný sa viazať na DNA a regulovať expresiu iných génov, ale aj interagovať s ďalšími transkripčnými faktormi a kofaktormi [2]. Ako už z celého názvu génu *OCT4* vyplýva, je schopný rozpoznávať a viazať sa na oktamérovú konsenzus sekvenciu ATGCAAAT na DNA [3]. Takýmto spôsobom je schopný ovplyvňovať expresiu génov, vďaka čomu funguje ako hlavný regulátor udržiavania pluripotencie, ale aj sebaobnovy kmeňových buniek. U človeka je *OCT4* exprimovaný v totipotentných a pluripotentných kmeňových bunkách počas všetkých štádií vývinu neoplozeného oocyta na blastocystu [4]. Správna a precízna expresia *OCT4* v kmeňových bunkách je veľmi dôležitá pre reguláciu exprese ďalších génov asociovaných s pluripotenciou a fenotypom kmeňových buniek, no zároveň aj represiou génov zapojených do procesu diferenciácie [5]. *OCT4* sa spolu so *SOX2* proteínom viažu na regulačné elementy viacerých génov a synergisticky ovplyvňujú ich expresiu. Ide napr. o gén fibroblastového rastového faktora *FGF4* [6], gén *NANOG* [7], ktorý je rovnako transkripčným faktorom dôležitým pre pluripotenciu buniek, ale aj *UTF1* [8]. *OCT4* a *SOX2* komplex sa dokonca viaže aj na regulačné elementy vlastných *OCT4* a *SOX2* génov, čím pozitívne regulujú vlastnú expresiu [9].

OCT4 transkripčný faktor bol prvý krát identifikovaný u myší. Schöler a kolektív identifikovali *OCT4* proteín v neoplozených oocytoch a ESC. Zaujímavým zistením bolo, že bol exprimovaný len maternálne, teda ocytmi, nie spermiami, čím sa preukázala jeho zárodočne špecifická expresia [10]. O rok neskôr sa podarilo Okamotovi a kolektívu *OCT4* identifikovať okrem myšacích EC aj v ECC. Na druhej strane, v tkanivách dospelých myší, ako je mozog, pečeň alebo svaly jeho expresia detegovaná nebola. Okrem identifikovania exprese autori zistili aj to, že po indukovaní diferenciácie týchto buniek kyselinou retinovou došlo k rapídному zníženiu jeho množstva [11]. Všetky tieto dôkazy naznačovali, že zohráva úlohu v skorom vývoji. Z dôvodu, že bol *OCT4* proteín identifikovaný v ESC odvodených z vnútornej bunkovej masy cicavčej blastocysty, ktoré sú pluripotentné, sa predpokladalo, že môže byť dôležitým faktorom pluripotencie buniek. Takahashi a Yamanaka preukázali, že *OCT4* je jedným zo 4 transkripčných faktorov, ktoré sú potrebné na reprogramovanie somatických buniek na pluripotentné bunky, čím sa im podarilo vôbec po prvý raz vytvoriť indukované pluripotentné kmeňové bunky [12][13]. Je teda jednoznačné, že úroveň exprese tohto proteínu sa môže medzi bunkami výrazne líšiť a na základe jeho množstva môže dochádzať ku zmene osudu bunky, čím sa tento proteín radí medzi dôležité molekulárne regulátory vývoja.

Transkripčné varianty génu *POU5F1*

POU5F1 gén je zložený z piatich exónov, ktoré môžu prostredníctvom mechanizmov ako je alternatívna iniciácia transkripcie alebo alternatívny splicing vytvárať viaceré transkripty, ktoré sa vo výsledku líšia nie len v sekvencii, ale majú aj rôznu funkciu a vnútrobunkovú lokalizáciu. Alternatívny splicing je proces, vďaka ktorému dokáže z jednej prekursorovej mRNA vzniknúť niekoľko typov maturovaných mRNA, ktoré sú následne translatované na proteíny, vďaka čomu teda môže z jedného génu vzniknúť hneď niekoľko proteínov. Alternatívny splicing bol prvý krát opísaný v roku 1978 Gilbertom a práve tento koncept umožnil vyriešiť záhadu medzi počtom proteín kódujúcich génov človeka (20 000-25 000) a výsledným počtom proteínov, ktorý je výrazne vyšší [14][15]. *OCT4* gén vytvára na úrovni RNA štyri kategórie variantov: *OCT4A*, *OCT4B*, *OCT4C* a *OCT4D*, z ktorých každý využíva unikátne miesto začiatku transkripcie, označované aj ako alternatívny promótor. Alternatívnym splicingom ďalej vznikajú podkategórie *OCT4B* a *OCT4C* transkriptov [16].

Objav jednotlivých variantov *OCT4* génu bol postupný a už v roku 1992 Takeda a kolektív [17] identifikovali druhú izoformu *OCT4B*. Atlasi a kolektív v roku 2008 pri experimente s dvoma známymi izoformami identifikovali nový splicingový variant a označili ho ako *OCT4B1*. Po osekvenovaní a zarovnaní voči ľudskému genómu autori prišli na to, že novo identifikovaný transkript má v sekvencii zachovanú sekvenciu intrónu 2 a následne ho označili ako exón 2b [18]. Na základe objavenia ďalšieho exónu sa dalo predpokladať, že počet identifikovaných splicingových variantov bude pribúdať. Ďalším identifikovaným bol *OCT4B2*, pri ktorom sekvenčné dáta potvrdili prítomnosť nekanonického splicingového miesta a tiež zachovanie časti intrónu 1 [19]. Rovnakí tím autorov identifikoval aj splicingové varianty *OCT4B3*, *OCT4B4* a *OCT4B5*. *OCT4B3* je veľmi podobný *OCT4B2* variantu, s výnimkou 207-nt dlhej sekvencie exónu 1b, ktorá mu chýba [20]. Izoforma *OCT4B4* je zas veľmi podobná *OCT4B* variantu a líši sa len 28-bp dlhou chýbajúcou časťou exónu 2b [21]. Podobne je to aj s *OCT4B5*, ktorý zdieľa podobnosť s *OCT4B*, no na rozdiel od neho má zachovaných len šesť nukleotidov exónu 2 [22]. V roku 2017 sa podarilo identifikovať ďalšie dve varianty-*OCT4C* a *OCT4C1*. V tomto prípade došlo aj ku identifikácii ďalšieho exónu označeného ako exón 0, ktorý je lokalizovaný cca 9kb upstream od exónu 1. *OCT4C* a *OCT4C1* sú sekvenčne takmer identické a medzi sebou sa líšia len v mieste začiatku a konca exónu 0 [23]. Na úrovni expresie génov teda bolo doposiaľ identifikovaných desať variantov *OCT4*, nie všetky však boli identifikované aj na úrovni proteínov. Príkladom sú aj transkripčné varianty *OCT4C*, *OCT4C1* a *OCT4D*, pri ktorých sa zatiaľ len predpokladá, že vytvárajú proteíny dlhé 164 aminokyselín, pretože žiadny z nich doposiaľ nebol identifikovaný [23].

Expresia *OCT4* variantov

Jednotlivé varianty *OCT4* génu môžu následne procesom translácie vytvárať rôzne druhy proteínov. Pre všetky proteíny kódované *OCT4* génom platí, že obsahujú N-transaktivačnú doménu, POU doménu a C-terminálnu homeodoménu. Ak sa v literatúre stretneme s proteínom *OCT4*, vo väčšine prípadov ide o izoformu *OCT4A*. Toto označenie sa používa z dôvodu, že je prvou identifikovanou a zároveň najznámejšou izoformou kódovanou *POU5F1* génom. *OCT4A* proteín je dlhý 360 aminokyselín a je exprimovaný v ES a EC bunkách, v nepluripotentných bunkových typoch však jeho expresia dokázaná zatiaľ nebola, čím sa potvrdzuje, že zohráva úlohu v pluripotencii buniek [18]. Druhý identifikovaný, *OCT4B* transkript, môže byť translatovaný na tri rôzne dlhé proteíny, konkrétne 265, 190 a 164 aminokyselín dlhé. To je umožnené vďaka mechanizmu alternatívnej translácie [24]. *OCT4A* a *OCT4B* izoformy zdieľajú rovnakú POU doménu a C-terminálnu doménu, avšak líšia sa na N-konci. Pri *OCT4B* izoforme má N-terminálna doména inhibičný efekt na DNA-väzbovú doménu v dôsledku čoho táto izoforma nedokáže stimulovať transkripciu z *OCT4* závislých promótorov a to ani pri jeho nadexpresii [25]. Práve z dôvodu, že *OCT4B* izoforma nemá schopnosť viazať sa na DNA zostávala jej úloha neznáma. Ďalším rozdielom medzi *OCT4A* a *OCT4B* je ich vnútrobunková lokalizácia. *OCT4A* izoforma je lokalizovaná primárne v jadre bunky, kde plní svoju úlohu transkripčného faktora. Na druhej strane, *OCT4B* proteín je lokalizovaný najmä v cytoplazme buniek [26]. Atlasi a kolektív [18] imunohistochemickým farbením zistili, že podobne ako *OCT4A* aj *OCT4B1* izoforma je v ES a EC bunkách vysoko exprimovaná a rovnako dochádza ku prudkému zníženiu expresie v prípade indukcie diferenciácie buniek kyselinou retinovou. V prípade *OCT4B* boli v ESC a ECC zaznamenané len malé množstvá, avšak jeho expresia bola vyššia v somatických bunkách. Na základe tohto teda môžeme tvrdiť, že *OCT4B1* izoforma je vlastnosťami podobnejšia *OCT4A* variantu

[18]. V prípade OCT4B2 izoformy bola expresia potvrdená v rôznych typoch ľudských buniek vrátane pluripotentných kmeňových buniek a viacerých nádorových bunkových línii. Rovnako ako v predchádzajúcich prípadoch bola expresia tejto izoformy po indukcií diferenciácie redukovaná [19]. Autori sa v článku zamerali aj na sledovanie zmeny expresie OCT4B izoforiem po vystavení buniek teplotnému stresu. Zaujímavým zistením bolo, že expresia všetkých troch izoforiem, OCT4B, OCT4B1 aj OCT4B2, bola po vystavení teplotnému šoku zvýšená. Dôvodom môže byť to, že teplotný stres dokáže ovplyvniť promótor týchto izoforiem a spôsobiť expresiu variantov skupiny B [19]. V prípade izoformy OCT4B3 bola potvrdená expresia len v niektorých nádorových bunkových líniiach a to v bunkovej línii nádoru močového mechúra a astrocytému. Existuje predpoklad, že OCT4B3 vzniká z OCT4B2 izoformy splicingom, avšak len za určitých konkrétnych podmienok. Tie nie sú vo všetkých bunkových líniiach rovnaké a preto je jeho expresia špecifická len pre niektoré z nich [20]. Poslednými identifikovanými izoformami sú OCT4B4 a OCT4B5, ktoré sú vo veľkých množstvách exprimované v ESC a ECC a podobne ako v iných prípadoch sa ich množstvo v diferencovaných bunkách znižuje [21][22]. V porovnaní s OCT4A, je zníženie množstva OCT4B5 transkriptu po indukcií diferenciácie pomalšie, čo však zatiaľ nemá jasný význam [22]. Hoci množstvo identifikovaných splicingových variánt génu *POU5F1* stále rastie, o jednotlivých izoformách nemáme dostatok informácií. V prvom prípade sa vždy skúma expresia v rôznych typoch buniek na základe informácií o už identifikovaných variantoch. Stále však zostáva nejasné, prečo niektoré bunky exprimujú konkrétne izoformy a akú úlohu v nich tieto izoformy plnia.

Úloha OCT4 proteínov v karcinogéze

V súčasnosti existuje čoraz viac dôkazov, že vo väčšine zhubných nádorov existuje minoritná skupina buniek, ktoré majú vlastnosti kmeňových buniek. Ide o tzv. teóriu kmeňových buniek v karcinogéze, ktorá popisuje nádorové kmeňové bunky schopné indukovať tumorigenézu a rast nádoru pretože majú vlastnosti neobmedzenej sebaobnovy, sú rezistentné na chemoterapiu a rádioterapiu a môžu z nich vznikáť ďalšie progenitorové bunky schopné ďalej diferencovať [27]. Existuje viacero teórií, ktoré hovoria, ako takéto nádorové kmeňové bunky vznikajú a možnosti nevylučujú ani ich vznik zo somatických buniek v dôsledku mutácie, ktorá aktivuje gény zodpovedné za typický fenotyp kmeňových buniek. Do skupiny týchto génov patrí aj *POU5F1*, konkrétne *OCT4A* izoforma exprimovaná v kmeňových bunkách a zodpovedná za schopnosť ich sebaobnovy [25]. Aj toto bol dôvod, prečo sa viaceré výskumné skupiny zamerali na stanovenie úrovne expresie tohto génu vo viacerých typoch nádorov. V roku 2011 Liu a kolektív [28] skúmali expresiu viacerých génov, vrátane *OCT4*, v subpopulácií buniek nádoru prsníka, ktoré vykazovali vlastnosti kmeňových, resp. progenitorových buniek. Zaujímavým zistením bolo, že expresia *OCT4* súvisela s histologickým typom, stavom lymfatických uzlín, ale aj molekulárnym typom nádoru, no tiež to, že prípady s vysoko exprimovaným proteínom OCT4 mali signifikantne horšie pooperačné prežívanie ako prípady s nízkou, resp. nulovou expresiou [28]. Prediktívnu hodnotu OCT4 pri rakovine prsníka navrhli aj Cai a kolektív [29], ktorí zistili, že úroveň expresie *POU5F1* je významne asociovaná s metastázovaním, vďaka čomu sa môže stať potenciálnym kandidátom pre jeho predikciu [29]. Podobne to je aj v prípade kolorektálneho karcinómu, kedy pacienti s vysokou expresiou *POU5F1* mali signifikantne horšiu prognózu než tí s nízkou expresiou [30]. V súvislosti s kolorektálnym karcinómom bola sledovaná aj expresia *OCT4B* izoforiem. V tomto prípade sa ukázalo, že expresia *OCT4B1* mRNA korelovala so stupňom diferenciácie tumoru, pričom platilo, že zle a stredne diferencované tkanivá karcinómu vykazovali

najvyššiu úroveň expresie *OCT4B1*. Autori tiež zistili, že expresia korelovala so štádiom ochorenia, to znamená, že spolu s progresiou štádia nádoru rástla aj expresia *OCT4*. To môže značiť, že rozvinutie malignity súvisí so zvýšeným počtom kmeňových buniek v nádore [31]. Podobný trend, teda koreláciu zvýšenej expresie *OCT4* s progresiou tumoru a horším prežívaním, bol pozorovaný aj pri rakovine močového mechúra, krčka maternice, ale aj rakovine pankreasu [32][33][34]. Li a kolektív [35] zistili, že zvýšená expresia *OCT4B* významne zvyšovala rast buniek nádoru krčka maternice, čo naznačuje jeho úlohu v bunkovej proliferácii a tumorigenéze a to prostredníctvom znižovania podielu apoptických buniek, teda anti-apoptickou aktivitou [35]. Tieto výsledky naznačujú, že *OCT4* môže byť sľubným markerom na predikciu prognózy, no aj to, že spolu s inými génmi môže byť súčasťou procesu tumorigenézy.

Záver

V tomto momente nie je jednoznačné, akým spôsobom, a či vôbec v tomto procese zohráva gén *POU5F1* úlohu. Je to najmä z dôvodu, že ani o najznámejšej a najviac študovanej izoforme *OCT4A* nemáme dostatok informácií. Rovnako sa však v tomto procese môžu uplatňovať aj ostatné, menej známe izoformy. Dôkazom je štúdia, ktorá naznačuje úlohu a význam *OCT4B1* variantu. Na základe toho, čo už o géne, resp. génových produktoch *POU5F1* vieme, ale aj toho čo ešte nevieme, je jasné, že je potrebné venovať mu dostatočnú pozornosť aj v budúcnosti.

Práca bola podporená grantami VEGA č. 1/0269/22, APVV-16-0066 a LISPER (Integratívna stratégia v rozvoji personalizovanej medicíny vybraných zhubných nádorových ochorení nádorových ochorení a jej vplyv na kvalitu života), podporovaný zo zdrojov EÚ.

Literatúra

- [1] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5460>; updated April 24. **2022**
- [2] Zhao, *Front Biosci.* **2013**, 18: 1051–1071.
- [3] Verrijzer, *EMBO J.* **1992**, 11:4993-5003.
- [4] Wu and Schöler, *Cell Regen.* **2014**, doi:10.1186/2045-9769-3-7
- [5] Shi and Jin, *Stem cell res. Ther.* **2010**, 1:39-47.
- [6] Ambrosetti and Dailey, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17:6321-6329.
- [7] Rodda, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280:24731-24737.
- [8] Nishimoto, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, 19:5453-5465.
- [9] Chew, *Mol. Cell. Biol.* **2005**, 25:6031-6046.
- [10] Schöler, *EMBO J.* **1989**, 8:2543-2550.
- [11] Okamoto, *Cell.* **1990**, 60:461-472.
- [12] Takahashi and Yamanaka, *Cell.* **2006**, 126:663-676.
- [13] Kim, *Exp. Mol. Med.* **2021**, 53:1018-1028.
- [14] Gilbert, *Nature.* **1978**, 271:501.
- [15] International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature.* **2004**, 431:931-945.
- [16] Mehravar and Poursani, *Stem Cell Rev. Rep.* **2021**, 17:1068-1073.
- [17] Takeda, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20:4613-4620.
- [18] Atlasi, *Stem Cells.* **2008**, 26:3068-3074.
- [19] Poursani, *Tumour Biol.* **2017**, 39:1010428317724280.
- [20] Poursani, *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **2017**, 9:142-145.
- [21] Poursani, *Gene.* **2017**, 627:369-372.
- [22] Mehravar and Poursani, *Stem Cell Rev. Rep.* **2021**, 17:1068-1073.
- [23] Malakootian, *Eur. J. Cell. Biol.* **2017**, 96:347-355.
- [24] Wang, *Stem Cells.* **2009**, 21:1265-1275.
- [25] Lee, *J. Biol. Chem.* **2006**, 381:33554-33565.
- [26] Cauffman, *Stem Cells.* **2006**, 24:2685-2691.
- [27] O'Flaherty, *J. Thorac. Oncol.* **2012**, 7:1880-1890.
- [28] Liu, *Ann. Surg.* **2011**, 253:1165-1171.

- [29] Cai, *BMC Cancer*. **2016**. 16:175.
- [30] Miyoshi, *Surg. Today*. **2018**. 48:709-715.
- [31] Gazouli, *Mol. Carcinog*. **2012**, 51:165-173.
- [32] Chang, *Cancer Res*. **2008**, 68:6281-6291.
- [33] Kim, *BMC Cancer*. **2015**, 15:1015.
- [34] Lu, *Cancer Lett*. **2013**, 340:113-123.
- [35] Li, *PLoS One*. **2015**, 10:e0118033.

Liquid prostate biopsy

Dušenka, R.^{1,2}, Dušenková, S.², Slávik, P.³, Švihra ml.^{1,2}, Kliment, ml., J.², Eliáš, B.²

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

Abstract

Prostate cancer (PCa) being a heterogenous disease with various clinical outcomes, comes to the fourth leading causes of cancer-related deaths in men worldwide. Liquid biopsy represents a less-invasive method to detect cancer. It has emerged as a candidate to substitute an invasive tissue biopsy for more frequent and accurate sampling of cancer to enable precision medicine for each individual. Circulating tumor cells (CTCs), circulating tumor DNA (ctDNA), cfDNA, cfRNA and extracellular vesicles (Evs) found in the bloody fluids reflecting cancer-related status with having its unique characteristics to potentially aid cancer management. Although the detection rate of ctDNA is low in localized PCa, the presence of ctDNA may indicate that the disease will progress more rapidly. Detection rate of ctDNA is low in localized PCa, the presence of ctDNA may indicate that the disease will progress more rapidly. CfRNA is a potential biomarker for the detection and characterization of aggressive PCa. Urinary exosomal assay may identify aggressive PC in patients within the PSA gray zone at the initial biopsy and thus avoids missed diagnosis of advanced PCa in patients within the PSA gray zone. In summary, multiparametric liquid biopsy analysis provides more comprehensive information for diagnosis, prognosis, and clinical decision-making in PCa,

Keywords: prostate cancer, liquid biopsy, cancer cells, precision medicine

Introduction

Prostate cancer (PCa) being a heterogenous disease with various clinical outcomes, comes to the fourth leading causes of cancer-related deaths in men worldwide making it the second most common cancer to be diagnosed in men worldwide[1]. Most of the PCa cases are detected at their indolent course of a disease [2]. Prostate cancer is classified as localised, locally advanced or metastatic disease. Localised PCa is further subdivided into risk groups based on prostate-specific antigen (PSA) level, International Society of Urological Pathology (ISUP) grade/ Gleason score (GS) and clinical TNM stage [3]. Even though, the prostate specific antigen (PSA) has a low accuracy, with a high rate of false-negative and false-positive results, PSA still remain as the gold standard biomarker for the clinical management of PCa. Elevated serum PSA levels need a confirmation through histopatological examination of a prostate biopsy from the patient. Based on the proper classification of the disease, an appropriate treatment option can offered to the patient. In general, low-risk patients are offered active surveillance (AS) and intermediate-risk patients are treated by radical prostatectomy (RP) or curative radiotherapy (RaT) [4]. High-risk patients are treated with RP with extended lymph-node dissection or RT in combination with long-term androgen-deprivation therapy (ADT). Overdiagnosis and subsequent overtreatment became an issue in the PCa patients. The inevitable search for biomarkers that could

discriminate indolent localised PCa which is followed by AS from aggressive localised PCa that needs radical treatment was intensified. In an attempt to find a more effective and less invasive clinical tool for PCa, researchers from all over the world are developing new strategies based on liquid biopsies from blood, urine, seminal fluid and stool (Figure 1).

Liquid biopsy

The liquid biopsy was first applied in 1869 by the pathologist Thomas Ashworth, who showed the existence of circulating tumor cells (CTCs) in the blood of a patient with metastatic cancer [5]. Tumor cell masses, as well as normal tissues, shed components such as whole cells known as CTCs, cell-free nucleic acids (cf-nucleic acids) and extracellular vesicles (EVs), which end up in the bloodstream or other body fluids depending on their place of origin. These tumor components are targets of biomarker search that provide additional and complementary information to the PSA and improve the accuracy in cancer diagnosis, monitoring of the disease status, treatment response and provide personalized treatment approach [6]. Liquid biopsy represents a less-invasive method to detect cancer. It has emerged as a candidate to substitute an invasive tissue biopsy for more frequent and accurate sampling of cancer to enable precision medicine for each individual. Circulating tumor cells (CTCs) are cancer cells that are shed from tumors (primary and/ or metastatic) into the vasculature. Extracellular vesicles (EVs) are nano-sized vesicles, including exosomes and microvesicles, that play a role in intercellular communication through their molecular cargo (proteins, mRNA, microRNAs (miRNAs), and DNA). Circulating tumor DNA (ctDNA) is tumor-derived, short, fragmented DNA found in the bloodstream, reflecting cancer-related genetic changes. Each of these circulating biomarkers has unique characteristics to potentially aid cancer management (Fig. 1) [7].

Circulating tumor cells (CTCs) in PCa

CTCs are rare cells from primary and metastatic tumors that circulate throughout the body to form metastatic foci in other tissues. These cells are detectable in cancer patients while they are undetectable in healthy individuals. CTCs are released into blood, but CTCs from PCa can be also found with a high probability in urine, seminal fluid or stool because of their organ of origin. Nucleic acids contained in CTCs, which allow monitoring epigenetic and genetic alterations, proteins expressed on the surface or inside CTCs, as well as the number of these CTCs are potential cancer biomarkers. There are two major types of CTC enrichment: epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)-dependent and EpCAM-independent assays. However, the EpCAM-based platform misses a subgroup of CTCs undergoing epithelial-mesenchymal transition (EMT) [8]. It is crucial to capture these CTCs because they are more aggressive and promote the invasion and metastasis of PCa [9]. Due to the limitations of the EpCAM-dependent assays, many EpCAM-independent assays have been developed, such as the AdnaTest platform and the Epic Science platform. These two assays and the CellSearch system remain the most used technologies in CTC-related clinical trials. The AdnaTest performs immune-magnetic-based enrichment of CTCs and detects PCa-related mRNA of selected cells by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). This technology is widely used for the analysis of the expression status of the androgen receptor (AR) splice variant (AR-V) mRNA of CTCs. Epic Science, an imaging-based system independent of EpCAM, allows downstream genetic and protein analyses; after label-based enrichment, CTCs are identified as 4,6-diamidino-2-phenylindole_b, CD45_b, and cytokeratin_b (CK_b) cells [10]. In addition to

label-based separation, label-free technologies based on particular physical traits of CTCs have been developed, such as microfluidic technologies and size-based methods with high throughput.

Cell-free nucleic acids in PCa

Cf-nucleic acids are cell-free circulating DNA or RNA fragments released after the lysis of apoptotic or necrotic cells. In patients with PCa, cell-free DNA (cf-DNA) in blood is detectable in higher levels when compared to control individuals; with a sensitivity and specificity of 80% and 82%, respectively. Furthermore, more than 50% of blood samples and over 70% of urine samples from PCa patients showed alterations on cell-free DNA that may be used as PCa biomarkers [11].

Cell-free DNAs (cfDNA) in PCa

Cell-free DNA (CfDNA) in the bloodstream is composed of tumor-derived DNA and normal DNA, which mainly emanates from leukocytes. CfDNA is released by cells undergoing necrosis or apoptosis, or is actively secreted by viable cells as 150–200 base-pair fragments [12]. Circulating tumor DNA (ctDNA) originates from primary tumors and metastatic tumors, ctDNA analysis detects and analyzes tumor genomes and epigenomes. The half-life of cfDNA ranges from several minutes to several hours, providing an opportunity for real-time monitoring. Variable, such as extraction procedure itself may influence cfDNA yields efficacy and it can vary greatly with different extraction procedures. There are two types of assays available: PCR-based methods and target next-generation sequencing (NGS) assays [13]. PCR-based methods are attractive for the clinic because of their low cost, ease of performance, and data analysis, but are restricted to known genetic changes [14]. NGS is exploratory, offers broader coverage, and may uncover multiple genetic aberrations; however, this method is time-consuming and requires powerful bioinformatics analysis. Quantification of cfDNA concentration and tumor fraction may serve as prognostic biomarkers in PCa. During cancer progression, the ctDNA and cfDNA concentrations increase; the cfDNA concentration and fraction of ctDNA in cancer patients are significantly higher than those in healthy individuals and are associated with poor prognosis of overall surveillance in PCa [15].

Although the detection rate of ctDNA is low in localized PCa, the presence of ctDNA may indicate that the disease will progress more rapidly.

Cell-free RNAs in PCa

Noncoding RNAs, such as long noncoding RNAs and microRNAs (miRNAs) are responsible for the post-transcriptional regulation of gene expression. Noncoding RNAs play crucial roles in oncogenesis and metastasis, rendering the characterization of cell-free RNAs (cfRNA) as a target that carries transcriptomic information of cancer cells. The value of noncoding RNAs and tumor-derived messenger RNAs (mRNAs) has been proven as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in PCa [16]. In general, the analytical technologies for the detection and analysis of cfRNA include RT-PCR approaches, microarray analysis, and NGS-based technologies. In contrast to whole-transcriptome NGS-based technologies, PCR-based approaches and microarray analyses are restricted to known genetic changes; however, NGS-based technologies require complex bioinformatics analyses. A comprehensive microarray profiling of circulating miRNAs indicates that dysregulated expression of circulating miRNAs aids in the identification of patients with PCa. A combined analysis of miR-17-

3p and miR-1185-2-3p results in a sensitivity of 91% and specificity of 97% [17]. Additionally, five circulating miRNA pairs achieve higher sensitivity (99%) and specificity (100%), which is beneficial for the early diagnosis of PCa [18]. Apart from the early detection of aggressive PCa, plasma miRNAs are capable of improving risk stratification. *Al-Qatati et al.* have shown that the upregulation of plasma miR-148a, miR-16, and miR-195 helps to distinguish between high-risk and immediate-risk patients [19]. In addition to CTC-based technology, cfRNA detects AR-V7 transcripts using droplet digital PCR or RT-PCR in whole blood, which are also associated with resistance to ARSIs in patients with mCRPC.

CfRNA is a potential biomarker for the detection and characterization of aggressive PCa.

Extracellular vesicles (EVs) in PCa

EVs are lipid bilayer-delimited particles, including exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies, which play important roles in the mediation of cell-to-cell communication and interaction between PCa cells and their adjacent stromal cells. Exosomes are small vesicles with sizes ranging from 30 to 100 nm that originate from the exocytosis of multivesicular bodies. Microvesicles, also called ectosomes, bud from the plasma membrane with a size ranging from 100 to 1000 nm, and apoptotic bodies are derived from cell lysis with sizes of 0.5–5 μ m [20]. Because of their protective membranes, EVs stably carry and deliver active biological molecules, such as DNA, RNA, proteins, and lipids, exchange genetic materials to target cells, and modify the microenvironment to facilitate tumorigenesis, metastasis, and invasion. Potential applications of EVs is in diagnostic, prognostic, and therapeutic strategies of PCa [21]. A combination of urinary exosomal assay and standard of care (PSA level, age, race, and family history) is able to distinguish patients with PCa with a grade group (GG) 2 from those with GG1, avoiding 26% of unnecessary tissue biopsies. Only 7% of patients with GG 2 tumors are missed [22].

A urinary exosomal assay may identify aggressive PC in patients within the PSA gray zone at the initial biopsy [102] and thus avoids the 30% missed diagnosis of advanced PCa in patients within the PSA gray zone [23].

Conclusion

Liquid biopsy, a non-invasive strategy, provides an opportunity to comprehensively evaluate genomic, transcriptomic, and epigenomic alterations of primary and metastatic tumors in real-time. Current strategies for liquid biopsy include CTC-based, cfDNA-based, cfRNA-based, and EV-based assays, allowing the analysis of germline and somatic mutations, dysregulated gene expression, and signaling pathways. Comprehensive evaluation of heterogeneity and subclonal evolution through the integration of multiple liquid biopsies may direct individualized therapeutic options. In summary, multiparametric liquid biopsy analysis provides more comprehensive information for diagnosis, prognosis, and clinical decision-making in PCa, showing that only 13.8% of somatic single nucleotide variants are shared by CTCs and matched plasma cfDNA, indicating that data derived using only one liquid biopsy strategy is insufficient [24].

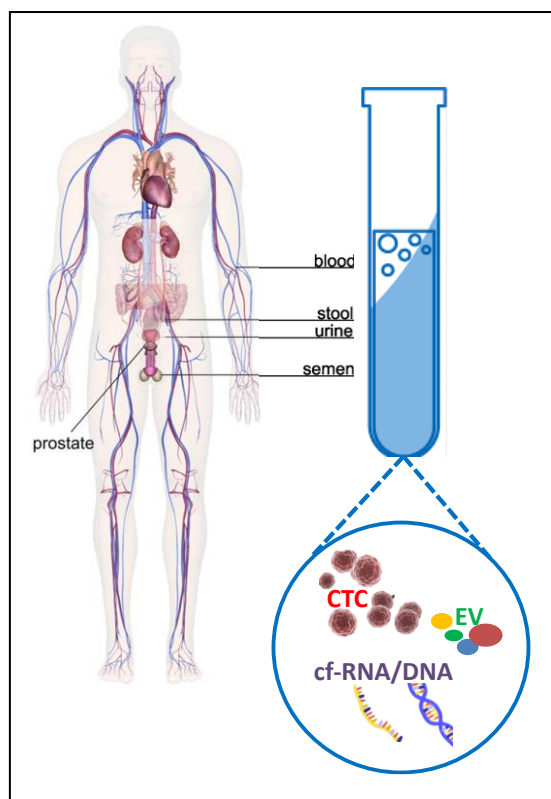


Figure 1 Fluids access and targets of potential liquid biopsies in prostate cancer (CTC-circulating tumor cells; cf-cell-free nucleic acids; EV-extracellular vesicles)

Table 1 Schematic profiling of liquid biopsies and applications in PCa (PCa-prostate cancer; CTC-circulating tumor cell; cfDNA-cell-free DNA; cfRNA-cell-free RNA; EVs-extracellular vesicles)

Body fluids (urine, blood)	CTCs cf-DNA cf-RNA EVs	Early diagnosis	CTC enumeration RNA and EVs analysis
		Prognosis of survival	CTC enumeration cf-DNA concentration cf-DNA fraction
		Treatment efficacy	Dynamic changes of CTC count
		Resistance mechanisms	Genomic analysis Transcriptomic analysis Epigenomic analysis CTC phenotypic analysis

References

- [1] Sung, *Cancer J. Clin.* **2021**, 1-41.
- [2] Siegel, *Cancer J. Clin.* **2020**, 70:7-30.
- [3] Egevad, *APMIS*. **2016**, 124:433-5.
- [4] D'Amico, *Cancer*. **2002**, 95:281-6.
- [5] Ashworth, *Austral. Med. J.* **1869**, 14:146-147.
- [6] Pal, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2021**, 18:454-467.

- [7] Liu, *Front. Oncol.* **2020**, 10:572-895.
- [8] Miller, *J. Oncol.* **2010**, 2010:617421-617428.
- [9] Ye, *BJU Int.* **2018**, 124:258-267.
- [11] Werner, *J. Circ. Biomark.* **2015**, 4:3.
- [12] Meddeb, *Sci. Rep.* **2019**, 9:5220.
- [13] Oxnard, *JAMA Oncol.* **2017**, 3:740-741.
- [14] Postel, *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **2018**, 18:7-17.
- [15] Choudhury, *JCI Insight.* **2018**, 3:122109.
- [16] Endzelin, *Mol. Cancer.* **2016**, 15:41.
- [17] Urabe, *Clin. Cancer Res.* **2019**, 25:3016-3025.
- [18] Liu, *Bioinform.* **2020**, 22:111.
- [19] Al-Qatati, *Int. J. Cancer.* **2017**, 141:1231-1239.
- [20] Mathieu, *Nat. Cell. Biol.* **2019** 21:9-17.
- [21] Bhagirath, *Cancer Res.* **2018**, 78:1833-1844.
- [22] McKiernan, *Eur. Urol.* **2018**, 74:731-738.
- [23] Tutrone, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2020**, 23:607-614.
- [24] Hodara, *JCI Insight.* **2019**, 4:125529.

Multiparametric magnetic resonance imaging in prostate cancer

Dušenka, R.^{1,2,3}, Dušenková, S.², Eliáš, B.², Jerga, T.^{2,3}, Švihra, ml., J.^{1,2}, Kliment, ml., J.², Ľupták, J.^{1,2}

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, Klinika chirurgie, Ružomberok
rdusenka@gmail.com

Abstract

Prostate cancer (PCa) is the most common solid organ malignancy among men worldwide. PCa is discovered by an abnormal digital rectal exam (DRE) and/ or elevated serum prostate-specific antigen (PSA) followed by random transrectal ultrasound (TRUS) guided biopsy. Anatomically, the central zone prostate cancers account only for 0.5–2.5% of all PCa, they tend to have a higher Gleason grade, and more likely to invade the seminal vesicles, and have extracapsular extension. Multiparametric MRI (mpMRI) has emerged as a promising imaging tool for assessment of the prostate, allowing clinicians to localize possible cancerous lesions. mpMRI tends to detect clinically significant cancers while not detecting small, insignificant tumors. Multiparametric MRI of the prostate is comprised of four key sequences: T1-weighted (T1W), T2W, diffusion-weighted imaging (DWI), and dynamic contrast-enhanced MRI imaging (DCE). T1W and T2W are generally considered “anatomic” and DWI and DCE are generally considered “functional”. It has been shown that with the sectoral map and new scoring system in PI-RADS™v2 that integrated standard use with recommendations of the guidelines, the prostatic lesions became more understandable with better localization in MRI reports. The goal of mpMRI is to provide a non-invasive method of screening, assessing, and treating clinically significant cancers, as well as to identify patients who would benefit from active surveillance.

Keywords: prostate cancer, cancer cells, precision medicine, multiparametric magnetic resonance imaging

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most common solid organ malignancy among men worldwide [1]. PCa is discovered by an abnormal digital rectal exam (DRE) and/ or elevated serum prostate-specific antigen (PSA) followed by random transrectal ultrasound (TRUS) guided biopsy, usually obtained with 8-12 core needle samples. The combination of PSA screening and TRUS guided biopsy can lead to overdiagnosis and overtreatment of indolent cancers. Systematic biopsies can easily miss or under-grade aggressive lesions that lie outside of the standard 12-core template. One must be careful in diagnosing PCa and be cautious in overdiagnose low-risk disease and underdiagnose high-risk disease [2]. The evidence regarding the benefit of population-based serum PSA screening for prostate cancer is contradictory [3].

Anatomy of prostate

Central zone (CZ)

The prostate zonal anatomy is based on the classical work done by McNeal, who proposed different prostate „zones“ based on anatomic location, histologic and

embryologic features [4]. Anatomically, the seminal vesicles are located posterosuperiorly and drain into the mid prostatic urethra via the ejaculatory ducts in the region of the verumontanum. The central zone surrounds the ejaculatory ducts and is located posterior to the transition zone and the urethra proximal to the verumontanum [5]. Typically, the central zone (CZ) is symmetric, homogenous, low signal on T2WI, has low uniform ADC. It does not show focal early enhancement on DCE-MRI. However, the apparent diffusion coefficient (ADC) of benign CZ is lower than the ADC of other zones of the prostate and has overlap even with significant PCa. On DCE-MRI, the normal CZ has a progressive (type 1) or plateau (type 2) enhancement curve. DCE-MRI and symmetric appearances at expected location are the key features differentiating normal CZ from cancer. With age, the CZ undergoes distortion with hypertrophy of the transition zone (TZ) from prostatic hyperplasia, the CZ is compressed and displaced towards the base of the prostate gland [6]. While central zone cancers account only for 0.5–2.5% of all PCa, they tend to have a higher Gleason grade, and more likely to invade the seminal vesicles, and have extracapsular extension. They are also prone to biochemical recurrence after prostatectomy [7]. Uneven hypertrophy of the TZ can cause asymmetric displacement of the CZ which can be seen as an area of focal signal abnormality near the peripheral zone (PZ) and present as a pseudolesion (asymmetric CZ). The asymmetric CZ will have a benign enhancement curve on DCE-MRI. The use of coronal and sagittal planes can be useful to demonstrate continuity and symmetry of the CZ.

Anterior fibromuscular stroma (AFMS)

The anterior fibromuscular stroma (AFMS) is a band of fibromuscular tissue that forms the anterior surface of the prostate, and is located anterior to the transition zone. It is composed of connective tissue, smooth muscle, and some skeletal muscle. It extends from the apex to the base of the prostate. The prostate capsule blends with the AFMS and in the majority of cases (89%), the AFMS forms the only anterior covering of the prostate. Laterally, the AFMS fuses with the lateral pelvic fascia and covers outermost regions of the lateral and anterior surfaces of the prostate in the majority of cases (85%) [8]. AFMS has low signal on T2WI with low ADC values and therefore, can obscure an anterior tumor or mimic PCa when asymmetric. Normal AFMS has a benign progressive (type 1) curve at DCE [9]. Symmetric appearance and DCE-MRI characteristics are helpful in differentiating AFMS from anterior cancer. Anterior cancers account for about 20% of all PCa and tend to have higher rates of extracapsular extension [10]. Most anterior tumors are located in the anterior third and inferior half of the TZ or in the AFMS. In contrast to AFMS, anterior tumors are asymmetric and have a washout (type-3) enhancement curve with earlier enhancement than normal AFMS. The consultation of T2W images in coronal and sagittal planes can confirm the continuity of the hypertrophic anterior fibromuscular stroma with the benign tissue [11].

Periprostatic venous plexus

The prostate is drained by the periprostatic venous plexus that lies along the posterolateral aspect of the gland. This plexus then communicates with the dorsal venous plexus (Santorini) and hemorrhoidal venous plexus posteriorly to drain into the internal iliac vein [12]. The periprostatic veins are tubular structures and can be hypointense on T2W and ADC depending on blood flow velocity and turbulence. Veins close to the peripheral zone may be mistaken for a peripheral zone PCa particularly in areas where the prostatic pseudocapsule is indistinct [13]. The periprostatic draining

veins mostly enhance on DCE-MRI (venous plexus with low ADC). Following the veins as tubular structures on multiple planes and recognizing, the prostate boundary will help the reader identify the plexus. Layering signal intensities within the thrombosed or slow flowing vessels can be seen on DWI/ ADC and T2W images. This feature can help to identify a vein of the periprostatic plexus. A hyperintense rim around the periprostatic venous plexus can be seen on T2W images (coronal view) [14].

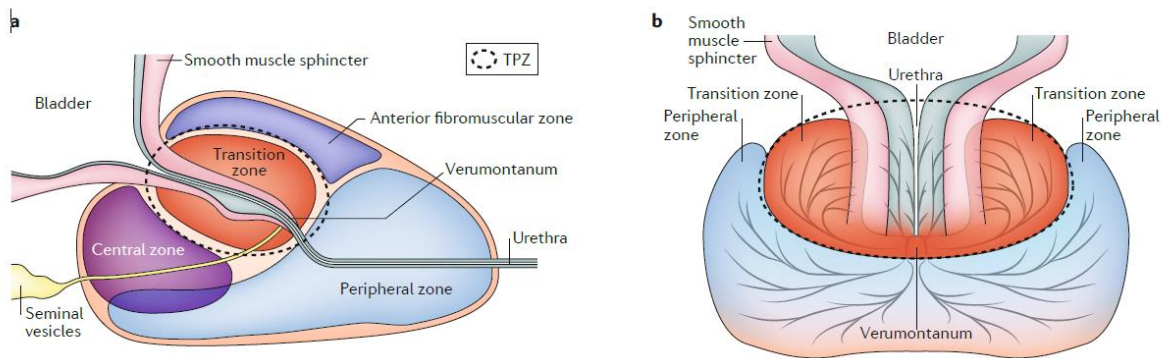


Figure 1 The anatomy of the prostate (a and b) [15]

Diagnosis of prostate cancer

Diagnosis of PCa is determined by histopathology of the biopsy taken in case of clinical suspicion, elevated prostate specific antigen (PSA) levels, and/ or abnormal digital rectal examination (DRE). Many strategies for prostate biopsy have been described, and the gold standard remains to be the 8-12 core scheme with the guidance of transrectal ultrasound (TRUS) guidance, *Hodge et al.* [16]. However, 12-core TRUS biopsy has its challenges due to the limitations of prostate ultrasound resolution of early tumors, and 20-25% of frequently multifocal samples represent undersampling [17]. Samples made from standard TRUS biopsy with poor visualization of lesions, can cause underestimation of a high risk prostate cancer, overestimation of a clinically insignificant cancer or false risk stratification [18]. Therefore, repeat biopsies are often clinically indicated, with yields of 14-22% for the first repeat biopsy, and subsequent lowering of yields with >2 biopsies, but rarely zero yield [19]. Therefore, many observations have been reported when comparing ultrasound biopsy findings to surgical pathology, such as: (1) missing adjacent dominant lesion in low grade disease, (2) final tumor grade accuracy in only 37% of the biopsized cases, and (3) dominant tumor localization in only 55% of the cases. In some clinical situations, focal or subtotal tissue destruction is desired instead of full organ removal or radiation challenge in patient selection in that 72% of the cases with unilateral disease detected on TRUS biopsy have also contralateral disease [20].

Multiparametric magnetic resonance imaging (mpMRI)

Multi-parametric MRI (mpMRI) has emerged as a promising imaging tool for assessment of the prostate, allowing clinicians to localize possible cancerous lesions. This information can be utilized to guide prostate biopsies, limiting their number while producing more accurate assessments of tumor grade. This information can be used to tailor treatment for patients. Moreover, mpMRI tends to detect clinically significant cancers while not detecting small, insignificant tumors. Meanwhile, a negative mpMRI provides the patient excellent assurance that they do not harbor a clinically significant

prostate cancer. Reports have shown mpMRI to have a negative predictive value of 95% for clinically significant cancer when performed before biopsy [21]. As valuable as mpMRI is, there is still room for optimization of mpMRI to further reduce false negatives for significant disease. Combined with image guided biopsy, pre-mpMRI of the prostate is helpful in early detection of clinically significant disease. Today, mpMRI is becoming a routine diagnostic tool in prediction, assessment, and localization of PCa and disease management [22]. MRI is an imaging modality that is capable of producing images based on “anatomic” or “functional” features. Multi-parametric magnetic resonance imaging (mpMRI) consists of both anatomic and functional scans also known as sequences. Specifically, mpMRI of the prostate is comprised of four key sequences: T1-weighted (T1W), T2W, diffusion-weighted imaging (DWI), and dynamic contrast-enhanced MRI imaging (DCE). T1W and T2W are generally considered “anatomic” and DWI and DCE are generally considered “functional”. The combination of these sequences provides a more accurate diagnosis than any individual sequence [23].

Multiparametric MRI sequences

T1- weighted and T2- weighted sequences

Both provide images according to the principle of calculating the water density in the tissue which are obtained in all MRIs. T1WI is especially used to identify post-biopsy hemorrhage in the prostate and seminal vesicles. It is also useful for detecting the status of lymph nodes and skeletal metastases, especially after administration of intravenous gadolinium-based contrast agent (GBCA). T2WI detects low signal intensity in the tumoral tissue. The high resolution shows a sharp demarcation line in the prostate capsule-especially where the fat content is present just outside of the anatomic pseudocapsule. For this reason, it is useful to use prostate zones, lesions within the prostate, seminal vesicle (SV) invasion, extraprostatic extension and evaluation of cancer staging. However, T2WI-sequences are not sufficient to detect transitional zone and central zone cancers. [24]

Diffusion-weighted sequences

DWI is the key functional sequence of mpMRI. This modality depicts restricted diffusion of water molecules within the prostate by acquiring images at different magnetic gradient strengths. According to the Stejskal-Tanner diffusion decay model, apparent diffusion coefficient (ADC) maps are obtained from DW images on a voxel-by-voxel basis [25]. ADC values inversely correlate with Gleason grade in PCa (low ADC values are associated with higher grade prostate cancer) and DWI is most useful for distinguishing between normal parenchyma and abnormal tissues since tumor tissue has high cellular density and therefore, restricted water diffusion [26]. Most of the clinically significant prostate cancers (CSPCa) appear hypointense in the ADC maps, as compared to normal tissue, due to restricted diffusion, i.e. “trapped” water molecule motion. High b-value images protect the signal in cancer areas that have restricted diffusion compared to normal tissues. Compared with ADC map high b-value images show high signal intensities, especially in CSPCa which are adjacent to or invasive the anterior fibromuscular stroma, in the subcapsular area and in the apex or base of the gland, but ADC map shows low signal intensity. DWI shows better CZ and TZ tumors and cancer aggressiveness, but the resolution is poor and the image becomes impaired [27]. At higher b-values, cancers with restricted water diffusion appear as high signal intensity focus while normal tissue appears hypointense. Quantitative and qualitative analysis of DWI at b-values >1000 demonstrate improved MRI sensitivity

for distinguishing between low and high-grade PCa in the PZ [28]. The disadvantage of high b-value DWI is that it suffers from low signal and high noise creating a low signal to noise ratio (SNR). DWI, using both high b-value imaging and ADC maps, increases both sensitivity and specificity in mpMRI when compared to T2W imaging alone and is considered the best MR sequence to distinguish between malignant and indolent cancers of the prostate regardless of region.

Dynamic contrast-enhanced imaging

DCE MRI is another functional sequence of mpMRI. This sequence visualizes the inflow and outflow of contrast media in suspicious lesions by capturing early and delayed enhancement of tumors after the bolus infusion of an intravenous contrast agent. Scans are acquired before, during, and after injection of a low molecular-weight gadolinium chelate [29] and is comprised of fast 3D T1W sequences that are sensitive to the change in T1. These sequences visualize tumor angiogenesis. Because tumor vessels are more leaky and tortuous than normal vessels, the contrast media, which normally does not enhance the prostate significantly, washes in with more enhancement and also washes out of tumors more quickly than normal tissue. One of the reasons that DCE-MRI is less useful than the other sequences is that increased enhancement may also be seen in benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatitis. Therefore, DCE-MRI must always be interpreted in conjunction with the other mpMRI sequences. DCE MRI is most useful when T2W and DWI are unclear. DCE is also the most important sequence in detecting recurrent cancer post-treatment [30].

Prostate Imaging Reporting and Data System (PI-RADS™)

With the development of mpMRI devices, high resolution prostate images have begun to be obtained. However, no standard terminology is used in the evaluation of these images. There has been a challenge for clinicians trying to translate imaging reports into clinical decisions. In 2012, ESUR aimed to establish a common terminology for evaluating prostate MRI. Thus they adapted the Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS™) (which is used in breast MRI evaluation routinely) to the prostate imaging, and the first version of Prostate Imaging Reporting and Data System (PI-RADS™) was published [31]. PI-RADS™ is briefly summarized as obtained images in different sequences. The results obtained separately after first scoring are combined, giving MRI a score of 1-5 for the suspected lesion. However, in this first version, some conceptual confusion and differences in the evaluation process persisted. For this reason, ESUR, ACR and AdMeTech Foundation established a Steering Committee for the development of the first version. As a result of the work, in 2015 sophisticated form of PI-RADS™v2 was announced. PI-RADS™v2 divided the prostate and surrounding tissues into 39 sectors (36 sectors for prostate, 2 sectors for SV and 1 sector for external urethral sphincter) and redefined the scoring system. The PI-RADS™v2 assessment system shown in Table 1 and its sectoral map is shown in Figure 1. With the sectoral map and new scoring that integrated standard use with recommendations of the guidelines, the prostatic lesions became more understandable with better localization in MRI reports. It has been shown that PI-RADS™v2 has higher sensitivity and specificity than the first version. PI-RADS™ - 3 - lesions were evaluated as negative or positive instead of scoring with the change in DCEI, and when positive, the lesion was upregulated to PI-RADS™ - 4 - lesion. But still this lesion is mostly discussed and exposed to different approaches and continued to be called “equivocal” lesions.

Conclusion

Multiparametric MRI is useful in the detection, monitoring, and treatment planning of PCa. Though it still must be complemented by traditional detection and treatment methods such as DRE, PSA, and biopsy, mpMRI has the potential to reduce the number of unnecessary biopsies, to reduce over diagnosis and overtreatment of indolent cancers, and to aid in patient management. The goal of mpMRI is to provide a non-invasive method of screening, assessing, and treating clinically significant cancers, as well as to identify patients who would benefit from active surveillance. When used in conjunction with the traditional detection and monitoring methods, mpMRI imaging has proven to be a successful technique for assessing PCa.

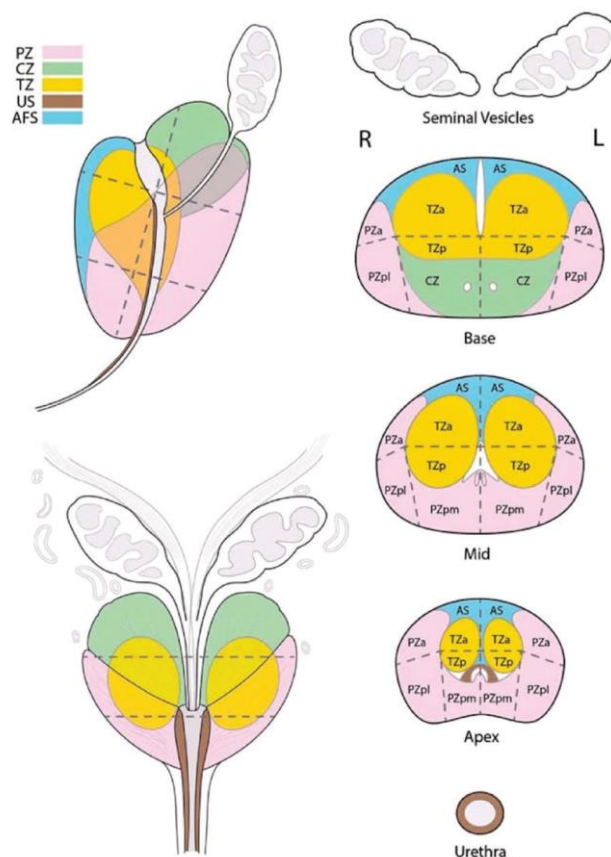


Figure 2 Sectoral map of prostate - PI-RADSv2 (PZ-peripheral zone, CZ-central zone, TZ-transitional zone, US-urethral stroma, AFS-anterior fascial stroma)

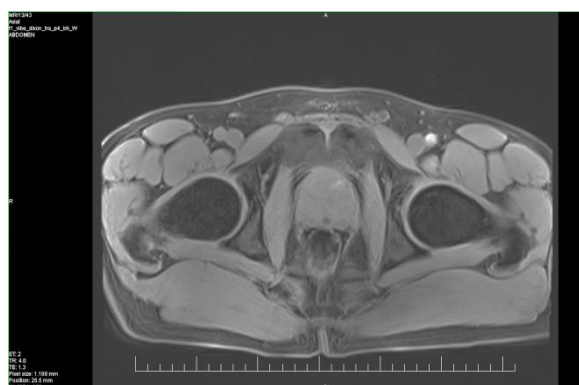


Figure 3 T1-weighted sequence of prostate



Figure 4 T2-weighted sequences of prostate

Table 1 PI-RADS™v2 assesment categories

PIRADS 1	very low (clinically significant PCa is highly unlikely to be present)
PIRADS 2	low (clinically significant PCa is unlikely to be present)
PIRADS 3	intermediate (the presence of clinically significant PCa is equivocal)
PIRADS 4	high (clinically significant PCa is likely to be present)
PIRADS 5	very high (clinically significant PCa is highly likey to be present)

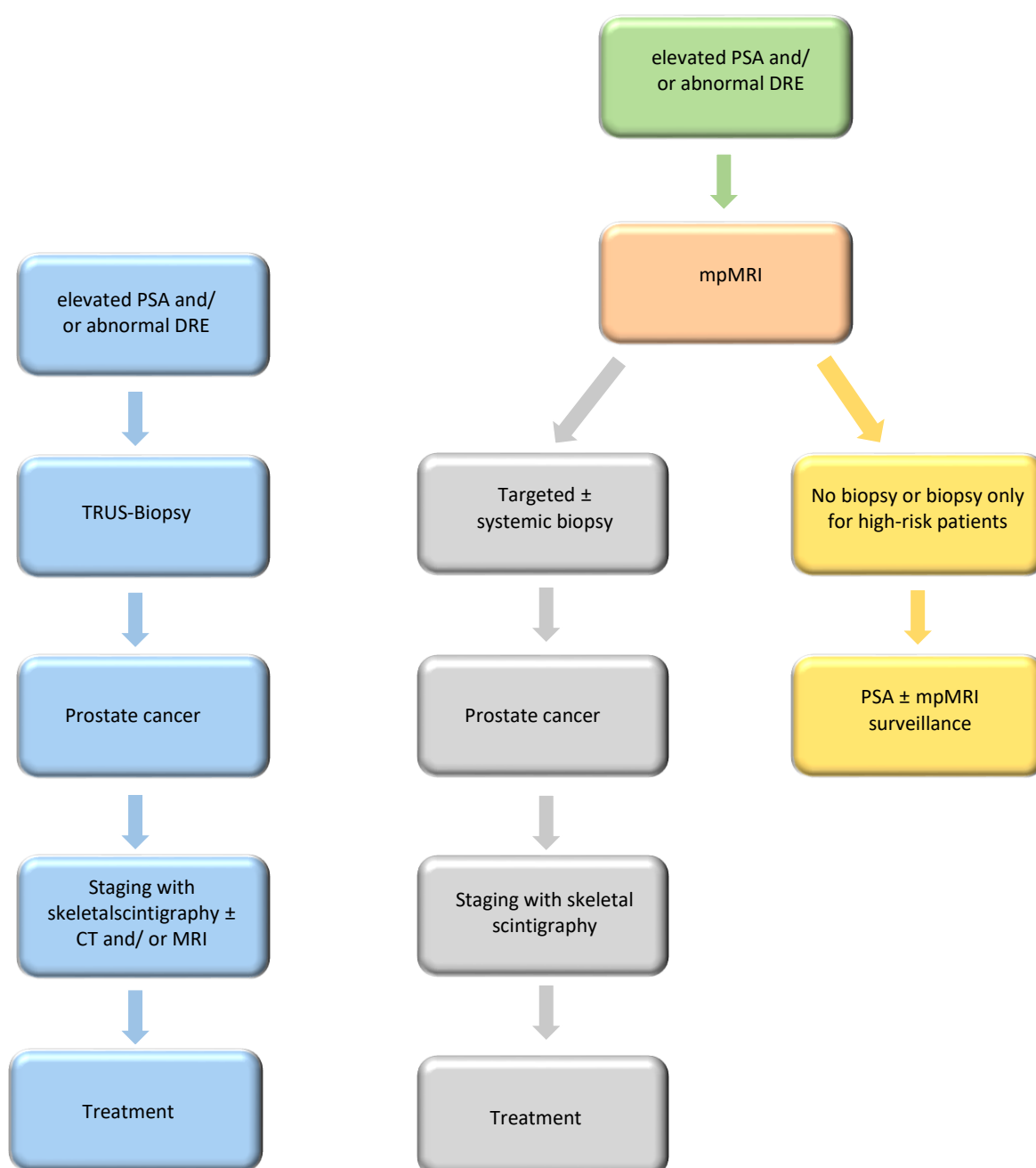


Figure 5 Comparison of traditional and mpMRI prostate cancer diagnostic (mpMRI-multiparametric MRI, PSA-prostate specific antigen, DRE-digital rectal examination)

References

- [1] Fitzmaurice, *JAMA Oncol.* **2017**, 3:524.
- [2] Brown, *Abdominal imaging.* **2015**, 40(6):1788-1799.
- [3] Martin, *JAMA.* **2018**, 319: 883-895.
- [4] McNeal, *Am. J. Clin. Pathol.* **1968**, 49(3):347-357.
- [5] Vargas, *Radiology.* **2012**; 262(3):894-902.
- [6] Rosenkrantz, *AJR Am. J. Roentgenol.* **2014**, 202(1):109-120.
- [7] Cohen, *J. Urol.* **2008**, 179(5):1762-1767.
- [8] Kiyoshima, *Japanese Journal of Clinical Oncology.* **2004**; 34(8):463-468.
- [9] Ward, *Abdom. Radiol.* **2017**, 42(3):926-934.
- [10] Koppie, *BJU Int.* **2006**, 98(6):1167-1171.
- [11] Panebianco, *Insights into Imaging.* **2018**, 9(1):87-101.
- [12] Cristini, *BMC Urol.* **2013**, 13:13.
- [13] Ayala, *Am. J. Surg. Pathol.* **1989**, 13(1):21-27.
- [14] Poon, *Journal of computer assisted tomography.* **1991**, 15(2):265-268.
- [15] Stabile, *Nature reviews.* **2019**, 254-263.
- [16] Hodge, *J. Urol.* **1989**, 142:66-70.
- [17] Thompson, *J. Urol.* **2007**, 177:2106-131.
- [18] Marshall, *Prostate Int.* **2015**, 3:35-41.
- [19] Kanthabalan, *Curr. Opin. Urol.* **2014**, 24:209-217.
- [20] Washington, *BJU Int.* **2012**, 110:50-55.
- [21] Appayya, *Current opinion in urology.* **2015**, 25(6):510-517.
- [22] Scheenen, *Investigative radiology.* **2015**, 50(9):594-600.
- [23] Jambor, *Journal of magnetic resonance imaging.* **2015**, 41(5):1394-1404.
- [24] Giganti, *Am. J. Roentgenol.* **2019**, 5:454-470.
- [25] Stejskal, *J. Chem.* **1965**, 42(1):288-292.
- [26] Hauth, *The British journal of radiology.* **2015**, 88(1054):412-422.
- [27] <http://www.Acr.Org/quality-safety/resources/pirads/>; Updated **2015**
- [28] Grant, *Abdominal imaging.* **2015**, 40(3):578-586.
- [29] Berman, *Abdominal Imaging.* **2015**, 5:454-465.
- [30] Muller, *World journal of urology.* **2015**, 33(10):1503-1509.
- [31] Barentsz, *Eur. Radiol.* **2012**, 22:746-757.

Diagnostika a moderná liečba chronických glomerulonefritíd

Graňák, K.^{1,2}, Vnučák, M.^{1,2}, Beliančinová, M.^{1,2}, Machálek K. Kajová, K.³,
Dedinská, I.^{1,2}

¹Univerzitná nemocnica Martin, Transplantačné centrum, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, I. Interná klinika, Martin; ³Slovenská Zdravotnícka Univerzita a Onkologický ústav sv. Alžbety v Bratislave, Ústav patológie, Bratislava
vnucak.matej@gmail.com

Abstract

Glomerulonephritis is responsible for 20-25% of end-stage renal disease. Most represent chronic forms that are irreversible, usually asymptomatic, and slowly progressing diseases with progressive glomerular sclerosis and loss of renal functions. Kidney biopsy with its histological examination remains the gold standard in their diagnosis. Last year, the KDIGO group put into practice therapeutic procedures with a new, highly specific biological and immunosuppressive treatment. The program of native kidney biopsies and the application of modern treatment has also started at our department.

Keywords: glomerulonephritis, renal biopsy, immunosuppression

Úvod

Glomerulonefritídy (GN) predstavujú ochorenia glomerulov zápalového charakteru vyplývajúce z aktivácie imunologických mechanizmov. Sú zodpovedné za 20 – 25% prípadov terminálneho štádia chronickej choroby obličiek, pričom predovšetkým u detí a mladých dospelých sú jednou z hlavných príčin ireverzibilného poškodenia ich funkcie. Existuje niekoľko klasifikačných kritérií GN. Pre klinickú prax sú dôležité najmä tri. Prvé je rozdelenie podľa etiológie na primárne GN, kedy nie je známa príčina a dochádza k izolovanému postihnutiu obličiek a sekundárne, ktoré vznikajú ako súčasť iných chorôb (systémové autoimunitné ochorenia, malignity, infekcie,...). Z hľadiska času ich delíme na akútne, rýchlo-progredujúce a chronické. Nevyhnutnosťou je histologické vyšetrenie, kde určujeme rozsah postihnutia glomerulov (fokálne, segmentálne, difúzne, globálne, mezangiálne, membranózne) a stupeň bunkovej proliferácie s aktivitou zápalu (neproliferatívne, proliferatívne). Manifestácia je veľmi heterogénna, avšak zjednodušene možno konštatovať, že každá z nich sa prejaví nefrotickým alebo nefritickým syndrómom. V začiatkovej fáze ochorenia sa môžu objaviť iba ich izolované zložky alebo sa tieto syndrómy môžu pri niektorých typoch GN v čase prekrývať. Zriedkavejšie sa manifestujú ako akútne poškodenie obličiek, či v nepoznaných prípadoch až komplikáciami terminálneho štádia chronickej choroby obličiek. Chronické GN, ktorých je veľká väčšina, sú ireverzibilné a pomaly progredujúce ochorenia s postupnou sklerotizáciou glomerulov a zánikom renálnych funkcií. Zlatým štandardom v diagnostike glomerulárnych ochorení zostáva biopsia obličky s jej histologickým vyšetrením. Najčastejším patologicko-anatomickým typom je IgA nefropatia nasledovaná membránovou glomerulopatiou. Výnimkou je Severná Amerika, kde prevažuje fokálno-segmentálna glomeruloskleróza = FSGS (1).

Renálna biopsia

Perkutánná biopsia obličky zostáva esenciálnou diagnostickou metódou vo väčšine prípadov chronických GN. Okrem stanovenia presnej diagnózy s možnosťou indikácie cielenej liečby nám v priebehu ochorenia napomáha určiť stupeň aktivity, či chronicity chorobných zmien glomerulov alebo odpoveď na podávanú liečbu. Stupeň aktívnych alebo chronických zmien predikuje prognózu a pravdepodobnú odpoveď na zvažovanú liečbu. Väčšina prípadov renálnu biopsiu vyžaduje. Medzi typické indikačné kritéria patrí nefrotický syndróm, akútny nefritický syndróm, akútne zlyhanie obličiek nejasnej príčiny, izolovaná ne-nefrotická proteinúria (> 500 mg/24 hodín). Izolovaná glomerulová hematuria pri dobrej funkcii obličiek zvyčajne biopsiu nevyžaduje z dôvodu dobrej dlhodobej prognózy. Biopsia nie je nevyhnutná u detí do 12 rokov s nefrotickým syndrómom, ktorého príčinou sú vo viac ako 90% minimálne zmeny glomerulov a sú väčšinou kortikosenzitívne. Taktiež sa biopsia neodporúča u pacientov v diagnostike membránovej GN pri sérovej pozitivite protilátok proti receptorom pre fosfolipázu A2, ktorí nevyžadujú nasadenie imunosupresívnej liečby. Nakoľko sa jedná o invazívne vyšetrenie je samozrejmosťou individuálny prístup so zvážením rizika a benefitu pre každého pacienta. Kontraindikáciami môžu byť malé zvrátené obličky odrážajúce ireverzibilné chronické zmeny, solitárna natívna oblička, stavy spojené s vysokým rizikom krvácania, ťažká nekorigovaná hypertenzia, hydronefróza, aktívna renálna alebo perirenálna infekcia, nespolupráca pacienta, či ťažká obezita (2).

Biopická vzorka potrebná k stanoveniu alebo vylúčeniu špecifického histopatologického nálezu, o ktorú sa môžeme dôverne oprieť by mala obsahovať minimálne 8 až 10 glomerulov. Výnimkou môže byť FSGS, kde lézie môžu byť viditeľné iba v niektorých segmentoch niektorých glomerulov, naopak pri difúzných typoch ochorení, akou je membránová GN, môže postačovať aj jediný glomerulus. Vzorka by mala byť v optimálnom prípade vyšetrená svetelným a elektrónovým mikroskopom a imunofluorescenčne. Vyšetrenie svetelnou mikroskopiou by malo minimálne poskytnúť iniciálne diagnostické vyhodnotenie založené na morfológickom vzore pozorovanom na tkanivových rezoch. Imunofluorescenčnou analýzou detekujeme prítomnosť imunoreaktantov ako imunoglobulín (Ig) G, IgA, IgM, komplement C3, C4, C1q, fibrín, či ľahké reťazce kappa a lambda. Táto metóda môže byť ďalej použitá na detekciu cieľových antigénov, ako napríklad receptoru pre fosfolipázu A2 (PLA2R), depozitov proteínov, či špecifických druhov amyloidu. Nakoniec elektrónová mikroskopia definuje umiestnenie, rozsah a špecifické charakteristiky imunitných alebo monoklonálnych depozitov, rozsah fúzie pedicel podocytov, či zmeny glomerulov bazálnej membrány. Nevyhnutnou zložkou, najmä pre následný terapeutický manažment, je posúdenie „aktivity“, či „chronicity“ prítomných lézií. Rozsah chronických ireverzibilných zmien je najjednoduchšie posúdiťelný zhodnotením stupňa tubulárnej atrofie a intersticiálnej fibrózy (3).

Biopsie obličiek na Transplantačno-nefrologickom oddelení v Univerzitetnej nemocnici Martin

Vznikom samostatného komplexného pracoviska pre nefrológiu (klinická a transplantačná nefrológia) v septembri 2021 v Univerzitetnej nemocnici Martin sa vytvorilo zázemie pre vznik centra pre diagnostiku a liečbu pacientov s GN. V rámci biopsií natívnych obličiek pracovisko spolupracuje s Urologickou klinikou JLF UK a UNM. Z dôvodu dlhoročných skúseností s imunosupresívnou liečbou a ako Centrum pre podávanie biologickej liečby pre nefrologických pacientov následne poskytujeme nadregionálnu zdravotnú starostlivosť vo forme modernej liečby podľa najaktuálnejších

trendov a odporúčaní. Významnú zmenu predstavuje aj spôsob vykonávania samotného výkonu – biopsie obličky. Biopsie boli realizované v celkovej analgosedácii, čo bolo spojené s potrebou pacienta absolvovať predoperačné vyšetrenie a samotnú celkovú anestéziu, ale aj s náročnejšou organizáciou práce z dôvodu časového faktoru a závislosti od prítomnosti anesteziológa. Po spustení tohto programu v rámci Transplantačno-nefrologického oddelenia biopsie prebiehajú v lokálnom znecitlivení pod sonografickou kontrolou, ako vyplýva z aktuálnej medzinárodných odborných doporučení. Od začiatku, teda 1. septembra 2021, k 15. aprílu 2022 sme zrealizovali 20 biopsií natívnych obličiek. Identifikované histologické nálezy:

- v 7 vzorkách FSGS, z ktorých bolo 6 vyhodnotených ako primárne, 1 ako sekundárna pri dlhodobou dekompenzovanej cukrovke;
- v 5 vzorkách IgA nefropatia;
- v 4 vzorkách difúzna membránová GN;
- v 1 vzorke ANCA asociovaná vaskulitída;
- v 1 vzorke lupusová nefritída typ V;
- z ostatných 1 krát amyloidóza a 1 vzorka bola nereprezentatívna.

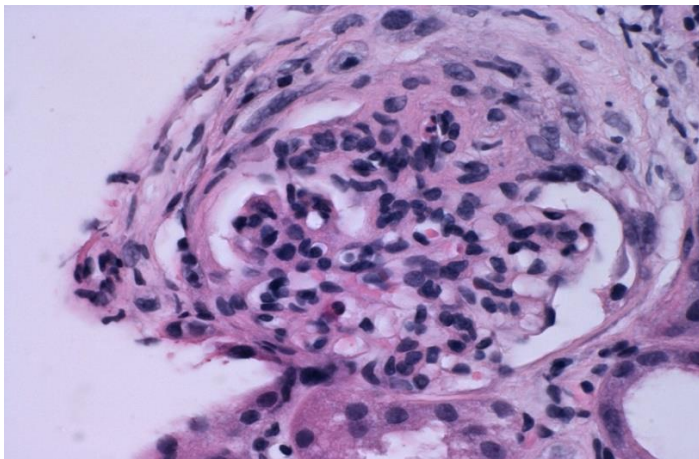
Naše skúsenosti v liečbe glomerulonefritíd

V najnovších odporúčeníach KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) z roku 2021 pre diagnostiku a manažment glomerulárnych ochorení nastali vo viacerých prípadoch významné zmeny v terapeutickom manažmente. Najpodstatnejšou bolo zaradenie rituximabu medzi liečbu prvej voľby v protokoloch membránovej GN, ANCA asociovej vaskulitídy, ale aj záchrannej liečby iných typov GN (3). Rituximab je monoklonálna protilátka namierená proti antigénom CD20 na povrchu B lymfocytov. Jeho podávanie musí byť zabezpečené na špecializovanom pracovisku so skúsenosťami a prebieha pri kontinuálnom monitoringu vitálnych funkcií pre riziko alergickej reakcie a syndrómu z uvoľnenia cytokínov. Samozrejmosťou je využitie modernej imunosupresívnej liečby, ako sú kalcineurínové inhibítory (dnes už preferenčne takrolimus pred cyklosporínom A), či kyselina mykofenolová, ktoré boli u nás donedávna využívané takmer výlučne v transplantačnej medicíne. Z nášho súboru diagnostikovaných pacientov sme v prípade membránovej GN indikovali špecifickú liečbu u 2 z nich, ktorí vykazovali plne rozvinutý nefrotický syndróm. Obom bola zahájená liečba rituximabom, konkrétne v indukčnom protokole 1000 mg dva krát v rozmedzí 14 dní s následným prechodom na udržiavaciu liečbu v podobe jednej dávky každých 6 mesiacov. V jednom z týchto prípadov bolo potrebné po absolvovaní indukčnej liečby pokračovať v kombinovanom režime s kalcineurínovým inhibítom pre pretrvávajúci ťažký nefrotický syndróm. Ostatní 2 pacienti s membránovou GN boli indikovaní na podpornú liečbu s pravidelným sledovaním nakoľko nejavili známky nefrotického syndrómu. V tomto prípade má ochorenie veľmi dobrú prognózu a imunosupresívna liečba sa spája s vyšším rizikom sprievodných komplikácií, preto je vhodné počkať na ďalší vývoj ochorenia. Rovnaký režim s rituximabom sme použili aj v indukčnom protokole u pacientky s ANCA vaskulitídou a lupusovou nefritídou. V prípade lupusovej nefritídy sa však nejednalo o primárnu liečbu. Pacientka v minulosti absolvovala indukčnú liečbu cyklofosfamidom v protokole EURO-LUPUS a udržiavaciu liečbu kyselinou mykofenolovou. Pre nedosiahnutie remisie bola nami realizovaná rebiopsia s potvrdením triedy V a aktivity ochorenia, vzhľadom k čomu bol indikovaný rituximab. Aktuálne je pacientka nastavená na kombinovanej liečbe, ktorá zahŕňa takrolimus, kyselinu mykofenolovú a kortikosteroid. Najväčšiu vzorku tvorili pacienti s potvrdeným FSGS. K liečbe kortikosteroidmi boli indikovaní iba 3 z nich pre

prejavy nefrotického syndrómu s veľmi dobrou a promptnou odpoveďou. Ostatní boli podobne ako tí s membránovou GN indikovaní na podpornú liečbu. Rovnaký postup sme zaujali aj v prípade IgA nefropatie, kde najdôležitejšiu rolu zohráva prísna kompenzácia krvného tlaku pomocou blokády systému renín – angiotenzín – aldosterón a správna kompenzácia iných pridružených ochorení. V náleze renálnej amyloidózy stále prebieha zložitý diagnostický proces zahŕňajúci typizáciu amyloidu z histologickej vzorky na zahraničnom pracovisku, nakoľko na Slovensku toto vyšetrenie nie je dostupné. Netradičným je izolované postihnutie obličiek pri absencii dôkazu amyloidu v iných orgánových systémoch. Prípadná liečba bude vedená multidisciplinárne v spolupráci s hematológom.

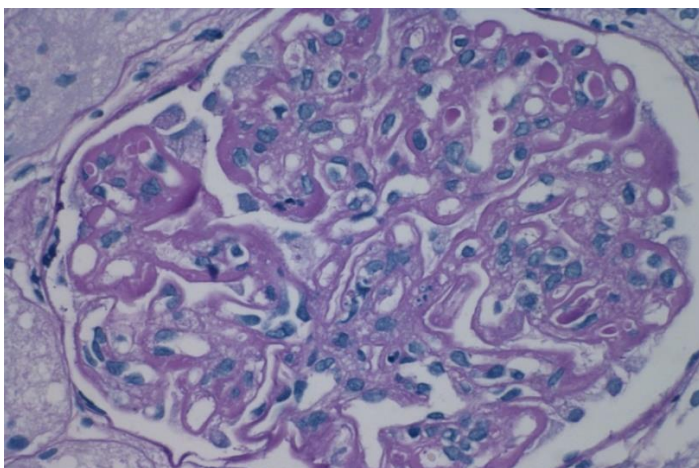
Záver

Biopsia obličky je napriek rýchlemu vedeckému pokroku a poznatkoch o viacerých sérových markeroch stále zlatým štandardom v diagnostike chronických GN. S jej využitím by sa v indikovaných prípadoch pri absencii absolútnych kontraindikácií nemalo váhať alebo ho odsúvať. S liečbou týchto špecifických ochorení je potrebné začať čo najskôr a pri splnení indikačných kritérií môžu byť pacienti nastavení na modernú biologickú alebo imunosupresívnu liečbu na špecializovaných pracoviskách.



Obrázok 1 FSGS. Glomerulus postihnutý segmentálnou sklerotizáciou, so širokou adhéziou na vnútornú časť puzdra. Časť glomerulu v oblasti mimo sklerózy je bez výraznejších histomorfologických zmien (*farbenie hematoxylín-eozín, zväčšenie 600x*)

ZDROJ: Archív Dr. Kajová Machálek, Unilabs Banská Bystrica)



Obrázok 2 Lupus nefritída typ V. Postihnutie glomerulu pri difúznej lupusovej nefritíde s obrazom florídnej aktívnej glomerulonefritídy s mezangiokapilárnym charakterom, so segmentálnou fibrinoidnou nekrózou, typickými „wire loops“ a ložiskovou dvojistou konturáciou bazálnych membrán (*farbenie hematoxylín-eozín, zväčšenie 600x*)

ZDROJ: Archív Dr. Kajová Machálek, Unilabs Banská Bystrica)

Literatúra

- [1] <https://www.uptodate.com/contents/glomerular-disease-evaluation-and-differential-diagnosis-in-adults> Updated September 08. **2021**.
- [2] <https://www.uptodate.com/contents/the-kidney-biopsy> Updated December 15. **2020**.
- [3] Rovin, *Kidney Int.* **2021**,100(4S):S1-S276.

Mikrobiom v patogenéze amyotrofickej laterálnej sklerózy - príčina či dôsledok

Parvanovová, P.¹ Tatarková, Z.¹ Kolísek, M.²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin
parvanovova1@uniba.sk

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis is a devastating fatal disease of the human motor system. The average survival time is 3 years rarely more than 8, survival time is mainly influenced by the onset and progression of symptoms. The cause of death is usually respiratory paralysis. The heterogeneity of the disease leads to a delay in diagnosis. As the incidence of this disease is directly proportional to increasing age, an increased incidence is expected as the population ages. However, current knowledge cannot clearly explain the pathophysiology of the disease. Many potential risk factors and pathophysiological mechanisms are being investigated, but only age and male sex are currently among the definitive risk factors. There is currently no effective intervention for this disease. The gut microbiome has become a relatively new target of research in the field of neurodegenerative diseases, as it is beginning to be recognized that ALS is not only a disease of the central nervous system but affects the physiology of the whole body.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis, microbiome

Úvod

Amyotrofická laterálna skleróza (ALS), progresívne a v konečnom dôsledku smrteľné ochorenie motorického neurónu s postihnutím mozgu aj miechy, je vo všeobecnosti charakterizovaná príznakmi súvisiacimi s končatinami alebo bulbárnym svalstvom ako počiatočným klinickým prejavom, zatiaľ čo respiračná insuficiencia je prejavom konečného štádia [1]. Celosvetový výskyt ALS sa odhaduje ročne na 1,75 / 100 000 jedincov a celosvetová prevalencia na 4,1-8,4 / 100 000 osôb [2]. V súčasnosti neexistuje žiadny definitívny diagnostický test alebo biomarker ALS a neurológovia sa pri diagnostike spoliehajú len na klinické kritériá. Preto je dôležité pochopenie patogenézy tohto ochorenia, ktorá by umožnila skoršiu diagnostiku a následne nové možnosti terapeutických intervencií. Čoraz viac sa uznáva, že na etiológii ALS sa podieľajú faktory mimo centrálného nervového systému. Črevný mikrobióm je jednou z najrýchlejšie sa rozvíjajúcich oblastí výskumu ALS [5], pričom v centre pozornosti stojí vplyv črevnej mikroflóry na centrálny nervový systém (CNS), a to tak pri neurovývojových, ako aj neurodegeneratívnych ochoreniach [3]. Predpokladom je, že metabolity produkované pozmeneným zložením mikrobiómu sú transportované krvnou cestou, pričom po prechode hematoencefalickej bariéry ich prítomnosť v CNS by mohla do určitej miery ovplyvniť neurologické funkcie. Dôležitosť mikrobiómu podporuje poznatok, že metabolity ako mastné kyseliny s krátkym reťazcom pochádzajúce z mikrobioty podporujú udržiavajú homeostázu mikroglií, ich dozrievanie a funkciu [4]. Okrem toho, narušenie mikrobioty môže zhoršiť funkcie hematoencefalickej bariéry a to znížením expresie kľúčových proteínov zabezpečujúcich správne fungovanie tesných spojení v mozgovom endotelu. Poruchy integrity hematoencefalickej bariéry môžu následne zvýšiť prestup rôznych imunitných

buniek, makromolekúl a metabolitov do mozgovomiechového moku, a tým katalyzovať potenciálne škodlivé imunitné reakcie.

Vzhľadom na vyššie uvedené fakty, štúdie ALS sa v súčasnosti odporúča vykonávať s ohľadom na stravu, mikrobióm, životný štýl a rozdiely medzi pohlaviami. Štúdie, ktoré skúmajú mikrobióm spolu s intestinálnou patogenézou, pomôžu takto určiť, kedy, kde a či sú mikrobióm a metabolity rozhodujúce pre progresiu ochorenia ALS. Pochopenie patogenézy ALS vzťahujúcej sa na GI trakt poskytne inovatívne stratégie na presnú diagnostiku a lepšiu liečbu tohto náročného ochorenia [6].

Všeobecná charakteristika mikrobiómu

Mikrobióm opisuje genóm všetkých mikroorganizmov, symbiotických aj patogénnych, žijúcich vo všetkých stavovcoch a na nich. Črevný mikrobióm sa skladá z kolektívneho genómu mikróbov obývajúcich črevá vrátane baktérií, archeí, vírusov a húb [7]. Rozloženie mikróbov v čreve je priestorové, pričom hrubé črevo obsahuje najväčšiu rozmanitosť a početnosť mikroorganizmov. V hrubom čreve sa nachádza aj viac aeróbov ako v tenkom čreve, čo je spôsobené jeho blízkosťou k vonkajšiemu prostrediu. Aj napriek značným rozdielom v diverzite a zastúpení jednotlivých rodov baktérií sa uvádza, že približne 90% všetkých bakteriálnych druhov črevnej mikrobioty dospelého človeka spadá do 2 kmeňov – *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Navyše, dominantný kmeň *Firmicutes* je rôznorodou skupinou pozostávajúcou z gram pozitívnych baktérií patriacich do vyše 200 rôznych rodov. Naopak, kmeň *Bacteroidetes* zahŕňa predovšetkým gram negatívne baktérie rodov *Prevotella*, *Allistipes* a *Odoribacte*. Významným je poznatok, že mikrobióm každého človeka je jedinečný, hoci približne tretina druhov je bežná pre väčšinu ľudí. Ľudský mikrobióm má rozmanité funkcie, ako je rozvoj imunity, obrana proti patogénom, výživa organizmu, vrátane produkcie pre organizmus dôležitých mastných kyselín s krátkym reťazcom, energetický metabolizmus, ale aj pre syntézu vitamínov a ukladanie tukov. Toto všetko má do určitej miery vplyv aj na samotné správanie jedincov. Ľudský mikrobióm taktiež hrá dôležitú úlohu pri kontrole životne dôležitých homeostatických mechanizmov tela. Patrí sem hypermetabolizmus, odolnosť voči infekciám a zápalom, prevencia proti autoimunitě a vplyv na os črevo - mozog. Zloženie mikrobiómu je dynamické, pričom najdramatickejšia modulácia nastáva počas ranného vývoja a predpokladá sa, že práve zmeny v skorom období ovplyvňujú zdravie v neskoršom veku [8]. Faktory ovplyvňujúce vývoj mikrobiómu v rannom veku sú: gestačný vek, spôsob pôrodu, typ výživy a výživový stav matky. Počas neskoršieho života je mikrobióm ovplyvnený faktormi prostredia, ako napríklad strava a užívanie antibiotík, ale aj prítomnosť rôznych ochorení. Prepojenie medzi mikrobiómom a patofyziológiou ochorení je nejasné. Hlavným cieľom štúdií je určiť či dysbióza je príčinou alebo následkom ochorení. Medzi ochorenia, pri ktorých sú pozorované zmeny mikrobiómu patria: zápalové ochorenie čriev, nekrotizujúca enterokolitída, atopické ochorenia, diabetes 1. typu, porucha autistického spektra a v neposlednom rade aj amyotrofická laterálna skleróza. Najnovším cieľom v oblasti výskumu mikrobiómu je ovplyvnenie zloženia mikrobiómu, ako účinného terapeutického nástroja v manažmente rôznych ochorení. Medzi skúmané metódy v tejto oblasti patrí: cielené používanie antibiotík na odstránenie vybraných mikróbov a následné použitie probiotík na podporu rastu prospešných baktérií. Ďalším možným terapeutickým prístupom je transplantácia fekálnej mikrobioty na obnovenie bakteriálnych spoločenstiev.

Mikrobióm a ALS

ALS je neurodegeneratívne ochorenie charakterizované progresívnou degeneráciou horných aj dolných motorických neurónov. Patogenéza ALS doteraz nebola dostatočne objasnená [9] Avšak z doterajších štúdií vieme, že patogenéza ALS je multifaktoriálna a zahŕňa komplexné interakcie hostiteľ-prostredie. Medzi dobre definované rizikové faktory patrí nutričný stav, nižší index telesnej hmotnosti (BMI), vyšší vek, fajčenie, rodinná anamnéza a mužské pohlavie, s ktorým súvisí aj vysoká úroveň fyzickej zdatnosti a vojenská služba [10]. Hromadiace sa dôkazy naznačujú viacsmernú interakciu medzi CNS a črevným mikrobiómom, o ktorom nedávne štúdie preukázali, že má vplyv na neuronálny prenos, aktivitu neurónov a komplexné správanie hostiteľa [11]. Aj keď je prepojenie mikrobiomu a ALS pomerne nové, v súčasnosti sú už dostupné poznatky zo štúdií na zvieracích modeloch [12] aj klinické štúdie [6,13,14].

Všeobecné zistenia zo štúdií na zvieracích modeloch poukazujú na existenciu mikrobiálnych zmien v presymptomatickom štádiu ALS, ako aj po nástupe ochorenia. S progresiou ochorenia dochádza ku zmene v mikrobiomálnych spoločenstvách, kedy modifikácia progresie ochorenia je modulovaná pomocou metabolitov pochádzajúcich z mikrobiálnych spoločenstiev (nikotínamid a butyrát), ako aj črevnou mikroflórou sprostredkované imunitné reakcie ovplyvňujúce motorické funkcie a mieru prežívania v experimentálnych modeloch ALS [5,15]. Na druhej strane, humánne štúdie priniesli protichodné výsledky z pohľadu zapojenia mikrobiómu do patofyziológie ALS. Mnohé zo štúdií sú často obmedzené malou vzorkou skúmanej populácie a nejednotnou metódou skúmania mikrobiómu. Taktiež v ľudskom mikrobióme existuje značná heterogenita bez ohľadu na zdravotný stav jedincov, ktorá sa čiastočne pripisuje individualite, životnému prostrediu, etnickej príslušnosti, strave, životnému štýlu a anamnéze [16]. Avšak aj napriek týmto obmedzeniam doterajšie poznatky poukazujú na existenciu rozdielov v zložení mikrobiómu u pacientov s ALS oproti zdravým jedincom [14], taktiež zmena zloženia mikrobiómu s progresiou ochorenia a metabolity odvodené od mikróbov vrátane nikotínamidu a butyrátu môžu zmierniť progresiu ALS. Štúdie ako [14,17] pozorovali, že baktérie metabolizujúce glutamát a dominantné baktérie produkujúce butyrát boli u pacientov s ALS početnejšie a hladiny nižšie v porovnaní s kontrolami, čo ovplyvnilo integritu čreva a reguláciu zápalu. Na rozdiel od toho iné štúdie ukázali, že fekálny mikrobióm pacientov s ochorením motoneurónu sa významne nelíši od zdravých kontrol, avšak vyšší pomer *Firmicutes/Bacteroidetes* bol spojený so zvýšeným rizikom úmrtia a väčšou druhovou diverzitou [18]. Tieto údaje podporujú, že zmeny mikrobioty by mohli skôr modulovať klinický priebeh ochorenia, než by predstavovali rizikový faktor jeho nástupu.

Na úlohu mikrobiómu v patofyziológii ALS poukazuje aj Švédska štúdia [20]. Táto štúdia sa zamerala na prepojenie liečby antibiotikami s ALS, keďže je všeobecne známe, že užívanie antibiotík výrazne ovplyvňuje črevné mikrobiálne prostredie a vedie k dysbióze. Širokospektrálne antibiotiká menia početnosť 30 % črevných baktérií, čo spôsobuje nízku taxonomickú bohatosť a diverzitu [19]. Taktiež je preukázané, že zmeny spôsobené antibiotikami môžu mať trvalý účinok na mikrobióm. Na základe hypotézy, že narušená črevná homeostáza zohráva úlohu pri rozvoji ALS, je predpoklad, že jedinci ktorí užívali antibiotiká, môžu mať vyššie riziko rozvoja ochorenia, opodstatnený [19].

Mikrobióm ako možný cieľ terapeutickkej intervencie

Črevný mikrobióm je veľmi citlivý na environmentálne faktory, čo vedie k dysbióze. To znamená, že mikrobióm je tiež veľmi flexibilný, a preto existujú značné možnosti na

modifikáciu zloženia črevného mikrobiómu v prospech hostiteľa. Súbežne s výskumom v oblasti patofyziológie, prebieha úsilie o vypracovanie intervencií, ktorých cieľom je modulácia mikrobiómu s cieľom zlepšiť priebeh ochorenia. Jednou z najväčších výziev vo výskume mikrobiómu určiť vzťahy príčina - účinok a navrhnúť terapie založené na mikrobióme, ktoré sú schopné dosiahnuť predvídateľné výsledky na mikrobiálne spoločenstvo a zdravie hostiteľa. Väčšina súčasných terapií založených na mikrobióme sa zameriava na prokaryotickú časť mikrobiómu tým, že sa snaží zmeniť mikrobiálne zloženie čreva prostredníctvom exogénneho podávania živých mikróbov, teda probiotiká. Alternatívnym prístupom sú prebiotiká. Namiesto podávania živých baktérií sú prebiotiká zlúčeniny, ktoré sa konzumujú so zámerom priaznivo ovplyvniť zloženie alebo funkciu mikrobiómu. Prebiotiká, podobne ako probiotiká, sú relatívne nešpecifickým prístupom k intervenciám založeným na mikrobióme a na úplnú charakteristiku účinkov prebiotík na rôzne bakteriálne druhy sú potrebné ďalšie štúdie.

Ďalšou možnosťou je fekálna transplantácia mikrobioty (FMT). FMT zahŕňa prenos celého mikrobiálneho spoločenstva od zdravého darcu chorému príjemcovi s cieľom nahradiť mikrobióm spojený s ochorením. Ukázalo sa, že FMT má pozoruhodnú účinnosť pri liečbe infekcie *Clostridium difficile*, ktorá sa najčastejšie vyskytuje po liečbe antibiotikami [21, 22]. V štúdii z roku 2020 [23], ktorá sa zaoberala vzťahom fekálnej mikroflóry a prognózou ALS, zistili, že ALS pacienti s vyššou bohatosťou a rovnomernosťou ich fekálneho mikrobiómu prežívali kratšie od nástupu typických symptómov. Avšak FMT je spojená so značnými rizikami pre príjemcu vrátane neúmyselnej transplantácie patobiontov a negatívnych interakcií s existujúcou mikrobiálnou komunitou príjemcu.

Novým prístupom sú terapeutiká založené na metabolitoch tzv. postbiotiká. Postbiotiká sa zameriavajú na nadväzujúce signálne dráhy mikrobiómu a pôsobia tak, že zmierňujú negatívne účinky nadbytku, nedostatku alebo dysregulácie metabolitov zapojených do týchto dráh. Exogénne podávanie alebo inhibícia metabolitov ako také má skôr než cielené pôsobenie na aberantné zloženie mikroorganizmov potenciál neutralizovať a korigovať negatívne účinky dysbiózy [25]. Medzi prvé príklady potenciálnych terapií založených na metabolitoch, ktoré boli objavené na zvieracích modeloch ľudských ochorení, patria masné kyseliny s krátkym reťazcom (SCFA), u ktorých sa preukázal protizápalový účinok [24]. Intervencie založené na metabolitoch sú terapeuticky atraktívne z viacerých dôvodov. Tieto malé molekuly sú fyziologicky hojne zastúpené vo vysokých koncentráciách, a preto je potenciál toxicity nízky. Medzi nevýhody liečiv založených na metabolitoch patrí kratší polčas rozpadu ako pri podávaní živých baktérií, preto môže byť na liečbu stavov spojených s dysbiózou potrebné opakované dávkovanie.

Zhrnutie a záver

Vzhľadom na to, že ALS je ochorenie závislé od veku, s rastúcou a starnúcou populáciou môže mať výskyt vo svete rastúci trend. Bohužiaľ v súčasnej dobe, neexistuje žiadna účinná intervencia, ktorou by sa dal zmeniť priebeh tohto ochorenia. Na základe meniaceho sa pohľadu na ALS ako na ochorenie aj na črevný mikrobióm ako na dôležitý faktor prispievajúci k zdraviu a chorobe, sa výskum mikrobiómu stáva čoraz dôležitejším pre pochopenie patofyziológie ALS. Hoci skúmanie prepojenia mikrobiómu a ALS je len v začiatkoch, v súčasnosti patrí k najatraktívnejším trendom v oblasti výskumu patofyziológie ALS. K tomuto záujmu výrazne dopomohlo pochopenie významu zapojenia periférie do rozvoja ALS, o ktorej sa donedávna predpokladalo, že sa obmedzuje iba na CNS.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore grantu UK/284/2022.

Literatúra

- [1] Kiernan, *Lancet* (London, England). **2011**, 377:942-955.
- [2] Marin, *Int. J. Epidemiol.* **2017**, 46(1):57-74.
- [3] Sharon, *Cell.* **2016**; 167:915-932.
- [4] Rooks, *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, 16:341-352.
- [5] Sun, *J. Intern. Med.* **2021**, 290:758-788.
- [6] Martin, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, 12:839526.
- [7] Veena Taneja, *Academic Press*, **2017**, pp. 569-583, ISBN 9780128035061
- [8] Charbonneau, *Nature.* **2016**, 535:48-55.
- [9] Braak, *Nat. Rev. Neurol.* **2013**, 9:708-714.
- [10] Wang, *Neurotoxicology.* **2017**, 61:101-130.
- [11] Blacher, *Immunol.* **2017**, 198:572-580.
- [12] Blacher, *Nature.* **2019**, 3802(572):474-480.
- [13] Burberry, *Nature.* **2020**, 582:89-94.
- [14] Nicholson, *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* **2021**, 22(3-4):186-194.
- [15] Zhang, *Clin. Ther.* **2017**, 39(2): 22-36.
- [16] Turnbaugh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2010**, 107(16):7503-8.
- [17] Rowin, *Physiol. Rep.* **2017**, 5(18):e13443.
- [18] Ngo, *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* **2021**: 549-62:2020.
- [19] Lozupone, *Nature.* **2012**, 489:220-230.
- [20] Sun, *Eur. J. Neurol.* **2019**, 26:1355-1361.
- [21] Quraishi, *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2017**, 46:479-493.
- [22] Bouri, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2018**, 21(5):405-410.
- [23] Ngo, *Amyotroph. Lateral. Scler. Frontotemporal Degener.* **2020**, 21(7-8):549-562.
- [24] Macia, *Nat. Commun.* **2015**, 6:6734.
- [25] Wong, *ASM Journals mSystems.* **2019**, 4(3).

Biologické toxíny ako zbrane

Neuschlová, M.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav mikrobiológie a imunológie, Martin
martina.neuschlova@uniba.sk

Abstract

Biological toxins are a heterogeneous group of substances produced by living organisms and have toxic effects on other living organisms. Many toxins affect the nervous system by interfering with the transmission of nerve impulses. Other toxins are responsible for blocking cell metabolism, causing cell death. Most toxins act very quickly and low doses can lead to death. For these reasons, they are attractive to terrorists and can be misused in bioterrorism. The main goal of this review was to describe biological toxins as potential biological weapons of bioterrorism and biowarfare, their high toxic potential, general characteristics and mechanisms of action.

Keywords: biological toxins, bioterrorism, biological weapons

Úvod

Použitie biologických zbraní v biologickej vojne a bioterorizme bolo zaznamenané už v dávnej minulosti. Ohrozenie ľudí, zvierat, rastlín, ale aj životného prostredia predstavovalo prostriedok ako presadzovať mocenské, politické, náboženské, ideologické a rôzne iné požiadavky jednotlivcami, skupinami či celými štátmi [1]. Použitie biologických zbraní vo vojenských konfliktoch alebo teroristických útokoch je jedinečné tým, že na rozdiel od iných zbraní hromadného ničenia, sú biologické agensy schopné pomnožiť sa živom organizme a tým znásobovať časom ich účinok. Výnimkou sú však toxíny, ktoré sa v napadnutom organizme nereprodukujú [2]. V roku 1972 bol vypracovaný Dohovor o zákaze bakteriologických (biologických) a toxínových zbraní a o ich zničení (BTWC), ktorý vstúpil do platnosti v roku 1975. Zakazuje vývoj, výrobu, hromadenie a transfery týchto agensov v druhoch a množstvách, ktoré nie sú opodstatnené pre profylaktické, ochranné a iné mierové účely [3].

Bioterorizmus a biologická vojna

Použitie toxínov je najstarší známy spôsob vedenia biologickej vojny [3]. Ľudia už od úsvitu civilizácie používali jedy na atentáty nielen proti nepriateľom, ale aj proti celým armádam [4]. Medzi najstaršie známe prípady použitia biologických zbraní vo vojnách patria udalosti z obdobia 6. storočia pred Kristom, kedy Asýrčania používali námeľové alkaloidy na otrávenie studní nepriateľov, známe je tiež používanie šíпов, ktoré Skýtski lukostrelci infikovali tak, že ich ponárali do rozkladajúcich sa tiel jedovatých hadov, ľudskej krvi a výkalov, ktoré nechávali hniť v zapečatených sudoch. Zmes obsahovala najmä klostrídie (*Clostridium perfringens* a *Clostridium tetani*) a ich toxíny [5].

Bioterorizmus je akékoľvek použitie vírusov, baktérií, húb, parazitov a toxínov mikroorganizmov za účelom vyvolania smrti, prípadne trvalého alebo dočasného poškodenia zdravia ľudí. Je to forma terorizmu, ktorá využíva biologické agensy ako zbrane proti ľuďom, ale aj zvieratám a rastlinám s cieľom vyvolať ohrozenie verejného zdravia obyvateľstva, vyvolať strach a masovú paniku, zničiť zásoby potravín, vodných zdrojov, destabilizovať štáty. Vysoký počet zasiahnutých vedie k extrémnemu náporu na systém zdravotnej starostlivosti. Ide o mimoriadne nebezpečný kriminálny čin [5].

Biologická vojna je zámerné použitie biologických agensov ako zbraní vo vojne. Ich použitie poskytuje niekoľko výhod oproti iným konvenčnejším zbraniam, pretože aj nepatrné množstvá môžu spôsobiť hromadné straty alebo úmrtia v závislosti od použitých agensov [5]. Mnohé toxíny sa dajú relatívne ľahko získať, bez väčších problémov ukryť v malých fľaštičkách a ľahko prepraviť, môžu sa dostať do vody alebo vzduchu a rozšíriť sa v krátkom čase do rozsiahlych oblastí, pôsobia rýchlo a smrteľne v nízkych dávkach [1].

Klasifikácia biologických agensov na základe rizika pre národnú bezpečnosť

Viaceré organizácie vytvorili zoznamy, ale najpoužívanejšia je klasifikácia podľa Centra pre kontrolu a prevenciu chorôb (CDC), ktorá delí potenciálne bioteroristické agensy do troch kategórií (A, B, C) v závislosti od spôsobu prenosu, súvisiacej chorobnosti a úmrtnosti a od schopnosti masovej produkcie týchto agensov [2, 6].

Kategória A – zahŕňa agensy s najvyššou prioritou, ktoré sa ľahko šíria z človeka na človeka, spôsobujú vysokú mortalitu, majú veľký vplyv na verejné zdravie, spôsobujú verejnú paniku a spoločenský rozvrat, vyžadujú si spustenie špeciálnych činností vo verejnom zdravotníctve a pripravenosť na takéto situácie [2, 6, 7].

Kategória B – zahŕňa agensy druhej najvyššej priority, v porovnaní s kategóriou A sa nešíria tak ľahko, spôsobujú miernejšiu chorobnosť a nižšiu mortalitu, vyžadujú si však špecifické úsilie na vytvorenie diagnostickej kapacity a zabezpečenie zvýšeného dohľadu nad chorobami [1, 2, 5].

Kategória C – zahŕňa agensy tretej najvyššej priority, objavujúce sa patogény, ktoré by mohli byť zneužitú po úprave na masové rozšírenie, pretože sú dostupné, ľahko sa vyrábajú a šíria, spôsobujú vysokú chorobnosť a mortalitu [2, 5].

Toxíny sú biomolekuly produkované baktériami (baktériové toxíny), mikroskopickými hubami (mykotoxíny), makroskopickými hubami (hubové toxíny), fytoplanktónom a nižšími rastlinami (fytotoxíny), ale aj rastlinami (fykotoxíny) a živočíchmi (zootoxíny) [3, 8] a slúžia im ako ich obranné mechanizmy. Po preniknutí do iných organizmov vyvolávajú škodlivé účinky najmä v oblasti nervového systému, čo vedie k narušeniu prenosu nervových vzruchov (napr. blokujú uvoľňovanie acetylcholínu na nervosvalových spojeniach a vyvolávajú paralýzu kostrových svalov). Pri poškodení bunkových membrán dochádza k poruchám funkcie tkanív a orgánov. Účinky toxínov sú často nezvratné a spôsobujú závažné, zvyčajne trvalé poškodenie zdravia. Smrtiaci potenciál biologických toxínov sa meria ako množstvo toxínu potrebného na usmrtenie 50 % exponovaných jedincov z testovanej skupiny zvierat (potkanov alebo myší). Označuje sa LD₅₀ a závisí pre daný toxín od druhu exponovaného organizmu a spôsobu vniknutia do organizmu [1, 3]. Na rozdiel od mikroorganizmov sa toxíny nereplikujú a nie sú infekčné [1]. Preto sa okrem štandardných preventívnych opatrení nevyžaduje použitie špeciálnych ochranných prostriedkov zdravotníkmi [7].

Charakteristika vybraných toxínov ako biologických zbraní

Biologické zbrane, ktoré sú založené na toxickom účinku toxínov, majú osobitné postavenie. Ich vojenské alebo teroristické zneužitie je zamerané na vyvolanie hromadnej intoxikácie. Toxíny je možné použiť vo forme aerosólu, kontaminovaním potravín, vody, ale preniknúť do organizmu môžu aj neporušenou kožou. Neprenášajú sa z človeka na človeka, ovplyvnia iba tých, ktorí im boli priamo exponovaní, v zasiahnutom organizme sa nereplikujú. Keďže sa nedajú kultivovať a otrava sa často prejavuje nešpecifickými klinickými príznakmi, diagnostika sa stáva oveľa zložitejšou

[7]. V závislosti od trvania expozície alebo frekvencie opakovania expozície môže dôjsť k akútnej alebo chronickej intoxikácii. Akútna toxicita predstavuje toxický účinok po aplikácii jednej alebo niekoľkých dávok toxínu v krátkom čase. Chronická toxicita vedie k poškodeniu organizmu pri opakovanom dlhodobom podávaní toxínu v malých dávkach. V rámci zneužitia toxínov ako biologickej zbrane je rozhodujúca akútna toxicita [3]. Kvôli vysokej toxicite, ľahkej výrobe a ľahkému šíreniu sa niektoré toxíny môžu stať biologickými zbraňami. Do klasifikácie CDC sú ako potenciálne bioteroristické agensy zahrnuté nasledovné toxíny: do kategórie A botulotoxín z *Clostridium botulinum* ako najsilnejší toxín v prírode, do kategórie B stafylokokový enterotoxín B zo *Staphylococcus aureus*, toxín epsilon z *Clostridium perfringens* a ricín zo semien rastliny *Ricinus communis* [5, 7].

Botulotoxín – kategória A

Je to najtoxickájšia známa látka na svete, proteínový toxín produkovaný *Clostridium botulinum*. Je to A-B toxín, blokuje prenos signálu na periférnych cholinergických synapsách, vedie k paralýze kostrových svalov (chabej obrne). Klinicky sa prejavuje spočiatku ťažkosťami s prehĺtaním, rečou, dvojitým a rozmazaným videním, nedostatkom slín a slz, úzkosťou, stratou kontroly nad telom. V poslednej fáze sú paralyzované dýchacie svaly, hlavne bránica, dochádza k uduseniu pri plnom vedomí. Mohol by byť použitý vo forme aerosólu, toxických striel pre ručné zbrane alebo prostredníctvom otrávenej vody alebo potravinami. Bioteroristický útok botulotoxínom je ťažké identifikovať, jeho účinnosť je rovnako vysoká bez ohľadu na cestu vstupu, pretože má takmer identické prejavy intoxikácie. V podstate len zvýšenie počtu ľudí s príznakmi otravy by mohlo naznačovať, že bol použitý pri útoku [1, 2, 7].

Stafylokokový enterotoxín B – kategória B

Toxín produkovaný *Staphylococcus aureus*, patrí medzi superantigény a môže vyvolať syndróm toxického šoku. V závislosti od množstva toxínu a vnímavosti jedinca spôsobuje za 2-4 hodiny po požití enterotoxikózu s horúčkou, hnačkami a vracaním. Veľmi silná alimentárna intoxikácia môže viesť k dehydratácii a smrti. Ako biologická zbraň môže byť zneužitý vo forme aerosólu, v ktorom je aj dostatočne stabilný, tepelne odolný. Po inhalácii má zneschopňujúci účinok, postihnutý jedinec nie je schopný vykonávať prácu najmenej 2 týždne. Pri inhalácii vysokých dávok môže viesť k syndrómu akútnej respiračnej tiesne (ARDS), edému pľúc, šoku, multiorgánovému zlyhaniu a smrti do 40-60 hodín [1, 2, 7].

Ricín – kategória B

Toxín pochádzajúci z rastliny *Ricinus communis*. Je to A-B toxín, vysoko toxický pre živočíšne bunky, inhibuje proteosyntézu. V biologickej vojne môže byť zneužitý vo forme aerosólu, toxických striel, otrávených zdrojov pitnej vody a potravín. Dá sa ľahko pripraviť vo veľkom množstve, vo forme aerosólu je stabilný, ľahko sa skladuje. Klinické účinky závisia od spôsobu jeho vniknutia do organizmu. Pri inhalačnej otrave nastáva edém pľúc, ťažký zápal spojoviek a smrť v priebehu 36-72 hodín. Je to najnebezpečnejšia forma. Pri požití vzniká gastrointestinálna otrava, pri injekčnom podaní vzniká parenterálna forma so závažnými lokálnymi nekrózami svalstva a uzlín. Zneužitie ricínu bolo zdokumentované pri likvidačných vraždách v niekoľkých zdokumentovaných prípadoch alebo pokusoch [1, 3, 7, 9].

Epsilon toxín *Clostridium perfringens* – kategória B

Viaže sa na membránu eukaryotických buniek, indukuje tvorbu pórov a zvyšuje priepustnosť buniek pre malé molekuly a ióny. Vede k veľmi rýchlym degeneratívnym a nekrotickým zmenám v bunkách a k zlyhaniu orgánov [1]. K intoxikácii môže dôjsť kontaminovanou vodou, potravou, alebo prostredníctvom aerosólu. Po vdýchnutí vzniká edém pľúc, šírenie do iných orgánov, poškodenie obličiek, pečene, kardiovaskulárneho systému a CNS s neurologickými príznakmi, nastáva edém mozgu, strata vedomia, kŕče a smrť do niekoľkých hodín [1, 3, 7].

Prehľad ďalších toxínov, ktoré prichádzajú do úvahy pri výrobe biologických zbraní je uvedený v tabuľke 1.

Tabuľka 1 Prehľad toxínov použiteľných v biologických zbraniach [1-3, 5, 7-9]

Toxín / pôvod toxínu	Účinok/vlastnosti toxínu
Trichotecénové mykotoxíny / mykotoxíny produkované plesňami	inhibujú proteosyntézu, majú pľuzgierotvorný účinok, vedú k znieschopneniu zasiahnutých osôb, poškodeniu očí, krvácaniu z ďasien, nosa, k neurologickým príznakom, môžu viesť k smrti
Šigatoxín / proteínový toxín z baktérie <i>Shigella dysenteriae</i>	inhibuje proteosyntézu, poškodzuje endotel ciev, spôsobuje hemoragickú kolitídu a hemolyticko-uremický syndróm
Sarafotoxíny / peptidové toxíny z jedu hadov čeľade <i>Atractaspididae</i>	majú kardiotoxické účinky, spôsobujú vazokonstrikciu, zvýšenie krvného tlaku, bledosť, poruchy vnímania, kolísajúcu úroveň vedomia, celkovú slabosť, opakované zvracanie, vodnaté hnačky
Abrín / fytotoxín z rastliny <i>Abrus precatorius</i>	silnejší toxický účinok ako ricín, silné bolesti brucha, zvracanie, hnačky, krvácanie z GITu, zlyhanie obličiek, po vdýchnutí pľúcny edém, hemolýza erytrocytov
Modeksín / fytotoxín z koreňa afrického sukulentu adenia prsnatá (<i>Adenia digitata</i>)	inhibuje proteosyntézu, má podobný účinok ako abrín a ricín, dominujú centrálné účinky
Viskumín / fytotoxín z imela bieleho (<i>Viscum album</i>)	inhibuje proteosyntézu, má podobný účinok ako abrín a ricín, dominujú cytotoxické účinky
Saxitoxín / fykotoxín produkovaný modrozelenými morskými riasami <i>Saxidomas giganteus</i>	neurotoxín, vyvoláva závrate, pocit drevenenia prstov, perí a jazyka, poruchy svalovej koordinácie, smäd, paralýzu, obrnu dýchacieho systému a smrť do niekoľkých minút
Anatoxín-A / fykotoxín produkovaný sinicami	pôsobí ako agonista na acetylcholínových receptoroch, viaže sa na ne irreverzibilne, veľmi rýchlo usmrcuje a príznaky sa vyvinú do 5 minút, rýchlejšie ako saxitoxín
Tetrodotoxín / fykotoxín produkovaný niektorými cyanobaktériami (morský fytoplanktón)	intoxikácia perorálne, vdýchnutím alebo absorpciou cez neporušenú kožu, blokuje nervový prenos, vedie k trpnutiu a znecitliveniu špičky jazyka, pier a postupne celých úst, kŕče svalov, slinenie, nastáva potenie, slabosť, závraty, zvracanie a pocit neodvratnej smrti
Aflatoxíny / mykotoxíny z toxigénnych kmeňov <i>Aspergillus flavus</i>, <i>A. parasiticus</i>	intoxikácia alimentárna alebo inhalačne, inhibuje energetické procesy v bunkách, vedie k hepatorenálnemu poškodeniu a poškodeniu CNS

Záver

Mnohé toxíny sa môžu stať potenciálnou biologickou zbraňou pre ich vysokú toxicitu, krátku inkubačnú dobu, ľahkú výrobu, jednoduché šírenie a dobrú stabilitu v prostredí. Špecifické charakteristiky toxínov sťažujú diagnostiku a na zabezpečenie účinného manažmentu je potrebné mať všeobecné znalosti o klinických príznakoch otráv vysoko nebezpečnými toxínmi. Identifikovanie väčšieho počtu predtým zdravých jedincov s klinickým príznakmi v neprítomnosti známeho vyvolávateľa by malo vyvolať podozrenie na pravdepodobnú expozíciu toxínu.

Práca bola podporená projektom KEGA č. 038UK-4/2019.

Literatúra

- [1] Frischknecht, *EMBO Rep.* **2003**,4(1):S47-52.
- [2] Janik, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20(5):1181.
- [3] Oliveira, *Forensic. Sci. Int.* **2020**, 314:110366.
- [4] Nováková, *PRO*, **2007**, 141 s. ISBN 978-80-89057-18-4
- [5] Berger, *Disaster and Mil. Med.* **2016**, 2:7.
- [6] Klement, *PRO*, **2011**, 664 s., ISBN 978-80-89057-29-0
- [7] Klement, *Bonus*, **2007**, 380 s., ISBN 978-80-969733-2-3
- [8] <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>; Updated May 15. **2022**.
- [9] Durdiak, *Ministerstvo obrany SR*, **2005**, 262 s., ISBN 80-88842-76-X

Towards understanding the principles of life Short Review

Adamkov, M.¹, Mestanová, V.¹, Hurta Csizmar, S.¹, Krajnakova, B.¹, Rajčáni, J.¹

¹Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Department of Histology and Embryology, Martin, Slovakia
marian.adamkov@uniba.sk

Abstract

The principles of life are difficult to assess, but describing their typical features seems relatively easy, especially regarding a living cell. Regardless of whether the cell exists as a single microorganism or as a part of a multicellular body, it consists of organic macromolecules, i.e. proteins and nucleic acids. The function of any cellular protein is determined by its composition, with special regard to the order of the amino acids forming the polypeptide sequence. The valuable information concerning this order is stored in the deoxyribonucleic acid (DNA) molecule filling the nucleus. The individual genes exhibit those sections of the twisted double helix which undergo transcription, being located in the so-called coding strand. The transcripts are spliced to form the final messenger ribonucleic acid (mRNA) molecule, which is, as a rule, translocated to the cytoplasm. This is inevitable for accomplishing the synthesis of individual polypeptides at the cytoplasmic ribosomes. Our hypothesis reflects the old notion claiming that the above-described direction of transcription follows regularly from DNA to RNA. The opposite called reversed transcription is a rare event rather related to the process of evolution. Both, the nucleus as well as cytoplasm including the cellular organelles are wrapped by a lipid bilayer, which represents the essential component of the cellular membrane system. Due to this arrangement, all chemical reactions within either of the cellular compartments proceed under standardized conditions.

Keywords: cell membranes, organelles, macromolecules, the polypeptide composition

Introduction

Life is closely associated with a well-regulated system of cellular macromolecules, namely proteins and nucleic acids, the interactions of which are believed to take place under stable conditions. A brief definition of life might be rather controversial, even though its correct features can be recognized [1]. These are the following: 1. cellular metabolism based on the uptake and/or turnover of chemical substances (either organic or inorganic) associated with own energy production; 2. standard concentration of important ions, especially sodium and potassium, kept within both cellular compartments; 3. transportation of required chemical substances among the cell compartments, aiming to supply the sites of actually running chemical reactions; 4. renewal of own cellular structures in order to remove the impaired areas, i. e. replacing deterioration occurring due to aging; 5. reproduction of the cell as such, i.e. its capability to synthesize its own structural components, including the whole system of cellular molecules; 6. perception, i.e. ability of each chain of structural protein components to transfer the signal elicited by binding of an external substance to the corresponding surface receptor; 7. cell adaptation, meaning that all aforementioned interactions of cellular components have been modified during evolution in a way of getting upmost appropriate to the conditions of external environment; 8. selection of the best fitting

cells and removal of the less suitable ones, to achieve a long term optimisation of each of differentiated cells; 9. evolution, i.e. fixation of the outcome of selection of the best adapted cells by each particular species in order to assure the improved development for the next future.

Statement of the hypothesis

Our hypothesis assumes that multicellular organisms are composed of cells revealing a different grade of development. Even in adults, the tissues and organs possess such pluripotent stem cells in addition to the differentiated (specialised) ones. The stem cells serve as reservoirs capable to supply the tissues with newly formed differentiated cellular components, i.e. replacing those which underwent apoptosis and/or necrosis. Stem cells express several regulatory proteins, also called transcription factors, which bind to special motifs of the promoter sequence located at the front of any individual gene. A balanced expression of transcription factors such as Oct4, Sox2 and/or Nanog helps to maintain their pluripotent state [2-4]. Overexpression of any of them (especially of Sox2) may contribute to cell transformation and hence promote tumour formation [5, 6].

Evaluation of the hypothesis

The cells exist either as single monocellular microorganisms or represent the smallest entity of the body of a multicellular organism [7]. The notion that fixed cells used in histological work closely resemble the living ones has been widely accepted. The novel data which have been recently accumulated due to the achievements in molecular biology essentially contributed to improved interpretations of both, the composition as well as the function of cellular structures [8]. Additional knowledge has originated from details recently described by modern electron microscopy [9] along with the achievements of overwhelming immunohistochemical investigations [10, 11]. The interdisciplinary approach for any scientific approach should reach beyond the limits of classical specialisation. For example, the description of the quick axonal transport allowing the bidirectional movement of the molecular cell components can be recognized in advance of sophisticated experiments based on special techniques [12]. From the times of Virchow, i.e. since the second half of the 19th century, there has been accepted that in the majority of diseases caused by impaired functioning of individual organs, the pathological changes as such first occur in individual cells. Definition of necrosis (i.e. accidental/uncontrolled cell death) in contrast to apoptosis (i.e. programmed/regulated cell death) was an important achievement of cellular pathology [13-15]. This important step allowed us to assess the real nature of lesions seen at histopathological examination [16]. The elimination of a group of quickly destroyed dead cells, as a rule, is mediated by cytokines inducing classical inflammation. The outcome of necrosis certainly differs from that of apoptosis, which relies on the removal of particular damaged cells from otherwise healthy tissue [17]. Apoptosis is a fundamental process for the maintenance of normal tissue homeostasis. It requires a precisely regulated balance between cell proliferation and cell demise [18]. At the beginning of apoptosis, the loss of water escaping from the cytoplasm causes cell shrinkage [19]. They become smaller in size, the cytoplasm is dense and the organelles are tightly packed. Mitochondria remain functional in the late apoptotic process [20, 21]. Cell surface specializations are lost, e.g. microvilli and cell junctions disappear. The cell destined for apoptosis becomes irregular in shape since blebbing and/or "budding" of its surface (plasma) membrane occurs, which is later on followed by karyorrhexis and fragmentation at least of a cytoplasm portion [22, 23]. So-called

apoptotic bodies are formed either with or without nuclear remnants, which are enclosed by an intact lipid bilayer. Before fragmentation and apoptotic body formation, affected cells seem to be surrounded by an unstained “halo” (Figure 1). The smaller cells such as lymphocytes usually do not fragment, since the integrity of their organelles is maintained. The last step of the apoptotic process is the removal of apoptotic bodies [24, 25]. The final stage hallmark is a phospholipid asymmetry including the presence of phosphatidylserine moieties on the surface of apoptotic cells. Phosphatidylserine is normally located on the inner plasma membrane surface, however during apoptosis redistributed to the outer surface, so that it marks the apoptotic cell, allowing its recognition by phagocytes such as macrophages possessing the appropriate surface receptors [26, 27]. Externalization of phosphatidylserine can be detected by immunohistochemistry, e.g. by Annexin V (Figure 2) [15, 28]. The removal of apoptotic fragments is efficient enough without the release of cellular constituents which would result in an inflammatory response [29, 30].

Table 1 Differences between apoptosis and necrosis

	Apoptosis	Necrosis
Cell size	shrinkage	enlargement
Cell membrane	blebbing of the intact lipid bilayer	interruptions of the lipid bilayer, escaping cytoplasmic organelles
Cytoplasmic organelles	preserved	soaked and enlarged
Chromatin (nucleus)	condensation and margination	preserved
Late-stage	apoptotic bodies	cell lysis and disruption

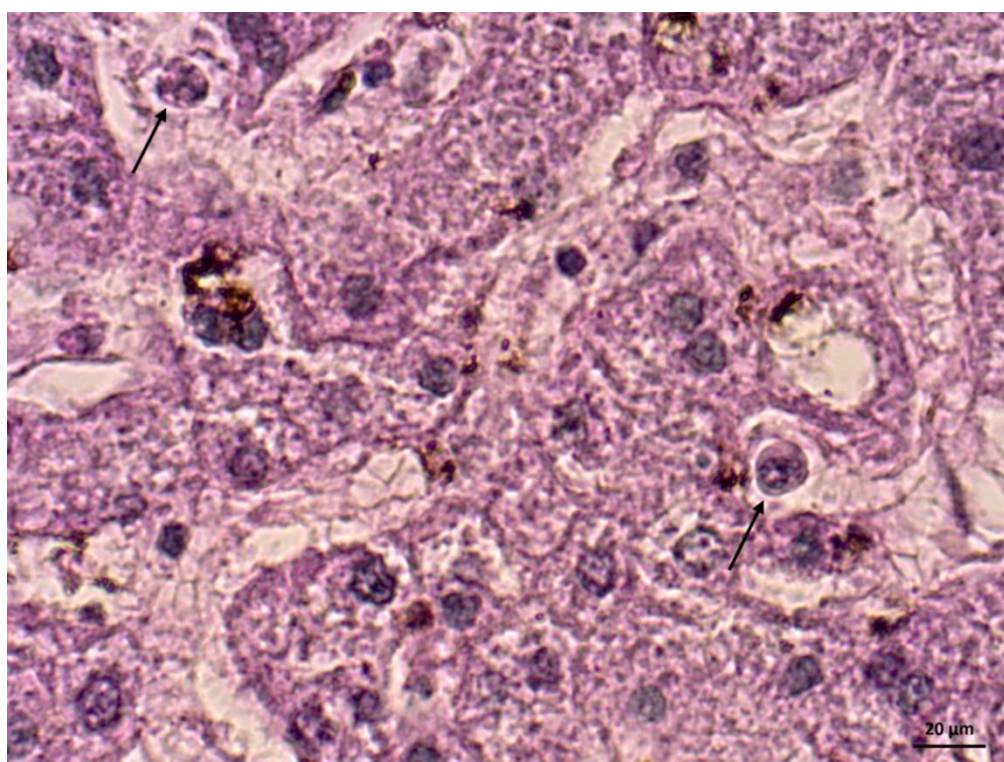


Figure 1 Apoptotic cells in human liver (arrows), hematoxylin-eosin

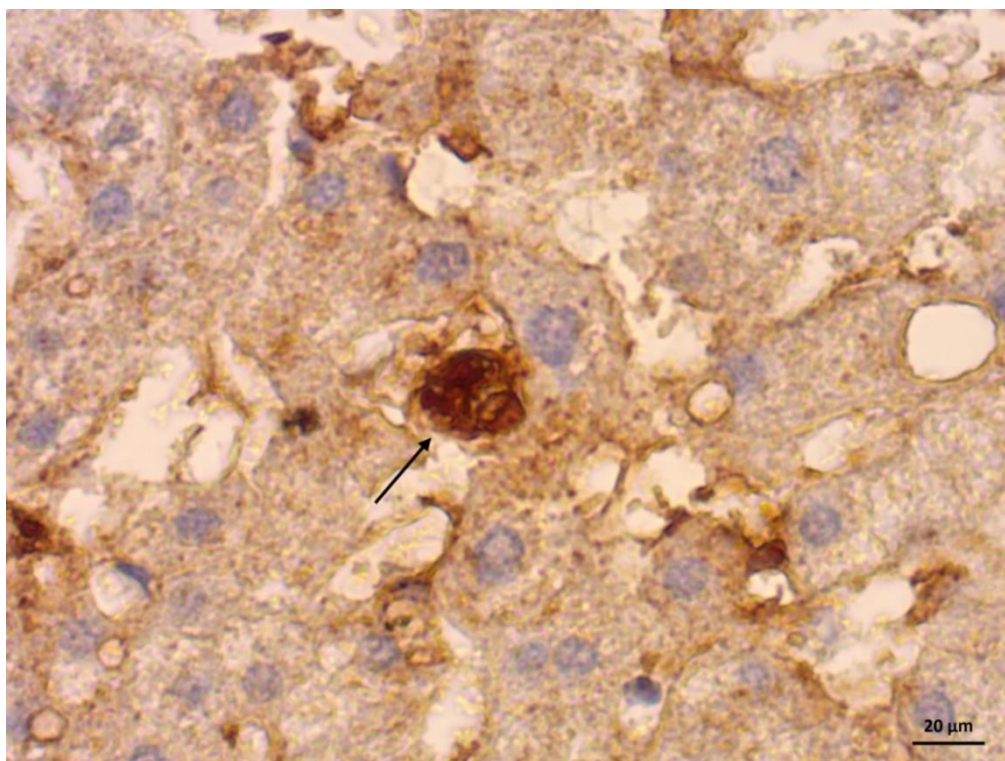


Figure 2 Apoptotic cell in human liver, immunohistochemical reaction with Annexin V (arrow)

One of the most characteristic features of apoptosis is a condensation of chromatin referred to as pyknosis [31]. At this stage the nuclear chromatin undergoes lysis since the DNA double-strand (dsDNA) is cleaved into small units called nucleosomes, consisting of separated DNA fragments and still adhering histone proteins [32, 33]. In the foetus, undesired cells can be removed by apoptosis as well; thus, apoptosis represents an important regulatory tool also in a course of normal prenatal development [34]. In postnatal life, when the mammalian body grows daily by adding up to 10^{10} of the „fresh” cells, a great number of potentially unuseful cells must be removed, namely, those which are either highly aged, defective and/or otherwise damaged [35]. The hallmarks distinguishing apoptosis from cell necrosis are summarized in Table 1. A very special form of cell death also called autophagy [36], occurs utilizing the membrane-derived lipid bilayer which surrounds a group of organelles destined for removal. The vesicles generated this way are also called phagosomes. They may interact with a special kind of vesicles called lysosomes delivering enzymes capable of cleavage of the phagosomal contents [37, 38].

It is well known that each protein is built from amino acids, the correct position of which is constant for the given polypeptide chain. The amino acid order which determines the properties of any protein molecule is the most essential information harboured in the sequence of the dsDNA [39]. The section of the dsDNA chain which encodes the polypeptide has been termed a *gene* long before the structure of the DNA molecule has been recognized. The key unit for encryption and/or retrieval of this information is the nucleotide triplet, also referred to as a codon, a standard combination of always 3 nucleotides. With an exception of methionine, to each of 19 additional amino acids, more than 1 codon has been related. Taken together, 20 amino acids (along with a stop signal for recognition of the polypeptide end) are specified by 64 codons [40, 41]. The resulting genetic code seems to save the information capable of directing the

synthesis of up to 35 000 different protein molecules building the human body out of the estimated total 100 000 presents in all the living creatures [8]. This great variety of protein molecules has successfully evolved over several billion years. An essential event for the synthesis of the first polypeptide was the appearance of a primitive membrane-bound already cell-like structure fulfilling the demand of the microenvironment, in which the interaction between transcribing protein (RNA polymerase) and RNA could repeatedly take place under standardized conditions. The microenvironment for creating the future cell precursor became separated from the ancient seawater, which covered the crust of the slowly cooling „blue” planet. The essential event was the formation of the lipid membrane bilayer, the exact origin of which is still poorly understood [42]. In the interior of the primitive cell, some of the proteins present have become specialized for catalysing chemical reactions. The special proteins later termed enzymes, became capable of bringing the individual substrates participating in each chemical reaction into close contact. The enzymes catalyse reactions which otherwise may not occur in their absence. The reacting substrates are bound to specific domains of the enzyme molecule, which configuration has been modified for substrate binding. An additional domain allows the reaction itself to proceed. It comes from these considerations, that the polypeptide configuration of each enzyme not only provides the specific binding sites but also the reaction domain allowing the chemical interaction(s) to proceed. The latter domain is frequently hidden and inactive but gets activated by cleaving off a short oligopeptide chain needed to activate the enzyme function. Important to emphasize that such a complicated configuration change involved in the enzyme activation is an energy-consuming process. The energy is donated from the adenosine triphosphate (ATP), an energy-storing substance, which last phosphate moiety is bound by a high energy bond. The released phosphate is further transferred by a stepwise chain of phosphorylation events. These occur upon extracellular signalling launched by a surface receptor, at which the cascade of intracellular phosphorylation events starts [4].

The origin of life on the planet Earth is a scientific problem, which has not yet been solved [43]. The main hypothesis supports the idea that RNA pre-dated the current DNA molecule forming the chromatin substance. As stated by the so-called RNA world hypothesis, the latter is also able to recognise and store genetic information, as DNA does [44]. In addition, the „ancient” RNA could direct chemical reactions when acting as an enzyme. Oparin in his work „The Origin of Life” argued that a "primordial soup" of organic molecules could be created in an oxygen-less atmosphere through the action of sunlight [45]. The first primitive organic molecules could combine in an even more complex fashion until they formed larger and more complex droplets. The origin of proteins is an enigma from the very beginning [46] since the etiology of amino acids is uncertain as well. The suggestion that a glycine precursor could have originated from CH_2O and HCN (i.e. methane + urea + water as well as hydrogen), which reacted in the presence of strong solar energy and/or high temperature is very tempting but has not been experimentally confirmed. Another, rather philosophical problem is a source of information underlying the genetic code, which directs a strongly supervised order of amino acids, being highly specific for each kind of polypeptide molecule. Where the consequent order of amino acids comes from is the question of discussion, but the principle of trial and error (namely that at each position any of the amino acids could have appeared) seems quite improbable due to an excess of improper combinations. The origin of regulatory promoter sequence positioned before gene sequence is another unsolved problem, difficult to explain. A relatively small proportion of genes is being continuously expressed [47]. In the different cells of human and/or mammalian

bodies, the expression of the majority of genes is regulated by a complicated transcription control, cofactors and chromatin regulator system [48, 49].

Discussion and Conclusions

This review is focused on a brief description of the basic features of life in mammalian cells. The uptake and/or release of chemical substances from the environment along with the turnover of ingested ones keeps the cellular metabolism running to produce energy (ATP). Another reason for metabolism is the maintenance of cellular structures and organelles. The specific function of cell proteins is determined by the precise order of their amino acid components. This order represents such important and valuable information that it is stored in the form of genes in DNA molecules. The genes are stretches of the coding strand of the dsDNA sequence. The gene information encoding any protein is first transcribed into RNA molecules, which are spliced to form the final mRNA. The latter is translocated to the cytoplasm to reach the ribosomes, where the translation into the corresponding polypeptide molecule takes place.

In conclusion, our hypothesis stresses that cell differentiation essentially means the transcription of different genes so that the translated information is not the same in various cell types. The specificity of transcription is governed by the so-called transfer factors, which either block and/or activate the association of RNA polymerase complex acting at the promoter region of a given gene, the expression of which may be either suppressed and/or expressed.

The living cell is a well-balanced system of protein to nucleic acid interactions supported by its own energy production. The specificity of proteins is based on the order of amino acids building each polypeptide chain. The corresponding information is stored in genes located at the coding strand of the DNA double helix. The expression of selected genes in different cells is regulated by (co)factors of transcription, the balanced level of which determines the functioning of any particular cell. Pluripotent (stem) cells form a reservoir from which the differentiated cells arise replacing those undergoing apoptosis.

We thank Mrs Jana Visnovcova, Mrs Margareta Kondekova, and Mrs Agata Resetarova for the skilful technical assistance.

References

- [1] Alberts, *Taylor and Francis Group*. **2008**, 1392 s., ISBN 13:978-0815341055
- [2] Liu, *Nat. Cell. Biol.* **2019**, 21:1060-7.
- [3] de Aja, *The EMBO Journal*. **2019**, 38:e9912.
- [4] Rajčáni and Adamkov, *Printing House P+M*, **2020**, 151 s., ISBN 978-80-89694-65-5
- [5] Moon, *Exp. Mol. Med.* **2020**, 52(4):538-547.
- [6] Seo, *DNA Cell. Biol.* **2017**, 36(11):1000-9.
- [7] Alquicira-Hernandez, *Genome Biol.* **2019**, 20:264.
- [8] Darnell, *Nature*. **1982**, 297:365-71.
- [9] Daghistani, *British Journal of Pharmacology*. **2019**, 176:4340-59.
- [10] Adamkov, *Pol. J. Pathol.* **2017**, 68(4):297-305.
- [11] Adamkov, *Acta Histochemica*. **2015**, 117:590-4.
- [12] Guedes-Dias, *Science*. **2019**, 366(6462):eaaw9997.
- [13] Tang, *Cell Research*. **2019**, 29:347-64.
- [14] Adamkov, *Rev. Arg. de Anat. Clin.* **2019**, 11(3):105-6.
- [15] Green, *Cold Spring Harbor*, **2018**, 278 s., ISBN 13:978-1621822141
- [16] Galluzzi, *Cell Death & Differentiation*. **2018**, 25:486-541.
- [17] Fullstone, *Cell Death & Differentiation*. **2020**, 27:2828-2842.
- [18] Adamkov, *Neoplasma*. **2009**, 56(2):130-5.
- [19] Adamkov, *Turany: P+M Turany*, **2017**, 440 s., ISBN 9788089694303

- [20] Bock and Tait, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2020**, 21:85-100.
- [21] Favaloro, *Aging (Albany NY)*. **2012**, 4(5):330-49.
- [22] Wyllie, *Int. Rev. Cytol.* **1980**, 68:251-306.
- [23] Saraste and Pulkki, *Cardiovascular Research*. **2000**, 45:528-37.
- [24] Adamkov, *Srp. Arh. Celok. Lek.* **2019**, 147/1-2:99-104.
- [25] Onal, *MOJ Immunol.* **2016**, 3(1):00073.
- [26] Xu, *Biosci. Rep.* **2019**, 39(1):BSR20180992.
- [27] Fadok, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276:1071-7.
- [28] Kim, *Animal Cells and Systems*. **2020**, 24(1):34-43.
- [29] Elmore, *Toxicologic Pathology*. **2007**, 35(4):495-516.
- [30] Kourtzelis, *Front. Immunol.* **2020**, 11:553.
- [31] Mandelkow, *Anticancer Research*. **2017**, 37:2239-44.
- [32] Kerr, *Br. J. Cancer*. **1972**, 26:239-57.
- [33] Kornberg, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263:1-4.
- [34] Kurosaka, *J. Immunol.* **2003**, 171:4672-9.
- [35] Bowling, *Development*. **2019**, 146(13):dev167486.
- [36] Doherty and Baehrecke, *Nat. Cell. Biol.* **2018**, 20:1110-7.
- [37] D'Arcy, *Cell Biol. Int.* **2019**, 43:582-92.
- [38] Yim and Mizushima, *Cell Discov.* **2020**, 6(6).
- [39] Nagata, *Annu. Rev. Immunol.* **2018**, 36:489-517.
- [40] Dila, *Biosystems*. **2020**, 195:104134.
- [41] Bezerra, *Life (Basel)*. **2015**, 5(4):1610-28.
- [42] Dreamer, *Life (Basel)*. **2017**, 7(1):5.
- [43] Gilbert, *Nature*. **1986**, 319:618.
- [44] Bada, *Earth Planet Science Lett.* **2004**, 226:1-15.
- [45] Oparin, *Dover Publications, Inc.*, **1965**, ASIN: B000M4GYD6
- [46] Crick, *Orig. Life*. **1976**, 7:389-97.
- [47] Ramsköld, *PLoS Comput. Biol.* **2009**, 5(12):e1000598.
- [48] Lee and Young, *Cell*. **2013**, 152(6):1237-51.
- [49] Anderson and Sandelin, *Nat. Rev. Genet.* **2020**, 21:71-87.

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



Agentúra

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

**Vydanie zborníka bolo podporené projektom
VEGA 1/0192/22**