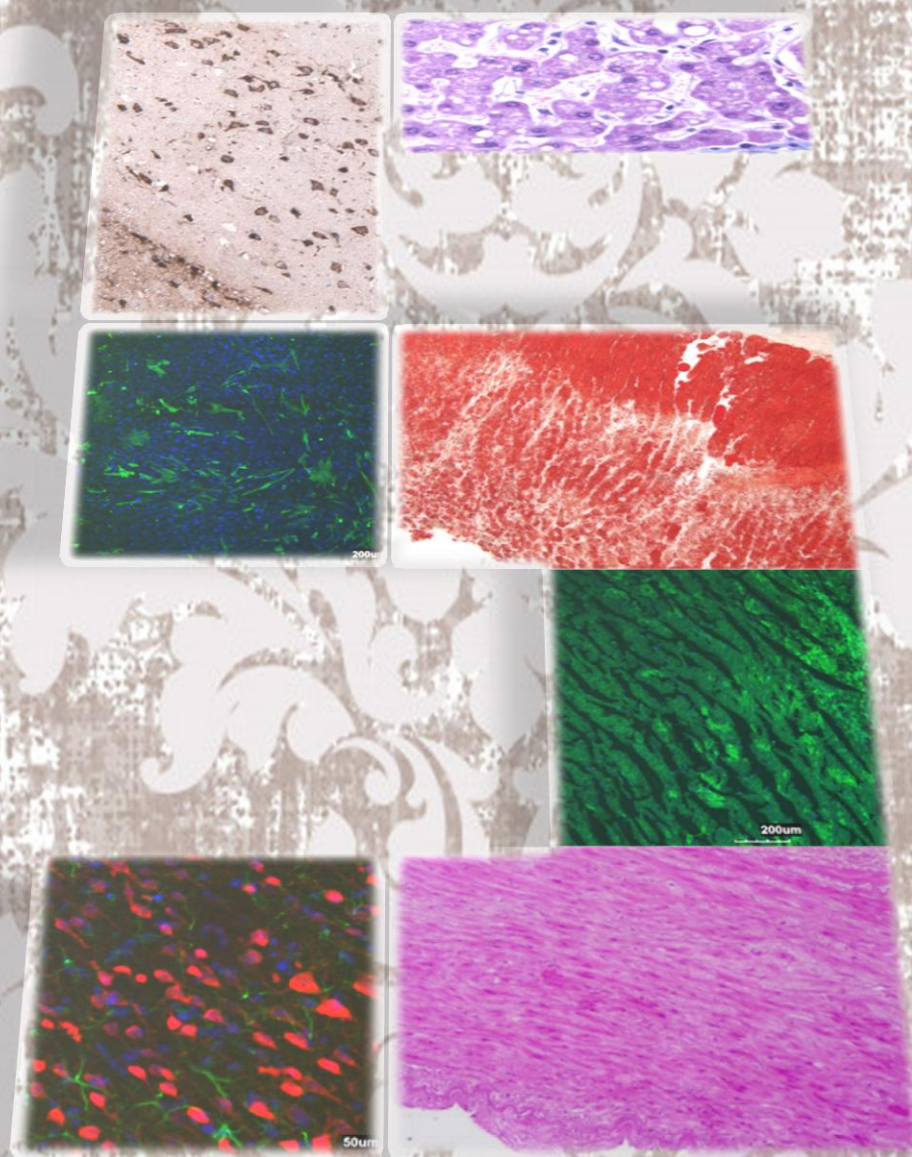




UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSENOVA LEKÁRSKA FAKULTA V MARTINE
Ústav histológie a embryológie



NOVÉ TRENDY A PERSPEKTÍVY V HISTOLÓGII V



Martin 2019

Nové trendy a perspektívy v histológii V

Recenzovaný zborník prác

Zostavovatelia: RNDr. Mária Kovalská, PhD.
prof. MUDr. Marian Adamkov, CSc.

Recenzenti: prof. MVDr. Silvia Rybárová, PhD.
prof. RNDr. Erika Halašová, PhD.
RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

Zborník neprešiel jazykovou korektúrou.

Za obsahovú ako aj gramatickú stránku zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov.

Miesto a rok vydania: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martin, 2019

Počet strán: 106

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

ISBN 978-80-8187-064-4

EAN 9788081870644

Venované pamiatke Doc. MUDr. Kamila Beleja, CSc.



(18.2.1942 - 17.5.2018)

S úctou a láskou spomíname na kolegu a priateľa, ktorý sa svojou vedecko-výskumnou i pedagogickou činnosťou zaslúžil o rozkvet nášho ústavu, ako aj Jesseniovej lekárskej fakulty.

Nulla tenaci invia est via.

(Skyper)

OBSAH

Adamkov M.	<i>Predhovor</i>	5
	KLINICKÉ ŠTÚDIE	
Tupá V.	<i>Význam a expresia SATB2 v kolorektálnych karcinómoch</i>	6
Klinerová B.	<i>Imunohistochemické aspekty karcinómu krčka maternice</i>	10
Baluchová K.	<i>Identifikácia komplexnej hereditárnej mutácie v géne BRCA2 u pacienta s kastrofne rezistentnou formou karcinómu prostaty</i>	14
Dušenka R.	<i>Raritné malígne nádory močového mechúra</i>	18
Weissensteiner J.	<i>Diagnostika kostných metastáz pomocou celotelovej scintigrafie skeletu u pacientov s rôznym histologickým typom karcinómu pľúc</i>	24
Neuschlová M.	<i>Infekčné príčiny erythema nodosum</i>	28
Výbohová D.	<i>Prolymfangiogénny rastový faktor VEGF-C v léziách lichen ruber planus s rôznym stupňom chronického zápalu</i>	32
Kunertová L.	<i>Vaskulárny endotelový rastový faktor a lymfangiogenéza</i>	36
Mešťanová V.	<i>Histomorfologické odchýlky v distribúcií nelymfocytových bunkových populácií a štruktúre týmusu u detí s vrodenými chybami srdca</i>	41
Fejerčák T.	<i>Poruchy prehĺtania po prednej krčnej diskektómii</i>	45
Hanzel R.	<i>Rizikové faktory zanorenia intersomatickej kliecky po prednej krčnej diskektómii</i>	49
Marčeková M.	<i>Retrospektívna analýza zdravotného stavu skupiny detí z okresu Martin</i>	52
	EXPERIMENTÁLNE ŠTÚDIE	
Uramová S.	<i>Účinky Cinnamomum zeylanicum L. v syngénnom 4T1 modeli adenokarcinómu mliečnej žľazy u myší</i>	56
Líšková A.	<i>Vplyv Thymus vulgaris L. na expresiu vybraných miRNA v modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy in vivo</i>	60
Samec M.	<i>Modifikácia metylačného profilu génov účinkom Thymus vulgaris L. v experimentálnej mamárnej karcinogenéze</i>	64
Kubatka P.	<i>Chemické modifikácie histónov v modeli chemicky indukovanej mamárnej karcinogenézy u laboratórnych potkanov: efekt Thymus vulgaris L.</i>	68
Mokrá D.	<i>Hodnotenie edému a apoptózy epitelových buniek pľúc zvierat s aspiráciou mekónia pri pľúca šetriacej pľúcnej ventilácii</i>	72
Holovská K.	<i>Základné morfológické rozdiely v štruktúre pľúc vtákov a cicavcov</i>	76

Andrašková S.	<i>Vplyv mikrovlnného žiarenia na ultraštruktúru Leydigových buniek prenatálne ožiarených potkanov</i>	79
Báľentová S.	<i>Ionizujúcim žiarením vyvolané neurodegeneratívne zmeny v mozgu za experimentálnych podmienok</i>	83
Tóthová B.	<i>Morfologické poškodenie mozgovej kôry a jeho asociácia s homocysteínom vyvolaných zmien v acetylácii histónu</i>	86
Oravcová B.	<i>Vplyv indukovanej hyperhomocysteinémie na progresiu neurohistopatologických zmien s črtami Alzheimerovej choroby</i>	90
Kalenská D.	<i>Experimentálna alergická encefalomyelitída - model pre štúdium roztrúsenej sklerózy mozgomiešnej - sklerózy multiplex (SM) vo vzťahu k ochrannému účinku vitamínu D</i>	94
Lysíková T.	<i>Úloha Annexínu 5 v kardioprotekcii srdca dospelého potkana vystaveného ischemicko-reperfúznemu poškodeniu</i>	101

Predhovor

Základným cieľom predkladaného zborníka „Nové trendy a perspektívy v histológii V“ je podať informácie o výskumných aktivitách morfológických a im príbuzných pracovísk širšej medicínskej komunite. Zostavovateľov zborníka teší fakt, že si táto publikácia získala pozornosť aj klinických pracovníkov, ktorí začali častejšie a pravidelne posilať svoje práce na uverejnenie. Tento rok sme zaradili do tlače až 24 vedeckých článkov. Žiaľ, niektoré práce sme už museli z kapacitných dôvodov odmietnuť, týmto sa ich autorom úprimne ospravedlňujeme. Pevne veríme, že ich budeme môcť uverejniť nasledujúci rok.

Nadalej budeme pokračovať v tradícii, že najhodnotnejšiu prácu v zborníku odmeníme knižnými cenami, ktoré budú odovzdané autorom na Ústave histológie a embryológie JLF na začiatku zimného semestra akademického roka 2019/2020.

prof. MUDr. Marian Adamkov, CSc.

RNDr. Mária Kovalská, PhD.

Význam a expresia SATB2 v kolorektálnych karcinómoch

Tupá, V.¹, Drahošová, S.², Adamkov, M.¹

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

Abstract

This work was designed to determine the significance and expression of SATB2 protein in patients with colorectal cancer (CRC). We examined SATB2 expression in CRC tissues by immunohistochemical staining of 111 samples. We evaluated the correlation of this protein with the clinico-morphological parameters of CRC. SATB2 was detected in 92,8% of cases and we noticed only nuclear localization of immunoreaction. We predominantly observed strong immunoreaction intensity (67,6%). Statistical analysis confirmed a significant association between intensity of immunoreaction and high grade ($p=5,97E-05$), between percentage of positive cells and high grade ($p=0,003$), between intensity of immunoreaction and negative lymph node status ($p=0,017$) and between percentage of positive cells and negative vascular invasion ($p=0,042$). Based on our results SATB2 is overexpressed in CRC and represents a highly sensitive marker for distinguishing CRC from other types of tumors. Moreover, SATB2 expression is associated with good CRC prognosis.

Keywords: SATB2, colorectal cancer, immunohistochemistry

Úvod

Karcinómy tráviaceho traktu sú v porovnaní s nádorovými ochoreniami iných orgánových systémov v celosvetovom meradle incidencie na popredných priečkach. V súčasnosti má medzi karcinómami tráviacej sústavy dominantné postavenie kolorektálny karcinóm (CRC) [1]. CRC predstavuje komplexné nádorové ochorenie, ktoré sa z klinického aj patologického hľadiska vyznačuje značnou heterogenitou [2]. CRC môže byť asymptomatický až do pokročilých štádií, preto dôležitú úlohu zohráva jeho včasná detekcia. Súčasťou diagnostiky a terapie pri CRC je aj špecifikácia rôznych prognostických a prediktívnych parametrov. Pri hodnotení prognózy sa zvyčajne používajú klasické morfológické parametre (grade, stage, stav lymfatických uzlín, vaskulárna invázia a iné) a biologické parametre (napr. K-ras, p53, MSI, BRAF a iné) [2-6].

SATB2 (z angl. Special AT-rich sequence binding-protein) predstavuje proteín viažuci na adenín a tymín bohaté sekvencie a je zložený zo 733 aminokyselín. Zúčastňuje sa remodelácie chromatinu, regulácie transkripcie a diferenciácie neurových buniek, neurónov a osteoblastov [7,8]. Charakterizuje ho tkanivovo-špecifická expresia, pričom je exprimovaný iba v žľazových bunkách dolnej časti gastrointestinálneho traktu. V poslednej dobe sa expresia SATB2 spája s nádormi a to najmä s CRC a s nádormi hlavy, krku a kostí. Práve pri CRC je úloha tohto proteínu najviac preskúmaná a slúži najmä na diferenciáciu od iných typov nádorov. Vysoká expresia SATB2 v CRC je spájaná s dobrou prognózou a na druhej strane nízka je asociovaná s metastázovaním a inváziou nádoru [8-10]. Pri diagnostike CRC je detekcia SATB2 pomocou imunohistochemického vyšetrenia dôležitá, pričom poskytuje vysokú senzitivitu a špecifitu. Navyše, podľa niektorých štúdií,

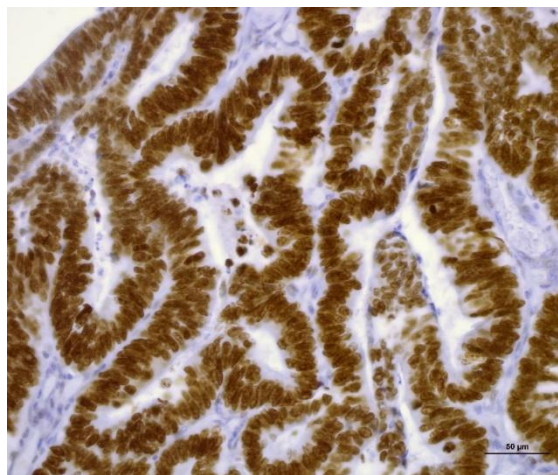
kombinácia SATB2 a CK20 dokáže identifikovať viac než 95% CRC, čo je výhodné pri diferenciálnej diagnostike v rutinej praxi [8, 11].

Materiál a metodika

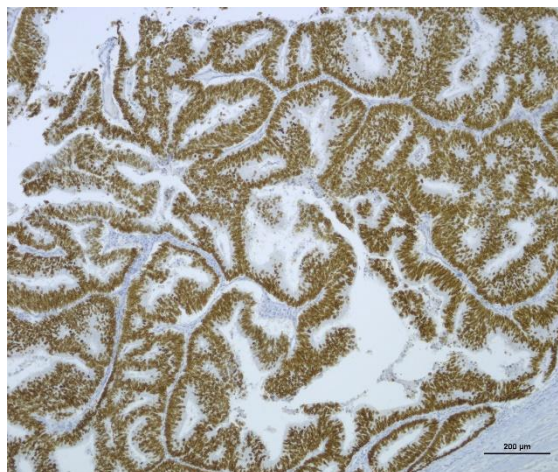
Imunohistochemicky sme vyšetrili parafrínový materiál zo 111 vzoriek CRC. Z každej vzorky boli pripravené 4 μm hrubé rezy na imunohistochemické reakcie na dôkaz SATB2 s použitím automatu Ventana BenchMark® ULTRA (Roche). Monoklonálna protilátka proti SATB2 (klon EP281; Cell Marque, USA) bola riedená v pomere 1:60. Protokol v automate pozostával z deparafrinizácie pri 72°C, kondicionovania buniek s CC1 na 8 minút pri 95°C a inkubácie s UV Peroxidase Inhibitor na 4 minúty. Ďalej nasledovala inkubácia s primárnou protilátkou na 24 minút pri 36°C. Vzorky boli následne inkubované s UV HRP Multimer – 8 minút, s UV DAB Chromogen a UV DAB H₂O₂ – 8 minút, s UV DAB Copper – 4 minúty, s Hematoxylin – 12 minút a s Bluing Reagent – 12 minút. Pri interpretácii získaných imunohistochemických vyšetrení sme semikvantitatívne hodnotili percento pozitívnych buniek, subcelulárnu lokalizáciu a intenzitu imunoreakcie. Štatistické hodnotenie bolo realizované pomocou testu Chi-square (χ^2) v softvéri R (verzia 3.2.3). Výsledky s p-hodnotou pod 0,05 boli považované za štatisticky signifikantné.

Výsledky

Proteín SATB2 bol exprimovaný v 103/111 (92,8%) prípadoch CRC. Pozitívne prípady vykazovali jadrovú pozitivitu. Vo väčšine (75/111; 67,%) vzoriek sme detegovali silnú pozitivitu imunoreakcie (Obr. 1). Slabú pozitivitu sme pozorovali v 6/111 (5,4%) prípadoch a strednú (Obr. 2) sme zaznamenali v 22/111 (19,8%) prípadoch. Prevládali prípady (97/111, 87,4%), v ktorých bolo viac ako 50% pozitívnych buniek. Menej ako 25% SATB2-pozitívnych buniek bolo preukázaných v 2/111 (1,8%) vzorkách a menej ako 50% v 4/111 (3,6%) prípadoch. Chi kvadrát test potvrdil signifikantné asociácie medzi klinicko-morfologickým parametrom grade s intenzitou imunoreakcie ($p=5,97\text{E-}05$) a percentom SATB2-pozitívnych buniek ($p=0,003$). Ďalej boli signifikantné vzťahy zistené medzi stavom lymfatických uzlín a intenzitou imunoreakcie ($p=0,017$). Signifikantne asociovala aj vaskulárna invázia s percentom pozitívnych buniek ($p=0,042$), pričom tendenciu ku korelácii sme zaznamenali aj s intenzitou imunoreakcie ($p=0,064$). Ostatné klinicko-morfologické charakteristiky CRC (vek, pohlavie, stage, lokalizácia lézie) nekorelovali s imunohistochemickými parametrami exprese SATB2 ($p>0,05$).



Obrázok 1 Silná jadrová pozitivita nádorových buniek CRC na dôkaz SATB2.



Obrázok 2 Stredná jadrová pozitivita nádorových buniek CRC na dôkaz SATB2.

Diskusia

V našej štúdii sme imunohistochemicky vyšetrili 111 prípadov CRC. Proteín SATB2 bol exprimovaný v 92,8% prípadov, pričom sme vo všetkých prípadoch pozorovali jadrovú lokalizáciu imunoreakcie. Väčšina CRC vykazovala silnú intenzitu imunoreakcie a pozitivitu vo viac ako 50% buniek. Naše výsledky sú v súlade s viacerými štúdiami, v ktorých zaznamenali rozsah expresie SATB2 v CRC od 85 – 96,8% a vo všetkých prípadoch detegovali jadrovú lokalizáciu imunoreakcie [7,11-13].

Štatistickou analýzou sme zaznamenali signifikantnú asociáciu expresie SATB2 s klinicko-morfologickým parametrom grade, pričom nižší grade bol asociovaný so silnou intenzitou a vyšším percentom SATB2-pozitívnych buniek. Signifikantne asocioval aj stav lymfatických uzlín s intenzitou a vaskulárna invázia s percentom pozitívnych buniek. Negatívne lymfatické uzliny sa spájali so silnou intenzitou imunoreakcie a negatívna vaskulárna invázia s vysokým percentom SATB2-pozitívnych buniek. Ďalšie klinicko-morfologické parametre (vek, pohlavie, stage, lokalizácia lézie) signifikantne nekorelovali s parametrami expresie SATB2. Na základe našich pozorovaní môžeme predpokladať, že vysoká expresia SATB2 je asociovaná s dobrou prognózou u CRC. Wang a kol. [9] vo svojej štúdii zaznamenali signifikantné asociácie medzi expresiou SATB2 a metastatickým postihnutím lymfatických uzlín a stagingom. Naopak, nepozorovali žiadny vzťah medzi SATB2 a vekom, pohlavím, lokalizáciou nádoru a gradingom. Ďalej pozorovali, že SATB2 signifikantne koreloval s celkovým prežívaním pacientov a predstavuje nezávislý prognostický faktor, ktorého nízke hladiny sú asociované so zlou prognózou a progresiou CRC. Eberhard a kol. vo svojej práci detegovali signifikantné asociácie expresie SATB2 s T a N stagingom, gradingom a vaskulárnou inváziou, avšak s vekom, pohlavím a M stagingom korelácie nezaznamenali [12]. Z ich výsledkov rovnako vyplýva, že vysoká expresia SATB2 je nezávislým dobrým prognostickým faktorom u CRC. Zhang a kol. v ich štúdii nepotvrdili žiadne signifikantné asociácie medzi expresiou SATB2 a klinicko-morfologickými parametrami (vek, pohlavie, lokalizácia a veľkosť nádoru, grade, stage) [14]. K tejto diskrepancii mohlo podľa autorov dôjsť na základe heterogenity pacientov a výberu medzných hodnôt pri hodnotení expresie SATB2.

Záver

Mnoho štúdií, ktoré skúmali zapojenie SATB2 do CRC, priniesli konzistentné výsledky, ku ktorým sa prikláňame aj výsledkami našej štúdie. Na základe nich môžeme vyvodiť niekoľko záverov týkajúcich sa úlohy tohto proteínu v CRC. SATB2 je nadmerne exprimovaný v CRC a predstavuje vysoko citlivý marker na rozlíšenie CRC od iných typov nádorov. Zvýšená expresia tohto proteínu je v CRC spojená s dobrou prognózou. Sú však potrebné ďalšie štúdie, pretože klinicko-patologický význam SATB2 a jeho možný mechanizmus v karcinogéze a progresii CRC je stále nejasný.

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

Literatúra

- [1] Vavrečka, *Via pract.* **2010**, 7/1:10-13.
- [2] Duffy, *Eur J Cancer.* **2007**, 43/9:1348-1360.
- [3] Prochotský, *Litera Medica*, **2006**, 652 s., ISBN 80-967189-4-0
- [4] Svobodová, *Anticancer Res.* **2011**, 31:373-378.
- [5] Gonzales-Pons, *BioMed Research International.* **2015**, 2015:1-14.
- [6] Lech, *World J Gastroenterol.* **2016**, 22:1745-1755.
- [7] Dragomir, *Am J Clin Pathol.* **2014**, 141/5:630-638.
- [8] Brocato, *Carcinogenesis.* **2015**, 36/2:186-191.
- [9] Wang, *J Pathol.* **2009**, 219/1:114-122.
- [10] Mansour, *FEBS J.* **2015**, 282/8:1394-1405.
- [11] Magnusson, *Am J Surg Pathol.* **2011**, 35/7:937-948.
- [12] Eberhard, *Br J Cancer.* **2012**, 106/5:931-938.
- [13] Lin, *Arch Pathol Lab Med.* **2014**, 138/8:1015-1026.
- [14] Zhang, *EBioMedicine.* **2018**, 28:62-69.

Imunohistochemické aspekty karcinómu krčka maternice

Klinerová, B.¹, Mešťanová, V.¹, Škuciová, V.²,
Drahošová, S.³, Adamkov, M.¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ²Patológia s.r.o., Martin

³Hermes LabSystems, s.r.o., Bratislava
klinerova2@uniba.sk

Abstract

Cervical cancer is the fourth most common malignant disease in the world. The cause of its formation is frequent failure of genes coding proteins managing signaling pathways involved in proliferation and apoptosis processes. We distinguish three levels of benign pathological changes called cervical intraepithelial neoplasia (CIN) – mild dysplasia (CIN I), moderate dysplasia (CIN II) and severe dysplasia (CIN III). If damaged cells overgrow the entire thickness of the epithelium, they form carcinoma. Squamous cell carcinoma of the cervix is the most common among all cervical cancers. The tumor-suppressor protein PTEN is expressed in the cytoplasm and nucleus of cells. Several studies report its reduced expression in cervical cancer cells correlating with poor disease prognosis. Cytoplasmic localization suppresses the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway promoting tumor cell growth and survival. Nuclear expression of PTEN is involved in maintaining chromosome integrity by controlling DNA repair processes. Survivin represents an anti-apoptotic protein. Protein p16 negatively regulates the Cdk4/6-Rb/E2F pathway and provides retinoblastoma protein (pRb) mediated passage of cells from G1 to the S phase of the cell cycle. Ki-67 is a proliferative marker constitutively expressed in cervical tumor cell nuclei. An unknown protein testin (TES) is present in tumor cells and is probably involved in focal cell adhesion. Immunohistochemical evaluation of the intensity of PTEN, p16, Ki-67 survivin and testin expression in cervical cancer cells can provide a significant shift in the regulation of their function due to its therapeutic benefit in molecular oncology.

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma, PTEN, p16, Ki-67, survivin, testin, immunohistochemistry

Úvod

Z anatomického hľadiska predstavuje krčok (*cervix*) spodnú časť maternice. Histologicky sa člení na endocervix a exocervix. Endocervikálny kanál alebo inak nazývaný endocervix je pokrytý jednovrstvovým cylindrickým epitelom a prepája maternicu s pošvou. Exocervix vyčnieva do hornej časti pošvy a pokrýva ho viacvrstvový dlaždicový nerohovatejúci epitel [9]. V oblasti stretnutia obidvoch epitelov – transformačnej zóny, dochádza k najčastejším dysplastickým zmenám epitelových buniek krčka maternice, ktoré sa okrem iného prejavujú aj zvýšenou citlivosťou na infekciu ľudským papilomavírusom (HPV). Najmä perzistentná infekcia epitelových buniek krčka maternice vírusom sa môže veľkou mierou podieľať na vzniku cervikálnych intraepitelových neoplázií (CIN). Podľa rozsahu dysplastických zmien v jednotlivých vrstvách viacvrstvého dlaždicového epitelu rozlišujeme tri stupne CIN: mierny stupeň dysplázie (CIN I), stredne ťažký stupeň dysplázie (CIN II) a ťažký stupeň dysplázie (CIN III). Ich dlhodobou transformáciou sa môže vyvinúť karcinóm krčka maternice, ktorý buď vyrastá z povrchového epitelu ako

skvamocelulárny karcinóm alebo zo žľazového epitelu krčka maternice ako adenokarcinóm [2]. Karcinóm krčka maternice je podľa štatistických údajov GLOBOCAN zaradený medzi štvrté najčastejšie sa vyskytujúce malígne ochorenie žien vo svete. V roku 2018 bolo celosvetovo zaznamenaných približne 570 000 novodiagnostikovaných prípadov a 311 000 úmrtí [1]. Na území Slovenskej republiky sa ročne vyskytuje približne 692 nových prípadov a zomiera približne 281 pacientiek na karcinóm krčka maternice [16]. Uvedenou problematikou sa zaoberám v rámci môjho doktorandského štúdia.

Ľudský papilomavírus (HPV)

Ľudský papilomavírus je členom rodiny *Papillomaviridae*. Ide o malý vírus s veľkosťou približne 55 nm. Obsahuje cirkulárnu dvojvláknovú dsDNA, ktorá sa delí na oblasť so skoro prepisujúcimi sa génmi, oblasť s neskoro prepisujúcimi sa génmi a nekódujúcu regulačnú (LCR) oblasť. Na karcinogenéze krčka maternice sa podieľajú najmä skoro sa prepisujúce gény kódujúce neštruktúrne proteíny E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 zastávajúce viaceré funkcie. Za transformáciu hostiteľských buniek sú z nich zodpovedné najmä gény E5, E6 a E7. Neskoro prepisujúce sa gény genómu vírusu kódujú štruktúrne kapsidové proteíny L1 a L2, ktoré sa syntetizujú v replikačnom cykle vírusu neskôr a v hostiteľskom organizme zabezpečujú tvorbu nových viriónov. Na základe karcinogénneho potenciálu vírusu sa HPV typy rozdeľujú na nízko rizikové (LR-HPV) a vysoko rizikové (HR-HPV). Medzi hlavných zástupcov nízko rizikových typov vírusu podieľajúcich sa na vzniku benígnych nádorov patrí vírus HPV 6 a HPV 11 [13]. Medzi vysoko rizikové onkogénne typy vírusu patria HPV typy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 a 59. Práve HPV typy 16 a 18 sú najčastejšie zodpovedné za vznik 70 - 80% karcinómu krčka maternice [15].

Perzistentná infekcia epitelových buniek krčka maternice HPV vírusom

Chronická alebo inak nazývaná aj perzistentná infekcia vyvolaná prostredníctvom HPV je nevyhnutná, ale nie dostatočná na malígnu transformáciu epitelových buniek krčka maternice. Sú za ňu zodpovedné viaceré endogénne a exogénne podnety, medzi ktoré patrí fajčenie, skorý začiatok sexuálneho života spojený s častým striedaním sexuálnych partnerov, oslabená imunita, socioekonomický status, genetické a epigenetické mechanizmy. Karcinogenéza asociovaná s HPV je teda viacstupňový proces spájaný aj s akumuláciou genetických zmien v bunkách zahŕňajúcich najmä genetickú instabilitu, imunodeficienciu, stimuláciu proliferácie, obchádzanie rastových supresorov a odolávanie bunkovej smrti – apoptózy [3]. Dôležitým krokom v malígnej transformácii buniek je práve integrácia genómu vírusu do chromozómu infikovaných buniek hostiteľa. Za integráciu vírusového genómu do jadier buniek bazálnej vrstvy viacvrstvého dlaždicového epitelu sú zodpovedné vírusové proteíny E1 a E2, ktoré následne zabezpečujú rozvinutie, teda linearizáciu cirkulárnej vírusovej DNA. K integrácii vysoko rizikových typov HPV 16 a HPV 18 dochádza už vo veľmi skorých štádiách CIN, kedy môže dôjsť k ich následnej progresii až na karcinóm krčka maternice. Proteíny E1 a E2 zároveň kontrolujú expresiu vírusových onkoproteínov E6 a E7 blokujúcich tumor-supresorové gény, ktoré negatívne regulujú bunkový cyklus. Proteín E7 sa viaže na regulačné proteíny a destabilizuje ich, čím dochádza k narušeniu kontroly proliferácie buniek. Ak pri integrácii HPV vírusu dôjde k porušeniu časti jeho genómu obsahujúceho gén kódujúci proteín E2, nastáva zvýšená expresia E6 a E7, a teda veľmi často dochádza k navodeniu malígnej transformácie hostiteľských buniek. Po integrácii vírusového

genómu do epitelových buniek hostiteľa sa proteíny E1 a E2 podieľajú tiež na replikácii vírusovej DNA. Replikácia vírusu prebieha počas diferenciácie bazálnych buniek do vyšších vrstiev epitelu. V superficiálnej vrstve epitelu sa exprimujú vírusové proteíny L1 a L2 zodpovedné za tvorbu nových vírusových častíc. Počas delenia jednotlivých epitelových buniek sa do dcérskych buniek kopíruje aj HPV DNA, čím sa zabezpečí stály počet jej kópií [10].

Prognostické markery

Prognostické markery sú spájané s procesmi, ktoré sa podieľajú na vývoji nádorového ochorenia. Medzi najznámejšie prognostické markery karcinómu krčka maternice patrí grade, stage, metastázy do lymfatických uzlín, veľkosť nádoru, vek pacientiek, histologický typ nádoru, apoptotický index a hĺbka stromálnej invázie. Podľa odporúčaní svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) sa na kategorizáciu nádorov na základe stupňa zrelosti a diferenciácie nádorových buniek používajú tri grade stupne. G1 stupeň charakterizuje diferencovaný, G2 je stredne diferencovaný a G3 nediferencovaný nádor. V nádorových bunkách dochádza k zvýšenej alebo zníženej expresii veľkého počtu nádorových markerov [5].

Fosfatázový a tenzinový homológ PTEN

Fosfatázový a tenzinový homológ PTEN bol objavený v roku 1997 ako nádorový supresor, u ktorého je pozorovaný častý pokles expresie v nádorových bunkách. Vyznačuje sa svojou duálnou lipid-fosfatázovou aktivitou. Je kódovaný génom lokalizovaným na dlhom ramienku chromozómu 10q23.31. Súčasné štúdie preukázali úlohu proteínu PTEN ako negatívneho regulátora signálnej dráhy PI3K/Akt/mTOR, ktorá reguluje rast a prežívanie nádorových buniek stimuláciou proliferčných procesov a inhibíciou apoptózy. Hlavným spúšťacím mechanizmom dráhy je aktivácia fosfatidylinozitol-3 kinázy (PI3K), ktorá katalyzuje fosforyláciu inozitolového kruhu na tretej pozícii (D3) fosfatidylinozitol-4,5-bifosfátu (PIP₂) prítomného na vnútornej strane plazmatickej membrány buniek za vzniku fosfatidylinozitolu-3,4,5-trifosfátu (PIP₃). PIP₃ zabezpečuje aktiváciu Akt kinázy, ktorá následne fosforyluje viaceré pro-apoptotické faktory a inhibitory bunkového cyklu. Hlavným antagonistom PI3K/Akt/mTOR dráhy je práve proteín PTEN, ktorý defosforyláciou tretej pozície inozitolového kruhu PIP₃ katalyzuje premenu PIP₃ na PIP₂. Znížená expresia PIP₃ v nádorových bunkách následne zablokuje aktiváciu Akt-kinázy, čím inhibuje proliferáciu a prežívanie nádorových buniek. Funkcia proteínu PTEN býva najčastejšie narušená mutáciami alebo prostredníctvom epigenetických mechanizmov. V dôsledku inhibície PTEN funkcie nastáva nadmerná akumulácia PIP₃ na plazmatickej membráne s následnou aktiváciou Akt-kinázy zapojenej do dráhy PIP₃K/Akt/mTOR. PTEN lokalizovaný v jadre potláča prežívanie nádorových buniek nezávisle od svojej fosfatázovej aktivity. Prostredníctvom proteínu CENP-C sa viaže na centroméry, čím sa podieľa na zachovaní integrity chromozómu [4]. Zmeny expresie proteínu PTEN vyvolané pôsobením viacerých genetických faktorov boli pozorované v nádoroch prostaty, prsníka a krčka maternice. PTEN expresia je značne redukovaná počas malígnej transformácie viacvrstvého dlaždicového epitelu krčka maternice z prekancerózneho štádia až po karcinóm [8].

Anti-apoptotický proteín survivin

Anti-apoptotický proteín survivin je člen rodiny proteínov inhibujúcich apoptózu – IAPs a regulujúcich bunkový cyklus. Zúčastňuje sa na regulácii mitotickej aktivity buniek, stabilizácii deliaceho vretienka a segregácii chromozómov [14]. Na základe

viacerých štúdií bola pozorovaná žiadna alebo slabá expresia survivinu v benígnych bunkách krčka maternice v porovnaní s CIN. Výsledky jednotlivých štúdií naznačujú značnú koreláciu medzi intracelulárnou lokalizáciou survivinu s progresiou CIN krčka maternice [6].

Ďalšie študované proteíny p16, Ki-67 a testin

Tumor-supresorový proteín **p16^{ink4a}** patrí do rodiny inhibítorov cyklín-dependentnej kinázy 4 (INK4) regulujúcej bunkový cyklus. Je negatívnym regulátorom dráhy Cdk4/6-Rb-E2F zabezpečujúcej prechod buniek z G1 do S fázy bunkového cyklu. Jeho expresia sa zvyšuje s progresiou prekancerózných lézií až po invazívny karcinóm krčka maternice [7]. Proteín **Ki-67** je proliferačný marker, ktorého expresia je prítomná v každej fáze bunkového cyklu - G1, S, G2, M s výnimkou pokojovej fázy G0. Podľa viacerých štúdií, expresia proteínu Ki-67 koreluje so zlou prognózou karcinómu krčka maternice [11]. **Testin (TES)** predstavuje menej známy tumor-supresorový proteín, ktorý negatívne reguluje proliferáciu buniek. Exprimuje sa v cytoplazme benígnych a malígnych buniek [12].

Záver

Hlbšie pochopenie komplikovaných bunkových signálnych dráh, zapojených do procesov tumorigenézy, môže vysokou mierou prispieť k vývoju účinnejších stratégií prevencie a liečby nádorových ochorení ženských pohlavných orgánov, vrátane karcinómu krčka maternice. Hodnotenie expresie nádorových proteínov PTEN, p16, Ki-67, survivinu a testinu zapojených do procesov nádorovej progresie má preto veľký prognostický a prediktívny význam.

Literatúra

- [1] Bray, *CA Cancer J Clin.* **2018**, 68/1:7-30.
- [2] Crosbie, *Lancet.* **2013**, 382/9895:889-899.
- [3] Gupta, *Curr Probl Cancer.* **2018**, 42/2:161-174.
- [4] Chen, *Front Endocrinol.* **2018**, 9/338:1-12.
- [5] Jesinghaus, *J Pathol Clin Res.* **2018**, 4/2:93-102.
- [6] Kim, *Oncol Lett.* **2014**, 7/5:1589-1593.
- [7] Liu, *Exp Mol Pathol.* **2015**, 99/1: 44-49.
- [8] Loures, *Rev Bras Ginecol Obstet.* **2014**, 36/5:205-210.
- [9] Mills, *Raven Press.* **2012**, 1328 s., ISBN 978-1-4511-1303-7.
- [10] Oyervides – Muñoz, *Infec Genet Evol.* **2018**, 61/5:134-144.
- [11] Pan, *Med Sci Monit.* **2015**, 21/2:882-889.
- [12] Popiel, *Pathol Oncol Res.* **2018**, 1/4:1-6.
- [13] Rajčáni, *Veda.* **2006**, 578 s., ISBN: 80-224-0911-1.
- [14] Xia, *Mol and Cell Biol.* **2008**, 28/17:5299-5311.
- [15] Yang, *Chin J Cancer.* **2013**, 32/1:42-48.
- [16] <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/703-slovakia-fact-sheets.pdf>; Updated March. **2019**.

Identifikácia komplexnej hereditárnej mutácie v géne *BRCA2* u pacienta s kastročne rezistentnou formou karcinómu prostaty

Baluchová, K.¹, Holečková, K.^{1,2}, Kliment J. Sr.²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed - Divízia Onkológia, Martin, ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Urologická Klinika, Martin a Univerzitná nemocnica Martin
baluchova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Prostate cancer (PC) is the second most lethal malignant disorder in Slovakian men affecting male urogenital system and increasing in numbers worldwide. Unknown hereditary components of PC are considered to be a minor but significant contributor in developing aggressive metastatic disease. For these reasons, we have analysed a panel of 38 unselected patients with castration-resistant PC and sequenced their peripheral blood DNA deeply on *Illumina* platform in coding and adjoining regions of *BRCA1* and *BRCA2* genes known to be involved in directing the reparation of damaged DNA. Quality metrics of deep sequencing allowed us to identify several variants in these genes that were reported in *HGMD* and *ClinVar* as clinically important. Using the *in silico* prediction tools *PolyPhen-2* and *SIFT*, we could not identify concurrently any unambiguously pathological variants in *BRCA1*. In contrast, in *BRCA2* we found one complex indel c.10094_10095insGAATTATAT and c.10095_10096insT in one patient in a heterozygous state. Both variants are located in the last exon of *BRCA2* and whereas the former variant cosegregated with lethal PC phenotype in one study, combined they remain unreported in the literature. In this study, we have identified one complex indel generating premature translational stop resulting in absent or disrupted *BRCA2* protein. This finding may have an impact on the aggressiveness of PC.

Keywords: prostate cancer, *BRCA2*, NGS, DNA repair

Úvod

Karcinóm prostaty (KP) je po karcinóme kolorekta druhé najčastejšie onkologické ochorenie diagnostikované u mužov na Slovensku [1]. Ochorenie sa zvyčajne vyvíja pomaly a mnohí pacienti zomierajú na pridružené neonkologické ochorenia. Asi u 20 až 30 % pacientov však ochorenie postupuje rýchlejšie a má agresívny priebeh [2]. Aj preto je mortalita KP po karcinóme pľúc a kolorekta tretia najvyššia u slovenských mužov.

Pacienti sú liečení na základe fyziologických, biochemických, histologických a rádiologických ukazovateľov, zriedka na podklade genetických parametrov. Liečba závisí od štádia ochorenia a zahŕňa aktívne sledovanie bez intervencie, čiastočnú alebo radikálnu prostatektómiu, ako aj rádioterapiu, chemoterapiu, hormonálnu manipuláciu a androgénovú depriváciu terapiu (ADT) alebo ich kombinácie. Účelom terapií je stabilizovať a spomaliť progredovanie ochorenia. V počiatočných štádiách ochorenia pacienti dobre odpovedajú na liečbu, ktorá im zvyčajne zabezpečí plnohodnotný aktívny život. Pacienti v štádiu kastročnej rezistencie (KR), ktorí neodpovedajú na štandardnú liečbu, napr. ADT, spravidla postupujú do letálneho štádia ochorenia, ktorú zmierňuje paliatívna starostlivosť. Malá, ale významná skupina pacientov s KP má predispozíciu na toto ochorenie, a už v čase diagnózy by mohli byť na základe genetického vyšetrenia zaradení do rizikovej skupiny. Pacienti

s vyšším rizikom ochorenia na KP by mohli byť častejšie monitorovaný, prípadne by im mohla byť navrhnutá radikálnejšia liečba za účelom oddialenia metastázujúcej formy ochorenia.

Úloha génových produktov zodpovedných za opravu poškodenej DNA je kľúčová pre zachovanie integrity a funkčnosti genetického materiálu. Malá, ale významná skupina pacientov s KP má monoalelickú, zriedkavejšie bialelickú inaktiváciu aspoň jedného génu, ktorý sa podieľa na opravných mechanizmoch DNA [3]. Medzi nimi sú aj gény *BRCA1* a *BRCA2*, ktoré zabezpečujú integritu genómu, a tým aj zníženie rizika vzniku neoplastických procesov v organizme. Inaktivácia *BRCA1* alebo *BRCA2* proteínov v nádore vedie k neúčinnnej schopnosti bunky opravovať dvojvláknové zlomy v DNA pomocou homolognej rekombinácie. Tieto zlomy sa kumulujú pri inhibovaní PARP (Poly(ADP-ribose) polymerázy), pretože jednovláknové zlomy v DNA, ktorých efektívnu opravu PARP zabezpečujú, sa transformujú v procese DNA replikácie na dvojvláknové zlomy. PARP inhibitor *Olaparib* je účinný pri navodení syntetickej smrti bunkám karcinómu ovárií a prsníka s hereditárnymi mutáciami v *BRCA1* alebo *BRCA2* géne. Nedávno bol *Olaparib* tiež označený za prelomové chemoterapeutikum v liečbe KRKP s mutovanými *BRCA* génmi. Cieľom tejto práce bolo zmapovať hereditárne patogénne varianty *BRCA1* a *BRCA2* v súbore pacientov s diagnostikovaným KRKP.

Materiál a metódy

Celková DNA (gDNA) bola izolovaná z buffy-coatu získaného z 5 ml periférnej krvi pomocou štandardnej kolónkovej metódy (Qiagen, Slovensko). gDNA koncentrácia bola meraná na *Nanodrop-e* (MGP, Česko) a následne na *Qubit-e* (Thermo Fischer Scientific, Slovensko), ktorého údaje slúžili na nariadenie gDNA na 20 ng/ml. Na prípravu knižníc novogeneračnej sekvenácie (NGS) bolo použitých celkovo 500 ng enzymaticky fragmentovanej DNA podľa štandardnej metódy (*Systemas Genómicos*, Španielsko). Všetky proteín-kódujúce exóny a príslušné regióny *BRCA1* a *BRCA2* boli pokryté primerovými mixami a po štandardnom značení a klonálnej amplifikácii boli vzorky sekvenované na HiSeq (Illumina, USA). Kvalitatívne parametre behu obsahovali okrem iného *Phred* skóre (priemer 35,4; medián 36,0), priemerne pokrytie báz (priemer 423,8; medián 434,1) a % precízne zmapovaných čítaní k hg38 genómu bez nejednoznačných PCR duplikátov (priemer 58,5; medián 58,1). Zaznamenané dáta boli filtrované cez *Ensembl Variant Effect Predictor*, identifikované varianty kontrolované cez IGV a ich klinická dôležitosť odvodená z *Clinvar* a HGMD a/alebo overená pomocou *in silico* nástrojov *PolyPhen-2* and SIFT.

Výsledky a diskusia

V skupine 38 pacientov s KRKP sme zaznamenali v géne *BRCA1* dvadsaťdva variant, prevažne v exónoch 10 a 15 a v intróne 15. Tie *BRCA1* kódujúce varianty, ktoré mali podľa HGMD alebo *ClinVar* priradený klinický význam, alebo tie, ktoré sa v kaukazoidnej populácii nachádzajú s frekvenciou 0,0835 a menej, sú zvýraznené v Tab. 1, vrátane ich databázových súradníc. Všetky identifikované varianty okrem štyroch s frekvenciou nad 0,35 v kaukazoidnej populácii (p.Pro871Leu, p.Glu1038Gly, p.Lys1183Arg a p.Ser1613Cys) boli zastúpené v heterozygotnom stave. Varianty boli podrobené *in silico* analýze pomocou nástrojov *PolyPhen-2* a SIFT, ktoré umožňujú predpovedať dopad zmeny aminokyseliny v polypeptidovom reťazci na aktivitu proteínu. *PolyPhen-2* sa zameriava efektom substituovanej aminokyseliny na stabilitu a funkciu proteínu [4]. *PolyPhen-2* hodnoty 0,8 a viac

naznačujú patologický dopad substituovanej aminokyseliny na funkciu proteínu. SIFT analyzuje, či je proteín na skúmanej pozícii evolučne konzervovaný, a či je chemická povaha detegovanej aminokyseliny príbuzná s referenčnou aminokyselinou [5]. SIFT hodnoty nižšie ako 0,05 naznačujú patologickú variantu proteínu. Obidva nástroje používajú nezávislé komplementárne matematické modely a v kombinácii umožňujú prognosticky klasifikovať patologickú povahu nájdených variant. Hodnoty získané pre identifikované *BRCA1* varianty pomocou *PolyPhen-2* a SIFT sú zaznačené v Tab. 1.

Tabuľka 1 Topologicky zoradené varianty v géne *BRCA1* s indikovaným dopadom na funkciu proteínu.

exón	kódujúca sekvencia	proteínová sekvencia	dbSNP	EUR MAF	frekvencia v tejto štúdii	<i>PolyPhen-2</i>	SIFT
10	c.1067A>G	p.Gln356Arg	rs1799950	0,0596	0,1052	(0,998)	0,21
	c.2077G>A	p.Asp693Asn	rs4986850	0,0835	0,2105	0,000	(0,03)
	c.2477C>A	p.Thr826Lys	rs28897683	0,001	0,0263	(0,954)	(0,00)
	c.2612C>T	p.Pro871Leu	rs799917	0,3628	0,6315	0,000	1,0
	c.3113A>C	p.Glu1038Gly	rs16941	0,3569	0,6315	0,008	(0,00)
	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	rs4986852	0,0288	0,0526	0,974	(0,05)
	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	rs16942	0,3549	0,6052	0,000	0,98
	c.4039A>G	p.Arg1347Gly	rs28897689	0,001	0,0263	0,255	0,06
15	c.4837A>T	p.Ser1613Cys	rs1799966	0,3598	0,6315	0,985	(0,00)
	c.4956G>A	p.Met1652Ile	rs1799967	0,0159	0,0526	0,005	(0,00)

dbSNP, databáza nukleotidových variant a EUR MAF, minoritná frekvencia aliel v Európskej populácii. Hodnoty *PolyPhen-2* v zátvorkách indikujú pri špecificite 0,95 a viac, senzitivitu testu nižšiu ako 0,70. *PolyPhen-2* hodnoty 0,000 mali pri senzitivite testu 1,00, špecificitu testu 0,00. Hodnoty SIFT v zátvorkách indikujú nízku spoľahlivosť testu.

PolyPhen-2 predpovedal, že varianty p.Ser1040Asn a p.Ser1613Cys by mohli negatívne ovplyvniť opravné funkcie BRCA1. Tieto predpoklady sa však nedali jednoznačne dokázať pomocou SIFT. Serín na aminokyselinovej pozícii 1040 sa nachádza v oblasti dôležitej pre naviazanie ligandu RAD51 na BRCA1. Serín na aminokyselinovej pozícii 1613 sa nenachádza v žiadnej známej funkčnej doméne BRCA1, ale medzi tzv. *coiled-coil* a karboxyterminálnou doménou. Tieto domény sú kľúčové pre sprostredkovanie interakcie medzi BRCA1 a napr. PALB2 a MSH2, dôležitými hráčmi v procese opravy poškodenej DNA. Seríny bývajú tiež často fosforylované na svojich hydroxylových zvyškoch, čím sprostredkovávajú aktivačný signál v celej rade signálových procesov.

V géne *BRCA2* sme identifikovali desať variant v oblasti kódujúcej pre proteín (Tab. 2); najviac tri v exóne 27 a po dve varianty v exónoch 10 a 11. Medzi týmito variantami sú zastúpené aj varianty, ktoré identifikovali HGMD alebo *ClinVar* ako klinicky dôležité. Všetky *BRCA2* varianty, okrem varianty p.Asn372His nachádzajúcej sa v exóne 10, sú reprezentované v kaukazoidnej populácii zriedkavo. Varianta p.Asn372His bola v našom súbore ako jediná zastúpená v homozygotnom stave, a to u 21 pacientov (55,3 %). *PolyPhen-2* a SIFT nevyhodnotili analogicky deväť z desiatich identifikovaných *BRCA2* variant jednoznačne ako potenciálne patologické. Výnimkou bola komplexná heterozygotná mutácia v exóne 27 zaznamenaná u jedného pacienta na pozíciách 3365 a 3366 v *BRCA2* proteíne, ktorej patogenita sa nedala preveriť zvolenými *in silico* nástrojmi. Mutácia p.3365 bola publikovaná v rodine s vysoko rizikovým KP a mutácia p.3366 nebola doposiaľ popísaná u onkologického pacienta [6]. Kompozitná analýza dvoch po sebe nasledujúcich variant identifikovala termináciu proteínu BRCA2 na pozícii p.3368, čo predstavuje adíciu troch a stratu 50 C-terminálnych aminokyselín (Obr. 1). Je

pravdepodobné, že jedna *wild-type* alela *BRCA2* vyprodukuje dostatočné množstvo proteínu, a tým táto varianta nebude mať signifikantný dopad na opravný mechanizmus v DNA u tohto pacienta. Ak však v procese malígneho bujnenia vzniknú klinicky relevantné somatické varianty v *BRCA2* géne, potom tento *BRCA2* genotyp môže prispieť k zlyhávaniu efektívnej opravy poškodenej DNA.

Tabuľka 2 Topologicky zoradené varianty v géne *BRCA2* s indikovaným dopadom na funkciu proteínu.

exón	kódujúca sekvencia	proteínová sekvencia	dbSNP	EUR MAF	frekvencia v tejto štúdii	Poly-Phen-2	SIFT
10	c.865A>C	p.Asn289His	rs766173	0.0348	0.157	0.4	(0.00)
	c.1114A>C	p.Asn372His	rs144848	0.2952	0.395	0.023	(0.03)
11	c.2971A>G	p.Asn991Asp	rs1799944	0.0348	0.157	[0.0]	1.00
	c.5744C>T	p.Thr1915Met	rs4987117	0.024	0.026	0.003*	(0.04)
15	c.7544C>T	p.Thr2515Ile	rs28897744	0.00068	0.026	0.879	(0.03)
18	c.8149G>T	p.Ala2717Ser	rs28897747	0.00126	0.026	0,944	0.86
22	c.8851G>A	p.Ala2951Thr	rs11571769	0.003	0.079	(1,000)	(0.00)
27	c.10094_10095insGAATTATAT	p.Val3365_Ser3366insAsnTyrIle	rs758307938	0.00068	0.026	NA	NA
	c.10095_10096insT	p.Ser3366Ter	rs730881599	0.00035	0.026	NA	NA
	c.10234A>G	p.Ile3412Val	rs1801426	0.04493	0.026	0.004	0.80

Hodnoty *PolyPhen-2* v oválnych zátvorkách indikujú pri špecificite 1,00, senzitivitu testu 0,00. Hodnoty *PolyPhen-2* v hranatých zátvorkách indikujú pri špecificite 0,00, senzitivitu testu 1,0. V *Poly-Phen-2* znak * indikuje pri špecificite testu 0,44, senzitivitu 0,98. Hodnoty SIFT v zátvorkách indikujú nízku spoľahlivosť testu. Skratka NA poukazuje na nevhodnosť tohto typu testu pre indikovanú variantu.

```

pacient      |S T G E K Q F I S V N Y I -
pacient      TCAACAGGAGAAAAACAATTTATATCTGTGAATTATATCTAGTGAATCCACTAGGACTGCTCCAC
hg38         TCAACAGGAGAAAAACAATTTATATCTGT-----CAGTGAATCCACTAGGACTGCTCCAC
hg38         S T G E K Q F I S V S E S T R T A P T S S E

```

Obrázok 1 Komplexná varianta v géne *BRCA2* s termináciou v proteíne po aminokyseline č. 3368 u pacienta s KRKP. Zmeny v amino-peptidovom reťazci pacienta oproti referenčnej variante hg38 sú zvýraznené v žltom. Stop kodón je podčiarknutý.

Záver

V skupine 38 pacientov s KRKP sme nezaznamenali v géne *BRCA1* patologickú variantu, ktorá by jednoznačne mohla ovplyvniť opravnú funkciu poškodenej DNA. Naopak v géne *BRCA2* sme identifikovali u jedného pacienta v heterozygotnom stave komplexnú variantu, ktorá modifikuje a skrakuje *wild-type* proteín o 50 aminokyselín, čo s vysokou pravdepodobnosťou ovplyvní funkciu *BRCA2* proteínu. Táto komplexná mutácia, podľa našich informácií, nebola popísaná v literatúre.

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

Literatúra

- [1] European Cancer Information System, <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>; vzhľadnuté 01/05/2019
- [2] Litwin, *JAMA*, **2017**, 317/24:2532-2542.
- [3] Nombela, *Cancers (Basel)*. **2019**, 11/3:1-15.
- [4] Adzhubei, *Nat Methods*. **2010**, 7/4:248-9.
- [5] Ng, *Nucleic Acids Res*. **2003**, 31/13:3812-3814.
- [6] Na, *Eur Urol*. **2016**, 71/5:740-747.

Raritné malígne nádory močového mechúra

Dušenka, R.¹, Dušenková, S.¹, Eliáš, B.¹, Slávik, P.², Švihra st., J.¹, Lupták, J.¹,
Kliment st., J.¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Urologická klinika, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej anatómie, Martin
rdusenka@gmail.com

Abstract

Malignant non-urothelial tumours of the urinary bladder are rare. They present less than 5 % of all urinary bladder neoplasms. The goal of the work is to state results of diagnostics and treatment of these tumours. Retrospectively, we analysed patients with diagnosed non-urothelial tumour of the urinary bladder in the period of last five years. The non-urothelial tumour was diagnosed in 9 patients with the average age of 67.5 years (52-86 years), out of them 7 men and 2 women. Macroscopic haematuria was the most frequent manifestation of the clinical disease. Non-urothelial tumours were diagnosed from bioptic material obtained by transurethral resection. Adenocarcinoma was diagnosed in 4 patients, while in 3 cases it was the urachal subtype of carcinoma, in 1 case adenocarcinoma arising from the laterodorsal wall of the urinary bladder, small-cell carcinoma was diagnosed in 3 patients and 2 leiomyosarcomas. Radical cystectomy was performed in 6 patients and partial resection of the urinary bladder in 3 patients with urachal carcinoma. 5 patients out of 9 are surviving, 2 of them with urachal carcinoma survive 12 and 5 months, with non-urethral adenocarcinoma 1 month, with small-cell carcinoma 25 months and with leiomyosarcoma 32 months. 2 patients with small-cell carcinoma exited because of the disease progression 9 and 1 month after the operation, 1 patient with urachal adenocarcinoma after 10 months and one patient with leiomyosarcoma 1 months after the operation. Radical surgical treatment with cystectomy or partial resection of the urinary bladder in patients with urachal adenocarcinoma is a basic treatment of non-urothelial tumours in the urinary bladder. The role of adjuvant or neoadjuvant treatment is not clearly defined.

Keywords: tumour of the urinary bladder, non-urothelial malignant tumours, cystectomy, adjuvant treatment

Úvod

Zhubné nádory močového mechúra (NMM) patria medzi najčastejšie tumory uropoetického systému a tvoria 2,5 – 3 % všetkých zhubných nádorov [1]. Predstavujú 7. najčastejšie diagnostikovaný nádor v mužskej populácii, pričom pri zohľadnení oboch pohlaví nádor močového mechúra sa radí na 11. miesto [2]. Vyskytujú sa 4× častejšie u mužov ako u žien. Najčastejšie postihujú jedincov medzi 50. – 70. rokom života [1]. Vekovo štandardizovaná celosvetová incidencia tohto ochorenia (na 100 000 osôb/ rok) je 9 u mužov a 2,2 u žien. V Európskej únii miera vekovej štandardizovanej incidence je 19,1 u mužov a 4 u žien. Celosvetová vekovo štandardizovaná úmrtnosť karcinómu močového mechúra (na 100 000 osôb/ rok) predstavuje 3,2 u mužov vs 0,9 u žien v roku 2012 [2]. V čase iniciálnej diagnózy je približne 70 % NMM neinvazívnych a 30 % infiltruje svalovinu [1]. Urotelový karcinóm močového mechúra je najrozšírenejším histologickým typom nádoru močového

mechúra. Na druhom konci spektra sú neurotelové malígne nádory močového mechúra – adenokarcinóm, spinocelulárny karcinóm, malobunkový karcinóm, sarkóm, sarkomatoidný tumor, lymfóm, melanóm, ktoré sú zriedkavé a predstavujú menej ako 5 % všetkých nádorov močového mechúra [1]. Svetová zdravotnícka organizácia klasifikuje nádory močového mechúra na základe histologického vyšetrenia. Cieľom práce je poukázať na raritnosť výskytu neurotelových nádorov močového mechúra a na skúsenosti s ich diagnostikou a liečbou.

Materiál a metódy

V retrospektívnej analýze sme vyhodnotili výskyt neurotelových malígnych nádorov močového mechúra u pacientov liečených počas posledného 5-ročného obdobia. Informácie o pacientoch boli získané z nemocničného informačného systému spolu s informáciami priamo od pacientov. Hodnotenie pacientov pozostávalo z anamnézy, fyzikálneho vyšetrenia, cystoskopie, transuretrálnej resekcii nádoru močového mechúra (TURBT), vyšetrenia abdomenu a panvy pomocou počítačovej tomografie a röntgenového vyšetrenia hrudníka. Staging ochorenia bol vykonaný podľa manuálu American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging [3]. Na základe stagingu a performance statusu bola u pacientov uskutočnená radikálna cystektómia s bilaterálnou panvou lymfadenektómiou. Prežívanie pacientov bolo vyhodnotené za pomoci štatistického úradu Slovenskej republiky [4] o prežívaní nádorových ochorení.

Výsledky

Retrospektívne sme analyzovali výskyt neurotelových malígnych nádorov močového mechúra v celkovom počte 9. Priemerný vek pacientov bol 67,5 roka (52 – 86 rokov). V 7 prípadoch šlo o mužov, v 2 prípadoch o ženy. Zaznamenali sme rôzne symptómy dolných močových ciest, najčastejším príznakom však bola makroskopická hematúria. Všetci 9 pacienti podstúpili diagnostické cystoskopické vyšetrenie s následnou transuretrálnou resekcii nádoru.

V 4 prípadoch išlo o nález lokalizovaný v oblasti vertexu, pričom v dvoch prípadoch sa histologicky potvrdil urachálny adenokarcinóm, v jednom prípade malobunkový karcinóm a u jedného pacienta sa potvrdil leiomyosarkóm.

Imunohistochemicky bol u pacientov vyšetrený panel protilátok špecifický pre jednotlivé druhy neurotelových malígnych nádorov močového mechúra, ktoré boli pozitívne pre urachálny adenokarcinóm – β -catenin cytoplazmaticky; neuroendokrinný, malobunkový nádor močového mechúra – CD56, chromogranín, synaptofyzín, sarkomatoidný nádor močového mechúra – vimentín. V 3 prípadoch bola lokalizácia nádoru na prednej stene, v 1 prípade šlo o urachálny adenokarcinóm, v ďalšom prípade o malobunkový nádor a v 1 prípade o leiomyosarkóm. Ďalšie 2 lokalizácie boli v oblasti zadnej steny močového mechúra, kde sa histologicky potvrdil v jednom prípade malobunkový nádor a v druhom neurachálny adenokarcinóm. U 5 pacientov bolo histologicky verifikované štádium pT3 a u 4 pacientov pT2. Histologický stupeň G1 bol prítomný u 2 pacientov, G3 u 7 (77,75 %) pacientov. 2 pacienti (22,2 %) podstúpili neoadjuvantnú liečbu rádioterapiou a chemoterapiou. Všetci 9 pacienti podstúpili chirurgickú liečbu, z toho u 3 pacientov s urachálnym adenokarcinómom bola vykonaná parciálna resekcia močového mechúra, 6 pacientov podstúpilo radikálnu cystektómiu. U 5 pacientov bola použitá derivácia ureteroileocutaneostómiou podľa Bricker a jeden pacient podstúpil ortotopickú deriváciu podľa Studera. Lokálna recidíva malígneho procesu sa zaznamenala u jedného pacienta s urachálnym adenokarcinómom (Obr. 1) s následnou adjuvantnou chemoterapiou. Jeden pacient s leiomyosarkómom podstúpil

adjuvantnú chemoterapiu. Angioinvázia bola prítomná u 5 pacientov, perineurálna invázia prítomná u 2 pacientov. Na zhubný nádor močového mechúra zomreli 4 pacienti, s priemerným prežívaním 6,75 mesiaca. Z 9 prežívajú 5 pacienti. 2 pacienti s urachálnym adenokarcinómom prežívajú 12 a 5 mesiacov. Pacient s infiltratívnym adenokarcinómom prežíva 1 mesiac od operácie, pacient s malobunkovým karcinómom prežíva 25 mesiacov, pacient s leiomyosarkómom 32 mesiacov od operácie. Štyria pacienti exitovali na progresiu ochorenia, 1 pacient s urachálnym adenokarcinómom po 10 mesiacoch od operácie, 1 s malobunkovým karcinómom po 9 mesiacoch, 1 s leiomyosarkómom po 1 mesiaci a 1 s malobunkovým karcinómom po 7 mesiacoch od operácie.

Diskusia

Výsledky pozorované v našom súbore pacientov poukázali na fakt, že najčastejšie zastúpený histologický typ neurotelového nádoru močového mechúra bol urachálny adenokarcinóm v zastúpení 33 %, z čoho 22 % predstavoval adenokarcinóm a zvyšných 11 % tvoril invazívny adenokarcinóm. Adenokarcinóm močového mechúra je tretím najčastejším histologickým typom nádoru močového mechúra. Predstavuje 0,5 % až 2 % všetkých nádorových ochorení močového mechúra. Vznik adenokarcinómu močového mechúra je asociovaný so schistozomiázou, s endometriózou, augmentáciou močového mechúra a ďalšími dráždivými vplyvmi močového mechúra [5, 6]. Podľa Grignona a kol. [7] sa adenokarcinóm delí na urachálny a neurachálny typ. Pre urachálne adenokarcinómy močového mechúra je charakteristická ich lokalizácia, a to v oblasti vertexu s primárnym postihnutím vrstvy svaloviny, prítomnosťou pozostatkov urachu aj nádorov šíriacich sa do oblasti Retzia. Pacienti s extrofiou močového mechúra majú 4 % prevalenciu vzniku adenokarcinómu močového mechúra počas života [9]. Adenokarcinóm má prakticky vždy invazívny charakter rastu [7]. Primárny adenokarcinóm močového mechúra má zlú prognózu bez ohľadu na spôsob liečby. Adenokarcinóm nie je rádiosenzitívny. Niektorí autori uvádzajú ako liečebný postup radikálnu cystektómiu s adjuvantnou terapiou alebo bez nej. Miera 5-ročného prežívania bez príznakov ochorenia je v rozmedzí od 0 % do 80 % [5, 9-12]. Na základe histopatologických nálezov skupina autorov Anderstrom a kol. [13] klasifikuje adenokarcinóm močového mechúra do niekoľkých vzorov: žľazy so stĺpcovitými bunkami, koloidný karcinóm, papilárny adenokarcinóm, karcinóm s pečatnými bunkami a karcinóm z jasných buniek. Bolo opísaných niekoľko ďalších histologických podtypov vrátane mucinózných, enterických buniek adenokarcinómu, hepatoidných buniek a buniek zmiešaného typu [14]. Odporúčaná liečba pacientov s adenokarcinómom močového mechúra je radikálna cystektómia. Pacienti s urachálnym adenokarcinómom sú liečení en bloc excíziou urachu a umbiliku s parciálnou cystektómiou.

Grignon a kol. [7] analyzovali 72 pacientov s adenokarcinómom močového mechúra, u 24 z nich išlo o urachálny adenokarcinóm a 48 pacientov malo neurachálny adenokarcinóm. Jednotlivé prípady boli analyzované podľa štádia v čase primárnej diagnózy, podľa histologických typov a podľa prítomnosti mucínu stanoveného imunohistochemicky. Štádium nádoru v čase diagnostiky bolo najsilnejším prediktorom výsledku liečby. Neurachálne karcinómy mali tendenciu k horším výsledkom oproti urachálnym, ale štatisticky sa významnosť tejto tendencie nepotvrdila.

Druhým najčastejším neurotelovým nádorom diagnostikovaným u našich pacientov bol malobunkový karcinóm. Predstavuje 0,35 – 0,70 % zo všetkých nádorových

ochorenie močového mechúra [15]. Ide o neuroendokrinný nádor, ktorý je najčastejšie zastúpený v pľúcach. Extrapulmonálne sa môže vyskytnúť vo viacerých lokalizáciách vrátane močového mechúra (Obr. 2). Terapeutický postup pri malobunkovom nádore močového mechúra si vyžaduje agresívnu liečbu, kombináciu chemoterapie s radikálnou cystektómiou a extenzívnou panvovou lymfadenektómiou alebo kombináciu chemoterapie a rádioterapie.

Tretím najčastejším neurotelovým nádorom v našom klinickom súbore bol leiomyosarkóm. Sarkóm močového mechúra predstavuje najčastejšie mezenchýmové zhubné nádorové ochorenie močového mechúra. Leiomyosarkóm močového mechúra je najčastejším malígnym mezenchýmovým nádorom močového mechúra u dospelých. Je stále relatívne veľmi vzácnym ochorením, vyskytuje sa u menej ako 0,1 % všetkých nádorových ochorení močového mechúra [16; Obr. 3]. Vzhľadom na veľmi nízku incidenciu tohto typu nádoru a limitované informácie o prirodzenom priebehu a prognóze ochorenia neexistuje štandardný terapeutický postup. Prevalencia leiomyosarkómu močového mechúra je vyššia u pacientov vystavovaných pôsobeniu účinku cyklofosfamidu, priamemu alkylačnému činidlu používanému pri chemoterapeutikách a imunosupresívach [16-18]. Leiomyosarkóm močového mechúra bol vždy považovaný za veľmi agresívny typ nádoru, ktorý si vyžaduje agresívny chirurgický prístup liečby, a to radikálnu cystektómiu [19, 20]. Pacienti s lokálnou recidívou alebo s metastázujúcim zhubným nádorom močového mechúra by mali byť liečení systémovou chemoterapiou (doxorubicín, cisplatina, ifosfamid, a docetaxel) a/alebo rádioterapiou [19, 20]. Niektoré štúdie vyhodnocujú mitotickú aktivitu pri leiomyosarkómoch močového mechúra s bližšou špecifikáciou nízkej mitotickej aktivity a miernou až stredne ťažkou jadrovou atypiou, tieto nádory majú dobrú prognózu, zatiaľ čo tie s vyššou mitotickou aktivitou majú horšiu prognózu [21]. Liečebnou voľbou u pacientov so sarkómom je radikálna cystektómia. U našich pacientov za uvedené 5-ročné obdobie nebol diagnostikovaný spinocelulárny karcinóm, ktorý je po urotelovom karcinóme najčastejším nádorom v močovom mechúre a vyskytuje sa približne v 3-5 % všetkých nádorov močového mechúra [16]. Podobný výskyt zaznamenal aj Dahm a kol. [22]. Nádorové ochorenie tohto typu môžeme rozdeliť na bilharziózne a nebilharziózne podtypy na základe etiológie vzniku karcinogenézy daného podtypu parazita schistozomiázy hematobium, ktorý je endemický pre oblasť Egypta a iných afrických regiónov, ako aj oblasť Južnej Ameriky. Etiológia nebilharziózneho podtypu spinocelulárneho karcinómu močového mechúra je spájaná s chronickou stázou moču v močovom mechúre pri obštrukcii odvodných ciest, s rekurentnými zápalmi dolných močových ciest, cystolitiazou, chronickou deriváciou permanentným katétrom. V rámci liečebnej stratégie bola navrhnutá neoadjuvantná rádioterapia s cieľom zlepšenia lokálnej kontroly, no táto liečba zostáva s neistým efektom [23]. Štandardné režimy chemoterapie majú obmedzenú účinnosť v dôsledku relatívnej chemorezistencie spinocelulárneho karcinómu. Vplyv nových chemoterapeutických režimov, ako je napríklad kombinácia paklitaxelu, karboplatiny a gemcitabínu, preukázali účinnosť u pacientov so spinocelulárnym karcinómom v iných lokalizáciách, ako napríklad v oblasti hlavy a krku [24]. Voľbou liečby pacientov so spinocelulárnym karcinómom močového mechúra ostáva radikálna cystektómia.

Kassouf a kol. [25] analyzovali výsledky liečby u 27 pacientov s nebilharzióznym spinocelulárnym nádorom močového mechúra. Z nich osem pacientov dostalo neoadjuvantnú chemoterapiu alebo rádioterapiu s cieľom zlepšiť lokálne podmienky pred plánovanou cystektómiou. Z nich 5 pacienti pred cystektómiou progredovali a exitovali. Traja pacienti podstúpili radikálnu cystektómiu, u 2 z nich sa dosiahlo

lokálne zlepšenie nádoru (downstaging) a zostali bez známk ochorenia. Radikálnu cystektómiu ako primárnu liečbu podstúpilo 10 z 20 pacientov a k lokálnej a vzdialenej recidíve ochorenia v období 5,1 až 7 mesiacov došlo u 4 pacientov. Autori pokladajú radikálnu cystektómiu za základnú liečbu spinocelulárneho karcinómu močového mechúra, ak je nádor resekovateľný. Úloha neoadjuvantnej liečby nie je jasná.

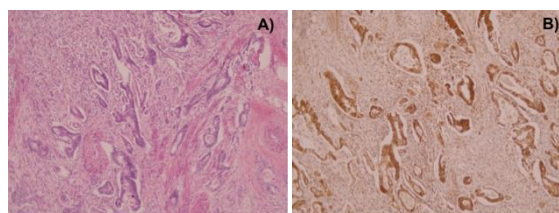
V nami sledovanom súbore sme nezaznamenali žiaden nález hlienu v moči, ktorý opísali autori Sheldon a kol. [26] či už makroskopický, alebo mikroskopický nález hlienu v moči ako dôležitý príznak pri výskyte adenokarcinómu, no bol prítomný iba u 25 % pacientov. Dve tretiny pacientov boli vo vekovej skupine 41 – 70 rokov, 65 % pacientov bolo mužského pohlavia. Čo sa týka sarkómov, neuroendokrinného nádoru a nádoru močového mechúra z vretienkových buniek, sú k dispozícii veľmi limitované dáta. Ide o vysokoagresívne nádory s horšou prognózou. Adjuvantná chemoterapia v týchto prípadoch môže poskytnúť lepšie prežívanie v porovnaní so samotnou cystektómiou [27-29].

Úloha cytologického vyšetrenia pri neurotelovom malígnom nádore močového mechúra nie je dobre definovaná. Cytologické vyšetrenie nevedlo k diagnóze zhubného nádoru v 18 % primárnych adenokarcinómov v štúdií autorov Bardales a kol. [30].

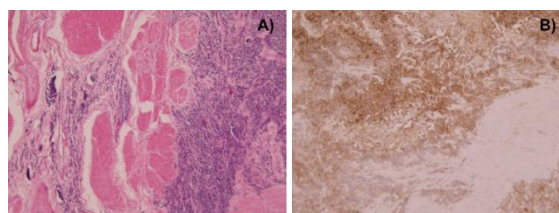
Záver

Neurotelové malígne nádory močového mechúra sú zriedkavé. Karcinogenéza neurotelových nádorov je multifaktoriálna, presný patomechanizmus nie je známy. Multifaktoriálna povaha karcinogenézy zahŕňa postupné rozpoznanie gentických zmien, ktoré vedú k invazívnemu rastu a progresii ochorenia [31]. Diagnostika neurotelových nádorov je v súčasnosti založená na štandardnej diagnostike používanej pri urotelových nádoroch. Základnú liečbu predstavuje radikálna cystektómia, pri urachálnych adenokarcinómoch parciálna resekcia močového mechúra s resekciou zvyšku urachu a umbilika, pri pokročilejšom nádore je však indikovaná cystektómia. Napriek radikálnej chirurgickej liečbe vzhľadom na agresívne biologické správanie väčšiny týchto nádorov je prognóza ochorenia nepriaznivá. Možnosti neoadjuvantnej a adjuvantnej liečby chemoterapiou alebo rádioterapiou pri jednotlivých typoch neurotelových nádorov nie sú štandardizované.

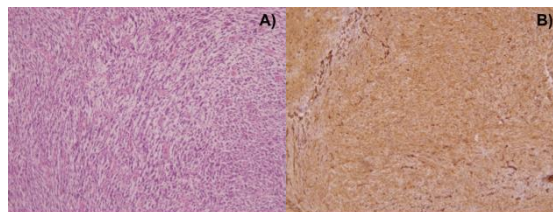
Obrázok 1 Histologický preparát tkaniva močového mechúra – urachálny adenokarcinóm. **A)** Farbenie hematoxylíneozínom, zväčšenie 100x, tubuloglandulárne rastúci urachálny adenokarcinóm enterického typu s exulceráciou a infiltráciou svaloviny **B)** Imunohistochemické vyšetrenie β -cateninu, zväčšenie 200x, cytoplazmatická pozitivita β -cateninu v urachálnom adenokarcinóme (strata nukleárnej expresie)



Obrázok 2 Histologický preparát tkaniva močového mechúra – neuroendokrinný karcinóm, nádor močového mechúra – malobunkový variant. **A)** Farbenie hematoxylíneozínom, zväčšenie 100x, infiltrácia svaloviny karcinómom **B)** Imunohistochemické vyšetrenie CD56 neuroendokrinného karcinómu, zväčšenie 100x



Obrázok 3 Histologický preparát tkaniva močového mechúra leiomyosarkóm. **A)** Farbenie hematoxylíneozínom, zväčšenie 100x, fascikulárny rast vretenovitých nádorových buniek s nukleárnou pleomorou **B)** Imunohistochemické vyšetrenie hladkého svalového aktínu, zväčšenie 100x.



Literatúra

- [1] Eliáš, *Základy klinickej onkológie*. **2016**, 12:128-132.
- [2] Abdollah, *Cancer Epidemiol*. **2013**, 37/3:219-25.
- [3] AJCC Cancer Staging Manual, 7th edition, **2010**, 497-502 s.
- [4] SVS MV SR, Centrálné pracovisko registra, Banská Bystrica, Slovensko.
- [5] Makar, *Acta Union Internationalis Contra Cancer*. **1962**, 18:599-602.
- [6] Anderstrom, *Cancer*. **1983**, 52:1273-1280.
- [7] Grignon, *Cancer*. **1991**, 67:2165-2172.
- [8] Smeulders, *BJU Int*. **2001**, 87:623-628.
- [9] Fiter, *Urology*. **1993**, 41:30-33.
- [10] Abenoza, *Urology*. **1987**, 31:9-14.
- [11] Hatch, *Urology*. **1989**, 33:311-312.
- [12] Burrett, *Urology*. **1991**, 67:315-321.
- [13] Anderstrom, *Cancer*. **1983**, 52:1273-1280.
- [14] Serretta, *Eur Urol*. **2000**, 37:85-89.
- [15] Trias, *Eur Urol*. **2001**, 39:85-90.
- [16] Pedersen-Bjergaard, *J Clin Oncol*. **1995**, 13:532-533.
- [17] Kawamura, *Urol Int*. **1993**, 51:49-53.
- [18] Sigal, *Arch Pathol Lab Med*. **1991**, 115:1049-1051.
- [19] Spiess, *Urologic Oncology*. **2007**, 25:38-45.
- [20] Ricciardi, *World Journal of Surgical Oncology*. **2010**, 8:16.
- [21] Lee, *American Journal of Surgical Pathology*. **2010**, 34:502-509.
- [22] Dahm, *Eur Urol*. **2003**, 44:672-681.
- [23] Swanson, *J Urol*. **1990**, 143:37-40.
- [24] Hussain, *J Clin Oncol*. **2001**, 19:2527-2533.
- [25] Kassouf, *Cancer*. **2007**, 110:764-769.
- [26] Sheldon, *J Urol*. **1984**, 131:1-8.
- [27] Choong, *Cancer*. **2005**, 103:1172-1178.
- [28] Lopez-Beltran, *J Urol*. **1998**, 159:1497-1503.
- [29] Quek, *J Urol*. **2005**, 174:93-96.
- [30] Bardales, *Cancer*. **1998**, 84:335-343.
- [31] Nachajová, *Nádor Biol*. **2015**, 36:7335-7338.

Diagnostika kostných metastáz pomocou celotelovej scintigrafie skeletu u pacientov s rôznym histologickým typom karcinómu pľúc

Weissensteiner, J.¹, Babušíková, E.²

¹Oddelenie nukleárnej medicíny, Nemocnica Poprad, a.s., Poprad, ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin
jaroslav.weissensteiner@gmail.com

Abstract

The number of malignant diseases has been increasing lately. Lung cancer is in the third place behind the most incident breast cancer and prostate cancer being characterized by production of secondary lesions, including of bone metastases. Our aim was to evaluate influence of gender, age, clinical stage, and particularly of tumour's histological type on bone metastases' incidence by lung cancer patients. We investigated bone metastases by patients using whole-body bone scintigraphy. We evaluated the most frequent incidence of bone metastases' localisation, and the number of lesions in skeleton as well.

Keywords: bone metastasis, bone scintigraphy, lung cancer

Úvod

Karcinóm pľúc patrí medzi najčastejšie malígne nádorové ochorenia a má významné postavenie vo výskyte úmrtí v skupine týchto ochorení. Skelet je jedným z hlavných miest lokalizácie sekundárnych ložísk a 15 – 40 % pacientov s diagnostikovaným karcinómom pľúc má prítomné kostné metastázy [1-3]. Na zistenie prítomnosti kostných metastáz u pacientov s karcinómom pľúc sa v klinickej praxi používa celotelová scintigrafia skeletu.

Materiál a metodika

V našom súbore sme vyšetrili 60 pacientov s diagnostikovaným karcinómom pľúc (46 mužov, 14 žien) celotelovou scintigrafiou skeletu za účelom zistenia prítomnosti kostných metastáz. U 50 pacientov bol diagnostikovaný nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC – *non-small-cell lung cancer*), u 9 pacientov malobunkový karcinóm pľúc (SCLC – *small-cell lung cancer*) a v jednom prípade bol diagnostikovaný typický karcinoid pľúc. U všetkých pacientov súboru bolo známe histologické vyšetrenie z tkaniva odobratého počas operácie karcinómu alebo z biopsie daného tkaniva pri bronchoskopii. Na diagnostiku kostných metastáz sme využili celotelovú scintigrafiu skeletu, ktorá sa vykonala hybridnou gamakamerou typu *BrightView XCT*. Vyšetrenie sa realizovalo ako celotelové snímání z prednej a zadnej projekcie po 2 – 4 hodinách od intravenózne aplikácie osteotropného rádiofarmaka značeného rádionuklidom technéciom (^{99m}Tc – metyléndifosfonát, ^{99m}Tc – MDP) s aktivitou 500 – 700 MBq. Zistené rozdiely sme medzi skupinami hodnotili ako štatisticky významné, ak bola hodnota $p < 0,05$. Významnosť rozdielov medzi sledovanými skupinami sme analyzovali neparametrickými testami z dôvodu asymetrie v rozdelení dát.

Výsledky

Prítomnosť kostných metastáz sme zistili u 25 % pacientov (Tab. 1). U 56,67 % pacientov neboli kostné metastázy prítomné, v 11 prípadoch sme zistený nález hodnotili ako nález pravdepodobných metastáz v kostiach. U mužov 26,1 %

pacientov malo prítomné kostné metastázy a u žien malo kostné metastázy 21,4 % pacientok (Tab. 1).

Tabuľka 1 Nález celotelovej scintigrafie skeletu u pacientov s karcinómom pľúc.

Pacienti n	Prítomné mts n	Pravdepodobné mts n	Neprítomné mts n
Muži 46	12	10	24
Ženy 14	3	1	10
Spolu 60	15	11	34

mts – metastázy, n – počet pacientov

Najčastejšie boli kostné metastázy prítomné v stavcoch chrbtice, v rebrách, v panvových kostiach (Tab. 2).

Tabuľka 2 Distribúcia metastáz v kostiach podľa ich lokalizácie u pacientov s karcinómom pľúc na základe nálezu z celotelovej scintigrafie skeletu.

Lokalizácia	Počet pacientov podľa lokalizácie kostných mts	%
Stavec	12	80
Rebro	11	73,33
Hrudná kosť	4	26,67
Kľúčna kosť	1	6,67
Lopatka	9	60
Ramenná kosť	8	53,33
Panvové kosti	10	66,67
Stehenná kosť	9	60
Lebka	9	60

mts – kostné metastázy

V axiálnom skelete sme detegovali metastázy u 2 pacientov a len v apendikulárnom skelete u jedného pacienta z 15 pacientov so zistenými kostnými metastázami (Tab. 3). Spolu bolo postihnutie axiálneho aj apendikulárneho skeletu kostnými metastázami u 12 pacientov.

Tabuľka 3 Nález postihnutia axiálneho a apendikulárneho skeletu kostnými metastázami pri celotelovej scintigrafii skeletu u pacientov s karcinómom pľúc.

Postihnutie skeletu	Počet pacientov	%
Skelet axiálny	2	13,33
Skelet apendikulárny	1	6,67
Skelet axiálny aj apendikulárny	12	80

Porovnali sme aj nález prítomnosti kostných metastáz s klinickým štádiom ochorenia u pacientov s karcinómom pľúc (Tab. 4). Pacienti s vyšším štádiom ochorenia mali častejšie prítomné kostné metastázy.

Tabuľka 4 Nález celotelovej scintigrafie skeletu u pacientov s karcinómom pľúc s rôznym klinickým štádiom ochorenia.

Klinické štádium (n)	Prítomné kostné mts n	Pravdepodobné kostné mts n	Neprítomné kostné mts n
I. (10)	2	2	6
II. (1)	0	0	1
III. (26)	5	5	16
IV. (23)	8	4	11

mts – kostné metastázy, n – počet pacientov

Pri porovnaní histologického typu nádoru a prítomnosti kostných metastáz v skelete boli kostné metastázy najčastejšie prítomné v rámci vyšetrenia celotelovou scintigrafiou skeletu u pacientov s SCLC a v jednom prípade u pacienta s typickým karcinoidom pľúc (Tab. 5). U pacientov s diagnostikovaným NSCLC bola naopak prítomnosť kostných metastáz nižšia.

Tabuľka 5 Nález celotelovej scintigrafie skeletu pri jednotlivých histologických typoch ochorenia.

Histologický typ karcinómu	Počet (%)	Prítomné kostné mts n (%)	Pravdepodobné kostné mts n	Neprítomné kostné mts n
SCLC	9 (15 %)	5 (55,56 %)	4	1
Typický karcinoid pľúc	1 (1,67 %)	1 (100 %)	0	0
NSCLC	50 (83,33 %)	10 (20 %)	7	33
Subtypy NSCLC				
Epidermoidný karcinóm	21 (35 %)	4 (19,05 %)	2	15
Adenokarcinóm	20 (33,33 %)	4 (20 %)	3	13
Veľkobunkový karcinóm	3 (5 %)	1 (33,33 %)	1	1
NSCLC s neuroendokrinným komponentom	3 (5 %)	1 (33,33 %)	0	2
Bližšie neurčený NSCLC	3 (5 %)	0 (0 %)	1	2

mts – kostné metastázy, n – počet pacientov, SCLC – malobunkový karcinóm pľúc (*small-cell lung cancer*), NSCLC – nemalobunkový karcinóm pľúc (*non-small-cell lung cancer*)

Diskusia

Karcinóm pľúc je v súčasnosti po karcinóme prsníka a prostaty na treťom mieste v skupine malígnych ochorení spojených s tvorbou kostných metastáz. V našom súbore pacientov bolo podľa histologického typu prítomných 50 pacientov s NSCLC (83,33 %), 9 pacientov s SCLC (15 %) a v jednom prípade pacient s typickým karcinoidom pľúc (1,67 %). Z NSCLC bolo 21 pacientov s epidermoidným karcinómom pľúc (35 %), 20 pacientov s adenokarcinómom (33,33 %), 3 pacienti s veľkobunkovým karcinómom (5 %), 3 s NSCLC s neuroendokrinným komponentom (5 %) a bližšie neurčený NSCLC v 3 prípadoch (5 %). Kostné metastázy sme zistili u 25 % pacientov a najčastejšie boli kostné metastázy prítomné v skupine pacientov s SCLC (55,56 %). Zhang a kol. analyzovali 125 652 pacientov s karcinómom pľúc s nasledujúcou distribúciou jednotlivých histologických podtypov: 43,7 % pacientov s adenokarcinómom, 21,8 % epidermoidným karcinómom, 15 % SCLC a 1,8 % veľkobunkovým karcinómom [4]. Najviac kostných metastáz zistili v skupine pacientov s adenokarcinómom a SCLC (24,4 a 24,7 %), čo je v súlade s našimi zisteniami, hoci sme mali oveľa menší súbor, a preto sme pravdepodobne nepozorovali štatisticky významné rozdiely v prítomnosti kostných metastáz medzi jednotlivými typmi karcinómu pľúc. Retrospektívna štúdia Conen a kol. zahŕňala 92 pacientov s SCLC, kde bola prítomnosť kostných metastáz potvrdená v 36,9 % prípadov [5]. Sugiura a kol. zistili najčastejší výskyt kostných metastáz vo svojej štúdii 118 pacientov s karcinómom pľúc a s prítomnými kostnými metastázami v chrbtici (42 %), v rebrách (20 %), v panvových kostiach (18 %) a menej často v stehennej kosti (6 %), v lopatke a lebke (po 3 %) a v ramennej a kľúčnej kosti (po 1 %) [6]. V ďalšej štúdii, kde bolo analyzovaných 168 pacientov s karcinómom pľúc s prítomnými kostnými metastázami, bola prítomnosť kostných metastáz hlavne v lopatke a rebrách (23,2 %), v panve (15,5 %) a v lebke (2,4 %) [7]. V našej skupine pacientov bolo najviac kostných metastáz prítomných v chrbtici (80 %), v rebrách (73,33 %), v panvových kostiach (66,67 %), ale aj v lopatke, stehennej kosti a v lebke (po 60 %). Menej často boli kostné metastázy prítomné v hrudnej kosti (26,67 %) a v kľúčnej kosti (6,67 %). Zhou a kol. vo svojej štúdii 2021 pacientov s karcinómom

pľúc zistili prítomnosť kostných metastáz u 23,9 % pacientov. Najčastejšie zistili prítomnosť kostných metastáz v rebrách (62,3 %) a najmenej v lakťovej a vretennej kosti (0,8 %) [8]. Porovnateľne s danou štúdiou sme v našom súbore pacientov s karcinómom pľúc zistili prítomnosť kostných metastáz v 25 % prípadov a v súbore pacientov s NSCLC v 20 % prípadov. Výrazne vyšší počet kostných metastáz 57,7 % prípadov zistil v retrospektívnej štúdii 661 pacientov s NSCLC Santini a kol. [9]. Oliveira a kol. vo svojej retrospektívnej štúdii 413 pacientov s karcinómom pľúc nezistili žiadnu koreláciu medzi lokalizáciou kostných metastáz (chrbtica 32,1 %, panva 17,4 %, proximálna časť stehennej a ramennej kosti 17,1 %) a histologickým typom nádoru. Signifikantne zvýšená prítomnosť kostných metastáz bola u pacientov s adenokarcinómom a naopak signifikantne znížená bola u pacientov s epidermoidným karcinómom pľúc [10].

Záver

Vzhľadom na zvyšujúci sa počet nových prípadov karcinómu pľúc si toto ochorenie vyžaduje pozornosť nielen v rámci prevencie a klinickej praxe, ale aj v oblasti ďalšieho výskumu zameraného na diagnostiku a liečbu. Kvalitu života pacientov s karcinómom pľúc výrazne znižuje tvorba kostných metastáz. Okrem známych faktorov, pomocou ktorých môžeme posúdiť riziko výskytu kostných metastáz, ako je vek pacientov, pohlavie, prítomnosť metastáz v lymfatických uzlinách, vo vzdialenejších orgánoch v čase stanovenia diagnózy patrí aj histologický typ nádoru, ktorý môže zohrávať určitú významnú úlohu ako prognostický faktor ochorenia. V našom súbore pacientov boli kostné metastázy najčastejšie prítomné v skupinách pacientov s pokročilejším štádiom ochorenia (III. a IV. klinické štádium) a v skupine pacientov s SCLC, u mužov a vo vekovej skupine 61 – 70 rokov. Najčastejšie bol kostnými metastázami súčasne postihnutý axiálny a aj apendikulárny skelet a ich lokalizáciou hlavne chrbtica, rebrá, panvové kosti, ale aj lopatka, stehenná kosť a kalva. Význam výskumu karcinómu pľúc spočíva aj v závažnosti daného ochorenia a tým aj jeho ďalší celkový dopad na spoločnosť. Do budúcnosti by malo zmysel sa podrobnejšie zamerať aj na menej častú skupinu neuroendokrinných nádorov pľúc a ich riziko tvorby kostných metastáz, rovnako aj na zníženie rizikových faktorov ochorenia a na prevenciu vzniku karcinómu pľúc.

Literatúra

- [1] Torre, *Adv Exp Med Biol.* **2016**, 893:1-9.
- [2] Siegel, *CA Cancer J Clin.* **2019**, 69/1:7-34.
- [3] Cho, *BMC Cancer.* **2019**, 19/1:303.
- [4] Zhang, *BMC Cancer.* **2019**, 19/1:238.
- [5] Conen, *J Cancer.* **2016**, 7/14:2110-2116.
- [6] Sugiura, *Clin Orthop Relat Res.* **2008**, 466/3:729-736.
- [7] Zhang, *Med Sci Monit.* **2017**, 23:4087-4094.
- [8] Zhou, *Sci Rep.* **2017**, 7/1:8970.
- [9] Santini, *Sci Rep.* **2015**, 5:18670.
- [10] Oliveira, *Lung Cancer.* **2016**, 96:19-24.

Infekčné príčiny erythema nodosum

Neuschlová, M.

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

Abstract

Erythema nodosum is the most common form of septal panniculitis with formation of painful erythematous nodules in the subcutaneous fat. In most cases it is located symmetrically on the lower legs in the anterior area. The disease is usually self-limiting, although lasting for a long time. Ulceration and scars does not occur. It is important to determine the cause. It occurs in isolation or in connection with other disease processes or drugs use. This work is focused on the infectious etiology, the most common cause of erythema nodosum.

Keywords: erythema nodosum, panniculitis, subcutaneous fat, infection

Úvod

Erythema nodosum (EN) je klinicko-patologická forma panikulitídy. Pri tejto nešpecifickej zápalovej kožnej reakcii dochádza k postihnutiu podkožného tukového tkaniva s tvorbou bolestivých erytematóznych uzlov v podkoží. Vyskytujú sa najčastejšie symetricky na oboch dolných končatinách v oblasti predkolenia, ale zriedkavo aj v iných lokalizáciách. Nemajú tendenciu ulcerovať a hoja sa v priebehu niekoľkých týždňov bez atrofie a bez jaziev [1]. EN môže vzniknúť v súvislosti s najrozličnejšími ochoreniami, ako sú infekcie, sarkoidóza, reumatologické ochorenia, idiopatické črevné zápaly, autoimunitné procesy, malignity (najmä hematologické), užívanie niektorých liečiv, tehotenstvo. V mnohých prípadoch sa nepodarí aj napriek podrobným vyšetreniam zistiť, čo viedlo k jeho vzniku. Vtedy sa uvádza, že prebieha izolovane [2-4]. Niektoré klinické varianty EN sú známe aj pod názvami erythema nodosum migrans, subakútna nodózna migrujúca panikulitída a chronický nodózny erytém. U dospelých je výskyt EN viazaný na pohlavie [1]. Postihuje prevažne ženy, podľa niektorých štúdií až 79 % v porovnaní s 21 % výskytom u mužov [5]. U detí nie je výskyt viazaný na pohlavie [1].

Klinický obraz a patogenéza

V klinickom obraze EN dominuje prítomnosť nodulov (uzlov) v podkoží, ktoré dosahujú veľkosť od niekoľkých mm až do 10 cm v priemere, niekedy aj viac. Sú neostro ohraničené od okolia, pretože patologický proces prebieha v podkoží [1]. Najčastejšie bývajú lokalizované v pretibiálnej oblasti, zriedkavejšie v iných oblastiach [5]. Zo začiatku sú jasno červené, postupne nadobúdajú purpurovo červenú farbu, neskôr pripomínajú modriny, až napokon prechádzajú do žltkastozelenej farby, podobne ako modriny počas procesu hojenia [2]. Na dotyk sú citlivé až bolestivé. Zo začiatku sú tvrdé, neskôr sa stávajú mäkkšími. Pokožka nad nimi býva suchšia. Vytvárajú sa počas rôzne dlhého obdobia. Môžu sa objavovať stále nové a nové noduly, takže v tom istom čase sú pozorované noduly v rôznych fázach vývoja. Pretrvávajú približne jeden až dva mesiace, kým dôjde k ich úplnému vyhojeniu a uzdraveniu. K ulcerovaniu dochádza len veľmi zriedkavo [6]. Nevedú k atrofickým zmenám ani zjazveniu. Prodromálne príznaky sa môžu objavovať 1-3 týždne pred začiatkom EN, ako únava a slabosť, zvýšená telesná teplota, kašeľ,

bolesti hlavy, kĺbov, ktoré môžu, ale nemusia byť sprevádzané artritídou. Bolesti kĺbov pretrvávajú v mnohých prípadoch aj dlho po odoznení nodózneho erytému. Reumatoidný faktor býva negatívny, zvýšená je sedimentácia erytrocytov, CRP a leukocytóza [1]. K recidívam dochádza zriedkavo, a to v prípadoch, kedy vyvolávajúca príčina nebola zistená alebo pretrváva. Pri vzniku EN zohrávajú úlohu imunitné odpovede organizmu. Predpokladá sa najmä účasť IV. typu hypersenzitívnych reakcií, tzv. oneskorenej hypersenzitivity [1], ktorá je zodpovedná aj za tvorbu granulómov a poškodenie tkaniva [7]. Vyskytuje sa často práve v súvislosti s granulomatóznymi chorobami (granulomatóznou kolitídou, sarkoidózou alebo tuberkulózou) [1]. Tvorba a ukladanie imunokomplexov je tiež jedna z možností, ktoré sa môžu uplatňovať pri vzniku EN [8].

Histologický nález

Histopatologicky ide o septálnu panikulitídu bez vaskulitídy. Septá podkožného tuku sú zhrubnuté a infiltrované rôznymi zápalovými bunkami. Zloženie zápalového infiltrátu sa v priebehu času mení, tak ako sa vyvíjajú zmeny v noduloch. V začiatkových štádiách je za zhrubnutie sept zodpovedný prevažne edém, ale aj krvácanie a infiltrácia neutrofilmi. V neskorších štádiách bývajú hlavným histologickým nálezom granulačné tkanivo, infiltrácia lymfocytmi, histiocytmi a obrovskými mnohoadrovými bunkami. Prevažujú fibrotické zmeny. Infiltráty sa môžu rozširovať aj do periseptálneho priestoru a tukových lalôčikov [2, 3]. Charakteristickým znakom je prítomnosť tzv. Miescherových radiálnych granulómov – uzlíkov, ktoré sa skladajú z malých dobre ohraničených nahromadení histiocytov usporiadaných radiálne okolo centrálnej štrbiny, ktorá môže byť rôzneho tvaru, často hviezdicovitého [2]. V priebehu niekoľkých týždňov až mesiacov výsev pozvoľna ustupuje a ložiská sa hoja bez trvalých kožných zmien [1].

Infekčné príčiny erythema nodosum

Retrospektívnou štúdiou 81 pacientov s EN v rokoch 2003 – 2017 [5] bola zistená infekčná etiológia ako najčastejšia príčina (39,5%). Z neinfekčných príčin (29,6 %) to boli hlavne reumatologické choroby, potom sarkoidóza, nešpecifické črevné zápaly, malignity a užívanie niektorých liekov (orálne kontraceptíva a antibiotiká). Príčina nebola zistená u 30,9 % pacientov s EN zo sledovaného súboru [5]. Na vzniku EN sa môže podieľať aj viacero príčin súčasne.

Táto práca je zameraná na infekčnú etiológiu nodózneho erytému. Za jednu z najčastejších infekčných príčin sa považuje streptokoková faryngitída. Častou príčinou však bývajú aj infekcie spôsobené yersíniami, mykoplazmami, chlamýdiami, mykobaktériami a niektorými vyvolávatelmi vírusových infekcií, parazitóz a mykóz. EN môže vzniknúť až po prebehnutí infekcie ako jej dôsledok, alebo sa vyvinie už v priebehu infekčnej choroby [1].

BAKTERIÁLNA ETIOLÓGIA

Streptokoková faryngitída

Streptokokové infekcie spôsobené beta-hemolytickými streptokokmi predstavujú jednu z najfrekvencovanejších infekčných príčin nodózneho erytému, a to až do 44 % u dospelých a 48 % u detí [1, 9]. Prvé ložiská sa začínajú objavovať zvyčajne dva až tri týždne po streptokokovej faryngitíde. Výter z hrdla býva v tom čase už spravidla negatívny, ale na predchádzajúcu streptokokovú infekciu môžu poukázať zvýšené titry antistreptolýzínu (ASLO) [10]. Potrebné je dôkladné preliečenie streptokokovej infekcie antibiotikami podľa citlivosti [11].

Tuberkulóza a atypické mykobaktériové infekcie

EN sa môže vyskytnúť pri primárnej tuberkulóze, ale boli popísané aj prípady pri vysokej pozitivite kožného tuberkulínového testu (Mantoux testu) bez zreteľnej klinickej manifestácie tuberkulózy [1]. U nás patrí tuberkulóza medzi zriedkavé príčiny EN [4], ale v rámci diferenciálnej diagnostiky je potrebné zvážiť aj túto etiológiu.

Mykoplazmové infekcie

Mycoplasma pneumoniae je intracelulárny patogén respiračného traktu vyvolávajúci často komunitné pneumónie [12, 13]. Typickými kožnými prejavmi býva EN, erythema multiforme, urtikária, vaskulitída a Stevens-Johnsonov syndróm [14]. Približne u 25 % infikovaných jedincov dochádza k vzniku extrapulmonálnej manifestácie pred, po, počas a niekedy aj pri chýbaní respiračných symptómov, čo výrazne sťažuje diagnostiku [15]. Metódy kultivácie a molekulárnej diagnostiky klinického materiálu z horných dýchacích ciest nie sú vždy vhodné na zistenie extrapulmonálnych mykoplazmových prejavov. V diagnostike prevláda stanovenie špecifických protilátok sérologickými metódami [15, 16]. Špecifický IgM je indikátorom primárnej alebo nedávno prebehnutej infekcie. Ďalším dôležitým ukazovateľom prebiehajúcej infekcie sú pozitívne titre špecifických IgA [17]. Prospešná je podporná imunomodulačná liečba, zároveň je však nutná liečba antibiotikami cielene proti *Mycoplasma pneumoniae*, ktorá slúži na zníženie množstva mykoplaziem v respiračnom trakte, čím sa zníži aj množstvo antigénnych podnetov pre imunitný systém pacienta [16].

Gastrointestinálne infekcie

Medzi známe príčiny EN sa zaraďujú aj infekcie gastrointestinálneho traktu vyvolané yersíniami, salmonelami, *Campylobacterom* [4, 5] a *Helicobacterom* [5].

Ostatné známe bakteriálne príčiny

Pre komplexnosť informácií, okrem vyššie uvedených príčin, sa v niektorých publikovaných prípadových štúdiách uvádzajú aj ďalší vyvolávatelia ako napr. *Rickettsia* spp., *Treponema pallidum*, *Leptospira* spp., *Chlamydia* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoea*, *Coxiella burnetii*.

Medzi zriedkavé príčiny patrí tiež tularémia (zajačia choroba), potenciálne život ohrozujúce infekčné ochorenie, ktoré vyvoláva *Francisella tularensis*. Vyskytuje sa v prírodných ohniskách, hlavne u drobných hlodavcov a zajacov, k prenosu na človeka môže dôjsť priamym kontaktom, ale aj prostredníctvom ektoparazitov, kontaminovanou potravou alebo manipuláciou s predmetmi kontaminovanými výlučkami nakazených zvierat. Z človeka na človeka sa neprenáša. Ochorenie sa manifestuje celkovými príznakmi (dlhotrvajúca horúčka, bolesti chrbta, končatín, svalov) a zdurením regionálnych lymfatických uzlín. Môže prejsť do nebezpečnej chronickej formy s častými relapsami. U časti pacientov vedie k EN [18]. Jednou zo zriedkavejších príčin je aj choroba mačacieho škrabnutia vyvolaná *Bartonella henselae* [19]. Môže vzniknúť po uškrabnutí alebo uhryznutí nakazenou mačkou. V mieste inokulácie sa objaví pustula do 1 cm a dochádza k regionálnej subakútnej lymfadenitíde. Okrem celkových príznakov môže byť ochorenie spojené aj s kožnými prejavmi. V priamej diagnostike je významná PCR z materiálu primárnych lézií alebo biopsických vzoriek uzlín. V nepriamej diagnostike dominuje sérologický dôkaz prítomnosti IgG a IgM [18, 19].

VÍRUSOVÁ, MYKOTICKÁ A PARAZITÁRNA ETIOLÓGIA

Z vírusov, ktoré súvisia s EN, sa uvádzajú najmä obalené DNA vírusy – Epstein-Barrovej vírus, cytomegalovírus, vírus herpes simplex, vírus hepatitídy B, ale aj niektoré obalené jednovláknové RNA vírusy – vírus hepatitídy C, vírus HIV. V určitých geografických oblastiach patria medzi príčiny EN aj mykózy. V súvislosti s cestovaním do rôznych exotických krajín je potrebné brať do úvahy aj túto možnosť. Ide najmä o vyvolávateľov systémových mykóz – *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Blastomyces* [1]. Ako príčina EN sa uvádzajú aj jednobunkové črevné parazity giardie a entaméby prenášané fekálne-orálnou cestou [5]. *Giardia* species sa vyskytujú celosvetovo, prevažne v oblastiach s nízkym hygienickým štandardom. *Entamoeba* species sú rozšírené v tropických a subtropických oblastiach, rezervoárom je asymptomatický človek, lebo stolicou vylučuje odolné cysty [20].

Záver

Cieľom práce bolo zamerať sa na infekčné príčiny nodózneho erytému. Je potrebné zdôrazniť, že úspešnej liečbe tohto ochorenia predchádza dôkladná a náročná diagnostika. Tá býva zložitá najmä pri asymptomatickom alebo atypickom priebehu infekcie. Nodózny erytém infekčnej etiológie máva dobrú prognózu. V liečbe sa postupuje podľa zistenej infekčnej príčiny cielene antimikrobiálnymi liekmi, a to dostatočne dlhú dobu. V čase akútnych ťažkostí, v čase tvorby nových uzlov a ich bolestivosti je vhodný pokoj na lôžku. Aplikuje sa lokálna symptomatická liečba, prípadne kombinovaná podľa potreby s celkovou liečbou. Dôraz sa kladie aj na zistenie a odstránenie prípadných fokusov. Tie by po uzdravení mohli viesť k novým recidívam. Neskôr, po zvládnutí akútnych ťažkostí a uzdravení pacienta, je potrebné individuálne riešiť obmedzenie náročnejšej fyzickej záťaže a športových aktivít aj na dlhšie obdobie.

Práca bola podporená projektom KEGA 038UK-4/2019 a KEGA 032UK-4/2019 MŠVVaŠ SR.

Literatúra

- [1] Schwartz, *Am Fam Physician*. **2007**, 75:695-700.
- [2] Requena, *Dermatol Online J*. **2002**, 8/1:4.
- [3] Dejmková, *Čes Revmatol*. **2006**, 14/4:154-158.
- [4] Hradiská, *Pediatr prax*. **2010**, 11/2:65-66.
- [5] Ozbacivan, *J Immunol Res*. **2017**, doi: 10.1155/2017/8139591.
- [6] Marks, *Elsevier*, **2019**, s. 315-325, ISBN: 978-0-323-43040-1
- [7] Neuschlová, *JLF UK v Martine*, **2017**, 189 s., ISBN 978-80-8187-031-6
- [8] Kumar, *Elsevier*, **2015**, 1391 s., ISBN 978-1-4557-2613-4
- [9] Mert, *Scand J Infect Dis*. **2004**, 36:424-427.
- [10] Nováková, *JLF UK v Martine*, **2018**, 106 s., ISBN 978-80-8187-058-3
- [11] Nováková, *Rev med praxi*. **2018**, 16/4:14-15.
- [12] Kompaníková, *JLF UK v Martine*, **2013**, 209 s., ISBN 978-80-554-0827-9
- [13] Kurata, *Acta Derm Venereol*. **2016**, 96:111-113.
- [14] Bajantri, *J Clin Med Res*. **2018**, 10/7:535-544.
- [15] Ali-Ahmed, *Case Rep Infect Dis*. **2017**, doi: 10.1155/2017/6854913
- [16] Narita, *Front Microbiol*. **2016**, 7:23.
- [17] Lee, *Clin Vaccine Immunol*. **2017**, 24/1:e00471-16.
- [18] Senel, *Int J Dermatol*. **2015**, 54/1:e33-7.
- [19] Schattner, *BMJ Case Rep*. **2018**, bcr-2017-222511.
- [20] Ondriska, *Univerzita Komenského*, **2016**, 239 s., ISBN: 978-80-223-4217-9

Prolymfangiogénny rastový faktor VEGF- C v léziách lichen ruber planus s rôznym stupňom chronického zápalu

Výbohová, D.¹, Adamicová, K.², Hešková, G.¹, Kunertová, L.¹, Mellová, Y.¹, Adamkov, M.³

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

²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej anatómie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin

vybohova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

VEGF-C is the main prolymphangiogenic factor expressed during both prenatal and postnatal lymphangiogenesis. This study is focused at the VEGF-C expression in relation to the degree of inflammation within the chronic cutaneous lichen planus lesions. VEGF-C expression was detected using the immunohistochemical analysis with the antibody - Monoclonal Mouse Anti-Human Vascular Endothelial Growth Factor-C. Quantification of VEGF-C expression (VEGF-C positive area) and inflammatory cell infiltration (cell area of papillary dermis stained by Mayer's hematoxylin) was determined in the standart hotspot areas of epidermis and papillary dermis by using morphometric software. Results did not confirm significant differences in VEGF-C expression (VEGF-C positive area) between the sample groups with weak, mild and high degree of inflammation. Statistical analysis affirmed weak positive correlation between the VEGF-C expression (VEGF-C positive area) and inflammatory cell infiltration in papillary dermis (cell area of papillary dermis stained by Mayer's hematoxylin) in chronic lesions of cutaneous lichen planus.

Keywords: VEGF-C, chronic inflammation, lichen ruber planus

Úvod

Ako prvé prolymfangiogénne faktory boli opísané dva vaskulárne endotelové rastové faktory: VEGF-C (vascular endothelial growth factor - C) a VEGF-D (vascular endothelial growth factor - D) [1].

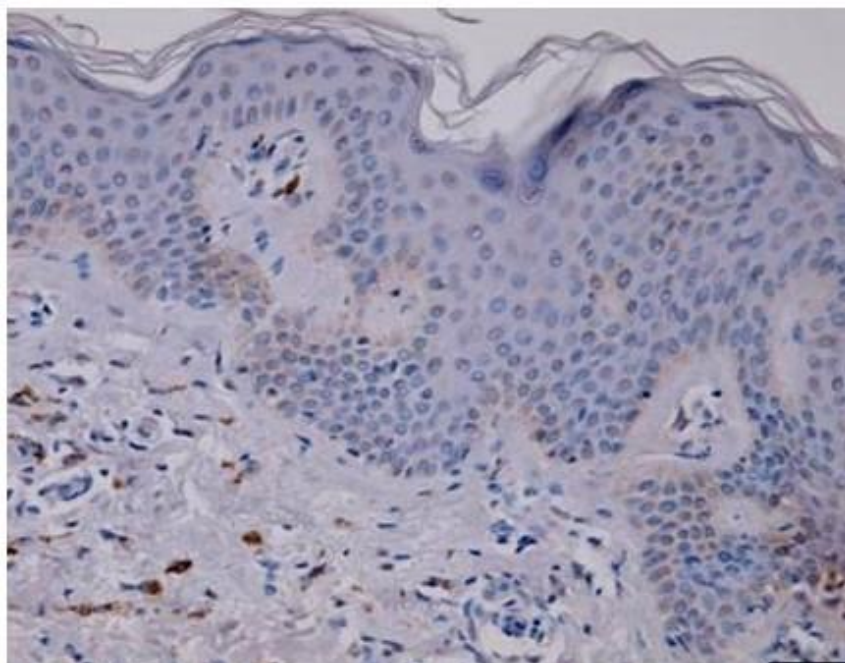
VEGF-C je syntetizovaný ako preproteín, ktorý sa aktivuje proteolýzou v extracelulárnom priestore. Jeho zrelá forma má 30% homologických domén ako izoforma VEGF-A₁₆₅. VEGF-C je významným faktorom pri tumorigenéze a zápale, pričom sa viaže na VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor receptor 3) a stimuluje proliferáciu a migráciu endotelových buniek lymfatických ciev. Je schopný viazať sa aj cez VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) a následne stimuluje proliferáciu a migráciu endotelových buniek krvných ciev a súčasne zvyšuje permeabilitu cievnej steny podobne ako VEGF-A. Jeho expresiu neovplyvňuje hypoxia, ako je to u VEGF-A, ale jeho zvýšená expresia je odpoveďou na zápal, resp. produkciu zápalových cytokínov [2]. Či sa prejaví jeho proangiogénny alebo prolymfangiogénny efekt závisí od stupňa proteolýzy jeho prekursora v extracelulárnom priestore a od pomeru exprimovaných receptorov VEGFR-2 a VEGFR-3 [2,3]. Experimentálne štúdie ukázali, že pre embryonálnu lymfangiogenézu je nevyhnutný iba VEGF-C. V postnatálnej lymfangiogenéze sa zúčastňujú oba, VEGF-C aj VEGF-D, avšak oveľa významnejšiu úlohu má VEGF-C [1].

V našej predchádzajúcej štúdii sme potvrdili nárast plochy krvných aj lymfatických kapilár a aj zvýšenú expresiu faktorov VEGF-A a VEGF-C v kožných léziách psoriasis vulgaris a aj v kožných léziách lichen ruber planus v porovnaní so zdravou kožou [4].

V predkladanej práci sme sa zamerali na hodnotenie expresie VEGF-C v kožných léziách lichen ruber planus s rôznym stupňom zápalu, pričom našim cieľom je zistiť či sa expresia VEGF – C mení v závislosti od stupňa zápalovej infiltrácie v pars papillaris dermis.

Materiál a metodika

Vzorky z kožných lézií (n=14) lichen ruber planus sme získali z archívu Ústavu patologickej anatómie, pričom jednou z podmienok bolo, aby lézie pochádzali z oblastí truncus corporis. Kontrolné vzorky zdravej kože (n=10) boli odobraté rovnako z oblastí truncus corporis z kadaverov bez kožného ochorenia v anamnéze. Expresiu VEGF–C sme študovali použitím imunohistochemickej analýzy (viď Obr. 1) s použitím monoklonálnej protilátky - Monoclonal Mouse Anti-Human Vascular Endothelial Growth Factor–C Clone MM0006-2E65 (Santa Cruz Biotechnology, USA). Na vizualizáciu sme použili kit LSABTM+ / HRP (Labelled Streptavidin-Biotin Complex / Horseradish Peroxidase, code No. K0679; DakoCytomation Denmark A/S) a ako chromogén bol použitý diaminobenzidín. Olympus Evolt E-420 a mikroskop Olympus BX41N slúžili na vytvorenie digitálneho obrazu, ktorý sme následne hodnotili pomocou morfometrického softvéru QuickPhoto Micro (Promicra, Praha, Česká republika). Hodnotili sme VEGF–C pozitívnu plochu, ktorá bola definovaná ako percento plochy buniek detekovaných pomocou monoklonálnej protilátky v štandardnej ploche epidermis a pars papillaris dermis. Zápalovú infiltráciu resp. stupeň zápalu v jednotlivých léziách sme hodnotili ako percento plochy infiltrujúcich buniek v pars papillaris dermis zafarbených Mayerovým hematoxylínom v štandardnej ploche pars papillaris dermis v sledovaných hotspot oblastiach [5-7].



Obrázok 1 Vizualizácia VEGF–C v lézii lichen ruber planus pomocou imunohistochemickej metódy s použitím Monoclonal Mouse Anti-Human Vascular Endothelial Growth Factor–C Clone MM0006-2E65. Mierka 50µm.

Výsledky

Imunohistochemická analýza ukázala, že VEGF-C v zdravej koži exprimovali keratinocyty, najmä keratinocyty v bazálnej vrstve epidermis, a fibroblasty v pars papillaris dermis. Intenzita imunoreaktivity bola zväčša slabá alebo mierna, iba v patologických vzorkách ojedinele silná.

VEGF-C expresia v chronických kožných léziách lichen ruber planus vykazovala signifikantne vyššie hodnoty oproti hodnotám v kontrolnej zdravej koži ($p < 0,0001$).

Pri vzájomnom porovnaní expresie v patologických léziách s rôznym stupňom zápalovej infiltrácie sme však typický nárast s rastúcim stupňom zápalovej aktivity nepotvrdili a to ani v pars papillaris dermis ani v epidermis (viď Tab. 1).

Štatistická analýza potvrdila iba slabú pozitívnu avšak štatisticky nevýznamnú koreláciu medzi percentom infiltrujúcich buniek a percentom plochy VEGF-C exprimujúcich buniek v epidermis a aj v dermis ($r = 0,021$ $p = 0,943$ v epidermis; $r = 0,129$ $p = 0,660$ v dermis).

Tabuľka 1 Percentuálne hodnoty VEGF-C pozitívnej plochy v chronických léziách lichen ruber planus v koži. PPD – pars papillaris dermis.

		Percentuálna VEGF-C pozitívna plocha vzhľadom k štandardnej ploche	
		Epidermis	PPD
Kontrolná zdravá koža		0,41 ± 0,32	0,10 ± 0,07
T- test , hodnota p lézie lichen ruber planus vs kontrolná koža		< 0,0001	< 0,0001
Lézie lichen ruber planus			
nízky stupeň zápalu infiltrácia buniek v PPD menej ako 4%		5,60 ± 5,60	1,02 ± 0,89
mierny stupeň zápalu infiltrácia buniek v PPD 4 - 8%		8,14 ± 3,20	1,52 ± 0,43
vysoký stupeň zápalu infiltrácia buniek v PPD viac ako 8%		6,24 ± 5,08	1,37 ± 0,89
ANOVA test hodnota p		0,721	0,670
Student	nízky vs mierny	0,758	0,647
Neuman	mierny vs vysoký	0,510	0,737
Keuls	nízky vs vysoký	0,876	0,534
test hodnota p			

Diskusia

Postnatálne je prolymfangiogénny faktor VEGF-C exprimovaný najmä v srdci, tenkom čreve, placentе, ováriu a štítnej žľaze [2, 3]. Tvoria ho však aj leukocyty, fibroblasty a keratinocyty [8]. Jeho expresia je indukovaná najmä zápalovými cytokínmi [9].

Zaujímavé zistenie priniesli vo svojej štúdii Skobe a kol. [9], keď dokázali, že expresiu VEGF-C v ľudských dermálnych endotelových bunkách in vitro indukuje aj samotný VEGF-A, rastový faktor krvných endotelových buniek. Toto zistenie naznačuje existenciu molekulárneho crosslinku medzi angiogenézou a lymfangiogenézou [9].

V klinickom obraze chronických zápalových dermatóz dominuje polymorfnosť prejavov, ktoré sa vyvíjajú pomaly a dlho [10, 11]. Nie všetky chronické zápalové dermatózy majú špecifický histologický obraz [12]. Ich spoločným znakom je však obraz chronického zápalu, v ktorom hrá krvná a lymfatická mikrocirkulácia kože významnú úlohu. V chronickom zápalovom procese sú zjavné funkčné zmeny a súčasne sa objavujú aj morfológické zmeny ciev mikrocirkulácie a samozrejme aj novotvorba ciev v zmysle angiogenézy a lymfangiogenézy [13, 14].

Je potvrdené, že lymfangiogenéza nasleduje angiogenézu v chronických zápalových ložiskách kožných lézií psoriasis vulgaris [15, 16], ale napríklad aj v procese hojenia rán [9].

Naša analýza potvrdila niekoľkonásobne vyššiu expresiu VEGF-C v léziách lichen ruber planus v epidermis a aj v dermis v porovnaní so zdravou kožou. Hlavným cieľom však bolo zistiť či expresia stúpa so zvyšujúcou sa zápalovou infiltráciou a tu musíme konštatovať, že naše výsledky síce potvrdili pozitívnu koreláciu medzi expresiou VEGF-C a zápalovou infiltráciou, avšak korelačný vzťah bol iba veľmi slabý.

Literatúra

- [1] Christiansen, *Genes & Cancer*. **2011**, 2:1146-1158.
- [2] Jussila, *Physiol Rev*. **2002**, 82:673-700.
- [3] Roy, *FEBS Letters* **2006**, 580:2879-2887
- [4] Výbohová, *Acta Histochem*. **2015**, 30:20-28.
- [5] Mylona, *Histol Histopathol*. **2007**, 22:825-835.
- [6] Deb, *Microvasc Res.*, **2012**, 84:34-43.
- [7] Boruah, *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. **2013**, 79:216-223.
- [8] Vranova, *J Clin Cell Immunol*. **2014**, 5:2155-9899.
- [9] Skobe, *J Invest Dermatol Symp Proc*. **2000**, 19/1:514-519.
- [10] Braun-Falco, *Osveta*. **2001**, 1474 s., ISBN 80-8063-080-1
- [11] Bologna, *Elsevier Saunders*. **2012**, 2776 s., ISBN-13: 978-0723435716
- [12] Murphy, *W B Saunders Company*. **1995**, 601 s., ISBN-13 978-0721624181
- [13] Majno, *Am J Pathol*. **1998**, 153:1035-1039.
- [14] Hulín, *ProLitera*. **2013**, 1136 s., ISBN 978-80-970253-9-7
- [15] Henno, *J Dermatol Sci*. **2010**, 57:162-169.
- [16] Henno, *Br J Dermatol*. **2010**, 160:581-590.

Vaskulárny endotelový rastový faktor a lymfangiogenéza

Kunertová, L., Výbohová, D., Mellová, Y.

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

Abstract

The vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) have major roles in physiological but also in pathological vasculogenesis. VEGF belongs to the PDGF supergene group characterized by 8 conserved cysteines and functions as a homodimer structure. VEGF-A regulates angiogenesis and vascular permeability by activating 2 receptors, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR/Flk1 in mice). On the other hand, VEGF-C/VEGF-D and their receptor, VEGFR-3 (Flt-4), mainly regulate lymphangiogenesis. The VEGF family includes other interesting variants, one of which is the virally encoded VEGF-E and another is specifically expressed in the venom of the habu snake (*Trimeresurus flavoviridis*). VEGFRs are distantly related to the PDGFR group; however, they are unique with respect to their structure and signaling system [1].

Keywords: VEGF, VEGF receptor, vasculogenesis, angiogenesis, lymphangiogenesis

Úvod

Vaskulogenéza, tvorba a zachovanie cievnych štruktúr, je nevyhnutná pre fyziologické funkcie tkanív a je dôležitá aj pre progresiu ochorení, napríklad ako sú rakovina a zápal. Systémy ako VEGF-VEGFR, efrín-Eph receptory, angiopoetín-Tie a systém Delta-Notch zohrávajú dôležité úlohy v procese angio- a lymfangiogenézy. Vaskulárne endotelové rastové faktory (VEGF) a receptory (VEGFR) regulujú ako vaskulogenézu, vývoj ciev z prekursorových buniek počas skorej embryogenézy, tak tvorbu ciev z už existujúcich ciev [1].

V zdravej ľudskej koži nepodlieha lymfatická cirkulácia výrazným zmenám. Avšak experimentálne štúdie na zvieracích modeloch ukazujú, že za istých patologických podmienok ako je napríklad zápalové alebo nádorové ochorenie kože je tento systém schopný reagovať novotvorbou ciev, ktorá je charakterizovaná triádou na seba nadväzujúcich procesov: proliferácia endotelových buniek, migrácia a proteázová aktivita [2]. Najvýznamnejším impulzom pre lymfangiogenézu sú cytokíny uvoľňované pri zápale, tie následne indukujú tvorbu najvýznamnejších lymfangiogenézu stimulujúcich faktorov VEGF-C a VEGF-D. Väzbou na VEGF-R2 a VEGF-R3 receptor na endotelových bunkách lymfatických ciev iniciujú tieto faktory sled krokov vedúcich k proliferácii a migrácii týchto endotelových buniek a následne k novotvorbe ciev [3-5].

LYMFATICKÝ SYSTÉM

Lymfatický systém má zásadný význam pre normálne udržiavanie rovnováhy v tkanivách. V priebehu dňa 50% z celkového množstva proteínov uniká z krvného obehu a nereabsorbuje sa späť. Preto je vrátenie týchto proteínov a makromolekúl do krvného obehu zásadným pre udržanie objemu plazmy a zabránenie zvyšovania tlaku v tkanivách. Okrem toho, dôsledné vstrebávanie prebytočnej tekutiny z interstícia zabezpečuje adekvátnu výživu buniek. Lymfatický systém je tiež zapojený

do reakcie organizmu na infekciu. Lymfatické cievy priamo transportujú antigén-bunky do lymfatických uzlín, sú preto nevyhnutné pre rozvoj bunkovej imunity. Hoci lymfatické cievy spravidla sprevádzajú krvné cievy, ich hustota nie je vždy paralelná s hustotou krvných.

Lymfatický systém na rozdiel od krvného, je otvorený, jednosmerný tranzitný systém, ktorého cievy obsahujú extravasálnu tekutinu nazývanú lymfatická tekutina, lymfa, ktorá sa skladá z intersticiálnej tkanivovej tekutiny, makromolekúl a buniek a je bohatá na proteíny a lymfocyty.

Lymfatické kapiláry vykazujú v stavbe cievnej steny isté morfológické odlišnosti od krvných kapilár, neobsahujú pericyty a majú slabo vyvinutú alebo až chýbajúcu bazálnu membránu. Lymfatické kapiláry majú tiež väčší a nepravidelnejší lúmen. Charakteristickou črtou sú tzv. kotviace vlákna (fibrilínové filamentá), ktoré kotvia endotelové bunky lymfatických kapilár ku kolagénovým vláknam v dermis [3, 6].

V tkanivových rezoch sa lymfatické cievy podobajú krvným, ale sú spravidla tenšie a viac nepravidelné. V mnohých smeroch sa ale oba systémy na seba podobajú. Lymfatická mikrocirkulácia kože je tvorená podobne ako krvná, dvoma spleťami: plexus lymphaticus subpapillaris et plexus lymphaticus reticularis. Vasa lymphocapillaria začínajú svojimi slepými koncami v dolných častiach dermálnych papíl a pokračujú do povrchovej splete – plexus lymphaticus subpapillaris. Z nej pokračujú lymfatické kolektory – vasa lymphatica do hlbkej – plexus lymphaticus reticularis [6, 7].

Stena lymfatických kapilár je tvorená tenkou endotelovou výstelkou, ktorá je tenšia ako v krvných kapilárach, bazálna membrána chýba alebo je nekompletná a stena kapilár nie je stabilizovaná pericytmi. K vonkajšiemu povrchu endotelových buniek sú pripojené mikrofilamenty fibrilínu tzv. kotviace fibrily, ktoré fixujú kapiláru k elastickým a kolagénovým vláknam v dermis a reagujú na zmeny v interstíciu. V prípade zvýšeného tlaku v interstíciu, napríklad pri edéme, sa ťahom kotviacich fibríl kapiláry otvárajú, zväčšujú svoj lúmen a zväčšujú sa aj štrbiny medzi endotelovými bunkami, čím sa výrazne zvýši permeabilita cievnej steny [6, 8-11]. Endotelové bunky lymfatických kapilár sa tvarom podobajú dubovému listu a nie sú medzi sebou tak pevne spojené ako v krvných kapilárach. Vytvárajú ventilové spojenia [10] tzv. „button like junctions“ [9] alebo „overlapping intercellular junctions“ [6], ktoré sú jedinečné a typické iba pre lymfatické kapiláry. Výbežky susedných endotelových buniek lymfatických kapilár sa vzájomne prekrývajú a fungujú ako ventily. Zjednodušene: za kludových podmienok, ak je tlak v interstíciu nízky, ventily zostávajú uzatvorené, výbežky endotelových buniek sa prekrývajú. Ak však dôjde k hromadeniu tekutiny v interstíciu a tlak sa zvýši, ťahom kotviacich fibríl sa susedné endotelové bunky od seba vzdialia, výbežky endotelových buniek sa už nebudú prekrývať a ventil medzi susednými bunkami sa otvorí pre prestup tekutín, bielkovín a buniek [6, 9, 10]. Väčšie cievy sú obklopené svalovou vrstvou, ktorá sa kontrahuje v reakcii na vazoaktívne látky, čím napomáha transportu tekutiny, keďže v lúmene je nízky intraluminálny tlak. Zároveň pulzácia artérií, nachádzajúcich sa v okolí cievy a kontrakcia kostrového svalstva stláča cievy, a tým zvyšuje účinnosť transportu tekutín. Lymfatické cievy majú, podobne ako krvné, svoje vasa vasorum, ktorá poskytuje sieť krvných ciev pre výživu cievy.

VEGF

Vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF), tiež známy ako faktor vaskulárnej permeability (VPF), bol pôvodne opísaný ako mitogén špecifický pre endotelové bunky. Je produkováný mnohými bunkovými typmi vrátane nádorových buniek,

makrofágov, trombocytov, keratinocytov renálnych mesangiálnych buniek. Aktivity VEGF nie sú obmedzené iba na cievny systém, ale úlohu hrajú aj pri normálnych fyziologických funkciách, ako je tvorba kostí, hematopoéza, hojenie rán a vývoj.

Skupina génov VEGF obsahuje najmenej 7 členov, vrátane VEGF-E odvodeného z vírusového genómu. Skupina génov VEGFR má troch až štyroch členov v závislosti od druhu stavovca. VEGF-A a jeho receptory VEGFR-1 a VEGFR-2 hrajú hlavné úlohy vo fyziologickej, ako aj patologickej angiogenéze, vrátane nádorovej angiogenézy. VEGF-C / D a ich receptor VEGFR-3 môžu regulovať angiogenezu pri včasnej embryogenéze, ale väčšinou fungujú ako kritické regulátory lymfangiogenézy. VEGF je vysoko špecifický mitogén pre vaskulárne endotelové bunky. Izoformy sa líšia svojou molekulovou hmotnosťou a biologickými vlastnosťami, ako je napríklad ich schopnosť viazať sa na heparínsulfátové proteoglykany bunkového povrchu. Expresia VEGF je zosilnená v dôsledku hypoxie. VEGF indukuje proliferáciu endotelových buniek, podporuje migráciu buniek a inhibuje apoptózu. In vivo, indukuje angiogenezu a lymfangiogenezu. Ovplyvňuje permeabilitu ciev a hrá dôležitú úlohu pri regulácii vaskulogenézy. Deregulovaná expresia VEGF prispieva k rozvoju nádorov a mnohých ďalších ochorení podporovaním novotvorby ciev v týchto patologických léziách. Novotvorba ciev je charakterizovaná abnormálnou angiogenezou a lymfangiogenezou. V dôsledku toho, inhibícia VEGF signalizácie ruší vývoj patologických stavov. Rôzne formy VEGF sa viažu na dva receptory tyrozínkinázy, VEGFR-1 a VEGFR-2, ktoré sú exprimované takmer výlučne v endotelových bunkách.

VEGF-A kóduje proteín viažuci heparín, ktorý existuje ako disulfidicky viazaný homodimér, viaže sa na VEGFR-1 a VEGFR-2 a aktivuje ho. Podporuje angiogenezu, vaskulárnu permeabilitu, migráciu buniek a génovú expresiu. Indukuje proliferáciu a migráciu vaskulárnych endotelových buniek a je nevyhnutný pre fyziologickú aj patologickú angiogenezu. Narušenie tohto génu u myší viedlo k abnormálnej tvorbe embryonálnych krvných ciev. Tento gén je neregulovaný v mnohých známych nádoroch a jeho expresia koreluje so štádiom nádoru a jeho progresiou.

VEGF-B, na rozdiel od VEGF-A, hrá v cievnom systéme menej výraznú úlohu. Je dôležitý pri udržiavaní novovytvorených krvných ciev počas patologických stavov. VEGF-B hrá tiež dôležitú úlohu pri ochrane niekoľkých typoch neurónov, napríklad pri ochrane neurónov v sietnici a mozgovej kôre počas cievnej mozgovej príhody a motoneurónov počas ochorení motorických neurónov, ako je amyotrofická laterálna skleróza.

VEGF-C, VEGF-D sa produkujú ako predčasné formy a štiepia sa proteázami, v oboch amino- a karboxylových koncových častiach. Tieto molekuly vykazujú vyššiu afinitu k VEGFR-3, ktorá je exprimovaná na lymfatických endotelových bunkách a stimuluje receptor pre lymfangiogenezu. Okrem toho tieto proteíny majú slabú afinitu k VEGFR-2, teda do určitej miery aktivujú aj angiogenezu. VEGF-C je exprimovaný počas embryogenézy, zatiaľ čo VEGF-D je exprimovaný po narodení a v dospelosti.

VEGF-E. VEGF-A je kľúčovým regulátorom tvorby kožných krvných ciev, má aj úlohu počas hojenia rán, zvyšuje jej reepitelizáciu. VEGF-E indukuje proliferatívne kožné lézie, ktoré sa iniciujú v ránach a sú charakterizované rozsiahlou tvorbou krvných ciev, epidermálnou hyperpláziou. Cievne zmeny pod léziou sú do značnej miery

spôsobené vírusom exprimovaným VEGF-E. Štúdie na myšiach ukázali, že VEGF-E môže indukovať epidermálne zmeny, ako sú zmeny pozorované vo vírusovej lézii. Injekcia VEGF-E do normálnej kože zvýšila počet endotelových buniek a krvných ciev v dermis a zvýšené epidermálne zahusťovanie a počet keratinocytov. Injekcia VEGF-E do poranenej kože, spôsobila zvýšenie hrúbky a plochy neoepidermy a zosilnila reepitelizáciu rany [18].

Lymphangiogenesis

Pre reguláciu lymfangiogenézy sú dôležité predovšetkým dva vaskulárne endotelové faktory: VEGF-C a VEGF-D, viažuce sa na tyrozínkinázový receptor VEGFR-3, exprimovaný na lymfatických endotelových bunkách. Pre vývoj lymfatických ciev počas embryonálneho obdobia je dôležitý hlavne VEGF-C, na postnatálnej lymfangiogenéze sa podieľajú oba faktory, aj keď aj tu prevažuje VEGF-C [12].

VEGF-C je preproteín, ktorý sa aktivuje proteolýzou v extracelulárnom priestore. Je významným faktorom lymfangiogenézy počas embryonálneho vývoja, ale aj postnatálne, vo fyziologických aj patologických podmienkach, najmä pri tumorigenéze a zápale, pričom sa viaže na VEGFR-3 a stimuluje proliferáciu a migráciu endotelových buniek lymfatických ciev. Prejavenie sa lymfangiogénneho efektu závisí od stupňa proteolýzy jeho prekursora v extracelulárnom priestore a od pomeru exprimovaných receptorov VEGFR-2 a VEGFR-3. V dospelosti je exprimovaný v srdci, tenkom čreve, placentе, ováriu a štítnej žľaze. Tvoria ho aj leukocyty, fibroblasty a keratinocyty. Jeho expresia je indukovaná najmä zápalovými cytokínmi [13, 14].

VEGF-D je známy aj ako FIGF (c-fos-induced growth factor). Tak ako VEGF-C aj tento faktor sa viaže na oba receptory VEGFR-2 a VEGFR-3 a predpokladá sa aj rovnaký účinok. Faktom však je, že jeho biologické správanie je zatiaľ oveľa menej preskúmané [13, 14].

VEGF-A je ďalším vaskulárnym endotelovým faktorom, ktorý stimuluje lymfangiogenézu väzbou na VEGFR-2, ale jeho vplyv v porovnaní predchádzajúcimi faktormi je veľmi slabý. Oslabenie jeho vplyvu spôsobuje signálna cesta Notch [14]. Nagy a kol. [4] vo svojej štúdii tvrdí, že lymfatické cievy indukované prostredníctvom VEGF-A, ktoré vznikajú v oblasti chronického zápalu sú funkčne aj morfológicky abnormálne, majú široký lúmen, nefunkčné chlopne a prietok lymfy v nich je spomalený [4].

Medzi stimulatory lymfangiogenézy patria aj iné faktory. Napríklad angiopoetíny, FGF, PDGF, hepatocytový rastový faktor a endotelín - 1 [12]. Angiopoetín - 1 indukuje fosoryláciu TIE-2 receptora, receptora, ktorý viaže angiopoetín, na lymfatických endotelových bunkách, a tým podporuje rast nových lymfatických ciev [16]. Angiopoetín - 2 indukuje lymfangiogenézu v okrajoch hojajúcich sa rán [17]. FGF (fibroblast growth factor) indukuje proliferáciu lymfatických endotelových buniek, ich migráciu a prežívanie, avšak doteraz nie je jasné akým mechanizmom pôsobí in vivo. In vitro štúdie dokázali priamy vplyv FGF-2 na FGFR-1 na endotelových bunkách ale aj nepriamy vplyv stimuláciou produkcie VEGF-C [15]. Ako inhibitory lymfangiogenézy sú v súčasnosti známe aj TGF- β , IFN- γ (interferon- γ) a endostatín [12, 15].

Záver

Keďže v dostupnej literatúre je iba málo štúdií zaoberajúcich sa štúdiom plexus lymphaticus v koži a lymfangiogenézou za fyziologických podmienok, ale aj v patologických léziách kože a navyše ich výsledky sú rôznorodé, je veľmi dôležité

venovať pozornosť tejto problematike, čo môže prispieť k rozšíreniu poznatkov v tejto oblasti, a tým prispieť k liečbe rôznych patologických stavov a ochorení.

Literatúra

- [1] Masabumi, *Genes Cancer*. **2011**, 2/12:1097-1105.
- [2] Peppes, *Clin Cancer Res*. **2001**, 7:462-468.
- [3] Braverman, *J Invest Dermatol Symp Proc*. **2000**, 5:3-9.
- [4] Nagy, *J Exp Med*. **2002**, 196/11:1497-1506.
- [5] Ferrara, *Endocr Rev*. **2006**, 25/4:581-611.
- [6] Skobe, *J Invest Dermatol Symp Proc*. **2000**, 5/1:14-19.
- [7] Ryan, *Int J Dermatol*. **1986**, 25:411-419.
- [8] Gerli, *Lymphology*. **2000**, 33:148-157.
- [9] Baluk, *Journal of experimental medicine*. **2007**, 204:2349-2362.
- [10] Lüllmann-Rauch, *Grada Publishing a.s.* **2012**, ISBN 8024737299
- [11] Lund, *Cancer discovery*. **2016**, 6:22-35.
- [12] Christiansen, *Genes cancer*. **2011**, 2:1146-1158.
- [13] Jussila, *Physiological review*. **2002**, 82:673-700.
- [14] Roy, *Febs letters*. **2006**, 580:2879-87.
- [15] Zheng, *The Journal of Clinical Investigation*. **2011**, 124:878-887.
- [16] Tammela, *Cell*. **2010**, 140:460-476.
- [17] Kim, *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*. **2007**, 27:564-70.
- [18] Wise, *Cell Microbiol*. **2012**, 14/9:1376-90.

Histomorfologické odchýlky v distribúcií nelymfocytových bunkových populácií a štruktúre týmusu u detí s vrodenými chybami srdca

Mešťanová, V.¹, Varga, I.², Adamkov, M.¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav histológie a embryológie, Bratislava
veronika.mestanova@uniba.sk

Abstract

Thymus is a central organ of the immune system and plays a pivotal role in support and regulation of cell-mediated defence mechanisms protecting organism against the impairment of internal homeostasis and integrity. Thymus consists of two distinct compartments, cortex and medulla. The fundamental structural unit of the thymic microenvironment network is a thymic epithelial reticular cell (TEC). These TECs in interaction with other fixed and wandering cells maintain the ideal niche for T lymphocytes maturation. Disrupted embryological development of the thymus primordia in association with the congenital heart defects, may negatively affect the physiological immune mechanisms and subsequently result in the various immunodeficient states. The objective of this study was to analyse thymic microarchitecture in patients with congenital heart defects. Study was performed on archived formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks from 48 children patients suffering from heterogeneous congenital heart malformations. Tissue was sectioned and pre-processed for conventional histology (hematoxylin eosin), immunohistochemical (cytokeratins AE1/AE3, HMW cytokeratins). The widest range of morphological diversity was detected in reduction of functional cytotreticulum, accompanied with the foamy macrophages and enlarged Hassall's corpuscles. Our findings indicate that normal structural pattern of thymus is altered in diagnoses as tetralogy of Fallot (TOF), ventricular septal defect (VSD) and transposition of the great arteries (TGA). We propose that the detailed analysis of thymic histomorphology could critically contribute to unveil the pathophysiology of diseases associated with disrupted adaptive immune mechanisms.

Keywords: thymus, thymic epithelial reticular cells, congenital heart disease

Úvod

Týmus predstavuje špecifické bunkové mikroprostredie pre rôzne štádiá vyvíjajúcich sa T lymfocytov, ktoré sa zúčastňujú obrannej reakcie voči cudzorodým antigénom, no zároveň zabezpečujú imunologickú toleranciu voči telu vlastným antigénom. Vzájomná interakcia medzi zrejúcimi tymocytmí a ne-lymfocytovými bunkovými populáciami je nevyhnutná z pohľadu zachovania špecificity a stability cytotretikula týmusu. Postnatálne týmus podlieha vekom-podmieneným zmenám vyúsťujúcim do gradujúcej regresie vo veľkosti a súčasne v aktívnom exporte zreých T lymfocytov [1-3]. Popri fyzologickej involúcií, ktorá spravidla nastupuje v adolescentnom veku jedinca, môže týmus meniť svoju normálnu architektúru vplyvom heterogénnych negatívnych faktorov, napr. podvýživa, horúčka, exogénne steroidy, rádiácia a infekcie [4, 5]. Hypoxia, recidivujúce infekty dýchacích ciest, rastová retardácia a pľúcna hypertenzia sú výrazné stresové faktory u pacientov s vrodenými chybami

srdca (CHD – Congenital Heart Disease) [6]. Pacientom, ktorých diagnóza si vyžaduje nevyhnutnú chirurgickú korekciu vrodených chyby srdca, je spravidla peroperačne vykonávaná čiastočná alebo úplná tymektómia. CHD predstavujú heterogénne štrukturálne abnormality srdca postihujúce srdcové priehradky, chlopne a výtokovú oblasť srdca. Nezriedka sú asociované s rozvojom porúch imunitného systému. Komplikácie v podobe oneskorených imunitných odpovedí môžu prameniť zo spoločných prvkov v embryogenéze týmusu a srdca [7, 8]. Bunky neurálnej lišty, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu v normogenéze srdca, migrujú cez tretí a štvrtý faryngový oblúk do novovznikajúceho aortopulmonálneho septa [9]. Narušená migračná dráha neuroektodermových buniek cez faryngovú oblasť embrya môže vyústiť do vzniku vrodených chýb derivátov príslušných faryngových oblúkov – týmus, prištítna telieska a štítna žľaza [10]. V predloženej práci sa autori zamerali na histomorfologické a imunohistochemické hodnotenie tkaniva týmusu u detských pacientov s vrodenými chybami srdca.

Materiál a metódy

V práci autori spracovali 48 vo formálne fixovaných a v parafíne zaliatých archívnych vzoriek týmusu z diagnosticky uzavretých prípadov pacientov s vrodenými chybami srdca. Priemerný vek pacientov bol $1,17 \pm 2,47$ roka. Vzhľadom k etiopatogenéze jednotlivých CHD boli pacienti rozdelení do dvoch skupín – konotrunkálnych malformácií (KM) (n=34; geneticky podmienených narušenou migráciou buniek kardiogénnej neurálnej lišty) a štrukturálnych malformácií (ŠM) (n=14; bez priameho vplyvu narušenej migrácie pluripotetných buniek neuroektodermového pôvodu). Navyše, pacienti boli podľa veku zaradení do troch skupín s odstupom šiestich mesiacov, s cieľom vyhodnotiť závislosť pozorovaných histomorfologických zmien v súvislosti s narastajúcim vekom pacientov, resp. pretrvávajúcou dobou pôsobenia negatívnych faktorov na iniciáciu stresom-podmienennej involúcie. Základné histomorfologické parametre boli hodnotené pomocou štandardného farbenia hematoxylin a eozín. Histotopografická distribúcia nelymfocytových retikulárnych epiteliálnych buniek týmusu bola hodnotená s použitím imunohistochemického farbenia (proti látka proti cytokeratínom AE1/AE3, HMW – Dako, Dánsko). Vzorky boli semikvantitatívne hodnotené vo svetelnom mikroskope Olympus BX41 a mikrofotografie zachytené pomocou Olympus E-420. Percentuálna hodnota pozitívnej AE1/AE3 a HMW imunoreakcie bola zaznamenaná v rozpätí menej ako 10 %, 11 % až 50 %, viac ako 50 %. Štatistická analýza prebehla pomocou GraphPad InStat (χ^2 -test). Hodnota $p < 0,05$ bola hodnotená ako štatisticky významná.

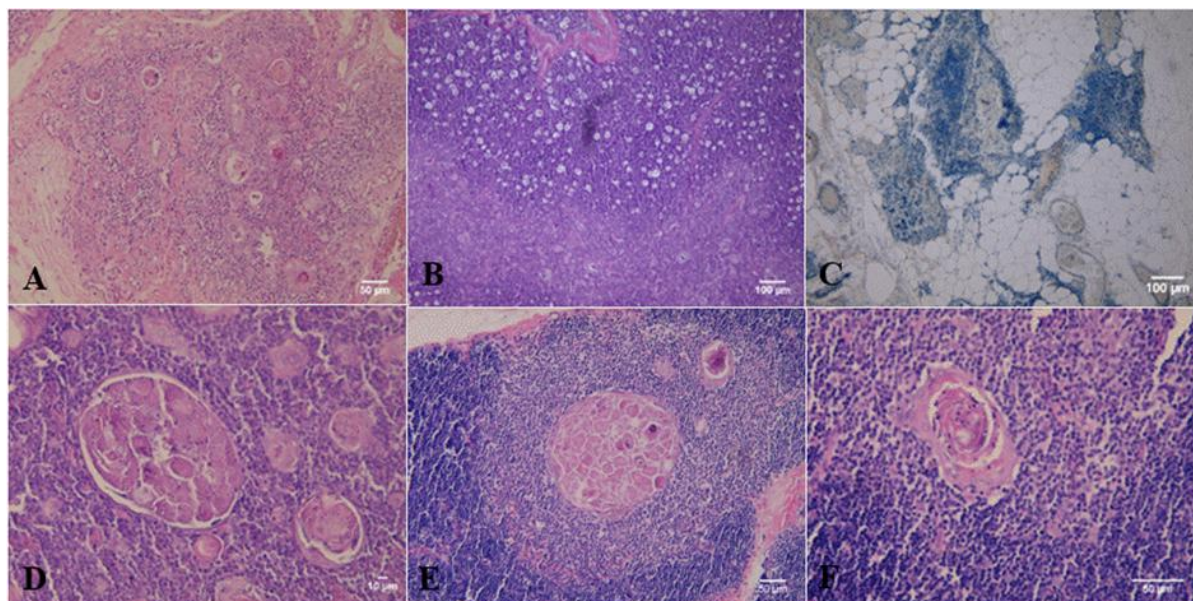
Výsledky

Normálna štruktúra týmusu s typickou diferenciáciou na periférne lokalizovanú kôru a centrálnu uloženú dreň vykazovalo 33,33 % vzoriek (n=16) zo všetkých hodnotených prípadov. Medzi najčastejšie a najmarkantnejšie histomorfologické zmeny v cytoarchitektonike týmusu patrili: výrazný pokles kortikálnej celularity, ktorý bol výrazne asociovaný s celkovým kortikálnym zúžením, no zároveň rozšírením väzivovej septácie, vymiznutie kortikomedulárneho rozhrania, prítomnosť penových makrofágov s typickou manifestáciou – obrazom tzv. hviezdnej oblohy. Mimoriadne heterogénny charakter vykazovali dreňové Hassallove telieska (HT), ktorých morfológická variabilita prechádzala od normálnej štruktúry, cez zväčšené až po cystické HT (Obr. 1). Navyše, štrukturálne zmeny HT vykazovali štatisticky signifikantný vzťah práve s vekom pacientov, resp. s pretrvávajúcim vplyvom rôznorodých stresových faktorov, napr. hypoxiou pri cyanotických chybách srdca

(transpozícia veľkých ciev, Fallotova tetralógia) (Tab. 1). Subcelulárna lokalizácia cytokeratínov AE1/AE3 a HMW vykazovala cytoplazmatickú pozitivitu. Každá imunopozitívna bunka bola hodnotená ako pozitívna bez ohľadu na intenzitu imunoreakcie. Výrazná pozitivita cytokeratínov bola exprimovaná v subkapsulárnej zóne a v oblasti Hassalových teliesok drene. Na druhej strane, kortikálna imunohistochemická cytokeratínov pozitivita mala difúzny charakter. Napriek tomu, že výsledky preukázali značnú variabilitu v percentuálnom výskyte AE1/AE3 a HMW exprimujúcich buniek vo vzorkách zo skupiny konotrunkálnych malformácií srdca, štatisticky sa nepotvrdila žiadna korelácia medzi expresiou cytokeratínov a typom vrodených chýb srdca či vekom pacientov.

Tabuľka 1 Hodnotenie štrukturálnych zmien Hassalových teliesok drene v asociácii s vekom pacientov s vrodenými chybami srdca.

Štruktúra HT	Normálna						Zväčšená						Cystická					
Vek pacientov	Spolu		KM		ŠM		Spolu		KM		ŠM		Spolu		KM		ŠM	
	n=48	%	n=34	%	n=14	%	n=48	%	n=34	%	n=14	%	n=48	%	n=34	%	n=14	%
≤ 6 mesiacov	10	20.83	5	14.71	5	35.71	11	22.92	10	29.41	1	7.14	8	16.67	5	14.71	3	21.43
6 – 12 mesiacov	5	10.42	5	14.71	0	0	1	2.08	1	2.94	0	0	2	4.17	2	5.88	0	0
≥ 12 mesiacov	1	2.08	0	0	1	7.14	1	2.08	0	0	1	7.14	9	18.75	6	17.65	3	21.43
P	Všetky prípady - p=8.549E-03**						Konotrunkálne defekty p=1.946E-03**						Štrukturálne defekty p=0.436					



Obrázok 1 Histomorfologické parametre hodnotené v tkanive týmusu u pacientov s CHD. **A.** Pokles kortikálnej celularity v asociácii so stieraním kortikomedulárneho rozhrania a dilatovanými väzivovými priehradkami (vek pacienta (VP) 3 mesiace, dg. transpozícia veľkých ciev (TGA)), **B.** obraz tzv. hviezdnej oblohy (VP 8 mesiacov, dg. pulmonálna stenóza), **C.** stresom-podmienená involúcia – predominancia tukového tkaniva (VP 5 dní, dg. TGA), **D.** variabilita vo veľkosti a štruktúre Hassalových teliesok drene (VP 2 mesiace, dg. syndróm hypoplastického ľavého srdca), **E.** evidentný pokles v počte avšak prominentný nárast vo veľkosti HT s centrálnym amorfným debris (VP 4 roky, dg. defekt komorového septa (VSD)), **F.** Hassallove teliesko so zriedkavým nálezom inkorporovaných lymfocytov v jeho štruktúre (VP 4 roky, dg. VSD).

Diskusia a záver

Predložená práca sumarizuje morfologické zmeny v týmuse s častým výskytom u

pacientov s vrodenými chybami srdca. Ceyran a kol. [11] popísal identické histomorfologické zmeny v tkanive týmusu pacientov s CHD - pokles bunkovej hustoty v kortikálnej oblasti, zaniknutie definovanej kortikomedulárnej hranice s prominujúcim podielom T lymfocytov v dreni a prítomnosťou tzv. obrazu hviezdnej oblohy. Ďalší autori [3, 12] pripisujú výskyt týchto histomorfologických odchýlok strate T lymfocytov, zvýšenej miere de-novo angiogenézy a rozšíreniu perivaskulárnych priestorov v dôsledku nedostatočného zásobovania tkaniva kyslíkom, čo negatívne ovplyvňuje proces bunkového rastu a prežívania lokálnych buniek. Naše výsledky naznačujú, že hypoxia môže vystupovať ako agent provokatér a iniciovať tak nástup predčasnej involúcie u detských pacientov s CHD. Morfologické zmeny sme pozorovali najmä u pacientov s perzistujúcou hypoxiou (transpozícia veľkých ciev, Fallotova tetralógia). Tieto nálezy sú často asociované s funkčnou poruchou týmusu u detí s vrodenými chybami srdca, konkrétne s negatívnym dopadom na diferenciačný proces T lymfocytov [3, 13]. Histopatologická transformácia Hassallových teliesok v hodnotenom súbore indikuje prebiehajúce degeneratívne procesy. Prítomnosť cystických Hassallových teliesok dominovala v skupine pacientov s dg. Fallotova tetralógia, transpozícia veľkých ciev a defekt komorovej priehradky. Štrukturálne fluktuácie Hassallových teliesok sú typické pre stresom-podmiernenú involúciu. Popísaná variabilita vo veľkosti, počte a štruktúre HT vykazovala štatisticky signifikantný vzťah s progredujúcim vekom pacientov, resp. skôr svedčí o perzistujúcich nepriaznivých hypoxických podmienkach v týmuse [11], keďže 77,08 % (n=37) detských pacientov bolo mladších ako jeden rok. Pretrvávajúce stresom-podmiernené perinvolučné zmeny môžu u týchto pacientov vyprovokovať predčasné starnutie imunitného systému [14]. Diverzitu mikroprostredia týmusu u pacientov s vrodenými chybami srdca (najmä TGA a VSD) vykazovali nielen morfológické ale aj fenotypické prvky. Poklesu AE1/AE3 a HMW exprese markerov retikulárnych epitelových buniek týmusu je vo vedeckých prácach [15, 16] pripisovaná kľúčová rola v patogenéze autoimunitných a imunodeficientných stavov u pacientov s vrodenými chybami srdca. Autori prinášajú komplexnú analýzu histomorfologických odchýlok vo formovaní špecifického mikroprostredia týmusu u detí s vrodenými chybami srdca. Výsledky naznačujú, že štrukturálna remodelácia týmusu môže byť závislá od doby persistujúceho pôsobenia negatívnych faktorov, napr. hypoxie, s potenciálnym rizikom dopadu na proces diferenciácie, zrenia a exportu vyvíjajúcich sa T lymfocytov.

Literatúra

- [1] Gui, *Aging Dis.* **2012**, 3:280-90.
- [2] Jablonska-Mestanova, *Bratisl Med Letters.* **2013**, 114/7:402-8.
- [3] Loginova, *Arkh Patol.* **2013**, 75/4:9-14.
- [4] Savino, *Br J Nutr.* **2007**, 98/1:S11-6.
- [5] Poliani, *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* **2009**, 9/6:489-95.
- [6] Pierpont, *Circulation.* **2007**, 115/23:3015-38.
- [7] Varga, *Neuro Endocrinol Lett.* **2008**, 29/6:837-45.
- [8] Roosen, *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* **2015**, 20/1:101-6.
- [9] Plein, *Curr Top Dev Biol.* **2015**, 111:183-200.
- [10] Adams, *Insights Imaging.* **2016**, 7/1:69-76.
- [11] Ceyran, *Int J Clin Exp Pathol.* **2015**, 8/7:8038-47.
- [12] Hale, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2002**, 282/4:H1467-77.
- [13] Savino, *Proc Nutr Soc.* **2010**, 69/4:636-43.
- [14] Zlamy, *Immun Ageing.* **2016**, 13:3.
- [15] Sun, *Biomed Res Int.* **2014**, 2014:206929.
- [16] Abramson, *Annu Rev Immunol.* **2017**, 35:85-118.

Poruchy prehĺtania po prednej krčnej diskektómii

Fejercák, T.

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

Abstract

Difficulty swallowing after anterior cervical discectomy (ACD) is a common complication. Pathophysiology of postoperative dysphagia is unclear, and the treatment of persistent dysphagia is problematic. Published incidence of dysphagia after ACD is in the range of 0 - 89 %. Factors that are usually associated with increased risk of postoperative dysphagia include: multiple level surgery, female gender, long surgery duration and age over 60 years. It is possible to quantify dysphagia after ACD with subjective patient evaluation using Bazaz-You dysphagia score and objectify it using videofluoroscopy and fibroscopy. Prevention of postoperative dysphagia includes: consideration of surgical techniques, elimination of the hematoma incidence in the surgical wound, using implants with low or zero profile and intraoperative control of the endotracheal tube cuff pressure.

Keywords: anterior cervical discectomy, dysphagia, risk factors, prevention

Úvod

Degeneratívne ochorenie krčnej chrbtice predstavuje najčastejšiu príčinu postihnutia krčnej miechy a miechových koreňov. Chirurgická liečba degeneratívneho ochorenia krčnej chrbtice prichádza do úvahy po vyčerpaní všetkých terapeutických konzervatívnych modalít. U pacientov s rozvojom zánikovej radikálnej symptomatológie alebo myelopatie predstavuje metódu voľby. Podobne, ako u iných operačných výkonov, aj pri prednej krčnej diskektómii (ACD) sa môžu vyskytnúť peroperačné a pooperačné komplikácie. Dysfágia po ACD je dobre známou komplikáciou, jej patofyziológia je však nejasná a liečba perzistujúcich porúch prehĺtania problematická.

Patofyziológia dysfágie po prednej krčnej diskektómii

Prehĺtanie sa delí do troch neuroanatomických fáz. *Orálna fáza* začína vstupom jedla do ústnej dutiny, kde je rozdrobené pomocou žuvacích svalov a jazyka. Svalstvo jazyka, ktoré inervuje hypoglossálny nerv, manipuluje s bolusom jedla. Komplexná koordinácia mäkkého podnebia, pohybov jazyka, slinných žliaz a žuvacieho svalstva vrátane vedenia informácií z chemo- a mechanoreceptorov v ústach je zabezpečená faciálnym, glossofaryngeálnym a hypoglossálnym nervom. *Faryngeálnu fázu* charakterizuje už mimovôľová koordinácia svalovej kontrakcie, ktorá posúva bolus jedla. Kritickým aspektom tejto fázy je elevácia laryngu a inverzia epiglottis, ktorá zabraňuje vniknutiu jedla do dýchacích ciest a kontrakcia mm. constrictores pharyngis. Inerváciu faryngeálnej fázy prehĺtania zabezpečujú n. laryngeus superior a n. laryngeus recurrens. *Ezofageálna fáza* začína pasážou bolusu jedla cez horný ezofageálny sfinkter a končí pasážou cez dolný ezofageálny sfinkter. Táto fáza je kompletne mimovôľová a realizovaná koordinovanou peristaltikou ezofageálnej muskulatúry. Koordináciu tejto fázy zabezpečuje autonómna činnosť plexus myentericus Auerbacha, ktorý je pod kontrolou vágového nervu. Glossofaryngeálny a hypoglossálny nerv môžu byť poškodené pri prístupe v segmente C3 a vyššie, n.

laryngeus superior pri prístupe k intervertebrálnemu disku C3-4 a n. laryngeus recurrens pri prístupe v segmente C6 a nižšie. Nervus vagus, prirodzene chránený v karotickom púzdre, môže byť poškodený excesívnou retrakciou v celej oblasti subaxiálnej krčnej chrbtice [1].

Tabuľka 1 Incidencia dysfágie po prednej krčnej diskektómii.

Autori	Štúdia	Počet pacientov	1M	6T	3M	6M	12M	24M	> 24M
Stewart et al. (1995)	R	73	45%			12%			
Frempong-Bodau et al. (2002)	P	23	67%						
Bazaz et al. (2002)	P	249	50%	32%		18%	13%		
Riley et al. (2005)	R	454			30%	22%		21%	
Yue et al. (2005)	R	74							35%
Scholz et al. (2011)	P	30		8%		3%			
Kalb et al. (2012)	P	249		89%	30%	7%	0		
Wu et al. (2017)	R	358			6%	3%			
Opsenak et al. (2019)	P	73		53%	33%	19%	22%		

(R – retrospektívna štúdia, P – prospektívna štúdia, M – mesiac, T – týždeň)

Rizikové faktory, incidencia a prevencia

Mnohé štúdie referujú prítomnosť poruchy prehĺtania už pred ACD [2-5]. Frempong-Bodau a kol. [5] referujú u 66 % pacientov s myelopatiou predoperačné abnormality prehĺtania, ktoré boli verifikované pomocou pasáže bária. Predpokladali preto, že príčinou prehĺtania u týchto pacientov je porucha lokálnych reflexných mechanizmov na pregangliovej - sympatickej úrovni v dôsledku kompresie miechy [5].

V publikáciách sa skúmajú rôzne rizikové faktory v súvislosti s dysfágiou po ACD. Ich výsledky sa však líšia a nemožno ich považovať za jednoznačne smerodajné. Medzi faktory, ktoré sú väčšinou spájané so zvýšeným rizikom pooperačnej dysfágie patria počet operovaných segmentov, ženské pohlavie, dlhý operačný čas a vek nad 60 rokov. Faktory, u ktorých prevažne nebol zaznamenaný súvis s pooperačnou dysfágiou sú bolesti hlavy, typ incízie, veľkosť predných osteofytov, pseudoartróza, zanorenie implantátu, uvoľnenie alebo rozlomenie implantátu, intubácia, závažnosť myelopatie, retrakcia ezofágu, osteoartrída, užívanie alkoholu a obezita [1].

Publikovaná incidencia dysfágie po ACD kolíše v rozmedzí 0 - 89 % (Tab. 1) a klesá s narastajúcim odstupom od vlastného operačného výkonu [3, 5, 6, 8, 11, 17-20]. Bazaz a kol. [6] prospektívne analyzovali 249 pacientov po ACD a krčnej somatektómii a pooperačne hodnotili závažnosť dysfágie pomocou vlastného skórovacieho systému (*Bazaz-Yoo dysphagia score*), ktorý je uvedený v Tab. 2. Ženské pohlavie bolo rizikovým faktorom šesť mesiacov po operácii. Multisegmentový operačný výkon bol rizikovým faktorom jeden mesiac po operácii, ale v období šesť mesiacov pooperačne už v porovnaní s monosegmentovými výkonmi nebol rozdiel štatisticky významný. Vek, primárny versus revízny výkon, somatektómia versus diskektómia a použité inštrumentárium neboli rizikovými faktormi v celom období sledovania [6]. Smith-Hammond a kol. [7] sledovali v trojročnej prospektívnej štúdii incidencia dysfágie pre predných krčných výkonoch. V kontrolných skupinách sledovali tiež pacientov po zadných výkonoch na krčnej a drikovej chrbtici. Dysfágia bola zisťovaná pred- a pooperačne cestou subjektívnych otázok a verifikovaná videofluoroskopicky alebo endoskopicky fibroskopom. Incidencia dysfágie u pacientov po prednom krčnom prístupe bola 50 %, pričom u 70 % týchto pacientov regredovala v priebehu dvoch mesiacov. Zaujímavé bolo zistenie, že až 20 % pacientov po výkonoch na krčnej chrbtici

zadným prístupom malo poruchy prehľadania [7]. Štúdia publikovaná autormi Yue a kol. [8] potvrdzuje, že pooperačná dysfágia môže pretrvávať aj dlhšie ako 12 mesiacov. Autori sledovali 74 pacientov priemerne 7 rokov po predných výkonoch na krčnej chrbtici. Celková incidencia dysfágie bola 35 %, pričom v 16,2 % prípadov bola stredne ťažkého a u jedného pacienta ťažkého stupňa podľa Bazaz-Yoo dysfagického skóre [8].

Tabuľka 2 Bazaz-Yoo dysfagické skóre (upravené podľa [6]).

Bazaz-Yoo dysfagické skóre	Charakteristika stupňa porúch prehľadania subjektívne hodnoteného pacientom
žiadna	bez problémov s prehľadáním
mierna	sporadické problémy s prehľadáním
stredne ťažká	problémy s prehľadáním v súvislosti s určitou stravou
ťažká	časté problémy s prehľadáním pri väčšine druhov stravy

Medzi preventívne opatrenia redukujúce výskyt pooperačnej dysfágie patria šetrná operačná technika, dôsledná hemostáza počas operačného výkonu a aplikácia drénu na konci operačného výkonu pre elimináciu hematómu. Ďalšie štúdie skúmali špecifické možnosti prevencie pooperačnej dysfágie. Lee a kol. [9] skúmali význam dizajnu prednej krčnej dlahy ako rizikového faktoru. Vo svojej prospektívnej štúdii zistili, že použitie krčnej dlahy Zephir (Medtronic, Sofamor Danek, USA) je spojené s nižšou incidenciou pooperačnej dysfágie ako použitie dlahy Atlantis od rovnakého výrobcu. Autori vysvetľujú uvedené zistenie hladším povrchom a nižším profilom krčnej dlahy Zephir [9]. Fogel a kol. [10] referujú v retrospektívnej analýze 44 pacientov s perzistujúcou poruchou prehľadania po implantácii konvenčnej dlahy regresiu dysfágie po jej odstránení v 55 % prípadov. Peroperačne nachádzali autori rozsiahle adhérie medzi pažerákom a dlahou, prípadne prevertebrálnou fasciou [10]. Uvedené štúdie predikujú nižšiu incidenciu pooperačnej dysfágie pri použití implantátov s nulovým profilom [11]. Viaceré štúdie však tento logický predpoklad nepotvrdili [2-4]. Zástupcom týchto implantátov sú kliečky s integrovanou dlahou v tele implantátu (napr. Zero Profile a Zero Profile VA, DePuy Synthes, Švajčiarsko), ktoré by mali eliminovať nevýhody konvenčnej dlahy a zachovať jej prednosti [4, 11, 12]. Pedram a kol. [13] potvrdili, že podanie kortikoidu neredukuje incidenciu dysfágie po ACD. Dysfágiu po ACD redukuje aj desuflácia a insuflácia manžety endotracheálnej kanyly, udržiavanie tlaku v nej do 20 mmHg počas výkonu a minimalizácia retrakčného času [14-16].

Záver

Incidencia dysfágie včasnom období po ACD sa pohybuje na úrovni okolo 50 %. U väčšiny pacientov dochádza do šiestich mesiacov pooperačne k úprave, pričom 12 mesiacov pooperačne je incidencia porúch prehľadania už len okolo 10 %. Medzi faktory, ktoré sú spájané so zvýšeným rizikom pooperačnej dysfágie patria počet operovaných segmentov, preexistujúca porucha prehľadania, ženské pohlavie, dlhý operačný čas a vek nad 60 rokov. K preventívnym opatreniam patria šetrná operačná technika, dôsledná hemostáza, redukcia retrakčného času a udržiavanie nízkeho tlaku v manžete endotracheálnej kanyly.

Literatúra

- [1] Anderson, *Global Spine J.* **2013**, 3/4:273-286.
- [2] Opšenák, *Gastroenterologie a hepatologie.* **2017**, 71/2:150-155.
- [3] Opsenak, *Rozhledy v chirurgii.* **2019**, 98/3:115-120.

- [4] Opšenák, *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. **2018**, 81/6:669-677.
- [5] Frempong-Bodau, *Journal of Spinal Disorders & Techniques*. **2002**, 15/5:362-368.
- [6] Bazaz, *Spine*. **2002**, 27/22:2453-2458.
- [7] Smith-Hammond, *Spine*. **2004**, 29/13:1441-1446.
- [8] Yue, *European Spine Journal*. **2005**, 14/7:677-682.
- [9] Lee, *CSRS 32nd annual meeting*. **2004**, Edited, Boston, MA.
- [10] Fogel, *Spine Journal*. **2005**, 5/2:140-144.
- [11] Scholz, *Clinical Orthopaedics and Related Research*. **2011**, 469/3:666-673.
- [12] Opšenák, *Neurológia*. **2019**, 14/1:20-23.
- [13] Pedram, *Spine Journal*. **2003**, 12/1:84-90.
- [14] Apfelbaum, *Spine*. **2000**, 25/22:2906-2912.
- [15] Ratnaraj, *Journal of Neurosurgery*. **2002**, 97/2:176-179.
- [16] Opšenák, *Neurológia pre prax*. **2017**, 18/2:92-95.
- [17] Stewart, *British Journal of Neurosurgery*. **1995**, 9/5:605-609.
- [18] Riley, *Spine*. **2005**, 30/22:2564-2569.
- [19] Kalb, *World Neurosurgery*. **2012**, 77/1:183-187.
- [20] Wu, *Clinical Spine Surgery*. **2017**, 30/5:554-559.

Rizikové faktory zanorenia intersomatickej kliečky po prednej krčnej diskektómii

Hanzel, R.

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

Abstract

Intervertebral cage subsidence into adjacent vertebral bodies may provoke a significant segmental kyphotisation and represents a risk factor for an adjacent segment degeneration and for unfavourable clinical results of the surgical treatment. There are various risk factors for the cage subsidence with their significance being unclear.

Keywords: cage subsidence, anterior cervical discectomy, risk factors

Úvod

Zanorenie náhrady intervertebrálneho disku predstavuje jej preniknutie do spongiózy priľahlých stavcových tiel s následným poklesom výšky medzistavcového priestoru (Obr. 1). Strata operačne získanej distrakcie môže viesť až k restenóze neuroforamin, a tým k recidíve radikulárnej symptomatologie [1]. Zanorenie náhrady po prednej krčnej diskektómii (ACD) sa vyskytuje najčastejšie vo ventrálnej časti intervertebrálneho priestoru, čím podmieňuje segmentovú kyfotizáciu. Kyfotizácia pohybového segmentu je považovaná za významný rizikový faktor degenerácie priľahlých segmentov [2, 3].



Obrázok 1 Zanorenie ukotvenej kliečky ROI-C® v segmente C6/7.

Incidencia, prevencia a rizikové faktory

Incidencia zanorenia intersomatických kliečok vyrobených z rôznych materiálov po ACD sa udáva v širokom rozpätí 0-62 % [4-6]. Bartels a kol. [4] referujú incidenciu

zanorenia kietky bez istenia dlahou na úrovni 29,2 %. Wu a kol. [6] dokonca udávajú incidenciu zanorenia kietky až na úrovni 62.5 %. Dhir a kol. [5] referujú zanorenie ukotvenej kietky Zero Profile® vo všetkých prípadoch implantácie, signifikantné zanorenie do priľahlého tela stavca viac ako 3 mm malo incidenciu 2 %.

Chen a kol. [7] referujú vyššiu incidenciu zanorenia titánovej kietky v porovnaní s kietkou z polyéteréterketónu (PEEK). Kietka ukotvená pomocou distrakčne zavedených skrutiiek má predpoklad vyššej incidencie zanorenia v porovnaní s kietkami istenými konvenčnou dlahou [5, 8, 9]. Lee a kol. [9] udávajú vyššiu incidenciu zanorenia kietky s integrovanou dlahou Zero Profile® v porovnaní s kietkou istenou konvenčnou krčnou dlahou. Napriek tomu kietky s integrovanou dlahou a nulovým profilom majú svoje nesporné výhody [8, 10-12]. Štúdie udávajú nesignifikantný vplyv zanorenia intersomatickej kietky na efekt operačnej liečby [2, 6].

Oslabenie mechanickej odolnosti tiel priľahlých stavcov v dôsledku osteoporózy je považovaná za významný rizikový faktor zanorenia implantátu [13]. Rovnako rozsiahle peroperačné opracovanie krycej plochy priľahlých tiel stavcov a extenzívna resekcia ventrálnych osteofytov patria medzi rizikové faktory zanorenia implantátu [2, 14]. Nagaraja a kolektív v biomechanickej štúdií na kadaveroch zistili, že opracovanie krycej plochy vedie k jej stenčeniu priemerne o 20 % [14]. Barsa a Suchomel [2] referujú zanorenie neistenej kietky v takmer 90 % prípadov do distálneho priľahlého stavca. Biomechanická stabilita ukotvených kietok je limitovaná v anteflexii a retroflexii v porovnaní s kietkami istenými konvenčnou dlahou [15]. Práve pooperačné segmentové mikropohyby sú považované za jednu z príčin zanorenia [2, 16]. Rozsah peroperačnej distrakcie je považovaný za významný rizikový faktor zanorenia implantátu [17]. Zanorenie intersomatickej kietky vo ventrálnej časti intervertebrálneho priestoru vedie ku segmentovej kyfotizácii, ktorá je rizikovým faktorom degenerácie priľahlého segmentu [18]. Medzi preventívne opatrenia zanorenia kietky patria aj ventrálna pozícia implantátu v intervertebrálnom priestore a implantácia kietky s dostatočne veľkou kontaktnou plochou ku krycím plochám priľahlých stavcových tiel [2]. Individualizované cervikálne implantáty vyrobené technológiou 3-D tlače sľubujú zníženie rizika zanorenia vzhľadom k tomu, že presne kopírujú veľkosť a kongruenciu krycích plôch tiel priľahlých stavcov [19].

Záver

Za rizikové faktory zanorenia náhrady sú považované osteoporóza, rozsah peroperačnej segmentovej distrakcie, poloha implantátu v intervertebrálnom priestore, veľkosť kontaktnej plochy implantátu ku krycím plochám tiel priľahlých stavcov, rozsah peroperačného opracovania krycích plôch tiel stavcov, excesívna resekcia ventrálnych osteofytov, istenie náhrady dlahou ako aj materiál použitý na výrobu náhrady. Zanorenie intersomatickej kietky vedie ku segmentovej kyfotizácii, ktorá je rizikovým faktorom degenerácie priľahlého segmentu.

Literatúra

- [1] Opšenák, *Neurológia*. **2019**, 14/1:20-23.
- [2] Barsa, *European Spine Journal*. **2007**, 16:1395-1400.
- [3] Katsuura, *European Spine Journal*. **2001**, 10:320-324.
- [4] Bartels, *Neurosurgery*. **2006**, 58:502-508.
- [5] Dhir, *The Bone & Joint Journal*. **2012**, 94(Supp.):142
- [6] Wu, *European Spine Journal*. **2012**, 21/7:1374-1382.
- [7] Chen, *European Spine Journal*. **2013**, 22/7:1539-1546.

- [8] Opšenák, *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. **2018**, 81/6:669-677.
- [9] Lee, *Spine (Phila Pa 1976)*. **2015**, 40/10:563-570.
- [10] Opšenák, *Gastroenterologie a hepatologie*. **2017**, 71/2:150-155.
- [11] Opsenak, *Rozhledy v chirurgii*. **2019**, 98/3:115-120.
- [12] Opšenák, *Neurológia pre prax*. **2017**, 18/2:92-95.
- [13] Lim, *Spine (Phila Pa 1976)*. **2001**, 26:951-956.
- [14] Nagaraja, *Spine (Phila Pa 1976)*. **2015**, 15/11:2425-2432.
- [15] Scholz, *Spine (Phila Pa 1976)*. **2009**, 34:156-160.
- [16] Kast, *Neurosurgical Review*. **2009**, 32:207-214.
- [17] Li, *Journal of Clinical Neuroscience*. **2015**, 22/3:566-569.
- [18] Katsuura, *European Spine Journal*. **2001**, 10:320-324.
- [19] Kolarovszki, *Brněnské neurochirurgické dny s doprovodnou výstavou zdravotnícké techniky a farmacie*. **2018**, 3.

Retrospektívna analýza zdravotného stavu skupiny detí z okresu Martin

Marčeková, M.¹, Neščáková, E.², Mellová, Y.¹

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

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie, Bratislava
marcekova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Exclusive breast-feeding during the first months after birth is associated with lower asthma rates during childhood. The effect, caused by immunomodulatory qualities of breast milk, avoidance of allergens, or a combination of these and other factors, strengthens the advantage of breast-feeding, especially if a family history of atopy is present [1]. Recent researches support relation between the duration of breast-feeding and occurrence the allergy relative to the mode of delivery. The aim of this study was to evaluate the state of health of children after ten years. Authors follow up 216 children during two years ten years ago (2017-2018). The group of children, according the sex, and duration of breastfeeding, in the subgroups were separated. The children were born spontaneously (84 %) and with caesarean section (16 %). We decided to perform the retrospective examination after ten years. We obtained the reading about the state of health of 74 children -39 boys and 35 girls and we evaluated relative to the sex, mode of delivery and duration of breastfeeding. The conclusions our report do not confirm the relation between the mode of delivery and the appearance of allergy, however they confirm the influence of duration of breast-feeding.

Keywords: breastf-feeding, atopy, rhinitis, asthma

Úvod

Alergie patria u detí medzi chronické ochorenia [2]. Počas perinatálneho vývinu a v skorom perinatálnom období pôsobí komplex enviromentálnych faktorov najvýraznejšie. Exkluzívne dojčenie, v priebehu prvých mesiacov po narodení, môže ovplyvniť výskyt alergií a súvisí s nižším výskytom astmy počas detstva. Tento efekt je spôsobený imunomodulačnou aktivitou materského mlieka, s absenciou alergénov. Dojčenie je veľkou výhodou, špeciálne v rodinách, s dedičnou atopiou [4].

Materiál a metódy

Počas rokov 2007a 2008 autori sledovali telesný vývin 216 detí, od narodenia, do veku jedného roka. Po desiatich rokoch skontrolovali telesný vývin a zdravotný stav sledovanej skupiny. V uvedenej práci boli použité údaje získané pri pravidelnej kontrole 74 desaťročných detí – 39 chlapcov a 35 dievčat.

Výsledky

Zdravotný stav detí sme hodnotili vzhľadom na pohlavie a na dĺžku dojčenia. Zistili sme, že 59 %, z toho 33 % chlapcov a 43 % dievčat z nášho súboru trpí na rôzne druhy alergií. Najčastejšie sa vyskytovala alergická rinitída (10 dievčat a 9 chlapcov) a atopická dermatitída (7 dievčat a 2 chlapci), 2x astma, 1x intolerancia laktózy a 1x deficit bunkovej imunity. 3 dievčatá mali súčasne atopickú dermatitídu a alergickú rinitídu, 1 dievča malo súčasne atopickú dermatitídu a astmu. Všetky štyri

dievčatá neboli vôbec dojčené. U 1 chlapca sa vyskytla súčasne atopická dermatitída a alergická rinitída. Dojčenie: dievčatá: 0M 6 (40 %), 3M 2 (16 %), 6M 1 (6 %), 12M 6 (40 %); chlapci: 1M 2 (13 %), 6M 4 (13 %), 12M 8 (47 %).

Tabuľka 1 Výskyt alergie vzhľadom na typ pôrodu a dĺžku dojčenia u dievčat.

Diagnóza	Typ pôrodu	Dĺžka dojčenia					
		spontánny SC	0M	3M	6M	9M	12M
Dermatitis atopica	7	0	5	0	0	0	2
Rhinitis alergica	8	2	4	1	1	0	4
Asthma bronchiale	3	1	2	0	0	0	1

U dievčat, ktoré boli narodené spontánnym pôrodom sa alergie vyskytli častejšie. Atopickou dermatitídou a Astmou trpeli najviac nedojčené deti

Tabuľka 2 Výskyt alergie vzhľadom na typ pôrodu a dĺžku dojčenia u chlapcov.

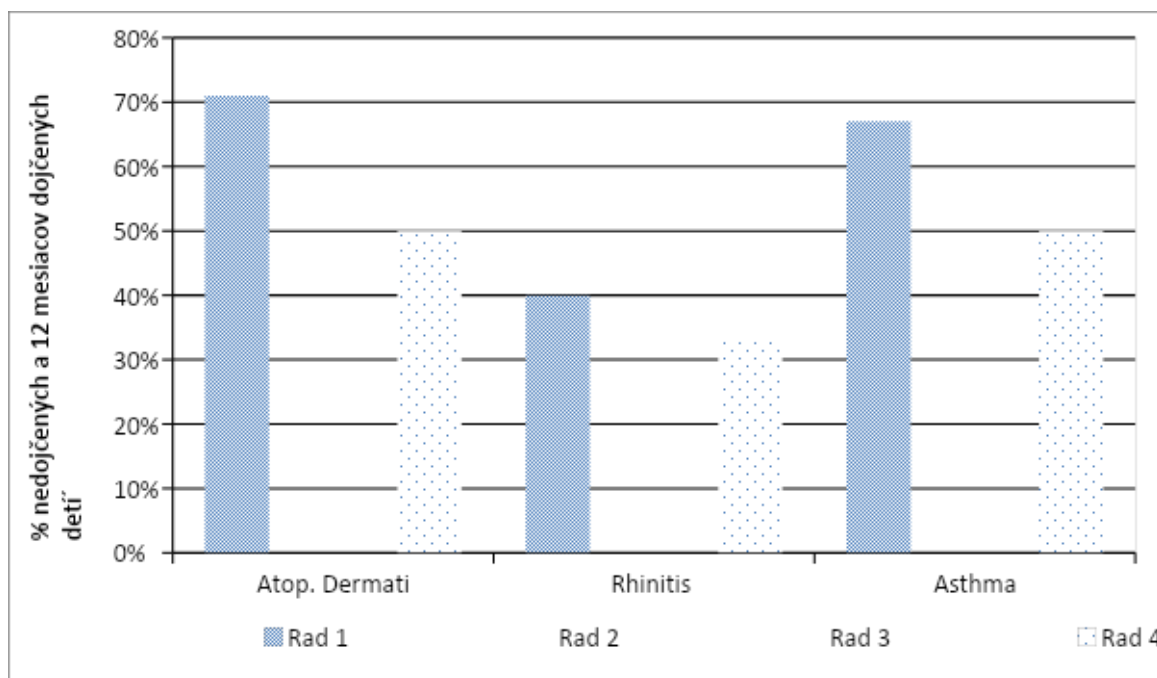
Diagnóza	Typ pôrodu	Dĺžka dojčenia					
		spontánny SC	0M	3M	6M	9M	12M
Dermatitis atopica	2	0	0	0	1	0	1
Rhinitis alergica	9	0	3	1	1	1	3
Asthma bronchiale	2	0	1	0	0	0	1

Chlapci boli narodení všetci spontánnym pôrodom a nevidno u nich výrazný rozdiel medzi dĺžkou dojčenia, vzhľadom na jednotlivé diagnózy.

Tabuľka 3 Porovnanie chlapcov a dievčat s rovnakou diagnózou vzhľadom na dĺžku dojčenia.

Diagnóza	N = 54		χ^2	p hodnota
	0M N = 30	12M N = 24		
Dermatitis atopica	5	3	0,321	0,571
Rhinitis alergica	7	7		
Atop. dermatitída	5	3	0,008	0,928
Asthma bronchiale	3	2		
Rhinitis alergica	7	7	0,148	0,701
Asthma bronchiale	3	2		

V Tab. 3 sme porovnali obidve pohlavia vzhľadom na dĺžku dojčenia. Napriek zlúčeniu obidvoch pohlaví sa štatistická významnosť rozdielov nepotvrdila.



Graf 1 Porovnanie chlapcov a dievčat s rovnakou diagnózou vzhľadom na dĺžku dojčenia. Rad 1= dievčatá nedojčené; Rad 2= chlapci nedojčení; Rad 3= dievčatá dojené 12 mesiacov; Rad 4= chlapci dojené 12 mesiacov

Diskusia

Ľudské mlieko obsahuje imunologické faktory, ktoré bránia rozvoju alergických ochorení, ako je celiakia, a dokonca aj diabetes 1. typu. Mikrobiálna flóra dojených detí obsahuje väčší počet bifidobaktérií a oproti tomu mikrobiálna flóra detí kŕmených náhradnou výživou obsahuje väčšie množstvo enterokokov. Predpokladá sa, že tento rozdiel je spôsobený imunologickými podnetmi rôznych živín v materskom mlieku, ako sú rôzne molekuly s antimikrobiálnou aktivitou, a prítomnosťou prebiotík. Štúdia Palmerovej a kol. [6] potvrdila tiež jasný súvis medzi vývojom alergie na bielkovinu kravského mlieka (CMPA) a dĺžkou dojčenia. Štatisticky významný rozdiel bol zistený medzi skupinou s CMPA, ktorá mala priemernú dĺžku dojčenia 2,2 mesiaca a kontrolnou skupinou s priemernou dĺžkou dojčenia 5,9 mesiaca [6]. Výskyt alergie na proteíny kravského mlieka v poslednom období vzrastá a súvisí s používaním antibiotík počas gravidity a perinatálneho obdobia, s nezrelosťou plodu a predčasným pôrodom [3] a s predčasným ukončením dojčenia [8].

Thavagnanam a kol. [7] v metanalýze uvádzajú, že deti narodené sekciou majú zmenenú bakteriálnu črevnú mikrobiotu a je u nich zvýšené riziko vzniku astmy. Gil a kol. [5] študovali asociáciu medzi sectio caesarea, spôsobom výživy (dojčenie, náhradná výživa) a vznikom alergie na kravské mlieko. Zistili, že dĺžka dojčenia vplyva na vývoj alergie.

American academy of Pediatrics doporučuje exkluzívne dojčenie počas prvých šiestich mesiacov a nepretržité dojčenie minimálne do konca prvého roka života.

V prevencii potravinovej alergie sa neodporúča žiadna diéta tehotných a dojčiacich žien, naopak, takáto diéta oberá matku o dôležité mikronutričné látky. Zaujímavý je fakt, že dojčenie napriek mnohým jednoznačným zdravotným benefitom pre matku a dieťa, pravdepodobne nie je v exkluzívnej podobe ochranným faktorom vo vývoji potravinovej alergie. Pre deti, ktoré nemôžu byť dojené, hydrolyzované formuly sa ukazujú ako protektívne v prevencii alergických ochorení, väčšinou aj tu je však limitácia skôr na vývoj atopickej dermatitídy [1].

Záver

Pred desiatimi rokmi sme sledovali rast a vývin súboru zdravých detí do jedného roka.

Po desiatich rokoch sme sa vrátili ku 74 deťom z tohto súboru a zistil sme, že až 71 % nedojčených dievčat trpí atopickou dermatitídou, oproti tomu touto diagnózou trpí až 50 % chlapcov dojčených dvanásť mesiacov. Alergickou rinitídou trpí rovnaké množstvo dievčat nedojčených ako aj dojčených 12 mesiacov a rovnako je to i u chlapcov. Astma sa prejavila výrazne u nedojčených dievčat a u 12 mesiacov dojčených chlapcov. Absenciu dojčenia a jej negatívny vplyv na vývoj alergie sme pozorovali hlavne u dievčat- nedojčené dievčatá výrazne vyššie trpia alergickými ochoreniami ako nedojčení chlapci.

Dojčenie predstavuje ideálnu výživu v prvých mesiacoch života. Ovplyvňuje vývoj črevného mikrobiómu a podporuje dozrievanie črevnej bariéry. Materské mlieko obsahuje unikátnu substanciu imunoaktívnych látok, ktoré vytvárajú ideálny imunomodulačný prostriedok. Obsah oligosacharidov a ich prebiotický efekt na črevnú flóru, redukuje TH2 bunkovú odpoveď. Imunosupresívna aktivita podporuje vývoj orálnej tolerancie na potravinové a enviromentálne alergény. Na správny vývoj orálnej tolerancie výrazne vplýva súčasné dojčenie v čase zavádzania prvých príkrmov. Prolongované výlučné dojčenie, bez zavedenia inej stravy, dlhšie ako 7-9, mesiacov môže byť spojené s nárastom atopickej dermatitídy a iných alergických ochorení. Napriek mnohým jednoznačným zdravotným benefitom pre matku i dieťa, dojčenie v exkluzívnej forme pravdepodobne nie je ochranným faktorom vo vývoji potravinovej alergie.

Literatúra

- [1] Abafyová, *Pediatrics*. **2017**, 12/51:9-15.
- [2] Fodoreková, *Slovenská antropológia*. **2007**, 10/1:44-49.
- [3] Fuchsová, *Slovenská antropológia*. **2011**, 14/1:16-19.
- [4] Gdalevich, *Journal of Pediatrics*. **2001**, 139/2:261.
- [5] Gil, *Int Arch Allergy Immunol*. **2017**, 173:147-152.
- [6] Palmer, *Plos Biol*. **2007**, 5:177.
- [7] Thavagnanam, *Clinical and experimental allergy*. **2008**, 38/4:629-633.
- [8] Toro-Monjarez, *Revista de gastroenterologica de México*. **2015**, 80/1:27-31.

Účinky *Cinnamomum zeylanicum* L. v syngénnom 4T1 modeli adenokarcinómu mliečnej žľazy u myší

Uramová, S.¹, Kubatka, P.^{1,2}, Solár, P.³, Kajo, K.⁴, Líšková, A.⁵, Samec, M.⁵, Péč, M.²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed - Divízia onkológia, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin; ³Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Ústav lekárskej biológie, Košice; ⁴Onkologický ústav sv. Alžbety v Bratislave, Ústav patológie, Bratislava; ⁵Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin

sona.uramova@uniba.sk

Abstract

The mixture of phytochemicals present in plant foods with a broad spectrum of biologically active compounds can provide additive or synergic effect against carcinogenesis. The aim of this study is to evaluate therapeutic effect of phytochemicals mixtures present in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) in syngeneic (allograft) 4T1 mouse mammary adenocarcinoma model. Cinnamon was used at two concentration of 0,1 % and 1 % in the diet for 15 days. Treatment started in the same day as application of 4T1 cells. After autopsy, histopathological and tumor volume analyses of mouse mammary carcinomas were performed.

Cinnamon significantly reduced volume of 4T1 tumours in higher dose and significantly decreased mitotic index in both groups with administered cinnamon compared to the controls. *Cinnamomum zeylanicum* L. demonstrated therapeutic activities against mouse 4T1 cell line of mammary carcinoma.

Keywords: 4T1 cell line, breast cancer, allograft mouse model, cinnamon

Úvod

Súčasná možnosť v klinickej praxi sú veľmi široké, no i napriek tomu ostáva rakovina veľkým medicínskym a spoločenským problémom. Vo všetkých krajinách sveta je rakovina mliečnej žľazy najčastejšie nádorové ochorenie u žien a zároveň jednou z najčastejších príčin smrti na malígne ochorenia. Súčasný trend poukazuje na stúpajúcu tendenciu výskytu ochorenia. Onkologické štúdie na modelových zvieratách i bunkových líniiach zohrávajú významnú úlohu pri hodnotení nových farmák v predklinických testoch [1, 2]. V stredomorskej oblasti, kde je strava bohatá na fytochemikálie, sa riziko vzniku rakoviny prsníka znižuje [3, 4]. V zrealizovaných štúdiách *in vitro* [5, 6] boli preukázané protirakovinové účinky izolovaných fytochemikálií. Iná štúdia [7] jednoznačne preukázala, že kombinácia šiestich fytochemikálií výraznejšie inhibovala proliferáciu, migráciu a inváziu, či indukovala apoptózu v kmeňových bunkách rakoviny prsníka v porovnaní s jednotlivými biomolekulami. V nedávnej dobe bolo zrealizovaných niekoľko štúdií našou pracovnou skupinou, kde boli jednoznačne preukázané chemopreventívne účinky rastlinných funkčných potravín v modeli mamárnej karcinogenézy *in vivo* a *in vitro*. Jedná sa o komerčne dostupné fytosubstancie ako *Chlorella pyrenoidosa* [8], lyofilizát šupiek tmavého ovocia [9], Klinčekovec voňavý [10] či Dúška tymiánová [11]. Je zrejmé, že za výrazne pozitívne onkostatiké účinky rastlinných substancií nezodpovedá iba jedna chemická látka, ale ide o aditívny či synergický efekt pôsobenia desiatok rôznych fytochemikálií.

K rastlinným funkčným potravinám s potenciálne významným protinádorovým účinkom patrí i škorica. Dominantné fenolické látky prítomné v Škorici pravej (*Cinnamomum zeylanicum* L.) sú cinnamaldehyd, limonén, kopaen, naftalén, 2-propenal či heptán. Doteraz známa predklinická štúdia s karcinómom prostaty preukázala jednoznačne pozitívny efekt škoric na vývoj ochorenia [12]. Antikarcinogénny účinok škoric doposiaľ nebol skúmaný na zvieracom modeli rakoviny prsníka. Naším cieľom bolo okrem základných parametrov experimentálnej mamárnej karcinogenézy u samíc myší sledovať aj vplyv škoric na histopatologické charakteristiky 4T1 buniek karcinómu mliečnej žľazy myší. Hodnotili sme aj vedľajšie účinky škoric na organizmus.

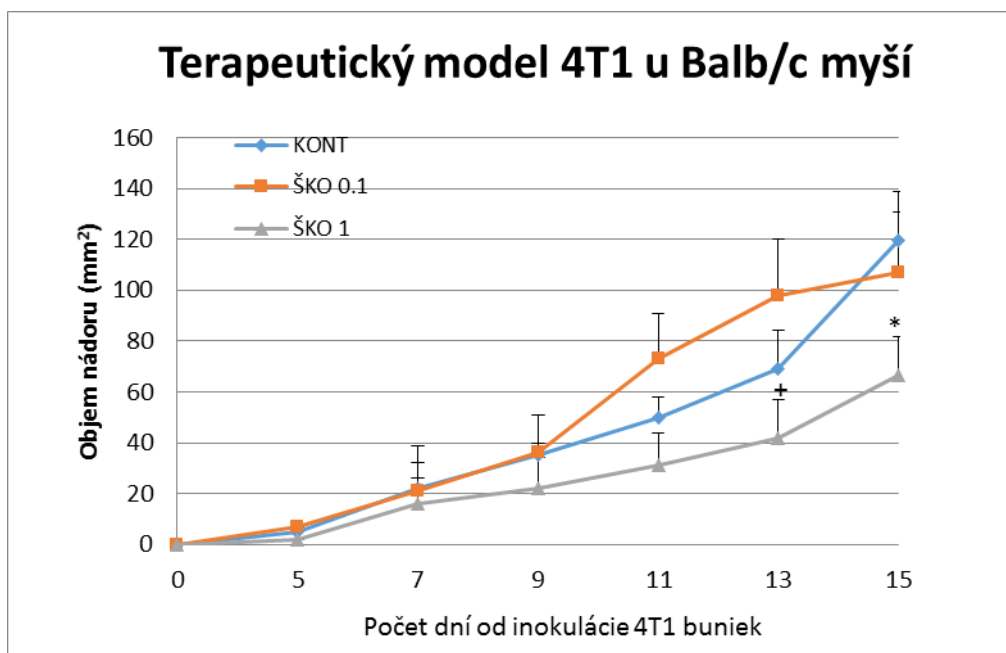
Materiál a metódy

V experimente sme použili panenské samice myší kmeňa Balb/c z chovnej stanice Charles River Germany vo veku 15 týždňov. Zvieratá boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca. Mamárne nádory sme vyvolali subkutánnou aplikáciou myších nádorových 4T1 buniek adenokarcinómu mliečnej žľazy do abdominálnej oblasti v 16. postnatálnom týždni v množstve 10^5 / zviera. Tento typ experimentu predstavuje terapeutický model. Aplikácia fytosubstancie začala v deň inokulácie nádorových buniek a liečba bola aplikovaná počas celej doby experimentu t.j. 15 dní. Fytosubstancia bola zapracovaná v potrave (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Nemecko). Zvieratá v experimente v počte 78 kusov boli rozdelené do 3 skupín: 1. kontrolná skupina bez fytosubstancie, 2. skupina s fytosubstanciou v nižšej koncentrácii (1 g/kg; ŠKO 0.1), 3. skupina s fytosubstanciou vo vyššej koncentrácii (10 g/kg; ŠKO 1). Zvieratá boli trikrát do týždňa palpované a rozmery nádorov zaznamenané. Na konci experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Časť vzoriek tkaniva mamárnych nádorov a pečene boli zafixované v 10 %-nom roztoku pufrovaného formalínu a následne technikou parafínových rezov pripravené na histopatologické vyšetrenie.

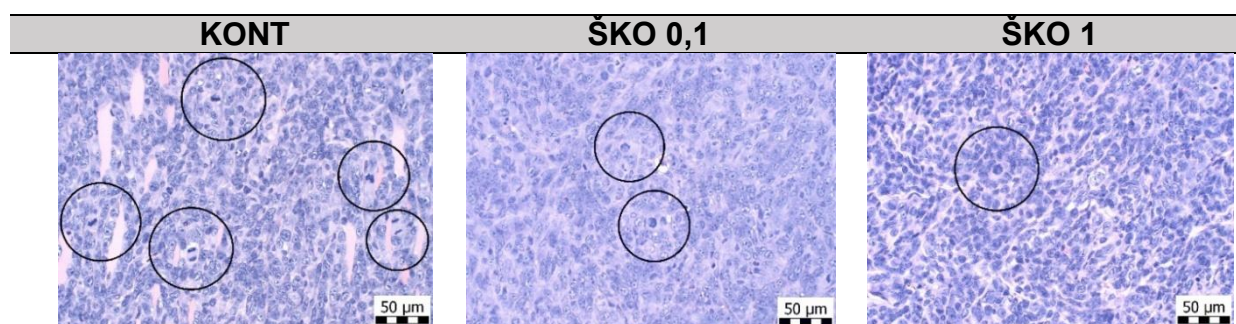
V štatistickom hodnotení bola použitá ANOVA. Experiment bol schválený Etickou komisiou JLF UK (No. EK1948/2017) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. Ro-1640/17-221).

Výsledky

V syngénnom 4T1 modeli u myší škorica aplikovaná vo vyššej dávke na konci experimentu signifikantne redukovala objem 4T1 tumorov voči kontrole (Obr. 1). Histopatologická analýza preukázala v skupine s nižšou aj vyššou dávkou škoric signifikantný pokles mitotického indexu porovnaním voči kontrolám (Obr. 2). V pomere nekroza/celé nádorové tkanivo nebola vplyvom liečby zaznamenaná signifikantná zmena voči kontrole.



Obrázok 1 Vplyv škoricice na objem 4T1 mamárnych nádorov u myší v priebehu experimentu. Dáta sú vyjadrené ako priemery \pm SEM. Signifikančný rozdiel, *P < 0.05 vs kontrola, +P < 0.05 vs ŠKO 0,1.



Obrázok 2 Index mitotickej aktivity (IMA) po liečbe škoricou v 4T1 nádoroch u Balb/c myší. Mitózy (v krúžkoch) v jednotlivých experimentálnych skupinách: A) kontrolná skupina; B) Škorica 0,1; C) Škorica 1; farbenie hematoxylín-eozín; zväčšenie 400x.

Diskusia

Viacero predklinických štúdií popísalo antiproliferatívny, proapoptotický, antimetastatický a antiangiogénny potenciál fytochemikálií v mamárnej karcinogéze [13-17]. Napriek skutočnosti, že klinické štúdie nepriniesli presvedčivé dôkazy o tumor-supresívnych účinkoch rôznych fytochemikálií, či celých rastlinných substancií u ľudí, prísne definované *in vivo* experimenty môžu predstavovať cestu ako dokázať ich antineoplastické účinky v organizme.

V predchádzajúcom období sme použitím 4T1 modelu testovali Dúšku tymiánovú, ktorá prejavila signifikantný terapeutický účinok poklesom objemu adenokarcinómu u myší o 85 % voči kontrole. Tento efekt bol sprevádzaný výrazne pozitívnymi zmenami v histopatologických charakteristikách nádorov. Škorica pravá v tomto experimente prejavila tiež terapeutický efekt voči 4T1 nádorom, aj keď v menej výraznej miere. Naše výsledky s použitím terapeutického 4T1 modelu sú z pohľadu onkologického výskumu veľmi zaujímavé, avšak súčasne aj značne limitované. 4T1 model predstavuje iba jedinou nádorovú líniu, u ktorej sme tymián a škoricu otestovali. Malígne nádory, ktorých bunky intenzívne proliferujú, vytvárajú predpoklady pre vznik nových mutácií, čoho dôsledkom sú nové nádorové línie s rôznym genotypom a fenotypom v rámci tumorovej masy. U takýchto malignít možno pozorovať značne

variabilnú citlivosť nielen voči konvenčným terapeutikám ale aj molekulám prírodného rastlinného pôvodu. Preto sú potrebné klinické štúdie, ktoré zadefinujú úlohu rastlinných potravín najpravdepodobnejšie iba ako doplnkových terapeutík ku konvenčnej liečbe u rôznych nádorových ochorení vrátane karcinómu prsníka. Na základe našich výsledkov ale aj výsledkov ostatných autorov [18, 19] možno dospieť k záveru, že pravidelná konzumácia rastlinných funkčných potravín môže byť prospešná predovšetkým v znižovaní rizika rakoviny prsníka u ľudí.

Záver

Výrazný protinádorový účinok Škorice pravej použitej v našej predklinickej terapeutickej štúdii, vyplynul z kombinovaného účinku biologicky aktívnych látok, ktoré sú v nej obsiahnuté. Uvedený účinok škorice je potrebné potvrdiť aj ďalšími experimentálnymi štúdiami, napr. s použitím chemopreventívneho a *in vitro* modelu.

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

Literatúra

- [1] Kuo, *Free Rad Biol Med.* **2010**, 49/2:214-226.
- [2] Habibi, *PharmBiol.* **2015**, 53/1:92-97.
- [3] Toledo, *JAMA Intern Med.* **2015**, 175/11:1752-1760.
- [4] Braakhuis, *Nutrients.* **2016**, 8/9:547.
- [5] Beana-Ruiz, *Maturitas.* **2016**, 94:13-19.
- [6] Qin, *Sci Rep.* **2015**, 5:12044.
- [7] Ouhtit, *J. Cancer.* **2013**, 4/9:703-715.
- [8] Kubatka, *Nutrition.* **2015**, 31/4:560-569.
- [9] Kubatka, *Eur J Nutr.* **2016**, 55/3:955-965.
- [10] Kubatka, *J Cell Mol Med.* **2017**, 21:2837-2851.
- [11] Kubatka, *Int J Mol Sci.* **2019**, 20/7; pii:E1749.
- [12] Gopalakrishnan, *IUBMB Life.* **2018**, 70(5):445-457.
- [13] Li, *Front Pharmacol.* **2018**, 9:772.
- [14] Zhang, *Sci Rep.* **2018**, 8/1:11255.
- [15] Goldsmith, *Int J Mol Sci.* **2018**, 19/7; pii:E1937.
- [16] Sp, *Nutrients.* **2018**, 10/6; pii:E772.
- [17] Seifaddinipour, *Molecules.* **2018**, 23/1; pii:E110.
- [18] Liu, *Adv Nutr.* **2013**, 4/3:384-392.
- [19] Liu, *J Food Sci.* **2013**, 1/A:18-28.

Vplyv *Thymus vulgaris* L. na expresiu vybraných miRNA v modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy *in vivo*

Líšková, A.¹, Samec, M.¹, Kubatka, P.², Uramová, S.³, Žúbor, P.¹, Adamkov, M.⁴, Danko, J.¹, Péč, M.²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed - Divízia Onkológia, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin

lislova80@uniba.sk

Abstract

There is a huge interest in the preventive use of phytosubstances included in the whole plant foods. Our experiment deals with the chemopreventive and potential therapeutic effects of *Thymus vulagris* L. mediated via modulation of expression of microRNAs in the animal model of experimental mammary carcinogenesis. Experimental animals were divided into three groups: control group without chemoprevention, chemoprevention at a concentration of 0.1 % (THYME 0.1) and chemoprevention at a concentration of 1 % (THYME 1). The group administrated with the chemoprevention at a higher concentration showed significant increase in the expression of miR22 by 68.5 % ($P < 0.05$) and miR210 by 72.5 % ($P < 0.05$) in comparison to control and increase in expression of miR34a by 100 % ($P < 0.05$) when compared to group with chemoprevention at a lower concentration. Moreover, *T. vulgaris* L. increased expression of miR21 by 34 % ($P < 0.05$, THYME 0.1) when compared to control group, and expression of miRNA21 by 37.5 % ($P < 0.05$, THYME 1) vs THYME 0.1 group. In conclusion, the significant chemopreventive efficacy of *Thymus vulagris* L. mediated via increase in expression of miR22, miR210, and miR34a is presumably based on synergic or additive effects of the phytochemicals of the whole plant foods.

Keywords: mammary carcinoma, phytochemicals, thyme, rat, microRNAs

Úvod

Rakovina prsníka patrí medzi najčastejšie diagnostikované malígne ochorenia a zároveň predstavuje jednu z hlavných príčin úmrtnosti v dôsledku rakoviny u žien [1, 2]. Na základe uvedeného, poukazujeme na stúpajúcu potrebu progresu nie len v liečbe rakoviny prsníka, ale najmä v efektívnych spôsoboch prevencie jej vzniku [3]. Vznik a rozvoj malígnych ochorení je ovplyvnený epigenetickými mechanizmami, ktoré zahŕňajú nekódujúce RNA a to predovšetkým microRNA (miRNA) [4]. Medzi substancie s potencionálnym chemopreventívnym účinkom zaradujeme syntetické a prirodzene sa vyskytujúce látky [5], pričom izolované fytochemikálie alebo ich zmesi významne ovplyvňujú viaceré signálne dráhy asociované s rozvojom rakoviny. Chemopreventívna efektívnosť fytochemikálií zároveň spočíva v modulácii tumor-supresorových alebo onkogénnych miRNA a tak umožňuje potlačenie malígneho procesu [6]. *Thymus vulagris* L. (tymian) je aromatická bylina patriaca do čeľade hluchavkovité (Lamiaceae). Tymian je vyhľadávanou substanciou v kozmetickom a potravinárskom priemysle, avšak jeho význam spočíva aj v lekárskej aplikácii [7]. Je významným obsahom saponínov, sterolov, silice a fenolových látok [8] a jeho hlavnou polyfenolovou zložkou je kyselina rozmarínová. Tymian je taktiež zdrojom ďalších

antioxidačných látok, medzi ktoré patrí tymol, karvakol, flavonoidy a luteolín [9]. Na základe významných biologických účinkov tymianu a s prihliadnutím na výsledky predchádzajúcich štúdií [8, 10], sme sa rozhodli analyzovať účinok vňate tymianu na expresiu miR22, miR34a, miR210 a miR21 v modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov.

Materiál a metódy

V priebehu experimentu boli použité samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley z chovnej stanice Charles River Germany vo veku 32 - 36 dní, pričom celkový počet zvierat predstavoval 75 ks. Zvieratá 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. Uvedený animálny model imituje situáciu vysoko rizikových premenopauzálnych žien. Fytosubstancia bola zapracovaná v potrave (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Nemecko). Aplikácia chemoprevencie začala týždeň pred indukciou mamárnej karcinogenézy a trvala až do ukončenia experimentu (15 týždňov). Zvieratá boli rozdelené do 3 skupín: kontrolná skupina bez aplikácie fytosubstancie (KONT), skupina s obsahom tymianu v potrave v nižšej koncentrácii (1 g/kg) (TYM 0.1) a skupina s tymianom v potrave vo vyššej koncentrácii (10 g/kg) (TYM 1). Zvieratá boli tri krát týždenne vážené a palpované za účelom zistenia výskytu, lokalizácie a počtu nádorov mliečnej žľazy. V závere experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Vzorky odobraté z nádorov boli použité na zhodnotenie úrovne expresie vybraných miRNA, pričom homogenizácia tkaniva a izolácia celkovej RNA bola realizovaná s použitím komerčne dostupného kitu *MiRVana microRNA isolation kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Následne prebehla kvantifikácia RNA pomocou NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA). Reverzná transkripcia vyizolovanej RNA bola vykonaná prostredníctvom TaqMan Advanced miRNA cDNA synthesis Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Pre kvantitatívnu real time PCR bola použitá komerčná esej TaqMan™ Advanced miRNA assays Kit (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) pre tumor-supresorové miR22, miR34a, miR210 a onkogénnu miR21. MiR-191-5p bola použitá ako interná kontrola za účelom normalizácie výsledkov. Samotná kvantitatívna real-time PCR prebehla použitím AB7500 Real Time System (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), pričom všetky reakcie kvantitatívnej PCR boli realizované v duplikátoch a získané hodnoty Cq boli spriemerované. Experimenty boli schválené Etickou komisiou JLF UK (No. EK1125/2012) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. Ro-1759/11-221).

Výsledky

Za účelom zhodnotenia chemopreventívneho a prípadného terapeutického potenciálu tymianu sme analyzovali expresiu špecifických miRNA z tkanív mamárnych karcinómov potkanov *in vivo*. Naše výsledky preukázali signifikantné zvýšenie expresie miR22 o 68.5 % ($P < 0.05$) a expresie miR210 o 72.5 % ($P < 0.05$) v prípade aplikácie fytosubstancie vo vyššej dávke (TYM 1) v porovnaní s kontrolnou skupinou (KONT) a zároveň sme pozorovali zvýšenú expresiu miR34a o 100 % ($P < 0.05$) v porovnaní so skupinou s nižšou dávkou (TYM 0.1 vs TYM 1) (Obr. 1).

Diskusia a záver

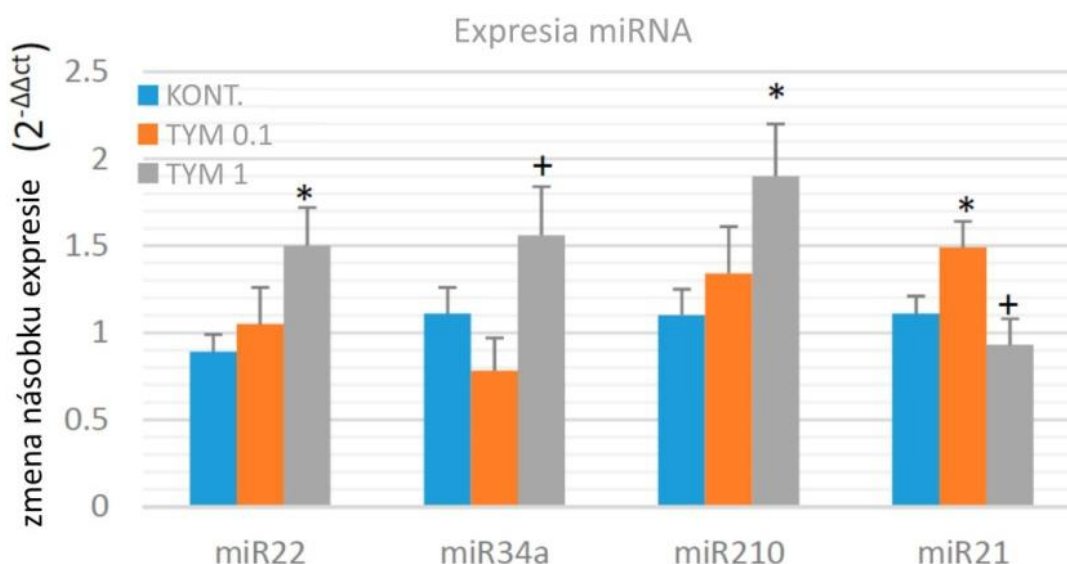
Životné prostredie či strava človeka je charakteristická prítomnosťou veľkého množstva látok podporujúcich vznik nádorového ochorenia. Zároveň však existujú substancie, ktoré sú schopné proces karcinogenézy inhibovať, zvrátiť alebo spomaliť. Výsledky laboratórnych a epidemiologických štúdií poukazujú na súvislosť medzi konzumáciou rastlinných zložiek potravy a rizikom vzniku nádorových ochorení [5, 11]. Úprava životného štýlu a používanie chemopreventívnych látok môže mať významný dopad na znižovanie incidencie rakoviny prsníka [12]. Chemoprevenca prostredníctvom prirodzených substancií je z hľadiska nežiaducich účinkov a nízkej cytotoxicity v porovnaní so syntetickými chemopreventívami omnoho vyhovujúcejšia [2]. Fytochemikálie, ako nenutričné zložky rastlinnej potravy, vykazujú významné protirakovinové a antimutagénne účinky [11]. Na základe *in vitro* a animálnych štúdií je teda možné poukázať na významný protirakovinový účinok fytochemikálií, pričom mechanizmus ich účinku spočíva v modulácii signálnych dráh zúčastňujúcich sa bunkovej proliferácie a apoptózy, podporujúcich imunitný systém či zvyšujúcich citlivosť rakovinových buniek voči terapeutikám [13]. Vzhľadom na to, že nepriaznivé zmeny v úrovni expresie miRNA úzko súvisia s iniciáciou a progresiou malígnych ochorení, sa v súčasnosti veľký dôraz kladie na vplyv fytochemikálií nachádzajúcich sa v strave človeka práve na reguláciu ich expresie [14]. V rámci klinických a predklinických štúdií zaoberajúcich sa rakovinou mliečnej žľazy, predstavujú nami zvolené miR22, miR34a, miR210 a miR21 dobre zdokumentované nekódujúce RNA [15-18]. Významné účinky na expresiu miRNA boli pozorované aj v prípade aplikácie resveratrolu a indol-3-karbinolu, kde došlo prostredníctvom zvýšenia expresie miR34a k potlačeniu nádorovej progresie v bunkách MDA-MB-231, MCF7 a T47D [19, 20]. V priebehu nášho experimentu sme sa preto zamerali na analýzu účinkov vňate tymianu na expresiu miRNA v animálnom modeli N-metyl-N-nitrozoureu indukovanej experimentálnej mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov kmeňa Sprague-Dawley. Tymian podávaný v potrave zvierat v závislosti od dávky výrazne ovplyvnil expresiu miRNA v tkanivách mamárnych karcinómov. Vyššia dávka tymianu viedla k jednoznačnému nárastu expresie miR22, miR34a a miR210, pričom miR22 a miR34a sú považované za špecificky tumor-supresorové, zatiaľ čo miR210 prejavuje svoje tumor-supresorové účinky v skorých štádiách karcinogenézy. Vysvetlenie dávkovo závislého bifázického efektu expresie miR21 v bunkách nádorov mliečnej žľazy *in vivo* si vyžaduje ďalšie vyhodnotenie a porovnanie údajov v rámci onkologického výskumu. Na základe výsledkov nášho experimentu je možné poukázať na pozitívne významné zmeny v expresii miRNA, ktoré prispeli k chemopreventívnej účinnosti tymianu v mamárnej karcinogenéze potkanov. Predpokladáme, že protinádorová efektivita tymianu spočíva v jeho aditívnych či synergických účinkoch ako výsledok kombinácie viacerých fytochemikálií v rámci celistvých rastlinných potravín. Napriek významnému prínosu predklinických štúdií zaoberajúcimi sa chemopreventívnymi účinkami rastlinných substancií, stanovenie dávkovania v prípade aplikácie u ľudí si vyžaduje ďalšie zhodnotenie prostredníctvom presne definovaného a kontrolovaného klinického skúmania.

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

Literatúra

- [1] Bray, CA *Cancer J Clin.* **2018**, 68:394-424.
- [2] Ko, J *Cancer Prev.* **2015**, 20:223-231.
- [3] Pratheeshkumar, *Biomed Res Int.* **2015**, 324021.
- [4] Pasculli, *Semin Cancer Biol.* **2018**, 51:22-35.

- [5] Tanaka, *Molecules*. **2012**, 17:3202-3242.
 [6] Kapinova, *Environ Health Prev Med*. **2018**, 23:36.
 [7] Grigore, *Romanian Biotechnological Letters*. **2010**, 15:5436-5443.
 [8] Al-Menhali, *J Med Food*. **2015**, 18:54-59.
 [9] Yashin, *Antioxidants (Basel)*. **2017**, 6:E70.
 [10] Bozkurt, *Nutr Cancer*. **2012**, 64:1245-1250.
 [11] Surh, *Nat Rev Cancer*. **2003**, 3:768-780.
 [12] Schottenfeld, *Oxford University Press*, **2006**, 1416s., ISBN 978-0195149616
 [13] Kotecha, *Oncotarget*. **2016**, 7:52517-52529.
 [14] Abbasi, *Asian Pac J Trop Med*. **2018**, 11:501-509.
 [15] Wang, *Int J Oncol*. **2016**, 50:345-355.
 [16] Imani, *Oncotarget*. **2017**, 8:23177-23187.
 [17] Venturutti, *Oncogene*. **2016**, 35:2208-2222.
 [18] Jung, *Sci Rep*. **2017**, 7:10921.
 [19] Otsuka, *Oncotarget*. **2018**, 9:24718-24730.
 [20] Hargraves, *Mol Carcinog*. **2015**, 55:486-498.



Obrázok 1 Relatívna úroveň expzie miR22, miR34a, miR210 a miR21 v mamárnom karcinóme v animálnom modeli samíc potkanov. MikroRNA 191-5p bola použitá ako interná kontrola na normalizáciu výsledkov. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetické priemery \pm SEM. Signifikančný rozdiel, * $P < 0,05$ vs. KONT, + $P < 0,05$ vs. TYM 0.1.

Modifikácia metylačného profilu génov účinkom *Thymus vulgaris* L. v experimentálnej mamárnej karcinogénéze

Samec, M.^{1,2}, Jašek, K.², Kubatka, P.^{2,3}, Lišková, A.^{1,2}, Uramová, S.^{1,2}, Adamkov, M.⁴,
Pěč, M.³, Žúbor, P.¹, Lasabová, Z.², Danko, J.¹

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

Abstract

Breast cancer is the most commonly occurring cancer in women worldwide and remains a major public health problem. The risk of mammary glands carcinogenesis can be reduced with naturally bioactive compounds from plants, known as phytochemicals. Recent evidence suggests, that epigenetic modifications including DNA methylation, histone modification, and miRNA expression plays vital role in carcinogenesis. One of the primary objectives of our research was to identify anticancer effect of thyme in the modification of promoter methylation status of tumor suppressor genes *ATM*, *PTEN*, *PITX2*, *RASSF1* and *TIMP3* in the chemopreventive model of breast carcinogenesis. Mammary cancer in rats was chemically induced by NMU (N-methyl-N-nitrosourea). Chemoprevention by thyme was administered in two concentrations 0.1% and 1% in diet and lasted 15 weeks. Our results revealed that thyme in the lower dose in diet (0,1%), as well as in the higher dose in diet (1%) has significantly chemopreventive and therapeutic action which was associated with the decrease in the promoter methylation level of tumor suppressor genes *ATM*, *RASSF1A*, *PTEN*, and *TIMP3* in rat mammary carcinoma cells *in vivo*.

Keywords: *Thymus vulgaris*, epigenetics, mammary carcinogenesis, rat

Úvod

Fytochemikálie sú definované ako sekundárne metabolity a bioaktívne zložky v rastlinných funkčných potravinách. Tieto látky v synergii s ostatnými rastlinnými nutrientami ako sú vitamíny a minerály majú výrazný potenciál v prevencii mnohých civilizačných ochorení, medzi ktoré sú radené aj malígne transformácie buniek a následný rozvoj rakoviny [1]. Nedávne vedecké štúdie preukázali benefit fytochemikálií ako sú flavonoidy, karotenoidy, fenolové kyseliny a organosírne zlúčeniny v rámci regulácie signálnych dráh asociovaných s rakovinou, a tak iniciovať spomalenie progresie karcinogénzy supresiou celulárnych procesov vrátane prežívania a proliferácie nádorových buniek [1, 2]. Okrem toho niektoré štúdie zaznamenali signifikantný genoprotektívny účinok týchto bioaktívnych komponentov rastlín [3, 4]. Tymian (*Thymus vulgaris* L.) z čeľade *Lamiaceae* predstavuje zaujímavú zmes esenciálnych olejov a monoterpénov ako sú tymol, karvakrol a borneol [5]. Fytochemikálie obsiahnuté v tymiane majú výrazný antioxidačný efekt a v rámci *in vitro* experimentov preukázali signifikantný antineoplastický potenciál v prevencii rôznych typov rakoviny [6, 7].

Rakovina prsníka predstavuje najčastejšiu príčinu mortality v súvislosti s nádorovým ochorením v ženskej časti populácie, a to aj napriek výraznému medicínskemu pokroku a zavádzaniu skriningových programov na národných úrovniach [8]. Z

hľadiska etiopatogenézy predstavuje rakovina prsníka kaskádu genetických, ako aj epigenetických alterácií, ktoré sú zapojené v iniciácii a progresii ochorenia [9]. Epigenetické modifikácie predstavujú súbor procesov, ktoré regulujú génovú expresiu bez zmeny poradia nukleotidov v sekvencii DNA. Medzi tieto epigenetické mechanizmy sú radené metylácia CpG dinukleotidov v promótorových oblastiach génov, histónové modifikácie a expresia malých nekódujúcich RNA [10]. Metylácia DNA prostredníctvom pridania metylovej skupiny (CH₃) na 5. uhlík pyrimidínového kruhu cytozínu a formovanie 5-metyl-cytozínu (5-me-C) predstavuje regulačný mechanizmus transkripcie génov. Tento reverzibilný proces je katalyzovaný enzýmami z rodiny DNA metyltransferáz (DNMT) [11]. V karcinóme prsníka boli identifikované transkripčne reprimované gény, zapojené v regulačných a reparačných procesoch bunky, ktoré vykazovali výraznú hypermetyláciu v promótorovej oblasti [12, 13]. Z toho dôvodu predstavuje štúdium epigenetických modifikácií a ich regulačný mechanizmus vysoko aktuálnu oblasť vedeckého výskumu. Cieľom našej štúdie bolo hodnotenie metylačného statusu promótorov tumor supresorových génov *ATM*, *PTEN*, *PITX2*, *RASSF1* a *TIMP3* po dlhodobej aplikácii tymianu v mamárnej karcinogénze u samíc potkanov.

Materiál a metódy

Animálne modely a indukcia mamárnej karcinogenézy

V našom experimente boli použité samice potkanov kmeňa Spague-Dawley (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) vo veku 30-34 dní. Zvieratá boli chované v štandardných podmienkach vo zverinci. Karcinogénza sa u potkanov indukovala pomocou N-nitroso-N-methylurey (NMU, Sigma, Deisenhofen, Germany). Látka bola podaná intraperitoneálne v jednorazovej dávke 50mg/kg telesnej hmotnosti v 42. deň postnatálneho vývoja. Použitý animálny model potkana imituje situáciu žien v premenopauzálnom období s vysokým rizikom rozvoja rakoviny prsníka. Chemoprevencia so sušenou vňaťou tymianu (*Thymus vulgaris* L.) začala týždeň pred podaním karcinogénu a trvala 15 týždňov. Experimentálne zvieratá boli náhodne rozdelené do 3 skupín a kŕmené potravou obohatenou o fyto-substanciu: 1) kontrolná skupina bez chemoprevencie; 2) chemoprevencia s tymianom v nižšej koncentrácii (1g/kg; 0,1%); 3) chemoprevencia s tymianom vo vyššej koncentrácii (10g/kg; 1%). Posledný týždeň experimentálnej štúdie boli zvieratá dekapitované a bolo im okamžite odobraté nádorové tkanivo.

Homogenizácia nádorového tkaniva a izolácia DNA

Samotnej izolácii DNA z odobratých nádorov predchádzala homogenizácia tkanív pomocou TissueLyser LT (Qiagen, Germany). Po rozrušení kompaktnosti tkaniva sa k homogenátu pridalo 20µl proteinázy K a nasledovala inkubácia 4 dni pri 56°C. Genomickú DNA sme následne izolovali s použitím komerčného kitu DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany) a postupovali podľa priloženého protokolu. Po extrakcii DNA sme zmerali jej koncentráciu pomocou Qubit™ 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Pre bisulfidovú konverziu sme použili DNA s koncentráciou 50ng/µl, pričom sme postupovali podľa priloženého protokolu.

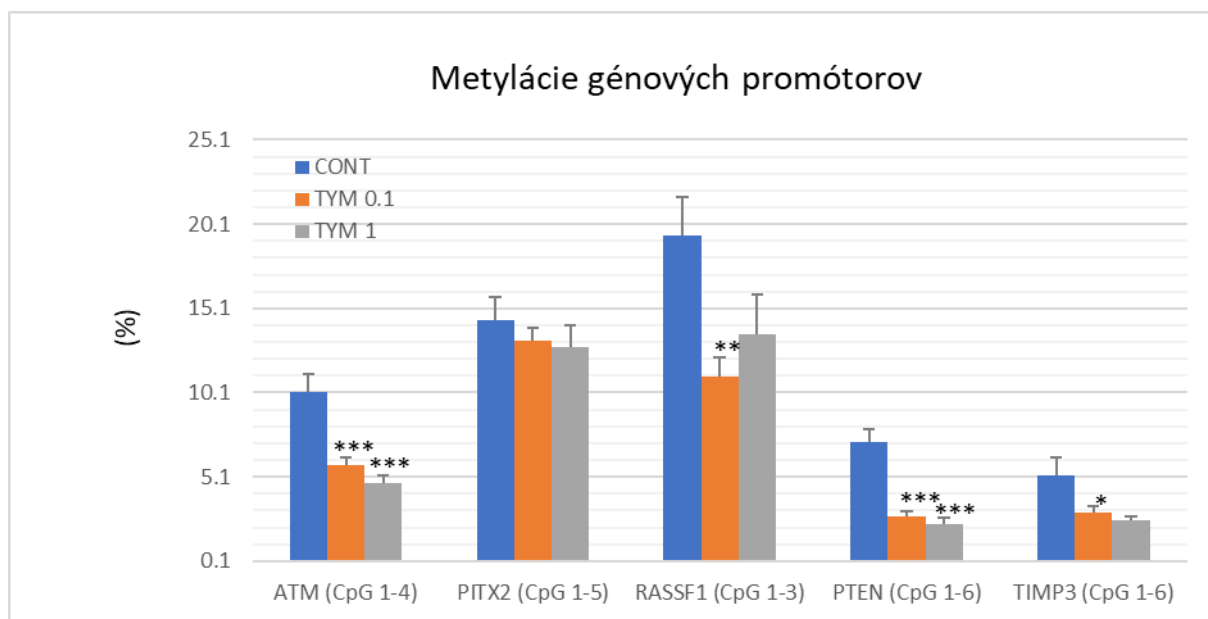
Kvantitatívna analýza metylácie

Kvantitatívna analýza metylačného statusu promótorovej oblasti vybraných génov bola vykonaná pyrosekvenovaním s použitím komerčného kitu PyroMark PCR (Qiagen, Germany). Použili sme navrhnuté metylačné eseje na stanovenie metylačného statusu piatich génových promótorov (*RASSF1*, *TIMP3*, *PITX2*, *ATM*, *PTEN*) (PyroMark CpG assay, Qiagen, Germany). Samotná analýza prebiehala na zariadení PyroMark Q96 ID System (Qiagen, Germany) s použitím PyroMark Gold

Q96 Reagents. Metylácia bola meraná komerčným softvérom (PyroMark Q96 software version 2.5.8; Qiagen, Germany).

Výsledky

Tymian vo vyššej dávke prejavil signifikantný chemopreventívny účinok redukciou frekvencie mamárnych nádorov na skupinu. Celkovo sme analyzovali 60 vzoriek nádorového tkaniva, ktoré sme odobrali z troch testovaných skupín potkanov a hodnotili metylačný status CpG ostrovčekov v promótorových oblastiach piatich tumor supresorových génov: *ATM* (4 CpG ostrovčeky), *RASSF1* (3 CpG ostrovčeky), *PTEN* (6 CpG ostrovčekov), *TIMP3* (6 CpG ostrovčekov) a *PITX2* (5 CpG ostrovčekov). Vňať tymianu v nižšej koncentrácii (0,1 %) signifikantne znížila úroveň metylácie promótorovej oblasti génu *ATM* o 43 % ($p < 0,001$); *RASSF1* o 43,5 % ($p < 0,01$); *PTEN* o 62,5 % ($p < 0,001$) a *TIMP3* o 44 % ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Vňať tymianu vo vyššej koncentrácii (1 %) viedla k zníženiu úrovne metylácie promótoru v prípade génu *ATM* o 54,5 % ($p < 0,001$); *PTEN* o 69,5 % ($p < 0,001$) a *TIMP3* o 44 % ($p < 0,05$) v komparácii s kontrolnou skupinou. V prípade génu *PITX2* nebola pozorovaná žiadna signifikantná zmena metylácie medzi kontrolnou skupinou a oboma liečenými skupinami ($p > 0.05$; Obr. 1).



Obrázok 1 Metylácia promótorovej oblasti génov *ATM*, *PITX2*, *RASSF1*, *PTEN* a *TIMP3* v mamárnom karcinóme v animálnom modeli potkana. U každého analyzovaného génu (*ATM*, *PITX2*, *RASSF1*, *PTEN* a *TIMP3*) bola kvantifikovaná úroveň metylácie CpG ostrovčekov v kontrolnej a v liečených skupinách. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetické priemery \pm SEM, signifikantný rozdiel * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. KONT.

Diskusia a záver

Metylácia promótorových oblastí tumor supresorových génov predstavuje dôležitý mechanizmus v iniciácii a progresii rakoviny [11]. Zníženie expresie prostredníctvom zmeny metylačného paternu tumor supresorových génov ako sú *ATM*, *PITX2*, *RASSF1*, *PTEN* a *TIMP3* je často pozorovaná epigenetická modifikácia v predklinických ako aj v klinických štúdiách mamárnej karcinogenézy [12, 13]. Aplikácia fytochemikálií obsiahnutých v rastlinných funkčných potravinách a ich antineoplastický účinok prostredníctvom regulácie metylácie promótorových oblastí génov bol pozorovaný v *in vitro* experimentoch na nádorových bunkových líniiach

MCF7 a MDA-MB-231 [14, 15]. V našej nedávnej štúdii sme pozorovali signifikantný protinádorový efekt klinčeka, ktorý bol spojený so zmenami metylácie génových promótorov *RASSF1* a *TIMP3* v konvenčnom (premenopauzálnom) modeli mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov [16]. V rámci aktuálneho experimentu sme sledovali úroveň metylácie promótorových oblastí piatich génov zapojených v regulačných a reparačných mechanizmoch bunky (*ATM*, *PITX2*, *RASSF1*, *PTEN* a *TIMP3*) v asociácii s protinádorovým účinkom tymianu. V štyroch uvedených markeroch sme vplyvom liečby pozorovali signifikantný pokles úrovne metylácií, čo poukazuje na pozitívny modulačný účinok tymianu v mamárnej karcinogenéze.

V predkladanej práci sme potvrdili signifikantný chemopreventívny účinok tymianu v experimentálnom modeli mamárnej karcinogenézy u samíc potkana. Z tohto hľadiska predstavuje tymian potenciálne vhodnú potravinu, ktorej pravidelná konzumácia môže byť spojená so znížením rizika rozvoja nádorového ochorenia prsníka, najmä v skupine vysoko rizikových žien. Napriek skutočnosti, že predklinické štúdie preukázali pozitívny účinok tymianu voči mamárnej karcinogenéze, sú potrebné ďalšie klinické štúdie orientované na výskum protinádorového efektu tejto rastlinnej funkčnej potraviny so zameraním na jej dávkovanie a individuálne genetické pozadie každého jedinca v rámci personalizovanej medicíny.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 01/0136/19.

Literatúra

- [1] Kapinova, *Environmental health and preventive medicine*. **2018**, 23:36.
- [2] Kubatka, *Nutrition*. **2015**, 31:560-569.
- [3] Li, *Oncotarget*. **2017**, 8:73938-73946.
- [4] Wang, *Biochem Biophys Acta*. **2014**, 1853:244-53.
- [5] Fachini-Queiroz, *eCAM*. **2012**, 657026.
- [6] Heidari, *3 Biotech*. **2018**, 8:177.
- [7] Al-Menhali, *J Med. Food*. **2015**, 18:54-59.
- [8] Golubnitschaja, *Tumor Biology*. **2016**, 37:12941-12957.
- [9] Fardi, *Genes & diseases*. **2018**, 5:304-311.
- [10] Kubatka. *International journal of molecular sciences*. **2019**, 20:1749.
- [11] Pasculli, *Seminars in cancer biology*. **2018**, 51:22-25.
- [12] Spitzwieser, *BMC cancer*. **2017**, 17:260.
- [13] Jezkova, *Tumor Biology*. **2016**, 14:758-766.
- [14] Lubecka-Pietruszewska, *Lifestyle Genomics*. **2015**, 8:91-101.
- [15] Kumar, *Tumor Biology*. **2017**, 39:1010428317692258
- [16] Kubatka, *Journal of cellular and molecular medicine*. **2017**, 21:2837-2851.

Chemické modifikácie histónov v modeli chemicky indukovanej mamárnej karcinogenézy u laboratórnych potkanov: efekt *Thymus vulgaris* L.

Kubatka, P.^{1,2}, Samec, M.³, Výbohová, D.⁴, Adamkov, M.⁵, Uramová, S.², Líšková, A.³, Žúbor, P.³, Péč, M.¹, Danko, J.³

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed - Divízia Onkológia, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ⁵Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
kubatka@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Naturally-occurring mixtures of phytochemicals present in plant foods are proposed to possess tumor-suppressive activities. In this study, we aimed to evaluate the antitumor effects of *Thymus vulgaris* L. in *in vivo* mammary carcinoma model. Dried *T. vulgaris* (as hulum) was continuously administered at two concentrations of 0.1 % and 1 % in the diet in a chemically-induced rat mammary carcinomas model. Chemoprevention began 1 week before application of carcinogen and lasted for 15 weeks until the end of experiment. After autopsy, histopathological analyses of rodent mammary carcinomas were performed. Thyme administered in the diet (1 %) demonstrated significant chemoprevention activity. Immunohistochemical analysis of mammary carcinomas in rats demonstrated epigenetic changes in rat tumors; we found a decrease in the lysine methylation status of H3K4me3 in both treated groups, (H3K9m3, H4K20m3, and H4K16ac were not changed). In this study, we found a significant anticancer effect of the *Thymus vulgaris* L. hulum, which was associated with epigenetic changes in mammary gland tumors *in vivo*.

Keywords: breast carcinoma, thyme, phytochemicals, rat, mechanism of action, histone chemical modifications

Úvod

Jeden z možných prístupov znižovania výskytu nádorových ochorení je chemoprevencia. Chemoprevencia, kde patrí aj použitie prírodných látok na zníženie rizika vzniku ochorenia, sa v súčasnosti stáva oblasťou intenzívneho výskumu [1]. U fytochemikálií, či u celých tzv. rastlinných funkčných potravín boli preukázané antioxidačné, protizápalové, antiproliferatívne a antiangiogénne účinky, či schopnosť indukovať apoptózu [2]. U viacerých fytochemikálií s protirakovinovými vlastnosťami bola preukázaná schopnosť ovplyvniť epigenóm s priamym účinkom na procesy iniciácie a promócie karcinogenézy. Posttranslačné modifikácie molekúl histónov ovplyvňujú interakcie DNA-histón a následne aj transkripčnú aktivitu genómu. Aberantné chemické modifikácie histónov zohrávajú dôležitú úlohu v karcinogenéze [3]. Zmeny metylácie a acetylácie histónov lyzínu, ako je H3K4m3, H3K9m3, H4K20m3 a H4K16ac, sú často spojené s rakovinou prsníka [4]. Imunofenotypický profil chemických modifikácií histónov môže variovať medzi rôznymi neoplastickými subpopuláciami, oblasťami nádoru, bunkovými líniami, či jedincami, preto je potrebné analyzovať hneď niekoľko špecifických epigenetických markerov, ktoré sú vhodné pre animálny model.

Vňať tymiánu (*Thymus vulgaris* L.) je zaujímavý obsahom silice, fenolových látok, saponínov a sterolov. Vedecké bádanie poukázalo na protinádorové účinky tymiánu *in vitro* v bunkových líniiach hrubého čreva resp. prsníka [5-7]. Na základe uvedených poznatkov sme sa rozhodli analyzovať protinádorový účinok vňate tymiánu v modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov so zameraním na vybrané parametre chemických modifikácií histónov.

Materiál a metódy

V experimente sme použili panenské samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley z chovnej stanice Charles River Germany vo veku 32 - 36 dní. Zvieratá boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca. Mamárnu karcinogenézu sme vyvolali intraperitoneálnou aplikáciou N-methyl-N-nitrozourey (Sigma, Deisenhofen, Nemecko) medzi 40. - 46. postnatálnym dňom v dávke 50 mg/kg hmotnosti zvieraťa. Tento experimentálny model imitoval situáciu u zdravých ale vysoko rizikových žien. Týždeň pred aplikáciou karcinogénu sme začali s chemoprevenciou, ktorá trvala 15 týždňov až do ukončenia experimentu. Tymián bol aplikovaný v diéte (SSNIFF Spezialdiäten GmbH Soest, Nemecko). Zvieratá v každom experimente v počte 75 kusov boli rozdelené do 3 skupín: 1. kontrolná skupina bez fytozloženie (KONT), 2. skupina s tymiánom v nižšej koncentrácii (1 g/kg) (TYM 0.1), 3. skupina s tymiánom vo vyššej koncentrácii (10 g/kg) (TYM 1). Zvieratá boli raz do týždňa palpované a vážené.

Na konci experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Časť vzoriek tkaniva mamárnych nádorov boli zafixované v 10 %-nom roztoku pufrovaného formalínu a následne technikou parafrínových rezov pripravené na histologické a imunohistochemické vyšetrenie. Druhá časť vzoriek bola zmrazená pre ďalšie vyšetrenia. Nádory boli klasifikované podľa kritérií pre klasifikáciu mamárnych nádorov u potkanov [8]. Detekcia chemických modifikácií histónov bola realizovaná pomocou nepriamej imunohistochemickej metódy na celistvých parafrínových rezoch za použitia komerčne dostupných protilátok (Abcam, Cambridge, MA, USA; Santa Cruz Biotechnology, Paso Robles, CA, USA; Dako, Glostrup, Denmark; Bioss, Woburn, MA, USA). Reprezentatívne oblasti rezov tkaniva boli nasnímané (Obr. 1), pričom expresia proteínov bola kvantifikovaná ako priemerná percentuálna hodnota antigén pozitívnych oblastí v štandardných poliach (0,5655 mm²) "hot spot" oblastí rezu nádorového tkaniva. Na kvantifikáciu sa použila morfometrická analýza (QuickPhoto Micro, verzia 3.1, Promicra, Praha, Česká republika). V štatistickom hodnotení bola použitá ANOVA a Kruskal-Wallisov test. Experimenty boli schválené Etickou komisiou JLF UK (No. EK1125/2012) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. Ro-1759/11-221). Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0136/19.

Výsledky a diskusia

Tymián (1 % v diéte) v našej štúdii signifikantne znížil riziko experimentálneho karcinómu prsníka u samíc potkanov. Analýza chemických modifikácií histónov H3 a H4 preukázala signifikantný a dávkovo-závislý pokles H3K4m3 o 19.5 % (p < 0.05, TYM 0.1) a 33.5 % (p < 0.01, TYM 1) v porovnaní s kontrolami. Zmeny chemických modifikácií u parametrov H3K9m3, H4K16ac a H4K20m3 v liečených skupinách neboli signifikantné po porovnaní s kontrolnou skupinou (Obr. 2).

Dietetické fytochemikálie vykazujú schopnosť modulovať epigenetické modifikácie, čím sa aktívne podieľajú na chemoprevencii karcinogenézy [9]. Úloha rastlinných prírodných látok v moduláciách metylácií a acetylácií histónov bola zdokumentovaná

v niekoľkých štúdiách *in vitro* a *in vivo* [10, 11]. Zmeny v metylácii a acetylácii histónových zvyškov lyzínu, ako je H3K4m3, H3K9m3, H4K20m3 alebo H4K16ac, boli často spojené s výskytom karcinómu prsníka [12, 13]. *T. vulgaris* v tejto štúdii významne a v závislosti od dávky znižoval hladiny H3K40m3. Podobne nedávne výsledky z našej skupiny ukázali, že diétne podávané pupene klinčeka významne a spôsobom závislým od dávky zvyšovali hladiny H4K20m3 a H4K16ac pri chemicky indukovanom karcinóme mliečnej žľazy [14]. Výsledky z inej štúdie s použitím hlodavčieho modelu tiež poukazujú na významné účinky extra panenského olivového oleja na hladiny H4K20m3 v nádorových alebo zdravých mliečnych žľazách [3]. Ukázalo sa, že trimetylácia H3K4 je signifikantne regulovaná a úzko spojená s aktívnou transkripciou génu, onkogenézou, progresiou rakoviny a funkciami súvisiacimi s rakovinou [15]. V tomto ohľade naše výsledky naznačujú priaznivé účinky *T. vulgaris* v etiopatogenéze karcinómu prsníka.

Naše výsledky môžu reprezentovať jeden z množstva mechanizmov, prostredníctvom ktorého fytochemikálie tymiánu ovplyvňujú NMU-indukovanú karcinogenézu mliečnej žľazy u samíc potkanov. Samozrejme ide o výsledky pilotnej analýzy, ktoré si vyžadujú ďalšie experimentálne overenie napríklad s použitím širšieho spektra analyzovaných epigenetických markerov chemických modifikácií histónov. Predpokladáme, že sledované signifikantné protinádorové účinky tymiánu, klinčeka i škoric (nepublikované výsledky) boli dôsledkom aditívnych, či synergických účinkov fytochemikálií v nich obsiahnutých.

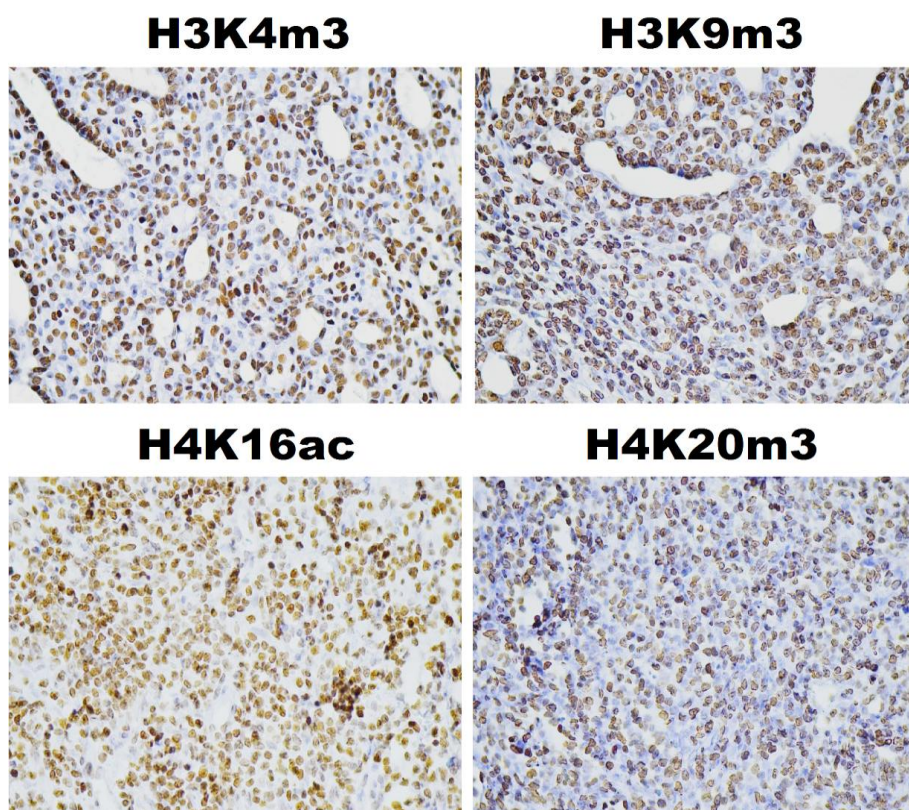
Záver

Každodenná konzumácia niekoľkých rôznych bylín a korenia, ktoré sú typické napr. pre stredomorskú stravu (silné antioxidanty akými sú tymián, klinček, sumak, oregano, rozmarín, šalvia, atď.) zvyšuje pravdepodobnosť chemopreventívneho pôsobenia u rakovinového ochorenia. Inovatívne klinické stratégie, ktoré zahŕňajú individuálne skriningové programy zamerané na potreby vysokorizikových populácií, stratifikácia pacienta využívajúca špecifické fenotypy a genotypy, o ktorých je známe, že súvisia so zvýšenou prevalenciou rakoviny prsníka a multiomická diagnostika predstavujú kľúčové medicínske prístupy na podporu zmeny paradigmy celkového manažmentu rakoviny prsníka z reaktívnej na prediktívnu, preventívnu a personalizovanú medicínu. Využitie rastlinných funkčných potravín v chemoprevenčii rakoviny prsníka zapadá do tohto konceptu. Využitie rastlinných potravín v klinickej praxi bude závisieť od výsledkov precízne nadizajnovaných klinických štúdií, ktoré určia onkostatickú efektivitu u ľudí (vrátane typu nádorového ochorenia), spôsob využitia (napr. ako doplnkové liečivo v kombinácii so štandardnou terapiou, či ako chemopreventívum), veľkosť dávky a spôsob aplikácie a nakoniec aj prípadný výskyt nežiaducich účinkov pri dlhodobej aplikácii.

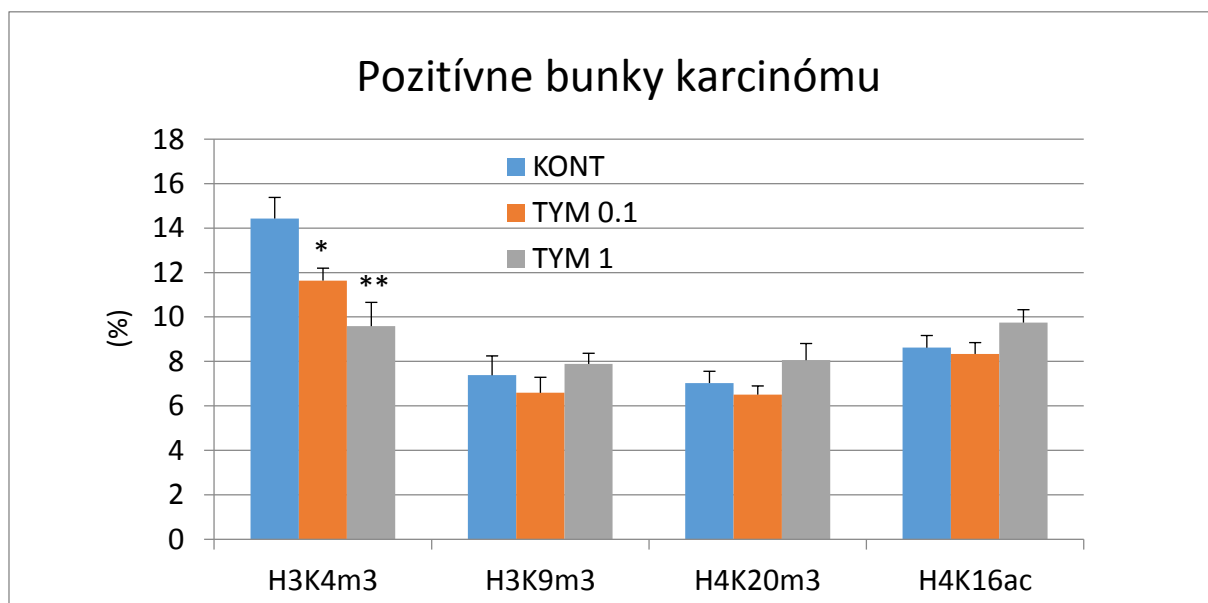
Literatúra

- [1] Ferlay, *Int J Cancer*. **2010**, 127:2893-2917.
- [2] Kuo, *Free Rad Biol Med*. **2010**, 49:214-226.
- [3] Rodríguez-Miguel, *PLoS ONE*. **2015**, 10:e0138980.
- [4] Fraga, *Nat Genet*. **2005**, 37:391-400.
- [5] Kubatka, *Int J Mol Sci*. **2019**, 20; pii: E1749.
- [6] Al-Menhali, *J Med Food*. **2015**, 18:54-9.
- [7] Bozkurt, *Nutr Cancer*. **2012**, 64:1245-50.
- [8] Russo, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. **2000**, 5:187-200.
- [9] Hardy, *Epigenomics*. **2011**, 3:503-518.
- [10] Altonsy, *Nutr Cancer*. **2012**, 64:1251-1260.
- [11] Attoub, *Eur J Pharmacol*. **2011**, 651:18-25.

- [12] McAnena, *Cancers*. **2017**, 9:5.
 [13] Chen, *Breast Cancer Res Treat*. **2016**, 157:267-279.
 [14] Kubatka, *J Cell Mol Med*. **2017**, 21:2837-2851.
 [15] Messier, *Oncotarget*. **2016**, 7:5094-5109.



Obrázok 1 Reprezentatívne digitálne zábery imunohistochemickej analýzy chemických modifikácií histónov v mamárnych nádorových bunkách potkana. Pozorované je jadrová pozitivita, zväčšenie: 400x.



Obrázok 2 Imunohistochemická analýza chemických modifikácií histónov H3 a H4 v mamárnych nádoroch u zvierat na konci experimentu – efekt tymiánu. Dáta sú vyjadrené ako priemery \pm SEM. Dáta sú vyjadrené ako priemery \pm SEM. Signifikantný rozdiel, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs KONT.

Hodnotenie edému a apoptózy epitelových buniek pľúc zvierat s aspiráciou mekónia pri pľúca šetriacej pľúcnej ventilácii

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

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

Abstract

Choice of appropriate ventilation mode in neonates with severe meconium aspiration syndrome (MAS) has been discussed. This study compared changes in the lungs of meconium-instilled rabbits after short-term ventilation with high-frequency oscillatory ventilation (HFOV) and conventional mechanical ventilation (CMV) to find out which of these ventilation modes is superior. Anesthetized meconium-instilled New Zealand young rabbits were oxygen-ventilated with HFOV (MAS-HFOV, n=7) or with CMV (MAS-CMV, n=7), both ventilations supplied by ventilator SLE5000 for 4 hours. Other animals served as non-ventilated controls (n=6). At the end of experiment, left lung was saline-lavaged and protein content in bronchoalveolar lavage fluid was determined. Right lung was used for determination of wet/dry lung weight ratio and immunohistochemical analysis of apoptosis of lung epithelial cells by TUNEL methods and detection of caspase-3. Meconium instillation caused significant lung edema formation compared to healthy controls ($p < 0.001$ or 0.01), with no difference between the MAS groups ($p > 0.05$). In both MAS groups, increased lung cell apoptosis was found compared to controls as indicated by slightly, but non-significantly increased apoptotic index ($p > 0.05$) and elevated number of caspase-3 immunoreactive cells ($p < 0.01$ for alveoli in both MAS+CMV and MAS+HFOV groups, $p < 0.05$ for bronchi in MAS+HFOV group). In conclusion, both lung-protective ventilations (HFOV and CMV) exerted comparable impact on the lung, with no clear preference for any of the ventilation modes in this model of MAS.

Keywords: meconium aspiration, rabbit model, conventional mechanical ventilation, high-frequency oscillatory ventilation

Úvod

Syndróm aspirácie mekónia (MAS) je závažným respiračným ochorením novorodencov. V dôsledku aspirácie mekónia (prvej stolice resp. smolky) vzniká obštrukcia dýchacích ciest, neutrofilný zápal, inaktivácia pľúcneho surfaktantu, pľúcny edém a vazokonstrikcia, čo sa prejaví znížením poddajnosti pľúc, hypoxémiou, hyperkapniou a acidózou [1]. Unikátna kombinácia vyššie uvedených patofyziologických zmien je v konečnom dôsledku zodpovedná aj za slabú odozvu na liečbu a vysokú mortalitu. Na liečbu menej závažných prípadov MAS sa používa suplementácia kyslíkom s alebo bez použitia kontinuálneho pretlaku v dýchacích cestách (cPAP). Pri závažnejších formách je však nutná intubácia a mechanická ventilácia pacienta pomocou tzv. ventilačných režimov šetriacich pľúca (lung-protective ventilation) [2]. Pre základný typ ventilácie - konvenčnú mechanickú ventiláciu (CMV) - existujú nasledovné odporúčania: a) ak je to možné, odporúča sa synchronizovaný režim ventilácie, b) hodnota vrcholového inspiračného tlaku (PIP) má byť < 3 kPa a pozitívneho tlaku na konci výdychu (PEEP) $0,4-0,7$ kPa, c) dychový

objem (V_T) má byť 5-6 ml/kg hmot., d) doba inšpiria (T_i) 0,5 s alebo dlhšia, e) frekvencia ventilácie (f.) má byť <50/min. V prípade nedostatočnej účinnosti CMV sa odporúča použitie vysokofrekvenčnej oscilačnej ventilácie (HFOV), ktorá môže zlepšiť oxygenáciu u niektorých pacientov [2]. Nakoľko porovnania medzi CMV a HFOV pri MAS v minulosti viedli ku kontroverzným výsledkom, a to najmä z dôvodu rozdielov v metodike, technických princípoch použitých ventilátorov, či zaraďovacích kritériách [4, 5], cieľom našej štúdie bolo porovnať účinnosť HFOV vs. CMV v experimentálnom modeli MAS, a to na základe zmien markerov tvorby edému a apoptózy pľúcnych epitelových buniek, a to medzi takto ventilovanými skupinami s modelom MAS a aj v porovnaní so zdravými neventilovanými zvieratami.

Materiál a metodika

V experimentoch sme použili novozélandské biele králiky s hmotnosťou $2,0 \pm 0,3$ kg (dodávateľ: Velaz, ČR). Experimenty spĺňali platné etické normy a ich protokol bol odsúhlasený Etickou komisiou JLF UK a ŠVaPS.

Čerstvé mekónium bolo po odbere z plienky zdravých donosených novorodencov lyofilizované (48 h pri -54°C) a uskladnené pri -20°C . Pred podaním sme pripravili suspenziu mekónia vo fyziologickom roztoku s koncentráciou 25 mg/ml.

Zvieratá boli počas experimentu v celkovej anestéze (úvod: tiletamín + zolazepam 15 mg/kg; Zoletil) a xylazín (5 mg/kg; Xylariem) i.m., následne i.v. infúzia: tiletamín + zolazepam (10 mg/kg/h). Zaviedli sme tracheálnu kanylu a katétre do a. femoralis (odber arteriálnej krvi, monitoring tlaku krvi), v. femoralis (odber venózne krvi, podávanie anestetík a roztokov) a v. jugularis ext. (odber centrálnej venózne krvi). Skupina zdravých neventilovaných zvierat (Kontrola) bola v tejto fáze usmrtená predávkovaním anestetika. Ostatným zvieratám sme podali myorelaxans (pipekuronium bromid, 0,3 mg/kg/30 min i.v.; Arduan) a ventilovali konvenčne ventilátorom SLE5000 s nasledovnými nastaveniami parametrov: f. 40/min, FiO_2 50%, T_i 50 %, PEEP 0,5 kPa, stredný tlak v dýchacích cestách (MAP) 0,7-0,8 kPa, V_T <6 ml/kg. Po 15 min stabilizácie sme odmerali iniciálne hodnoty respiračných parametrov a krvných plynov (RapidLab348, Siemens). Model MAS sme vytvorili i.t. podaním suspenzie mekónia v dávke 4 ml/kg. Následne sme FiO_2 zvýšili na 100% a f. na 50/min, aby sme zabezpečili adekvátnu výmenu plynov. V priebehu 30 min došlo k vytvoreniu respiračného zlyhávania, ktoré bolo charakterizované poklesom PaO_2 na 10 kPa pri FiO_2 100% a poklesom poddajnosti pľúc o viac ako 40%. Zvieratá s modelom MAS pokračovali v CMV ventilácii (f. 50/min, V_T <6 ml/kg, T_i 50 %, FiO_2 100%, PEEP 0,5 kPa, MAP 1,1 kPa; MAS+CMV skupina, n=7) alebo boli ventilované pomocou HFOV ventilácie (f. 600/min, FiO_2 100%, MAP 1,1 kPa, delta P 14-19 mmHg; MAS+HFOV skupina, n=7).

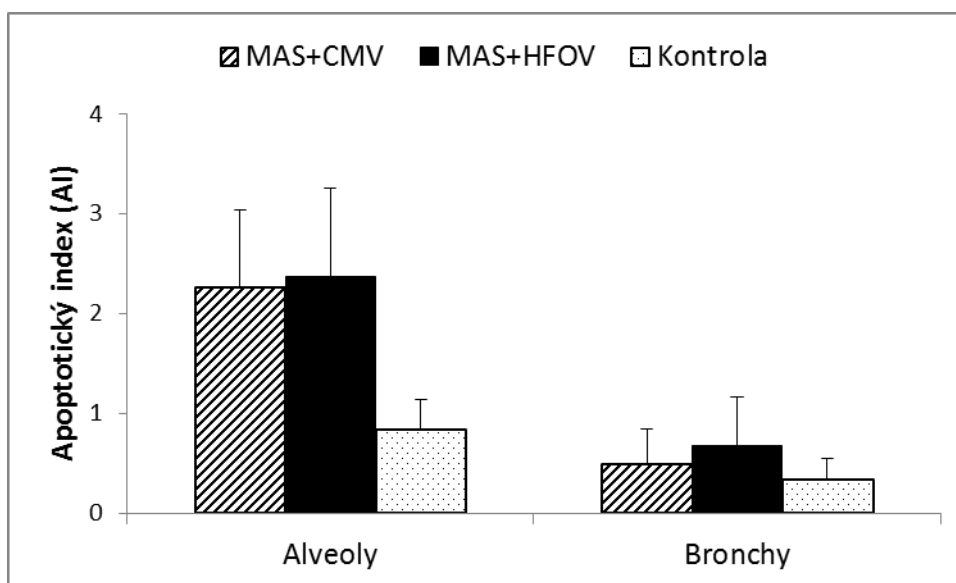
Na konci experimentu sme zvieratá usmrtili predávkovaním anestetika. Vybrali sme pľúca a tracheu. Po podviazaní pravého bronchu sme ľavé pľúca lavážovali fyziologickým roztokom (3×10 ml/kg). V lavážnej tekutine sme určili celkový obsah proteínov podľa Bradforda [3]. Časť tkaniva pravých pľúc sme odvážili, sušili 24 h pri 60°C a stanovili pomer vlhkej a suchej hmotnosti pľúc. Apoptózu pľúcnych epitelových buniek sme určili pomocou TUNEL metódy a na základe detekcie kaspáza-3 imunoreaktívnych buniek [podrobnejšie viď 4].

Na štatistické spracovanie výsledkov sme použili SYSTAT for Windows. Rozdiely medzi skupinami sme analyzovali pomocou one-way ANOVA testu s post-hoc Fisher's LSD testom. Hodnotu $p < 0,05$ sme považovali za štatisticky významnú. Výsledky sme vyjadrili ako aritmetické priemery \pm SEM.

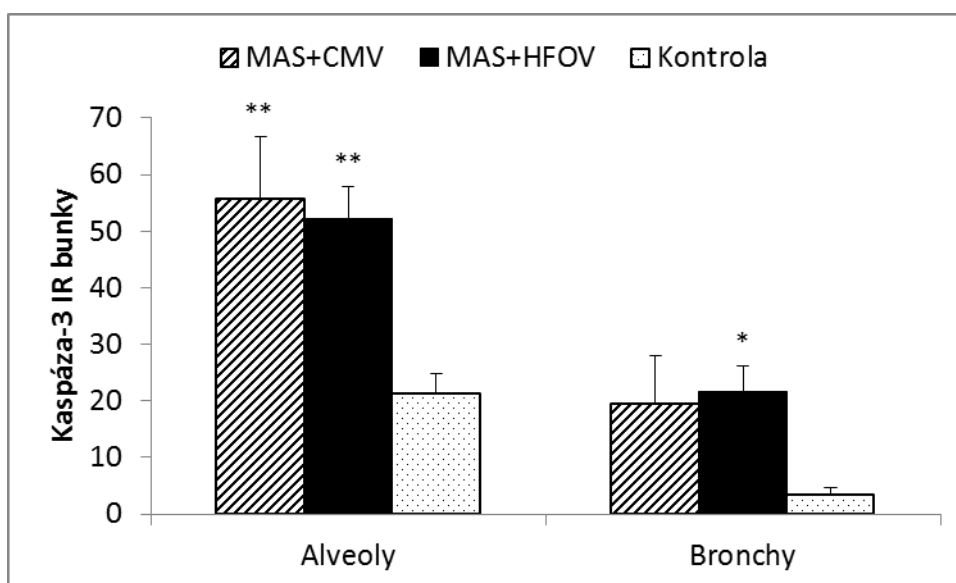
Výsledky

Po i.t. podaní mekónia sa signifikantne zvýšili hodnoty oboch markerov tvorby pľúcneho edému: celkovej koncentrácie proteínu v lavážnej tekutine (MAS+CMV: 525 ± 51 $\mu\text{g/ml}$ a MAS+HFOV: 530 ± 54 $\mu\text{g/ml}$ vs. Kontrola: 316 ± 16 $\mu\text{g/ml}$, obe $p < 0,01$) i pomeru vlhkej a suchej hmotnosti pľúc (MAS+CMV: $6,45 \pm 0,27$ a MAS+HFOV: $6,38 \pm 0,32$ vs. Kontrola: $4,65 \pm 0,15$, obe $p < 0,001$), ale bez rozdielu medzi MAS skupinami ($p > 0,05$).

V skupinách s modelom MAS sme pozorovali aj zvýšenie apoptózy pľúcnych epitelových buniek. Zatiaľ čo zvýšenie apoptotického indexu bolo nesignifikantné, hoci s jasným trendom ku zvýšeniu (Obr. 1), počet kaspáza-3 imunoreaktívnych buniek sa zvýšil signifikantne (Obr. 2).



Obrázok 1 Hodnotenie apoptózy pľúcnych alveolárnych a bronchiálnych epitelových buniek pomocou apoptotického indexu (AI) TUNEL metódou. Pre rozdiely medzi skupinami: $p > 0,05$.



Obrázok 2 Počet kaspáza-3 imunoreaktívnych buniek v rezoch pľúc. Pre rozdiely medzi skupinami: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Diskusia

Poškodenie alveolokapilárnej bariéry, dysfunkcia surfaktantu, neutrofilný zápal, hypoxémia, ventilačno-perfúzny nepomer a iné zmeny po podaní mekónia stimulujú prenikanie tekutiny bohatej na proteíny z kapilár do interstícia a do alveolárneho priestoru. V našej štúdii sme zistili zvýšenie tvorby edému v skupinách s MAS v porovnaní so zdravými kontrolami. Podobne, zvýšenie proteínov v tracheálnom aspiráte a zvýšenie pomeru vlhkej a suchej hmotnosti pľúc zvierat s MAS zaznamenali aj iní autori [5, 6]. Akútne poškodenie pľúc a zápal sú pri MAS spojené aj so zvýšenou apoptózou pľúcnych epitelových buniek, ktorá ďalej zhoršuje poškodenie alveolokapilárnej membrány [7]. K iniciácii apoptózy dochádza dvomi alternatívnymi cestami: externou, ktorú spúšťa väzba ligandu smrti (napr. TNF α) na špecifické receptory na povrchu bunky, alebo internou, ktorá je aktivovaná cytokínmi, hypoxiou alebo oxidantami. Obe cesty konvergujú a aktivujú sa kaspázy-3, -6 alebo -7, zodpovedné za vykonanie bunkovej smrti [3, 6]. Naše výsledky ukázali, že k aktivácii proapoptotických procesov v pľúcach králikov dochádza už v priebehu niekoľkých hodín od podania mekónia. Za tieto zmeny môžu byť zodpovedné viaceré faktory: prozápalové cytokíny, voľné formy kyslíka, oxid dusnatý a jeho deriváty, angiotenzín II, proteázy a pod., ktoré sa vo zvýšenej miere tvoria pri MAS [8]. Včasné zmeny DNA sa popisujú aj pri iných formách akútneho poškodenia pľúc či pri sepe [9,10]. Tvorba edému a apoptóza pľúcnych buniek boli v oboch MAS skupinách napriek rozdielnym typom ventilácie porovnateľné. Tieto výsledky naznačujú, že jednotlivé ventilácie šetriace pľúca (CMV alebo HFOV) majú podobný efekt, čiže aj ich výber závisí len od dostupnosti danej metódy na príslušnom pracovisku.

Záver

Instilácia mekónia králikom zvýšila tvorbu pľúcneho edému a apoptózu pľúcnych epitelových buniek. Oba typy pľúca-šetriacej ventilácie viedli k porovnateľným výsledkom, bez zrejmej preferencie niektorého z typov.

Práca bola podporená projektom APVV-15-0075.

Literatúra

- [1] Lindenskov, *Neonatology*. **2015**, 107:225-230.
- [2] Dargaville, *Int J Pediatr*. **2012**, 2012:965159.
- [3] Bradford, *Anal Biochem*. **1976**, 72:248-254.
- [4] Mokra, *J Physiol Pharmacol*. **2016**, 67:919-932.
- [5] Lindenskov, *Pediatr Res*. **2005**, 57:371-377.
- [6] Li, *Int J Clin Exp Med*. **2015**, 8:6804-6812.
- [7] Galani, *Pathol Res Pract*. **2010**, 206:145-150.
- [8] Vidyasagar, *J Perinatol*. **2008**, 28/3:S102-S107.
- [9] Ronchi, *J Appl Physiol* (1985). **2012**, 112:1184-1190.
- [10] Chopra, *Exp Biol Med* (Maywood). **2009**, 234:361-371.

Základné morfológické rozdiely v štruktúre pľúc vtákov a cicavcov

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

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Ústav histológie a embryológie, Košice
katarina.holovska@uvlf.sk

Abstract

The aim of this work was to point out some morphological differences between the avian and mammalian lungs. The avian lungs are relatively small, compact, tubular and practically rigid. They comprises of primary, secondary and tertiary (parabronchi) bronchi. The parabronchi have typical honeycomb arrangement. The lumen of parabronchus is formed by atria that have several elongated infundibulae. The infundibulae give rise to anastomosing tubules called air capillaries that form the gas exchange surface of the bird's lungs. In contrast to mammalian lungs, avian lungs do not contain alveoli. Birds have air sacs; avascular, transparent structures. The main function of the air sacs is to draw air through the lungs, especially during flight, to regulate heat, and to alter the specific gravity of the birds while swimming and diving.

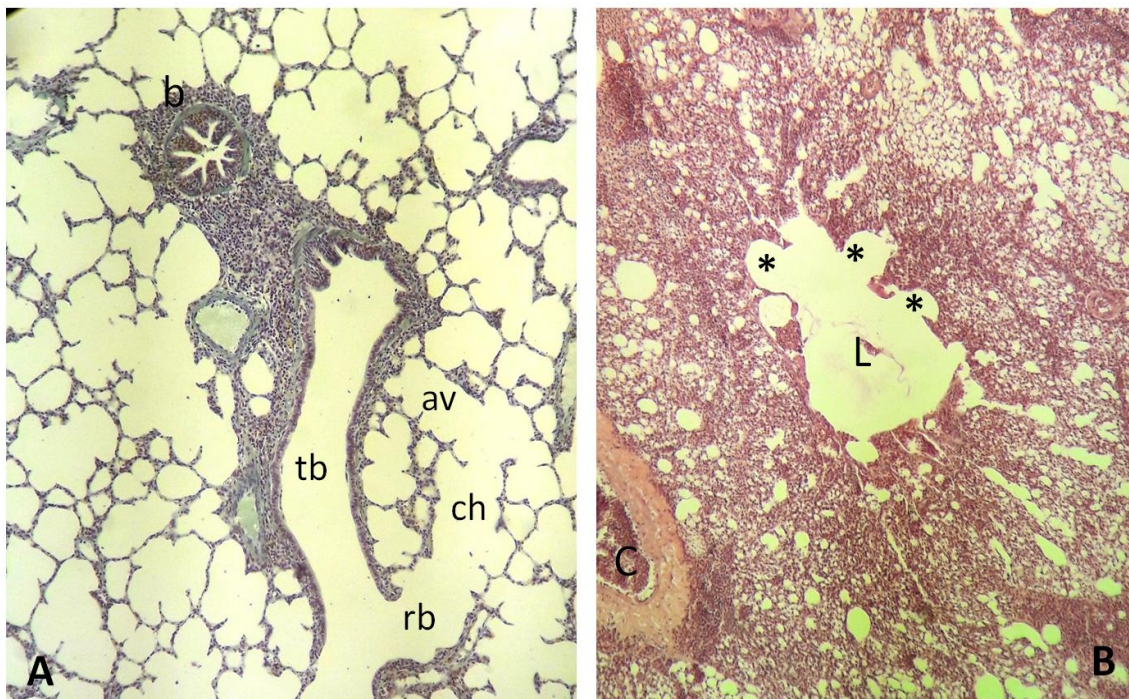
Keywords: lungs, bird, structure

Úvod

Cieľom tejto práce je poukázať na niektoré morfológické rozdiely v štruktúre pľúc vtákov a cicavcov (Obr. 1). Dýchací systém u vtákov je tvorený pľúcami a vzduchovými vakmi (lung-air sac system). Ide o najzložitejší a súčasne o najúčinnjší systém výmeny plynov, aký sa vyvinul u stavovcov [1]. Jeho celková aktívna plocha je 10 x väčšia, ako u cicavcov [2-4]. Keďže ide o veľkú plochu, ktorá je kontinuálne vystavovaná rôznym škodlivým látkam a patogénom [5, 6], je dýchací systém vtákov veľmi náchylný na rôzne infekcie [7].

Z makroskopického hľadiska sú pľúca vtákov malé, kompaktné a tvoria ich dva rovnako veľké laloky, ktoré sa už ďalej nečlenia. Do týchto lalokov privádza vzduch hlavná prieduška, ktorá spolu s cievmi vstupuje do pľúc v oblasti hilu. Z intrapulmonárnych primárnych bronchov vystupujú štyri skupiny sekundárnych priedušiek, ktorých označenie sa zhoduje s úsekom pľúc, ktoré zásobujú. Sekundárne priedušky sú spojené terciálnymi prieduškami, ktoré sa nazývajú parabronchy, alebo pľúcne píšťaly. Parabronchy majú na priereze šesťuholníkový tvar a sú ohraničené tenkými väzivovými priehradkami. V strede parabronchov sa nachádza lúmen, s množstvom polygonálnych útvarov - atrií. Lúmen atrií je vystlaný dlaždicovým, alebo kubickým epitelom [3, 5]. Na dne každého atria sa nachádzajú 2 až 4 predĺžené otvory - infundibula, ktoré pokračujú do tubulóznych útvarov, tzv. vzduchových kapilár [3, 9] (Obr. 1B). Lúmen vzduchových kapilár je pokrytý dlaždicovými bunkami - membránovými pneumocyty [10]. Vzduchové kapiláry sú v priamom kontakte s krvnými kapilármi a predstavujú miesto výmeny plynov [3, 10]. Sliznica primárnych a čiastočne aj sekundárnych priedušiek vytvára pozdĺžne riasy. Epitel, ktorý ich pokrýva, je jednovrstvový kubický alebo cylindrický s pohárikovými bunkami [11, 12]. Sliznica sekundárnych bronchov obsahuje BALT (bronchus-associated lymphoid tissue) [13, 14]. Z histologického hľadiska ide o nahromadené lymfatické uzlíky so zárodočným centrom, ktoré sa veľmi podobajú Payerovým plakom [14]. U kurčiat a moriek je BALT umiestnený v mieste vetvenia primárnych do sekundárnych bronchov [13], ako aj v mieste odstupu vzduchových vakov [15].

Okrem týchto štruktúr boli v blízkosti ciev v pľúcach vtákov pozorované nahromadené lymfocyty, plazmatické bunky, heterofily - pseudoeozinofily a makrofágy. V pľúcach cicavcov predstavujú alveolárne makrofágy veľmi dôležitú obrannú líniu proti patogénom [16, 17]. U vtákov však makrofágy vo vzduchových kapilárach neboli pozorované. Ich výskyt bol potvrdený len v lúmene átrií a v infundibule [4, 8], ako aj vo väzivových priehradkách medzi átriami [14]. Označujú sa ako FARM "free avian respiratory macrophages". Štúdia, ktorá sledovala fagocytárny index kačacích a králičích pľúcnych makrofágov poukázala na výnimočnú fagocytózu schopnosť FARM. Ich nedostatok v pľúcach je pravdepodobne častou príčinou vysokej úmrtnosti vtákov na respiračné ochorenia [7].



Obrázok 1 Mikrofotografie z pľúc cicavca a vtáka. **A) cicavčie pľúca:** b - bronchiolus, tb - terminálny bronchiolus, rb- respiračný bronchiolus, ch - alveolárna chodbička, av - alveolárny váčok (Hematoxylín – Mallory; zväčšenie 400x). **B) vtáčie pľúca:** L- lúmen parabronchu, C - cieva, hviezdičky - átriá (Hematoxylín-eozín, zväčšenie 100x).

Súčasťou dýchacej sústavy vtákov sú aj vzduchové vaky. Ich množstvo je druhovo špecifické a pohybuje sa v rozpätí od 6 do 14 [3, 9]. Ide o blanité vydutiny primárnych a sekundárnych priedušiek, ktoré sú na povrchu pokryté serózou a vo vnútri ich vystiela jednovrstvový cylindrický, alebo dlaždicový epitel. U niektorých druhov, ako napr. u holubov bol pozorovaný cylindrický epitel s mikrokľkami, kde cytoplazma buniek obsahovala množstvo lyzozómov [17]. Súčasťou epitelu sú aj granulované pneumocyty, ktoré produkujú surfaktant [18]. V niektorých štúdiách boli pozorované hladkosvalové bunky, ktoré zasahovali do vzduchových vakov z parabronchov [19]. Súčasťou vzduchových vakov sú aj fagocytujúce bunky. Najpočetnejšiu skupinu tvorili pseudoeozinofily, makrofágy a najmenej početné boli lymfocyty [20].

Vzduchovým vakom sa dlho pripisovala funkcia priamo pri výmene plynov. Neskôr sa zistilo, že ich štruktúra tento proces neumožňuje. Napriek tomu majú množstvo dôležitých funkcií. V závislosti od ich topografie sa uplatňujú pri dýchaní, kde fungujú ako zdroj čerstvého vzduchu s vyšším obsahom kyslíka. Prebieha v nich odparovanie vody, čím dochádza k ochladzovaniu organizmu. Zasahujú medzi svaly a vnútorné

orgány, kde plnia mechanickú funkciu (znižujú trenie a tlmia nárazy). Prenikajú do kostí a tak znižujú hmotnosť tela vtákov (pneumatizácia kostí). Okrem toho sa uplatňujú pri udržiavaní rovnováhy a stability tela vtákov pri chôdzi a lete [3, 4, 14].

Záver

Dýchací systém vtákov sa morfológicky a funkčne výrazne líši od dýchacieho systému cicavcov. Pľúca vtákov sú pomerne malé a ich objem sa pri dýchaní takmer nemení. Avšak ich celková aktívna plocha je 10 x väčšia, ako u cicavcov. Táto rozsiahla plocha predstavuje povrch, cez ktorý sa z vonkajšieho prostredia do tela dostávajú mnohé škodlivé látky a patogény, čím sa dýchací systém vtákov stáva veľmi náchylný na rôzne infekcie.

Práca bola podporená projektom KEGA č. 1/0046/16.

Literatúra

- [1] Carvalho, *The Open Biology Journal*. **2011**, 4:35-46.
- [2] Brown, *Environ Health Perspect*. **1997**, 105/2:188-200.
- [3] Černý: *Metoda*. **2005**, s. 206-215, ISBN: 80-239-4966-7
- [4] Maina, *Journal of African Ornithology*. **2008**, 79/2:117-132.
- [5] Nganpiep, *J Anat*. **2002**, 200:499-516.
- [6] Härtlen, *Avian Immunology*. **2014**, 251-263.
- [7] Mutua, *Biol Res*. **2016**, 49:29.
- [8] Klika, *Anat Rec*. **1996**, 246:87-97.
- [9] Eckert, *Freeman and Company*. **1988**, s. 474-519, ISBN 0716714221
- [10] Makanya, *ISRN Anatomy*. **2014**, 1-9.
- [11] Banks, *Williams and Wilkins*. **1986**, s. 447-66, ISBN 0801666104
- [12] McLelland, *J Anat*. **1986**, 147:83-93.
- [13] Van Alstine, *Am J Vet Res*. **1988**, 49:835-839.
- [14] Reese, *Vet Res*. **2006**, 37/3:311-24.
- [15] Myers, *Avian Dis*. **1987**, 31:622-628.
- [16] Bowden, *Exp Lung Res*. **1987**, 12:89-107.
- [17] Carlson, *Research in Veterinary Science*. **1973**, 14:148-150.
- [18] Smith, *Am J Anat*. **1986**, 177:221-242.
- [19] Trample, *Am J Vet Res*. **1980**, 41/10:1730-4.
- [20] Crespo, *Avian Dis*. **1998**, 42:35-44.

Vplyv mikrovlnného žiarenia na ultraštruktúru Leydigových buniek prenatálne ožarovaných potkanov

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

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Ústav histológie a embryológie, Košice;

²Slovenská akadémia vied, Neurobiologický ústav Biomedicínskeho centra, Košice

sandra.andraskova@student.uvlf.sk

Abstract

Electromagnetic radiation is one of factors, which can play an important role in the worldwide reduction of the male reproductive potential. This work deals with the problem of male reproductive potential focusing on the testicular steroidogenesis by monitoring changes in the ultrastructure of Leydig cells in prenatally exposed rats. The pregnant females were daily exposed to a pulsed microwave radiation at a frequency of 2.45 GHz and a mean power density of 2.8 mW/cm² for 2 hours a day throughout whole pregnancy. After delivery, the testicular tissue of offspring at the age of 5 weeks was subjected to the histopathological evaluation. The tissue samples were histologically processed by a Durcupan embedding and the ultrathin sections were observed electron microscopically. We noticed that the Leydig cells had constantly damaged their cytoplasm which contained numerous electron-lucent vacuoles of different size, swollen mitochondria and poorly developed smooth endoplasmic reticulum compared to the control groups. The results showed the distinct negative effect of the pulsed microwave radiation on ultrastructure of Leydig cells in testis of prenatally irradiated juvenile rats.

Key words: microwave radiation, rat testes, Leydig cells, testosterone

Úvod

Elektromagnetické žiarenie je podľa mnohých autorov jedným z faktorov, ktorý môže zohrávať významnú úlohu v celosvetovom znižovaní mužského reprodukčného potenciálu. Táto práca sa venuje problematike samčej neplodnosti so zameraním na steroidogézu, konkrétne sledovaním zmien v ultraštruktúre Leydigových buniek u samcov pohlavne nedospelých potkanov ožarovaných počas ich vnútromaternicového vývoja. Prenatálny vývin jedinca je kritickým obdobím z pohľadu pôsobenia rozličných škodlivých environmentálnych činiteľov, nakoľko vo vyvíjajúcich sa tkanivách dochádza k intenzívnym štrukturálnym a funkčným zmenám [1, 2]. Semenníky sú orgánom mimoriadne citlivým na expozíciu elektromagnetickej radiácie (EMR) v dôsledku ich povrchového uloženia v miešku, vďaka prítomnosti hrubého väzivového obalu, ktorý významne obmedzuje schopnosť odvádzať naakumulované teplo v tkanive a v neposlednom rade aj negatívnym ovplyvnením samotnej spermatogenézy v dôsledku nárastu teploty v orgáne. Hlavnou funkciou Leydigových buniek je produkcia steroidného hormónu – testosterónu, ktorého prekursorom je cholesterol. Samotná regulácia syntézy testosterónu je zložitý proces zahrňujúci nervové, endokrinné, parakrinné a autokrinné signálne dráhy [3]. Prvá generácia Leydigových buniek sa vyvíja už počas fetálneho života a fetálny testosterón je zodpovedný za maskulinizáciu samčieho urogenitálneho systému. Produkcia testosterónu u potkanov bola zaznamenaná po vytvorení semenotvorných kanálikov medzi 14. a 16. dňom *post coitum* a najvyššie koncentrácie boli zaznamenané na 18. až 20. deň [5]. Postnatálny vývoj Leydigových

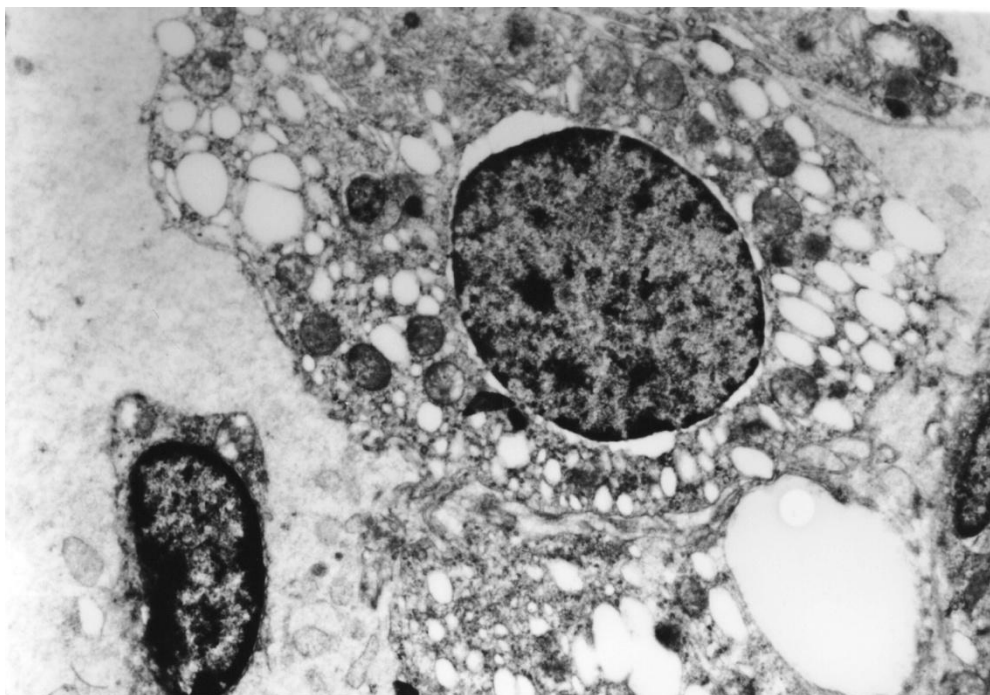
buniek začína nanovo z nediferencovaných mezenchýmových buniek od 10. dňa po narodení. Počet dospelých Leydigových buniek narastá až do puberty. Produkujú testosterón potrebný pre nástup spermatogenézy [4]. Vo svojej cytoplazme obsahujú početné lipidové kvapôčky a bohato zastúpené agranulované endoplazmatické retikulum, ktoré je miestom syntézy steroidných hormónov.

Materiál a metodika

Experiment bol uskutočnený na Neurobiologickom ústave Biomedicínskeho centra SAV v Košiciach. Gravidné samice potkanov rodu Wistar albino (n=12) sme náhodne rozdelili do dvoch skupín. Experimentálnu skupinu (n=6) sme celotelovo ožarovali mikrovlnným pulzným žiarením s frekvenciou 2,45 GHz a priemernou silovou hustotou 2,8 mW/cm² dve hodiny denne počas celej dĺžky gravidity. Kontrolné samice (n=6) sme držali v klietkach s voľným pohybom, prístupom k vode a potrave, avšak bez aplikácie žiarenia. Po pôrode sme potomstvo samčieho pohlavia nechali prežívať 5 týždňov a následne po anestézii Izofluranom a chloralhydrátom usmrtili intrakardiálnou perfúziou 4% paraformaldehydom. Odobraté vzorky tkaniva semenníkov (1 mm³) sme po primárnej fixácii v 3 % glutaraldehyde a následnej postfixácii v 1 % OsO₄ odvodnili v acetóne so stúpajúcou koncentráciou. Vzorky sme následne preniesli do propylénoxidu a zaliali do Durcupanu ACM (Fluka). Pomocou ultramikrotómu (Tesla BS 490) sme narezali ultratenké (60-90 nm) rezy a dvojfázovo kontrastovali uranylacetátom a citrátom olovnatým metódou podľa Reynoldsa. Ultratenké rezy sme pozorovali elektrónovým mikroskopom Tesla BS 500 a vyhodnotili pomocou následne zhotovených elektrónogramov.

Výsledky

Pri hodnotení ultraštruktúry Leydigových buniek zo získaných elektrónogramov sme sa zamerali na jednotlivé organely. Sledovali sme hlavne jadrá buniek, mitochondrie, agranulované endoplazmatické retikulum a tukové kvapôčky. V interstíciu kontrolnej skupiny zvierat sa nachádzali väčšie skupinky Leydigových buniek pravidelných tvarov a v ich blízkosti sme často pozorovali množstvo typických krvných kapilár. Leydigove bunky mali okrúhle alebo oválne jadro a v cytoplazme sa nachádzali charakteristické mitochondrie s tubulami, početné cisterny agranulovaného endoplazmatického retikula a primerané množstvo tukových kvapôčok. V skupine pokusných zvierat sme v interstíciu pozorovali len relatívne malé skupinky Leydigových buniek, ktoré mali nepravidelný a väčšinou pretiahnutý tvar. Jadrá mali zachovanú ultraštruktúru, avšak ich jadrová membrána bola zvlnená. Mitochondrie v cytoplazme boli zväčšené, mali nepravidelne usporiadané tubuly a v mnohých prípadoch sme v nich pozorovali aj nepravidelné elektrónlucentné priestory. Cisterny agranulovaného endoplazmatického retikula boli menej početné, väčšinou dilatované a nepravidelných tvarov. V cytoplazme sme zaznamenali aj veľké množstvo tukových kvapôčok rôzneho tvaru a veľkosti (Obr. 1).



Obrázok 1 Časť Leydigovej bunky prenatalne ožarovaného juvenilného potkana so zmenami v ultraštruktúre (elektronogram). Zväčšenie: 7200x.

Diskusia

Moderný životný štýl charakterizovaný každodenným používaním bezdrôtových technológií môže zásadne ovplyvňovať zdravie človeka. Aktuálne poznatky z danej problematiky potvrdzujú, že existuje široká škála možností pôsobenia neionizujúceho EMR na živé organizmy [7, 8]. V rámci študovania dopadu EMR na jednotlivé orgánové systémy sa zistilo, že semenníky patria k mimoriadne citlivým orgánom [1]. Dôvodom vysokej senzitivity samčích gonád u väčšiny cicavcov je ich povrchové uloženie a prítomnosť hrubého väzivového obalu. V neposlednom rade je to aj samotná spermatogenéza, ktorej normálny priebeh je závislý na množstve citlivých a ľahko ovplyvniteľných mechanizmov. EMR môže byť obzvlášť škodlivé, pokiaľ nepretržite pôsobí na organizmus hlavne v priebehu jeho vývinu a môže sa podieľať aj na abnormálnom vývoji fetálnych gonád [9, 10]. Práce zamerané na sledovanie vplyvov EMR počas intrauterinného vývinu jedinca sú veľmi ojedinelé, a preto cieľom nášho výskumu bolo prispieť k objasneniu tejto problematiky. Zamerali sme sa na študovanie Leydigových buniek u pohlavne nedospelých potkanov, ktoré boli ožarované počas ich prenatalného vývinu. U pokusných zvierat došlo k redukcii počtu a veľkosti Leydigových buniek a pozorovali sme aj viaceré zmeny v ich ultraštruktúre. Jednalo sa hlavne o zrnčenie tukových kvapôčok, poškodenie cisterien agranulovaného endoplazmatického retikula a mitochondrií. Uvedené degeneratívne zmeny sú v súlade s pozorovaniami autorov, ktorí ich zaznamenali v experimentoch podobného charakteru, avšak u dospelých potkanov [11]. Keďže uvedené orgány zohrávajú kľúčovú úlohu v procesoch steroidogenézy, predpokladáme, že u pokusných zvierat došlo k výrazným zmenám v produkcii testosterónu. Tento predpoklad je podporený aj výsledkami viacerých autorov, ktorí zaznamenali zmeny koncentrácií sérového testosterónu u dospelých ožarovaných potkanov [11, 12].

Záver

Prenatálny život je kritickou fázou vývoja vzhľadom na vysokú citlivosť vyvíjajúcich sa tkanív na škodlivé environmentálne činitele, vrátane neionizujúceho elektromagnetického žiarenia. Bezdrôtové technológie, ktorými sú z rozličných zdrojov takmer nepretržite exponované aj gravidné matky, zostávajú znepokojujúcou súčasťou nášho života. Je nevyhnutné uvedomiť si potenciálne riziká negatívneho dopadu elektromagnetickej radiácie na vývin jedinca, vrátane jeho budúcej reprodukčnej schopnosti a snažiť sa obmedziť používanie týchto zariadení najmä v tomto kritickom období.

Práca bola finančne podporená grantovou agentúrou VEGA 1/0060/18

Literatúra

- [1] Diamanti-Kandarakis, *Endocrine Reviews*. **2009**, 30:293-342.
- [2] Dietert, *Hum Exp Toxicol*. **2008**, 27:129.
- [3] Stojkov, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. **2013**, 305:194-204.
- [4] Habert, *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2001**, 179:47-74.
- [5] Scott, , *Endocrine Reviews*. **2009**, 30:883-925.
- [6] Shan, *Endocrinology*. **1993**, 133:2277-2283.
- [7] Mathur, *Asian Journal of Andrology*. **2011**, 13:585-591.
- [8] Kubátová, *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa*. **2013**, 16:107-112.
- [9] Hamlin, *Today-Reviews*. **2011**, 93:19-33.
- [10] Skakkebaek, *Human Reproduction*. **2001**, 16:972-978.
- [11] Wang, *Zhonghua Nan Ke Xue*. **2019**, 9:327-330.
- [12] Ozguner, *Saudi Medicine Journal*. **2005**, 26:405-410.

Ionizujúcim žiarením vyvolané neurodegeneratívne zmeny v mozgu za experimentálnych podmienok

Báľentová, S.¹, Kalenská, D.², Muriň, P.³, Hajtmanová, E.³, Lehotský, J.^{2, 4}, 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 biochémie, Martin; ³Onkologické centrum, Univerzitná nemocnica Martin, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Biomed, Martin
balentova@jfmf.uniba.sk

Abstract

In the present study we investigated radiation-induced subacute histopathological changes in the rat brain. Adult male Wistar rats received fractionated whole brain irradiation with a total dose of 40Gy that was administered in 5 fractions (8Gy per fraction) once a week on the same week day for 5 consecutive weeks. After immunohistochemical staining of brain slices we examined quantitative changes in neuronal representation in two neurogenic regions in the adult rat brain, i.e. the subventricular zone – olfactory bulb axis and the hippocampal dentate gyrus. Brain slice image analysis sixteen weeks after exposure showed radiation-induced increase in neurodegeneration. These partial results reflect subacute and possibly the development of late radiation-induced neurodegenerative changes.

Keywords: radiation-induced brain changes, neurodegeneration, Fluoro-Jade C

Úvod

Radiačné zmeny v mozgovom tkanive nastávajú najčastejšie po externej konvenčnej rádioterapii pacientov s primárnymi mozgovými nádormi a metastázami. Na základe klinických prejavov a časovej postupnosti rozdeľujeme radiačné zmeny na akútne, subakútne a neskoré. V súčasnosti sa pozornosť odborníkov zameriava na prevenciu resp. zmiernenie následkov neskorých účinkov terapeutického ožiarenia. Je známe, že tieto účinky sa prejavujú v podobe progresívnych a ireverzibilných kognitívnych zmien bez prítomnosti anatomických abnormalít, t.j. demyelinizácie a nekrózy bielej hmoty [1]. Dôležitým fenoménom, ktorý často stojí v pozadí kognitívnych zmien je inhibícia neurogenézy. Štúdie na zvieratách ukazujú, že neurogenéza v dospelosti pretrváva v dvoch oblastiach: subvetrikulárnej zóne (SVZ) v stene laterálnych mozgových komôr (LK) a subgranulárnej zóne (SGZ) v gyrus dentatus (GD) hipokampu [2, 3]. Výsledky prác zaoberajúcich sa vplyvom ionizujúceho žiarenia na centrálny nervový systém odzrkadľujú široké spektrum zmien na molekulárnej, bunkovej a kognitívnej úrovni [4, 5].

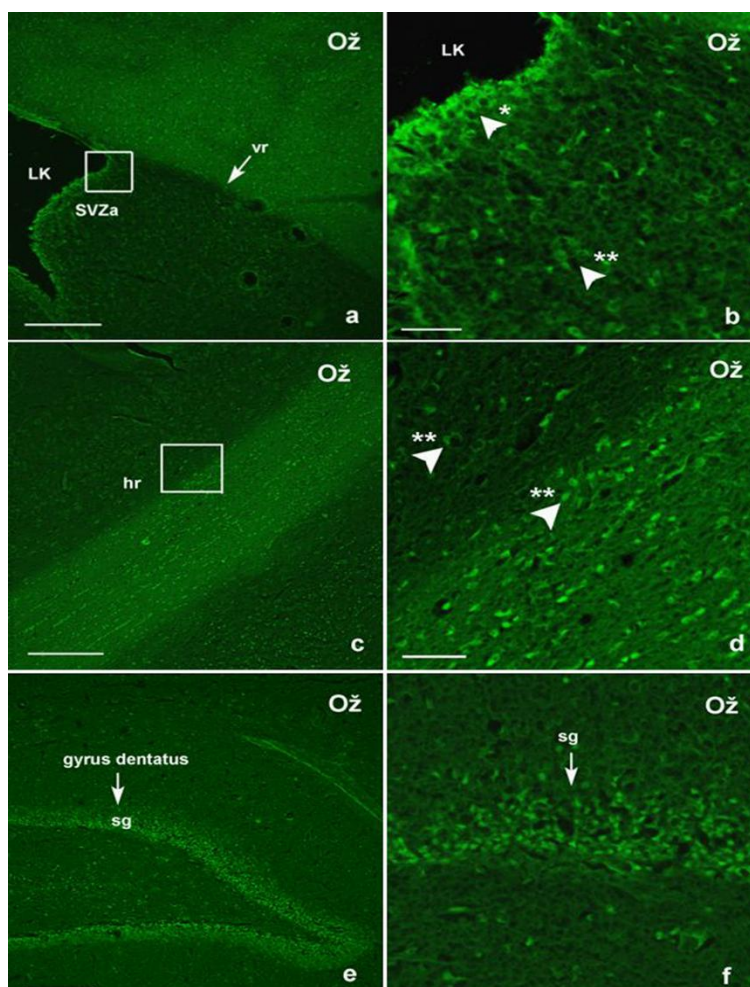
Materiál a metódy

Samce potkanov kmeňa Wistar vo veku 3-4 mesiace sme rozdelili na dve skupiny: kontrolnú (n=10) a druhú skupinu (n=7), ktorú sme ožiarili celkovou dávkou cD=40Gy ionizujúceho žiarenia rozdelenú na 5 frakcií, s dávkou na frakciu=8Gy. Ožarovaný objem predstavoval hlavu, krk a zdrojom žiarenia bol rádioizotop ⁶⁰Co (prístroj TERAGAM ÚJP Praha, ČR). Po uplynutí stanovenej doby prežívania po ožiarení (16 týždňov) sme vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu pomocou 4 % paraformaldehydu a po dekapitácii sme z mozgových hemisfér narezali sériové sagitálne 30µm zmrazené rezy. Použitím histochemickej, fluorescenčnej metódy

Fluoro-Jade C (F-J C) sme označili bunky podliehajúce neurodegenerácii. Počet fluorescenčne značených buniek sme vyhodnocovali v jednotlivých anatomických oblastiach osi subventrikulárna zóna - bulbus olfactorius (SVZ-BO): SVZa, vertikálne rameno, ohyb, horizontálne rameno a v gyrus dentatus (GD) hipokampu. Obrázovú analýzu preparátov sme uskutočnili pomocou programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

Výsledky

Vo všetkých hodnotených oblastiach osi SVZ-BO a rovnako aj v GD v hipokampe sme po ožiarení zistili nárast počtu buniek podliehajúcich neurodegenerácii (Obr. 1). Pozdĺž osi SVZ-BO došlo k signifikantnému nárastu počtu Fluoro-Jade C pozitívnych buniek (F-J C⁺) v SVZa (Ož: $267,85 \pm 29,35/\text{cm}^2$ verzus K: žiadne bunky; $P < 0,001$), ohybe (Ož: $182,30 \pm 34,70$ vz. K: žiadne bunky; $P < 0,05$) a horizontálnom ramene (Ož: $238,65 \pm 50,34$ vz. K: žiadne bunky; $P < 0,001$). Iba mierne zvýšenie počtu F-J C⁺ buniek sme zistili vo vertikálnom ramene (Ož: $121,17 \pm 29,01$ vz. K: žiadne bunky) a taktiež v GD v hipokampe (Ož: $120,14 \pm 26,26$ vz. K: žiadne bunky).



Obrázok 1 Sagitálny prierez predným mozgom ožiarených (Ož) potkanov, ktorí preživali 16 týždňov po frakcionovanej expozícii celkovou dávkou 40Gy. Jednotlivé oblasti osi SVZ-BO (a, c, e), a to SVZa, vertikálne rameno (vr; šípka), horizontálne rameno (hr) a stratum granulosum v GD v hipokampe (sg; šípka). Detail SVZa, hr a sg (b, d, f), ktorý znázorňuje fluorescenčne značené endymové bunky (hlavička šípky s hviezdikou) a neuroblasty a/alebo zrelé neuróny (hlavička šípky s dvoma hviezdikami). Preparáty boli farbené histochemickou fluorescenčnou metódou Fluoro-Jade C, ktorá znázorňuje degenerujúce neuróny. Mierky: a, c, e = 200µm; b, d, f = 50µm.

Diskusia

Pomocou histochemickej metódy F-J C sme v mozgoch ožiarených potkanov identifikovali rôzne typy buniek podliehajúce neurodegenerácii. Okrem diferencujúcich sa neurónov sme identifikovali aj zrelé neuróny, ependýmové bunky v stene LK a pravdepodobne aj astrocyty. FJ-C metódou sa špecificky značia predovšetkým axóny, dendrity a telá neurónov. V intaktnom mozgovom tkanive (napr. v kontrolnej skupine zvierat) je F-J C pozitivita minimálna alebo žiadna. Niektoré štúdie, zaoberajúce sa modelmi traumatickeho poškodenia mozgu a neurodegeneratívnymi ochoreniami ukazujú, že po inzulte dochádza k aktivácii astrocytov a mikroglie [6]. Nie je teda vylúčené, že ožiarenie môže viesť k aj morfológickým a funkčným zmenám gliových buniek. Uvedené údaje korešpondujú s výsledkami našich predchádzajúcich štúdií. V týchto prácach sme po expozícii odlišnými frakcionovanými dávkami ionizujúceho žiarenia (cD=20, 35Gy) jednoznačne identifikovali zvýšený počet F-J C⁺ v týchto oblastiach, a to v rozpätí 4 - 21 týždňov po ožiarení [7, 8]. Môžeme konštatovať, že frakcionované ožiarenie klinicky relevantnou dávkou vedie k značným neurodegeneratívnym zmenám v neurogénnych oblastiach v mozgu. Získané výsledky je však potrebné porovnať aj s metabolickými a funkčnými zmenami v mozgovom tkanive.

Záver

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

Práca bola podporená projektami VEGA č. 1/0129/16, 1/0128/16 a 1/0243/18, APVV č. 15/0107 a z projektov „Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení“, kód: 26220220114 a „Centrum translačnej medicíny“, kód: 26220220021, spolufinancovanými zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Sundgren, *Neuroimaging Clin N Am.* **2009**, 19:657-668.
- [2] Doetsch, *J Neurosci.* **1997**, 17:5046-5061.
- [3] Kempermann, *J Neurosci.* **2002**, 22:635-638.
- [4] Ciciarello, *Neurosurgery.* **1996**, 38:772-779.
- [5] Gaber, *Int J Radiat Biol.* **2003**, 79:359-366.
- [6] Damjanac, *Brain Research.* **2007**, 128:40-49.
- [7] Báľentová, *Neurotoxicology.* **2017**, 60:70-81.
- [8] Báľentová, *Int J Radiat Biol.* **2018**, 94:238-247.

Morfologické poškodenie mozgovej kôry a jeho asociácia s homocysteínom vyvolaných zmien v acetylácii histónu

Tóthová, B.¹, Kovalská, M.², Kalenská, D.³, Tomašcová, A.³, Halašová, E.^{1,4},
Lehotský, J.^{1,3}

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

²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin

tothova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Epigenetics has a crucial role not only in various pathological conditions but is essential for the proper function of many biochemical and molecular processes in a healthy organism. Epigenetic signature can be affected by several exo- and endogenous factors and this can ultimately lead to serious tissue damage. One of the most investigated epigenetic modification is acetylation. Histone acetylation is linked to a permissive state of chromatin and it positively regulates DNA accessibility. Decrease or increase in histone acetylation leads to either repression or activation of specific gene expression, respectively. Homocysteine, or its elevated plasma levels, as a risk factor for atherosclerosis, vascular diseases and associated with neurodegeneration, may also have a particular impact to the acetylation profile of the specific tissue. Therefore, here we decided to focus on morphological and acetylation changes in cerebral cortex after homocysteine administration in experimental animal model. In homocysteine - treated group we observed a diminished number of neuronal cells when compared to the control group without homocysteine treatment in M1 cortical region. The number of acetylated histone H3 on lysine 9 positive cells was elevated to 607% against the control. Based on these results we can conclude, that hyperhomocysteinemia as a pathological condition is able to alter the global acetylation state in the organism.

Keywords: cerebral cortex, homocystein, histone acetylation

Úvod

Epigenetické modifikácie predstavujú procesy, ktoré sú schopné meniť génovú expresiu reguláciou dostupnosti molekuly DNA, majú dedičný efekt a bez zmien v sekvencii DNA [1]. Epigenetická regulácia génov zohráva dôležitú úlohu nielen pri vývine a činnosti centrálnej nervovej sústavy, ale aj pri patofyziológii rôznych porúch nervovej sústavy [2, 3]. Acetylácia patrí k najbežnejším modifikáciám histónov spojených s aktívnou transkripciou. Homocysteín (Hcy) je neesenciálna aminokyselina, ktorá sa vytvára ako medziprodukt pri premene metionínu na cysteín. Zmenou regulácie Hcy metabolizmu môže dochádzať k jeho hromadeniu v organizme, pričom vysoké hladiny Hcy môžu mať na bunky toxický účinok. Zvýšenú hladinu plazmatického Hcy všeobecne nazývame hyperhomocysteinémia (hHcy) [4, 5]. Okrem množstva biochemických vlastností môže Hcy pôsobiť aj na epigenetický aparát zmenou DNA metylačného profilu v dôsledku nerovnováhy jednotlivých zložiek Hcy cyklu [6]. Viaceré štúdie poukázali na asociáciu medzi hHcy a zníženou globálnou DNA metyláciou [7-9]. Znížená DNA metylácia a acetylácia histónov sa spájajú s aktívnou transkripciou, hoci otvorená konformácia chromatinu sa tak stáva

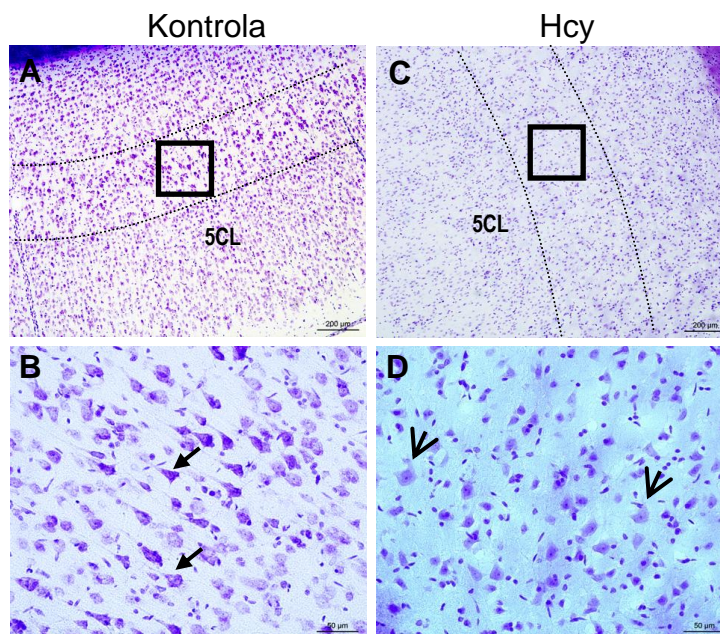
dostupnejšou pre supresorové proteíny, čo v konečnom dôsledku môže prispieť ku zvýšenej regulácii určitých génov a zvýšenému tkanivovému poškodeniu [10].

Materiál a metodika

Na uskutočnenie našich experimentov sme použili dospelé potkany kmeňa Wistar (samce), ktorým sme počas 21 dní raz denne subkutánne aplikovali Hcy v koncentrácii 1,2 μmol Hcy/g hmotnosti zvierat, počet zvierat v skupine $n=4$. Po uplynutí tohto obdobia sme zvieratá humane usmrtili, odobrali im krv a mozgové tkanivo. Biologické vzorky sme následne spracovali na histologické a imunohistochemické analýzy. Kontrolnú skupinu predstavovali zvieratá bez podávania Hcy. Hladinu Hcy v plazme sme stanovili komerčne dostupnou súpravou u všetkých zvierat. Vzorky tkanív boli pozorované pod svetelným mikroskopom Olympus BX41, imunofluorescencia bola analyzovaná konfokálnym laserovým skenovacím mikroskopom Olympus FluoView FV10i. Výsledky sme vyhodnotili programom GraphPad InStat v3.01 a pomocou Student-Newman-Keulsovoho testu, pričom štatisticky významná bola hladina $p<0,05$.

Výsledky a diskusia

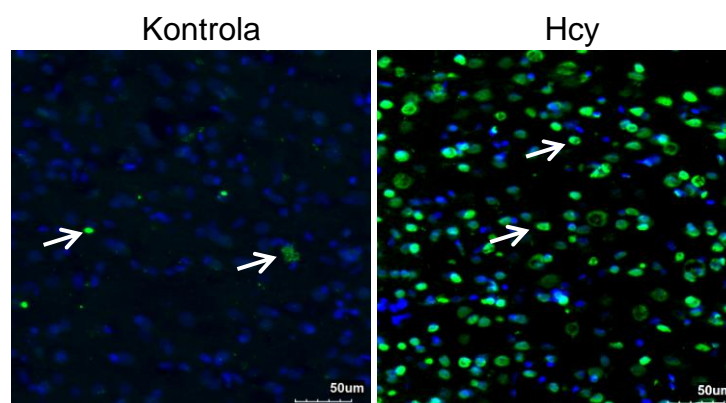
Je všeobecne známe, že Hcy prechádza cez hematoencefalickú bariéru a najvyššiu hladinu v mozgovom tkanive dosahuje 15 až 60 minút po podaní Hcy injekcie [11]. Hladina plazmatického Hcy u skupiny zvierat s injekčne podávaným Hcy predstavovala $8,5 \pm 0,38 \mu\text{mol/l}$, pričom fyziologická hladina Hcy u kontrolných zvierat bola $7,2 \pm 0,42 \mu\text{mol/l}$. Na určenie miery morfológických zmien v mozgovej kôre sme použili krezylovú violet. Táto metóda sa bežne používa na identifikáciu neuronálnej štruktúry v mozgovom tkanive, pričom špecificky farbí Nisslove telieska.



Obrázok 1 Svetelné mikrofotografie morfológických zmien v M1 kôrovej oblasti u kontrolnej skupiny (A, B) a skupiny s podávaným Hcy (C, D) s použitím farbenia krezylova violet pri 50x zväčšení (horný rad) a detail oblasti so zameraním na piatu kôrovú vrstvu (5CL) pri 400x zväčšení (dolný rad). Plné šípky označujú morfológicky nezmenené telá neurónov, prázdne šípky označujú morfológicky zmenené telá neurónov. Mierka označuje 50 a 200 μm .

Farbením krezylovou violetou sme zaznamenali morfológické zmeny, pričom u kontrolnej skupiny sme v M1 kôrovej oblasti pozorovali okrúhle a bledo sfarbené jadrá neuronálnych buniek s fialovo zafarbenými Nisslovými telieskami. V skupine s Hcy sme v porovnaní s kontrolou zaznamenali znížený počet buniek, avšak tento pokles nebol štatisticky významný.

V našej práci sme sa ďalej zamerali na sledovanie zmien acetylácie špecifického aminokyselinového zvyšku lyzín 9 na históne H3 (H3K9), keďže viaceré štúdie poukázali na zmeny v regulácii expresie špecifických génov v dôsledku abnormálneho H3K9 acetylačného profilu po aplikácii Hcy [12-14]. Z mikrofotografií na Obr. 1 môžeme vidieť, že Hcy signifikantne ovplyvnila acetylačný status histónu H3K9 v M1 kôrovej oblasti a medzi kontrolnou a Hcy skupinou sme pozorovali viditeľné rozdiely v acetylácii histónu H3K9. Signály zodpovedajúce acetylovanému H3K9 boli zaznamenané predovšetkým s jadrovou lokalizáciou. U kontrolnej skupiny sme detekovali nízky počet acetylovaných H3K9 pozitívnych jadier a výrazne zvýšenú imunoreaktivitu u skupiny s aplikovaným Hcy. Počet acetylovaných H3K9 pozitívnych nervových buniek v Hcy skupine narástol na 607 % ($123 \pm 2,4$; $p < 0,001$). Nerovnováha epigenetických mechanizmov a zmena acetylačného profilu teda môže mať vplyv na rozsah morfológického poškodenia kortikálnych neurónov aj napriek rôznej vulnerabilite neurónov na degeneráciu a apoptózu.



Obrázok 2 Fluorescenčné mikrofotografie imunohistochemickej detekcie H3K9ac protilátky v M1 kôrovej oblasti mozgu potkana u kontrolnej skupiny a skupiny s podávaným Hcy. Jadrá nervových buniek sú dofarbené DAPI (modrá), H3K9ac pozitívne jadrá nervových buniek (zelená). Šípky označujú prekryv DAPI a H3K9ac pozitívnych jadier nervových buniek. Úsečka zodpovedá dĺžke 50 μ m.

Záver

Väčšina súčasných štúdií sa zameriava na epigenetický efekt Hcy predovšetkým vo vzťahu k metylácii DNA či histónov a nie v spojitosti s acetyláciou histónov. Touto prácou sme chceli prispieť k rozšíreniu poznatkov o pleiotropnom účinku Hcy a jeho schopnosti meniť epigenetický status buniek na úrovni acetylácie histónov vo vulnerabilnej oblasti mozgu, akou je mozgová kôra. Všetky tieto zmeny môžu ovplyvniť transkripčne aktívny resp. neaktívny stav chromatínu a génovej expresie ako súčasť odpovede tkaniva na patologický stav organizmu, a tým prispieť k nezvratnej strate funkčnosti tkaniva.

Táto práca bola podporená projektami APVV 15-0107, VEGA 0128/16 a VEGA 1/0171/18.

Literatúra

- [1] Berger, *Genes Dev.* **2009**, 23/7:781-783.
- [2] Gräff, *Nat Commun.* **2012**, 3:991.
- [3] Rudenko, *Neuroscience.* **2014**, 264:51-63.
- [4] Škovierová, *Int J Mol Sci.* **2016**, 17:1733.
- [5] Lehotsky, *Cell Mol Neurobiol.* **2015**, 35:7-15.
- [6] Kalani, *Mol Neurobiol.* **2013**, 48:157-168.
- [7] Lee, *Trends Cardiovasc Med.* **1999**, 9:49-54.
- [8] Yi, *J Biol Chem.* **2000**, 275:29318-29323.
- [9] Jiang, *Acta Biochem Biophys Sin.* **2007**, 39:657-667.
- [10] Kim, *Cardiovasc Res.* **2011**, 92:466-475.
- [11] Streck, *Neurochem Res.* **2002**, 27:1593-1598.
- [12] Jin, *Neurochem Int.* **2011**, 58:833-838.
- [13] Xu *Analyst.* **2015**, 140:3057-3063.
- [14] Weekman, *ASN Neuro.* **2017**, 9:1759091417742296.

Vplyv indukovanej hyperhomocysteinémie na progresiu neurohistopatologických zmien s črtami Alzheimerovej choroby

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

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is characterised as a neurodegenerative process resulting in massive hippocampal and neocortical neuronal loss leading to dementia and eventual death. The exact pathomechanism of AD is not fully explored but it could be partially prevented by properly addressing its modifiable risk factors, as its treatment. The newer strong modifiable independent risk factor, hyperhomocysteinemia (hHcy), has created such new opportunity. However, the molecular background underlying these mechanisms linked with hHcy and ischemic stroke is poorly understood. Rat model of global forebrain ischemia-reperfusion (IR) injury was induced by 4-vessels occlusion lasting 15 min of ischemia followed by reperfusion period of 72 hours. hHcy was induced by subcutaneous injection of homocysteine (0.45 µmol/g) twice a day in duration of 14 days. Animals were sacrificed, brain were fixed in 4 % paraformaldehyde and proceed for cryosectioning followed by histological analyses. The results showed remarkable neural cell death induced by hHcy already after 72-hour reperfusion in brain cortex. We demonstrated degeneration of cortical neurons, alterations in number and morphology of neurons and their processes in the Entorhino-cortex (EC). These findings suggest that the combination of risk factor of hHcy with IRI aggravates neurodegeneration processes and could leads to development of AD-like pathology in the EC.

Keywords: Alzheimer's disease, hyperhomocysteinemia, entorhino-cortex, ischemia-reperfusion injury, neurodegeneration

Úvod

Entorinálny kortex (EC) reprezentuje hlavný prepojovací mostík kortiko-hipokampálnych nervových dráh a radí sa k oblastiam mozgu, ktoré sú na neurodegeneratívne zmeny najcitlivejšie. EC-hipokampálny systém preto predstavuje štruktúru, ktorá sa konštantne študuje v súvislosti s rozvojom Alzheimerovej choroby (AD) ako aj jej patomechanizmom [1, 2]. AD je najčastejšou formou demencie a je charakterizovaná ako progresívna a irreverzibilná neurodegeneratívna porucha vedúca k hipokampálnej i neokortikálnej strate neurónov. Súčasne dochádza k tvorbe neuritických plakov zložených najmä z β-amyloidných peptidov a neurofibrilárnych plstí z hyperfosforylovaných foriem cytoskelet stabilizujúceho tau proteínu [1-3].

Presný patomechanizmus vzniku Alzheimerovej choroby nie je úplne objasnený, liečba s prognózou sú obmedzené, avšak stanovením rizikových faktorov sa vytvárajú nové možnosti v rámci prevencie ochorenia. Za jeden zo silných modifikovateľných, samostatných rizikových faktorov sa považuje zvýšená plazmatická hladina homocysteínu (Hcy) [3, 4].

Hcy je neesenciálna neproteinogénna aminokyselina, ktorá vzniká počas metabolizácie metionínu, a to tromi možnými spôsobmi: remetyláciou, transmetyláciou alebo transulfuráciou. V prípade zvýšeného príjmu metionínu, zmenou odbúravania či vylučovania Hcy dochádza k hyperhomocysteinémii (hHcy).

hHcy navodzuje oxidatívny stres, spája sa s poruchou antitrombotickej rovnováhy, je spolufaktorom pri vzniku prokoagulačného stavu, a nakoniec vedie k aterosklerotickým zmenám [5, 6]. Zároveň sú deriváty Hcy schopné vystupovať ako analógy N-metyl-D-aspartátu (NMDA) i glutamátu, spojené s excitotoxicitou a homocysteín-NMDA receptorom sprostredkovanou smrťou neurónov [7, 8].

Existuje len obmedzené množstvo experimentálnych prác zaoberajúcich sa vzájomným prepojením vplyvu hHcy a ischemického poškodenia nervového tkaniva. Práve preto sme v našej práci sledovali ako sa ich spolupôsobenie podieľa na rozvoji a priebehu neurodegenerácie a zmien typických pre Alzheimerovu chorobu. Prehĺbením poznatkov v tejto oblasti by sa rozšírili možnosti liečby neurologických pacientov s ischemickými infarktmi, ktorých negatívne dôsledky môžu byť umocnené práve hHcy. [3, 4, 6, 9]

Materiál a metódy

K získaniu vyhodnotených vzoriek v tomto experimente sme použili samce potkana kmeňa Wistar (n=5) vo veku 3 až 6 mesiacov, s priemernou hmotnosťou 320g, ktoré boli chované za štandardných podmienok vo zverinci. Manipulácia s týmito zvieratami bola schválená Etickou komisiou JLF UK ako aj ŠVPS SR pod číslom 727/12-221. Zvieratá boli rozdelené do troch skupín. Prvá skupina zvierat slúžila ako kontrola. Zvieratá druhej skupiny podstúpili štvorcievny podváz (4-VO) s následnou 15 minútovou cerebrálnou ischémiou a 72 hodinovou reperfúziou. Poslednej skupine bol počas 14 dní (2-krát denne) subkutánne aplikovaný Hcy o koncentrácii 0,45 $\mu\text{mol/g}$ zvieratá. Na 15. deň bol zvieratám navodený 4-VO s rovnakou dobou reperfúzie ako v predchádzajúcej skupine. Potkany boli usmrtené dekapitáciou v hlbokoj anestéze v súlade s etickými zásadami práce s laboratórnymi zvieratami. Mozgy boli vypreparované, hlbokozmrazené, narezané na kryostate a nanesené na podložné sklá. Pre ďalšie spracovanie a vyhodnocovanie preparátov sme použili Krezylovú violet' a histochemickú metódu FluoroJade-C. Vzorky sme podrobili histologickej analýze na svetelnom mikroskope Zeiss Axio Scope A1 a konfokálnom mikroskope Olympus FluoView FV10i. Zamerali sme sa na laterálnu EC oblasť kortexu. Výsledky sme vyhodnotili v programe GrafPhad InStat V3.01 a pre vyjadrenie štatistickej významnosti sme použili Studentov *t*-test.

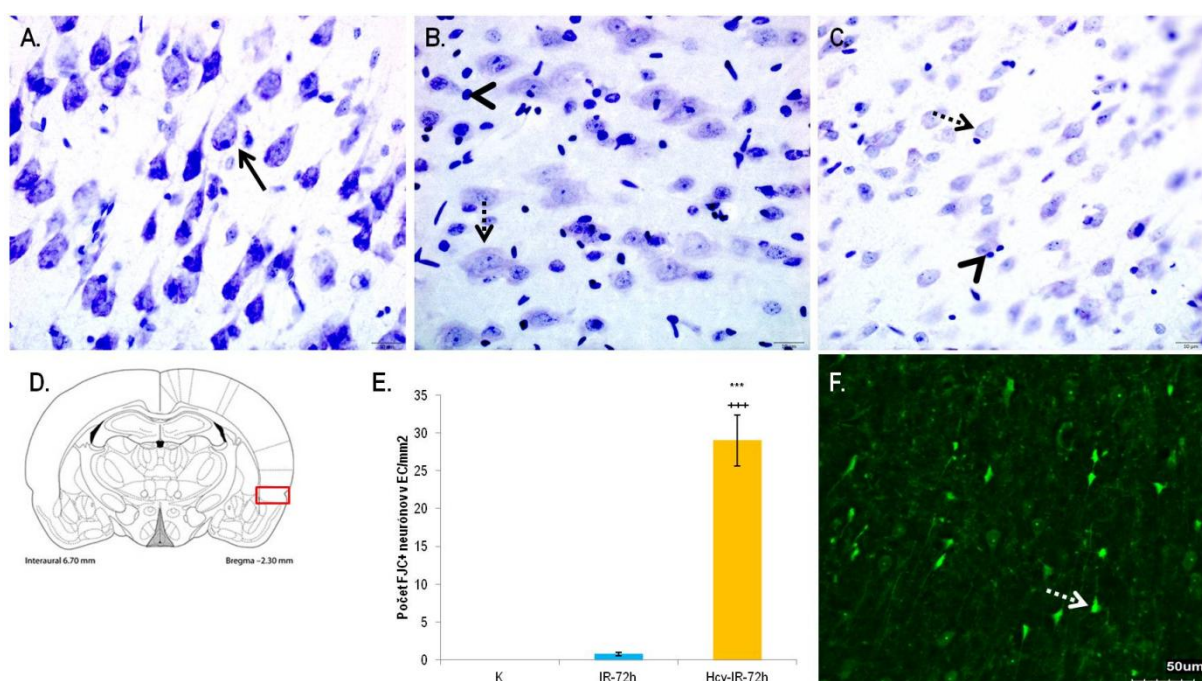
Výsledky

Krezylová violet' je bežné neurohistologické farbenie, ktoré špecificky farbí bazofilné štruktúry buniek - hlavne RNA ribozómov na drsnom endoplazmatickom retikule (tzv. Nisslova substancia). Jej prítomnosť a intenzita zafarbenia určuje funkčnosť a vitalitu buniek. Nefarbiace alebo slabo sa farbiace bunky predstavujú dezintegrované a metabolicky neaktívne neuróny poškodené navodením ischemicko-reperfúzneho (IR) poškodenia alebo kombináciou IR a hHcy [10].

Kontrolná skupina zvierat (K) vykazovala fyziologickú farbitelnosť, dobre vyvinuté endoplazmatické retikulum, veľké jadro, silne bazofilné jadierko a normálnu morfológiu perikaryonov nervových buniek (Obr. 1A). V naivnej skupine zvierat po ischémií a 72-hodinovej reperfúzii (IR-72h) sme zaznamenali výrazne zníženú vitalitu v porovnaní s kontrolou (Obr. 1B). V skupine s indukovanou hHcy po ischémií a 72 hodinovej reperfúzii (Hcy-IR-72h) sme zistili stratu vitality najväčšieho počtu

neurónov ako aj najmarkantnejšie morfológické zmeny neurónov (Obr. 1C). Opuch buniek, dezintegrácia vnútrobunkových organel so slabou farbiteľnosťou neurónov bola typická pre EC oblasť tejto skupiny. Taktiež sme v tejto skupine pozorovali zápalovú reakciu ako aj rozvoj reaktívnej astrogliózy.

Fluoro-Jade C predstavuje najsenzitívnejší marker neuronálnej degenerácie. Fluorescenčne označuje nielen perikaryá, tiež aj distálne dendrity a axóny nervových buniek [11]. Detailná fluorescenčná mikrofotografia z mozgov sledovaných skupín zvierat demonštruje Obr. 1F. Mozgy zvierat kontrolnej skupiny nevykazovali žiadnu fluorescenciu, priemerný počet pozitívne označených neurónov na plochu tkaniva ($0,3 \times 0,3 \text{ mm}$) bol $0,1 \pm 0,001$ (Obr. 1E). Podobne, v naivnej IR-72h skupine sme nedegovali takmer žiadne dezintegrované neuróny. Najvýraznejšie poškodenie sme zistili v Hcy-IR-72h skupine (Obr. 1F), kde počet FluoroJade-C pozitívnych buniek predstavoval $29 \pm 3,4$ buniek/plochu (Obr. 1E). Tento nárast bol 290 násobný oproti kontrole ($p < 0,001$). Taktiež bol tento nárast pozitívnych neurónov štatisticky významný v porovnaní s naivnou IR-72h skupinou, pričom bol 38,6-krát väčší ($p < 0,001$).



Obrázok 1 Mikrofotografie tkanivových rezov mozgov experimentálnych zvierat po zafarbení kryzlovou violetou a FluoroJade-C v EC oblasti kôry mozgu. V prvom riadku (A – C) sa nachádzajú mikrofotografie z EC kôrovej oblasti pri 630x zväčšení, pričom **A**) kontrola (K), **B**) naivná IR-72h, **C**) Hcy-IR-72h. Druhý riadok zobrazuje FluoroJade-C značené neuróny EC oblasti kôry mozgu pri 400x zväčšení, pričom **F**) Hcy-IR-72h. Plné šípky značia morfológicky nezmenené telá neurónov, prerušované šípky označujú morfológicky zmenené neuróny a hlava šípky indikuje bunky glie. Mierka predstavuje 10 a 50 μm . Obrázok **D**) znázorňuje oblasť mozgu potkanov, kde boli rezy vyhotovené a hodnotené. Červený obdĺžnik predstavuje oblasť EC kôrovú oblasť, kde sme vyhodnocovali morfológické a kvantitatívne zmeny (prebraté z Píxanos a Watson, [12]). Diagram **E**) graficky vyjadruje počet FluoroJade-C pozitívnych neurónov buniek EC oblasti kôry mozgu/plochu v skupine kontrolných zvierat, IR-72h a Hcy-IR-72h. Hodnoty boli normalizované ku kontrolným zvieratám \pm SEM; *** $p < 0,001$ znamená rozdiel oproti kontrolnej skupine; +++ $p < 0,001$ označuje rozdiel oproti naivnej IR-72h skupine.

Diskusia

HHcy je považovaná za samostatný rizikový faktor pre cerebrovaskulárne ochorenia, či už navodzovaním neurotoxicity, oxidatívnej nerovnováhy [4, 9] s lipidovou a

proteínovou oxidáciou [3] alebo indukciou neurodegenerácie [13]. Práve modely so subkutánnou aplikáciou Hcy, ktoré sme použili v tomto experimente, sa považujú za najvhodnejšie pre napodobnenie hHcy ako klinickej jednotky [6, 9]. Už viacero štúdií dokázalo, že IR poškodenie vedie k selektívnej degenerácii neurónov v CA1 oblasti hipokampu a vo vybraných vrstvách cerebrálneho kortexu [4, 6, 14]. Pri kombinácii IR poškodenia a hHcy boli doteraz výraznejšie neurodegeneratívne zmeny popísané najmä v oblasti hipokampu [6, 9, 15]. Avšak v tejto práci sme zistili väčší úbytok neurónov s nárastom množstva desintegrovaných buniek v kortikálnej EC oblasti už po 72 hodinovej reperfúzii, a to aj napriek autormi uvádzanej vyššej odolnosti neurónov v kortexe voči degenerácii [15, 16]. Počas sledovania neurodegeneratívnych zmien sme sledovali nárast počtu buniek neuroglie v naivnej skupine IR-72h s progresiou tohto fenoménu v Hcy-IR-72h skupine. Je to zrejme preto, že hHcy indukuje narušenie hematoencefalickej bariéry [4, 6] a aj nami zaznamenaná odpoveď tkaniva zmnožením astrocytov býva popisovaná ako reaktívna astroglóza [3, 17]. Poškodenie EC je spájané so synaptickou, pamäťovou a behaviorálnou deficienciou [1, 2]. Vzhľadom k tomu, že tieto defekty sú často prítomné u AD pacientov, predpokladáme, že neuropatologické zmeny a strata nerových buniek v EC-hipokampálnom systéme môže prispievať k poruchám pamäte vo veľmi raných štádiách AD. Naše pilotné výsledky naznačujú, že mierna hHcy (ako príklad metabolického stresu) v kombinácii s IR poškodením by mohla vplývať na progres AD-podobným patologickým črtám práve neurotoxickým pôsobením na nervové bunky v EC-hipokampálnom systéme.

Záver

Cieľom tejto práce bolo zhodnotiť vzájomný vzťah mozgovej ischemie a hHcy na tkanivá centrálnej nervovej sústavy so sledovaním priebehu neurodegenerácie a nástupu histopatologických zmien typických pre AD. Mala tak modelovať často sa vyskytujúci klinický stav, pomôcť objasniť zmeny, ku ktorým počas neho dochádza, a tak prispieť k rozvoju jeho prevencie a liečby.

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

Literatúra

- [1] Criscuolo, *Scientific Reports*. **2017**, 7:42370.
- [2] Tsao, *Nature volume*. **2018**, 561:57-62.
- [3] Kovalska, *Neurochem Res*. **2018**, 43/9:1766-1778.
- [4] Lehotsky, *Front Neurosci*. **2016**, <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00538>.
- [5] Humphrey, *Mayo Clin Proc*. **2008**, 83/1:1203-1212.
- [6] Kovalska, *J Physiol Pharmacol*. **2015**, 66:887-897.
- [7] Zhuo, *Trends Pharmacol Sci*. **2011**, 32/9:562-571.
- [8] Poddar, *J Neurochem*. **2013**, 124/4:558-570.
- [9] Petras, *Cel Mol Neurobiol*. **2017**, 37/8:1417-1431.
- [10] Türeyen, *Journal of neuroscience methods*. **2004**, 139/2:203-207.
- [11] Schmued, *Brain Res*. **2005**, 1035/1:24-31.
- [12] Paxinos, *Academic Press, London*. **2006**, <http://www.scribd.com/doc/22822097/Rat-Brain-Atlas>.
- [13] Li, *Ann Neurol*. **2017**, 37/8:1417-1431.
- [14] Zhu, *J Neurochem*. **2012**, 120/4:574-585.
- [15] Weekman, *ASN Neuro*. **2017**, doi.org/10.1177/1759091417742296
- [16] Zhao, *Int J Mol Sci*. **2016**, 17/8:1196.
- [17] Kim, *Metab Brain Dis*. **2013**, 28:519-522.

Experimentálna alergická encefalomyelitída- model pre štúdium roztrúsenej sklerózy mozgomiešnej – sklerózy multiplex (SM) vo vzťahu k ochrannému účinku vitamínu D

Kalenská, D.¹, Tomašcová, A.¹, Baranovičová, E.², Tóthová, B.², Čierny, D.³, Lehotský, J.^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed - Divízia Neurovedy, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav klinickej biochémie, Martin
kalenska@ifmed.uniba.sk

Abstract

Development of animal models of human neurological diseases comes from different clues and represents at least two important grounds: primarily is based on deeper insights and understanding of disease etiology and secondarily is leads to the development and validation of novel therapeutic formulas/approaches in the disease treatment. Paper presents animal models of multiple sclerosis and indicates relevant advantages/disadvantages of the models. Translational potential of preclinical studies is the key and cardinal factor which determine validity of respective model and its further optimization. Vitamin D has been proved as very important protective factor and we discuss here its potential. It is obvious that animal model can not fully represent human disease and only partially mimics diversity and phenotype of SM. Nevertheless animal models represent one of the important tool for understanding of human disease etiology and the role of vitamin D.

Keywords: multiple sclerosis, EAE, animal models, vitamin D

Úvod

V západnej civilizácii, nevynímajúc EU a Slovenskú republiku, predstavujú v súčasnej dobe neurologické ochorenia seriózný socio-ekonomický problém, najmä pre ich vysokú mortalitu a morbiditu a súčasne pre vysoké náklady na následnú zdravotnú starostlivosť a sociálnu opateru. Toto je aj dôvod, že tvorba modelov, a to aj modelov využívajúcich vyššie zvieratá, má vysokú aktuálnosť a naliehavosť nielen pre pochopenie etiológie ochorenia. Neurologická jednotka- SM je chronické imúnne-sprostredkované zápalové demyelinizačné ochorenie centrálného nervového systému (CNS), ktorá významnou mierou ovplyvňuje nielen kvalitu života pacientov ale čo je nadmieru závažné, je aj hlavnou príčinou neurologickej invalidity mladých dospelých [1, 2]. Typickým znakom je vytváranie morfológicky zreteľných sklerotických plakov, ktoré predstavujú koncovú fázu patologického mechanizmu, ktorý je časovo rozdielny a zahŕňa zápal, demyelinizáciu a remyelinizáciu, úbytok oligodendrocytov a astrocytózu, neurónovú a axonálnu degeneráciu [3]. Etiológia a patogenéza tohto ochorenia ešte nie je dostatočne preskúmaná [4].

V dôsledku etického limitovaného prístupu k ľudskému mozgovému tkanivu v rôznych fenotypových a klinických štádiách SM bol vývoj a zavedenie modelov jednak na úrovni jednotlivých bunkových rezov či kultúr a neskôr aj vývoj zvieracích modelov, veľmi podnetný k pochopeniu etiológie ochorenia [5]. Zvieracie modely sú hlavným podkladom nielen pre pochopenie indukcie a patogenézy ochorenia a pre vývoj terapeutických stratégií, ktoré obmedzia progresiu ochorenia, ba dokonca

umožňujú aj perspektívne vytvorenie algoritmov pre možnú efektívnu liečbu ľudského ochorenia [6].

Na štúdium SM sú ako laboratórne modely využívané hlodavce. Experimentálna autoimunitná encefalomyelitída (EAE) je zápalové ochorenie centrálneho nervového systému (CNS) hlodavcov, v ktorého priebehu zohrávajú úlohu CD4+ T-lymfocyty. Zápalový proces v CNS vyústi do paralýzy a ďalších neurologických ťažkostí, ktoré sú fenotypicky veľmi podobné sclerosis multiplex [7]. U zvierat sa EAE morfológicky prejavuje narušením HEB, perivenóznym zápalom, stratou oligodendrocytov, vznikom demyelinizačných ložísk a reaktívnou gliózou. Podľa klinického priebehu sa rozlišujú 4 typy EAE – akútna fatálna, chronická progresívna, chronická relapsujúca a chronická s oneskoreným nástupom [8]. Indukcia EAE u vnímavých druhov potkanov alebo myší môže byť vykonaná pasívnou imunizáciou podaním aktivovaných myelín špecifických T-lymfocytov. Väčšinou sa však EAE indukuje aktívnou imunizáciou rôznymi druhmi neuroantigénov ako je myelínový bázičný proteín (MBP), proteolipoproteín (PLP) a myelínový oligodendrocytový proteín (MOG) [9]. Myelínový oligodendrocytový proteín je transmembránový glykoproteín exprimovaný na povrchu myelínových membrán CNS a je schopný indukovať EAE. Po subkutánnom podaní MOG peptidu 35-55 rozpusteného vo Freudovom adjuvans a následnej intraperitoneálnej aplikácii pertussis toxínu po 48 hodinách myšiam druhu C57/BL6 dochádza k vzniku chronickej relapsujúcej (akútny vznik príznakov, ktoré odoznejú a neskôr dôjde k ďalšiemu relapsu ochorenia), resp. chronickej progresívnej (pomalé zhoršovanie príznakov asi od druhého týždňa po imunizácii) EAE, ktoré sú modelmi SM vhodnými pre identifikáciu molekulárnych mechanizmov vzniku a priebehu SM, ale aj na hľadanie nových terapeutických postupov. U myší je možné rozsah neurologického poškodenia kvantifikovať pomocou tzv. EAE skóre, ktoré môže dosiahnuť hodnotu 0 – 5. Pri hodnotení skóre sa posudzuje elasticita a pohyblivosť chvosta, slabosť, resp. paralýza zadných končatín, charakter chôdze [9, 10].

Vitamín D, ako jeden z environmentálnych rizikových faktorov SM má významné imunomodulačné účinky a ovplyvňuje funkcie imunokompetentných buniek. Epidemiologické štúdie poukazujú na významnú protektívnu úlohu vitamínu D proti vzniku SM počas vývinu organizmu [11]. Protektívny efekt slnečného žiarenia a stravy bohatej na ryby voči vzniku SM je sprostredkovaný vitamínom D [11]. Dostatočná hladina vitamínu D udržiava rovnováhu medzi adhéziou oligodendrocytov na axóny a následnou myelinizáciou a nedostatok vitamínu D vedie k oslabeniu myelinizácie a zvýšenej apoptóze oligodendrocytov. So stúpajúcou plazmatickou hladinou kalcidiolu sa významne znižuje riziko vzniku MS u bielej populácie a táto závislosť je významná hlavne do veku 20 rokov [12]. Do organizmu sa vitamín D dostáva buď z potravy, alebo k jeho tvorbe dochádza sledom metabolických procesov, ktoré začínajú v koži ožiarení 7-dehydrocholesterolu UVB lúčmi, keď vzniká vitamín D₃. Ten je následne transportovaný do pečene prostredníctvom vitamínu D viažúceho proteínu (DBP, vitamin D binding protein) a jeho molekula je hydroxylovaná v polohe 25 pomocou mikrozomálnej vitamínu D 25-hydroxylázy (CYP2R1) a mitochondriálnej vitamínu D 25-hydroxylázy (CYP27A1). Vzniká 25-hydroxycholecalciferol (25(OH)D₃), kalcidiol. Ďalšia hydroxylácia prebieha prostredníctvom CYP27B1 (25-hydroxy-vitamín D-1 α -hydroxyláza) hlavne v bunkách proximálnych tubulov obličky, ale aj v iných tkanivách. Bioaktívna forma vitamínu D sa viaže na receptor vitamínu D (VDR), prostredníctvom ktorého plní svoju regulačnú úlohu v metabolizme vápnika a v imunitnom systéme. Inaktivácia vitamínu D je katalyzovaná enzýmom 24-hydroxyláza (CYP24A1). Podobne ako pri zvieracích modeloch SM, kde deficit vitamínu D má za následok zvýšenú náchylnosť k vzniku

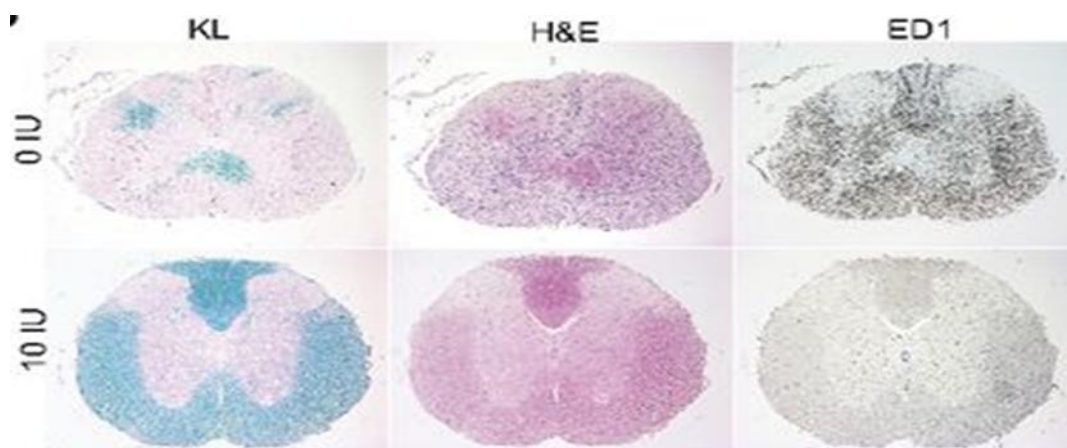
EAE a podávanie vitamínu D myšiam môže znížiť závažnosť, resp. zabrániť progresii príznakov ochorenia [13, 14] môže vitamín D pozitívne modifikovať klinický priebeh SM u ľudí. Účinky vitamínu D a jeho vplyv na priebeh SM závisia aj od aktivity receptora pre vitamín D, ktorá môže byť ovplyvnená geneticky génovými polymorfizmami rs1544410 (T/C), rs7975232 (T/G), rs731236 (T/C) a rs10735810 (C/T) [15-20]. Ramagopalan a kol. [34] dokázali priamu funkčnú interakciu vitamínu D s MHC II molekulami, ktoré sú hlavným genetickým rizikovým faktorom vzniku SM vďaka prítomnosti VDREs v promótorovej oblasti HLA-DRB1 génu. Perspektívny vhodný marker korešpondujúci s výskytom alely HLA-DRB1*1501 je jednonukleotidový polymorfizmus rs3135388.

Zvieracie modely SM

Nie je určená stále definitívna príčina a efektívna liečba SM, hoci bolo identifikovaných niekoľko genetických a environmentálnych rizikových faktorov a na zmiernenie priebehu ochorenia je k dispozícii viacero čiastočne účinných preventívnych liekov, či postupov. Je potrebné zdôrazniť, že v jedinom zvieracom modeli nie je možné zachytiť a adekvátne inkorporovať všetky klinické, rádiologické, patologické a genetické črty SM. Preto sa za posledných niekoľko desaťročí vyvinulo mnoho zvieracích modelov na pochopenie tak komplexného ochorenia akým je SM [6]. Je však stále otáznе, či zvieracie modely SM naozaj reprezentujú dobrý model ochorenia, keďže úplne nekopírujú priebeh SM. Nedostatky modelov: Najmä iniciácia ochorenia u zvierat je zvyčajne umelo navodená človekom - pri aktívnej imunizácii. Časové rozpätie symptómov u človeka a myší je rozdielne - u ľudí nastupujú klinické príznaky až po rokoch od začiatku nedetekovaných procesov predchádzajúcich ochoreniu, zatiaľčo príznaky u zvierat možno pozorovať v priebehu týždňov, dokonca dní od indukcie ochorenia. Následne aj liečba je u myší aplikovaná na začiatku ochorenia, pričom u ľudí až v neskorej fáze SM. Väčšina experimentálnych štúdií používa inbredné línie myší s genetickou homogenitou, ktorá môže akumulovať genetické chyby, ktoré sa takmer nevyskytujú v heterogénnej ľudskej populácii [21]. Myšacie modely sú najčastejšie používanými modelmi SM pre ich inbredný genotyp, rýchlu reprodukčnú kapacitu, ľahkú genetickú manipuláciu a dostupnosť transgénnych a knockoutových myší [22]. Modely sú vhodným a dostatočným zdrojom tkaniva CNS, na rozdiel od málopočetných vzoriek ľudského tkaniva, biopsií alebo autopsií. Najčastejšie používanými zvieracími modelmi SM sú autoimunitné, vírusom-indukované a chemicky-indukované myšacie modely.

Typy modelov experimentálnej autoimunitnej encefalomyelitídy (EAE)

Štúdie na skúmanie patogenetických, diagnostických a terapeutických aspektov SM na animálnych modeloch sa datujú do prvej polovice 20. storočia [23]. Rivers a kol. (1933) ako prvý demonštroval na opiciach imunizovaných králičími mozgovými extraktmi, že paralýza súvisela s perivaskulárnymi infiltrátmi a demyelinizáciou v mozgu a mieche. Ochorenie nazval akútna disseminovaná encefalomyelitída. Neskôr sa tento termín zmenil na experimentálnu alergickú alebo autoimunitnú encefalomyelitídu [24]. EAE je jedným z najpoužívanějších in vivo modelov na štúdium zápalu mozgu a postvakcinačnej encefalitídy. Súčasné modely EAE sú prevažne založené na zápale vyvolanom autoreaktívnymi CD4⁺ T-bunkami. Predpokladalo sa, že EAE je prototypom Th1 autoimúneho ochorenia, avšak nedávne štúdie ukázali, že hlavnými T-bunkami v imunitnej odpovedi nie sú Th1, ale Th 17 bunky [25].



Obrázok 1 Typická histopatologická a imunohistochemická analýza hlodavcov s aplikovaným protektívnym účinkom vitamínu D. Suplementácia vitamínu D vedie k potlačeniu neurozápalu a nižšej strate myelínu. Farbenie s Kluever (KL), hematoxylín-eozínom H&E, a protilátkou voči ED.

Patologické údaje a výsledky z klinických experimentov SM však ukazujú, že aj CD8⁺ T-bunky a B-lymfocyty hrajú dôležitú úlohu pri šírení zápalu a poškodenia tkaniva vo vzniknutej SM, a tak povzbudzujú vedcov k vyvíjaniu nových zvieracích EAE modelov [26]. Na vyvolanie EAE sa najčastejšie používajú dva prístupy, aktívna imunizácia a pasívny transfer. Modely aktívnej senzibilizácie vyžadujú imunizáciu encefalolitogénnymi antigénmi (najčastejšími sú MOG35-55 a PLP139-151) emulzifikovanými použitím kompletného Freundovho adjuvans (complete Freund's adjuvant, CFA) obsahujúcom tepelne inaktivované *Mycobacterium tuberculosis*. Táto emulzia sa aplikuje subkutánne pri báze chvosta. V deň imunizácie a o dva dni neskôr sa intraperitoneálne pridáva pertussis toxín (*Bordetella pertussis* toxín), ktorý zosilňuje rozvoj EAE [25]. Presný mechanizmus ako pertussis toxín zvyšuje proces senzibilizácie nie je úplne známy [26]. V závislosti od imunizačného protokolu a kombinácie myšacieho kmeňa (napríklad C57BL/6, SJL/J, Biozzi) a antigénu (napríklad MOG, MBP, PLP), priebeh ochorenia môže byť akútny, chronicky progresívny alebo relaps-remitujúci [27]. Podobne ako u SM, vek, pohlavie a vonkajšie prostredie majú silný vplyv na vnímavosť k ochoreniu, závažnosť a priebeh EAE [5]. Najpoužívanejším modelom sú myši C57BL/6 senzibilizované MOG35-55 peptidom v CFA [28]. Zvieratá vyvinú klasickú samolimitujúcu monofázickú EAE s očakávaným klinickým priebehom charakterizovaným prodromálnym obdobím 10-15 dní po imunizácii, nasledovaným vzostupnou paralýzou začínajúcou od chvosta cez zadné až po predné labky a súbežnou stratou hmotnosti [22]. Myši sú denne hodnotené klinickým skórovacím systémom po dobu 25-50 dní [27]. Pri modeloch pasívneho transportu T-buniek je potrebná aktívna imunizácia zvierat, z ktorých je izolovaná slezina a lymfatické uzliny. Po diferencovaní a restimulovaní in vitro môžu byť T-bunky transferované do novej skupiny zvierat, u ktorých sa rozvinie EAE [27]. Táto metóda umožňuje aplikáciu fluorescenčne značených encefalolitogénnych T-buniek a indukciu EAE u rôznych transgénnych myšacích kmeňov, napríklad na zobrazovacie účely [29]. Obdobným modelom je pasívny kotransfer autoreaktívnych T-buniek a patogénnych protilátok. V súčasnosti sa vytvárajú viaceré ďalšie modely EAE ako napríklad spontánne modely EAE, humanizované EAE modely, modely lokálnych zápalových demyelinizovaných lézií v CNS, modely pre primárnu alebo sekundárnu progresívnu SM.

EAE priamo viedla k vývoju troch schválených liečiv v humánnej terapii SM glatiramer acetát, mitoxantrone a natalizumab. Na druhej strane množstvo

terapeutických prístupov, ktoré dávali sľubné výsledky v EAE, sa ukázali buď ako neefektívne alebo v niektorých prípadoch dokonca škodlivé pri SM [6]. Príčiny rozporuplných výsledkov získaných u zvierat a ľudí môžu byť genetické (druhovú rozdiely, špecifiká inbredných zvieracích kmeňov), patogenetické (individuálna variabilita medzi SM pacientmi) alebo kinetické (rozdielne ontogény a biorytmy, dočasné rozdiely imunitnej reaktivity a odpovede na terapiu). Navyše pri SM môže byť hemato-encefalická bariéra nedostatočne narušená v porovnaní s EAE, a tým môže zabrániť liečivám dosiahnuť cieľové bunky a molekuly v CNS [24]. Hoci sú rozdiely v patofyziológii EAE a ľudskej SM, kvôli zápalovej povahe a jasnej autoimunitnej odpovedi na ochorenie, predstavuje EAE najužitočnejší model na určenie efektívnosti imunomodulačnej liečby SM a tiež pri určení liečby, ktorá priamo ovplyvňuje tkanivo CNS [22].

Vírusom indukované zápalové demyelinizácie

EAE modely nedávajú odpoveď na príčinu, ktorá spúšťa ochorenie SM u pacientov. Je zaujímavé, že určité vírusové infekcie u zvierat môžu spustiť zápalové demyelinizačné ochorenie podobné SM. Niektoré nepriame dôkazy naznačujú, že vírus Epstein a Barrovej alebo aktivácia endogénnymi retrovírusmi môžu zohrávať úlohu v patogenéze SM, no zatiaľ nebola nájdená žiadna vírusová infekcia špecifická pre SM [6]. Vírusové modely zobrazujú kľúčové črty SM podobnej zápalovej demyelinizácii. Hlavnou nevýhodou je ich veľmi komplexná patogenéza zahrňujúca vplyvy indukované priamo vírusom, antivírusovú imunitu a ďalšie autoimunitné mechanizmy. Vplyvy týchto rozdielných patogenetických zložiek je ťažké oddeliť. Jednou z ich hlavných výhod oproti EAE je, že sú zapríčinené infekčným procesom, a nie aktívnou senzibilizáciou, čo je prirodzenejší proces poskytujúci informáciu o etiológii ochorenia u ľudí [26]. Najviac používané vírusom indukované modely sú chronická encefalomyelitída indukovaná Theilerovým vírusom a MHV (mouse hepatitis virus) koronavírusom. Chronická demyelinizujúca encefalomyelitída indukovaná Theilerovým vírusom (Theiler's murine encephalitis virus, TMEV) TMEV je myšací črevný patogén, ktorý patrí do čelade jednovláknových RNA pikornavírusov, rodu Cardiovirus. Model je indukovaný priamou intracerebrálnou infekciou TMEV vnímavých myšacích kmeňov. Toto vedie k vzniku akútnej encefalomyelitídy u väčšiny infikovaných zvierat a ďalší priebeh ochorenia závisí od virulencie použitého typu vírusu a od genetickej schopnosti hostiteľského zvieratá navodiť špecifickú protivírusovú T-bunkovú odpoveď. Pri použití špecifického vírusového typu (BeAn alebo Danielov typ) a myší so špecifickými MHC haplotypmi (H-2q,r,s,v,f,p) je akútna encefalitická fáza nasledovaná chronickým demyelinizačným ochorením. Väčšinou postihuje miechu podobne ako u EAE modelov, na rozdiel od EAE je toto ochorenie vždy chronicko-progresívne [30]. Myšací kmeň SJL je typickým príkladom TMEV citlivých myší. V klasickom modeli sú demyelinizované lézie evidentné za 3 týždne po infekcii a strop dosiahnu asi po 100 dňoch od infekcie. V tom čase infikované myši začínajú prejavovať neurologické symptómy vrátane slabosti zadných končatín, kŕčovitosti a abnormalít chôdze. Kompletná paralýza zadných končatín a inkontinencia sa objavujú 6-9 mesiacov po infekcii [6]. Pozitívnou črtou TMEV modelu je, že vykazuje výrazne podobnú klinickú manifestáciu ako ľudská chronická progresívna SM. Patologické javy sú sprostredkované aktiváciou imunitného systému, a nie priamym toxickým efektom vírusu na cieľové bunky. Model je vhodný na testovanie nových terapeutických prístupov, hlavne terapií zameraných na adhézne molekuly, axonálnu degeneráciu a imunosupresiu. Hlavným negatívom je, že TMEV indukuje zápalovú demyelinizačnú

reakciu len u myší, a nespôsobuje žiadnu patológiu u ľudí. Otázkou je, či je rozumné používať nehumánny patogén pri výskume ľudského ochorenia akým je SM. Rozdielom v patogenéze TMEV a SM je perzistujúca vírusová infekcia CNS u zvieracieho modelu, čo sa nepreukázalo u pacientov so SM [21].

Toxická demyelinizácia

V porovnaní s EAE a TMEV sa modely toxikkej demyelinizácie nepokúšajú napodobniť SM ako ochorenie, ale sú vytvorené na objasnenie mechanizmov demyelinizácie a remyelinizácie. Na vyvolanie demyelinizácie u animálnych modelov SM sa najviac používajú kuprizon a lyzolecitín [31]. Kuprizon je chelátor medi a ako toxín spôsobuje poškodenie myelínu. Jeho cieľom sú zrelé oligodendrocyty, pričom iné bunkové typy CNS nie sú zasiahnuté. Špecifické črty modelu závisia od druhu zvieratá, dávky kuprizonu v strave a veku zvieratá pri aplikácii. Po odstránení kuprizonu zo stravy nastáva extenzívna remyelinizácia. Model je vhodný aj pre štúdium demyelinizácie v špecifických regiónoch CNS (napríklad hipokampus), ktoré sú postihnuté u SM pacientov, ale nie u iných animálnych modelov [32]. Lyzolecitín je aktivátor fosfolipázy A2 a po injekčnej aplikácii do rôznych častí miechy indukuje lokálnu demyelinizáciu. Demyelinizácia nastáva primárnym toxickým účinkom detergentu na myelínové pošvy. Akútna fáza deštrukcie myelínu je nasledovaná rapidnou remyelinizáciou [6].

Záver

Zvieracie modely sú stále nevyhnutným a veľmi cenným prostriedkom, ktoré sú súčasťou skúmania etiológie komplexných neurologických ochorení akými je SM. Je však potrebné zdôrazniť, že aj napriek častej vysokej fenotypickej podobnosti, žiadny z modelov nezachytáva celé spektrum neurologických prejavov u ľudí. Tvorba a vývoj užitočných a relevantných modelov, ktoré reprezentujú vybrané aspekty týchto ochorení slúžia hlavne ako možný testovací nástroj na štúdium rozvoja ochorenia a na inovatívne a neoverené nové terapeutické prístupy. Ich výhodou je, že sú vhodným a dostatočným zdrojom tkaniva CNS. Obmedzený prístup a nemožnosť práce in vivo u ľudských pacientov, resp. málopočetnosť vzoriek ľudského tkaniva, biopsií alebo autopsií, umožňuje použitie animálnych hlavne hlodavčích modelov aj pre translačnú prax. Výber najvhodnejšieho modelu a optimalizovaný dizajn štúdie sú jednoznačným základom pre úspešnú translačnú aplikáciu experimentálnych výsledkov do klinických štúdií a klinickej praxe. Skúmanie vplyvu vitamínu D na vývoj a priebeh ochorenia EAE je veľmi dobrým príkladom ako animálny model prináša hlbšie poznatky pre pochopenie extrakalciovej úlohy vitamínu D aj u tohto ochorenia.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: „Centrum translačnej medicíny“, (ITMS 26220220021), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja, VEGA 1/0128/16 a APVV 15/0107.

Literatúra

- [1] Lassmann, *Brain Pathol.* **2007**, 17:210-218.
- [2] Miljkovic, *Antioxid Redox Signal.* **2013**, 9/18:2286-334.
- [3] Compston, *Lancet.* **2008**, 372/9648:1502-1517.
- [4] Kremensov, *Mult Scler J.* **2013**, 19/13:1684-1689.
- [5] Kipp, *Mult Scler Relat Disord.* **2012**, 1/1:15-28.
- [6] Denic, *Pathophysiology.* **2011**, 18/1:21-29.
- [7] Devaux, *J Neuroimmunol.* **1997**, 75/1-2:169-173.
- [8] Lassmann, *Arch Neurol.* **1979**, 36:490-497.

- [9] Tafreshi, *Iran J Allergy Asthma Immunol.* **2005**, 4/3:113-117.
- [10] Racke, *Curr Protoc Neurosci.* **2001**, 14/1.
- [11] Ebers, *Mult Scler.* **2009**, 15:889-890.
- [12] Munger, *JAMA.* **2006**, 296/23:2832-2838.
- [13] Cantorna, *Proc Natl Acad Sci.* **1996**, 93:7861-7864.
- [14] Lemire, *J Nutr.* **1995**, 125/6:1704S-1708S.
- [15] Fukazawa, *J Neurol Sci.* **1999**, 166/1:47-52.
- [16] Niino, *J Neurol Sci.* **2000**, 177/1:65-71.
- [17] Tajouri, *Neurogenet.* **2005**, 19/1:25-38.
- [18] Mamutse, *Mult Scler.* **2008**, 14/9:1280-1283.
- [19] Orton, *Lancet Neurol.* **2006**, 5/11:932-936.
- [20] Simon, *Mult Scler.* **2010**, 16/2:133-138.
- [21] Procaccini, *Eur J Pharmacol.* **2015**, 759:182-191.
- [22] Robinson, *Miller Handb Clin Neurol.* **2014**, 122:173-189.
- [23] Lindsey, New York: Springer, **2005**, 1-9.
- [24] Mix, *Prog Neurobiol.* **2010**, 92/3:386-404.
- [25] Kurschus, *Biomed J.* **2015**, 38/3:183-193.
- [26] Lassmann, *Acta Neuropathol.* **2017**, 133:223-244.
- [27] Bittner, *JoVE.* **2014**, 86.
- [28] Mendel, *Eur J Immunol.* **1995**, 25/7:1951-1957.
- [29] Ellwardt, *Exp Neurol.* **2014**, 262:8-17.
- [30] Dal Canto, *Methods.* **1996**, 10/3: 453-461.
- [31] Blakemore, *Curr Top Microbiol Immunol.* **2008**, 318:193-212.
- [32] Norkute, *J Neurosci Res.* **2009**, 87/6:1343-1355.
- [33] Rivers, *Stroke.* **2006**, 37/1:98-104.
- [34] Ramagopalan, *PLoS Genet.* **2009**, 5/2:e1000369.

Úloha Annexínu 5 v kardioprotekcii srdca dospelého potkana vystaveného ischemicko-reperfúznemu poškodeniu

Lysíková, T.¹, Kovalská, M.², Hansen, MN.¹, Tuancersang, I.¹, Tomašcová, A.¹,
Lehotský, J.¹, Kaplán, P.¹, Tatarková, Z.¹

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

Abstract

Cardiomyocyte apoptosis is a key turning point in the cell death processes as well as in the pathogenesis of various cardiovascular diseases. Since apoptosis of cardiac cells is a highly regulated process, pharmacological intervention of apoptosis pathways may represent a promising therapeutic strategy for a number of diseases and disorders including myocardial infarction, IR injury or heart failure. Myocardial IR-induced apoptosis results in different (intra)cellular changes including loss of the asymmetric distribution of membrane phospholipids. Phosphatidylserine (PS) is highly polarized to the inner plasma membrane in normal cells, but it is externalized in the early phase of apoptosis and during inflammatory cell activation. Annexin 5 (AnxA5) is Ca^{2+} dependent PS binding protein that binds reversibly, specifically, and with high affinity to the PS-expressing cells. Adult rat hearts subjected to brief 20-min ischemia maintained PS content in mitochondria while decrease was observed after myocardial IR injury. AnxA5 positive cells were detected in both experimental groups but with different subcellular localization. Post-ischemic myocytes showed mostly cytoplasmic positivity whereas plasmatic positivity was detected in group subjected to IR injury. Short ischemic period, where competition between apoptosis and autophagy are present, seems to be more autophagic than apoptotic. Moreover AnxA5 binds reversibly to PS, and its loss after IR along with AnxA5 plasmatic positivity point to active apoptosis during reperfusion phase. To help identify potential innovative directions for future research, it is necessary to have a full understanding of the apoptotic pathways currently known to be functional in cardiac myocytes.

Keywords: Heart, Ischemia-reperfusion injury, Apoptosis, Annexin 5

Úvod

Ischemicko-reperfúzne (IR) poškodenie myokardu je komplexný patofyziologický proces, ktorý zodpovedá za poškodenie u rozsiahlej skupiny klinických stavov, ako je infarkt myokardu, či zlyhanie srdca. Preto pozornosť odbornej verejnosti sa upriamuje snahe vyvinúť nové prístupy, ktoré by umožnili potlačenie letálneho IR poškodenia, jeho sprievodných i dlhodobých poškodzujúcich následkov. Kardiovaskulárne ochorenia sú často spájané s procesom riadenej bunkovej smrti, apoptózou, srdcových myocytov. Keďže apoptóza kardiomyocytov je vysoko regulovaný proces, jednotlivé signálne dráhy apoptózy môžu predstavovať sľubnú terapeutickú stratégiu pre kardiovaskulárne ochorenia a poruchy vrátane infarktu myokardu, IR poškodenia, či zlyhania srdca v konečnom štádiu [1]. Už spomínaná apoptóza a zápal sú kľúčovými procesmi post-ischemickej remodelácie srdca. Jedným z významných hráčov v tomto procese je annexín 5 (AnxA5), ktorý má antiapoptotické [2] a protizápalové vlastnosti [3].

Pôvodne boli annexíny považované za antikoagulačné proteíny. Avšak ide o unikátnu rodinu na membránu viazaných, Ca^{2+} - a fosfolipid-viažúcich proteínov, ktorých distribúcia nie je úplne orgánovo špecifická. Spomedzi 12 izoform, Annexín 2, 5 a 6 nájdeme najviac zastúpené v tkanive srdca. Zatiaľ čo annexín 6 ovplyvňuje cyklizáciu vnútrobunkového Ca^{2+} a kontraktilitu v izolovaných kardiomyocytoch, annexín 5 je lokalizovaný tak v kardiomyocytoch ako aj v ostatných typoch buniek srdca, pričom sa podieľa na bunkovej regulácii toku iónov, organizácii a sekrécii. V prípade annexínu 2 nie je jeho úloha v srdci ešte stále plne objasnená [4].

Na zamedzenie poškodenia myokardu v dôsledku bunkovej smrti či prítomnosti zápalu je pre reperfúziu záchranu ischemizovaného myokardu aj naďalej preferovanou klinickou terapiou primárna perkutánna koronárna intervencia. Takáto post-ischemická reperfúzia so sebou prináša ďalšie poškodenie, ktoré je sprevádzané produkciou reaktívnych foriem kyslíka, ktoré stimulujú priamo dráhy bunkovej smrti a tvorbu zápalových cytokínov i zhoršenie apoptózy [5]. Dôsledkom IR-indukovanej apoptózy v myokarde sú rozličné (intra)celulárne zmeny, ktoré zahŕňajú okrem iných aj stratu asymetrickej distribúcie membránových fosfolipidov. Za normálnych podmienok je cholín-obsahujúci lipid, fosfatidylcholín, lokalizovaný na obidvoch stranách membrány, zatiaľ čo aminofosfolipidy ako je fosfatidylserín (PS), sú koncentrované na vnútornej strane membrán viabilných buniek. V skorých štádiách apoptózy a v procese aktivácie zápalu dochádza k prestupu PS na vonkajšiu stranu bunkového povrchu v dôsledku aktivácie proteolytického enzýmu kaspáza 3. Tento enzým funguje ako tzv. “eat me” signál včasného rozpoznania a fagocytózy [6].

AnxA5 má okrem anti-trombotických účinkov aj možné diagnostické vlastnosti umožňujúce vizualizáciu bunkovej smrti, či hodnotenie tvorby artériosklerotického plaku [7]. Navyše v dôsledku infarktu myokardu narastá hladina endogénneho AnxA5 v plazme a jeho uptake v oblasti postihnutej infarktom [8]. Po ischemickej príhode sa zistilo, že kardiomyocyty exprimujú PS na svojom bunkovom povrchu najmenej 6 hodín. Avšak exogénne podávanie AnxA5 malo za následok cytoplazmatickú internalizáciu a obnovenie sarkolemálnej asymetrie PS, pričom nezostal žiadny externalizovaný PS. Toto by mohlo poukazovať na schopnosť zvrátiť apoptotický proces [9]. Navyše, po liečbe AnxA5 bola pozorovaná znížená post-intervenčná zápalová reakcia, ktorá poukázala na potenciálny terapeutický účinok voči post-intervenčnej hyperplázii intimy a urýchlenej ateroskleróze [10]. Celkovo vzaté, antiapoptotické a protizápalové účinky AnxA5 by mohli v podobe ľudského rekombinantného AnxA5 slúžiť ako terapeutické činidlo na redukcii post-ischemickej remodelácie ľavej komory myokardu a zlepšenie funkcie srdca. Toto potvrdila aj štúdia, pri ktorej po aplikácii diméru AnxA5, diannexínu došlo k zlepšeniu prietoku krvi u králikov po ischémii a reperfúzii myokardu.

Preto cieľom našej práce bola snaha pochopiť skoré molekulárne mechanizmy, ktoré sú stimulované v procese post-ischemického poškodenia myokardu na modeli srdca dospelých potkanov.

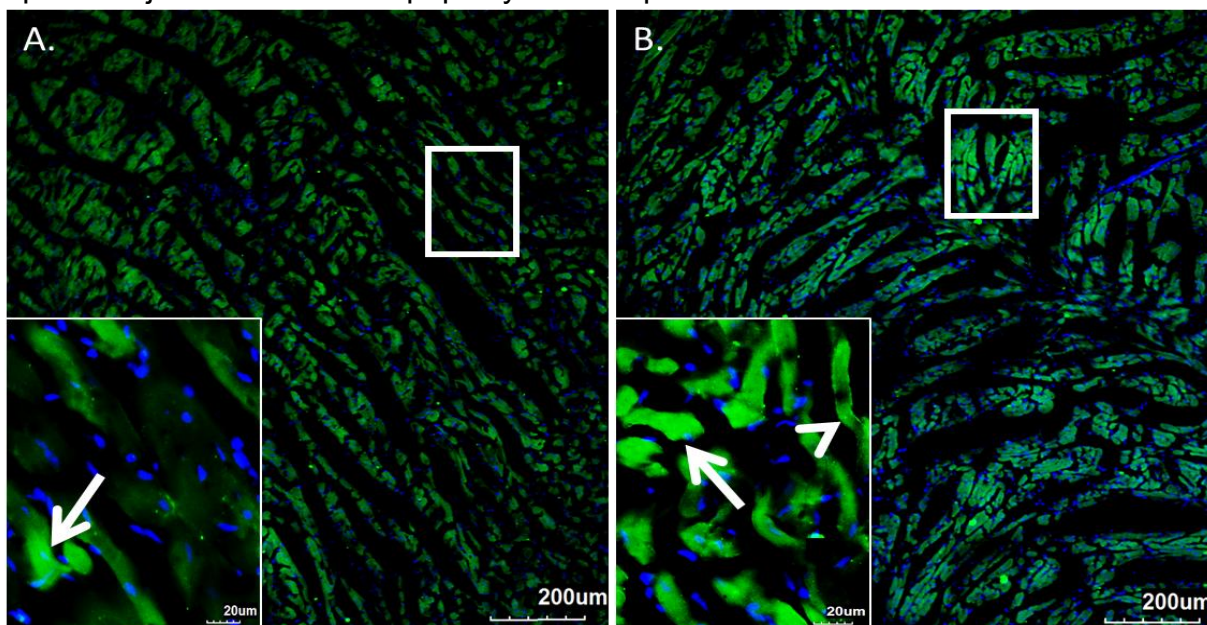
Materiál a metodika

Pre naše experimenty sme použili srdcia dospelých, 6-mes potkanov kmeňa Wistar ($n=6$ / skupinu), ktoré boli rozdelené na kontrolnú (KON) skupinu srdc (perfundovaná podľa Langendorffa 65 min), ischemickú skupinu sme vystavili 20-min globálnej ischémii (Isch) a IR skupinu s 30-min reperfúziou. Následne sme srdcia spracovali a uskladnili na -70°C . v našich experimentoch sme využili rôzne metodologické postupy ako je chromatografia na tenkej vrstve na analýzu množstva fosfatidylserínu,

a fixáciu tkanivové rezu myokardu pre následné imunohistochemické farbenie fluorescenčne značeného Annexínu 5. Výsledky sme vyhodnotili pomocou štatistického programu GrafPhad InStat V3.01 a Student-Neuman-Keulsovho testu, kde hladina $p < 0,05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

Výsledky a diskusia

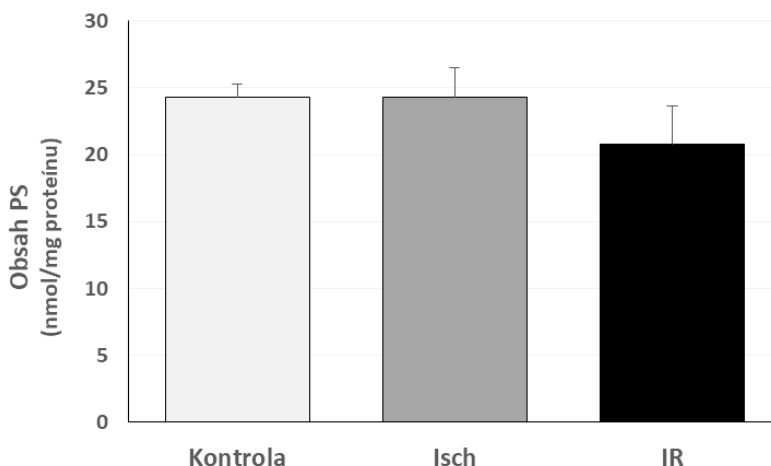
Aplikáciou fluorescenčne značeného Annexínu 5 na tkanivové rezy srdca vystavených 20-min globálnej ischemii (Obr. 1A) a srdca s následnou 30-min reperfúziou (Obr. 1B) sme monitorovali morfológické zmeny, konkrétne prestup fosfatidylserínu z vnútornej na vonkajšiu stranu plazmatickej membrány kardiomyocytov. Vzhľadom na to, že rez kontrolného srdca vykazoval minimálnu zmenu morfológie plazmatických membrán buniek srdca, tento nie je zaradený do výsledkov. Avšak na Obr. 1A je možno vidieť najmä cytoplazmatickú pozitivitu kardiomyocytov (biela šípka) v skupine vystavenej globálnej ischemii myokardu. Na druhej strane, mikrografy IR skupiny poukazujú na zvýšenú plazmatickú pozitivitu Annexínu 5 (hlava šípky), čo je dané nárastajúcim prestupom fosfatidylserínu z cytoplazmy na vonkajšiu stranu bunkovej membrány. Tieto štrukturálne zmeny, ktorými myokard prechádza v post-reperfúznom procese, reprezentujú skoré štádium apoptózy v IR skupine.



Obrázok 1 Reprezentatívne fluorescenčné mikrografy pre Annexín 5 na rezoch tkaniva myokardu v ischemickej (A) a IR skupine (B). Šípka označuje cytoplazmatickú, zatiaľ čo hlava šípky ukazuje plazmatickú pozitivitu annexínu 5 (zelená), s detailným zobrazením (biele obdĺžniky). Jadrá (modré) sú značené DAPI. Dĺžka úsečky zodpovedá 20 a 200 μm .

Zároveň fluorescenčné mikrografy podporujú predchádzajúcu štúdiu, kde sme pozorovali lokálny opuch kardiomyocytov s náznakmi perinukleárneho haló, ktoré sú markerom striedania reverzibilných zmien v dôsledku ischemického ataku. Preto môžeme predpokladať, že zmeny v tkanive myokardu vystaveného IR inzultu vznikajú v určitej miere ako dôsledok stimulácie skoršej fázy apoptózy. Navyše z literatúry je známe, že mechanizmy programovanej bunkovej smrti sú aktivované, avšak pri krátkej globálnej 20-min ischemii dochádza k ich kompetícii s indukciou autofágie resp. mitofágie, ktoré môžu pôsobiť za určitých stresových podmienok ako stimulatóri apoptózy.

Procesy apoptózy či už vonkajšej alebo vnútornej kaskády sú veľmi komplexné a zahŕňajú najrôznejšie interakcie s proteínmi iných dráh, či už prežívania buniek alebo bunkovej smrti. Napríklad aktivácia kaspázy-3 počas apoptózy cicavčích buniek je spojená aj s expresiou fosfatidylserínu na apoptotických bunkách. Annexín 5, ktorý má až nanomolárnu afinitu k PS, je využívaný odbornou verejnosťou na detekciu apoptózy tak *in vitro* [11] ako aj *in vivo* [12]. Práve možnosť neinvazívnej detekcie apoptózy by mala pomôcť maximalizovať potenciál záchrany buniek. V našom experimentálnom modeli IR poškodenia myokardu sme nezaznamenali signifikantné zmeny v množstve fosfatidylserínu po ischemii (Obr. 2), avšak trend prestupu bol pozorovaný v IR skupine.



Obrázok 2 Množstvo fosfatidylserínu (PS) po IR poškodení myokardu u 6 mes potkanov.

Niektoré práce poukazujú na význam PS-AnxA5 sprostredkovanej dráha pinocytózy, ktorá nie je obmedzená len na bunky v apoptóze ale jej výskyt bol detegovaný aj u nádorových buniek. Autori týchto prác dospeli k záveru, že intracelulárny uptake exogénneho AnxA5 bol spôsobený pohltitím apoptotických vezikúl potiahnutých AnxA5 susednými bunkami. Tento mechanizmus sa javí nepravdepodobný, keďže sme nedetegovali dostatok apoptotických či nekrotických buniek v srdciach zvierat podrobených krátkej ischemii (nepublikované výsledky). Kenis a kol. [9] zistili, že perinukleárne vezikuly v prostredí so zvýšenou koncentráciou vápnika môžu zabrániť uvoľňovaniu cytochrómu c z mitochondrií, čo podporuje antiapoptotickú úlohu AnxA5 v bunkách ischemického srdcového svalu. Expozícia reverzibilného PS predstavuje atraktívny cieľ neinvazívnej detekcie ischemie myokardu v porovnaní s tradičným zobrazovaním perfúzie srdcového svalu. Okrem toho pretrvávajúca externalizácia PS, najmenej 6 hodín po ischemii, môže umožniť retrospektívnu diagnózu bolesti na hrudníku a podporiť koncepciu ischemickej pamäte.

Záver

V minulosti sa verilo, že väčšina poškodených buniek srdcového svalu počas ischemie myokardu je odstránená nekrozou. Avšak v súčasnosti sa čoraz viac odbornej verejnosti prikláňa k teórii, ktorá presadzuje apoptózu ako veľmi dôležitý typ bunkovej smrti v postischemickom myokarde. Na rozdiel od nekrózy je apoptóza spojená s geneticky naprogramovanou kaskádou intracelulárnych udalostí, čím sa stáva prístupnou k intervencii. Napríklad použitie inhibítorov kaspázy-3 je spojené so znížením rozsahu apoptózy ale i nekrózy, s ktorou je vzájomne prepojená. Preto možnosť neinvazívnej detekcie apoptózy by mala pomôcť maximalizovať potenciál záchrany buniek. Navyše aktivácia kaspázy-3 je spojená s nadexpresiou PS na

apoptotických bunkách, čo odzrkadľuje až nanomolárna afinita AnxA5 na väzbu k PS.

Apoptóza kardiomyocytov je kľúčovým bodom „obratu“ v procese bunkovej smrti a je kritická v patogenéze rôznych kardiovaskulárnych ochorení. Zároveň inhibícia apoptózy je dôležitým cieľom terapeutickej intervencie, avšak jej mechanizmus v kardiomyocytoch stále nie je úplne preštudovaný.

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0004/19 a projektom "Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení", ITMS kód projektu: 26220220153, spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Xia, *Biomed Res Int.* **2016**, 2016:1-22.
- [2] Konstantinidis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2012**, 32:1552-1562.
- [3] Frangogiannis, *Circ Res.* **2012**, 110:159-173.
- [4] de Jong, *Sci Rep.* **2018**, 8:1-10.
- [5] Badalzadeh, *J Physiol Sci.* **2015**, 65:201-215.
- [6] Boersma, *J Nucl Med.* **2005**, 46:2035-2050.
- [7] Laufer, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2009**, 29:1031-1038.
- [8] Matsuda, *Resuscitation.* **2003**, 57:171-177.
- [9] Kenis, *J Nucl Med.* **2010**, 51:259-267.
- [10] Ewing, *Atherosclerosis.* **2012**, 221:333-340.
- [11] van Genderen, *Nat Protoc.* **2006**, 1:363-367.
- [12] Hofstra, *Lancet.* **2000**, 356:209-212.

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



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja



Agentúra

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

**Vydanie zborníka bolo podporené projektami
VEGA 1/0129/16 a VEGA 1/0171/18.**