

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA V MARTINE
ÚSTAV HISTOLÓGIE A EMBRYOLÓGIE



NOVÉ TRENDY A PERSPEKTÍVY V HISTOLÓGII IX



MARTIN, 2023



Nové trendy a perspektívy v histológii IX

Recenzovaný zborník prác

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

Recenzenti: prof. MUDr. Inga Hodorová, PhD.
prof. RNDr. Silvia Rybárová, PhD.

Grafická úprava: RNDr. Mária Kovalská, PhD.

Obálka zborníka: RNDr. Mária Kovalská, PhD.

Zborník neprešiel jazykovou korektúrou.

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

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

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martin 2023

Tlač: Tlačiareň P+M, s.r.o., Turany 2023

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

ISBN 978-80-8187-144-3

EAN 9788081871443

Nullum magnum ingenium sine mixtura dementiae fuit

Lucius Annaeus Seneca

OBSAH



Experimentálne štúdie

05

PREDHOVOR

Mokrá, D., et al.

Porovnanie ďalších
imunohistochemických markerov
fibrotických zmien v dvoch
modeloch pľúcnej silikózy
u potkanov

10

Mazuráková, A., et al.

Analýza účinku *Salvia officinalis* L.
na vybrané parametre v modeli
mamárnej karcinogenézy *in vivo*

18

Tirpáková, Z., et al.

Vplyv alkoholu na vyvíjajúce sa
vtáče embrya

27

Andrašková, S., et al.

Vývoj nosovej dutiny vtákov

34

Holovská, K., et al.

Štruktúra lymfatických ciev
v chorioalantoickej membráne
kuracieho embrya na 14. deň
inkubácie

41

Báľentová, S., et al.

Vedľajší účinok ožiarenia miechy na
populáciu astrocytov a mikroglie
v mozgu starnúcich potkanov

06

Koklesová, L., et al.

Regulačný účinok *Salvia officinalis* L.
na expresiu onkogénnych a tumor-
-supresorových miRNA
v experimentálnom modeli
karcinómu prsníka

14

Samec, M., et al.

Chemoprotektívny účinok
fytochemikálií obsiahnutých
v *Salvia officinalis* L. asociovaný
s reguláciou metylácie génových
promótorov v modeli mamárnej
karcinogenézy *in vivo*

22

Almášiová, V., et al.

Štúdium histologickej štruktúry
gonád kuracieho embrya na 9. deň
inkubácie

30

Holovská, K., et al.

Ultraštruktúra chorioalantoickej
membrány kuracieho embrya na 9.
deň inkubácie

38

Demčišáková, Z., et al.

Morfologická analýza vtáčej
chorioalantoickej membrány
v závislosti od *in ovo* a *ex ovo*
podmienok kultivácie

44



Klinicko-morfologické štúdie

48

Števík, M., et al.

Prínos MR 3D PCASL perfúzie mozgu

52

Turčan., M., et al.

Zavedenie CT koronarografie do klinickej praxe v UNM

56

Vrzgula, M., et al.

Výskyt superoxiddismutázy 1 a jej cytosólového prenášača medi v exokrinnom pankrease - imunohistochemická štúdia

60

Blahušiak Drobková, H., et al.

Génové varianty vaskulárneho endotelového rastového faktora a ich vplyv na riziko vzniku a progresie karcinómu prostaty

68

Hurtová, T., et al.

Rozvoj psoriázy po vakcinácii proti ochoreniu COVID-19 - kazuistika



Prehľadové štúdie

72

Híveš Holečková, K., et al.

Význam proteínu EpCAM pri karcinogenéze prostaty

76

Neuschlová, M., et

Havrilová, T.

Campylobacter: od zoonózy k autoimunitnému ochoreniu

80

Mičurová, G.

Chronic subdural hematoma

86

Haviarová, Z., et al.

Variabilita miechových nervových koreňov a ich klasifikácia

90

Fábryová, M., et al.

Dysbióza črevného mikrobiómu a jej možný vplyv na rozvoj Alzheimerovej choroby

Predhovor

Zborník Nové trendy a perspektívy v histológii píše svoju deviatu kapitolu. Každý rok sa snažíme sprístupniť čitateľom „nové trendy“ výskumných aktivít nielen v histológii, ale aj v príbuzných medicínskych odboroch. Tiež si myslíme, že ide o užitočnú formu informovanosti, ktorá môže pomôcť prípadnej spolupráci v určitých vedeckých projektoch, prípadne vyvolať odbornú diskusiu.

Už tradične publikujeme náš zborník tak v elektronickej ako aj nami preferovanej tlačenej forme, ktorá bude zaslaná každému prvému autorovi.

Zaslané príspevky, ktoré nespĺňali požadované základné kritériá sme museli, žiaľ, odmietnuť.

Najlepšie práce, tak ako každý rok, budú odmenené vecnými cenami. Prevažne ide o knižné publikácie vedeckého charakteru alebo ide o inú tvorbu slovenských a zahraničných autorov.

V tomto čísle zároveň prezentujeme nové logo nášho zborníka „Nové trendy a perspektívy v histológii: NTPH“.



Martin, Jún 2023

Zostavovatelia zborníka

Vedľajší účinok ožiarenia miechy na populáciu astrocytov a mikroglie v mozgu starnúcich potkanov

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

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

Abstract

In the present study, we investigated the side effect of ionizing radiation on the brain after fractionated spinal cord irradiation of rats at an advanced age. Middle-aged adult male Wistar rats (12 months old) received fractionated spinal cord irradiation with a total dose of 24 Gy administered in 3 fractions (dose 8 Gy per fraction) once a week on the same day for 3 consecutive weeks. We used immunofluorescence staining, confocal microscopy and image analysis of brain slides to determine glial cell changes in two neurogenic areas: the subventricular zone (SVZ) in the wall of the lateral ventricles and hippocampal dentate gyrus (DG). In irradiated rats, we found only a slight increase in astrocytes and a more significant increase in microglia in neurogenic areas. The study showed that the insignificant histological changes result from gradually weakening total radiation dose affecting brain regions. The influence of older age as a possible neuroprotective factor in the development of radiation-induced changes cannot be ruled out.

Keywords: rat brain, glial cells, fractionated irradiation, aging

Úvod

V rádiologickej liečbe pacientov s metastázujúcimi nádormi mozgu sa prednostne využíva frakcionované ožiarenie v kraniálnych indikáciách. Frakcionované kraniálne ožiarenie však z dlhodobého hľadiska vedie k ireverzibilným morfológickým zmenám v tkanive napr. poškodeniu endotelu, narušeniu hematoencefalickej bariéry, astroglióze, aktivácii mikroglie, apoptóze prekursorov oligodendrocytov a zápalovej odpovedi [1, 2, 3]. K najzávažnejším zmenám, ktoré významne znižujú kvalitu života onkologických pacientov patrí zhoršenie kognitívnych funkcií, napr. zmeny verbálnej a priestorovej pamäte, poruchy pozornosti až demencia [4]. Účinok ionizujúceho žiarenia nie je obmedzený na len tkanivo v bezprostrednej blízkosti cieľových buniek. Bunková toxicita sprostredkovaná cytokínmi a medzibunkovými kontaktami typu nexus môže viesť k poškodeniu bunkových populácií často vzdialených od cieľového ožiareného tkaniva. Tento vedľajší tzv. „bystander“ efekt môže negatívne ovplyvniť nielen napr. miechu ale aj susediace štruktúry ako je mozgové tkanivo [5]. Starnutie je komplexný proces, ktorý vedie k sérii molekulárnych, biochemických, štrukturálnych a funkčných zmien. Pokročilý vek hrá dôležitú úlohu aj pri modulácii radiačného účinku na neurogénne oblasti mozgu. V predklinických štúdiách bol po ožiarení mozgu potkanov vo veku 8, 18 a 28 mesiacov zistený zvýšený počet mikroglíí a takmer žiadne zmeny v zastúpení nezrelých neurónov, a to 10 týždňov po expozícii [6, 7]. Cieľom našej štúdie bolo vyšetriť ako frakcionované ožiarenie miechy potkanov ovplyvní okolité štruktúry so zameraním na populáciu gliových buniek v neurogénnych oblastiach mozgu. Súčasne sme skúmali, ako môže vyšší vek v čase ožiarenia ovplyvniť radiačné zmeny v mozgovom tkanive.

Materiál a metodika

V experimente sme použili dospelé, biele samce potkanov, kmeň Wistar (n=20), ktoré sme nechali prežívať do veku dvanásť mesiacov. Potkany sme rozdelili na kontrolnú skupinu (n=10) a druhú skupinu (n=10) sme ožarovali celkovou dávkou (cD=24 Gy, rozdelenou na 3 frakcie, 1 frakcia=8 Gy), 1-krát za týždeň. Na ožarovanie sme použili lineárny urýchľovač Clinac iX (Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, USA) s energiou 6 MeV. Ožarovaný objem predstavoval krčné a časť hrudníkových miechových segmentov (C1 – Th1). U oboch skupín zvierat sme po dvojmesačnom prežívaní vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu pomocou fyziologického roztoku a následne 4 % paraformaldehydu (obr. 1). Po dekapitácii a vybratí orgánov sme z mozgových hemisfér narezali sériové, sagitálne kryorezy. Pomocou imunofluorescenčného farbenia sme v preparátoch identifikovali marker astrocytov – glial fibrillary acidic protein (GFAP) a mikroglie – ionized calcium-binding adaptor molecule (Iba 1). Preparáty sme fotili na fluorescenčnom konfokálnom mikroskope Olympus Fluoview FV10i (Olympus, Japonsko) a hodnotili sme zastúpenie GFAP-imunoreaktívnych (GFAP-IR) astrocytov a Iba1-imunoreaktívnej (Iba1-IR) mikroglie v dvoch neurogénnych oblastiach: gyrus dentatus (GD) hipokampálnej formácie, prednej stene subventrikulárnej zóny (SVZa) a následne v jednotlivých oblastiach rostrálnej migračnej dráhy (rostral migratory stream; RMS), t.j. vertikálnom ramene, ohybe a horizontálnom ramene.



Obrázok 1 Schéma experimentálneho dizajnu

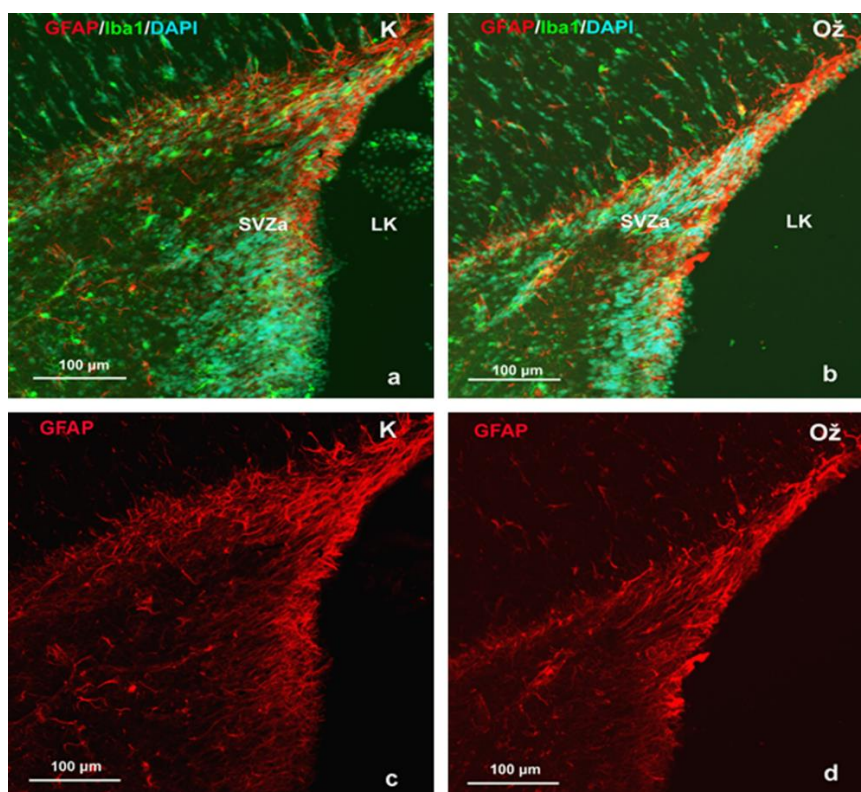
Výsledky

V neurogénnej oblasti mozgu kontrolnej skupiny potkanov sme zistili najvyšší počet astrocytov v SVZa ($1394 \pm 109,28$), ktorý bol nasledovaný poklesom vo vertikálnom ramene ($1085,70 \pm 60,03$), opätovným nárastom v ohybe ($1479,30 \pm 172,31$) a sekundárnym poklesom v horizontálnom ramene ($873,68 \pm 78,16$). Expresia GFAP v GD hipokampálnej formácie bola v porovnaní s údajmi získanými z oblastí migračnej dráhy relatívne nízka ($533,13 \pm 33,12$). Frakcionované ožarovanie vyvolalo mierny pokles GFAP-IR astrocytov v SVZa ($1099,80 \pm 63,33$) avšak v ďalších oblastiach migračnej dráhy a tiež v GD nastal mierny nárast (vr: $1196,80 \pm 78,15$; ohyb: $1512,90 \pm 166,34$; hr: $930,64 \pm 66,91$; GD: $539,03 \pm 35,24$) (obr. 2). Zastúpenie mikroglie v oboch neurogénnych oblastiach mozgu kontrolnej skupiny bolo porovnateľné (SVZa: $565,71 \pm 112,24/\text{cm}^2$; vr: $435,38 \pm 53,30$; ohyb: $950,67 \pm 60,34$; hr: $405 \pm 51,18$; GD: $257,87 \pm 43,18$). Ožarovanie iniciovalo nárast počtu Iba1-IR mikroglie pozdĺž migračnej

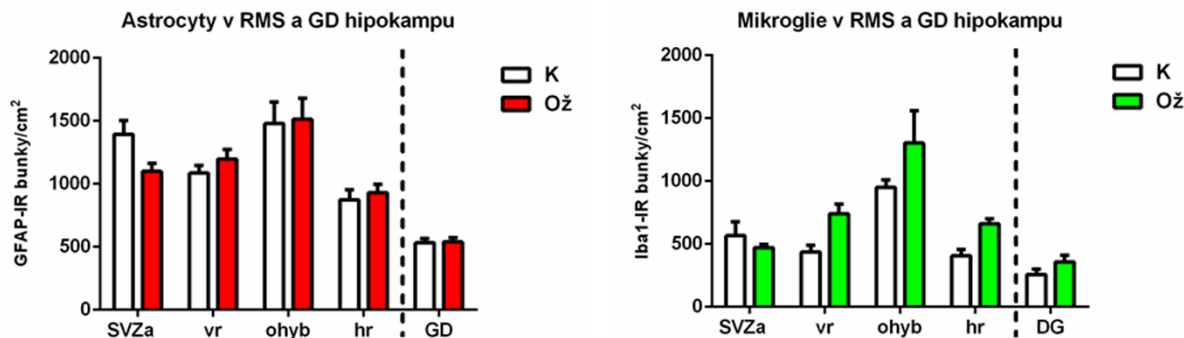
dráhy (vr: $740,07 \pm 77,04$; ohyb: $1303,10 \pm 255,79$; hr: $661,64 \pm 38,18$) a v GD ($357,47 \pm 52$) s výnimkou poklesu v SVZa ($468,69 \pm 26,48$).

Diskusia

Výsledky štúdie ukazujú, že ožiarenie miechy malo len nepatrný vplyv na populáciu astrocytov a mikroglie osídľujúcich neurogénne oblasti mozgu potkanov (obr. 3). V našej predchádzajúcej štúdii sme po frakcionovanom ožiarení mozgu potkanov cD=32 Gy alebo 35 Gy, prežívajúcich buď 9-11 alebo 18-21 týždňov zistili štatisticky významné zvýšenie astrocytov v oboch hodnotených oblastiach [8, 9]. V motorickej kôrovej oblasti, ktorá nie je považovaná za neurogénnu oblasť došlo po ožiarení mozgu cD=32 Gy len k miernemu zvýšeniu astrocytov [9]. V inej štúdii sme po ožiarení mozgu potkanov cD=40 Gy, prežívajúcich 16 týždňov identifikovali mierne zníženie počtu astrocytov [10]. Získané údaje čiastočne korešpondujú s výsledkami našich štúdií, avšak nie sú v súlade so závermi iných experimentov [11, 12]. Nevýrazné zvýšenie počtu mikroglie v ožiarenej skupine viac menej korešpondovalo so zmenami astrocytov. Astrocyty a mikroglie sa zásadným spôsobom podieľajú na homeostáze mozgového tkaniva a sú dôležité pri iniciácii ochorení s rôznou etiológiou [13]. V predchádzajúcich štúdiách sme zistili zvýšený počet Iba1-IR mikroglie v rámci migračnej dráhy a primárnej motorickej kôrovej oblasti po ožiarení cD=32 Gy [10, 14]. Predpokladáme že, rozdielna reakcia mikroglie v starších a novších štúdiách je výsledkom dlhšieho času prežívania po ožiarení a nie je spôsobená starším vekom potkanov.



Obrázok 2 Mikrofotografie sagitálnych rezov mozgu kontrolných (K) a ožiarených potkanov (Ož) Imunofluorescenčné farbenie na detekciu glial fibrillary acidic protein (GFAP) – markera astrocytov (červená fluorescencia) a ionized calcium-binding adaptor molecule (Iba1) – markera mikroglie (zelená fluorescencia) v prednej stene subventrikulárnej zóny (SVZa) v stene laterálnych mozgových komôr (LK). Preparáty boli dofarbené jadrovým farbivom DAPI (modrá fluorescencia). Po ožiarení nastal mierny pokles astrocytov v SVZa (c, d)



Obrázok 3 Zastúpenie GFAP-IR astrocytov a Iba1-IR mikroglie v gyrus dentatus (GD) hipokampálnej formácie a jednotlivých oblastiach rostrálnej migračnej dráhy (rostral migratory stream; RMS), t.j. prednej stene subventrikulárnej zóny (SVZa), vertikálnom ramene (vr), ohybe a horizontálnom ramene (hr) mozgu kontrolných (K) a ožiarených (Ož) potkanov

Záver

Porovnaním výsledkov našich a ďalších štúdií sme dospeli k záveru, že odlišné zmeny môžu byť spôsobené nielen cieľovou ožarovanou oblasťou, veľkosťou frakcie, celkovej dávky a dobou prežívania po žiarení. Svoju úlohu zohral aj vyšší vek potkanov v čase ožarovania. Histopatologické zmeny v mozgu sú zvyčajne úzko spojené s funkčnými zmenami, ktoré sú z klinického hľadiska veľmi závažné. Práve funkčné, kognitívne zmeny u pacientov po rádioterapii primárnych a metastázujúcich nádorov mozgu sú prognosticky nepriaznivé a zhoršujú kvalitu ich života.

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

Literatúra

- [1] Moraes, *Appl. Rad. Oncol.* **2017**, 6(1): 6–10.
- [2] Greene-Schloesser, *Front. Oncol.* **2012**, 2: 73.
- [3] Yuan, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2006**, 66: 860–866.
- [4] Kalm, *Radiat. Res.* **2009**, 171: 66–76.
- [5] Baskar, *Front. Mol. Biosci.* **2014**, 1: 24.
- [6] Schindler, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2008**, 70(3): 826–834.
- [7] Casciati, *Oncotarget.* **2016**, 7(19): 28040–28058.
- [8] Bálintová, *Neurotoxicology.* **2017**, 60: 70–81.
- [9] Bálintová, *Brain. Res.* **2019**, 1708: 146–159.
- [10] Hnilicová, *Neurochem. Int.* **2022**, 154: 105293.
- [11] Zorkina, *Am. J. Neurosci.* **2014**, 5: 26–35.
- [12] Tang, *Neurooncol. Adv.* **2019**, 1(1): vdz012.
- [13] Matejuk, *Front. Immunol.* **2020**, 11: 1416.
- [14] Bálintová, *Neurochem. Int.* **2021**, 145: 104985.

Porovnanie ďalších imunohistochemických markerov fibrotických zmien v dvoch modeloch pľúcnej silikózy u potkanov

Mokrá, D.¹, Adamčáková, J.¹, Báľentová, S.², Adamkov, M.², Mikolka, P.^{1,3}, Paľová, R.¹, Kalenská, D.⁴, Nová Z.¹

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

²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin

daniela.mokra@uniba.sk

Abstract

Excessive or long-term inhalation of particulate silicon oxide (or silica) may result into lung silicosis associated with irreversible fibrotic changes. Mechanisms of silica-induced lung fibrosis have not been completely elucidated yet; however, they include accumulation of immune cells, particularly lymphocytes and alveolar macrophages, in the lung interstitium, and thickening of the connective tissue mass. Because of poor understanding the pathomechanisms of silicosis, this study evaluated changes in immunohistochemical markers demonstrating early and late fibrotic changes in the lungs of silica-instilled rats. For this purpose, two animal models of silicosis were developed by means of orotracheal instillation of silica in two different concentrations and particle sizes. Fibrotic changes were evaluated by immunohistochemical detection of α -smooth muscle actin (SMA) and vimentin in the lung structures. We found that both tested models caused fibrotic changes in the lung; however, instillation of higher dose of smaller silica particles caused more serious fibrotic changes.

Keywords: silica, lung silicosis, inflammation, lung fibrosis

Úvod

Dlhodobá a/alebo intenzívna inhalácia kremíkových častíc (siliky) môže viesť k fibrotickým zmenám pľúc, pľúcnej silikóze [1,2]. Medzi najdôležitejšie patomechanizmy tohto ochorenia patrí aktivácia imunitných buniek (najmä alveolárnych makrofágov, neutrofilov a lymfocytov), zvýšená tvorba reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a aktivácia viacerých prozápalových, profibrotických a proapoptotických kaskád [3]. Na odhalenie patomechanizmov a ich vzájomných interakcií sa používajú animálne modely silikózy, ktoré sa vyvolajú podaním rôznych dávok, koncentrácií a veľkostí častíc siliky laboratórnym zvieratám (najčastejšie myšiam alebo potkanom). V našich experimentoch sme častice siliky podali dospelým potkanom-samcom orotracheálnou cestou, ktorá umožňuje porovnateľnú distribúciu siliky v pľúcach s priamou transtracheálnou instiláciou, ale nevyžaduje predchádzajúcu chirurgickú prípravu ani následnú pooperačnú fázu [4,5]. Na vyvolanie zápalových a fibrotických zmien v pľúcach sme použili dve rôzne dávkovacie schémy a následne sme porovnali stupeň imunohistochemických zmien v týchto animálnych modeloch. Pilotné výsledky niektorých morfometrických parametrov a imunohistochemickú analýzu prítomnosti kolagénových vlákien pomocou farbenia Sirius red sme publikovali pred 2 rokmi [6]. V aktuálnom príspevku prezentujeme ďalšie výsledky imunohistochemickej analýzy, a to detekciu prítomnosti alfa-aktínu hladkej svaloviny (α -SMA) a vimentínu v pľúcnych štruktúrach zvierat so silikózou v porovnaní so zdravými kontrolami po 14 resp. 28 dňoch od podania siliky (alebo fyziologického roztoku u kontrol).

Materiál a metódy

V štúdiu sme použili samce potkanov SPF kmeňa Wistar s hmotnosťou 250-400 g, ktoré boli chované v štandardných podmienkach vo zverinci. Na vyvolanie modelu č. 1 sme použili častice siliky s priemerom $<40\text{ }\mu\text{m}$ (Quartz, Merck, USA) v dávke 15 mg siliky/300 μl /zvíra. Na vyvolanie modelu č. 2 sme použili častice s veľkosťou $1,5\text{ }\mu\text{m}$ (SiO_2 powder, 1.5 micron, 99.9%; Alfa Aesar, ThermoFisher, USA) v dávke 50 mg/ml/zvíra. Modely silikózy sme vyvolali jednorazovým orotracheálnym podaním príslušnej dávky suspenzie siliky v sterilnom fyziologickom roztoku počas celkovej inhalačnej anestézy (4% izofluran+ O_2). Kontrolným zvieratám sme podali zodpovedajúci objem sterilného fyziologického roztoku. Po 14 alebo 28 dňoch od podania siliky sme zvieratá usmrtili podaním letálnej dávky anestetík.

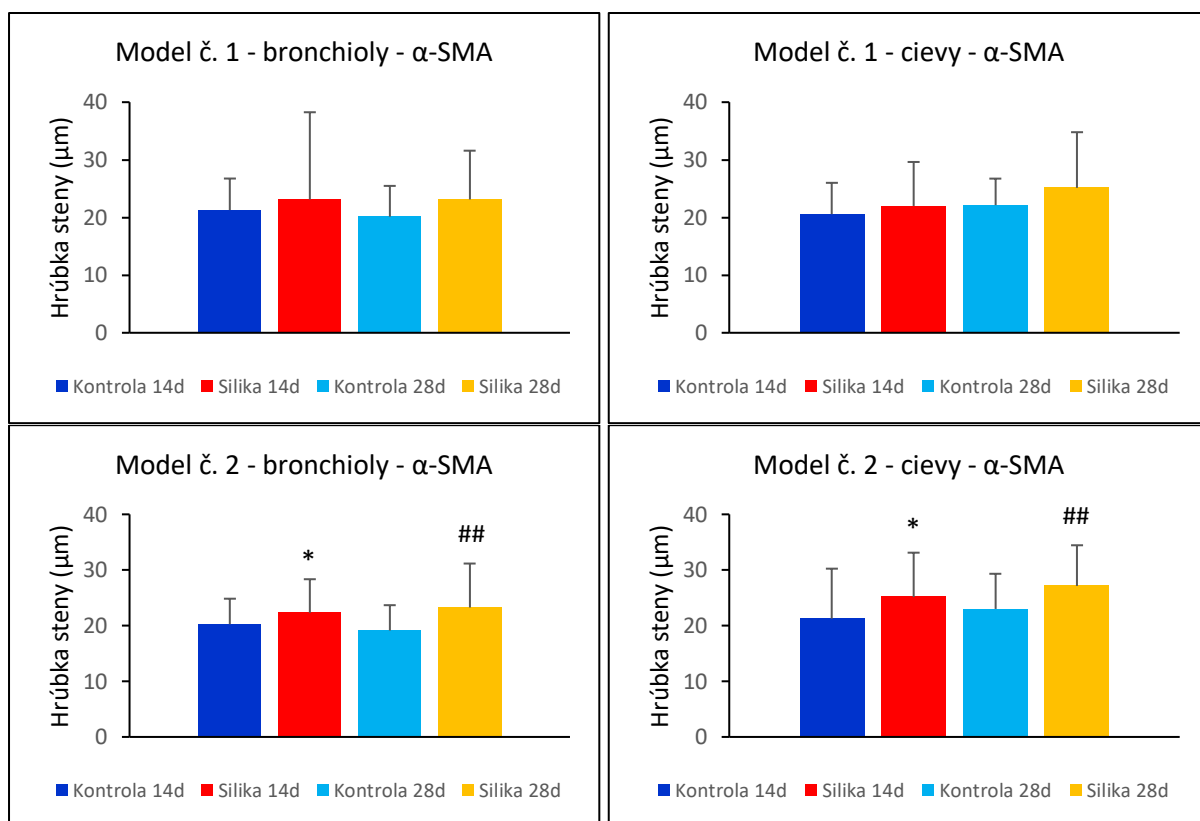
Následne sme vybrali pľúca a stredný lalok pravých pľúc sme fixovali v 4% formaldehyde. Po fixácii boli vzorky pľúc parafinizované, narezané a ofarbené Weigertovým hematoxylínom na vizualizáciu bunkových jadier. Časť vzoriek pľúc sme po narezaní inkubovali v roztoku 3% H_2O_2 počas 10 min. a farbili pomocou primárnej polyklonálnej protilátky proti aktínu hladkej svaloviny (SMA; 1:300, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 30 min. pri izbovej teplote. Rezy sme následne inkubovali pomocou duálneho detekčného systému LSAB2 System-HRP for use on rat specimens (Dako, Dánsko) počas 10 min. Výsledok reakcie, t.j. tmavohnedo sfarbenú cytoplazmu hladkosvalových buniek sme vizualizovali pomocou DAB and Envision Flex HRP magenta substrate chromogen system (Dako). Jadrá buniek sme dofarbili Mayersovým hematoxylínom (Himedia Laboratories) a montovali pomocou Entellanu (Merck, USA). Hrúbku vrstvy spojivového tkaniva (*lamina propria*) steny bronchiolov a hrúbku *tunica adventitia* steny ciev mikroskopicky hodnotil skúsený histológ pomocou softvéru Quick Photo Micro software (version 3.2, Olympus, Japonsko) a údaje vyjadril v μm . Kvantitatívnu analýzu prítomnosti vimentínu v pľúcnom parenchýme a cievnom endoteli, ktorý sa vizualizoval sfarbením cytoplazmy a plazmatickej membrány v odtieni magenta vo vimentín-pozitívnych bunkách, sa hodnotil pomocou Image J programu (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Výsledky sme spracovali pomocou štatistického programu GraphPad Prism. Údaje sú uvedené ako aritmetický priemer \pm štandardná odchýlka (SD). Hodnoty p menšie ako 0,05 sme považovali za štatisticky významné ($p<0,05$).

Výsledky

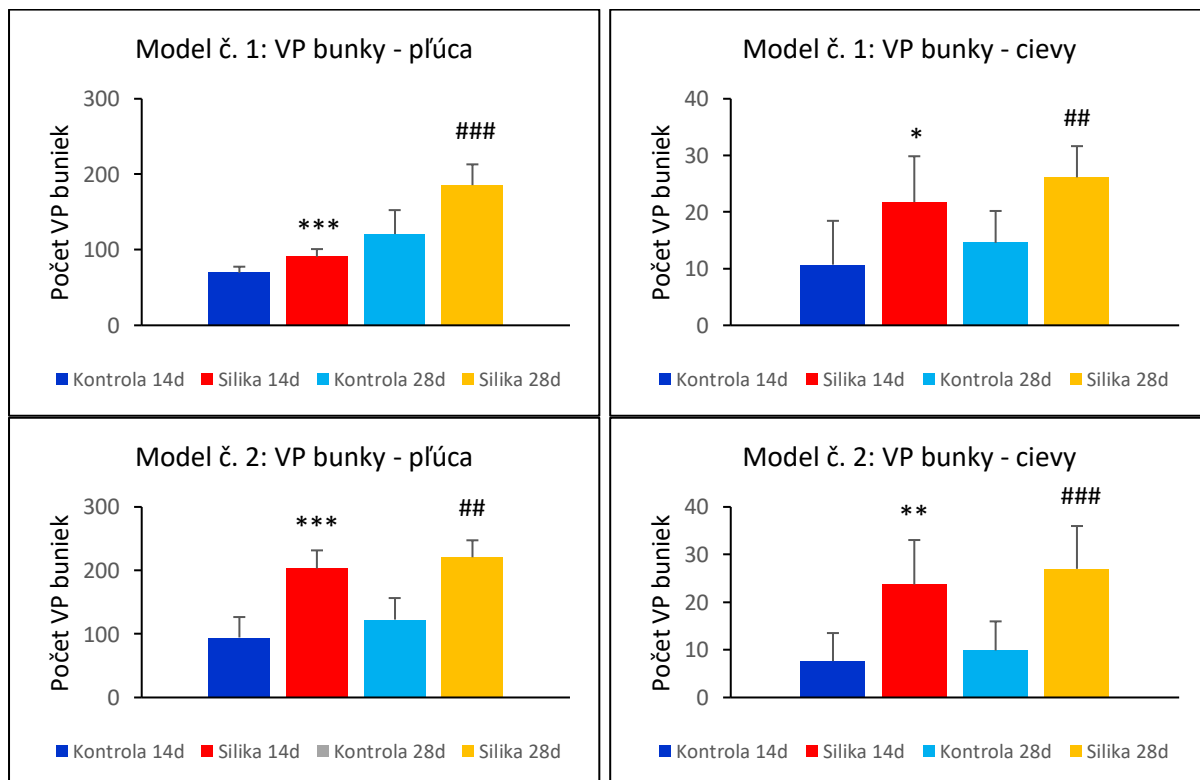
Analýza prítomnosti spojivového tkaniva v stene bronchiolov a ciev na základe farbenia pomocou protilátky proti α -SMA ukázala štatisticky nevýznamné zmeny v modeli č. 1 ($p>0,05$). Naopak, v modeli č. 2 sme zistili hrubšiu vrstvu spojiva v stene bronchiolov a tiež v stene pľúcnych ciev už po 14 dňoch od instilácie siliky v porovnaní s kontrolami (obe $p<0,05$), pričom sa tieto zmeny ešte zvýraznili po 28 dňoch pôsobenia siliky (obe $p<0,01$) (obr. 1).

Podanie siliky do pľúc viedlo aj ku zvýšeniu počtu vimentín-pozitívnych buniek v stene bronchiolov a v pľúcnom parenchýme. Signifikantné zvýšenie počtu vimentín-pozitívnych buniek v porovnaní s kontrolami sme zistili po 14 aj po 28 dňoch od podania siliky, a to v oboch modeloch silikózy (všetky $p<0,001$). Okrem toho došlo aj ku zvýšeniu počtu vimentín-pozitívnych buniek v stene pľúcnych ciev po 14 aj po 28 dňoch od podania siliky v porovnaní s kontrolnými skupinami (model č. 1: $p<0,05$ po 14 dňoch a $p<0,01$ po 28 dňoch; model č. 2: $p<0,01$ po 14 dňoch a $p<0,001$ po 28 dňoch)(obr. 2).



Obrázok 1 Prítomnosť α-SMA

Hrúbka bronchiolov a ciev (vyjadrená v μm). Model 14d vs. Kontrola 14d: * $p < 0,05$; Model 28d vs. Kontrola 28d: ## $p < 0,01$



Obrázok 2 Vimentín-pozitívne (VP) bunky v pľúčnom tkanive a cievach

Model 14d vs. Kontrola 14d: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Model 28d vs. Kontrola 28d: ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$

Diskusia

Prítomnosť siliky v pľúcach spúšťa zápalovú odpoveď, ktorá postupne prechádza do chronicity. Súbežne so zápalovými zmenami sa rozbiehajú aj fibrotické procesy, ktoré môžu skončiť ireverzibilnou fibrotizáciou pľúcneho tkaniva.

V tejto štúdii sme sa zamerali na hodnotenie prítomnosti α -SMA, ktorý je markerom diferenciácie myofibroblastov, kľúčového procesu pri fibróze. Zistili sme, že zatiaľ čo v modeli č. 1 sme nepozorovali výrazné rozdiely v hrúbke steny bronchiolov a pľúcnych ciev medzi zvieratami so silikózou a kontrolami, v modeli č. 2 sme zistili signifikantné zväčšenie hrúbky steny bronchiolov aj ciev už po 14 dňoch od podania siliky a tieto zmeny sa ešte zvýraznili po ďalších 14 dňoch experimentu.

Ďalšia imunohistochemická analýza hodnotila prítomnosť vláknitého proteínu vimentínu, ktorý sa nachádza v rôznych bunkách vrátane fibroblastov, endotelových buniek, ale aj imunitných buniek (makrofágov, neutrofilov a lymfocytov). Jeho zvýšené koncentrácie zvyšujú invazivitu fibroblastov, stimulujú epitelovo-mezenchýmovej premenu a tvorbu extracelulárnej matrix vrátane kolagénu. V dôsledku pôsobenia siliky došlo ku zvýšeniu počtu vimentín-pozitívnych buniek v porovnaní s kontrolami, pričom prítomnosť vimentínu v pľúcnom tkanive bola v oboch modeloch rovnako významná po 14 aj 28 dňoch, ale v modeli č. 2 bola výraznejšia prítomnosť vimentínu v cievach ako v modeli č. 1. Nález včasných fibrotických zmien je v súlade so zisteniami iných autorov [7-9]. Naše výsledky zároveň ukazujú, že podanie vyššej dávky častíc siliky s menším priemerom má vyšší fibrogénny efekt na pľúcne tkanivo.

Záver

V animálnych modeloch silikózy testovaných v tejto štúdii sme zistili, že obe dávkovacie schémy podania siliky do pľúc potkanov vedú k aktivácii profibrotických dejov. Model č. 2 vykázal výraznejšiu fibrotickú reakciu ako model č. 1, čo bolo pravdepodobne výsledkom podania vyššej dávky častíc siliky s menším priemerom.

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

Literatúra

- [1] Greenberg, *Dis. Mon.* **2007**, 53: 394–416.
- [2] Barnes, *Respirology*. **2019**, 24: 1165–1175.
- [3] Adamcakova and Mokra, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22: 4162.
- [4] Liu, *Biomed. Environ. Sci.* **2016**, 29: 584–588.
- [5] Gharaee-Kermani, *Methods Mol. Med.* **2005**, 117: 251–259.
- [6] Adamčáková, In: *Nové trendy a perspektívy v histológii VII. Martin: JLF UK, 2021*, s. 13–16, ISBN 978-80-8187-104-7
- [7] Abdelaziz, *Int. Immunopharmacol.* **2016**, 40: 530–541.
- [8] Li, *Biomed. Pharmacother.* **2019**, 119: 1093872019.
- [9] Ferreira, *Front. Endocrinol.* **2020**, 11: 388.

Regulačný účinok *Salvia officinalis* L. na expresiu onkogénnych a tumor-supresorových miRNA v experimentálnom modeli karcinómu prsníka

Koklesová, L.¹, Samec, M.², Mazuráková, A.³, Kubatka, P.⁴

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologicko-fyziologickej fyziológie; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie

koklesova5@uniba.sk; peter.kubatka@uniba.sk

Abstract

Breast carcinoma is the most common cancer and the most frequent cause of cancer death among women worldwide. The growing number of new cases of breast cancer in the world requires alternative preventive and therapeutic strategies as an adjunct to conventional clinical approaches. Antitumor activities of phytochemicals or whole plant foods through epigenetic changes are currently a highly evaluated area of breast cancer research. In our experiment, we focused on the epigenetic analysis (oncogenic and tumor-suppressive miRNA expression) of potential chemopreventive and antitumor effects of *Salvia officinalis* L. in a chemically-induced rat model of mammary carcinoma. Chemoprevention by sage was achieved by dietary administration in two groups at concentrations of 0.1 % and 1 % but chemoprevention was not administered in the control group. In our experiment, *S. officinalis* at a lower concentration did not cause the alterations of miRNA expression of any tested miRNAs; however, a sage at a higher concentration significantly reduced the expression of miR-21 a miR-145 when compared to the control. The results suggested that the phytochemicals occurring in sage exerted chemopreventive and modulatory effects through epigenetic alterations, including regulation of miRNA expression in rat breast carcinoma tissues *in vivo*.

Keywords: mammary carcinogenesis, miRNA expression, sage, chemoprevention

Úvod

Rakovina prsníka predstavuje v ženskej populácii najčastejšie diagnostikovanú rakovinu a príčinu úmrtí na rakovinu [1]. Rastúci počet nových prípadov rakoviny prsníka vo svete si vyžaduje alternatívne preventívne a terapeutické stratégie ako doplnok ku konvenčným klinickým prístupom. Chemoprevencia predstavuje jednu z významných foriem prevencie, kedy použitie syntetických liekov alebo prirodzených fytosubstancií vedie k zníženiu rizika rakoviny alebo oddialeniu jej rozvoja či recidívy [2]. Strava založená na celistvých rastlinných potravinách bohatých na fytochemikálie významne ovplyvňuje základné parametre mamárnej karcinogenézy (frekvencia, incidencia, latencia, objem nádorov a pomer high/low grade karcinómov), ale aj epigenetické mechanizmy, vrátane metylácie DNA, posttranslačných modifikácií histónov a regulácie expresie mikroRNA (miRNA) [3]. Epigenetika predstavuje súbor mechanizmov, ktoré ovplyvňujú génovú expresiu, ale bez zmien v primárnej štruktúre DNA. Navyše epigenetické zmeny sú reverzibilné, a preto sú vhodné pre skúmanie fytochemikálií ako modulačných epigenetických molekúl v nádorových ochoreniach, vrátane karcinómu prsníka [4]. MiRNA predstavujú malé nekódujúce RNA, ktoré posttranskripčne regulujú génovú expresiu. Regulujú rôzne cieľové gény, z ktorých niektoré sa podieľajú na procese karcinogenézy. Fytochemikálie ako protinádorové

látky regulujúce expresiu onkogénnych alebo tumor-supresorových miRNA sú intenzívne študované v predklinickom *in vitro* a *in vivo* onkologickom výskume [5].

Šalvia lekárska (*S. officinalis*) z čeľade Labiatae/Lamiaceae bohatá na rôzne fytochemikálie (flavonoidy, triesloviny, terpény, terpenoidy, alkaloidy a kumaríny) vykazuje mnohé protinádorové, protizápalové, antioxidačné, antimikrobiálne, antimutagénne, hypoglykemické a hypolipidemické účinky [6, 7]. Chemopreventívny účinok šalvie nebol doposiaľ skúmaný v experimentálnom modeli karcinómu prsníka, a preto cieľom našej štúdie bolo sledovať epigenetické zmeny, predovšetkým zmeny v expresii onkogénnych a tumor-supresorových miRNA, v odobratých tkanivách karcinómu prsníka potkanov.

Materiál a metódy

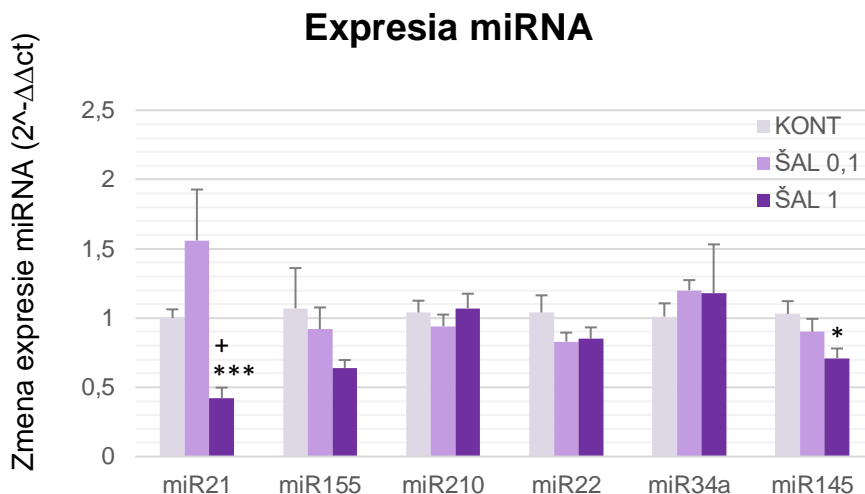
Samice potkanov Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Nemecko) boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca pri teplote 23 ± 2 °C, relatívnej vlhkosti 40-60 % a umelom svetelnom režime svetlo/tma 12:12 h). Samice potkanov (vo veku 5 týždňov a váhou v rozmedzí 125-140 g) sme náhodne zaradili do troch experimentálnych skupín: 1) kontrolná skupina bez podávania šalvie, 2) nižšia koncentrácia chemopreventívnej látky (šalvia: 1 g/kg potravy), 3) vyššia koncentrácia chemopreventívnej látky (šalvia: 10 g/kg potravy). Chemoprevenčia šalviou (*S. officinalis*) sa aplikovala v diéte (Ssniff, Soest, Nemecko) a začala sa týždeň pred intraperitoneálnym jednorázovým podaním karcinogénnej látky (N-metyl-N-nitrózuorea; NMU) a trvala počas celého experimentu (14 týždňov). Zvieratá sme raz týždenne vážili a palpovali za účelom zistenia výskytu, lokalizácie a frekvencie nádorov mliečnej žľazy. Posledný experimentálny týždeň sme po rýchlej dekapitácii odobrali potkanom nádorové tkanivá prsníka na molekulárnu analýzu.

Pre analýzu expresie miRNA, sme odobraté nádorové tkanivá najprv zhomogenizovali použitím TissueLyser LT (Qiagen, Nemecko). Následne sme izolovali celkovú RNA z nádorových tkanív použitím komerčného kitu na izoláciu mikroRNA miRVana (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Koncentráciu vyizolovanej RNA sme stanovili prostredníctvom spektrofotometra NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific), ktorý umožňuje presné a rýchle stanovenie koncentrácie a čistoty vzorky. V ďalšom kroku sme pre syntézu cDNA použili TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Na prípravu analýzy expresie miRNA prostredníctvom kvantitatívnej realtime PCR sme použili komerčnú esej TaqMan™ Advanced miRNA assays Kit (Thermo Fisher Scientific) pre onkogénne miR-21, -155 a -210 a tumor-supresorové miR-22, -34a, -145 a na normalizáciu výsledkov sme ako kontrolu použili miR-191. Prostredníctvom AB7500 Real Time System (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) sme vykonali kvantitatívnu realtime PCR. Všetky qPCR reakcie sme realizovali v duplikátoch, pričom hodnotu C_q sme stanovili ako priemer získaných hodnôt.

Výsledky

Z hľadiska regulačného potenciálu šalvie v nádorových tkanivách samíc potkanov sme sa zamerali na analýzu expresie onkogénnych (miR-21, miR-155, miR-210) a tumor-supresorových (miR-22, miR-34a, miR-145) miRNA (obr. 1). Nižšia dávka šalvie nepreukázala signifikantné zmeny v moduláciách expresie vybraných miRNA v porovnaní s kontrolnou skupinou. Signifikantné zmeny sme zaznamenali až po aplikácii vyššej dávky šalvie, a to zníženie expresie onkogénnej miR-21 o 58 % ($p < 0,001$, skupina ŠAL 1) a zníženie expresie tumor-supresorovej miR-145 o 31 % ($p < 0,05$, ŠAL 1) v porovnaní s kontrolou. Ďalšiu signifikantnú zmenu sme zachytili pri porovnaní skupín ŠAL 0,1 a ŠAL 1, kde sme odhalili významné zníženie expresie

onkogénnej miR-21 o 73 % ($p < 0,05$). Nesignifikantný, ale zreteľný pokles expresie onkogénnej miR-155 o 40 % ($p = 0,194$, ŠAL 1) v porovnaní s kontrolnými vzorkami sme zaznamenali aj po aplikácii vyššej dávky šalvie. Na ostatné testované parametre miRNA (miR-155, miR-210, miR-22, miR34a) nemala nižšia ani vyššia dávka šalvie významný modulačný účinok.



Obrázok 1 Relatívna úroveň expresie onkogénnych miRNA (miR-21, miR-155, miR-210) a tumor-supresorových miRNA (miR-22, miR-34a, miR-145) v nádorových tkanivách potkanov po aplikácii *S. officinalis*

Pre normalizáciu získaných výsledkov bola použitá miR-191-5p ako interná kontrola. Dáta sú vyjadrené ako priemery \pm SEM. Signifikantný rozdiel: * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs. KONT, + $P < 0,05$ vs. ŠAL 0,1

Diskusia

Aj napriek pokrokom v onkologickom výskume je incidencia a mortalita na karcinóm prsníka veľmi vysoká [1]. Hlavnou príčinou úmrtnosti je rozvoj rezistencie na konvenčnú terapiu [8]. Z tohto dôvodu je pre pacientov s rakovinou prsníka mimoriadne dôležitý individuálny prístup a identifikácia moderných a efektívnejších preventívnych a terapeutických stratégií vrátane zvýšenej citlivosti nádorových buniek na konvenčné chemoterapeutiká [9]. Primárna a sekundárna chemoprevenčia celistvými rastlinami by mohla viesť k efektívnemu znižovaniu incidence zhubných ochorení mliečnej žľazy [10]. Spúšťačom karcinogenézy sú často špecifické epigenetické zmeny, ktoré vedú k abnormálnej transkripcii génov a narušeniu regulácie bunkových procesov. Z hľadiska klinickej medicíny by rozdiely v epigenetických mechanizmoch medzi zdravými a chorými jedincami mohli viesť k identifikácii nových diagnostických, prediktívnych alebo prognostických markerov, najmä u vysokorizikových jedincov [11].

V našom experimente nižšia dávka šalvie nepreukázala významný účinok na reguláciu expresie žiadnej z testovaných miRNA, ale po aplikácii vyššej dávky šalvie sme zaznamenali pokles expresie onkogénnej miR-21. Na druhej strane sme po aplikácii vyššej dávky šalvie zaznamenali proneoplastický účinok šalvie prostredníctvom zníženej expresie tumor-supresorovej miR-145. Na regulácii miR-145 sa však podieľa množstvo faktorov, vrátane variácií chromatinu, transkripčnej a post-transkripčnej regulácie a hypermetylácie promótoru miR-145 génov. Okrem toho expresiu miR-145 môžu výrazne ovplyvňovať aj endogénne (cytokíny, hormóny) a exogénne (xenobiotiká) faktory [12]. Pre podrobnejšie stanovenie tohto účinku je však potrebná ďalšia analýza. Keďže sme pri ostatných epigenetických analýzach (metylácia DNA a

posttranslačné modifikácie histónov) a základných parametroch mamárnej karcinogenézy nezaznamenali iný proneoplastický účinok po aplikácii šalvie, predpokladáme, že šalvia vykazuje významný chemopreventívny účinok v experimentálnom modeli mamárnej karcinogenézy. V našich predchádzajúcich chemopreventívnych štúdiách karcinómu prsníka *in vivo* celistvé rastlinné potraviny (tymián, škorica a sumak) taktiež preukázali významný pozitívny modulačný účinok na vybrané epigenetické parametre, vrátane zmien v expresii miRNA [3, 13, 14]. V iných *in vitro* štúdiách karcinómu prsníka, autori podobne preukázali pokles expresie onkogénnej miR-21, a to po aplikácii extraktu z prhl'avy dvojdomej [15] alebo kombinácie silibininu s epigalokatechín-3-galátom [16].

Napriek tomu, že naša štúdia neodhalila presné mechanizmy, ktorými šalvia reguluje expresiu onkogénnych a tumor-supresorových miRNA v animálnom modeli karcinómu prsníka *in vivo*, komplexné predklinické a klinické štúdie poukazujú na významné preventívne a protinádorové účinky celistvých rastlinných potravín alebo izolovaných fytochemikálií prostredníctvom epigenetických zmien [4, 5, 17]. Pre pochopenie epigenetických mechanizmov spojených s reguláciou expresie miRNA v rámci chemoprevencie je potrebný detailnejší výskum.

Záver

Výsledky z experimentu poukázali na signifikantný modulačný efekt šalvie na epigenetické mechanizmy, konkrétne reguláciu expresie onkogénnych a tumor-supresorových miRNA, v experimentálnej mamárnej karcinogenéze *in vivo*, pričom zaznamenaná účinnosť bola predovšetkým v jej vyššej koncentrácii. Tieto výsledky poukazujú na dôležitosť analýzy epigenetických účinkov rastlinných prirodzených substancií v rámci onkologického výskumu.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0045/23. Experimenty boli schválené etickou komisiou JLF UK (No. EK12/2022) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (Ro-5056-3/2022-220).

Literatúra

- [1] Sung, *CA Cancer J. Clin.* **2021**, 71(3): 209–249.
- [2] Kubatka, *Univerzita Komenského v Bratislave*, **2017**, 204 s., ISBN 978-80-223-4373-2
- [3] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 22(1): 183.
- [4] Jasek, *Biomolecules*. **2019**, 9(7).
- [5] Samec, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2019**, 145(7): 1665–1679.
- [6] Ghorbani, *J. Tradit. Complement. Med.* **2017**, 7(4): 433–440.
- [7] Hosseini, *Avicenna J. Phytomed.* **2015**, 5(2): 84–97.
- [8] de Faria Lainetti, *Pharmaceutics*. **2020**, 12(12): 1193.
- [9] Mazurakova, *J. Adv. Res.* **2023**, S2090-1232(23)00066-8.
- [10] Mazurakova, *EPMA J.* **2022**, 13(2): 315–334
- [11] Romanowska a Joshi, *Genes*. **2019**, 10(2).
- [12] Zeinali, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2019**, 109: 195–207.
- [13] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20: 1749.
- [14] Kubatka, *Molecules*. **2020**, 25(6): 1399.
- [15] Mansoori, *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. **2017**, 93: 95–102.
- [16] Zadeh, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. **2015**, 18(12): 1209–1214.
- [17] Samec, *Biomolecules*. **2019**, 9(12): 829.

Analýza účinku *Salvia officinalis* L. na vybrané nádorové parametre v modeli mamárnej karcinogenézy *in vivo*

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

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

Abstract

Alarming statistics on breast cancer incidence and mortality highlight the crucial need for effective preventive strategies. Current cancer research describes potent anti-neoplastic capacity of naturally occurring phytochemicals present in whole plants *via* the capability to modulate each of the multistep process of carcinogenesis. The aim of our experiment was to analyze the effects of *Salvia officinalis* L. (sage) on selected parameters of apoptosis, proliferation, angiogenesis, and antioxidant activity in chemopreventive rat model of experimental mammary carcinogenesis. Experimental animals were divided into three groups: control group without chemoprevention, chemoprevention with sage at a concentration of 0.1 % (SAL 0.1) and chemoprevention with sage at a concentration of 1 % (SAL 1). Immunohistochemical analysis of rat tumor specimens revealed significant increase in the cytoplasmatic expression of caspase-3 by 54 % and the level of MDA by 30.5 % in SAL 1 vs. control group. Moreover, we observed significant increase in Bax / Bcl-2 ratio by 61 % and 62.5 % in both sage-treated groups when compared with control. In conclusion, we demonstrated significant anti-cancer effects of sage in chemopreventive model of experimental mammary carcinogenesis, specifically affecting parameters of apoptosis and antioxidant activity. The observed antineoplastic capacity in experimental mammary carcinogenesis is suggested to be a result of additive or synergistic effects of mixture of phytochemicals in the whole plant.

Keywords: rat, breast cancer, chemoprevention, phytochemicals, sage, apoptosis, proliferation, angiogenesis, antioxidant activity.

Úvod

Zavedenie efektívnych prístupov v manažmente nádorových ochorení, vrátane prevencie, je nevyhnutné pre pokles celosvetových trendov v incidencii a mortalite rakoviny prsníka [1, 2]. Chemopreventívny model chemicky indukovanej mamárnej karcinogenézy samíc potkanov imituje situáciu u vysoko rizikových premenopauzálnych žien [3]. Výrazný protinádorový potenciál rastlinných funkčných potravín je pravdepodobne výsledkom aktivity viacerých fytochemikálií nachádzajúcich sa v celistvej rastline [4]. Šalvia lekárska (*Salvia officinalis* L.) je významná obsahom širokého spektra fytochemikálií, vrátane flavonoidov [5]. Súčasný výskum poukazuje na sľubné protirakovinové účinky fytochemikálií nachádzajúcich sa v celistvých rastlinných potravinách, pričom mechanizmus ich účinku spočíva v možnosti ovplyvniť mnohostupňový proces karcinogenézy, a to v rámci primárnej, sekundárnej a terciárnej prevencie [2]. V priebehu experimentu sme analyzovali účinok šalvie na

vybrané parametre apoptózy, proliferácie, angiogenézy a antioxidačného účinku v chemopreventívnom experimentálnom modeli chemicky indukovanej karcinogenézy *in vivo*.

Materiál a metódy

V experimente boli použité samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley (Charles River, Nemecko) v počte 75 ks vo veku 32 - 36 dní. Zvieratá boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca (teplota 23 ± 2 °C, relatívna vlhkosť 40 – 60 %, umelý svetelný režim svetlo/tma 12 : 12 h). Následne boli zvieratá rozdelené do 3 experimentálnych skupín: kontrolná skupina bez aplikácie analyzovanej fytošubstancie v potrave (KONT), skupina s nižšou dávkou šalvie v potrave (1 g/kg) (ŠAL 0,1) a skupina s vyššou dávkou šalvie v potrave (10 g/kg) (ŠAL 1). Mamárna karcinogenéza bola indukovaná prostredníctvom chemokarcinogénu N-nitroso-N-methylurea (NMU, Sigma, Deisenhofen, Germany) aplikovaného intraperitoneálne v jednorazovej dávke (50 mg/kg hmotnosti zvieratá) v 42. postnatálnom dni. Analyzovaná fytošubstancia, *Salvia officinalis* L. (šalvia, sušená vňať, krajina a oblasť pôvodu – Slovensko, Spiš) bola zapracovaná v potrave (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Nemecko), pričom chemoprevenia začala týždeň pred indukciou karcinogenézy a trvala až do skončenia experimentu (14 týždňov). V závere experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Pri hodnotení protinádorového účinku šalvie v experimentálnom modeli mamárnej karcinogenézy samíc potkanov sme sa zamerali na imunohistochemické stanovenie vybraných parametrov apoptózy (kaspáza-3, Bax, Bcl-2), proliferácie (Ki67), angiogenézy (VEGF, VEGFR2) a antioxidačného účinku (malondialdehyd, MDA) reprezentatívnych oblastí nádorového tkaniva parafínových bločkov. Pre detekciu vybraných proteínov bola zvolená nepriama imunohistochemická metóda s použitím komerčne dostupných protilátok. Imunohistochemické farbenie (Autostainer Link 48/Hermes/) bolo zrealizované podľa odporúčaní výrobcu. Vizualizácia primárnych protilátok bola uskutočnená prostredníctvom sekundárneho detekčného systému (EnVision, Dual Link System-HRP, cat. No. K060911, Dako North America, Carpinteria, CA, USA) s použitím diaminobenzidín tetrahydrochloridu ako substrátu. Následne boli reprezentatívne oblasti rezov tkaniva nasnímané a analyzované pri 400-násobnom zväčšení (Olympus BX41N). Expresia proteínov bola kvantifikovaná ako priemerná percentuálna hodnota antigén pozitívnych oblastí v štandardných poliach ($0,5655 \text{ mm}^2$) nádorových "hot spot" oblastí. Digitálne zábery boli ďalej analyzované morfometricky s použitím softvéru QuickPhoto Micro, verzia 3.1 (Promicra, Praha, Česká republika). Antigén pozitívne oblasti boli vyhodnotené prostredníctvom fázovej analýzy so štandardnými prahovými hodnotami pre slabú, miernu a silnú intenzitu imunoreaktivity. Experimenty boli schválené Etickou komisiou JLF UK (No. EK12/2022) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. 5056-3/2022-220).

Výsledky

Šalvia signifikantne zvýšila cytoplazmatickú expresiu kaspázy-3 o 54 % (ŠAL 1, $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou (KONT). Taktiež sme účinkom šalvie pozorovali signifikantné zvýšenie pomeru Bax/Bcl-2 o 61 % (ŠAL 0,1, $p < 0,05$) a 62,5 % (ŠAL 1, $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou (KONT). Šalvia vo vyššej dávke (ŠAL 1) tiež signifikantne znížila hladinu MDA o 30,5 % v porovnaní s kontrolnou skupinou (KONT). Ďalej sme pozorovali nesignifikantné zníženie expresie Ki67 účinkom šalvie o 20,5 % (ŠAL 0,1, $p = 0,08$) a 21,5 % (ŠAL 1, $p = 0,063$) v porovnaní s kontrolou. Parametre angiogenézy (VEGF a VEGFR-2) sa po chemoprevencii

šalviou v porovnaní s kontrolnou skupinou signifikantne nezmenili. Kvantifikácia účinku šalvie na úroveň expresie sledovaných parametrov apoptózy, proliferácie, angiogenézy a antioxidačnej aktivity v mamárnych nádorových bunkách potkanov je zobrazená na obrázku 1.

Diskusia a záver

Súčasný výskum poukazuje na regulačný potenciál fytochemikálií v nádorovom procese sprostredkovaný moduláciou kľúčových mechanizmov iniciácie, promócie a progresie karcinogenézy, vrátane procesov apoptózy, proliferácie, angiogenézy či oxidačného poškodenia [3]. Programovaná bunková smrť alebo apoptóza môže byť indukovaná vnútornou alebo vonkajšou dráhou [6]. V rámci nášho experimentu sme analyzovali účinok šalvie na vnútornú, mitochondriami sprostredkovanú signalizáciu programovanej bunkovej smrti, a to konkrétne hodnotením účinku šalvie na kaspázu-3, pro-apoptotický proteín Bax a anti-apoptotický proteín Bcl-2. V závere experimentu sme vplyvom šalvie zaznamenali signifikantné zvýšenie expresie kaspázy-3 o 54 % pri vyššej dávke šalvie v porovnaní s kontrolnou skupinou. Taktiež sme pozorovali signifikantné zvýšenie pomeru Bax / Bcl-2 účinkom šalvie o 61 % pri nižšej dávke a o 62,5 % pri vyššej dávke v porovnaní s kontrolou.

Nekontrolovaná proliferácia patrí medzi ďalšie procesy asociované s karcinogénou. Bunková signalizácia pozmenená nádorovým procesom vedie k nadmernej proliferácii a obchádzaniu signálov, ktoré za normálnych okolností regulujú bunkový cyklus [7]. Jadrový proteín Ki67 je považovaný za vhodný marker proliferácie, nakoľko je asociovaný s aktívnymi fázami bunkového cyklu [8]. V našom experimente sme zaznamenali tendenciu k poklesu Ki67 účinkom šalvie v oboch dávkach, avšak tieto zmeny neboli preukázané ako signifikantné.

Nerovnováha medzi antioxidačnými mechanizmami a reaktívnymi formami kyslíka vedie k zvýšenému oxidačnému stresu [9] a teda k poškodeniu bunkových štruktúr, vrátane proteínov, lipidov a DNA [10]. Malondialdehyd (MDA) je najčastejším markerom oxidačného poškodenia lipidov [11]. Výsledky nášho experimentu preukázali signifikantné zníženie hladiny MDA o 30,5 % v skupine s vyššou dávkou šalvie v porovnaní s kontrolou.

Naše výsledky potvrdili protinádorový účinok šalvie, a to konkrétne prostredníctvom ovplyvnenia expresie vybraných parametrov apoptózy a antioxidačného účinku v experimentálnej mamárnej karcinogénze *in vivo*. Výsledky hodnotenia protinádorových účinkov šalvie sú v súlade s nedávnymi výsledkami našej pracovnej skupiny, kedy sme preukázali signifikantné antineoplastické účinky aj ďalších rastlinných funkčných potravín v rovnakom modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy (napr. listy mladého jačmeňa, zmes šupiek tmavého ovocia, oregano, klinček, škoric, sumac) [3, 12, 13]. Potenciál využitia celistvých rastlín charakterizovaných obsahom širokého spektra fytochemikálií spočíva predovšetkým v kontexte primárnej prevencie z dôvodu významnej protirakovinovej aktivity, jednoduchej dostupnosti a nízkej toxicity. Chemopreventívne vlastnosti fytosubstancií je taktiež možné využiť v manažmente nádorových ochorení v súlade s aktuálnym trendom prediktívneho, preventívneho a personalizovaného prístupu.

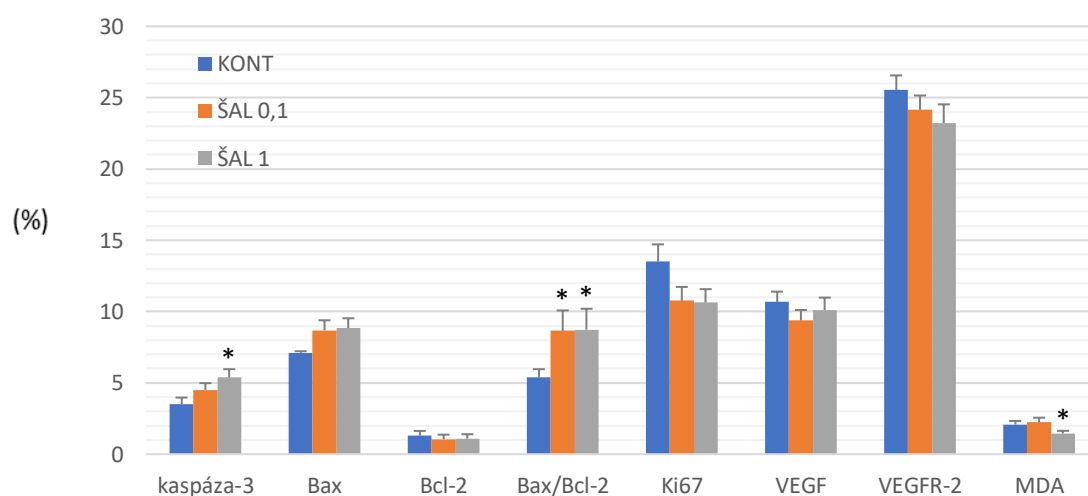
Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0045/23.

Literatúra

- [1] Sung, CA: *A Cancer Journal for Clinicians*. **2021**, 71: 209–249.
- [2] Mazurakova, *EPMA Journal*. **2022**, 13: 315–334.
- [3] Kubatka, *Univerzita Komenského v Bratislave*, **2017**, 204 s., ISBN 978-80-223-4373-2

- [4] Alsamri, *Antioxidants*. **2021**, 10: 73.
 [5] Hosseini et Ghorbani, *Avicenna Journal of Phytomedicine*. **2015**, 5: 84–97.
 [6] Kubatka, *European Journal of Nutrition*. **2016**, 55: 955–965.
 [7] Fouad, *American Journal of Cancer Research*. **2017**, 7: 1016–1036.
 [8] Richardse, *PLoS ONE*. **2017**, 12: e0186852.
 [9] Griňan-Lison, *Antioxidants*. **2021**, 10: 205.
 [10] Kumari, *Biomarker Insights*. **2018**, 13: 1177271918755391.
 [11] Skoie, *Archives of Dermatological Research*. **2019**, 311: 299–308.
 [12] Kubatka, *Molecules*. **2020**, 25: 1399.
 [13] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 22: 183.

Pozitívne bunky karcinómu



Obrázok 1 Imunohistochemické hodnotenie účinku šalvie na expresiu vybraných parametrov apoptózy (cytoplazmatická kaspáza-3, Bax a Bcl-2), proliferácie (Ki67), angiogenézy (VEGF a VEGFR-2) a antioxidačného účinku (MDA) mamárnych nádorových buniek samíc potkanov. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetické priemery \pm SEM. KONT – kontrolná skupina, ŠAL 0,1 – skupina so šalviou aplikovanou v nižšej dávke, ŠAL 1 – skupina so šalviou aplikovanou vo vyššej dávke. Signifikančný rozdiel: * $p < 0,05$

Chemopreventívny účinok fytochemikálií obsiahnutých v *Salvia officinalis* L. asociovaný s reguláciou metylácie génových promótorov v modeli mamárnej karcinogenézy *in vivo*

Samec, M.¹, Dvorská, D.², Braný, D.², Mazuráková, A.³, Koklesová, L.⁴, Péčová, R.¹, Péč, M.⁵, Kubatka, P.⁵

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej fyziológie, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ⁵Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin
marek.samec@uniba.sk

Abstract

Phytochemicals are widely distributed bioactive compounds in plants exerting various beneficial impacts on human health through modulating molecular cascades, which are altered in the pathological cancer phenotype. Recent evidence has identified numerous phytochemicals as modulators of critical components of epigenetic mechanisms, including DNA methylation. The main aim of our experimental study was to evaluate the potential chemopreventive effect of *Salvia officinalis* via the modulation of methylation in promoter regions of 5 genes (*RASSF1*, *TIMP3*, *PITX2*, *ATM*, *PTEN*) in an animal model of mammary carcinogenesis. Animals in our study were divided into three groups (control group, chemoprevention at a concentration of 0.1 %, and chemoprevention at a concentration of 1 %). Our observation revealed a dose-dependent decrease in methylation of *ATM* promoter region by 54.3% ($P < 0,05$) in the group with a lower concentration of *Salvia officinalis* L. and by 61,7% ($P < 0,01$) in the group with a higher concentration of *Salvia officinalis* L. compared to the control group. Moreover, we identified a decrease in methylation of the *PTEN* promoter region by 96,6% ($P < 0,01$) in the group with a higher concentration of *Salvia officinalis* L. compared to the control group. In conclusion, our results show the potential chemopreventive effect of *Salvia officinalis* L. via modulation of DNA methylation contributing to breast cancer development.

Keywords: phytochemicals, methylation, epigenetics, rats, salvia

Úvod

Rakovina prsníka je charakterizované ako multifaktoriálne ochorenie, ktoré predstavuje najčastejšie diagnostikovanú malignitu v ženskej časti populácie s ročným prírastkom takmer 2 000 000 nových prípadov a je zodpovedné za úmrtie približne 620 000 pacientov s týmto ochorením celosvetovo [1]. Rozvoj rakoviny prsníka predstavuje kaskádu dejov, ktoré ovplyvňujú genetické ako aj epigenetické zmeny, pričom v prípade epigenetických alterácií nedochádza k zmene poradia nukleotidov DNA. Epigenetické zmeny sú asociované so zníženou funkciou tumor-supresorových génov, prípade sú zodpovedné za aktiváciu onkogénov. Epigenetické mechanizmy predstavujú zmeny metylácie CpG dinukleotidov v promótorových oblastiach génov, chemické modifikácie histónov a RNA interferenciu regulujúcu expresiu génov na posttranskripčnej úrovni [2]. Práve regulácie metylácie DNA predstavuje zásadný epigenetický mechanizmus v iniciácii, promócii a progresii nádorového ochorenia.

Správna kontrola metylácie DNA nie je kľúčová len pre reguláciu génovej expresie, ale zahŕňa aj zachovanie integrity genómu a moduláciu imunitnej odpovede [3].

Využitie syntetických, prírodných alebo biologických látok na redukciu výskytu rakoviny u zdravých jedincov je definované ako chemoprevenca. Chemopreventívne látky inhibujú rozvoj rakoviny rôznymi mechanizmami ako je predchádzanie poškodenia DNA, ktoré vedie k rozvoju malígnej transformácie buniek, prípadne zvrátením alebo blokovaním delenia premalígnych buniek s poškodenou DNA [4]. Neustály nárast nových prípadov malígnych ochorení prsníka, zlyhávanie konvenčnej chemoterapie a jej nadmerná toxicita si vyžaduje aplikáciu nových prístupov [5]. Pozitívny účinok chemoprevenencie rakoviny prsníka bol preukázaný po aplikácii tamoxifénu, kde bol preukázaný výrazný pokles rozvoja invazívnej formy nádorového ochorenia [6]. Fytochemikálie ako sekundárne metabolity rastlín preukázali signifikantný inhibičný účinok proti karcinogénne, čo poukazuje na chemopreventívny potenciál týchto rastlinných produktov v supresii iniciácie a promócie malígnej transformácie [7]. Z toho dôvodu bolo cieľom predkladanej štúdie analýza modulačného účinku *Salvia officinalis* L. na zmenu úrovne metylácie DNA promótorových oblastí tumor-supresorových génov asociovaných s iniciáciou a promóciou mamárnej karcinogénne.

Materiál a metódy

Animálne modely a indukcia karcinogénne

V našom experimente boli použité samice potkana kmeňa Sprague-Dawley (n=60) (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Nemecko) vo veku 30-34 dní a telesnou hmotnosťou 115-140 g. Zvieratá boli aklimatizované v štandardných podmienkach vo viváriách (teplota prostredia 23 ± 2 °C) s relatívnou vlhkosťou vzduchu 30 – 60 % s umelým režimom svetlo/tma (L/D 12 : 12 h). Svetlo sa spúšťalo automaticky o 7:00 ráno. Karcinogénna sa u potkanoch indukovala aplikovaním N-nitroso-N-methylurey (NMU, Sigma, Deisenhofen, Nemecko). NMU je priame alkylačné činidlo, ktoré nevyžaduje metabolickú aktiváciu a preto predstavuje optimálny topický a účinný karcinogén pre podobné typy experimentov. NMU bola podaná potkanom intraperitoneálne v jednorazovej dávke 50 mg/kg telesnej hmotnosti v 42. deň postnatálneho vývoja. V rámci chemopreventívnej experimentálnej štúdie sme použili rastlinu *Salvia officinalis* L. (šalvia). Chemoprevenca šalviou začala týždeň pred aplikáciou karcinogénu a trvala 15 týždňov. Šalvia bola podávaná v dvoch koncentráciách a to konkrétne 1 g/kg potravy (0.1 %, čo predstavuje nižšiu koncentráciu šalvie v potrave) a 10 g/kg potravy (1 %, čo predstavuje vyššiu koncentráciu šalvie v potrave). Zvieratá boli rozdelené do troch skupín a to: 1) kontrolná skupina bez chemoprevenencie; 2) chemoprevenca šalviu v koncentrácii 0.1 %; 3) chemoprevenca s fytofarmakom v koncentrácii 1 %. Váženie a palpácia zvierat prebiehala kontinuálne každý týždeň počas experimentu a bola zaznamenávaná prítomnosť, počet a veľkosť každého palpovaného nádoru.

Pitva zvierat odber a procesovanie nádorového tkaniva pre ďalšie analýzy

Posledný týždeň experimentálnej štúdie boli zvieratá usmrtené a bolo im odobraté nádorové tkanivo na ďalšie analýzy. Tkanivo určené na analýzu metylačného profilu bolo odobraté do 1,5 ml skúmavky a uskladnené na ľade z dôvodu prevencie prípadnej degradácie DNA v natívnom tkanive. Následne boli takto odobrané tkaniva uskladnené v hlboko-mraziacom boxe pri teplote – 80 °C do samotnej izolácie DNA. Samotné nádorové tkanivo muselo byť pred samotnou izoláciou homogenizované, čo predstavuje esenciálny krok pred samotnou izoláciou nukleových kyselín z nádorovej masy. Homogenizácia prebiehala na zariadení TissueLyser LT (Qiagen, Nemecko). V našom

experimente sme nádorové tkanivo s hmotnosťou 50 – 100 mg spolu s oceľovými guľičkami s priemerom 5 mm (Qiagen, Nemecko) vložili do predchladenej skúmavky. Ku vzorkám sme pridali 200 µl lyzačného pufru (Qiagen, Nemecko), vložili do zariadenia TissueLyser LT (frekvencia vibrovania 50 Hz) pokiaľ nebolo tkanivo úplne rozrušené.

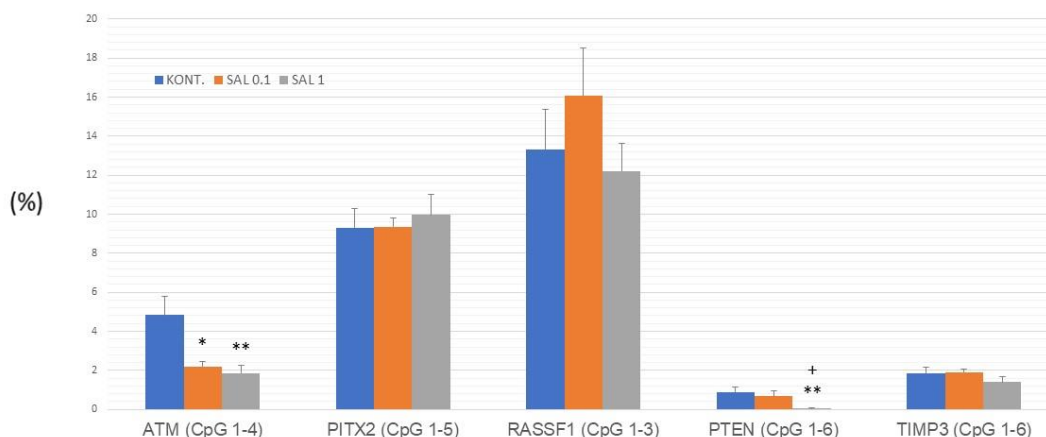
Spracovanie DNA a analýza metylácie DNA

Následný homogenát bol ďalej použitý na samotnú izoláciu DNA pomocou komerčného kitu DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Nemecko), pričom sme postupovali podľa protokolu, ktorý je súčasťou kitu. Koncentrácia vyizolovanej DNA sa stanovila pomocou spektrofotometra NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific). Na následnú bisulfidovú konverziu sme použili komerčne dostupný EpiTect Bisulfite kit (Qiagen, Nemecko). DNA so vstupnou koncentráciou 50 ng/µl sme konvertovali pomocou protokolu odporúčaného výrobcom. Následná kvantifikácia metylácie promótorových oblastí tumor supresorových génov zahŕňala amplifikáciu sledovaných oblastí DNA pomocou kitu PyroMark PCR (Qiagen, Nemecko). Na analýzu metylácie sme použili preddizajnované eseje na stanovenie metylačného statusu piatich génových promótorov (*RASSF1*, *TIMP3*, *PITX2*, *ATM*, *PTEN*) (PyroMark CpG assay, Qiagen, Nemecko). Detekcia úrovne metylácie bola realizovaná na zariadení PyroMark Q96 ID System (Qiagen, Germany) s použitím PyroMark Gold Q96 Reagents. Na vyhodnotenie bol použitý komerčný software PyroMark Q96 software version 2.5.8 (Qiagen, Germany). Experimenty boli schválené Etickou komisiou JLF UK (No. EK12/2022) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. 5056-3/2022-220).

Výsledky

V rámci pyrosekvenačnej analýzy na stanovenie detekcie metylačného profilu CpG dinukleotidov lokalizovaných v oblastiach génových promótorov sme hodnotili celkovo 60 vzoriek mamárneho karcinómu odobratého z troch experimentálnych skupín zvierat, aby sme stanovili hodnotu metylácie v génoch *ATM* (1-4 CpG), *PITX2* (1-5 CpG), *RASSF1* (1-3 CpG), *PTEN* (1-6 CpG) a *TIMP3* (1-6 CpG). Šalvia aplikovaná v nižšej dávke signifikantne znížila metyláciu promótoru génu *ATM* o 54.3% (* $P < 0.05$) a vo vyššej dávke o 61,7% (** $P < 0.01$) v porovnaní s kontrolnou skupinou bez chemoprevenencie. V prípade génu *PTEN* šalvia signifikantne znížila metyláciu CpG dinukleotidov v promótorovej oblasti o 96,6% (** $P < 0.01$) v tkanivách odobratých zo zvierat kŕmených vyššou koncentráciou fytošubstancie v porovnaní s kontrolnou skupinou (obr.1).

Metylácie génových promótorov



Obrázok 1 Úroveň metylácie promótorov tumor-supresorových génov *ATM*, *PITX2*, *RASSF1*, *PTEN* a *TIMP3* - efekt šalvie

V každom géne bol analyzovaný príslušný počet CpG dinukleotidov (*ATM*-4; *PITX2*-5; *RASSF1*-3; *PTEN*-6; *TIMP3*-6). V rámci každého génu bol hodnotený stupeň metylácie medzi kontrolnou skupinou a skupinami s aplikovanými fytosubstanciami. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetické priemery \pm SEM. Signifikantný rozdiel, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. CONT, + $P < 0.05$ vs. SAL 0.1

Diskusia a záver

Nádorové ochorenia je možné definovať ako nekontrolovateľný rast a proliferáciu buniek. Akumulácie genetických a epigenetických alterácií sú jednou zo základných charakteristík nádorovej transformácie [8]. Veľké množstvo predklinických aj klinických štúdií poukazujú na zásadný dopad epigenetických zmien v rozvoji malígnej transformácie [3, 9, 10]. Hypermetylácie tumor supresorových génov je epigenetickým procesom asociovaným so stratou funkcií týchto génov, čo vo výsledku vedie ku zníženiu ich exprese [11]. V našej štúdii sme sa zamerali na analýzu metylácie piatich tumor-supresorových génov *ATM*, *PITX2*, *RASSF1*, *PTEN* a *TIMP3*, ktorých zvýšená úroveň metylácie v promótorových oblastiach predstavuje zlý prognostický marker pre pacientov s rakovinou prsníka [12–15]. Analýza metylácie odhalila signifikantný pokles metylácie CpG dinukleotidov v géne *ATM*. Produkt tohto génu je dôležitý pre kontrolu bunkového cyklu a reguluje ďalšie down-stream proteíny vrátane tumor supresorových proteínov p53, BRCA1, checkpoint kinázy CHK2, ako aj ďalšie proteíny zapojené v bunkovom cykle [16]. Mutácie v tomto géne a znížená expresia vedie k rozvoju rádio/chemo rezistencie nádorov [17]. V našej experimentálnej štúdii sme zaznamenali signifikantný pokles metylácie v oboch liečených skupinách (SAL 0.1 a SAL 1) v porovnaní s kontrolou. Obdobné výsledky sme získali aj v našich predošliých expertízach, kde tymián znížil metyláciu génu *ATM* v animálnom modeli mamárnej karcinogenézy [18]. Rovnako aj v minulých experimentoch *in vivo* s aplikáciou škorice a sumachu ako chemopreventívnych látok sme zaznamenali signifikantný pokles metylácie génu *ATM* [19, 20]. V prípade hodnotenia génu *PTEN* sme detegovali signifikantné zníženie metylácie v skupine s vyššou dávkou šalvie. Produkt génu *PTEN* je rovnako ako *ATM* zapojený v regulácii bunkového cyklu a tiež v indukcii bunkovej smrti a stimulácii bunkovej proliferácie. Podobný výsledok sme zaznamenali aj v našich experimentoch s využitím rovnakého animálneho modelu po

aplikácii sumachu a tymiánu, kde sme identifikovali signifikantný pokles metylácie na analyzovaných CpG dinukleotidoch v promótorovej oblasti génu *PTEN* [18,19]. V prípade ostatných génov sme nezaznamenali žiadne signifikantné rozdiely v metylácii medzi testovanými skupinami. Naše výsledky poukázali na pozitívny chemopreventívny účinok bioaktívnych zložiek obsiahnutých v šalvii, ktorý bol sprostredkovaný moduláciou metylácie promótorových oblastí tumor supresorových génov v animálnom modeli mamárnej karcinogenézy *in vivo*.

Za technickú podporu ďakujeme doc. RNDr. Zore Lasabovej, PhD. a Ústavu molekulárnej biológie a genomiky JLF UK.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0045/23.

Literatúra

- [1] Abu Samaan, *Biomolecules*. **2019**, 9: 789.
- [2] Baylin, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, 8: a019505.
- [3] Lakshminarasimhan, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, 945: 151–72.
- [4] Ranjan, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20: 4981.
- [5] Nurgali, *Front. Pharmacol.* **2018**, 22;9: 245.
- [6] Nazarali, *Breast Cancer Targets Ther.* **2014**, 6: 29–36.
- [7] Amawi, *Chin. J. Cancer*. **2017**, 36: 50.
- [8] Dawson, *Cell*. **2012**, 150: 12–27.
- [9] Abba, *Cancer Lett.* **2017**, 387: 84–94.
- [10] Alam, *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, 72: 4577–92.
- [11] Jasek, *Biomolecules*. **2019**, 9(7).
- [12] Li, *Biosci. Rep.* **2019**, 39: BSR20190923.
- [13] Zhang, *Oncol. Lett.* **2013**, 6: 161–168.
- [14] Maleva Kostovska, *Pathol. Oncol. Res. POR.* **2018**, 24: 937–40.
- [15] Pouliot, *Anticancer Res.* **2015**, 35: 4569–74.
- [16] Stucci, *Genes*. **2021**, 12: 727.
- [17] Yan, *Medicine (Baltimore)*. **2020**, 99: e18823.
- [18] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20: 1749.
- [19] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 22.
- [20] Kubatka, *Mol. Basel. Switz.* **2020**, 25: 1399.

Vplyv alkoholu na vyvíjajúce sa vtáče embryo

Tirpáková, Z.¹, Demčišaková, Z.², Petrovova, E.², Luptáková, L.², Pokorná, B.²

¹Univerzita Veterinárskeho lekárstva v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice ²Univerzita Veterinárskeho lekárstva v Košiciach, Katedra morfológických disciplín, Košice
zuzana.tirpakova@student.uvlf.sk

Abstract

Alcohol (ethanol) is a widely used organic compound in various industries. Consumption of alcohol and its effect on living organism is associated with an increased risk of several diseases and conditions. Alcohol consumption during the pregnancy can lead to lifelong consequences for the fetus, also referred to as fetal alcohol syndrome (FAS). Given the legislative of European Union regarding the use of alternative methods for testing, we observed the toxic effects of ethanol on the developing chicken embryo during the period of organogenesis. Total of 144 chicken eggs were used in the experiment. The eggs were divided into two groups for 24 hour (24H) and 48 hour (48H) observation after ethanol application. Different concentration of ethanol (5%, 10%, 15%, 20%) were applied on the *membrana papyracea* of the embryo. The weight of the embryo and morphological changes were observed during the study. Comparing the groups of 24H and 48H, longer exposure of alcohol on the chicken embryos proved to be a factor in a decrease of the weight of the embryo. Due to a comparable similarity of chicken embryos to human embryos, the avian embryo provides a useful tool for hypothesis testing and identifying potential mechanisms of ethanol activity and provide a cost and time-effective *in vivo* model system.

Keywords: avian embryo, alcohol, embryotoxicity

Úvod

Alkohol je celosvetovo zaradený medzi najrozšírenejšiu drogu. Škodlivé účinky spojené s požívaním alkoholu počas tehotenstva a jeho vplyv na fetálny vývin, známe aj ako fetálny alkoholový syndróm (FAS) sa spájajú s následným celoživotným postihnutím ovplyvnených jedincov [1]. Vzhľadom na súčasnú legislatívu Európskej únie, smernicu 2010/63/EU, ktorej zámerom je obmedzenie počtu zvierat na vedecké účely, je prechod k alternatívnym metódam testovania nevyhnutnosťou [2]. Legislatíva vyzdvihuje implementáciu tzv. 3R – redukcia, zjemnenie a nahradenie experimentálnych zvierat vo vede a to alternatívnymi modelmi, resp. nižšími organizmami [3]. Vtáče embryá, ako alternatívny model na testovanie, sú využívané pre štúdium v oblasti vývojovej biológie a vývojových procesov a teda vhodným modelom pre štúdium FAS [4].

Materiál a metodika

Inkubácia a aplikácia etanolu

Na experimentálnu prácu bolo použitých 144 kuracích vajec. Inkubácia prebiehala pri 37,5 °C ± 0,5 °C a 60 % vlhkosti v automatickej liahni (COVINA ET 49, Taliansko). Škrupina vajec bola pred začiatkom experimentu očistená 70% etanolom. Pre experiment boli vytvorené dve skupiny na základe dĺžky pôsobenia alkoholu. V prvej skupine bola doba pôsobenia alkoholu 24 hodín (24H) a v druhej skupine 48 hodín (48H). Na embryonálny deň (ED) 7 a ED8 bola u oplodnených vajec prevedená aplikácia etanolu *in ovo* na povrch podškrupinovej membrány (*membrana papyracea*), podľa skupín s koncentráciou alkoholu - 0%, 5%, 10%, 15%, 20%.

Odber vzoriek

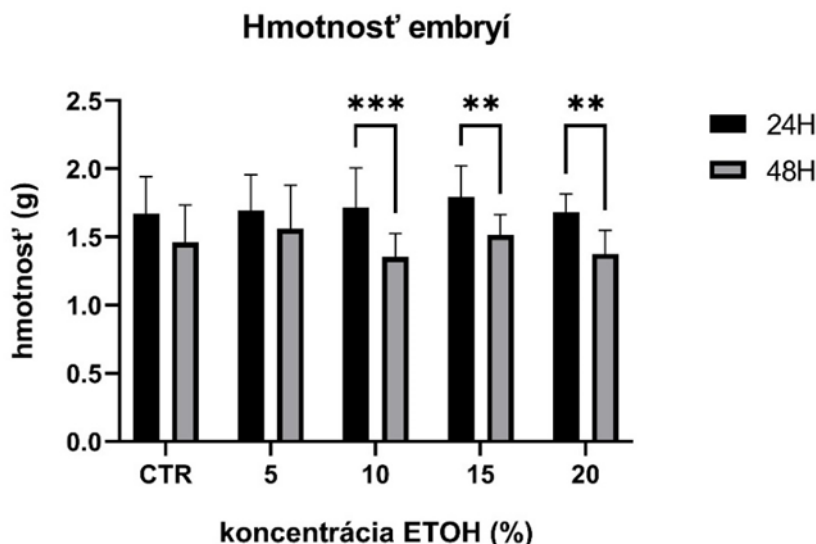
Odber vzoriek bol vykonaný 24 hodín (aplikácia etanolu na ED8) po aplikácii a 48 hodín po aplikácii (aplikácia etanolu na ED8) etanolu. Každé embryo bolo vybrané zo škupiny, odvážené, sledované boli morfológické zmeny na tele.

Štatistická analýza

Štatistické vyhodnotenie vzoriek prebehlo za využitia štatistického programu GraphPad Prism 9.5.0 (dvojcestná ANOVA; Sidak test – hmotnosť embryí). Pre stanovenie prežívateľnosti embryí bol použitý Logrank Mantel-Cox test a Gehan-Breslow-Wilcoxon test.

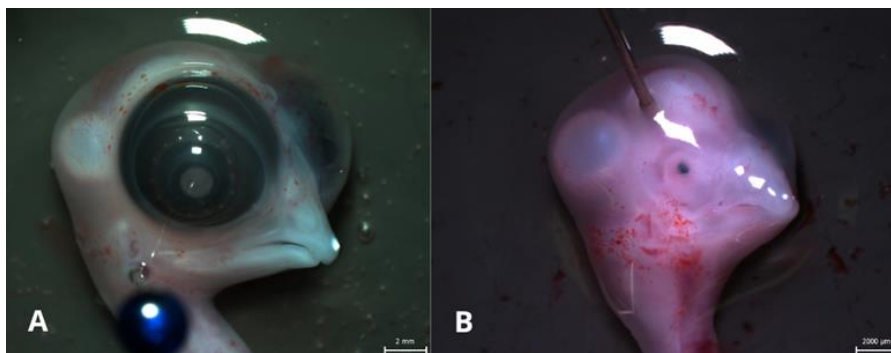
Výsledky

Pri sledovaní hmotností embrya boli zaznamenané rozdiely medzi skupinami spôsobením etanolu po dobu 24H a 48H. Signifikančné rozdiely boli pozorované pri koncentráciách 10%, 15% a 20% etanolu (obr. 1). Pri koncentrácii etanolu 10% boli priemerné hmotnosti 1,713 g (24H) a 1,353 g (48H). V prípade 15% etanolu sa jednalo o 1,793 g (24H) a 1,516 g (48H) a 20% etanolu 1,679 g (24H) a 1,376g (48H). Z výsledkov je zrejmé, že pôsobenie alkoholu malo vplyv na celkovú hmotnosť vyvíjajúceho sa embrya.



Obrázok 1 Porovnanie hmotností embryí pri 24 a 48 hodinovom pôsobení alkoholu

Zrejmé boli aj morfológické zmeny na embryách. V kontrolnej skupine 48H bola pozorovaná monoftalmia v prípade 48H pôsobenia 20% alkoholu bola pozorovaná anoftalmia (obr. 2).



Obrázok 2 Porovnanie vývinu očí. A: Kontrolná skupina 48H. B: Experimentálna skupina 20%-48H

Diskusia

Publikácie opisujú spomalenie embryonálneho vývoja vplyvom zvýšenej koncentrácie etanolu. Potvrdené boli zmeny vo vývojových štádiách embryí - kontrolná skupina preukázala vyššie vývojové štádium (štádium HH 40) v porovnaní s embryami s aplikovaným 15% etanolom (štádium HH 34). V literatúre opisujú ďalšie morfológické zmeny vo vývoji, pri ošetrovaní 15% etanolom končatiny embryí vykazovali neúplný segmentovaný vývoj kostí a chrupiek [4]. Spomalenie vývoja bolo v našom prípade potvrdené nižšou celkovou hmotnosťou embryí po vystavení účinkom etanolu oproti kontrolnej skupine, hmotnosť kontrolnej skupiny (48H) bola 1,46 g, pričom pri pôsobení najvyššej koncentrácie alkoholu (20%) priemerná hmotnosť klesla na 1,376g. V inej štúdii boli pozorované účinky etanolu pri koncentráciách 0%, 5%, 15% na skoré vývinové štádiá kuracieho embrya. Etanol významne ovplyvnil telesnú dĺžku embrya pri koncentracii 10% a 15%, pozorované boli aj zmeny v obvode hlavy a telesnej hmotnosti oproti kontrolnej skupine. Medzi samotnými jedincami v skupinách nepozorovali väčšie rozdiely, rozdiel bol však pozorovaný medzi kontrolnou skupinou (1,58g) a 15% etanolom (1,2g) [5]. Podobne, v našom experimente sme nezaznamenali výrazné zmeny v telesných hmotnostiach embryí v rámci jednotlivých časových skupín, ale medzi týmito časovými skupinami. Výsledky naznačujú, že dlhšie pôsobenie alkoholu na embryo ovplyvňuje telesnú hmotnosť.

Záver

V predkladanej štúdii sme pozorovali účinok jednorazovej dávky etanolu o rôznej koncentrácii na vyvíjajúce sa kuracie embryo. Najväčšie rozdiely boli pozorované medzi časovými skupinami (24H/48H). Známe je prepojenie embryotoxicity etanolu medzi kuracím a ľudským embryom, a to konkrétne na vznik FAS u detí po požití alkoholu matkou počas tehotenstva. Práve kuracie embryo bolo prvým experimentálnym modelom, pri ktorom bola preukázaná teratogenita alkoholu. Farmakologicky relevantné expozície alkoholu narúšajú rast, morfogenézu a správanie kuracích embryí a výsledné fenotypy sú veľmi paralelné s fenotypmi cicavčích modelov. Dostupnosť kuracieho embrya umožnila nový pohľad na teratogénne mechanizmy alkoholu.

Práca bola podporená projektom KEGA č. 004UVLF-4/2023 a IGA UVLF 14/2023 „Štúdium angiogénnej odpovede ciev chorioalantoickej membrány vtáčieho embrya vo vzťahu k vybraným inovatívnym biomateriálom určených pre regeneračnú medicínu“.

Literatúra

- [1] Flentke and Smith, *Biochemistry and Cell Biology*. **2018**, 96(2): 98–106.
- [2] Neuhaus, *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*. **2022**, 50(6): 381–413
- [3] Doke and Dhawale, *Saudi Pharmaceutical Journal*. **2015**., 23(3): 223–229.
- [4] Fernandes, [online]. **2013**, <https://concordia.ab.ca/wp-content/uploads/2017/05/Fernandes.pdf> [cit. 2022-06-12].
- [5] Afzal, *Pure and Applied Biology (PAB)*. **2019**, 8: 882–892.

Štúdium histologickej štruktúry gonád kuracieho embrya na 9. deň inkubácie

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

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfológických disciplín, Košice
viera.almasiova@uvlf.sk

Abstract

The aim of this study was to observe normal histological structure of gonad in the chicken embryo on day 9 of incubation. We observed an indifferent stage of the gonads that consisted of straight, anastomosing gonadal cords, in which the primordial germ cells were already present. In the surrounding mesenchyme, the mesenchymal cells gradually differentiated into the stromal cells. The coelom epithelium consisted of a thick, continuous layer of proliferating columnar cells. The tunica albuginea has not yet been developed. We plan to use our observations in the pedagogical process as well as in our upcoming experiments with a WiFi radiation.

Keywords: chick embryo, development, gonads, gonadal cords

Úvod

Kuracie embryá sa doposiaľ veľmi intenzívne používajú v rámci pedagogického procesu pri výučbe predmetu embryológia, ako aj modelové systémy pre štúdie v oblasti experimentálnej embryológie. Hlavnými výhodami tohto modelového systému je ľahká dostupnosť, jednoduchá manipulácia, finančná nenáročnosť, ako aj široké možnosti kultivácie buniek a transplantácie tkanív. Aj keď sa mnohé vývojové procesy u kuracieho embrya do značnej miery zhodujú s vývojom tkanív a orgánov cicavcov, je v rámci interpretácie experimentálnych výsledkov potrebné zohľadniť niektoré špecifiká. Naším cieľom preto bolo z morfológického aspektu preštudovať vývoj gonád u kuracieho embrya pri normálnych podmienkach inkubácie. Naše pozorovania okrem použitia v pedagogickom procese plánujeme využiť aj v rámci experimentov, ktoré budú zamerané na účinky neionizujúceho elektromagnetického žiarenia na vývoj tkanív a orgánov kuracieho embrya.

Materiál a metódy

Pokus bol realizovaný na Katedre morfológických disciplín Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach. V experimente sme použili oplodnené kuracie vajcia Kury domácej (*Gallus gallus domesticus*) z certifikovaného chovu Párovské Háje (Nitra), ktoré boli inkubované v inkubátore za štandardných podmienok pri teplote 37,5° C a vlhkosti vzduchu 60 %. Na 9. deň inkubácie sme z vajec odobrali vyvíjajúce sa zárodky a následne ich spracovali štandardným postupom pre účely svetelnej mikroskopie. Vzorky sme fixovali v roztoku mDF – Modified Davidson's fluid, zaliali do paraplastu a histologické rezy ofarbili prehľadným histologickým farbením hematoxylín-eozínom (HE). Na fotodokumentáciu bol použitý svetelný mikroskop Zeiss Axio Lab A1 s kamerou Axio Cam ERc 5.

Výsledky

Na 9. deň inkubácie sme u kuracieho embrya pozorovali indiferentné štádium gonád, ktoré sa vyskytovali v tesnej blízkosti mezonefrosu. Mezonefros mal pretiahnutý tvar a svojou laterálnou plochou bol prichytený ku telovej stene. V mezonefrose boli dobre

vyvinuté mezonefrické telieska a mezonefrické kanáliky, ako aj Wolffov a Müllerov vývod (*ductus mesonephricus et paramesonephricus*). Kaudálne od mezonefrosu sa už vyskytoval aj vyvíjajúci sa základ definitívnej obličky – metanefros s typickými sférickými bunkovými zoskupeniami (obr. A).

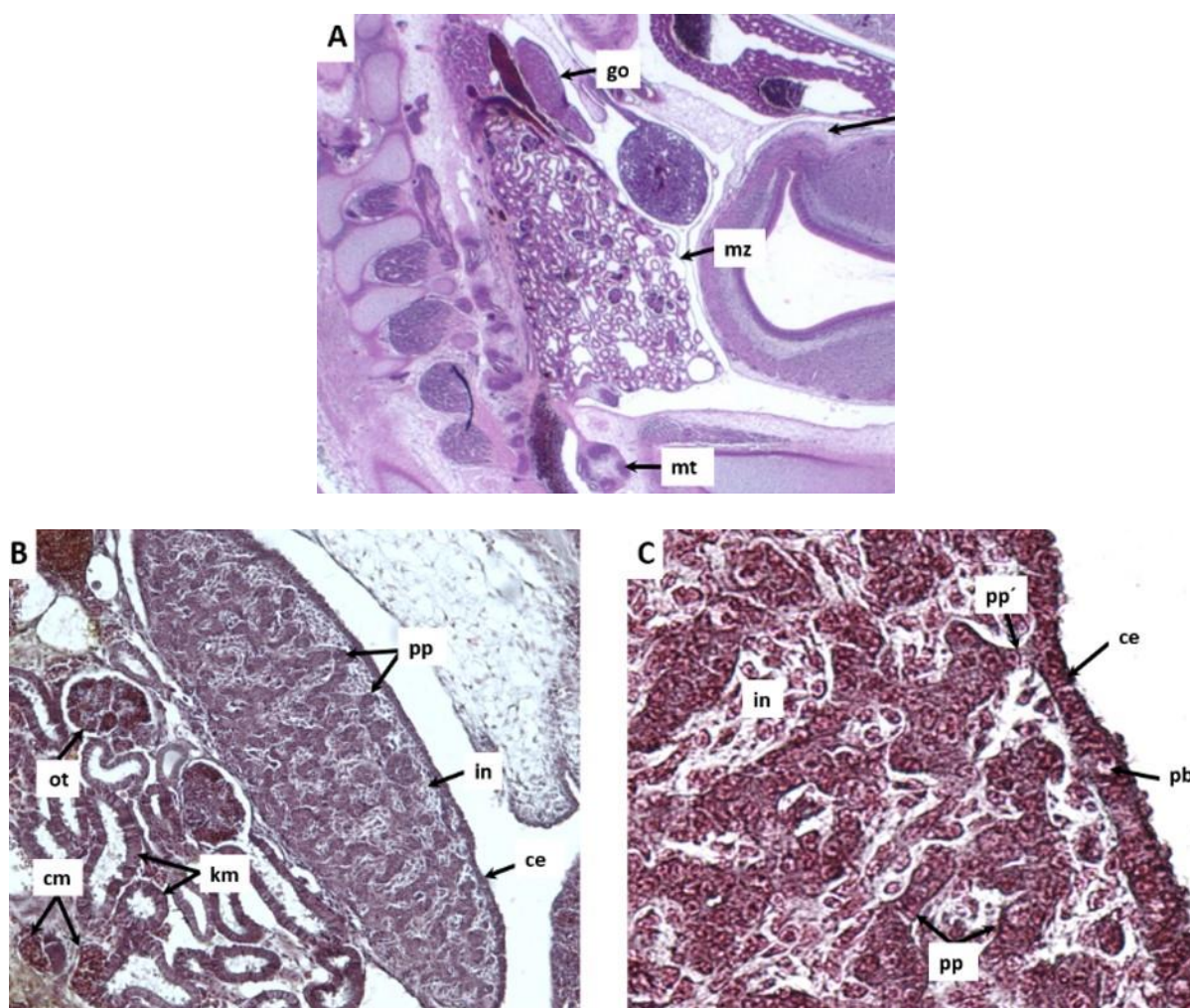
Vo vyvíjajúcich sa gonádach kuracieho embrya sme pozorovali formujúce sa pohlavné povrazce s rovným priebehom, v ktorých už boli začlenené aj prvopohlavné zárodočné bunky. Prvopohlavné zárodočné bunky boli relatívne veľké, okrúhleho tvaru s bledou cytoplazmou a tmavým jadrom. Pohlavné povrazce navzájom komunikovali a boli obklopené embryonálnym väzivom – mezenchýmom. V mezenchýme boli prítomné sieťovito usporiadané mezenchýmové bunky, ktoré sa už postupne diferencovali na bunky väzivovej strómy. Na povrchu indiferentnej gonády sa vyskytoval célomový epitel. Indiferentná gonáda bola veľkou časťou svojej laterálnej plochy priložená k mezonefrosu. V mezonefrose boli prítomné esovito postáčané kanáliky ako aj mezonefrické obličkové telieska. V ich okolí sa v mezenchýme vyskytovali veľké krvné cievy s krvinkami (obr. B).

Na povrchu gonády sme často pozorovali priame spojenia pohlavných povrazcov s célomovým epitelom. Célomový epitel pozostával z hrubej, súvislej vrstvy proliferujúcich cylindrických buniek. Väzivový obal - *tunica albuginea* ešte nebol vyvinutý (obr. C).

Diskusia

Mnohé, najmä iniciálne vývojové procesy sa u kuracieho embrya do značnej miery zhodujú s embryonálnym vývojom cicavcov. Aj preto je využitie tohto animálneho modelu pri výučbe embryológie, či v rámci rôznych experimentov veľmi obľúbenou pomôckou. Napriek tomu však v rámci embryogenézy vtákov existujú určité špecifiká, ktoré je potrebné hlavne v rámci interpretácie experimentálnych výsledkov zohľadniť. Práce zamerané na štúdium štruktúry tkanív a orgánov kuracieho embrya sú veľmi ojedinelé, a preto našim cieľom bolo preštudovať morfológický obraz vyvíjajúcich sa gonád kuracieho embrya pri bežných inkubačných podmienkach. Na 9. deň inkubácie sme u kuracích embryí zaznamenali indiferentné štádium vývoja gonády s prítomnosťou rovných, anastomozujúcich pohlavných povrazcov, ktoré v sebe niesli už aj prvopohlavné zárodočné bunky. Podobný morfológický obraz pri vývoji gonád u kuracieho embrya pozorovali aj Bellairs a Osmond [1] a Hyttel a kol. [3]. Títo autori uvádzajú, že prvotné pohlavné povrazce sa u kuracieho embrya objavujú už na 5. deň inkubácie a vznikajú proliferáciou célomového epitelu, ktorý invaduje mezenchým indiferentnej gonády. Proliferujúci célomový epitel v sebe nesie aj prvopohlavné zárodočné bunky, ktoré do peritonea v oblasti budúcej gonády primigrovali krvným obehom. Priame spojenia pohlavných povrazcov s célomovým epitelom na povrchu gonády, sme často pozorovali aj v našich preparátoch, čo je v súlade so zisteniami týchto autorov. Proliferácia pohlavných povrazcov ďalej pokračuje, čím dochádza k výraznému zväčšovaniu gonády. Kým k diferenciácii prvopohlavných buniek na spermatogónie dochádza až na 13. deň inkubácie, k diferenciácii na oogónie dochádza už skôr, a to na 7. deň inkubácie [2]. Prvopohlavné zárodočné bunky sa u vtákov objavujú už v prvom dni inkubácie (približne 18 hodín po oplodnení) v oblasti tzv. zárodkového polmesiaca na anteriórnom konci *area pellucida* a podobne ako je to u cicavcov, pochádzajú z buniek epiblastu [1, 5]. Na rozdiel od cicavcov, kde prvopohlavné zárodočné bunky amébovitým pohybom prostredníctvom filopódií priamo migrujú z extraembryonálnej mezodermy cez allantois a žltkový vak do indiferentných gonád, dochádza u vtákov k nepriamej migrácii prvopohlavných zárodočných buniek cez krvný obeh. Bunky najprv proliferujú, neskôr diapedézou

vstupujú do ciev zárodkového polmesiaca, odkiaľ sú transportované až do oblasti zadného čreva, kde približne na 3. inkubačný deň vystupujú z ciev mezenteria a mezenchýmom migrujú do indiferentnej gonády [1, 4-6]. U 9. dňového embrya sme zaznamenali relatívne vysoký počet prvopohlavných zárodočných buniek, včlenených do pohlavných povrazcov. Tieto bunky sme relatívne ľahko identifikovali podľa ich veľkosti, tvaru a charakteristík bunkového jadra rovnako ako uvádzajú aj Hyttel a kol. [3], ktorí na ich presnejšiu identifikáciu použili aj histochemickú metódu na dôkaz alkalické fosfatázy, či expresie pluripotenčného transkripčného faktora Oct4. Počas migrácie, ako aj po vstupe do gonád, prvopohlavné zárodočné bunky ešte ďalej proliferujú, avšak v pravostrannej gonáde u vtákov bunkové odumierania prevyšujú proliferáciu aktivitu, čo vedie ku značnej atrofii gonády [7]. U vtákov je preto u oboch pohlaví ľavostranná gonáda omnoho väčšia oproti pravostrannej gonáde a rovnako obsahuje aj väčší počet pohlavných buniek [8].



Obrázok Vývoj gonády kuracieho embrya na 9. deň inkubácie (HE)

A: Telová dutina kuracieho embrya s indiferentným štádiom gonády (zväčšenie 50 ×). B: Vyvíjajúca sa gonáda v tesnej blízkosti mezonefrosu (zväčšenie 200 ×). C: Detail povrchu vyvíjajúcej sa gonády s pohlavnými povrazcami (zväčšenie 400 ×)

Skratky: go – gonáda; mz – mezonefros; mt – metanefros; pp – pohlavné povrazce; pp' – bunky pohlavných povrazcov vyrastajúce z celomového epitelu; in – interstícium; ce – celomový epitel; km – kanáliky mezonefrosu; cm – ciev mezonefrosu; ot – telieska mezonefrosu; pb – prvopohlavné bunky

Záver

Cieľom našej práce bolo preštudovať histologickú štruktúru vyvíjajúcej sa gonády 9 - dňového kuracieho embrya za normálnych podmienok inkubácie. Naše pozorovania by sme chceli využiť ako zdroj poznatkov pri výučbe embryológie, ale aj v rámci plánovaných experimentov, ktoré sú zamerané na sledovanie účinkov neionizujúceho elektromagnetického žiarenia na štruktúru rôznych tkanív a orgánov vyvíjajúceho sa kuracieho embrya.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0036/22 a KEGA č. 005UVLF-4/2021.

Literatúra

- [1] Bellairs and Osmond, *Elsevier*, **2014**, s. 67–77, ISBN 978-0-12-384951-9
- [2] Gonzales-Morán, *Anat. Rec.*, **2011**, 294: 893–904.
- [3] Hyttel, *Elsevier*, **2021**, s. 252–286, ISBN 978-0-7020-2899-1
- [4] Kuwana, *Cell. Mol. Biol.* **1999**, 45: 725–736.
- [5] Noden and DeLahunta, *Williams & Wilkins*, **1985**, s. 322–330, ISBN 0-683-06545-9
- [6] Tsunekawa, *Development*. **2000**, 127: 2741–2750.
- [7] Ukeshima and Fujimoto, *Anat. Rec.* **1991**, 230: 378–386.
- [8] Villapando, *Gen. Comp. Endocrinol.* **2000**, 117: 325–334.

Vývoj nosovej dutiny vtákov

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

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfológických disciplín, Košice
sandra.andraskova@uvlf.sk

Abstract

The aim of this study was to observe the nasal cavity of chicken embryo on day 9 of incubation. The formation of the nasal cavity in the avian embryo can be divided into three phases. The first phase represents the period immediately after the formation of the primary palate, where the fusion between the medial and lateral nasal processes can be observed. The second phase involves the creation of a temporary nasal plug in the nasal vestibule and the formation of the nasal conchae. The third phase focuses on the cellular processes involved in the recanalization of the nasal vestibule, resulting in patent nasal cavities shortly before hatching. These three successive stages describe nasal cavity development in the chick embryo, including the formation, establishment and disintegration of the nasal plug. This work describes the characteristic developmental morphological features of the nasal cavity in a 9-day old chicken embryo and provides a broader view of craniofacial development in such a key model organism as the chicken embryo within the framework of developmental biology.

Keywords: chicken embryo, development, nasal cavity

Úvod

Vývoj nosovej dutiny v kuracom embryu vyžaduje obojstrannú fúziu medzi kraniofaciálnymi výbežkami, čím sa vytvorí primárne podnebie a horná čeľusť. Embryonálne nosové dutiny sa vpredu otvárajú cez párové vonkajšie nosové otvory umiestnené priamo nad zónami fúzie a sú ohraničené mediálnymi a laterálnymi nosovými výbežkami. Niekoľko dní po vytvorení nosových dutín sa mediálne a laterálne nosové výbežky spájajú, epitel medzi nimi proliferuje a vytvára dočasnú nosovú zátku (6. deň embryogenézy). Nosová zátka uzatvára nosovú predsieň počas väčšiny embryonálneho obdobia a znovu sa otvorí v čase liahnutia, kedy dôjde k jej degenerácii. Tento jav je súčasťou normálneho embryonálneho vývoja a poskytuje v rámci vývojovej biológie širší pohľad na kraniofaciálny vývoj kľúčového modelového organizmu akým je kuracie embryo.

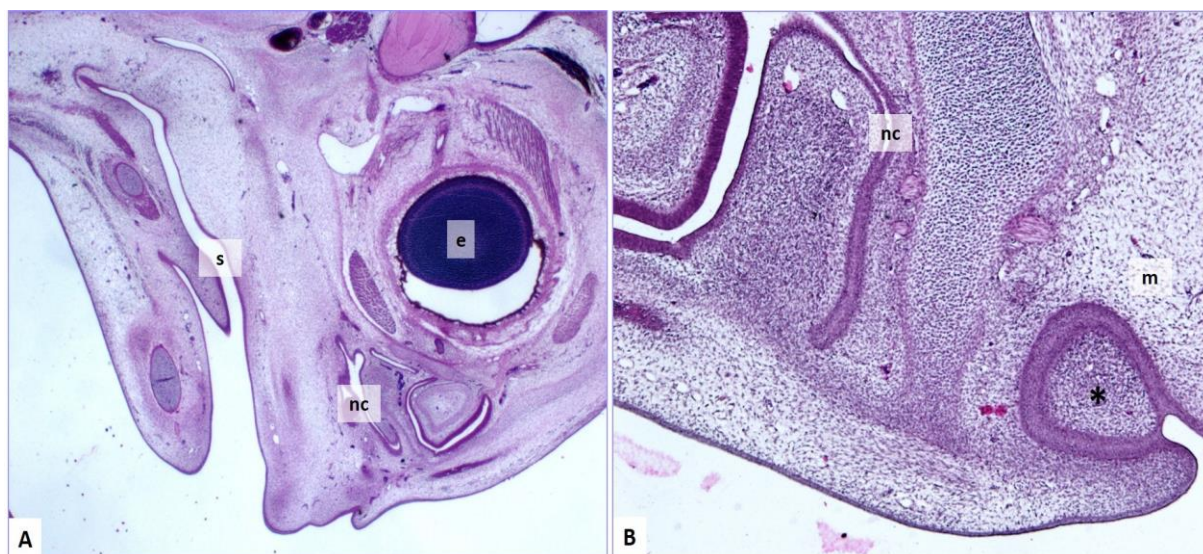
Materiál a metodika

Oplozené slepačie vajcia boli inkubované pri štandardných podmienkach (37,5°C, 60 % vlhkosť vzduchu). Na 9. deň inkubácie sme vajčka otvorili pomocou štandardných postupov. Vzorky vyvíjajúcich sa zárodkov sme po odobratí fixovali v mDF roztoku - Modified Davidson's fluid [1] a spracovali pre účely konvenčnej svetelnej mikroskopie. Na štúdium štruktúry vyvíjajúcich sa nosových dutín 9 - dňového kuracieho embrya sme použili parafínové histologické rezy s hrúbkou 7 µm ofarbené hematoxilín – eozínom. Na fotodokumentáciu bol použitý svetelný mikroskop Zeiss Axio Lab A1 a kamera Axio Cam ERc 5.

Výsledky

U 9-dňového kuracieho embrya bola vyvíjajúca sa nosová dutina ohraničená zvýšeným okrajom, tvoreným laterálnym a mediálnym nosovým výbežkom. Základ týchto výbežkov je tvorený nediferencovaným mezenchýmovým väzivom. Nosové

dutiny boli oddelené primárnym nosovým septom. Epitel laterálnej nosovej steny bol nerovnomerne hrubý a v tomto štádiu vývoja mal charakter viacvrstvého kubického epitelu. Nosová predsieň na úrovni vonkajších nosových otvorov vykazovala obštrukciu bunkovou hmotou. Jednalo sa o epitelovú nosovú zátku, ktorá spôsobuje dočasné uzatvorenie nosových dutín a je typická pre toto vývojové obdobie. Nosová zátka vzniká proliferáciou epitelu medzi mediálnymi a laterálnymi nosovými výbežkami približne na 6. deň inkubácie a pretrváva až do 14. dňa embryogenézy. Následne dochádza k jej pozvoľnej deštrukcii a opätovnému spriechodneniu nosovej dutiny. V reze bezprostredne v oblasti predsieni nosovej dutiny sme mohli pozorovať vyvíjajúcu sa rostrálnu nosovú škrupinu. V tomto štádiu sú za nosovou predsieňou viditeľné už aj stredné a kaudálne nosové škrupiny, a to vo forme výrastkov z laterálnych nosových stien do respiračnej a čuchovej časti vlastnej nosovej dutiny (obr. 1).



Obrázok 1 Mikrofotografia hlavy 9 - dňového kuracieho embrya

A: Rez na úrovni vonkajších nosových otvorov (HE, zväčšenie 100 ×). B: Prítomnosť epitelovej nosovej zátky medzi laterálnymi a mediálnymi nosovými výbežkami (HE, zväčšenie 200 ×)

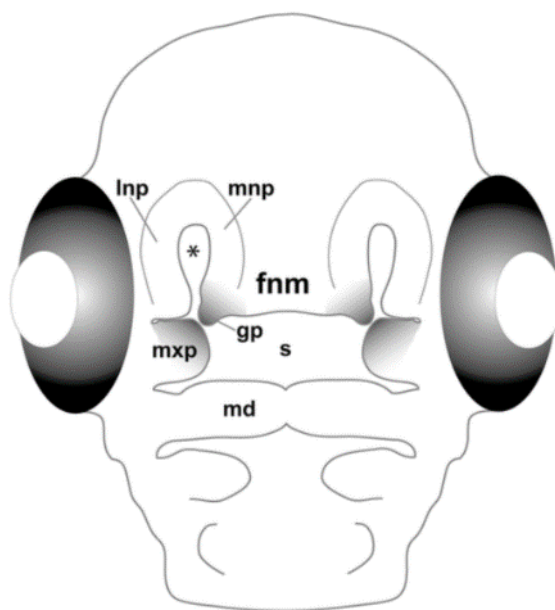
Skratky: e – oko; nc – nosová dutina; s – stomodeum; m – mezenchým; * – epitelová nosová zátka

Diskusia

Tvár kuracieho embrya je formovaná sadou kraniofaciálnych výbežkov, ktoré vyrastajú obojstranne a spájajú sa v prednej časti tváre. Spodná čeľusť sa tvorí z párových mandibulárnych výbežkov a horná čeľusť vzniká z frontonazálnej masy, alebo frontonazálneho výbežku, párových maxilárnych výbežkov, párových laterálnych nosových výbežkov a párových mediálnych nosových výbežkov (obr. 2). U vtákov sa nosová dutina rozprestiera od vonkajších nozdier po párové vnútorné otvory nazývané *choanae*. Štrbinou choány sa nosové dutiny spájajú so zobákovou dutinou a hltanom. Nosová plakóda sa stáva viditeľnou na 3. deň inkubácie a je tvorená zhrubnutou vrstvou ektodermu na frontonazálnom výbežku. Na 4. deň jej invagináciou vznikajú plytké nosové jamky. Každá nosová jamka zostáva na povrchu hlavy otvorená počas prvých dní embryonálneho vývoja. Neskôr sa z týchto otvorov stanú vonkajšie nozdry. Nosové jamky sa v dôsledku vydutia ektodermu okolo otvoru postupne prehlbujú, čím sa vytvárajú laterálne a stredné nosové výbežky. Dutiny nosových jamiek sa spočiatku otvárajú do zobákovatej dutiny, ale medzi 5. a 7. dňom embryogenézy sa fúziou medzi globulárnymi a maxilárnymi výbežkami vytvorí primárne podnebie a horná (nosová)

časť zobákovej dutiny sa oddelí od spodnej (zobákovej) dutiny [3]. Kým u cicavcov sa čelustné výbežky spájajú s mediálnymi nosovými výbežkami a vytvárajú celistvú hornú čelusť a nosové dutiny, u vtákov sa výbežky nespájajú po celej dĺžke strednej podnebnéj trhliny. Vtáky majú preto rozdelené podnebie [4]. Samotné nosové dutiny sú u cicavcov rozdelené do troch anatomických kompartmentov: rostrálna nosová predsieň, vlastná nosová dutina a nazofaryngeálny kanálik. U vtákov je nosová predsieň obzvlášť rozšírená, zatiaľ čo nazofaryngeálny kanálik je značne redukovaný alebo často chýba [5].

V kuracom embryu sa párové vonkajšie nosové otvory spočiatku vytvárajú ako priechodné otvory, ale zostanú tak iba krátky čas. Čoskoro po vytvorení nosových dutín sa mediálne a laterálne nosové výbežky spájajú (6. deň inkubácie), čím sa vonkajšie nosové otvory zmenšujú až napokon úplne uzatvoria počas značnej časti embryonálneho vývoja. Epitel medzi spojenými výbežkami proliferuje a vytvára dočasnú nosovú zátku. Nosová zátku je obmedzená na nosovú predsieň, zatiaľ čo zadná nosová dutina zostáva bez obštrukcií. Podobne ako iní autori aj my sme zaznamenali tento vývojový morfológický znak [6, 7]. Na 14. deň embryonálneho vývoja sa nosová zátku začína rozpadáť kombináciou bunkovej remodelácie, apoptózy, ako aj neapoptotickej nekrózy, čo vedie k rekanalizácii a úplnému spriechodneniu nosových dutín pri vyliahnutí [2]. Tieto zistenia zaraďujú kurčatá do kategórie s niektorými druhmi plazov a cicavcov (vrátane ľudí), u ktorých sa zistilo, že sa u nich vyvíja prechodná embryonálna nosová zátku.



Obrázok 2 6 - dňové kuracie embryo – schéma (prevzaté: Albawaneh [2])

Tieňovanie zvýrazňuje oblasti fúzie medzi maxilárnymi výbežkami (mxp) a globulárnymi výbežkami (gb) frontonazálnej hmoty (fnm). Hviezdička označuje otvorenú nosovú dutinu

Skratky: lnp – laterálny nosový výbežok; md – mandibulárny výbežok; mnp – mediálny nosový výbežok; s – stomodeum

Záver

U vtáčieho embrya možno tvorbu nosovej dutiny rozdeliť do troch fáz. Prvá fáza predstavuje obdobie bezprostredne po vzniku primárneho podnebia, kedy je možné pozorovať u 6-dňového kuracieho embrya fúziu medzi mediálnym nazálnym a laterálnym nazálnym výbežkom. Druhá fáza zahŕňa obštrukciu nosovej dutiny vytvorením nosovej zátky v nosovej predsieni a tvorbu nosových škrupín. Tretia fáza

(medzi 12. – 18. dňom) sa zameriava na bunkové procesy, ktoré sa podieľajú na rekanalizácii nosovej predsiene. Bunky v strede epitelovej nosovej zátky progresívne expandujú, čo vedie k ich deštrukcii a otvoreniu nosových dutín približne 3 dni pred vyliahnutím. Táto práca poskytuje opis základných morfológických zmien vo vývoji nosovej dutiny u 9-dňového kuracieho embrya. Naše pozorovania potvrdili prítomnosť obštrukcie nosovej predsiene na úrovni vonkajších nosových otvorov vo forme nosovej zátky. V našej ďalšej práci sa chceme zamerať na fázu zahŕňajúcu deštrukciu buniek nosovej zátky, a to pomocou sledovania apoptotických signálov histochemickou metódou TUNEL. Očakávame, že naše zistenia rozšíria potenciál kuracieho embrya ako modelového organizmu na štúdium ľudského kraniofaciálneho vývoja.

Práca bola finančne podporená grantovými projektami VEGA č. 1/0036/22 a KEGA č. 005UVLF-4/2021.

Literatúra

- [1] Latendresse, *Toxicol. Pathol.* **2002**, 30: 524–533.
- [2] Albawaneh, *Anat. Rec.* **2021**, 304: 247–257.
- [3] Abramyan, *Developmental Dynamics*. **2015**, 244: 1457–1468.
- [4] Jiang, *Developmental Dynamics*. **2006**, 235: 1152–1166.
- [5] Witmer, *Journal of Morphology*. **1995**, 225: 269–327.
- [6] Kim, *Laryngoscope*. **2004**, 114: 1791–1800.
- [7] Yoon, *Yonsei Medical Journal*. **2000**, 41: 477–484.

Štruktúra lymfatických ciev v chorioallantoickej membráne kuracieho embrya na 14. deň inkubácie

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

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

Abstract

The chorioallantoic membrane (CAM) is an intensely vascularized membrane that has wide use in research. The aim of our work was to observe the structure of the CAM at day 14 of incubation. On the 14th day of incubation both the chorion and the allantois epithelia were completely differentiated. Blood and lymphatic vessels were fully developed in the mesenchyme. Lymphatic vessels had wider, irregular lumen that was lined by a very thin layer of flattened endothelial cells. The tunica media in the lymphatic vessels was not formed.

Keywords: chick embryo, chorioallantoic membrane, lymphatic vessels

Úvod

Chorioallantoická membrána (CAM) kuracieho embrya je intenzívne vaskularizovaná štruktúra, ktorá vzniká splynutím dvoch extra-embryonálnych membrán a to chorionu a alantoisu [2, 12]. Nachádza sa pod vaječnou škrupinou, a to bezprostredne pod blanou *membrana papiracea*. Počas vývoja embrya CAM plní dôležité úlohy pri výmene plynov a pri resorpcii vápnika zo škrupiny [6]. Zároveň predstavuje alternatívny zvierací model, ktorý má mnoho výhod, ako sú nízke náklady, ľahká manipulácia a zobrazovanie zmien v reálnom čase [11].

Nakoľko je CAM bohatá krvná, mnohé vedecké práce sa zameriavajú na sledovanie vývoja a rastu krvných ciev v CAM [5, 14, 16]. Doposiaľ však chýbajú morfológické práce, ktoré by sa venovali lymfatickým cievm. Ako prvý opísal lymfatické cievy u vtáčích embryí Budge [1]. V súčasnosti je známych niekoľko teórií, ktoré sa zaoberajú vývojom lymfatických ciev, ktoré boli zhrnutých v prácach Papoutsi a kol. [9] a Sabin [13]. V týchto štúdiách sa uvádza, že lymfatické vaky, ktoré vznikajú zo susedných embryonálnych žíl, poskytujú základ pre rast a tvorbu lymfatického tkaniva a pre tvorbu lymfatických orgánov embrya. Podľa tejto teórie sú lymfatické endotelové bunky odvodené výlučne z endotelu krvných žíl. Naopak podľa názoru Huntingtona [3] a Kampmeiera [4] sú zdrojom lymfatických ciev priamo mezenchýmové bunky, teda lymfatické cievy sa vyvíjajú nezávisle od krvných ciev. Van der Jagt [15] sa prikláňa k oboj teóriám, teda že v tele embryí prebiehajú obidva mechanizmy vývoja lymfatických ciev súčasne.

Cieľom našej práce bolo sledovať štruktúru CAM na 14. deň inkubácie (DI) so zameraním sa na štruktúru krvných a lymfatických ciev.

Materiál a metódy

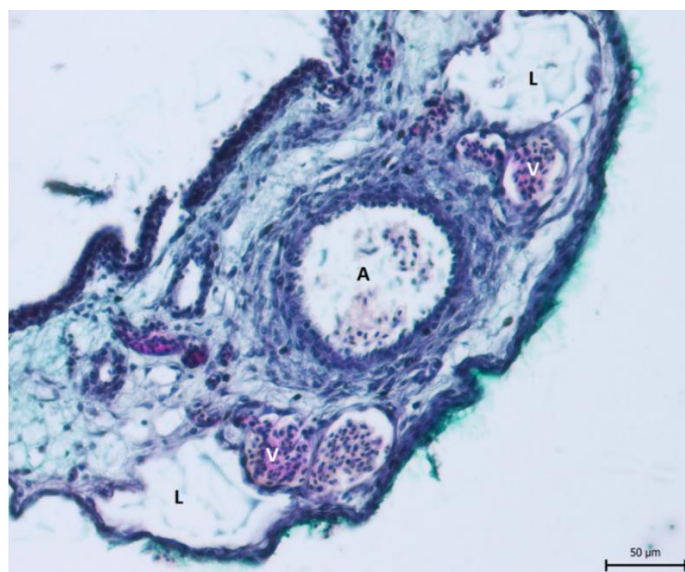
Na pokus bolo použitých 30 oplodnených kuracích vajec z certifikovaného chovu Párovské Háje (Nitra). Vajcia boli umiestnené do liahne a inkubované za štandardných inkubačných podmienok. Na 14. deň inkubácie boli odobraté chorioallantoické membrány, ktoré boli následne spracované pre účely svetelnej mikroskopie. Rezy hrubé 5-10 µm boli ofarbené hematoxylín-eozínom (HE) a Alcianovou modrou (Alcian Blue)

a fotodokumentované prostredníctvom mikroskopu Olympus CX 43 (Olympus, Japonsko) a kamery Promicra (Promicra, Česká republika).

Výsledky a diskusia

Na 14. DI bol epitel chorionu a alantoisu už úplne vydiferencovaný. Mezenchým bol bohatý na bunky, ako aj vlákna. Väčšie množstvo väziva sme pozorovali hlavne v okolí veľkých ciev, v ostatných úsekoch CAM bol objem väziva výrazne zredukovaný. Vo väzive boli prítomné krvné aj lymfatické cievy. Hlavné artérie mali charakteristickú štruktúru s okrúhlym, pravidelným lúmenom. Ich stena bola relatívne hrubá a pozostávala z endotelu a dvoch – troch vrstiev buniek hladkej svaloviny. Vény mali nepravidelný lúmen, pričom ich stena bola menej výrazná. Lymfatické cievy sa vyskytovali najmä v blízkosti veľkých krvných ciev. Charakterizoval ich široký, nepravidelný lúmen a boli vystlané len veľmi tenkým endotelom. *Tunica media* v lymfatických cievach nebola vytvorená (obr. 1).

U kuracích embryí sa CAM začína vyvíjať na 4. DI a dozrieva približne na 12. DI. Jej involúcia nastáva približne v 18.-19. DI. CAM obsahuje systém krvných ciev, ktorý pozostáva z artérií a žíl, ktoré sú spojené s intraepiteliálnym kapilárnym plexom. Okrem krvných ciev sú súčasťou CAM aj lymfatické cievy [7, 16]. Bolo zistené, že lymfangiogenéza v CAM nastupuje v období 5. - 9. DI, a to až po počiatočnom raste cievneho systému [10]. Naším cieľom bolo sledovať výskyt lymfatických ciev v CAM na 14. DI. Z morfológického hľadiska sa dali lymfatické cievy ľahko odlíšiť od okolitých krvných ciev. Lymfatické cievy mali oveľa väčší lúmen, ako krvné cievy. Ich endotel bol extrémne tenký a stena neobsahuje vrstvu *tunica media*. Rovnaký morfológický obraz lymfatických ciev v CAM pozorovali aj Oh a kol. [7]. Títo autori zistili, že párové lymfatické cievy prebiehali pozdĺž tepien a žíl. Ich počet rástol, ako sa postupne zväčšovali krvné cievy. Následne aplikácia VEGF-C (vaskulárny endotelový rastový faktor) na CAM ovplyvnila ich vývoj [7, 8, 9]. Došlo k zvýšenej proliferácii lymfatických endotelových buniek a k tvorbe väčších lymfatických sínusov. Za bežných fyziologických podmienok sú dôležitým zdrojom VEGF-C epitel allantoisu a bunky, ktoré sa podieľajú na tvorbe steny väčších krvných ciev. Predpokladá sa, že vysoká hladina VEGF-C, ktorej zdrojom sú práve bunky steny ciev, prispieva k tvorbe lymfatických ciev v CAM [8].



Obrázok 1 Chorioalantoická membrána na 14. DI

Skratky: A – artéria; V – vena; L – lymfatická cieva

Záver

Mnohé morfológické práce sa venujú vývoju a štruktúre krvných ciev v CAM a ich zmenám, vplyvom rôznych testovaných látok. Doposiaľ však chýbajú morfológické štúdie, ktoré by sa zaoberali štruktúrou a vývojom lymfatických ciev v CAM. Keďže lymfatické cievy sú neoddeliteľnou súčasťou CAM a môžu sa výraznou mierou podieľať na reakcii CAM na rôzne testované látky, sledovanie ich morfológie a morfogénzy v rôznych vývojových štádiách modelu CAM kuracieho embrya má preto veľký význam.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0036/22 a KEGA č. 005UVLF-4/2021.

Literatúra

- [1] Budge, *Arch. Anat. Entwicklgesch.* **1887**, 59–89.
- [2] Freeman, *Springer*, **1974**, s.153–159, ISBN: 978-94-009-5712-1
- [3] Huntington, *Anat. Rec.* **1908**, 2: 19–46.
- [4] Kampmeier, *Anat. Rec.* **1912**, 6: 223–233.
- [5] Merckx, *Tissue Eng. Part B.* **2020**, 26(6): 519–539.
- [6] Mueller, *Elsevier*, **2015**, s. 739–766, ISBN: 978-0-12-407160-5
- [7] Oh, *Dev. Biol.* **1997**, 188: 96–109.
- [8] Oliver and Detmar, *Gene Dev.* **2002**, 16(7): 773–783.
- [9] Papoutsis and Tomarev, *Dev. Dyn.* **2001**, 222: 238–251.
- [10] Parsons-Wingerter and McKay, *Anat. Rec. Part A.* **2006**, 288(3): 233–247.
- [11] Ribatti, *Mech. Dev.* **2016**, 141: 70–77.
- [12] Romanoff, *The Macmillan Co.*, **1960**, 342 s., ISBN 978-0-835-75932-8
- [13] Sabin, *Am. J. Anat.* **1909**, 9: 43–91.
- [14] Scavelli and Weber, *J. Anat.* **2004**, 204(6): 433–49.
- [15] Van der Jagt, *Microsc. Sci.* **1932**, 75: 151–165.
- [16] Winter and Dungel, *Sci. Rep.* **2018**, 8: 1–9.

Ultraštruktúra chorioalantoickej membrány kuracieho embrya na 9. deň inkubácie

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

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

Abstract

The aim of this study was to observe ultrastructure of the chorioallantoic membrane (CAM) of chicken embryo on day 9 of incubation. CAM was formed by two epithelial layers and connective tissue. Chorionic epithelium consisted of 2 layers of cells. Electron-dense cells occurred on the epithelial surface, and electron-lucid cells formed the basal part of the epithelium. Allantoic epithelium was simple or stratified squamous depending on the region. In connective tissue diffusely arranged mesenchymal cells and delicate network of fibers was seen. Below the chorionic epithelium a dense capillary network was created. The capillaries were lined by endothelial cells, whose cytoplasm contained vacuoles of various sizes.

Keywords: chick embryo, ultrastructure, chorioallantoic membrane

Úvod

Vtáacie embryá patria medzi často využívané alternatívne zvieracie modely, ktoré majú široké využitie vo výskume [1]. Pre ich vývoj sú nevyhnutné extraembryonálne štruktúry, ako sú žĺtkový vak (ŽV) a chorioalantoická membrána (CAM). Tieto útvary sa vyvíjajú súčasne s telom embrya a plnia množstvo funkcií. Zárodok prijíma živiny zo žĺtka prostredníctvom ŽV. Okrem toho ŽV je prvý hemopoetický orgán, ktorý má dôležitú úlohu aj v imunite jedinca [8]. Výmenu plynov a transport vápnika zo škrupiny vajca do tela embrya zabezpečuje CAM. Podieľa sa na udržiavaní acidobázickej rovnováhy a pri reabsorpcii vody a elektrolytov z alantoickej tekutiny [4, 5]. Sama osebe má CAM široké využitie v biologickom a biomedicínskom výskume pri štúdiu angiogenézy, rastu nádorov, ako aj sledovaní účinku rôznych liečiv [5]. Cieľom práce bolo sledovať ultraštruktúru CAM na 9. deň inkubácie. Naše pozorovania následne využijeme v našich plánovaných experimentoch.

Materiál a metódy

Pokus bol realizovaný na Katedre morfológických disciplín Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach. Na pokus boli použité oplodnené vajcia kury domácej (*Gallus gallus domesticus*) z certifikovaného chovu Párovské Háje (Nitra). Vajcia boli umiestnené do liahne a inkubované za štandardných inkubačných podmienok ($37 \pm 0,5$ °C, 60 % relatívna vlhkosť). Na 9. deň inkubácie (DI) boli odobraté chorioalantoické membrány, ktoré boli fixované v 3 % glutaraldehyde a postfixované 1 % OsO_4 , odvodnené v acetóne a zaliaté do Durkupanu. Polotenké rezy boli ofarbené toluidínovou modrou a fotodokumentované prostredníctvom mikroskopu Olympus CX 43 (Olympus, Japonsko) a kamery Promicra (Promicra, Česká republika). Ultratenké 60-120 nm rezy kontrastované uranyl acetátom a citrátom olovnatým boli následne vyšetrované prostredníctvom transmisného elektrónového mikroskopu Tesla BS 500.

Výsledky

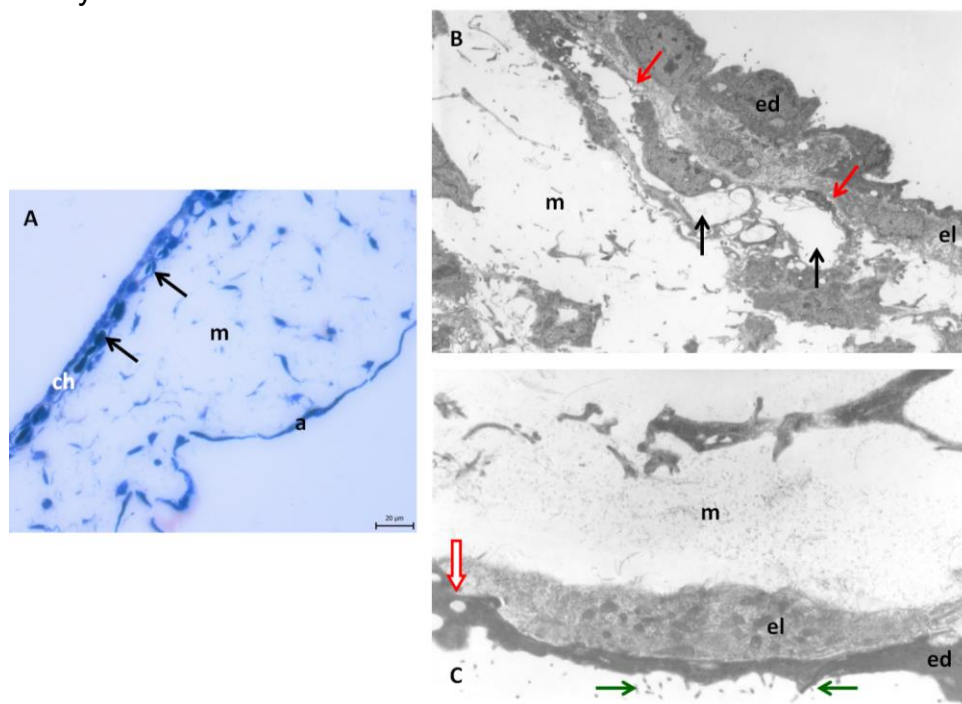
Na 9. DI CAM pozostávala z troch vrstiev, a to z epitelu alantoisu (ektoderma), epitelu chorionu (endoderma) a pomerne hrubej vrstvy väziva - mezenchýmu (mezoderma) (obr. 1A). Epitel chorionu tvorili 2 vrstvy buniek, ktoré boli rôzneho tvaru a ich cytoplazma mala odlišnú afinitu ku kontrastným látkam. Tmavé, elektrón-denzné bunky sa vyskytovali hlavne na povrchu epitelu. Ich apikálna časť bola mierne zvlnená a na niektorých miestach vytvárala krátke mikrokľky. Bunky mali jadro okrúhle, euchromatické s výrazným jadierkom a mierne zvlnenou jadrovou membránou. Svetlé, elektrón-lucidné bunky tvorili bazálnu časť epitelu. Bunky mali veľké, euchromatické jadro s mierne zvlnenou jadrovou membránou. Bunky boli v kontakte s kapilármi, alebo s mezenchýmovými bunkami (obr. 1B). Epitel alantoisu bol jednovrstvový (obr. 1A), na niektorých miestach dvojvrstvový (obr. 1C). Pozostával z 2 typov buniek, elektrón-denzných a elektrón-lucidných. Bázu epitelu tvorili elektrón-lucidné bunky, kým povrch epitelu pokrývali elektrón-denzné bunky. Elektrón-denzné bunky obsahovali vakuoly rôznej veľkosti a ich cytoplazmatická membrána na apikálnom konci vytvárala krátke mikrokľky, ktoré vyčnievali do dutiny alantoisu. Elektrón-lucidné bunky mali v cytoplazme dobre vyvinuté mitochondrie. Ich cytoplazmatická membrána v bazálnej časti vytvárala krátke výbežky, ktoré smerovali do mezenchýmu. Pod bazou buniek boli nahromadené jemné vlákna. Väzivová zložka CAM pozostávala z malého množstva rovnomerne rozptýlených mezenchýmových buniek. Na niektorých miestach pod epitelom chorionu sa väzivové bunky prichytávali výbežkami k epitelovým bunkám. Medzi epitelovými a mezenchýmovými bunkami sa vyskytovali rozšírené medzibunkové priestory (obr. 1B). Tesne pod epitelom chorionu bola hustá kapilárna sieť. Kapiláry boli vystlané endotelovými bunkami, v cytoplazme ktorých boli pozorované vakuoly rôznej veľkosti.

Diskusia

Extraembryonálne orgány, ako sú žltkový vak a chorioalantoická membrána, sú nevyhnutné pre vývoj vtáčích embryí. Plnia množstvo funkcií, čo sa odráža aj v ich štruktúre. Z literatúry je známe, že CAM vzniká na 4. – 5. deň DI a jej rast je úplne dokončený na 11. – 13. DI [2, 3, 6, 7]. Na 8. DI bunky, ktoré tvoria chorion, ešte nie sú plne diferencované. K týmto bunkám sa postupne prikladajú mezenchýmové bunky, ktoré sa výraznou mierou podieľajú na ďalších morfológických zmenách epitelu chorionu. Epitel sa postupne zvyšuje a začínajú sa v ňom objavovať krvné kapiláry [5]. Cieľom našej práce bolo sledovať ultraštruktúru CAM na 9. DI. Epitel chorionu v tomto štádiu inkubácie nebol ešte plne diferencovaný. Tvorili ho dva typy buniek, ktoré boli usporiadané do dvoch vrstiev. Kapiláry sme pozorovali len tesne pod epitelom chorionu. Na ich tvorbe sa podieľali mezenchýmové bunky, ktoré vytvárali krátke výbežky, pomocou ktorých sa prichytili k epitelu chorionu. Epitelové bunky boli od mezenchýmových buniek oddelené rozšírenými medzibunkovými priestormi.

Štruktúra epitelu alantoisu takisto závisí od doby inkubácie. Makanaye a kol. [5] na 8. DI pozorovali, že bunky alantoisu tvorili len jednu súvislú vrstvu. My sme na 9. DI pozorovali podobný morfológický obraz. Veľká časť alantoisu pozostávala len z jednej vrstvy buniek, avšak na niektorých úsekoch sa vyskytoval už aj dvojvrstvový epitel. Elektrón-lucidné bunky s dobre vyvinutými mitochondriami (bunky bohaté na mitochondrie alebo tzv. mitochondria-rich cells) tvorili bázu epitelu, kým elektrón-denzné bunky s krátkymi mikrokľkmi pokrývali povrch epitelu. Cytoplazma elektrón-denzných buniek obsahovala vakuoly rôznej veľkosti. Pravdepodobne ide o bunky bohaté na granuly („granule-rich cells“), ktoré ešte neboli úplne diferencované.

Väzivová zložka CAM na 9. DI pozostávala z malého množstva rovnomerne rozptýlených mezenchýmových buniek. Vo väzive sme pozorovali jemné vlákna, ktoré sa vyskytovali vo väčšom množstve tesne pod epitelom alantoisu. Tieto vlákna sa pravdepodobne podieľajú na formovaní bazálnej laminy, ktorá v tomto štádiu inkubácie nebola ešte výrazná.



Obrázok 1 CAM kuracieho embrya na 9. deň inkubácie

A: Mikrofotografia CAM - polotenký rez. B: Elektrónogram epitelu chorionu a mezenchýmu (originálne zväčšenie 5 700×). C: Elektrónogram epitelu alantoisu a mezenchýmu (originálne zväčšenie 4 500×)

Skratky: a – epitel alantoisu; ch – epitel chorionu; m – extraembryonálna mezoderma; čierna šípka – cieva; červená šípka – rozšírené medzibunkové priestory; červeno-biela šípka – vakuola; zelená šípka – mikroklyky

Záver

V súčasnosti patria kuracie embryá medzi najčastejšie využívané alternatívne modely. V experimentoch sa využívajú nielen priamo vtáacie embryá, ale aj chorioalantoické membrány. Cieľom našej práce bolo sledovať ultraštruktúru CAM u kuracieho embrya na 9. deň inkubácie. Dané pozorovania následne chceme využiť v našich ďalších experimentoch, ktoré sa týkajú sledovania účinku neionizujúceho elektromagnetického žiarenia, ktorého zdrojom sú rôzne bezdrôtové zariadenia, vrátne Wi-Fi.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0036/22 a KEGA č. 005UVLF-4/2021.

Literatúra

- [1] Baiguera, *Biomed. Mater. Res. Part B*. **2012**, 100: 1425–1434.
- [2] Dimitropoulou, *Angiogenesis*. **1998**, 2(3): 255–63.
- [3] Freeman, *Springer*, **1974**, s. 20–37, ISBN 978-94-009-5710-7
- [4] Gabrielli and Accili, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2010**, 2010: 1–13.
- [5] Makanya, *PLoS One*. **2016**, 11(4): 1–23.
- [6] Reizis and Hammel, *J. Exp. Biol.* **2005**, 13: 2483–2488.
- [7] Romanoff, *The Macmillan Co.*, **1960**, 342 s., ISBN 978-0-835-75932-8
- [8] Wong and Uni, *Poult. Sci.* **2021**, 100(3): 1–13.

Morfologická analýza vtácej chorioalantoickej membrány v závislosti od *in ovo* a *ex ovo* podmienok kultivácie

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

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

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

zuzana.demcisakova@gmail.com

Abstract

The chorioallantoic membrane (CAM) is a highly vascularized extraembryonic membrane of the avian embryo, which is commonly used to study angiogenesis, and its inhibition, tumor growth and metastasis, as well as drug efficacy. In this study, we evaluated the morphological characteristics of chicken CAM regarding to *in ovo* and *ex ovo* conditions of incubation. We evaluated the thickness of CAM layers using standard H-E sections and the ultrastructure of CAM tissue using transmission electron microscopy. We conclude that the CAM undergoes morphological changes during embryonic development, especially in the thickness of the mesenchymal layer, which differ with the amount of the ligament and the number of the cells. We have shown that culture conditions lead to significant differences in the structure of the ectodermal layer, which can lead to changes in CAM functions and differences in outcomes when CAM is used as an *in ovo* and *ex ovo* experimental assay for the same purposes.

Keywords: allantois, chicken embryo, chorioallantoic membrane, chorion

Úvod

Vtáčia chorioalantoická membrána (CAM) je extraembryonálna membrána, ktorá vzniká fúziou dvoch extraembryonálnych membrán, chorionu a alantoisu, na štvrtý deň embryonálneho vývinu (ED4) [1]. Predstavuje primárny respiračný a exkretčný orgán vyvíjajúceho sa vtáčieho embrya, ktorý sa v priebehu embryonálneho vývinu podieľa na transporte sodíka a chloridu z alantoisu, transporte vápnika z vaječnej škrupiny do embryonálnej vaskulatúry, udržiava homeostázu, formuje stenu alantoisového vaku, a podieľa sa na spätnej resorpcii vody a iónov z alantoisu [2]. Z hľadiska histologickej štruktúry pozostáva CAM z troch vrstiev: chorionu, mezenchýmu a alantoisu. Vrstva chorionu je tvorená epitelovými bunkami ektodermálneho pôvodu priliehajúcimi na vnútornú podškrupinovú membránu. Strednú vrstvu tvorí vysokovaskularizované tkanivo mezenchýmu, ktoré vzniká fúziou mezodermálnych vrstiev chorionu a alantoisu. Alantois, derivát endodermy, je tvorený vrstvou skvamózných, fibroblastom podobných buniek, a je lokalizovaný najhlbšie v CAM [3-5]. CAM reprezentuje alternatívny animálny model, ktorý predstavuje medzistupeň medzi jednoduchým *in vitro* a komplexným *in vivo* modelovým systémom, ktorého použitie na experimentálne účely je v súlade s princípmi 3R [6]. Uplatnenie nachádza najmä v oblasti bioinžinierstva, v štúdiu tkanivových transplantátov, nádorovej biológie a genómiky [7]. V rámci štúdie sme hodnotili morfológiu CAM z hľadiska celkovej hrúbky CAM, hrúbky vrstiev CAM, a ultraštruktúrnych zmien v tkanive CAM v *in ovo* a *ex ovo* podmienkach kultivácie v 6., 9. a 14. deň embryonálneho vývinu kuracieho embrya.

Materiál a metodika

Oplodnené vajcia kury domácej (*Gallus gallus domesticus*, Lohmann Brown, *n* = 180) boli zakúpené v chovnom zariadení Párovské Háje, Nitra. Následne boli v závislosti od podmienok kultivácie (*in ovo*: vertikálna poloha, *ex ovo*: horizontálna poloha)

umiestnené za štandardných inkubačných podmienok ($37,5 \pm 0,5$ °C, 60 %) do liahne s núteným obehom a konštantnou vlhkosťou vzduchu, s automatickým naklápaním (*in ovo*), resp. bez automatického naklápania (*ex ovo*). Po 72. hodinách od začiatku inkubácie (ED3) boli vajcia z liahne vybrané za účelom odsatia 2 ml albumínu v prípade *in ovo* kultivácie a vyklopenia technikou *ex ovo*. Vajcia, resp. vyklopené kuracie embryá, sme následne vrátili späť do liahne, kde boli inkubované za konštantných inkubačných podmienok až do dňa odberu vzoriek CAM. Excíziu vzoriek CAM sme vykonávali v ED6, ED9 a ED14. Morfometrickú analýzu histologických rezov sme vykonali s použitím svetelného mikroskopu Olympus CX43 (Tokio, Japonsko) s digitálnou kamerou PROMICAM 3-5CP+ (Praha, Česká republika). V parafrínových rezoch (7 µm) ofarbených metódou hematoxylín-eozín sme hodnotili celkovú hrúbku a hrúbku jednotlivých vrstiev CAM v závislosti od podmienok kultivácie. Pre účely hodnotenia ultraštruktúrnych zmien CAM v *in ovo* a *ex ovo* kultivačných podmienkach sme tkanivo CAM hodnotili a dokumentovali transmisným elektrónovým mikroskopom JEM-1400Plus (JOEL Benelux, Belgicko). Získané dáta sme štatisticky analyzovali pomocou programu GraphPad Prism 9.5.1 (jednocestná ANOVA, Šidákov test). Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SD (štandardná odchýlka) z troch nezávislých experimentov. Hodnoty $p < 0,05$ boli považované za štatisticky významné.

Výsledky

Morfometrickou analýzou CAM sme významné rozdiely v celkovej hrúbke CAM zaznamenali v ED6 a ED14, kedy celková hrúbka CAM bola vyššia v *ex ovo* kultivačných podmienkach (tab. 1).

Tabuľka 1 Celková hrúbka CAM v *in ovo* a *ex ovo* podmienkach kultivácie kuracieho embrya. Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SD z troch nezávislých experimentov; biologické replikáty: $n = 6$, technické replikáty: $n = 180$. * $p < 0,0001$

Embryonálny deň [ED]	Celková hrúbka CAM [µm]	
	<i>in ovo</i>	<i>ex ovo</i>
ED6	47,23 \pm 13,01	78,74 \pm 23,51*
ED9	59,53 \pm 12,23	62,42 \pm 12,40
ED14	46,43 \pm 9,11	72,85 \pm 12,07*

Porovnaním hrúbky jednotlivých vrstiev CAM sme významné rozdiely zaznamenali v hrúbke chorionu, mezenchýmu a alantoisu v ED6 a v hrúbke mezenchýmu a alantoisu v ED14 v *ex ovo* podmienkach kultivácie. V ED9 sme medzi *in ovo* a *ex ovo* kultivovanou CAM významné zmeny v celkovej hrúbke CAM, ako aj v hrúbke jej jednotlivých vrstiev nepozorovali (tab. 2).

Tabuľka 2 Hrúbka vrstiev CAM v *in ovo* a *ex ovo* podmienkach kultivácie kuracieho embrya. Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SD z troch nezávislých experimentov; biologické replikáty: $n = 6$, technické replikáty: $n = 180$. * $p < 0,0001$

Embryonálny deň [ED]	Chorion [µm]		Mezenchým [µm]		Alantois [µm]	
	<i>in ovo</i>	<i>ex ovo</i>	<i>in ovo</i>	<i>ex ovo</i>	<i>in ovo</i>	<i>ex ovo</i>
ED6	8,58 \pm 3,24	10,53 \pm 3,74*	34,88 \pm 11,33	62,52 \pm 22,20*	3,77 \pm 1,31	5,69 \pm 1,85*
ED9	6,75 \pm 2,08	7,56 \pm 1,67	48,52 \pm 12,44	50,54 \pm 12,03	4,26 \pm 1,26	4,33 \pm 1,30
ED14	9,82 \pm 1,53	9,75 \pm 2,33	31,79 \pm 8,88	57,44 \pm 12,44*	4,83 \pm 0,97	5,66 \pm 1,33*

V rámci elektrónovej mikroskopie sme sa zamerali na hodnotenie zmien v

ultraštruktúre tkaniva CAM vo vybraných embryonálnych dňoch (ED6, ED9 a ED14) v závislosti od podmienok kultivácie. Vo všetkých vzorkách sme sledovali štruktúru CAM, ktorá bola tvorená tromi vrstvami. Vrstva chorionu v ED6 v *in ovo* podmienkach bola tvorená jednou vrstvou plochých nediferencovaných buniek. Alantois pozostával z jednej vrstvy skvamózných buniek podobných fibroblastom s početnými filopódiami, ktoré siahali do mezenchýmu a krátkymi mikrokľkami, ktoré vybiehali smerom do lúmenu alantoisu. Niektoré bunky v subepiteliálnej oblasti mezenchýmu mali prítomné mitotické útvary. Medzi epitelom chorionu a alantoisu bola vytvorená vrstva mezenchýmu s nízkym obsahom väziva a mezenchýmových buniek, ktoré boli uložené prevažne v subchorionovej vrstve. V *ex ovo* podmienkach bola vrstva chorionu tvorená 1 až 2 vrstvami buniek, medzi ktorými sa nachádzali krvné cievy. Vrstva mezenchýmu bola tvorená vyšším množstvom väziva a prítomné boli centrálné uložené krvné cievy. Alantois tvorila jedna vrstva buniek podobných fibroblastom s nižším počtom filopódií siahajúcimi do mezenchýmu a mikrokľkami vybiehajúcimi do lúmenu alantoisu. Epitel chorionu v ED9 v *in ovo* podmienkach kultivácie bol hrubší a pozostával z viacerých vrstiev buniek. Množstvo väziva vo vrstve mezenchýmu sa zvýšilo, rovnako ako počet mezenchýmových buniek, ktoré mali vytvorené dlhé výbežky cytoplazmy. Väčšie krvné cievy boli uložené centrálné vo vrstve mezenchýmu a krvné cievy s menším priemerom boli uložené v subchorionovej vrstve. Epitel alantoisu bol tvorený jednou vrstvou fibroblastom podobných buniek s filopódiami, ktoré sa spájali s bunkami mezenchýmu a mikrokľkami, ktoré smerovali do lúmenu alantoisu. Epitel chorionu v *ex ovo* podmienkach bol tvorený viacerými vrstvami dobre diferencovaných epitelových buniek a vysokým obsahom krvných ciev v blízkosti mezenchýmu. Epitel alantoisu bol tvorený 1 až 2 tenkými vrstvami fibroblastom podobných buniek s filopódiami, ktoré sa spájali s bunkami mezenchýmu a mikrokľkami, smerujúcimi do lúmenu alantoisu. Ich počet bol v porovnaní s *in ovo* podmienkami nižší. Prítomné boli vakuoly a granuly glykogénu vo vonkajšej vrstve alantoisu. Najvýraznejšie morfológické zmeny v ultraštruktúre CAM sme zaznamenali v ED14. Epitel chorionu v *in ovo* aj *ex ovo* podmienkach kultivácie mal viacvrstvový charakter. Bunky chorionu boli dobre diferencované. V prípade *in ovo* kultivácie boli krvné cievy uložené na povrchu epitelu chorionu. V *ex ovo* podmienkach boli krvné cievy uložené v strednej časti chorionu. Na povrchu chorionu bola vytvorená kontinuálna vrstva buniek. V prípade *ex ovo* kultivácie sme nezaznamenali prítomnosť typických buniek chorionu, ako sú bunky vilózne dutiny a bazálne bunky. Epitel alantoisu v *in ovo* podmienkach bol dvojvrstvový s nízkym obsahom buniek. Identifikovali sme menej filopódií a mikrokľkov smerujúcich do lúmenu alantoisu. Epitel alantoisu v *ex ovo* bol tvorený viacerými vrstvami buniek, ktoré smerovali do mezenchýmu. Prítomné boli aj krvné cievy.

Diskusia

K metódam hodnotenia procesu neovaskularizácie patria kvantitatívne a kvalitatívne metódy hodnotiace topografiu a štruktúru vaskulárnej siete, predovšetkým morfometrická analýza, štúdium štruktúry a vetvenia krvných ciev [8]. Doposiaľ však neexistuje štúdia, ktorá by opisovala alebo inak hodnotila zmeny CAM, ku ktorým dochádza v priebehu embryonálneho vývinu kuracieho embrya v závislosti od *in ovo* a *ex ovo* podmienok kultivácie. V priebehu embryonálneho vývinu CAM dochádza k zmenám, na základe ktorých možno embryonálny vývin CAM rozdeliť do troch vývinových fáz; ED8 – ED13, ED13 – ED18 a ED18 – ED20. Angiogenéza je zvyčajne sledovaná v intervale od ED5 do ED14 [9]. Na ED7 pokrýva CAM takmer polovicu žltkového vaku, jednotlivé vrstvy sú dobre diferencované a odlišiteľné. Hlavné krvné cievy sú na ED10 prítomné v mezoderme, uložené bližšie k alantoisu. Epitel

chorionu CAM je tvorený vrstvou malých krvných ciev, ktoré tu vytvárajú vysoko denznú kapilárnu sieť. Táto kapilárna sieť nalieha na vnútornú podškrupinovú membránu a v priebehu vývinu dosahuje hrúbku maximálne $13,7 \pm 2,2 \mu\text{m}$ [5]. Maksimov a kol. sledovali morfológické parametre CAM kuracieho embrya v závislosti od štádia embryonálneho vývinu v intaktnom vají. Hrúbka jednotlivých vrstiev CAM dosiahla maximálne hodnoty na ED12 [4]. V závislosti od podmienok kultivácie sme sledovali zmeny v hrúbke jednotlivých vrstiev CAM, a to predovšetkým v strednej, mezodermálnej, vrstve CAM. Porovnaním ultraštruktúry CAM v *in ovo* a *ex ovo* podmienkach kultivácie sme sledovali výrazné rozdiely v morfológickej stavbe a v distribúcii ciev ektodermálnej vrstvy CAM, ktoré sú dobre definované na ED14. V neskorších štádiách embryonálneho vývinu vtáčieho embrya možno pozorovať patomorfologické zmeny CAM (napr. redukcia a devastácia kapilárnej siete a degeneratívne zmeny mezodermálnych ciev), ktoré súvisia so stratou respiračnej funkcie CAM. Vzhľadom na funkcie CAM možno predpokladať, že uloženie krvných ciev pod poréznu vaječnú škrupinu v *in ovo* podmienkach kultivácie súvisí so zabezpečením respiračnej funkcie CAM, ktorú od ED18 preberajú pľúca [10].

Záver

Napriek tomu, že CAM model sa stáva veľmi populárnym alternatívnym modelovým systémom, stále absentujú morfológické štúdie, ktoré by opisovali štrukturálne zmeny CAM, ku ktorým dochádza v priebehu embryonálneho vývinu vtáčieho embrya. Dokázali sme, že CAM v priebehu embryonálneho vývinu podlieha morfológickým zmenám, a to predovšetkým zmenám v celkovej hrúbke CAM, ktorá priamo reflektuje zmeny na úrovni jednotlivých vrstiev tkaniva CAM. K najvýraznejším zmenám dochádza v hrúbke mezenchýmovej vrstvy. Hodnotením štrukturálnych zmien CAM s ohľadom na elektrónovú mikroskopiu sme identifikovali výrazné rozdiely v štruktúre ektodermálnej vrstvy CAM, ktorá sa v závislosti od podmienok kultivácie líši predovšetkým distribúciou a usporiadaním krvných ciev v *ex ovo* podmienkach. K týmto zmenám v štruktúre dochádza pravdepodobne kvôli absencii komunikácie CAM s vaječnou škrupinou embrya, následkom čoho môže dochádzať aj k zmenám funkcie CAM. Našu teóriu potvrdzuje aj absencia buniek vilóznej dutiny vo vzorkách CAM kultivovanej v *ex ovo* podmienkach.

Publikácia vznikla za finančnej podpory projektov APVV-20-0073, VEGA č. 1/0036/22 a IGA UVLF 14/2023 „Štúdium angiogénnej odpovede ciev chorioalantoickej membrány vtáčieho embrya vo vzťahu k vybraným inovatívnym biomateriálom určených pre regeneračnú medicínu“.

Literatúra

- [1] Kundekova, *Biology*. **2021**, 10: 301.
- [2] Ribatti, *Reproductive Toxicology*. **2017**, 70: 97–101.
- [3] Valdes, *Journal of Biomedical Materials Research*. **2002**, 62: 273–282.
- [4] Maksimov, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. **2006**, 142: 367–371.
- [5] Makanya, *Plos One*. **2016**, 11(4): e0152821.
- [6] Chen, *Cells*. **2021**, 10: 463.
- [7] Liu, *Experimental Animals*. **2018**, 67: 1–6.
- [8] McKay, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **2008**, 49: 1184–1190.
- [9] Koning, *Plenum Press*, **1997**, 411: 353–358.
- [10] Reizis, *The Journal of Experimental Biology*. **2005**, 208: 2483–2488.

Prínos MR 3D PCASL perfúzie mozgu

Števík, M.¹, Zelenák, K.¹, Žatkuliaková, V.¹, Jágríková, J.¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin, Rádiologická klinika, Martin
martin.stevik@uniba.sk

Abstract

Arterial spin labelling (ASL) MRI sequence is used in most areas of neuroscience, due to its non-invasive nature and access to reproducible and validated cerebral blood flow (CBF) quantification with respect to other brain perfusion techniques [1, 2]. The value of ASL has been demonstrated in acute and chronic neurovascular diseases, in which perfusion anomalies have been revealed concordantly with other techniques. In tumor diseases, ASL perfusion specifies the grade of the tumor and measures the effects of antiangiogenic treatment. Local changes in cerebral perfusion have also been found in epilepsy and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. The absence of irradiation or exogenous administration of contrast material, as well as the reproducible quantification of perfusion parameters, make ASL an interesting technique for the study of brain tissue perfusion [3, 4].

Keywords: Arterial spin labelling, brain tumor, MR, neurovascular diseases

Úvod

ASL je alternatívna neinvazívna MR perfúzna technika, ktorá umožňuje meranie perfúzie tkaniva mozgu (CBF) bez potreby aplikácie kontrastnej látky. To umožňuje perfúzne zobrazenie aj u pacientov s kontraindikáciami aplikácie intravenózne kontrastnej látky, ako je napríklad zlyhanie obličiek. V roku 2015 sa vedci zhodli, že technika ASL MRI je vhodná na použitie v klinickom prostredí a odporučili implementáciu ASL pre perfúznú MRI v klinických aplikáciách [5]. Senzitivita, špecifickosť, pozitívna prediktívna hodnota a negatívna prediktívna hodnota ASL v porovnaní s dynamic susceptibility contrast (DSC) perfúziou sú 71,4 %, 78,6 %, 83,3 % a 64,7 % [6]. V metaanalýze sa porovnávalo ASL s DSC perfúziou so záverom, že ASL vykazuje strednú až vysokú zhodu s DSC perfúziou na detekciu penumbry u pacientov s ischemickou cievnu mozgovou príhodou. Využitie ASL bolo preukázané prínosné pri akútnych aj chronických neurovaskulárnych ochoreniach. Pri nádorových ochoreniach ASL spresňuje stupeň nádoru a sleduje účinnosť liečby. Lokálne zmeny mozgovej perfúzie boli popísané aj pri epilepsii a neurodegeneratívnych ochoreniach, ako je Alzheimerova choroba [3, 4].

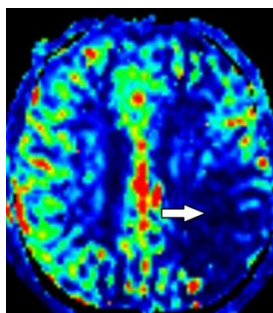
Materiál a metódy

ASL MR sekvencia bola zavedená do klinickej praxe na RDG UNM a JLF UK v novembri 2022 na novo inštalovanom MR prístroji Magnetom Vida 3T, Siemens, Nemecko s 20 a 64-kanálovou hlavovou cievkou s parametrami štandardnej PCASL sekvencii 3D tra s rozlíšením 1,8x1,8x4 mm³, 3:33min, FOV 230mm, TR 4000,0ms, TE 22,10ms. Od 1.11.2022 do 30.4.2023 bolo realizovaných v rámci multiparametrického protokolu 48 MR ASL vyšetrení mozgovej perfúzie u 45 pacientov s vyhodnotením CBF. ASL sekvencia pozostáva z dvoch častí. V prvej časti označenie spinov prichádzajúcej krvi invertovaním magnetizácie protónu. V druhej časti akvizícia signálu z kapilár tkaniva. Medzi týmito dvoma časťami je relatívne dlhé oneskorenie, kým pritečie značená krv do meraného tkaniva. Sú dve hlavné schémy označovania

krvi a to pulzná ASL (PASL) a pseudo kontinuálna ASL (PCASL). Pri PASL je inverzný slab umiestnený proximálne od meraného. Pulzy sú krátke, rádovo približne 10 ms a okamžite invertujú naraz všetkú krv pod meraným objemom. Po označení nasleduje oneskorenie, počas ktorého sa invertovaná krv presunie z oblasti označenia do mozgu a postupne stráca pozdĺžnu relaxáciu T1. Pri PCASL je pritekajúca krv kontinuálne invertovaná, keď preteká cez označenú oblasť. Sled pulzov pri PCASL sa aplikuje po dobu 1 až 2 sekúnd. Väčšina sekvencií ASL používa iba jedno oneskorenie medzi označením a meraním. V prípade oklúzie tepny dochádza k oneskorenému prísunu krvi do parenchýmu, čo môže falošne znížiť CBF ASL - arteriálny tranzit artefakt. Znížený srdcový výdaj vedie k podobným zmenám, najmä v oblastiach hranice cievnych teritórií. Redukcia artefaktov je pomocou multi-delay ASL. Cerebrálny prietok krvi je jedným z parametrov perfúzných techník. CBF je definovaný ako objem krvi, ktorý prejde daným množstvom mozgového tkaniva za jednotku času, najčastejšie mililitre krvi za minútu na 100 g mozgového tkaniva.

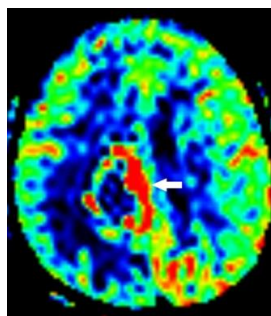
Výsledky

Od 1.11.2022 do 30.4.2023 bolo na Rádiologickej klinike UNM a JLFUK realizovaných a vyhodnotených 48 MR ASL vyšetrení mozgovej perfúzie u 45 pacientov, z toho 24 mužov a 21 žien. Priemerný vek pacientov bol 64,4 roka (min. 10 rokov, max. 78 rokov). Najširšie uplatnenie má ASL technika pri zobrazení cerebrovaskulárnych ochorení. Technika ASL zobrazuje mozgovú ischémiu bez aplikácie kontrastnej látky (obr. 1). Vo viacerých štúdiách sa preukázala primeraná zhoda ASL s DSC perfúziou a môže sa použiť na koreláciu s difúzne váženými obrazmi [7]. Nápomocná je aj keď ASL ukazuje normálnu perfúziu alebo hyperperfúziu, pretože eliminuje možnosť difúžno-perfúzneho nesúladu, ktorý by zobrazoval tkanivo ohrozené nekrózu pri infarkte.

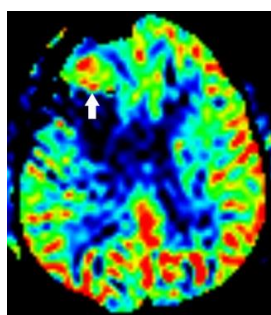


Obrázok 1 PCASL, MR, hypoperfúzia mozgu v povodí ACM vľavo pri čerstvej ischémií s poklesom CBF (šípka)

Hemodynamické zmeny sú prítomné pri mnohých tumoroch centrálneho nervového systému. Vo všeobecnosti sa CBF zvyšujú so stupňom nádoru. Glioblastoma multiforme je najčastejším high-grade nádorom centrálneho nervového systému u dospelých. Je spojený s vysokým metabolizmom a zvýšeným CBF (obr. 2, 3). Štúdie preukazujú že ASL a DSC vykazujú do značnej miery zhodné výsledky, pokiaľ ide o zobrazenie perfúzie u tohto nádoru a jeho odlíšenie od iných typov lézií.



Obrázok 2 PCASL, MR, zvýšený CBF na periférii tumoru mozgu (glioblastom multiforme) FP vpravo (šípka)

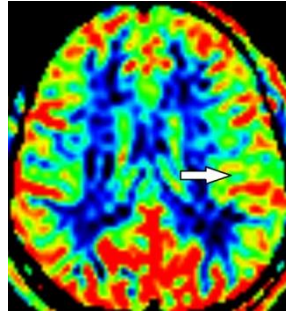


Obrázok 3 PCASL, MR, zvýšený CBF F vpravo predstavuje reziduálne tumorózne tkanivo glioblastomu multiformis (šípka)

ASL je tiež nápomocná pri hodnotení odpovede na liečbu. Obzvlášť dôležité a náročné je rozlíšenie medzi radiačnou nekrózou a recidívou nádoru u pacientov s novým alebo zvýšeným kontrastným sýtením. Radiačná nekróza sa zvyčajne spája so zníženým CBF oproti väčšine rekurentných nádorov vykazujúcich zvýšený CBF, kedy perfúzne zobrazenie môže byť užitočné na rozlíšenie týchto dvoch lézií. ASL zlepši vyhodnotenie perfúzne v porovnaní s meraním DSC perfúzie vzhľadom na jej lepšiu zobrazovaciu schopnosť v okolí resekčných dutín, kde krvné produkty môžu ovplyvniť meranie DSC. Je tiež menej citlivá na prítomnosť okolitých veľkých ciev, čo umožní lepšie oddiferencovanie v porovnaní s DSC perfúziou.

Alzheimerova choroba je najčastejším typom demencie. Štúdie ASL u rozvinutej choroby preukázali zníženie CBF v zadnej parietálnej distribúcii. Nález pri ASL je podobný ako prítomný hypometabolizmus pri FDG PET a obe modalities majú podľa literatúry podobnú diagnostickú senzitivitu [8].

Hlavnou úlohou ASL pri epilepsii je lokalizácia potenciálneho epileptogénneho ložiska (obr. 4). Počas akútneho periiktálneho obdobia je CBF typicky zvýšený v dôsledku patologickej neuronálnej aktivity, zatiaľ čo v chronickom interiktálnom období je CBF znížený, pretože epileptogénna oblasť je zvyčajne menej funkčná a aktívna v porovnaní s normálnym mozgovým tkanivom [9].



Obrázok 4 PCASL, MR, zvýšená perfúzia mozgu FT vľavo so zvýšením CBF pri aktívnej epilepsii (šípka)

Diskusia

Najširšie uplatnenie má ASL technika pri zobrazení cerebrovaskulárnych ochorení, kde je prínosná hlavne pri hodnotení ischemických stavov, mozgových tumorov a neurodegeneratívnych ochorení. Vyššia CBF pri multiformnom glioblastóme koreluje s genetickými markermi (receptor pre epidermálny rastový faktor) a je spojená s kratším časom prežitia bez progresie [10]. Nádory nižšieho stupňa zvyčajne majú nižšiu CBF. Zmeny CBF a jeho zvýšenie môžu znamenať transformáciu na agresívnejší fenotyp. Väčšina metastatických lézií mozgu vykazuje podobné alebo nižšie vychytávanie glukózy a CBF v porovnaní so sivou hmotou [1]. Na základe klinických a zobrazovacích štúdií sa javí ASL lepšia ako FDG pozitronová emisná tomografia (PET) a DSC na odlíšenie recidívy nádoru od radiačnej nekrózy v gliómoch so senzitivitou 94 % [11]. V skorom období po resekcii (< 4 týždne), kde je akékoľvek kontrastné sýtenie pravdepodobne spôsobené pseudoprogresiou, sa ASL vo viacerých štúdiách ukázala užitočnejšia ako DSC [12]. Pridanie sekvencie ASL k MR protokolu je pre pacienta minimálne náročné a nevyžaduje si dodatočné ožarovanie ani použitie kontrastných látok, je menej nákladné a umožňuje posúdiť štruktúru a perfúziu mozgu počas jedného vyšetrenia. Limitáciou môže byť kvalita obrazov ASL obmedzená ich nízkym pomerom signálu a šumu a niekoľkými typmi artefaktov. Dostupnosť metódy umožní rozsiahle používanie ASL, a tým aj overenie jej potenciálnych klinických aplikácií.

Záver

Pri mnohých ochoreniach poskytuje ASL perfúzia dodatočné a doplňujúce informácie k informáciám dostupným zo štrukturálneho MR zobrazenia. Absencia ožarovania alebo podávania kontrastnej látky, ako aj možnosť reprodukovateľnej kvantifikácii perfúzných parametrov robia z ASL mimoriadne zaujímavú techniku pre štúdiu perfúzie tkanív, najmä mozgu. ASL sa stáva dostupnou sekvenciou MR a jej použitie je prínosné, jednoduché a opakovateľné.

Literatúra

- [1] Haller, *Radiology*. **2016**,281(2): 337–356.
- [2] Lindner, *Magn. Reson. Med.* **2023**, 89: 2024–2047.
- [3] De Vis, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. **2018**, 48(2): 449–458.
- [4] Kim, *Sci. Rep.* **2021**, 11: 24218.
- [5] Alsop, *Magn. Reson. Med.* **2015**,73(1): 102–116.
- [6] Gopinath, *Cureus*. **2022**, 14(3): e23625.
- [7] Bivard, *Stroke*. **2014**,45(1): 127–133.
- [8] Musiek, *Alzheimers Dement.* **2012**,8(1): 51–59.
- [9] Storti, *Neuroimage*. **2014**,102(Pt 1): 49–59.
- [10] Qiao, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **2015**,36(4): 672–677.
- [11] Ozsunar, *Acad. Radiol.* **2010**,17(3): 282–290.
- [12] Luan, *Radiat. Oncol.* **2020**, 15: 204.

Zavedenie CT koronarografie do klinickej praxe v UNM

Turčan, M.¹, Števík, M.¹, Krkoška, A.¹, Samoš, M.², Dragula, M.³, Zeleňák, K.¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Rádiologická klinika, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, I. interná klinika, Martin; ³Univerzitná nemocnica Martin, Oddelenie invazívnej kardiológie, Martin
matej.turcan@gmail.com

Abstract

Coronary CT angiography (CCTA) belongs to the first non-invasive examination in symptomatic patients with suspected coronary artery disease (CAD). Reliably exclude obstructive CAD for high sensitivity and negative predictive value. CCTA has the ability to assess the anatomy and morphology of the coronary artery. With technological advances and improved dose reduction techniques in the last decade, cardiac CT has become increasingly popular.

Keywords: calcium score, coronary artery disease, CT, stenosis

Úvod

Ischemická choroba srdca (ICHS) predstavuje jednu z najčastejších príčin morbidity vo vyspelých krajinách a jednu z hlavných príčin morbidity v rozvojových krajinách. CT koronarografia má svoje nezastupiteľné miesto medzi diagnostickými metódami kardiovaskulárnych ochorení. V porovnaní s intervenčnou koronarografiou, táto metóda odbúra riziká spojené s invazívnym zákrokom a poskytuje oveľa komplexnejšie hodnotenie, keďže okrem vizualizácie lúmenu vyšetrovanej cievy umožňuje posúdiť okolité mäkké tkanivá a detekciu rôznych vrodených alebo získaných abnormalít koronárnych tepien. Využíva sa ako jedna z možností na diagnostiku ischemickej choroby srdca, monitorovanie priechodnosti bypassov alebo na dôkaz prítomnosti trombov a aterosklerotických plátov v koronárnych cievach [1, 2].

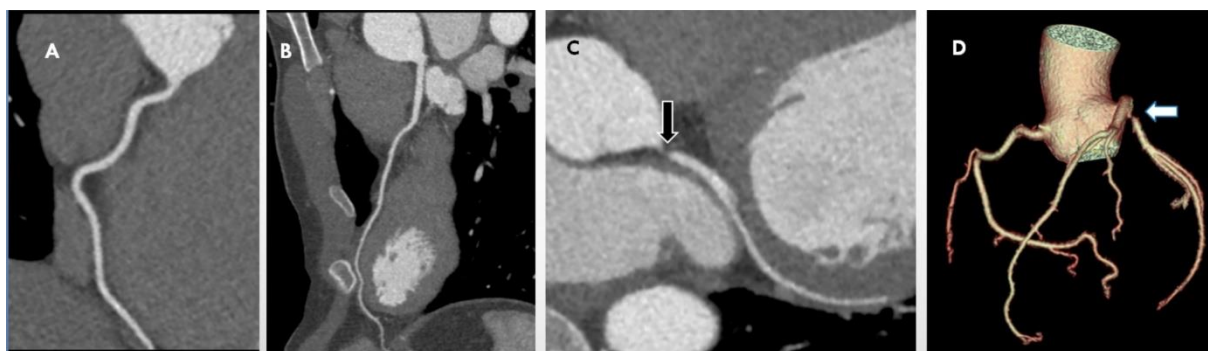
Materiál a metódy

Na Rádiologickej klinike UNM a JLF UK sme od 9/2020 do 4/2023 celkovo vyšetřili 242 pacientov na CT GE Revolution 256, štandardným protokolom s hrúbkou rezu 0,42mm, 100kV, 0,28s rotácia s aplikáciou 70-100ml jódovej kontrastnej látky rýchlosťou 8ml/s i.v. Samotné vyšetřenie bolo realizované v dvoch na seba nadväzujúcich krokoch. V prvom kroku, počas EKG-synchronizácie, sme zhodnotili natívnym CT skenom zastúpenie kalcia v koronárnom riečisku a na aortálnej chlopni. Následne sme pristúpili k príprave pacienta a samotnej realizácii CT koronarografie. Zásadným aspektom pre najkvalitnejšie zobrazenie koronárnych artérií je minimalizácia ich pohybu. Na to nám slúžila predovšetkým EKG-synchronizácia, ktorá bola potrebná na presné ohraničenie opakujúcej sa fázy srdcového rytmu a zároveň presné definovanie jednotlivých fáz. Pri srdcovej frekvencii vyššej ako 80/min bol najmenší pohyb srdca v end-systolickej fáze (25-35% cyklu), a vtedy je vyšetřenie realizované retrospektívnym EKG-triggeringom. Pri srdcovej frekvencii nižšej ako 80 za minútu bol najmenší pohyb srdca v mid-diastolickej fáze (65-75% cyklu) a realizované prospektívnym EKG-triggeringom. Nižšia srdcová frekvencia je však optimálna, keďže zvyšuje relatívny podiel diastoly počas srdcového cyklu, znižuje tak prítomnosť pohybových artefaktov a podmieňuje nižšiu radiačnú záťaž [3]. Na zaistenie optimálnej srdcovej frekvencie 50-60 úderov za minútu, podávame pacientovi β-blokátor i.v.. Taktiež pacientovi aplikujeme tesne pred vyšetřením nitrát podávaný

sublingválne. Medzi hlavné kontraindikácie priamo späté s daným vyšetrením je neschopnosť pacienta ležať na chrbte bez pohnutia, neschopnosť riadiť sa pokynmi asistenta a tiež zadržať dych počas skenovania. Relatívne kontraindikácie sú vysoké kalciové skóre a hodnota BMI vyššia ako 40 kg/m². medzi kontraindikácie spojené so samotným RTG žiarením a podávaním kontrastu patria: alergia na jódomú kontrastnú látku, renálna insuficiencia, tehotenstvo.

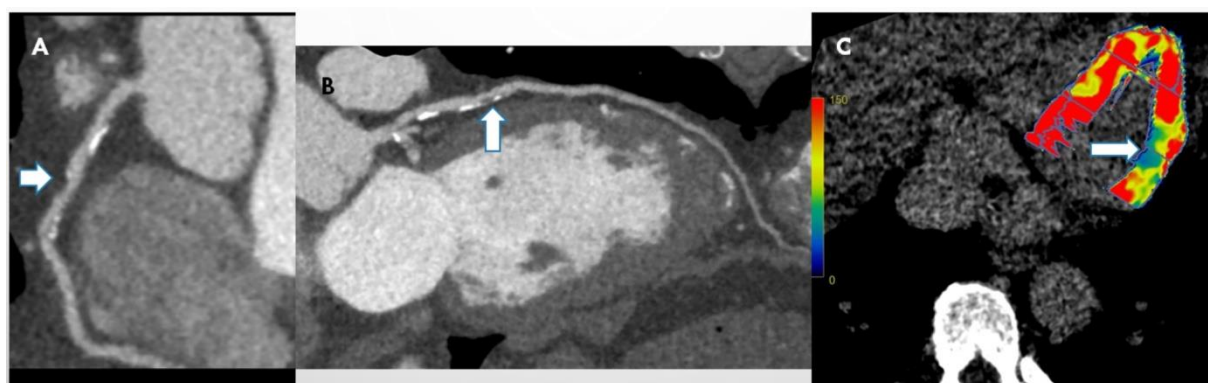
Výsledky

Skúmaný súbor pacientov na Rádiologickej klinike UNM a JLF UK v čase od 09/2020 do 04/2023 tvorilo 242 pacientov, pričom prevládalo mužské pohlavie (138) s percentuálnym podielom 57%, v menšom počte bolo zastúpené ženské pohlavie (104). V našej vyšetrenej skupine pacientov na Rádiologickej klinike UNM a JLF UK od 9/2020 do 4/2023 v celkovom počte 242 prevládalo mužské pohlavie v počte 138, ženské pohlavie bolo zastúpené v počte 104 čo predstavuje percentuálne zloženie 57% v prospech mužského pohlavia. Z celkového počtu vyšetrení bolo 140 realizovaných u ambulantných pacientov, zvyšných 102 pacientov bolo hospitalizovaných v našej nemocnici resp. v spádových nemocniciach v rámci Žilinského kraja. Najmladší pacient vyšetrovaný na našom pracovisku mal 16 rokov, najstarší 88 rokov, čo predstavuje medián na úrovni 56 rokov. Na základe vysokého kalciového skóre, bolo z ďalšieho hodnotenia vyradených 11 pacientov. Samotná CCTA bola realizovaná u 231 pacientov, kde 155 pacientov bolo vyšetrených pomocou prospektívneho EKG-trigerringu, u zvyšných 76 pacientov bol použitý retrospektívny EKG-triggering, čo predstavuje 67,1% v prospech prospektívneho triggeringu. Hodnota kalciového skóre definovaná pomocou Agatsonovom skóre sa pohybovala v rozmedzí 0 až 3525, kde medián bol na úrovni 4,5. Na kvantifikáciu stenózy sa používal štandardizovaný klasifikačný systém CAD-RADS, ktorého 6 stupňov (0 - 5) je rozdelených priamo úmerne percentu stenózy. Skóre 0 – 2 zodpovedá stenóze od 0-49%, 3 – stenóza 50-69%, 4 – 70-99% a stupeň 5 totálnej oklúzii [4, 5]. Z celkového počtu pacientov bolo 157 v rozmedzí stupňa 0-2, čo sa klinicky interpretovalo ako absentujúca ICHS resp. minimálna eventuálne mierna neobštrukčná ICHS. Pacienti s vyšším CAD-RADS skóre boli funkčne dodiagnostikovaní. Menšia časť aj na našom pracovisku pomocou dynamickej perfúzie myokardu po farmakologickej záťaži pod CT kontrolou, ktorá dáva alternatívu k SPECT a poukáže na možnú hypoperfúziu myokardu podmienenú stenózou v koronárnom riečisku. Následne takto dodiferencovaní pacienti podstupujú invazívnu koronarografiu s možnosťou dilatácie a stentingu koronárnej artérie. Zaujímavým sledovaným aspektom bola radiačná dávka vyšetrenia, ktorá bola pri kalciovom skóre v rozmedzí 0,30 – 1,16 mSv, kde medián bol na úrovni 0,63 mSv. Pri samotnej CCTA bola radiačná dávka v rozmedzí 0,77 – 12,70 mSv a medián 2,23 mSv. Celková radiačná záťaž pacienta bola v rozmedzí 1,12 – 13,67 mSv a medián na úrovni 2,87 mSv. Pre porovnanie, natívna RTG snímka brucha má priemernú radiačnú dávku 0,7 mSv a CT vyšetrenie mozgu 1-2 mSv.



Obrázok 1 Pacient č.1 s pozitívnou RA a bolesťami na hrudníku, laboratórne pozitívny troponín s dynamikou

A: CCTA šikmé zobrazenie pravej koronárnej artérie (RCA) bez nálezu stenózy. B: šikmé zobrazenie *ramus interventricularis anterior* (LAD) bez nálezu stenózy. C: šikmé zobrazenie preokluzívnej stenózy (čierna šípka) v odstupe *ramus circumflexus* (LCx). D: 3D rekonštrukcia s odstupovou preokluzívnou stenózou *ramus circumflexus* (šípka)



Obrázok 2 Pacient č.2 s pozitívnou RA s arteriálnou hypertenziou, a atypickými bolesťami na hrudníku

A: CCTA šikmé zobrazenie RCA so stenózou do 59% (šípka). B: šikmé zobrazenie LAD s nálezom viacerých segmentárnych stenóz s maximom do 69% (šípka). C: známky hypoperfúzie myokardu po farmakologickej záťaži v povodí *ramus interventricularis anterior* (šípka)

Diskusia

Prevažná väčšina vyšetrených pacientov bolo ambulantných avšak v poslednej dobe si našla CT koronarografia svoje miesto aj u hospitalizovaných pacientov, ktorým spoľahlivo vylúčila podozrenie na obštrukčnú ischemickú chorobu srdca, a tým vylúčenie možnej kardiálnej príčiny ťažkostí, čo v podstatnej miere skrátilo dobu ich hospitalizácie [6]. Nami sledovaná hodnota radiačnej dávky korelovala alebo sa približovala k výsledkom randomizovaných štúdií, v niektorých prípadoch sa nám podarilo dávku výrazne redukovať pod referenčnú hodnotu [7, 8].

Záver

CT koronarografia ma svoje neodmysliteľné miesto pri neinvazívnej diagnostike symptomatických pacientov s podozrením na ICHS. S vysokou senzitivitou a negatívnou prediktívnou hodnotou dokáže spoľahlivo vylúčiť obštrukčnú ICHS. Výhodou je tiež relatívne nízka radiačná záťaž. Vyšetrenie je spojené s detekciou kalciového skóre, čo predstavuje jeden s diagnostických faktorov aortálnej stenózy.

Literatúra

[1] Geleijns, *Cardiac CT*. 2013, January: 55–67.

- [2] Kuchynka, *Cor et Vasa*. **2015**, 57(6): 425–432.
- [3] <https://www.solen.sk/storage/file/article/661f52b38dc6f6d027c8584ab25bba56.pdf>, **2017**.
- [4] Leipsic, *Journal of Cardiovascular Computed Tomography*. **2014**.
- [5] Song, *Journal of Thoracic Disease*. **2018**, 10(4): 2365–2376.
- [6] Muhammad Sohaib Nazir, *Cardiovascular Research*, **2019**, 115.
- [7] Gosling, *Heart*. **2010**, 96: 922–926.
- [8] Sabarudin, *Sci. Rep.* **2019**, 9: 4374.

Výskyt superoxiddismutázy 1 a jej cytosolového prenášača medi v exokrinnom pankrease - imunohistochemická štúdia

Vrzgula, M.¹, Mihalik, J.¹, Kreheľová, A.¹, Rozprávková, M.¹, Hodorová, I.¹

¹Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav anatómie, Košice
marko.vrzgula@upjs.sk

Abstract

The pancreas is an exocrine and endocrine gland. The exocrine section is a serous gland responsible for producing and releasing digestive enzymes into the duodenum. The secretory units, either tubuloacinar or acinar in shape, comprise pyramidal serous cells. Centroacinar cells constitute the beginning of the duct system and are connected to the intercalated duct cells. Short intercalated ducts drain into intralobular ducts, and intralobular ducts open into the interlobular ducts. Finally, the interlobular ducts drain into the main or accessory pancreatic duct. Superoxide dismutases are enzymes that are present in all organisms that exist in an oxygen-rich environment. The leading role of superoxide dismutase 1 is to prevent oxidative stress by eliminating superoxide and regulate cellular signalling. Oxidative stress has been linked to various aspects of cancer biology. Copper chaperone for superoxide dismutase 1 is an essential ion-binding protein for maintaining copper homeostasis. It is also known to play a role in various other biological processes in mammals. Its primary molecular function is to transport copper to superoxide dismutase 1 and activate superoxide dismutase 1.

Keywords: antioxidants, immunohistochemistry, pancreas, superoxide dismutase

Úvod

Pankreas je sekundárne retroperitoneálne uložená žľaza, ktorá má exokrinnú aj endokrinnú funkciu. Exokrinná časť pankreasu tvorí tráviace enzýmy, ktoré sú transportované systémom vývodov do dvanástnika. Medzi bunky exokrinnnej časti pankreasu zaraďujeme serózne acinárne bunky pyramídového tvaru, ploché polyedrické centroacinózne bunky a epitelové bunky vývodov. Vsunuté vývody pankreasu vystiela jednovrstvový plochý epitel. Intralobulárne vývody sú lemované kubickým až nízkym cylindrickým epitelom. Interlobulárne vývody ústia do hlavného príp. prídavného pankreatického vývodu a sú lemované cylindrickými epitelovými bunkami usporiadanými do jednej vrstvy. Endokrinnú časť pankreasu tvoria Langerhansenove ostrovčeky. V rámci aeróbného metabolizmu vznikajú v bunkách pankreasu reaktívne formy kyslíka. Najčastejšie sú reaktívnymi formami kyslíka voľné radikály. Voľný radikál je chemická entita (atóm, molekula alebo ión), ktorá má vo vonkajšej sfére svojho elektrónového obalu aspoň jeden nespárovaný elektrón, v dôsledku čoho má relatívne vysokú reaktivitu. Pred negatívnym účinkom voľných radikálov chráni bunku antioxidantné enzýmy. Dôležitú úlohu v enzýmovom antioxidantnom systéme zohráva superoxiddismutáza (SOD), ktorá katalyzuje premenu superoxidu na kyslík a peroxid vodíka. Superoxid patrí medzi voľné kyslíkové radikály a vzniká v organizme najmä v rámci dýchacieho reťazca na vnútornej membráne mitochondrií. Dýchací reťazec predstavuje celý rad na seba nadväzujúcich oxidačnoredukčných systémov, v rámci ktorých sa rôznym substrátom odštiepuje vodík, ktorý sa prenáša cez tieto systémy najprv ako atóm vodíka, a potom len ako elektróny, až na kyslík, ktorý sa do bunky dostal difúziou. V rôznych organizmoch sa vyvinuli tri rozdielne triedy superoxiddismutáz, ktoré majú rozličné ióny kovov

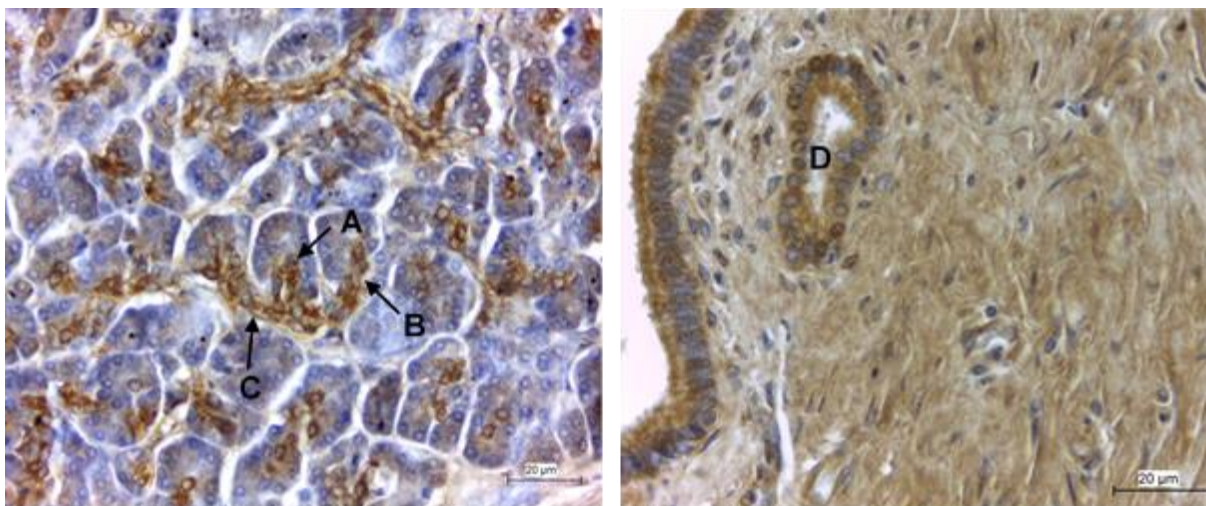
v katalytickom centre. Okrem odlišných požiadaviek na kofaktory kovových iónov majú superoxiddismutázy aj variabilné subcelulárne lokalizácie. SOD1 (CuZn-SOD) je homodimérny bimetaloenzým, ktorý využíva meď na katalýzu a zinok na zvýšenie katalytickej účinnosti a stabilizáciu samotného enzýmu. SOD1 má molekulovú hmotnosť 32 kDa a je hlavnou cytosolickou formou superoxiddismutáz [1]. Hoci je SOD1 primárne distribuovaná v cytosole, nachádza sa aj v bunkových organelách ako sú jadro, lyzozómy a peroxizómy, bola objavená aj intermembránovom priestore mitochondrií [2]. SOD1 gén je lokalizovaný u ľudí na chromozóme 21. Ľudský cytosolový prenášač medi pre SOD 1 (CCS) je homodimér s molekulovou hmotnosťou 54 kDa [3]. Je to meď viažuci proteín, ktorého primárnou molekulárnou funkciou je dodávanie medi SOD1 a tým aktivácia SOD1. Reguluje však funkcie aj rôznych iných proteínov ako napr. Mia40 a XIAP [4]. Mia40 je bielkovinový receptor lokalizovaný vo vnútri intermembránového priestoru mitochondrií, ktorý pomáha rozličným proteínom dostať sa medzi vonkajšiu a vnútornú mitochondriálnu membránu [5]. XIAP je meď viažuci proteín exprimovaný vo zvýšenej miere pri viacerých typoch rakoviny. Je zapojený do regulácie apoptózy tak, že blokuje kaspázy dôležité v procese bunkovej smrti [6]. Po naviazaní medi na XIAP, ktorú mu doručil CCS, dochádza k inhibícii funkcie XIAP, čo následne vedie k iniciácii apoptózy. V bunke je CCS lokalizovaný najmä v cytosole, ale aj v jadre a v intermembránovom priestore mitochondrií [7]. Gén kódujúci humánny CCS je lokalizovaný na chromozóme 11.

Materiál a metodika

Zmapovanie výskytu SOD 1 a CCS v bunkách exokrinného pankreasu sme realizovali na 5 vzorkách zdravého humánneho pankreasu. Materiál vo forme parafínových bločkov bol pre účely tejto štúdie zapožičaný po schválení Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice L. Pasteura (UNLP) v Košiciach z Oddelenia patológie UNLP. Ďalšie spracovanie vzoriek prebehlo na Ústave anatómie Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika v Košiciach. Z parafínových bločkov boli za pomoci sánkového mikrotómu zhotovené rezy s hrúbkou do 5 µm. Po odparafínovaní, rehydratácii a revitalizácii materiálu v PT linku bola zablokovaná aktivita endogénnej peroxidázy v 3% roztoku H₂O₂. Následne boli aplikované primárne králičie polyklonálne protilátky anti-SOD1 a anti-CCS v riedení 1:200. Inkubácia primárnych protilátok trvala 60 minút a prebehla pri laboratórnej teplote. K spracovávaným vzorkám bol pridaný Biotynilovaný Link, Streptavidín-HRP a na vizualizáciu SOD1 a CCS diaminobenzidín. Po každom uvedenom kroku bol vykonaný oplach v oplachovacom roztoku. Na záver boli vzorky tkanív zafarbené hematoxylínom. Následne bol celý postup zopakovaný ešte raz bez pridania primárnych protilátok pre potrebu negatívnej kontroly. Vzorky boli za pomoci svetelného mikroskopu vyhodnotené dvoma posudzovateľmi prienikom výsledkov ich nezávislých pozorovaní. Na získanie obrazovej fotodokumentácie bola použitá digitálna kamera a LAZ EZ software.

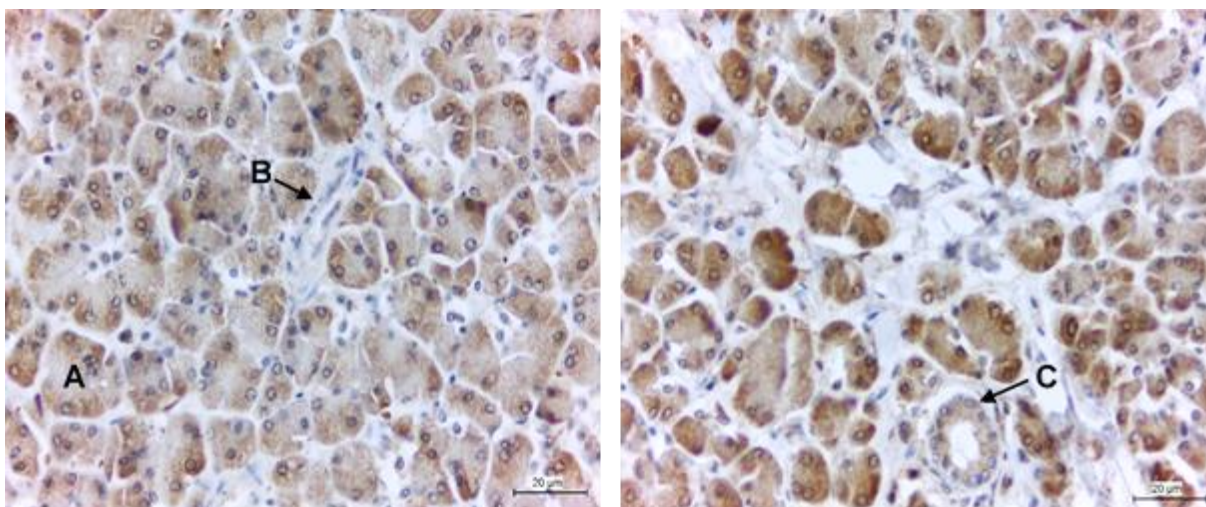
Výsledky

V acinárnych bunkách exokrinnnej časti pankreasu bola detegovaná iba minimálna SOD1 pozitivita. V centroacinózných bunkách, v epitelových bunkách vsunutých vývodov ako aj v epitelových bunkách intralobulárnych a interlobulárných vývodov bola pozorovaná difúzne výrazná SOD1 pozitivita.



Obrázok 1 a 2 Distribúcia SOD1 v bunkách exokrinnnej časti pankreasu (zväčšenie 400x)
Skratky: A – centroacinózne bunky; B – epitelové bunky vsunutých vývodov; C – epitelové bunky intralobulárnych vývodov; D – epitelové bunky interlobulárnych vývodov

Imunohistochemická analýza dokázala prítomnosť CCS v acinárnych bunkách. V najväčšej miere bol proteín lokalizovaný bazálne okolo bunkového jadra. Centroacinózne bunky ako aj epitelové bunky vsunutých a intralobulárnych vývodov vykazovali iba minimálnu CCS pozitivitu. Mierne výraznejšia CCS pozitivita bola objavená v epitelových bunkách interlobulárnych vývodov.



Obrázok 3 a 4 Distribúcia CCS v bunkách exokrinnnej časti pankreasu (zväčšenie 400x)
Skratky: A – acinárne bunky; B – epitelové bunky intralobulárnych vývodov; C – epitelové bunky interlobulárnych vývodov

Diskusia

Exokrinnú časť pankreasu tvoria bunky, ktoré sa zúčastňujú na tvorbe a transporte tráviacich enzýmov. Podobne ako v iných bunkách ľudského tela sa aj v nich v rámci aeróbného metabolizmu tvoria voľné radikály. V prípade narušenej rovnováhy medzi ich tvorbou a degradáciou vzniká oxidačný stres. Voľné radikály spôsobujú oxidačné poškodenie bielkovín, lipidov a nukleových kyselín [1]. Dôležitú úlohu v degradácii superoxidového radikálu zohráva SOD1. Okrem ochrany pred oxidačným stresom sa zmenami v množstve superoxidu a peroxidu vodíka zúčastňuje aj na regulácii viacerých signálnych dráh [8]. Neoplastickou transformáciou buniek exokrinnnej časti

pankreasu vzniká drvivá väčšina pankreatických malignít. Medzi nádory exokrinného pankreasu zaradujeme duktálny adenokarcinóm, pankreatické cystické neoplázie, pankreatické neoplázie z acinárnych buniek a pankreatoblastóm. SOD1 a CCS sa v rôznych bunkách exokrinného pankreasu vyskytujú rôzne. Presná úloha SOD1 v onkogenéze je iba slabo definovaná [9]. U pacientov s duktálnym adenokarcinómom sa potvrdila zvýšená aktivita SOD1 v hemolyzovaných erytrocytoch, hoci klinický význam tohto nálezu ostáva nejasný, pretože celková SOD aktivita nie je u pacientov výraznejšie modifikovaná [10]. Rovnako detailný význam CCS v patogenéze onkologických ochorení nie je doteraz známy. Zistilo sa, že CCS funguje ako potenciálny nádorový promótor pri niektorých typoch rakoviny [11]. Pri inhibícii CCS bola pozorovaná spomalená proliferácia nádorových buniek pri rakovine pľúc a leukémii [12]. Inou štúdiou bolo zistené, že CCS bol vysoko exprimovaný pri rakovine prsníka, kde podporoval proliferáciu a migráciu nádorových buniek. Potlačením expresie CCS došlo k zníženiu aktivity ERK1/2 a zvýšeniu hladín reaktívnych foriem kyslíka, čo viedlo k inhibícii bunkovej proliferácie a migrácie [11].

Záver

Rakovina pankreasu patrí medzi najobávanejšie onkologické ochorenia. Zmapovanie výskytu SOD1 a CCS v bunkách exokrinnej časti zdravého pankreasu a následne zhodnotenie lokalizácie týchto proteínov v rôzne diferencovaných nádorových bunkách pankreasu vytvára predpoklad pre hlbšie pochopenie ich intracelulárneho metabolizmu a otvára potenciálnu možnosť použiť ich ako prognostické biomarkery.

Práca bola podporená projektom VEGA č.1/1073/19.

Literatúra

- [1] Fukai et Ushio-Fukai, *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, 15(6): 1583–606.
- [2] Tsang, *Nat. Commun.* **2014**, 5: 3446.
- [3] Son et Elliot, *J. Neurol. Sci.* **2014**, 336/1: 1–7.
- [4] Ge, *Protein. J.* **2019**, 38(4): 463–71.
- [5] Peleh, *Elife.* **2016**, 5: e16177.
- [6] Mufti, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 463(2): 168–74.
- [7] Brad, *Mol. Cell. Biol.* **2010**, 30(8):1923–36.
- [8] Li, *Int. J. Oncol.* **2015**, 46(6): 2613–20.
- [9] Wilkes, *Antioxidants (Basel).* **2017**, 6: 1–14.
- [10] Kodydkova, *Pancreas.* **2013**, 42(4): 614–21.
- [11] Li, *Front. Pharmacol.* **2019**, 10: e356.
- [12] Wang, *Nat. Chem.* **2015**, 7: 968–79.

Génové varianty vaskulárneho endotelového rastového faktora a ich vplyv na riziko vzniku a progresie karcinómu prostaty

Blahušiak Drobková, H.¹, Jurečková, J.², Kmeťová Sivoňová, M.², Kliment, J. Jr.³, Híveš Holečková, K.^{1,3}, Mazuchová, J.⁴, Péč, M.⁴, Kliment, J.³

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Urologická klinika Univerzitnej nemocnice Martin, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin
henrieta.drobkova@uniba.sk

Abstract

The main aim of this study was to observe the possible influence of -2578 A/C, 18 bp I/D, -460 C/T polymorphisms in the gene for vascular endothelial growth factor (VEGF), which has an important role in the process of cell proliferation and angiogenesis, on the risk of prostate cancer development and progression. During study, we processed blood samples taken from 446 patients with prostate cancer and 241 healthy men. We isolated DNA from all samples and determined gene polymorphisms by using polymerase-chain reaction-restriction fragment length polymorphisms analysis (PCR-RFLP). We detected no significant association between the individual polymorphisms studied and the risk of prostate cancer development and also clinical data (Gleason score, PSA – prostate specific antigen). The results of the study show that individual polymorphisms of *VEGF* gene do not significantly contribute to the development and progression of prostate cancer.

Keywords: prostate cancer, vascular endothelial growth factor, polymorphisms

Úvod

Výskyt nádorových ochorení vo svetovej populácii má stúpajúcu tendenciu. Podľa údajov Globocan z roku 2012 predstavoval karcinóm prostaty celosvetovo 14,8% zo všetkých nádorových ochorení [1]. Medzi jednotlivými krajinami existujú výrazné rozdiely v incidencii tohto ochorenia a aj v jeho mortalite. Slovenská republika patrí medzi krajiny so stredne vysokými hodnotami výskytu ochorenia, pričom možno pozorovať prudký nárast v jeho incidencii [1].

V patogeneze karcinómu prostaty zohráva významnú úlohu dráha angiogenézy, v regulácii ktorej sú zapojené rôzne špecifické proteíny, vrátane rastových faktorov a cytokínov. Angiogenéza je biologický proces zahŕňajúci delenie a migráciu endotelových buniek, ktorý vedie k vytvoreniu mikrovaskulatúry, teda nových krvných ciev z pôvodných existujúcich ciev [2–4].

Vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF), homodimerický heparín viažuci glykoproteín, je špecifickým mitogénom endotelových buniek, ktorý zvyšuje cievnu permeabilitu [5] a stimuluje nielen fyziologickú, ale aj nádorovú angiogenézu [6]. VEGF, patriaci do skupiny hlavných proangiogénnych faktorov, prostredníctvom väzby na špecifické receptory aktivuje VEGF signálnu dráhu, ktorá podporuje proliferáciu, migráciu a inváziu endotelových buniek a schopnosť týchto buniek degradovať a pretvárať extracelulárnu matrix. Tieto procesy vyúsťujú do iniciácie angiogenézy [7, 8]. V nádorových bunkách sa VEGF zúčastňuje aj parakrinnej a autokrinnej VEGF signalizácie, ktorá ovplyvňuje funkcie nádoru nezávisle od angiogenézy. Pre nádorové bunky je charakteristická autokrinná VEGF signalizácia [9]. VEGF, vylučovaný

nádorovými bunkami, prostredníctvom autokrinnej VEGF signalizácie podporuje dediferenciáciu a lepšie prežívanie nádorových buniek, ako aj inváziu nádorov. Zvyšovaním cievnej permeability VEGF uľahčuje nádorovým bunkám vstúpiť do cirkulácie, čo umožňuje metastázovanie do vzdialených miest [6, 10, 11]. Gén kódujúci VEGF je lokalizovaný na chromozóme 6 (6p21.1) a zahŕňa 14 kilobáz (kb) kódujúcu oblasť pozostávajúcu z ôsmich exónov a siedmich intrónov [12]. Karcinóm prostaty je heterogénne malígne ochorenie, u ktorého bola zistená veľká variabilita v expresii špecifických markerov produkovaných nádorovými bunkami. Polymorfizmy v géne pre VEGF môžu výrazne prispieť k malígnej transformácii buniek prostaty, prípadne ovplyvniť progresiu ochorenia, tvorbu metastáz ako aj účinnosť terapie. Cieľom štúdie bolo sledovať možný vplyv vybraných polymorfizmov v géne *VEGF* (-2578 A/C rs699947; 18 bp I/D rs144854329; -460 C/T rs833061) na riziko vzniku a progresie karcinómu prostaty.

Materiál a metódy

V rámci štúdie bolo celkovo spracovaných 687 vzoriek krvi odobratých od mužov vo veku nad 50 rokov, po schválení tejto štúdie Etickou komisiou JLF UK v Martine. Skupinu pacientov tvorilo 446 mužov s histologicky verifikovanou diagnózou karcinómu prostaty [priemerný vek = 66,8±8,09 rokov; medián koncentrácie prostatického špecifického antigénu (PSA) = 9,18 ng/ml (interkvartilový rozsah = 5,30 - 20,07 ng/ml); priemerné Gleasonovo skóre 7,03±1,30], ktorí boli hospitalizovaní na Urologickej klinike Univerzitnej Nemocnice Martin. Do súboru neboli zaradení pacienti, u ktorých boli okrem karcinómu prostaty zistené aj iné závažné ochorenia. Kontrolnú skupinu tvorilo 241 mužov [priemerný vek = 57,99±9,73 rokov; medián koncentrácie prostatického špecifického antigénu (PSA) = 1,06 ng/ml (interkvartilový rozsah = 0,54 - 2,39 ng/ml)], ktorým pri urologickom vyšetrení nebolo zistené žiadne ochorenie prostaty, ani iné onkologické ochorenie.

Všetkým mužom zaradeným do štúdie sme odoberali 5 ml venózne krvi do K₂EDTA skúmaviek. Izoláciu DNA sme robili zo všetkých vzoriek pomocou Wizard® Genomic DNA Purification kitu (Promega, Madison, WI, USA). Vzorky DNA sme uchovávali pri -20°C. Génové polymorfizmy sme stanovovali pomocou polymerázovej reťazovej reakcie s následným štiepením špecifickými restriktónymi enzýmami na určenie konkrétnych genotypov (PCR-RFLP). Amplifikácia fragmentov DNA sa uskutočnila v 12 µl master mixe, ktorý pozostával z 1 µl izolovaných vzoriek génomovej DNA, 6 µl DreamTaq Green PCR Master mixu (2x) (zmes pufru, Mg²⁺, dNTP a DNA Taq polymerázy), 0,4 - 0,5 µl špecifického primeru (priamy a spätný primer) a 4 - 4,2 µl vody bez DNáz. Použité primery, špecifické pre určitú cieľovú sekvenciu, sú uvedené v tabuľke 1.

Podmienky pre PCR amplifikáciu boli nasledovné: 5 minút počiatočná denaturácia pri 95°C, 30 - 50 sekúnd denaturácia pri 95°C, 30 - 40 sekúnd hybridizácia pri rozličných anelačných teplotách (tab. 1), 45 - 50 sekúnd elongácia pri 72°C, 5 - 10 minút konečná elongácia DNA pri 72°C. Podmienky (anelačná teplota pre naviazanie primerov, počet cyklov) sme menili v závislosti od použitých špecifických primerov a dĺžky množeného úseku DNA, pričom kroky 2 - 4 sa 28–35-krát cyklicky opakovali. Pri stanovovaní génových polymorfizmov -2578 A/C *VEGF* a -460 C/T *VEGF* sme vzniknuté produkty po PCR následne štiepli špecifickými restriktónymi enzýmami na určenie konkrétnych genotypov (tab. 1) pri optimálnych reakčných podmienkach: 37°C, 15 - 30 minút. 18 bp I/D – inzerčno-delečný polymorfizmus v dĺžke 18 bp na pozícii -2549 génu *VEGF* sme určovali pomocou PCR analýzy s využitím sekvenčne-špecifických primerov. Jednotlivé DNA fragmenty po PCR a restriktnej

analýze sme separovali použitím gélovej elektroforézy v 2% alebo 4% agarózových géloch, obsahujúcich interkalačné činidlo etídiumbromid. Následne sme DNA produkty vizualizovali pod ultrafialovým svetlom.

Tabuľka 1 Špecifické podmienky pre analýzu jednotlivých polymorfizmov v géne *VEGF*

Pozícia v géne <i>VEGF</i>	Sekvencia F (priamych) a R (spätných) primerov (5'-3')	Anelačná teplota (°C)	Restrikčný enzým	Veľkosť produktu (bp)
-2578 A/C	F: GCA CCT CCA CCA AAC CAC AGC AAC AT R: CAA GCC CCC TTT TCC TCC AAC TCT CC	62 °C	BglII	360; 205, 155
18 bp I/D	F: CCT GGA GCG TTT TGG TTA AA R: ATA TAG GAA GCA GCT TGG AA	59 °C	-	234, 216
-460 C/T	F: CTC TTT AGC CAG AGC CGG GG R: TGG CCT TCT CCC CGC TCC GAC	60 °C	Hin1I	175; 153, 22

Na porovnanie distribúcie genotypov a alel medzi kontrolnou skupinou a skupinou pacientov ako aj vyhodnotenie asociácie s klinickými údajmi sme použili chí-kvadrát test a Fischerov test. Frekvencie výskytu genotypov jednotlivých polymorfizmov boli testované na odchýlky od Hardy-Weinbergovej rovnováhy. Za významné sme považovali hodnoty $p < 0,05$. Na štatistické analýzy sme použili štatistický program StatsDirect verzia 2.7.0.2.

Výsledky

V súvislosti s rizikom vzniku a progresie karcinómu prostaty sme pozorovali niekoľko polymorfizmov v promótorovej oblasti génu *VEGF*: -2578 A/C (rs699947), 18 bp I/D – inzerčno-delečný polymorfizmus v dĺžke 18 bp na pozícii -2549 (rs144854329) a -460 C/T (rs833061). Distribúcia genotypov v kontrolnej skupine bola u všetkých sledovaných polymorfizmov v géne *VEGF* v Hardyho-Weinbergovej rovnováhe. Pri sledovaní polymorfizmov -2578 A/C, 18 bp I/D a -460 C/T v géne *VEGF* sme nepozorovali štatisticky významnú asociáciu týchto polymorfizmov s rizikom vzniku karcinómu prostaty (tab. 2).

Tabuľka 2 Distribúcia genotypov a alel polymorfizmov *VEGF*

Genotypy a alely	Kontrola (%)	Karcinóm prostaty (%)	OR (95% CI)	p
-2578 A/C <i>VEGF</i>				
AA	25,73	28,70	1,00 (ref.)	
AC	48,54	45,07	0,91 (0,62-1,34)	0,63
CC	25,73	26,23	1,09 (0,71-1,69)	0,68
A	50,00	48,77	1,00 (ref.)	
C	50,00	51,23	1,05 (0,84-1,31)	0,66
18 bp I/D <i>VEGF</i>				
II	26,55	26,01	1,00 (ref.)	
ID	47,72	45,74	0,98 (0,67-1,43)	0,91
DD	25,73	28,25	1,12 (0,73-1,73)	0,60
I	50,41	48,88	1,00 (ref.)	
D	49,59	51,12	1,06 (0,85-1,33)	0,59
-460 C/T <i>VEGF</i>				
CC	25,73	26,23	1,00 (ref.)	
CT	48,54	45,07	0,91 (0,62-1,34)	0,63
TT	25,73	28,70	1,09 (0,71-1,69)	0,68
C	50,00	51,23	1,00 (ref.)	
T	50,00	48,77	1,05 (0,84-1,31)	0,66

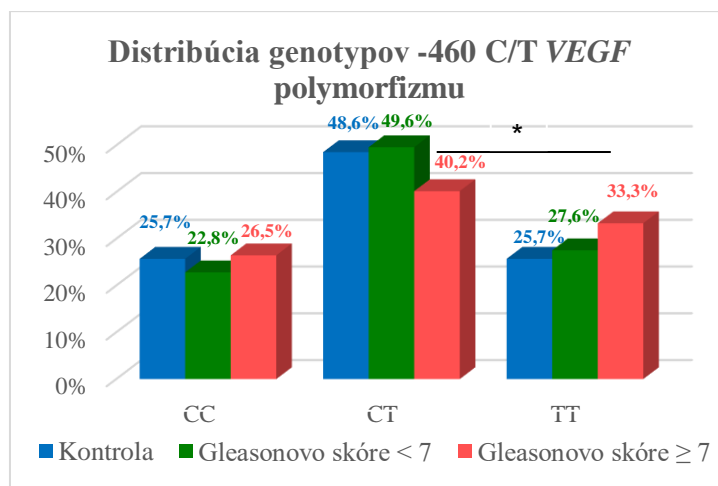
Následne sme pacientov rozdelili do skupín podľa patologického Gleasonovho skóre (Gleasonovo skóre < 7 a Gleasonovo skóre ≥ 7) a koncentrácií PSA (PSA < 10 ng/ml a PSA ≥ 10 ng/ml) a zisťovali sme asociáciu týchto polymorfizmov s vybranými

klinickými charakteristikami (Gleasonovým skóre a PSA), ktoré patria k markerom používaným pri určovaní agresivity ochorenia.

Po rozdelení pacientov do skupín podľa Gleasonovho skóre sme nezistili štatisticky významnú asociáciu žiadnej alely a ani genotypu sledovaných polymorfizmov so vznikom karcinómov s Gleasonovým skóre <7, ani Gleasonovým skóre ≥7 (tab. 3). Zaznamenali sme len, že AC genotyp polymorfizmu -2578 *VEGF* (OR = 0,65; 95% CI 0,42 - 1,01; p = 0,054) v porovnaní s CC genotypom a tiež ID genotyp polymorfizmu 18 bp I/D *VEGF* (OR = 0,68; 95% CI 0,44 - 1,07; p = 0,09) v porovnaní s TT genotypom boli spojené so zníženým rizikom vzniku karcinómov prostaty s Gleasonovým skóre ≥7 (kompletné výsledky nie sú uvedené). Zistili sme tiež, že CT genotyp polymorfizmu -460 *VEGF* (OR = 0,64; 95% CI 0,41 - 0,997; p = 0,048) bol v porovnaní s TT genotypom u pacientov spojený so štatisticky významne zníženým rizikom vzniku karcinómov prostaty s Gleasonovým skóre ≥7 (obr. 1) (kompletné výsledky nie sú uvedené).

Tabuľka 3 Analýza asociácie polymorfizmov *VEGF* s rizikom vzniku karcinómu prostaty u pacientov rozdelených podľa Gleasonovho skóre

Polymorfizmy <i>VEGF</i>	Gleasonovo skóre < 7		Gleasonovo skóre ≥ 7		Gleasonovo skóre < 7 vs. Gleasonovo skóre ≥ 7	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
-2578 A/C						
AA	1,00 (ref.)		1,00 (ref.)		1,00 (ref.)	
AC	1,04 (0,61-1,77)	0,88	0,83 (0,52-1,32)	0,43	0,80 (0,46-1,38)	0,42
CC	1,13 (0,62-2,05)	0,69	1,28 (0,78-2,12)	0,33	1,14 (0,62-2,08)	0,68
18 bp I/D						
II	1,00 (ref.)		1,00 (ref.)		1,00 (ref.)	
ID	1,10 (0,65-1,86)	0,74	0,91 (0,57-1,44)	0,69	0,83 (0,48-1,44)	0,51
DD	1,17 (0,64-2,12)	0,61	1,33 (0,80-2,20)	0,27	1,14 (0,62-2,09)	0,67
-460 C/T						
CC	1,00 (ref.)		1,00 (ref.)		1,00 (ref.)	
CT	1,15 (0,67-1,97)	0,61	0,81 (0,51-1,28)	0,36	0,70 (0,40-1,22)	0,21
TT	1,21 (0,66-2,21)	0,54	1,26 (0,76-2,08)	0,37	1,04 (0,57-1,92)	0,89



Obrázok 1 Distribúcia genotypov -460 C/T *VEGF* polymorfizmu u pacientov rozdelených podľa Gleasonovho skóre. * – p < 0,05

Po rozdelení pacientov do skupín podľa sérových koncentrácií PSA (PSA < 10 ng/ml a PSA ≥ 10 ng/ml) sme ani v jednej skupine pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou nezistili štatisticky významnú asociáciu medzi alelami, ani genotypmi

pozorovaných polymorfizmov *VEGF* (-2578 A/C, 18 bp I/D, -460 C/T) a karcinómom prostaty (tab. 4).

Tabuľka 4 Analýza asociácie polymorfizmov *VEGF* s rizikom vzniku karcinómu prostaty u pacientov rozdelených podľa koncentrácií PSA

Polymorfizmy <i>VEGF</i>	PSA < 10 ng/ml		PSA ≥ 10 ng/ml		PSA < 10 ng/ml vs. PSA ≥ 10 ng/ml	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
-2578 A/C						
AA	1,00 (ref.)		1,00 (ref.)		1,00 (ref.)	
AC	0,98 (0,61-1,57)	0,94	0,90 (0,55-1,46)	0,67	0,92 (0,55-1,54)	0,74
CC	1,23 (0,73-2,08)	0,43	1,16 (0,68-1,99)	0,58	0,94 (0,54-1,65)	0,84
18 bp I/D						
II	1,00 (ref.)		1,00 (ref.)		1,00 (ref.)	
ID	1,07 (0,67-1,70)	0,79	0,92 (0,57-1,50)	0,75	0,87 (0,52-1,45)	0,59
DD	1,30 (0,77-2,19)	0,32	1,15 (0,67-1,97)	0,61	0,88 (0,50-1,55)	0,66
-460 C/T						
CC	1,00 (ref.)		1,00 (ref.)		1,00 (ref.)	
CT	1,00 (0,63-1,61)	0,99	0,90 (0,55-1,46)	0,67	0,90 (0,53-1,51)	0,68
TT	1,28 (0,76-2,16)	0,35	1,16 (0,68-1,99)	0,58	0,91 (0,52-1,59)	0,73

Diskusia

Karcinóm prostaty možno považovať za heterogénne a multifaktoriálne ochorenie. Presná príčina vzniku a progresie tohto ochorenia zatiaľ nebola objasnená. V patogenéze karcinómu prostaty sú zapojené rôzne molekulové a genetické mechanizmy, pričom vznik a progresia tohto ochorenia je často spojená s výskytom bežných variantov v génoch dôležitých biologických dráh. Gén *VEGF* je vysoko polymorfný a jeho expresiu môže ovplyvňovať niekoľko polymorfizmov, ktoré boli skúmané u rôznych nádorových ochorení. V našej štúdii sme sa zamerali na sledovanie polymorfizmov, ktoré neboli študované alebo boli len málo študované v súvislosti s karcinómom prostaty v kaukazskej populácii, pričom publikované výsledky sú protichodné. Presný mechanizmus účinku týchto polymorfizmov nebol zatiaľ objasnený, no predpokladá sa, že by mohli vplývať na transkripčnú aktivitu génu *VEGF* a následne ovplyvniť koncentrácie proteínu VEGF v plazme, resp. v tkanive. Keďže VEGF podporuje angiogénu, je možné, že vyššie koncentrácie VEGF v mikroprostredí nádoru indukujú rýchlejšiu progresiu a prežívanie reziduálneho nádoru a môžu prispieť k rozvoju metastáz alebo k lokálnej recidíve ochorenia [13].

Prvým zo sledovaných polymorfizmov v géne *VEGF* bol polymorfizmus -2578 A/C v promótorovej oblasti. Na základe výsledkov metaanalýzy, Chen Q *et al.* [14] poukázali na jeho asociáciu s rizikom vzniku určitých typov nádorov napr. karcinómu pľúc a kolorektálneho karcinómu. V súvislosti s karcinómom prostaty však metaanalýzy nezaznamenali konzistentné výsledky, vzhľadom na malý počet vyhodnocovaných štúdií. Asociácia tohto polymorfizmu s rizikom vzniku karcinómu prostaty bola naznačená len pre recesívny model (AA verus CC/CA: OR = 1,53; 95% CI 1,01 - 2,30; p = 0,04) [14, 15, 16]. Len niekoľko jednotlivých štúdií v rôznych populáciách sa zameralo na sledovanie tohto polymorfizmu v súvislosti s karcinómom prostaty. V niektorých nebola zistená významná súvislosť polymorfizmu -2578 A/C *VEGF* s rizikom vzniku a progresie tohto ochorenia (patologickým štádiom, gradom, PSA hladinami v čase diagnózy alebo vekom) [17, 18] alebo klinickej recidívy ochorenia [19]. Podobne, ani v našej štúdii sme nezistili štatisticky významnú asociáciu tohto polymorfizmu s celkovým rizikom vzniku karcinómu prostaty a tiež niektorými klinickými charakteristikami (Gleasonovo skóre, PSA). Zaznamenali sme len asociáciu AC genotypu polymorfizmu -2578 *VEGF* so zníženým rizikom vzniku karcinómov prostaty s Gleasonovým skóre ≥7 v porovnaní s CC genotypom. Aj keď bol výsledok

na hranici štatistickej významnosti, nie je možné vylúčiť vplyv tohto polymorfizmu na progresiu sledovaného ochorenia. Na rozdiel od predchádzajúcich štúdií, Martinez-Fierro *et al.* [20] v mexickej populácii zistili 6,1 násobne zvýšené riziko vzniku karcinómu prostaty v spojitosti s CC genotypom -2578 *VEGF*, pričom AA genotyp -2578 *VEGF* bol spojený s ochranným efektom v súvislosti so vznikom tohto ochorenia (až 84%) (OR = 0,16; 95% CI 0,04 - 0,71; p = 0,007). Pri hľadaní asociácie tohto polymorfizmu s agresivitou karcinómu prostaty (Gleasonovo skóre, PSA) však títo autori nezaznamenali štatisticky významné výsledky. Mechanizmus, ktorým by tento funkčný polymorfizmus mohol vplývať na riziko vzniku niektorých nádorov, môže byť spojený so skutočnosťou, že -2578 A/C *VEGF* polymorfizmus leží v rámci potenciálneho GATA-2 väzbového miesta a C alela môže stimulovať aktiváciu *VEGF* promótoru prostredníctvom GATA-2 transkripčného faktora [21].

Ďalším pozorovaným polymorfizmom v promótorovej oblasti bol polymorfizmus 18 bp I/D *VEGF*. Tento polymorfizmus bol sledovaný v niekoľkých štúdiách zameraných na rôzne ochorenia, pričom len málo z nich sa týkalo nádorových ochorení [22, 23]. Sledovaný bol len u karcinómu prsníkov a kolorektálneho karcinómu [24, 25]. U pacientok s karcinómom prsníkov bola zistená vyššia frekvencia II genotypu a I alely v porovnaní so zdravými jedincami. Alela D a genotyp ID tohto polymorfizmu mali ochranný efekt [25]. Naopak, Ungerback *et al.* [24] nezistili asociáciu medzi genotypmi tohto polymorfizmu a kolorektálnym karcinómom ako aj jeho klinicko-patologickými charakteristikami. Podobne sme ani v našej práci nezistili asociáciu medzi týmto polymorfizmom a karcinómom prostaty, ani niektorými sledovanými klinickými charakteristikami tohto ochorenia (Gleasonovo skóre, PSA). Zistili sme len asociáciu na hranici štatistickej významnosti medzi ID genotypom tohto polymorfizmu a zníženým rizikom vzniku karcinómov s vyšším gradom (Gleasonovo skóre ≥ 7) v porovnaní s DD genotypom, čo môže poukazovať na možný vplyv tohto polymorfizmu na progresiu ochorenia. Súvislosť polymorfizmu 18 bp I/D *VEGF* s karcinómom prostaty zatiaľ podľa našich vedomostí nebola skúmaná a publikovaná. Naša štúdia je pravdepodobne prvou v tejto oblasti. Funkčný mechanizmus vplyvu tohto polymorfizmu zatiaľ nie je známy. Predpokladá sa, že prítomnosť alely D môže byť spojená so zvýšením transkripcie, čo by pravdepodobne mohlo viesť k zvýšeniu koncentrácií *VEGF* [22]. Ungerback *et al.* [24] síce popísali 2,1 násobne zvýšenú expresiu mRNA *VEGF-A* v tkanive u pacientov s kolorektálnym karcinómom v porovnaní so zdravou skupinou jedincov, no nenašli súvislosť so žiadnym genotypom alebo haplotypom sledovaných polymorfizmov (vrátane 18 bp I/D *VEGF*). V publikovanej literatúre sa uvádza, že tento polymorfizmus je v úplnej väzbe s jednonukleotidovým polymorfizmom -2578 A/C *VEGF* a jedinci s alelou A (-2578) majú inzerciu 18 bp, kým jedinci s alelou C (-2578) majú deléciu [22, 26]. Podobný výsledok sme zaznamenali aj v našej štúdii, pričom sme navyše zistili, že s týmito dvomi polymorfizmami je v takmer úplnej väzbe tiež polymorfizmus -460 C/T *VEGF*. Posledným polymorfizmom nachádzajúcim sa v promótorovej oblasti génu *VEGF*, ktorý sme sledovali bol polymorfizmus -460 C/T *VEGF*. Tento polymorfizmus bol analyzovaný v súvislosti s rizikom vzniku a progresie karcinómu prostaty len v niekoľkých štúdiách realizovaných v rôznych populáciách [13, 17, 27, 28]. Výsledky jednotlivých štúdií nie sú konzistentné. Na základe metaanalýzy týchto výsledkov, Chen GQ *et al.* [29] publikovali, že tento polymorfizmus nebol spojený s výskytom, resp. rizikom vzniku karcinómu prostaty. Rovnaký výsledok bol zaznamenaný v podskupine tvorenej kaukazskou populáciou. Vo väčšine publikovaných štúdií nebola zistená asociácia medzi polymorfizmom -460 C/T *VEGF* a celkovým rizikom vzniku a progresie karcinómu prostaty [13, 17, 28]. Tieto výsledky

sú v súlade s našimi zisteniami. Avšak, my sme okrem toho zistili významnú súvislosť CT genotypu polymorfizmu -460 *VEGF* so zníženým rizikom vzniku karcinómov prostaty s Gleasonovým skóre ≥ 7 v porovnaní s TT genotypom, čo naznačuje možný vplyv tohto polymorfizmu na progresiu ochorenia. Naopak Onen *et al.* [28] v tureckej populácii zaznamenali, že CT genotyp bol spojený so zvýšeným rizikom vzniku karcinómov s pT3a-T4b (OR = 2,42; CI 1,09 - 5,39; p = 0,027). V taiwanskej populácii bol zistený štatisticky významný rozdiel vo frekvencii výskytu tohto polymorfizmu medzi kontrolnou skupinou a pacientmi s karcinómom prostaty (p < 0,001), pričom so zvýšeným rizikom bola spájaná T alela a za rizikový genotyp bol považovaný TT genotyp. Súvislosť tohto polymorfizmu s progresiou karcinómu prostaty nebola zistená [27]. Odlišné výsledky publikovali Fukuda *et al.* [13] Hoci pri sledovaní vplyvu tohto polymorfizmu (alel a genotypov) na riziko karcinómu prostaty nezískali štatisticky významné výsledky, na základe ďalších analýz popísali, že C alela, TC alebo CC genotypy polymorfizmu -460 *VEGF* boli významne spojené s vyššou pravdepodobnosťou výskytu klinickej recidívy ochorenia (nárast hodnôt PSA) u pacientov po radikálnej prostatektómii ako aj s horším prežívaním pacientov v porovnaní s TT genotypom. Naopak pri metastázujúcom ochorení bol so štatisticky významne horším prežívaním spojený TT genotyp tohto polymorfizmu. Aj keď sa predpokladá, že prítomnosť C alely môže vplývať na zvýšenie koncentrácie VEGF, funkčný mechanizmus vplyvu sledovaného polymorfizmu zatiaľ nie je známy. Naše výsledky nepotvrdili vplyv žiadneho z genotypov tohto polymorfizmu na zmenu koncentrácií proteínu VEGF v plazme, čo je tiež v súlade s výsledkami predchádzajúcej štúdie [13].

Záver

Hlavným cieľom práce bolo sledovanie polymorfizmov v géne kódujúcom vaskulárny endotelový rastový faktor, ktorý má dôležitú úlohu v procese bunkovej proliferácie a angiogenézy, a úlohy týchto polymorfizmov pri vzniku a progresii karcinómu prostaty. Medzi individuálnymi polymorfizmami v géne *VEGF* (-2578 A/C, 18 bp I/D, -460 C/T) a rizikom vzniku karcinómu prostaty, ako aj klinickými údajmi (Gleasonovo skóre, PSA) sme nezaznamenali štatisticky významnú asociáciu. Analýza génových polymorfizmov, ktoré sa môžu podieľať na etiopatogenéze karcinómu prostaty môže viesť k objaveniu nových markerov pre identifikáciu pacientov s vysokým rizikom vzniku a progresie tohto ochorenia.

Táto práca bola podporená projektmi APVV-15-0181 a VEGA č. 1/0014/22, spolufinancovanými zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Ferlay, *International Journal of Cancer*. **2015**, 136: E359–386.
- [2] Carmeliet and Jain, *Nature*. **2011**, 473: 298–307.
- [3] Weis and Cheresh, *Nature Medicine*. **2011**, 17: 1359–1370.
- [4] Ribatti, *Methods in Molecular Biology*. **2015**, 1214: 1–14.
- [5] Tischer, *Journal of Biological Chemistry*. **1991**, 266: 11947–11954.
- [6] Goel and Mercurio, *Nature Reviews Cancer*. **2013**, 13: 871–882.
- [7] Figg, *Springer-Verlag*, **2010**, 428 s., ISBN 978-1-60327-831-7
- [8] Sissung, *Biochimica et Biophysica Acta*. **2014**, 1846: 446–456.
- [9] Lee, *Cancer Letters*. **2012**, 318: 221–225.
- [10] Sfar, *Cytokine*. **2006**, 35: 21–28.
- [11] Amankwah, *Carcinogenesis*. **2012**, 33: 1259–1269.
- [12] Brogan, *Human Immunology*. **1999**, 60: 1245–1249.
- [13] Fukuda, *Oncology Reports*. **2007**, 18: 1155–1163.
- [14] Chen, *Biomedical Reports*. **2014**, 2: 823–830.

- [15] Chen, *Gene*. **2014**, 534: 286–297.
- [16] Xu and Zhu, *Tumor Biology*. **2014**, 35: 1307–1311.
- [17] Langsenlehner, *European Journal of Cancer*. **2008**, 44: 1572–1576.
- [18] VanCleave, *Prostate*. **2010**, 70: 341–352.
- [19] Langsenlehner, *Strahlentherapie und Onkologie*. **2014**, 190: 364–369.
- [20] Martinez-Fierro, *Cancer Biomarkers*. **2013**, 13: 235–241.
- [21] Nasr, *Clinica Chimica Acta*. **2008**, 395: 124–129.
- [22] Yang, *Journal of Diabetes and its Complications*. **2003**, 17: 1–6.
- [23] Amle, *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*. **2015**, 14: 19.
- [24] Ungerback, *Molecular Medicine Reports*. **2009**, 2: 435–439.
- [25] Kapahi, *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. **2013**, 17: 242–248.
- [26] Langsenlehner, *Strahlentherapie und Onkologie*. **2011**, 187: 784–791.
- [27] Lin, *Urology*. **2003**, 62: 374–377.
- [28] Onen, *Molecular Biology Reports*. **2008**, 35: 17–22.
- [29] Chen, *Tumor Biology*. **2014**, 35: 1875–1879.

Rozvoj psoriázy po vakcinácií proti ochoreniu COVID-19 – kazuistika

Hurtová, T.^{1,2}, Péčová, M.^{3,4}, Adamicová, K.⁵, Vorčáková, K.¹, Šimeková, K.²,
Péč, M.J.⁶, Péčová, R.⁷

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Dermatovenerologická klinika, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika infektológie a cestovnej medicíny, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika hematológie a transfuziológie, Martin; ⁴Univerzitná nemocnica Martin, Onkologické centrum, Martin; ⁵Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej anatómie, Martin; ⁶Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, I.interná klinika, Martin; ⁷Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej fyziológie, Martin
pec5@uniba.sk

Abstract

Since the introduction of vaccination against COVID-19 into clinical practice, cases of sudden worsening or de novo emergence of chronic autoimmune and immunologically mediated diseases have been increasing. The authors present a case report of a patient without a previous history of psoriasis or psoriatic arthritis with the first manifestation of the disease after a COVID-19 vaccination in a full dosing schedule, including histological verification from skin manifestations, together with an overview of available literature data.

Keywords: psoriasis, vaccination, COVID-19

Úvod

Messenger RNA (mRNA)-1273 (Moderna) vakcína, BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) vakcína a Ad26.COV2 vakcína proti adenovírusovému vektoru S (Janssen) spolu s AZD1222 Vaxzevria (AstraZeneca) boli schválené na použitie v prevencii rozvoja ochorenia COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) a predchádzaniu závažného priebehu tohto ochorenia. K tomuto dátumu je celosvetovo zaočkovaných aspoň jednou dávkou rôznych vakcín 69,9% populácie [1]. Psoriáza je chronické zápalové kožné ochorenie. Keďže pacienti na imunosupresívnej a imunomodulačnej liečbe, ktorá je štandardnou pri liečbe psoriázy, boli vylúčení z klinických skúšok vakcín proti ochoreniu COVID-19, neexistujú žiadne údaje o účinnosti a bezpečnosti nových vakcín v tejto populácii pacientov. Vakcinácia ako taká u pacientov so psoriázou bola identifikovaná ako možný spúšťač faktor, doposiaľ bola zdokumentovaná potenciálna súvislosť medzi novým nástupom alebo exacerbáciou psoriázy v reakcii na očkovanie proti Bacillus Calmette-Guérin (BCG), chrípke, tetanu-záškrtu a pneumokokovým polysacharidom [2-6]. Prezentujeme kazuistiku pacienta s novo-diagnostikovanou psoriázou po očkovaní mRNA vakcínou proti ochoreniu COVID-19.

Kazuistika

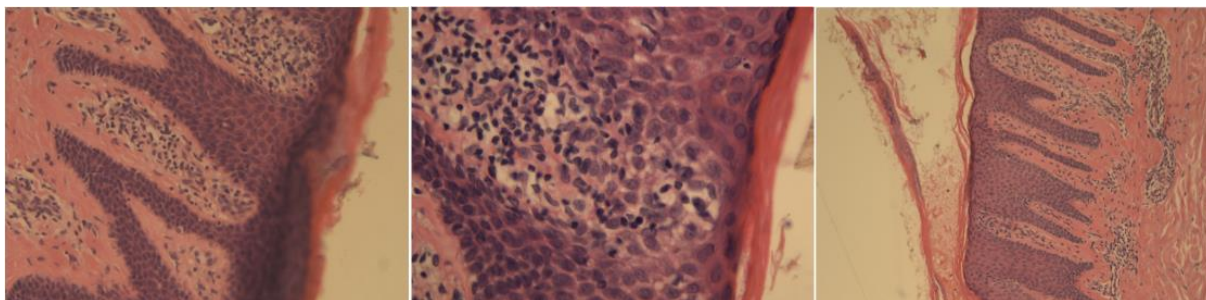
69-ročný pacient bol prijatý pre artralgie (kolená, lakty, proximálne a distálne interfalangeálne kĺby rúk) trvajúce asi tri týždne a opuch pravého členka. V osobnej anamnéze dominovala artériová hypertenzia, ischemická choroba srdca, syndróm karpálneho tunela, dyslipidémia a benígna hyperplázia prostaty, pacient nemal predchádzajúcu anamnézu psoriázy alebo psoriatickej artritídy. Chronicky pacient užíval iba dutasterid. Anamnesticky zisťujeme u pacienta očkovanie proti ochoreniu COVID-19 pred 3 mesiacmi v celkovom počte dávok 3 – 1. a 2. dávka Vaxzevria (AstraZeneca) a 3. dávka mRNA-1273 (Moderna). Počas fyzikálneho vyšetrenia mal

pacient tlak krvi 140/70 mmHg, frekvenciu srdca 80/min. s normosaturáciou a bol afebrilný. Fyzikálnym vyšetrením sa u pacienta zistil opuch pravého členka, bez erytému a palpačnej bolesti, s miernym obmedzením hybnosti a opuch dorza ľavej ruky bez erytému a poruchy hybnosti. V rámci vyšetrenia kože sa našlo erytematózne, ohraničené ložisko so striebnistými šupinami na ľavom kolene (obr. 1).

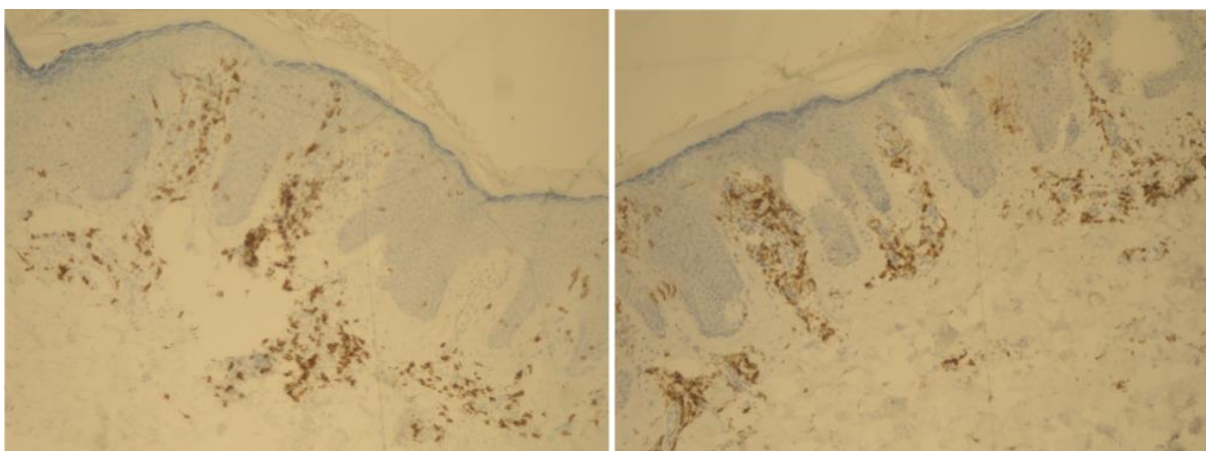


Obrázok 1 Psoriatické ložisko na ľavom kolene

V laboratórnom obraze dominovala elevovaná zápalová aktivita – C-reaktívny proteín 217,4 ng/l a leukocytóza $11,4 \times 10^9/l$. Následne doplnené sonografické vyšetrenie abdomenu a kolonoskopické vyšetrenie preukázali ľahkú kolitídu okolo ústia apendixu a v rektosigme do 30 cm od anu. Po preliečení pacienta antibiotickou liečbou – metronidazolom došlo k poklesu CRP a leukocytov. Stav bol reumatológom a dermatológom zhodnotený ako novozistená suspektná psoriáza a psoriatická artritída. Doplnená biopsia kože z ložiska na kolene potvrdila diagnózu psoriázy (obr. 2 – 3). V histologickom obraze dominovala psoriaziformná dermatitída, prítomná akantotická epiderma, hrubšia granulárna vrstva a kompaktná ortokeratóza s miernym lymfocytovým zápalom dermálnych papíl. Histologicky dokázané zmnoženie CD8+T-Ly v hornej derme psoriatickej kože ako aj pokles pomeru CD4+/CD8+ svedčí o prechode do chronicity. Pacient bol pre pozitívny výsledok PCR testu na ochorenie COVID-19 prepustený do domácej starostlivosti s pravidelnými kontrolami.



Obrázok 2 Vľavo - Psoriaziformná dermatitída. Akantotická epiderma, hrubšia granulárna vrstva a kompaktná ortokeratóza s miernym lymfocytovým zápalom dermálnych papíl (HE; obj. 20x), v strede – Detail na bohatší zápalový infiltrát s minimálnou exocytózou do epidermy (HE; obj. 40x), vpravo – Obráz psoriázy, s výraznou akantózou, zúžením suprapapilárnej vrstvy epidermy, zúženie až strata granulárnej vrstvy a v odlúčenom keratíne ložiská parakeratózy. Pretiahnuté kapiláry s okolitým prevažne lymfocytovým zápalom dopĺňajú obraz (HE; obj. 10x)



Obrázok 3 Vľavo – CD8+T-Ly v hornej derme psoriatickej kože. Zmnoženie týchto buniek svedčí o prechode do chronickej fázy psoriázy (CD8; obj. 10x), vpravo – CD4+T-Ly v hornej derme. Tento bunkový element sa nachádza rovnako hojne tak v akútnej fáze psoriázy, ako aj v chronickej fáze. Pokles pomeru CD4+/CD8+ môže svedčiť pre prechod psoriázy do chronického štádia (CD4; obj. 10x)

Diskusia

Predchádzajúce dostupné štúdie venujúce sa spúšťačom psoriázy uvádzali očkovanie proti chrípke (H1N1), tetanu - záškrtu, BCG a pneumokokovej pneumónii ako iniciačný faktor pre nový nástup alebo vzplanutie psoriázy [2–6]. Vzťah ochorenia COVID-19 a autoimunitných ochorení sledovali rozsiahle retrospektívne štúdie, ktoré poukázali na vyššie riziko psoriázy u pacientov po prekonaní COVID-19 (HR 2,91; 95% CI 2,67-3,17) spolu s ostatnými autoimunitnými ochoreniami [7, 8]. Po rozšírení očkovania, ako nástroja primárnej prevencie, boli popísané v literatúre prípady akútnej exacerbácie psoriázy po očkovaní. Štúdia venujúca sa tejto problematike preukázala signifikantne vyššie riziko vzplanutia psoriázy u pacientov po očkovaní ako u kontrolnej skupiny ($p < 0,05$) [9]. Autori Wu a kol. [10] v svojej práci analyzovali 7 štúdií zaoberajúcich sa novovzniknutou psoriázou, 32 štúdií zaznamenávajúcich vzplanutie psoriázy a 4 štúdie popisujúce oboje. Najviac bola s pozorovanými zmenami asociovaná druhá dávka očkovania [10]. V súčasnosti neexistuje žiadny dobre pochopený patologický mechanizmus pre nový nástup alebo vzplanutie psoriázy po očkovaní. Predchádzajúce štúdie preukázali významné zvýšenie produkcie interleukínu 6 a následne aj vývoj T pomocných 17 (Th17) buniek po BCG, tetanu, záškrtu a chrípkových vakcínach. Zvýšené koncentrácie Th17 buniek sú popisované aj

u pacientov s ťažkým priebehom psoriázy. Keďže čoraz viac dôkazov poukazuje na to, že bunky Th17 majú úlohu v patogenéze psoriázy, možno predpokladať, že mRNA vakcíny COVID-19 pravdepodobne vyvolávajú zvýšenie počtu interleukínu 6 a buniek Th17, čo môže prispieť k vzniku alebo vzplanutiu novej psoriázy u podskupiny pacientov [11].

Záver

V našej práci prezentujeme zriedkavý prípad novovzniknutej psoriázy po očkovaní proti ochoreniu COVID-19. Asociácia spájajúca očkovanie proti tomuto ochoreniu a psoriázu nie je dosiaľ známa, je preto dôležité zvážiť u pacientov so psoriázou pravidelné kontroly po očkovaní.

Literatúra

- [1] <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations> [22.4.2023].
- [2] Gunes, J. *Immunol. Res.* **2015**, 2015, 258430.
- [3] Raaschou-Nielsen, *Acta Derm. Venereol.* **1955**, 35(1): 37–42.
- [4] Munguía-Calzada, *Dermatol. Ther.* **2021**, 34(1): e14684.
- [5] Shi, *Vaccine*. **2017**, 35(36): 4785–4786.
- [6] Yoneyama, J. *Dermatol.* **2019**, 46(11): e442–e443.
- [7] Chang, *EClinicalMedicine*. **2023**;56: 101783.
- [8] Sharma, *Nat. Rev. Rheumatol.* **2023**;1–2.
- [9] Huang, *Front. Med. (Lausanne)*. **2021**;8: 812010.
- [10] Wu, *Am. J. Clin. Dermatol.* **2022**;23(6): 775–799.
- [11] Wei, *JAAD Case Rep.* **2022**;19: 74–77.

Význam proteínu EpCAM pri karcinogénéze prostaty

Híveš Holečková, K.^{1,2}, Kliment, J. ml.¹, Híveš, M.³, Blahušiak Drobková, H.²,
Kliment, J. st.¹

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

Abstract

Prostate cancer (PCa) has been the fear of the male population since the beginning of times. It is the second most commonly diagnosed malignance and one of the most common cause of cancer-related deaths in Slovak men. Uncertainty about the aggressiveness of the detected PCa is a persistent dilemma and the identification of significant markers has improved the diagnosis and curative treatment of patients. Thanks to the radical prostatectomy and radiotherapy patients with localized PCa can achieve excellent long-term survival. However, for recurrent and metastatic diseases, while initially responsive to androgen deprivation therapy, recurrent castration-resistant prostate cancer will inevitably occur, and is often associated with a poor prognosis. The aim of this report is a demonstration of role importance of EpCAM, not only as a functional biomarker in PCa development and therapeutic sensitivity, but also as a promising therapeutic target to repress PCa growth and overcome the resistance to chemo-/radiotherapy.

Keywords: EpCAM, biomarker, prostate cancer, therapy

Úvod

Karcinóm prostaty (KP) je druhým najčastejšie diagnostikovaným onkologickým ochorením slovenským mužov, a v celosvetovom merítku dominuje vo viac ako polovici krajín sveta [1]. Mnohé štúdie sa v súčasnosti zameriavajú na objasnenie etiológie tohto ochorenia a identifikáciu molekulárnych markerov, ktoré by mohli pomôcť pri diferenciácii indolentných a agresívnych foriem KP. Neistota o agresivite detegovaných KP je pretrvávajúcou dilemou a identifikáciou významných markerov by došlo ku zlepšeniu diagnostiky a kuratívnej liečby pacientov [2]. Aktuálnym klinickým problémom ostáva stanovenie účinnej liečby pre pacientov s metastatickým kastrochne rezistentným KP (mKRKP). Počiatočná androgén-deprivačná terapia (ADT) stabilizuje ochorenie na niekoľko rokov, avšak u väčšiny pacientov dochádza k vytvoreniu rezistencie, čo následne vedie k progresii ochorenia [3]. Podľa niektorých klinických štúdií, boli dosiahnuté sľubné výsledky aplikáciou cielenej terapie s použitím rádioligandov prostatického špecifického membránového antigénu (PSMA), ktorý predstavuje vysoko špecifický nádorový marker pre KP s jasnou koreláciou k agresivite nádoru [4]. Hoci po aplikácii uvedenej liečby celkovo pacienti s mKRKP vykazovali lepšie výsledky, niektorí pacienti s nízkou expresiou PSMA na liečbu nereagovali alebo sa u nich objavila rezistencia na podávanú liečbu [5, 6]. V súčasnosti, jedným zo skúmaných potenciálnych terapeutických markerov u pacientov s KP je epiteliálna bunková adhezívna molekula (EpCAM), označovaná aj ako CD326. Je nadmerne exprimovaná u 40-60% prípadov KP a asociovaná s tvorbou metastáz, zvýšeným rizikom recidívy KP a rezistenciou na liečbu [2].

EpCAM

Proteíny rodiny EpCAM (EpCAM a Trop2) sú transmembránové glykoproteíny exprimované na povrchu zdravých epiteliálnych buniek a buniek rôznych typov epiteliálnych nádorov. Ovplyvňujú široké spektrum bunkových procesov (proliferáciu, migráciu, adhéziu), čím sa vo vysokej miere podieľajú na onkogénnej signalizácii (schéma 1) [7]. Proteín EpCAM je významným markerom cirkulujúcich a diseminujúcich nádorových buniek, a preto sa stal jedným z najvyužívanějších transmembránových proteínov pri detekcii cirkulujúcich nádorových buniek (CTC) buniek z krvi pacientov [8]. Expresia proteínu EpCAM je v CTC bunkách desaťnásobne nižšia v porovnaní s primárnymi a metastatickými tkanivami [9]. Aj napriek silnej expresii proteínu EpCAM v primárnych nádoroch boli diseminované bunky u 2/3 pacientov na tento proteín negatívne. Zistilo sa, že k zníženiu expresie dochádza počas epiteliálno-mezenchymálnej tranzície (EMT) [10].

EMT je proces, počas ktorého epiteliálne bunky prechádzajú takými biochemickými zmenami, ktoré im umožnia získať fenotyp mezenchymálnych buniek. Predstavuje kľúčový proces vzniku metastáz, pretože podporuje migračnú kapacitu, invazivitu a disemináciu nádorových epiteliálnych buniek. Tieto bunky sa následne nielenže dostávajú do krvného alebo lymfatického obehu, môžu tiež kolonizovať sekundárne orgány a vytvárať v nich mikrometastázy. Pre rast mikrometastáz je dôležitý spätný proces – mezenchymálne-epiteliálna tranzícia (MET), ktorý umožňuje nádorovým bunkám opätovne získať epiteliálne vlastnosti (adhézia, proliferácia), čím podporuje vznik makrometastáz z diseminovaných buniek [11].

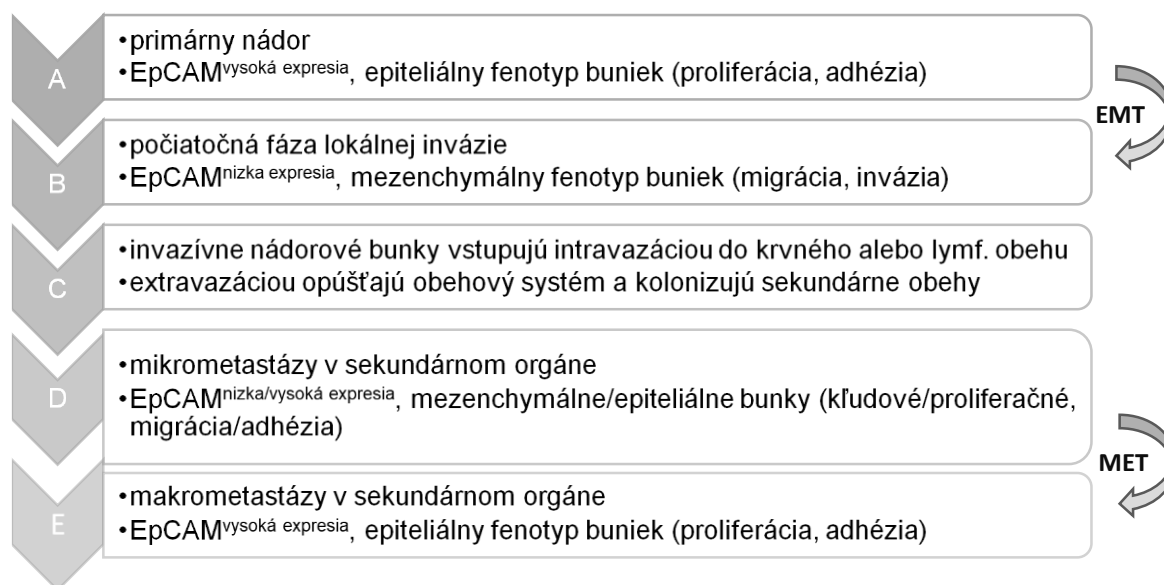


Schéma 1 Expresia proteínu EpCAM počas metastázovania nádoru

Zaujímavosťou je, že heterozygótna delécia v posledných dvoch exónoch génu *TACSTD1* (kódujúceho EpCAM) vedie k hypermetylácii promotora tumor supresorového génu *MSH2* s následnou stratou expresie tohto génu. Gén *MSH2* kóduje proteín, ktorý sa podieľa na opravných procesoch DNA počas bunkového delenia. Mutácie v tomto géne spôsobujú Lynchov syndróm (LS), známy aj ako hereditárny nepolypózny karcinóm kolorekta. Delécie v *TACSTD1* sú príčinou asi 20% prípadov LS, ktoré vykazujú stratu proteínovej expresie, aj napriek tomu, že *MSH2* neobsahuje žiadne mutácie [12, 13].

EpCAM a KP

EpCAM je dôležitým funkčným biomarkerom pri rozvoji KP. Jeho nadmerná expresia koreluje s genézou KP a aktiváciou signálnej dráhy PI3K/Akt/mTOR. Táto dráha zohráva kľúčovú úlohu pri kontrole bunkového cyklu, podieľa sa na regulácii prežívania, proliferácie a pri jej hyperaktivite aj na invázii a migrácii nádorových buniek [2,14,15]. Zvýšená expresia EpCAM je detekovateľná už v počiatočných štádiách KP, ale predovšetkým pri rozvinutejších nádoroch a metastatických léziách [16]. Nadmerná expresia EpCAM sa nachádza v približne 90% prípadov acinárneho adenokarcinómu prostaty, a pri hormonálne refraktérnych adenokarcinómoch prostaty bola zistená výrazne vyššia expresia EpCAM ako pri neliečených adenokarcinómoch [18, 19]. V bunkách KP je povrchová hladina proteínu EpCAM až 16-krát vyššia ako v zdravých bunkách prostaty, a až 4-krát vyššia pri malígnych nádoroch [16].

EpCAM sa vďaka svojmu vplyvu na chemo-/rádioterapeutickú odpoveď stal potenciálnym terapeutickým biomarkerom. Pre pacientov s lokalizovaným KP je charakteristické dlhodobé prežívanie a úspešnosť v liečbe štandardnými prístupmi, akými sú chirurgická resekcia a rádioterapia. Naopak, pacienti s pokročilým a metastatickým KP sú spájaní so zlou prognózou [19]. Ako bolo spomenuté vyššie, počiatočná liečba s ADT poskytuje spočiatku účinnú odpoveď, avšak nie dostatočne, nakoľko dochádza počas liečby k rezistencii a progresii ochorenia. V ďalšej fáze progredujúceho mKRKP, sa na zvýšenie terapeutickej účinnosti pridáva k ADT chemoterapeutikum docetaxel [20]. Síce poskytuje cytotoxický efekt, avšak konvenčné chemoterapeutiká nerozlišujú normálne zdravé a nádorové bunky, čo vedie k mnohým vedľajším účinkom v dôsledku kumulatívnej toxicity zdravých orgánov [2].

Z uvedeného dôvodu je dôležité podávanie cielených terapeutických liečiv, ktoré pomáhajú redukovat' vedľajšie cytotoxické účinky chemoterapeutík na zdravé bunky, a to selektívnym pôsobením na nádorové bunky. Pre účinnosť cielej terapie je dôležitý výber pacientov s dostatočnou expresiou cielej molekuly (napr. EpCAM). Pri použití EpCAM-cielených monoklonálnych látok (mAb) adecatumumab u pacientov s KP a karcinóm prsníka bolo zistené, že pravdepodobnosť progresie nádoru je výrazne nižšia u tých pacientov, u ktorých bola expresia EpCAM výrazne vyššia [22-24]. Efektívnejšou alternatívou v porovnaní s mAb sú malé „scaffold“ proteíny DARPin – geneticky upravené proteíny, ktoré charakterizuje ich vysoká špecifita a afinita na solídne nádory, jednoduchšie prekonanie biologických membrán a rovnomernou distribúciou cytotoxickéj záťaže v rámci nádoru [25].

Záver

Metastázy predstavujú príčinu úmrtí 90% pacientov s nádorovým ochorením. Aj napriek pochopeniu procesu nádorovej diseminácie, pokroku v identifikácii nových biomarkerov, terapeutických cieľov a zavedení nových liečebných stratégií, je stále úspešnosť terapie u pacientov s metastázujúcimi nádormi pomerne nízka. Necitlivosť na existujúce liečby vedie k progresii ochorenia, čo si vyžaduje identifikáciu nových molekulárnych markerov a cielené terapeutické prístupy. Jedným z potencionálnych terapeutických markerov by mohli byť proteíny rodiny EpCAM, ktorých expresia koreluje s výskytom metastáz, agresivitou karcinómu a zlou prognózou. Cielená protinádorová liečba umožňuje zníženie vedľajších cytotoxických účinkov pre zdravé bunky selektívnym pôsobením na nádorové bunky.

Práca bola podporená projektom APVV-15-0181.

Literatúra

[1] Sung, *A Cancer Journal for Clinicians*. **2021**, 71(3): 209–249.

- [2] Xu, *Oncology Reports*. **2022**, 47: 94–103.
- [3] Jacob, *Cancers (Basel)*. **2021**, 13: 5417.
- [4] Sadaghiani, *Eur. Urol.* **2021**, 80: 82–94.
- [5] Thang, *Eur. Urol. Oncol.* **2019**, 2: 670–676.
- [6] Rosar, *Theranostics*. **2021**, 11: 4050–4060.
- [7] Munz, *Cancer Res.* **2009**, 69: 5627–5629.
- [8] Gires, *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, 71: 4393–4402.
- [9] Rao, *Int. J. Oncol.* **2005**, 27: 49–57.
- [10] Gorges, *BMC Cancer*. **2012**, 12: 178.
- [11] Kalluri, *J. Clin. Invest.* **2009**, 119: 1420–1428.
- [12] Ligtenberg, *Nat. Genet.* **2009**, 41: 112–117.
- [13] Lynch, *New Engl. J. Med.* **2003**, 348: 919–932.
- [14] Xu, *Cell&Bioscience*. **2020**, 10: 54–65.
- [15] Ni, *BMC Cancer*. **2018**, 18: 1092–1104.
- [16] Massoner, *Br. J. Cancer*. **2014**, 111: 955–964.
- [17] Hu, *BMC Urol.* **2019**, 19: 67.
- [18] Zhong, *Development and Therapy*. **2021**, 15: 3985–3996.
- [19] Ni, *Cancer Metastasis Rev.* **2012**, 31: 779–791.
- [20] Cornford, *Eur. Urol.* **2021**, 79: 263–282.
- [21] Drago, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2021**, 18: 327–344.
- [22] Thurber, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2008**, 60: 1421–1434.
- [23] Schmidt, *Ann. Oncol.* **2010**, 21: 275–282.
- [24] Marchner, *Urol. Int.* **2010**, 85: 386–395.
- [25] Schmidt, *Ann. Oncol.* **2012**, 2306: 2313.

***Campylobacter*: od zoonózy k autoimunitnému ochoreniu**

Neuschlová, M.¹, Havrilová, T.¹

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

Abstract

Most human infections caused by *Campylobacter* are asymptomatic and treatment usually consists only of rehydration. However, acute campylobacteriosis can cause many extraintestinal health complications, including the development of the rare autoimmune disease Guillain-Barré syndrome, reactive arthritis, irritable bowel syndrome, and other complications. Severe cases of campylobacteriosis require treatment with antibiotics. In recent years, an increase in the number of strains resistant to various antibiotics has been detected, which poses a problem when choosing an effective preparation. Worldwide, a significant increase in strains resistant to fluoroquinolones, as well as the rise of resistance to macrolides and other antibiotics complicates the treatment of severe campylobacteriosis. In order to choose an effective treatment, it is necessary to identify campylobacter species and investigate their sensitivity to antibiotics in routine laboratory practice.

Keywords: *Campylobacter*, zoonosis, resistance, Guillain-Barré syndrome

Úvod

Campylobacter jejuni je celosvetovo jednou z najčastejších príčin bakteriálnej enterokolitídy [1]. Podľa štatistických údajov Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín EFSA (European Food Safety Authority) a Európskeho centra pre prevenciu a kontrolu chorôb spomedzi enteritíd spôsobených baktériami, boli kampylobakteriózy a salmonelózy najčastejšie alimentárne nákazy v štátoch Európskej únie (EÚ) v sledovaných rokoch 2017 – 2021 [2].

Epidemiológia

Kampylobakterióza je najčastejšie hlásenou zoonózou u ľudí v EÚ od roku 2007 [2, 3]. V rámci Slovenska stúpol výskyt kampylobakteriôz v priebehu roka 2021 o 23,8 % oproti roku 2020 a oproti päťročnému priemeru ale poklesol o 15 % [4]. Pokles počtu prípadov bol v EÚ zaznamenaný v roku 2020, pravdepodobne z dôvodu pandémie COVID-19, čo malo vplyv na diagnostiku aj systém hlásenia. V roku 2021, hoci pandémia stále trvala, bol zaznamenaný mierny nárast počtu potvrdených prípadov v porovnaní s rokom 2020 o +2,1 %. Dôvodom mohlo byť postupný návrat masových zhromaždení, športových a rekreačných podujatí, znovuotvorenie reštaurácií, barov a stravovacích zariadení. Aj keď sa nepozoroval rozdiel v počte prípadov spojených s cestovateľskou anamnézou medzi rokmi 2021 a 2020, európske a stredomorské krajiny boli hlavnými miestami nákazy kampylobaktermi v súvislosti s cestovaním [2]. Táto zoonóza sa spája najmä s konzumáciou nedostatočne tepelne spracovanej hydiny, ale aj hovädzieho a bravčového mäsa, surového mlieka, kontaminovanej vody [5], ovocia a zeleniny zavlažovaných kontaminovanou vodou alebo prihnojovaných prírodnými hnojivami pri ich pestovaní [6]. Štatistickou analýzou prípadov kampylobakteriôz v rokoch 2017 – 2021 v EÚ sa zistilo, že hlavnou kategóriou rizikových potravín bolo mäso a mäsové výrobky, pričom ako zdroj dominovala hydina, hovädzí dobytok a ošípané. Nasledovalo mlieko a mliečne výrobky (tab. 1) [2].

Tabuľka 1 Potvrdené prípady *Campylobacter* spp. u ľudí, v potravinách a u zvierat (upravené podľa Správy EÚ 2021 o zoonózach) [2]

rok	2021	2020	2019	2018	2017
Ľudia					
Celkový počet potvrdených prípadov	127 840	120 544	220 639	246 570	246 538
Potraviny					
Mäso a mäsové výrobky	87 808	66 099	57 027	26 514	21 521
Mlieko a mliečne výrobky	2 125	2 145	2 749	3 227	2 317
Zvieratá					
Hovädzí dobytok	7 529	4 387	6 850	4 220	7 312
Hydina (kura domáca)	10 162	13 628	10 472	14 093	10 133
Ošipané	4 502	2 110	4 308	2 481	3 824

Etiológia a klinický obraz

Campylobacter spp. sa vyskytuje komenzálne v gastrointestinálnom trakte mnohých voľne žijúcich vtákov, hospodárskych (dobytok, ošipané) a spoločenských zvierat (psy a mačky). Klinicky najvýznamnejšie druhy sú *C. jejuni* a *C. coli*, ktoré spôsobujú takmer 95 % gastroenterítid u ľudí. Ide o gramnegatívne nesporeujúce pohyblivé mikroorganizmy zakriveného tvaru, s jedným alebo dvoma bipolárne uloženými bičikmi. Najlepšie rastú pri teplote 42°C, sú mikroaerofilné, dobre rastú na selektívnych kultivačných pôdach v prostredí so zníženou koncentráciou kyslíka [5]. K prenosu dochádza fekálno-orálnou cestou [5]. Kampylobakteriôza sa môže vyskytnúť vo všetkých vekových kategóriách, najčastejšie však postihuje deti a mladých dospelých vo veku 15 až 44 rokov [5, 7]. Prevažne ide o sporadický výskyt ochorení, menej je prípadov hromadných [8]. Vo vyspelých krajinách sa až 90 % prípadov vyskytuje v letných mesiacoch, čo pravdepodobne súvisí s konzumáciou nedostatočne tepelne upraveného mäsa v rôznych gastro stánkoch s rýchlym občerstvením [5, 7] a počas obdobia letných dovolení častejšou prípravou jedál formou grilovania, kde je vyššie riziko nedostatočnej tepelnej úpravy mäsa. Kampylobakteriôza sa prejavuje ako hnačkové ochorenie, ktoré trvá spravidla 5 – 7 dní. Predchádza mu zimnica, závraty, bolesti tela a horúčka. Príznaky sa objavujú zvyčajne za 24 – 72 hodín po požití baktérií. Klinické spektrum sa pohybuje od vodnatých hnačiek bez krvi až po ťažkú hnačku so zápalom, krvavou stolicou, bolesťami brucha, horúčkou. Počas akútnej fázy ochorenia sú charakteristické kŕčovité bolesti brucha a hnačka, ktorá sa vyskytuje aj viac ako 10-krát denne. Stolica je hlienovitá a v dôsledku poškodenia epitelu sliznice čreva sa v nej objavuje krv. Bolesť brucha môže napodobňovať apendicitídu v dôsledku akútnej ileitídy. Bolesť brucha a vylučovanie kampylobakterov stolicou často pretrvávajú niekoľko dní až týždňov aj po vymiznutí hnačky. Znížená pravdepodobnosť vylučovania je u pacientov liečených antibiotikami [5].

Diferenciálna diagnóza

V rámci diferenciálnej diagnostiky prichádzajú do úvahy aj ďalšie zdroje bakteriálnej hnačky a to *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Listeria* a *Clostridium difficile*. Podobný klinický obraz sa môže vyskytnúť aj pri vírusovej gastroenteritíde spôsobenej norovírusmi, pri otrave jedlom, pri parazitárnych hnačkách vyvolaných *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* a *Entamoeba histolytica* [5, 9].

Liečba

Väčšina infekcií spôsobených kampylobaktermi je samolimitujúca, prebieha mierne a nevyžaduje si podávanie antibiotík. Ťažiskom liečby je v týchto prípadoch dostatočná hydratácia a príjem elektrolytov. Nie sú vhodné prípravky na spomalenie črevnej motility, pretože môžu predĺžiť dobu liečenia. V prípade závažnejšieho priebehu

ochorenia s pretrvávajúcou horúčkou, krvavou stolicou, silnými bolesťami brucha alebo u rizikových pacientov ako sú imunokompromitovaní alebo starší ľudia, je potrebné použiť antibiotiká [5]. Pokiaľ symptómy neustupujú, zosilňujú sa alebo trvajú viac ako týždeň a tiež u tehotných sa podávajú antibiotiká. Liekom voľby je niektorý prípravok zo skupiny makrolidov (erytromycín, klaritromycín, azitromycín, spiramycín). Alternatívne sú podávané fluorochinolóny (ciprofloxacín, ofloxacín, norfloxacín) pre predpokladanú účinnosť tejto skupiny antibiotík na ďalších pôvodcov bakteriálnych enteritíd ako sú salmonely a šigely [10–12].

Rezistencia na antibiotiká

V posledných rokoch sa však u kmeňov *Campylobacter* významne zvýšila rezistencia na fluorochinolóny. Výskumy naznačili, že to súvisí s nadmerným používaním antibiotík u hospodárskych zvierat [5, 11, 13, 14]. Fluorochinolónová rezistencia a rýchly nárast počtu rezistentných kmeňov bola zaznamenaná v Kanade, USA a väčšine európskych krajín [1, 15]. Rezistentné kmene dominujú aj v Afrike a Ázii [12]. Naproti tomu, výrazne nižší výskyt kmeňov rezistentných na fluorochinolóny je v Austrálii a na Novom Zélande [1]. Významné percento kmeňov *Campylobacter* rezistentných na fluorochinolóny bolo zistené v Srbsku [1, 16]. V niektorých krajinách bol zaznamenaný trend zvyšovania rezistencie aj na makrolidy. V USA a Kanade najmä u detí do 5 rokov [1, 17], v Afrike u kmeňov izolovaných od ľudí, pričom kmene izolované u zvierat mali lepšiu citlivosť. V Ázii je rezistencia na makrolidy menej výrazná u *C.jejuni* a rezistentnejšie sú kmene *C.coli*, v Austrálii bola pozorovaná rezistencia na makrolidy hlavne u kmeňov *C.coli* [1, 12]. Preventívne opatrenia zahŕňajú postupy na obmedzenie prenosu patogénov zo zvierat na človeka, zdravotný dohľad, vakcináciu hydiny, správnu hygienu potravín v celom výrobnom procese [1].

Komplikácie kampylobakteriôzy

Napriek tomu, že väčšina humánnych infekcií spôsobených kampylobaktermi je samolimitujúca, spájajú sa s infekciou aj početné zdravotné komplikácie, ktoré môžu mať horšiu prognózu ako samotná akútna kampylobakteriôza. Medzi tieto komplikácie sa zaraďujú extraintestinálne ochorenia neurologické, imunologické, pľúcne alebo kardiovaskulárne [5, 6, 18, 19]. Medzi hlavné známe následky patria Guillain-Barré syndróm (GBS), reaktívna artritída a syndróm dráždivého čreva [6]. Celosvetovo sa približne jedna tretina prípadov GBS pripisuje predchádzajúcej infekcii *Campylobacter* spp. [6, 20], najmä *C.jejuni* [5]. Pri štúdiu klinického priebehu GBS sa zistilo, že prípady GBS, ktorým predchádzala infekcia kampylobakterom, boli závažnejšie, mali horšiu odpoveď na liečbu a vyššie riziko invalidity [5, 21]. GBS je autoimunitné ochorenie prejavujúce sa symetrickou progresívnou ascendentnou chabou paralýzou v dôsledku demyelinizácie periférnych nervov, ktorá je charakterizovaná slabosťou končatín, parestéziami a hyporeflexiou predovšetkým na dolných končatinách s postupným progredovaním ascendentne na horné končatiny a tvárové svalstvo. Vyskytuje sa 1 – 3 týždne po infekcii kampylobakterom. V imunopatogenéze tohto autoimunitného ochorenia zohráva úlohu mechanizmus molekulárneho mimikry, kedy vytvorené protilátky proti lipooligosacharidovým štruktúram kampylobakterov krížovo reagujú so špecifickými gangliosidmi nachádzajúcimi sa na periférnych nervoch u človeka [5, 22, 23]. Klinický priebeh a prognóza GBS sa líši. V priaznivom prípade sa stav začne upravovať po 2 až 3 týždňoch a úprava motorických funkcií nastáva v 75 – 90 % prípadov, avšak GBS aj napriek adekvátnemu liečebnému prístupu môže viesť ku smrti 3 – 7 % chorých alebo k invalidite [5, 22–24].

Ďalšou komplikáciou je reaktívna artritída, ktorá postihuje najčastejšie mladých dospelých. Príznaky reaktívnej artritídy začínajú do 4 týždňov po akútnej infekcii *C.jejuni* a *C.coli*. Postihuje najmä kolená a členky, ale prejavíť sa môže aj na malých kĺboch a šľachách. Klinický priebeh sa líši od miernej oligoartralgie až po invalidizujúcu polyartritídu [5, 25].

V gastrointestinálnom trakte sa v niektorých štúdiách uvádza súvislosť medzi infekciami kampylobaktermi a ochoreniami pažeráka a hrubého čreva. Zriedkavou, ale obávanou komplikáciou, je toxický megakolón. Výskum tiež ukázal zvýšené riziko syndrómu dráždivého čreva a imunoproliferatívneho ochorenia tenkého čreva (MALT lymfómu) [5, 26].

Záver

Väčšina humánných infekcií spôsobených kampylobaktermi prebieha pod miernym klinickým obrazom a liečba spočíva väčšinou len v doplnení tekutín. Akútna kampylobakteriôza však môže vyvolať mnohé extraintestinálne zdravotné komplikácie, vrátane rozvoja zriedkavého autoimunitného ochorenia Guillain-Barré syndrómu, reaktívnej artritídy, syndrómu dráždivého čreva a iných komplikácií. Závažné prípady kampylobakteriôzy si vyžadujú liečbu antibiotikami. V posledných rokoch bol zistený nárast počtu rezistentných kmeňov na rôzne antibiotiká, čo predstavuje problém pri voľbe účinného prípravku. Celosvetovo výrazný nárast rezistentných kmeňov k fluorochinolónom, ako aj vzostup rezistencie k makrolidom a ďalším antibiotikám komplikuje liečbu závažne prebiehajúcich kampylobakteriôz. Pre voľbu účinnej liečby je preto potrebné v rutínnej laboratórnej praxi identifikovať kampylobaktery do druhu a vyšetrovať ich citlivosť na antibiotiká.

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

Literatúra

- [1] Aleksič, *Front. Med.* **2021**, 8: 763434.
- [2] European Food Safety Authority, *EFSA J.* **2022**, 20(12): e07666.
- [3] <https://www.efsa.europa.eu/en/microstrategy/FBO-dashboard>; Updated May 10. **2023**.
- [4] <https://www.epis.sk/InformacnaCast/Publikacie/VyroczneSpravy>; Updated April 27. **2023**.
- [5] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537033>; Updated April 20. **2023**.
- [6] Facciola, *J. Prev. Med. Hyg.* **2017**, 58(2): E79–E92.
- [7] Epps, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2013**, 10(12): 6292–6304.
- [8] https://www.svps.sk/potraviny/info_Kampylobakter.asp; Updated April 22. **2023**.
- [9] Slack, *Aust. Fam. Physician.* **2012**, 41(10): 782–786.
- [10] Žemličková, *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **2014**, 63(3): 184–190.
- [11] Allos, *Clin. Infect. Dis.* **2001**, 32(8): 1201–1206.
- [12] Luangtongkum, *Future Microbiol.* **2009**, 4/2: 189–200.
- [13] Gupta, *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, 10(6): 1102–1109.
- [14] Gibreel, *Chemother.* **2005**, 49: 2753–2759.
- [15] Sproston, *Microb. Genom.* **2018**, 4: e000198.
- [16] Miljković-Selimović, *Vojnosanit. Pregl.* **2009**, 66: 522–526.
- [17] Schiaffino, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, 63: e01911–8.
- [18] <https://storymaps.arcgis.com/stories/37987745de6f47029e14cb57d61fe923>; Updated April 21. **2023**.
- [19] McGrogan, *Neuroepidemiology.* **2009**, 32(2): 150–163.
- [20] Baker, *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, 18(2): 226–233.
- [21] Islam, *Neurology.* **2010**, 74(7): 581–587.
- [22] Bonilauri, *Ital. J. Food Saf.* **2016**, 5(1): 5641.
- [23] Cibulčík, *Neurol praxi.* **2016**, 17/1: 11–15.
- [24] Fussiová, *Pediatr. prax.* **2011**, 12(5): 212.
- [25] Pope, *Semin. Arthritis. Rheum.* **2007**, 37(1): 48–55.
- [26] Lecuit, *N. Engl. J. Med.* **2004**, 350(3): 239–248.

Chronic subdural hematoma

Mičurová, G.¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin, Neurochirurgická klinika, Martin
gabriela.micurova@gmail.com

Abstract

Chronic subdural hematoma belongs to one of the most commonly encountered conditions in neurosurgery. As it represents a nosologic unit typically seen among elderly patients, and as the standard length of life has become longer, naturally we come across with this pathology more often comparing to the past. Current diagnostic tools, especially highly accessible CT imaging, allow the diagnosis of chronic subdural hematoma to be determined quickly, making the prognosis favourable if appropriate therapy is chosen. There are many options regarding the treatment including surgical and non-surgical methods as well. In addition to traditional surgical procedures used in hematoma evacuation, embolisation of middle meningeal artery is discussed as a new option in the treatment, especially as prevention of hematoma recurrence. Conservative strategies using pharmacotherapy and observation, reserved for asymptomatic patients with small hematomas, are still object of many studies, recently with the focus on the use of dexametasone. In this article a brief review of chronic subdural hematomas is provided, including etiopathogenesis, clinical presentation, diagnosis and current treatment. One picture and 37 references were used.

Keywords: patophysiology, diagnosis, surgical evacuation, recurrence

Introduction (Etiopathogenesis)

Chronic subdural hematoma (CSDH), by its definition, is an encapsulated collection of extracerebral blood layered in subdural space in length more than 21 days. Estimated incidence in European countries is 2-3/100 000 inhabitants with the number of cases rising in age group over 65 years [1, 2], men being more often affected than women [1]. However, the number of annual cases in this particular population can reach up to 58/100 000 inhabitants [3]. Reflected in statistics as well as in the neurosurgical practice, CSDH is a condition associated mostly with elderly patients, although basically every age group can be affected [4]. Specific attention should be paid to toddlers, where CSDH can be one of the signs of shaken-baby syndrome.

There are few factors making elderly people more vulnerable, the most risk factor being cerebral atrophy, leading to higher tension of bridging veins occupying the brain convexity. In this condition only a trivial, even unnoticed head trauma can result in small acute subdural hematoma, triggering local inflammatory response and followed by its transformation into subacute, or eventually chronic subdural hematoma. In addition to cerebral atrophy, typical for aging, more additional risk factors are recognized in relation to CSDH – chronic use of antiplatelet or anticoagulant drugs, defective coagulation, chronic alcohol abuse or intracranial hypotension [3–5]. Etylism itself contributes to cerebral atrophy and naturally is associated with higher possibility of falls and head injuries, and moreover, it is responsible for decrease in liver functions resulting in defective coagulation. Speaking about the coagulation, the study by Bosche et al. from 2012 shows the importance of factor XIII (fXIII), proving that the deficiency of this particular factor can be the reason of rebleeding and recurrence following the treatment. That is why fXIII substitution should be performed in patients

with significant low activity of fXIII [6]. Intracranial hypotension caused by dehydration and chronic cerebrospinal fluid leak following some of the drainage surgeries, could be another possible condition leading to formation of CSDH [3]. Despite all the factors associated with CSDH development and formation, the minor head injury remains the main cause in vast majority of cases. This theory has been accepted for ages, but new hypothesis regarding CSDH formation has been revealed by recent studies, suggesting that harm of the bridging veins and subsequent hemorrhage could not be the only source of hematoma growth [5]. Recent researches emphasize the importance of its complex pathophysiology focusing on inflammatory processes, according to which the pharmacotherapy can be involved in CSDH therapy, particularly with use of dexamethasone [5, 7, 8].

In addition to primary head injury, the pathogenesis is considered to be more complex, involving mechanisms of angiogenesis, fibrinolysis and local inflammation. Looking back to history, it was in 1857 when 'pachymeningitis haemorrhagica interna' was first described by Virchow, who pointed out that chronic inflammation of the dura is triggered by bacterial infection, followed by processes as fibrin exsudation and neovascularisation. The same mechanisms can be provoked not only by infection, but they can be a result of basically any injury [5]. It has become a popular statement that CSDH is simply a result of trauma, but there are still authors who emphasize the coexistence of both trauma and inflammation.

The key role in the onset of CSDH is damage to the 'dural border cells'. These highly specialised cells lining the dura have the ability to phagocytose and form fibro-cellular connective tissue and are responsible for membranes development, frequently seen in CSDH [9]. A study by Izumihara et al. concerning etiopathogenesis of CSDH suggest that the presence of blood does not automatically lead to CSDH formation and other mechanisms must be involved - the damage of dural border cells, which in turn provokes the recruitment of inflammatory cells [10]. Aiming to repair the harmed dural cells, the proliferation occurs, resulting in formation of haematoma capsule [5, 8, 11]. Angiogenic factors contribute to neovessels creation, layering the space between dura and arachnoidea, which are prone to bleeding. The inner layer of dura is a place where these neocapillaries, also called sinusoids due to their penetrated character, are formed. All these processes are done one week following the head trauma [4].

Naturally, the blood occupying subdural space undergoes the physiologic process of coagulation. Soon there is an increase of fibroblasts around dura and their migration towards the centre of hematoma with collagen fibrils development. Following weeks are characterised by destruction of blood elements and predominance of fibrinolysis, leading to hematoma liquification. This is the condition considered to be the very CSDH – a liquified centre with thick vascularised membrane [12]. Expansion of CSDH is explained by multiple microbleeding accompanied by fluid exsudation to the cavity of hematoma from neocapillaries of its outer membrane [13]. The fenestrated appearance of these vessels was described, making them very fragile and highly permeable for blood elements, contributing to growth progression of hematoma. Considering the fibrinolysis taking part in CSDH formation, there is no fibrinogen detected in hematoma cavity. That explains the anticlotting character of hematoma resulting in recurrent bleeding potential [13–15]

A very rare subtype of CSDH is also known - calcified or also called ossified CSDH, where the etiopathogenesis is not still exactly defined, but the most likely theory involve both vascular and metabolic factors [16]. Having been discussed in few studies, a poor circulation is supposed to be the main factor responsible for hyalinization of connective tissue and its calcification in the CSDH capsule [17]. A few authors emphasize the

early surgical management in this rare diagnosis, craniotomy with complete removal of calcified membrane being appropriate method of choice with favorable outcome [18].

Clinical presentation and findings

In general, clinical signs are not uniform and specific, as they are caused by intracranial hypertension, direct brain parenchyma compression eventually accompanied by midline shift and local ischaemia underlying the hematoma [19]. Clinical appearance can vary and we meet with asymptomatic patients up to those with focal neurologic symptoms.

As mentioned above, two main groups of symptoms are recognized. The first one, arising from intracranial hypertension include headache, nausea and vomiting. Patients with CSDH can often present with quantitative consciousness disorder, personality changes like apathy, memory loss, confusion or drowsiness, which could be confusing, and many of the patients suffering CSDH are likely to have dementia or psychiatric disorders.

On the other hand, if the hematoma causes significant brain pressure, focal symptoms like hemiparesis or fatig disorder can appear, depending on the hematoma size and location.

Regarding the fact that most of the symptoms are caused by the mass effect of hematoma, the objective findings during examination in elderly patients with significant brain atrophy could be relatively physiologic. Brain involution could possibly be one of the factors making the patients' prognosis more favourable. Shown in a study by Opšénák et al., there is a positive correlation between increased age and Glasgow outcome scale (GOS) following surgery, brain atrophy being the protective factor providing enough space for volume compensation if the mass effect is present. This study also observed the impact of preoperative signs and symptoms on the GOS, revealing that risk factors associated with unfavourable prognosis are preoperative speech disorders, disorientation and consciousness disorders [20]

Diagnosis

Prior to the all diagnostic modalities, physical examination should be performed. As described above, patients might be asymptomatic, mostly in the beginning of CSDH formation the latent period is often seen, but in every case when CSDH is suspected, a native CT scan of brain should be performed. This is the modality of choice, quick, effective and highly accessible, displaying CSDH as a crescent-shaped hypodense collection in vast majority of cases located on brain convexity. However, the hematoma appearance on CT could be hyperdense if a recent haemorrhage has occurred, or on the other hand, even unnoticed with isodense character, sometimes bilateral. Using a CT scan, not only hematoma itself can be appreciated, but other traumatic changes, mass effect accompanied by midline shift, brain parenchyma compression, ventricles distortion etc. as well may be noticed as well. According to CT scan, more subtypes of CSDH can be distinguished based on the morphology, according to Nakaguchi et al. [21].

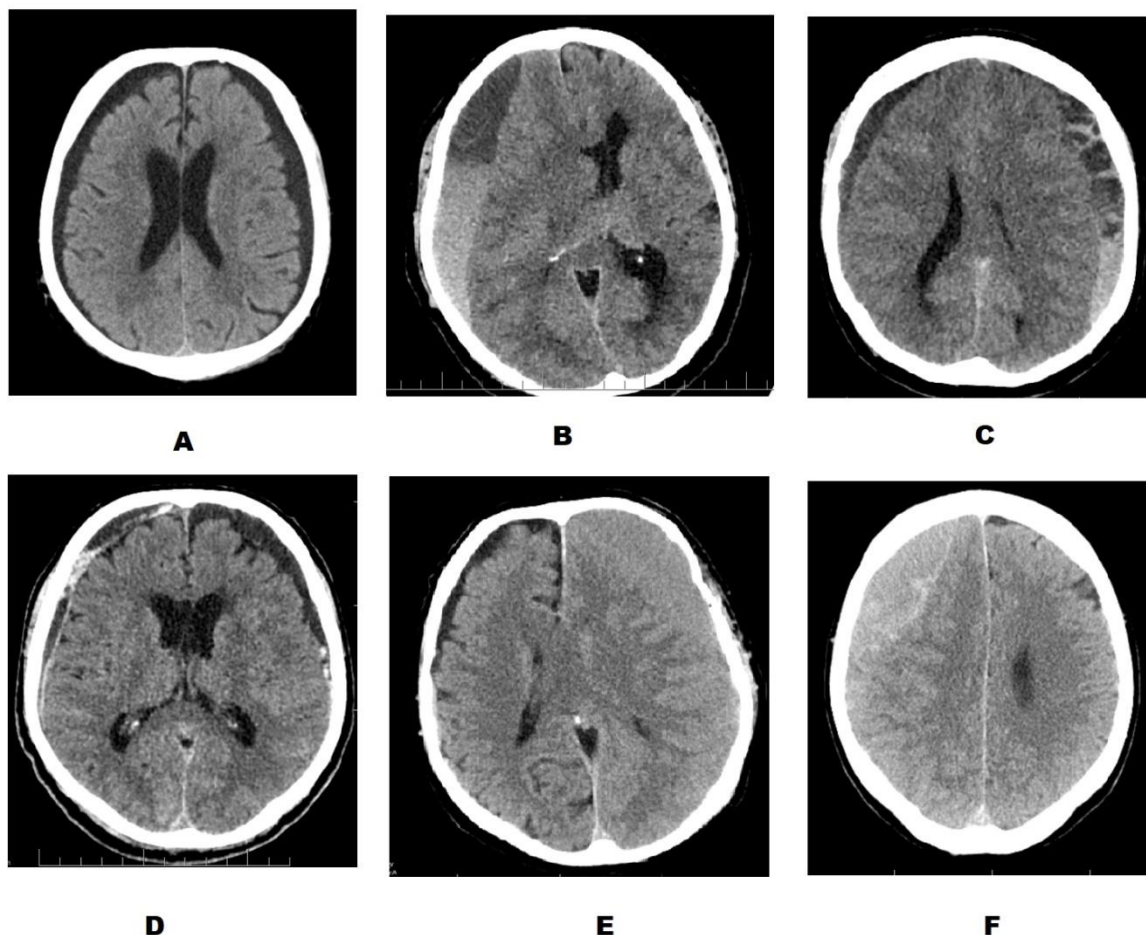


Figure 1 Morphological classification of nonacute subdural hematomas

A: homogenous hypodense. B: separated. C: trabecular. D: laminar. E: homogenous isodense. F: homogenous hyperdense

The other modality, however rarely used for CSDH verification, is MRI, where especially T2 sequence displays hematomas very well. MRI is in some studies described as a better modality for CSDH imaging, especially in cases of isodense bilateral hematomas, which can remain unobserved [22]. Based on our neurosurgical practice, brain CT scan is sufficient to confirm the diagnosis of CSDH.

According to CSDH appearance and features on CT scan a surgeon is able to decide which surgical technique would be the most suitable for a particular patient.

Treatment

In general, surgical and conservative methods of treatment are available. However, surgical evacuation of hematoma with use of burr-hole or craniotomy is preferred due to its rapid effect with no need of long hospitalisation. Conservative treatment could be the method of choice in asymptomatic, small, surgically insignificant hematomas. First attempts regarding non-surgical treatment are dated in early seventies, when mannitol was used with aim to facilitate CSDH resolution by decreasing osmotic pressure of blood leading to hematoma resorption [23]. Some studies reported success in treatment with bed rest, use of steroids [24], mannitol [25], tranexamic acid [26], angiotensin converting enzyme inhibitors [27], statins [28] or their combination. Despite the partial success in this manner of management, it cannot be verified if the hematoma resolution was due to drug effect or it was a natural process [29].

Recently, some studies have shown promise in corticosteroids use in CSDH treatment. Based on the pathophysiology showing the complex aetiology of this condition, suggesting that hematoma formation and growth is sustained by mechanisms of inflammation, anti-inflammatory drugs have been tried. However, there is still lack of evidence providing the benefits of this kind of treatment, considering the well-known side effects of corticosteroids.

Besides, conservative approach requires hospitalisation for long period of time, in average 40 days [30], with repeated CT brain imaging needed for CSDH re-evaluation. On the other hand, hematoma evacuation by means of different surgical techniques provides instant resolution. Any CSDH with maximum thickness 10 mm and/or midline shift 7 mm, or causing neurologic signs and symptoms is indicated for surgical evacuation [31]. There are many options and still no uniformity when it comes to choice of the surgical technique. Nonetheless, the basic principle of all surgical procedures is evacuation of hematoma, followed by natural brain re-expansion (which is often limited in case of serious brain atrophy seen in elderly) and fusion of outer and inner capsule of hematoma's cavity [4]. Most commonly techniques used are twist drill craniostomy, burr-hole craniostomy and craniotomy, each of mentioned having own benefits and risks. Besides traditional methods mentioned, there are also studies regarding the effect of middle meningeal artery embolisation [32].

Burr-hole craniostomy, also called trephination, defined as skull opening up to 3cm in diameter [27], is considered to be the method of choice for hypodense CSDH. Method itself is quite simple and can be performed under analgosedation and local anaesthesia, which eliminates risks of general anaesthesia, being beneficial especially in elderly patients with many comorbidities. There is still controversy in the number of trephination holes. One of the recently published studies regarding number of burr holes needed for hematoma evacuation did not show any significant difference in the recurrence rate using one or two trephinations [33]. Trephination with hematoma evacuation and irrigation of subdural space with physiologic saline and subdural silicone drains placement is the standard practice. Prevention of rebleeding is secured by drainage insertion, although some authors have reported no influence on hematoma recurrence with or without drains [34]. Recently, subgaleal drainage instead of traditional subdural drainage has been described, with no impact on hematoma recurrence [35]. Moreover, some studies regarded an association between the length of subdural drains and surgically significant hematoma recurrence. The highest rebleeding was seen in patients with the drains left for 2-3 days, however, the data obtained did not show relevant differences regarding the length of drainage [33]. Nonetheless, more than 5 days of drainage insertion is supposed to be associated with higher risk of infectious complications, requiring revision surgery. However, more authors have reported no significant correlation between drainage duration and incidence of infection [33, 36, 37].

Organised, calcified or ossified CSDH, or those with evident membranes are usually treated with craniotomy, where a larger surgical approach allows proper hematoma evacuation and membranectomy as well, as the hematoma is well exposed. Opšenák et al. [33] reported significantly lower recurrence rate in hematomas evacuated via craniectomy compared to those evacuated by trephination [33]; moreover, craniotomy provides a better „view“ to identify and clarify the inner and outer CSDH membrane, eventually allowing subsequent membranectomy. In cases when revision surgery is needed, usually craniotomy is a method of choice.

Conclusion

Chronic subdural hematoma is a condition very often seen in neurosurgical practice, with numbers of patients rising due to increased life expectancy and high access to diagnostic modalities. Being a diagnose with favourable prognosis if treated early and properly, it is very important to be aware of signs and symptoms especially in elderly patients. The most effective management of this particular type of bleeding remains surgical evacuation with burr hole or craniotomy, although there is still no uniformity in method of choice. However, there is still a number of patients with hematoma recurrence requiring revision and repetitive hematoma evacuation.

Literature

- [1] Iliescu, *Journal of Medicine and Life*. **2015**, 8(3): 278–284.
- [2] Liu, *J. Neurosurg.* **2014**, 121(3): 665–673.
- [3] Yadav, *Asian Journal of Neurosurgery*. **2016**, 11(4): 330–342.
- [4] Stejskal, *Cesk. Slov. Neurol. N.* **2019**, 82(1): 25–29.
- [5] Edlmann, *J. Neuroinflammation*. **2017**, 14(1): 108.
- [6] Borsche, *Clin. Neurol. Neurosurgery*. **2012**, 115(1): 13–8.
- [7] Henaux, *Trials*. **2017**, 18(1): 252.
- [8] Hutchinson, *The New England Journal of Medicine*. **2020**, 383(27): 2616–2627.
- [9] Koliass, *Nat. Rev. Neurol.* **2014**, 10(10): 570–8.
- [10] Izumihara, *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. **2013**, 53(5): 323–8.
- [11] Heula, *J. Neurol.* **2009**, 256(1): 66–71.
- [12] Ducruet, *Neurosurg. Rev.* **2002**, 35(2): 155–169.
- [13] Murakami, *J. Neurosurg.* **2002**, 96(5): 877–884.
- [14] Kawamakiy, *Neurosurgery*. **1989**, 25(1): 25–29.
- [15] Shim, *Yonsei Med. J.* **2007**, 48(2): 210–7.
- [16] Yang, *Tzu. Chi. Med. J.* **2004**, 16: 261–5.
- [17] Mori, *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. **2001**, 41(8): 371–81.
- [18] Snopko, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **2020**, 164(2): 209–212.
- [19] Ischikawa, *Surg. Neurol.* **1995**, 43(2): 130–137.
- [20] Opšenák, *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. **2021**, 47(5): 1649–1655.
- [21] . Nakagushi, *J. Neurosurg.* **2001**, 95(2): 256–62.
- [22] Senturk, *Swiss Medical Weekly*. **2010**, 140(23–24): 335–340.
- [23] Suzuki, *J. Neurosurg.* **1970**, 33(5): 548–53.
- [24] Delgado-Lopez, *Neurocirurgia*. **2009**, 20(4): 346–59.
- [25] Desai, *Neurosurg. Clin. N. Am.* **2017**, 28(2): 279–286.
- [26] Kageyama, *J. Neurosurg.* **2013**, 119(2): 332–7.
- [27] Weigel, *Neurosurgery*. **2007**, 61(4): 788–92; discussion 792–3.
- [28] . Wang, *J. Neurol. Sci.* **2014**, 336(1–2): 237–42.
- [29] Kyeonh-Seok, *The Korean Neurosurgical Society*. **2019**, 62(2): 144–152.
- [30] Kim, *J. Korean Neurosurg. Soc.* **2016**, 59(6): 628–636.
- [31] Ullman, *New York: Thieme*. **2015**, 528 s. ISBN 978-1-60406-368-4.
- [32] Link, *Operative Neurosurgery*. **2017**, 14(5): 556–562.
- [33] Opšenák, *Rozhledy v chirurgii*. **2020**, 99(1): 29–33.
- [34] Heringer, *Arq. Neuropsiquiatr.* **2017**, 75(11): 809–812.
- [35] Soleman, *Neurosurgery*. **2019**, 85(5): 825–834.
- [36] Kale, *Neurol. Res.* **2017**, 39(5): 399–402.
- [37] Yu, *Br. J. Neurosurg.* **2009**, 23(6): 606–611.

Variabilita miechových nervových koreňov a ich klasifikácia

Haviarová, Z.¹, Matejčík, V.², Kuruc, R.³

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Anatomický ústav, Bratislava; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta a UN Bratislava, Neurochirurgická klinika, Bratislava;

³Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta a ÚDZS, Ústav súdneho lekárstva, Bratislava
zora.haviarova@uniba.sk

Abstract

Variabilities of spinal nerve roots have attracted the attention of researchers since the second half of the last century. The interest in them was raised mainly by the failure of the intervertebral disc herniation operations due to the frequent finding of anomalies of the spinal nerve root exits, mainly in the lumbosacral region. Many of them were not detected by preoperative imaging examinations.

Operative, radiographic, and anatomical studies used several classification systems to classify their findings, which made it difficult to compare them with each other. The classification systems according to Neidre and MacNab, Postacchini et al. and Kadish and Simmons were most often used. In 2020, we also proposed a classification system, unifying the aforementioned three previous classification systems.

In 2021 Nikolenko et al. proposed a new simple unifying classification system of spinal root variabilities. Practice will show which system will be used next.

Keywords: variabilities, spinal nerve root, classification system, unification

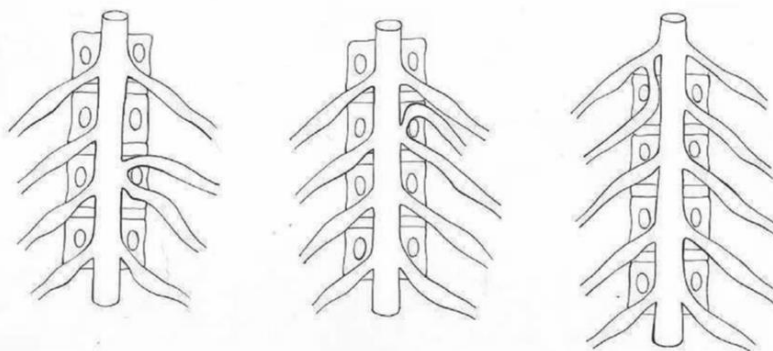
Úvod

Pokroky v možnostiach liečby herniácie lumbosakrálneho disku (a ich zlyhania) viedli k veľkému počtu štúdií zameraných na opis rôznych „anomálií“/variácií v miechových nervových koreňoch. Mnohé z nich prekvapili chirurgov intraoperačne a boli príčinou zlyhania operácie a nie všetky boli odhalené rádiografickými vyšetreniami predoperačne. Vyskytovali sa hlavne v najfrekventovanejšej lumbosakrálnej oblasti, o niečo menej v krčnej oblasti, s najnižšou incidenciou hlásenou v oblasti hrudníka [3]. Ako uvádza Schmidt (2017), tieto pozorované vrodené variácie zahŕňali [8]: 1. spojené nervové korene (2 susediace nervové korene, ktoré majú v určitom bode svojho odstupu z durálneho vaku spoločný durálny obal), 2. blízko priľahlé nervové korene (dva nervové korene vznikajú cez blízke otvory v durálnom vaku), 3., abnormálne kraniálny alebo kaudálny koreňový odstup nervov z durálneho vaku, 4., „anastomozujúce“ nervové korene (spojky medzi koreňmi- chybné nazvané anastomózami, boli pozorované intradurálne aj extradurálne) [8]. Embryologické príčiny výskytu týchto variácií miechových nervových koreňov stále nie sú úplne objasnené: najpravdepodobnejšie sú výsledkom chybnej migrácie nervových koreňov počas embryonálneho vývoja [8]. Výskyt týchto pozorovaných variácií nervových koreňov sa líšil v závislosti od typu štúdie: najčastejšie boli pozorované u kadaverózných štúdií, menej často pri rádiografických štúdiách a ich najmenšia incidencia bola hlásená chirurgickými pozorovaniami [8]. Pri popise variabilít krčných a lumbosakrálnych miechových koreňov vo vnútri chrbticevého kanála sme navrhli aj našu vlastnú klasifikáciu miechových koreňových variabilít, ktorá podľa nášho názoru zjednocuje 3 dovtedy používané klasifikácie variácií miechových koreňov [3] (obr. 1).

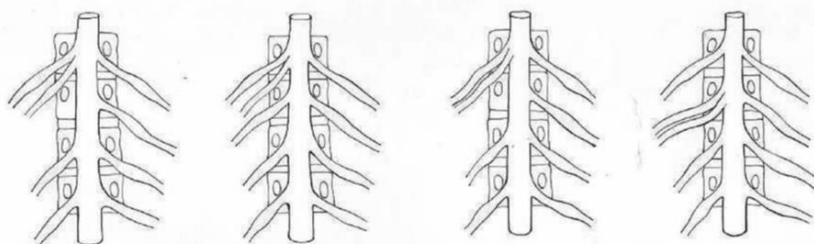
Historický prehľad

Doposiaľ existuje viacero vzájomne odlišných klasifikačných systémov pre anomálie miechových nervových koreňov. V roku 1962 Cannon a kol. prvýkrát identifikovali 3 najčastejšie typy variácií miechových koreňov: spojený Typ I, anastomotický Typ II a priečny Typ III [1, 8]. V roku 1982 Postacchini et al. klasifikovali bežné abnormality miechových nervových koreňov do 5 rôznych variácií [7]. V roku 1983 Neidre a MacNab rozšírili Cannonovu klasifikáciu na základe uhla a pozície odstupu miechového koreňa [5]. Táto klasifikácia sa používala najčastejšie. V roku 1984 Kadish a Simmons zaviedli klasifikačný systém založený na anatomických a rádiologických nálezoch [4]. Chotigavanich a Sawangnatra v roku 1992 tiež poskytli jednotnú klasifikáciu [2]. Najnovšia klasifikácia je spomínaná nami navrhovaná (viď vyššie) (obr.1) [3].

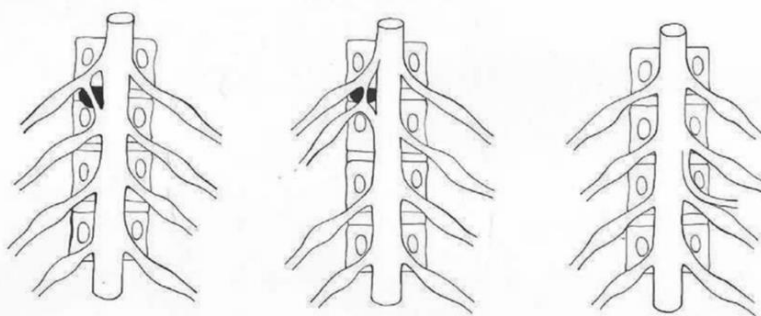
I. Joined nerve roots.



II. Two separate nerve roots exiting through one intervertebral neuroforamen.



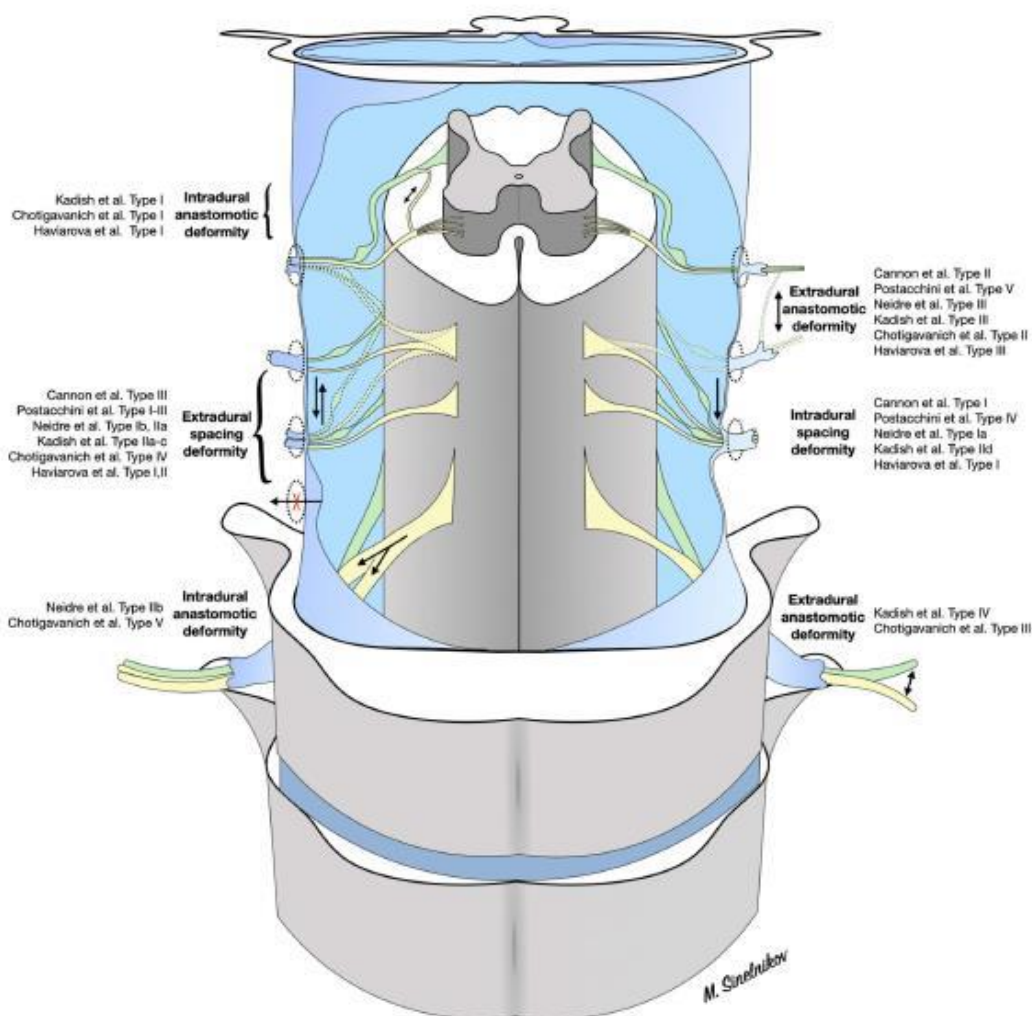
III. Extradural connecting branches.



Obrázok 1 Nami navrhnutá klasifikácia variabilít miechových koreňov (kombinácia predošlých 3 klasifikácií: Kadish a Simmons, Postacchini et al. a Neidre a MacNab s našimi navrhovanými úpravami aplikovanými na krčné miechové korene) [3]

Tabuľka 1 Zoradenie existujúcich klasifikačných systémov na základe zjednocujúcich kritérií [6]

Existing Classification reference	Unifying criteria			
	Intradural Anastomotic Deformity	Intradural Spacing Deformity	Extradural Anastomotic Deformity	Extradural Spacing Deformity
Cannon et al. (1962)	-	Type I	Type II	Type III
Postacchini et al. (1982)	-	Type IV	Type V	Types I- III
Neidre and MacNab (1983)	Type II b	Type I a	Type III	Types Ib, IIa
Kaddish and Simonns (1984)	Type I	Type IId	Types III, IV	Types IIa-c
Chotigavanich and Sawangnatra (1992)	Type I, V	-	Type II, III	Type IV
Haviarová et al. (2020)	Type I	Type I	Type III	Types I, II



Obrázok 2 Schematické zobrazenie variabilit koreňov miechových nervov podľa zjednocujúcej klasifikácie Nikolenka a spol. [6]

Záver (perspektíva)

Nikolenko so spolupracovníkmi [6] na základe analýzy existujúcich, najpoužívanějších klasifikačných systémov, navrhuje zjednocujúce klasifikačné kritériá, pričom jednotlivé typy variácií rozdeľuje (podľa lokalizácie) na intradurálne a extradurálne. A každú lokalizáciu ešte na 2 podtypy: anastomotický a priestorový (viď tab. 1). To znamená, že rozoznáva 4 hlavné typy variability: intradurálna anastomotická variácia, intradurálna priestorová variácia, extradurálna anastomotická variácia a extradurálna priestorová variácia (tab. 1., obr. 2) [6]. Tieto 4 navrhované variácie zahŕňajú všetky predtým klasifikované typy anomálií a môžu slúžiť ako jednotný klasifikačný systém. Takéto zjednotenie je opodstatnené vzhľadom na výrazne odlišnosti jestvujúcich klasifikačných systémov, komplikujúcich vzájomné porovnávanie získaných údajov. Čas ukáže, či sa táto zjednocujúca klasifikácia v praxi ujme.

Literatúra

- [1] Cannon, *Neurosurg. J.* **1962**, 19: 208–214.
- [2] Chotigavanich and Sawangnatra, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1992**, 278: 46–50.
- [3] Haviarová, *J. Clin. Neurosci.* **2020**, 73: 259–263.
- [4] Kadish and Simmons, *J. Bone Joint Surg. Br.* **1984**, 66(3): 411–416.
- [5] Neidre and Macnab, *Spine (Phila Pa 1976)* **1983**, 8(3): 294–299.
- [6] Nikolenko, *Ochsner Journal.* **2021**, 21: 123–125.
- [7] Postacchini, *J. Bone Joint Surg. A.* **1982**, 64(5): 721–729.
- [8] Schmidt, *Childs Nerv. Syst.* **2017**, 33(8): 1261–1273.

Dysbióza črevného mikrobiómu a jej možný vplyv na rozvoj Alzheimerovej choroby

Fábryová, M.¹, Pačanová, D.¹, Kalenská, D.², Kovalská, L.³, Adamkov, M.¹,
Lehotský, J.^{4,5}, 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 anatómie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu, Martin; ⁵Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin
maria.kovalska@uniba.sk

Abstract

Alzheimer's disease (AD), the most common cause of dementia, results in a sustained cognitive decline. There are currently few effective disease-modifying therapies for AD, but insights into the mechanisms that mediate the onset and progression of the disease may lead to new, effective therapeutic strategies. Amyloid beta oligomers, plaques, tau aggregates, and neuroinflammation are critical in neurodegeneration and impact clinical AD progression. The upstream modulators of these pathological features have not been fully clarified, but recent evidence indicates that the gut microbiome may influence these features and, therefore, may influence AD progression in human patients. The intestinal microbiota represents a wide community of microorganisms that populate our gastrointestinal tract and whose alterations are associated with various gastrointestinal tract diseases and the central nervous system. In the case of a healthy composition of the intestinal microbiota, bacteria produce metabolites that strengthen the integrity of the blood-brain barrier and intestinal barrier while promoting the production of neuronal growth factors. Diet, age and stress have a negative effect on the composition of the intestinal microbiota, resulting in a dysbiosis. Increased gut and blood-brain barrier permeability induced by microbial dysbiosis may mediate and influence the pathogenesis of AD and other neurodegenerative diseases, predominantly those associated with ageing. The bacteria in the intestines can produce amyloid and lipopolysaccharides, thereby contributing to the modulation of signalling pathways and the production of pro-inflammatory cytokines, contributing to the pathogenesis of AD. Metabolites produced by dysbiotic intestinal microbiota adversely affect the function of the central nervous system and can lead to a neurodegenerative process. In this short review, we briefly describe the composition of the gut microbiome, dysbiosis, and its influence on the onset and progression of AD through diet modification, which may represent new therapeutic options in AD therapies.

Keywords: Gut-Brain Axis, Alzheimer's Disease, Dysbiosis, Gut Microbiome

Úvod

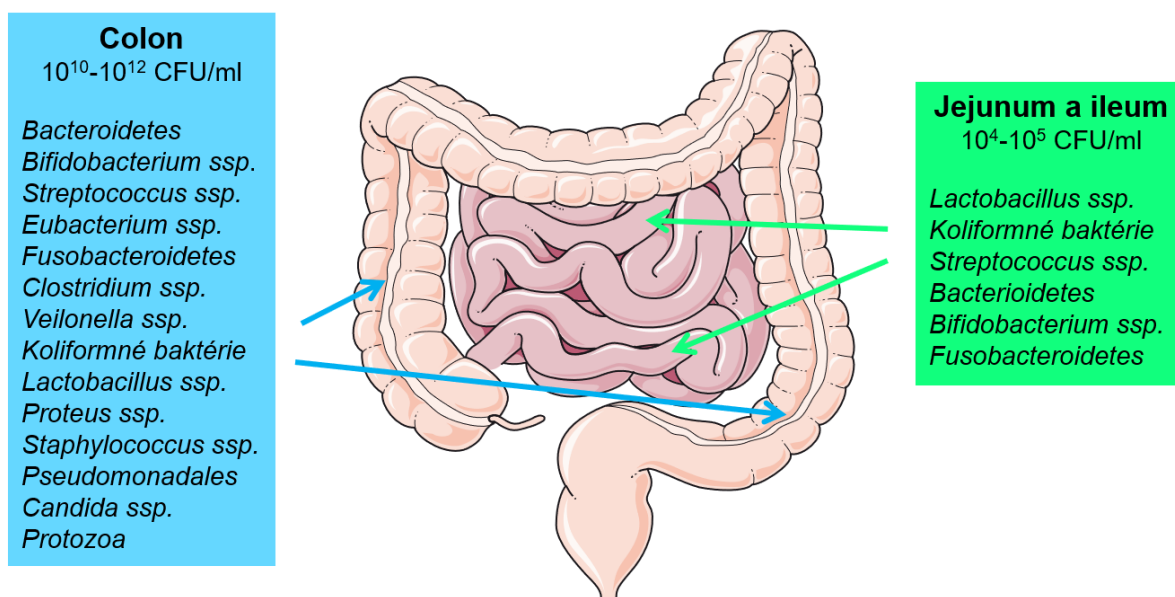
Ľudský gastrointestinálny trakt predstavuje najväčší rezervoár mikroorganizmov (baktérií, vírusov a eukaryotických mikroorganizmov) v tele, pričom ich diverzita medzi jednotlivcami signifikantne varíruje. Kolektívny názov pre všetky mikroorganizmy nachádzajúce sa v čreve je známy ako "črevná mikrobiota" a ak zahrnieme genóm, ktorý je s nimi spojený hovoríme o "črevnom mikrobióme" (GMB). Početnosť bakteriálnych buniek tvorený bakteriálnym mikrobiómom predstavuje 10^{13} - 10^{14} , čo je

približne 10x viac ako celkový počet buniek ľudského tela. Odhaduje sa, že množstvo génov, ktoré kóduje GMB je približne 4×10^6 , čo v porovnaní s 26 600 génmi kódovanými ľudským genómom je 150 násobne viac [1]. Celková hmotnosť baktérií prítomných v črevách je 1-2 kg, čo je porovnateľné s hmotnosťou ľudského mozgu [2].

Kompozícia ľudského GMB

Mikrobiota nie je homogénnou populáciou mikroorganizmov, ide skôr o zložené spektrum pozostávajúce z rozličných mikrobiálnych komunít, ktoré sú schopné interagovať ako medzi sebou, tak s hostiteľom, pričom dokáže ovplyvňovať jeho homeostatické parametre (obr. 1; [3]). Možnosti výskumu heterogenity GMB výrazne pokročili vďaka kultivačne nezávislým prístupom a modifikáciám genetických metód. Jedna z genetických metód je identifikácia mikroorganizmov pomocou sekvencie ich génov pre 16S rRNA. 16S rRNA je ribonukleová kyselina o dĺžke 1542 nukleotidov, ktorá obsahuje 9 vysoko variabilných regiónov, čo umožňuje jednoduchšiu diferenciaciu bakteriálnych druhov. Dáta zo štúdií MetaHit a Human Microbiome Project identifikovali 2172 bakteriálnych druhov izolovaných z ľudských vzoriek, ktoré zaklasifikovali do 12 rozličných kmeňov, z ktorých 93,5% patrí kmeňom *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* a *Verrucomicrobia*, pričom dominantné sú *Firmicutes* a *Bacteroidetes* [4].

Rozloženie mikrobioty v rámci gastrointestinálneho traktu má určité pravidlá, ktoré sú založené na fyziologických vlastnostiach jeho jednotlivých častí a vzájomne sa výrazne líšia. Môžeme hovoriť o rozmiestnení v rámci dvoch osí, a to longitudinálnej (napr. fakultatívne aeróbne baktérie, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*) a axiálnej (napr. *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*) [5].



Obrázok 1 Kompozícia mikrobioty v GIT-e (obrázok bol čiastočne vytvorený pomocou Servier Medical Art, ktorý poskytuje Servier, s licenciou Creative Commons Attribution 3.0 unported license; upravené podľa [5])

Skratky: CFU – kolóniu tvoriaca jednotka

Os črevo-mozog

Os črevo-mozog (GBA) je obojsmerné spojenie medzi centrálnym nervovým systémom (CNS) a enterickým nervovým systémom (ENS), ktorý je súčasťou

periférneho nervového systému, a umožňuje vzájomnú komunikáciu a ovplyvňovanie oboch častí. Toto obojsmerné spojenie umožňuje črevným sensorickým viscerálnym signálom, ktoré sa šíria cez *nervus vagus*, ovplyvňovať CNS pri regulácii reflexov a zmien nálady. Mozog zas usmerňuje signály na moduláciu fyziologických funkcií čreva. Aferentné a eferentné neuróny sa podieľajú na prepojení nervových dráh a prenose signálov rôznymi cestami, vrátane autonómneho nervového systému (ANS), ENS, osi hypotalamus-hypofýza-nadoblička, sympatoadrenálnej osi a zostupných monoaminergných dráh. Všetky tieto systémy sú úzko prepojené a regulované vzájomnými neurohumorálnymi vzťahmi. ENS tvorí sieť neurónov zodpovednú za vnútornú inerváciu čreva. Je zložený z dvoch gangliových plexov, *plexus myentericus Auerbacha* a *plexus submucosus* (Meissneri), ktoré regulujú črevné funkcie [6, 7]. Komunikácia medzi ENS a CNS prebieha pomocou intestinálnych neurónov a ganglií sympatikového nervového systému, pričom sensorické podnety putujú prostredníctvom aferentných dráh *nervus vagus*. Odpoveď CNS je sprostredkovaná ANS, ktorá je tvorená sympatikovou a parasympatikovou časťou, a ovplyvňuje funkcie čreva (trávenie, sekréciu žlče, produkciu hlienu a imunitnú odpoveď). Podľa nedávnych publikácií zohráva GMB dôležitú úlohu v interakciách GBA, preto sa začalo používať nové spojenie, kde je zahrnutý aj GMB. Vplyv GMB je sprostredkovaný pomocou mikrobiálnych metabolitov a bunkových zložiek, ako sú lipopolysacharidy (LPS), mastné kyseliny s krátkym reťazcom (SCFA), žľčové kyseliny, prekursor a metabolity tryptofánu, serotonín, glutamín a kyselina gama-aminomaslová. Pomocou týchto bakteriálnych metabolitov môže dochádzať k modulácii dôležitých procesov prebiehajúcich počas neurogenézy, k ovplyvňovaniu funkcií gliových buniek, myelinizácií a funkcií hematoencefalickej bariéry (BBB). Narušenie rovnováhy a zloženia GMB môže následne ovplyvniť zvyšné časti osi, čo sa môže prejaviť poruchami na úrovni ako čreva, tak aj mozgu [6, 8].

Dysbióza

Dysbióza je stav charakterizovaný kvantitatívnymi a kvalitatívnymi zmenami v zložení GMB, ktorých dôsledky môžu byť pre hostiteľa nepriaznivé. Kvantitatívne zmeny spočívajú v prítomnosti menšieho počtu prospešných baktérií a kvalitatívne v menšom množstve jednotlivých druhov baktérií [9]. Hlavné rody baktérií, ktoré nepriaznivo pôsobia na organizmus patria do čeľade *Enterobacteriaceae*. Do tejto skupiny zaraďujeme črevné komenzálne baktérie ako *Escherichia*, *Shigella*, *Proteus* a *Klebsiella*. Z dôvodu zníženia bakteriálnych populácií, ktoré majú protizápalové vlastnosti, ako *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, nadmerná produkcia škodlivých molekúl dysbiotickej mikroflóry a dysfunkcia intestinálnej bariéry a BBB, môže viesť k rozvoju závažných črevných a neurodegeneratívnych ochorení [10]. Zmeny v mikroflóre tvoria základ pre viaceré ochorenia, vrátane astmy, alergií, *sclerosis multiplex*, *diabetes mellitus* 2. typu, kolorektálneho karcinómu, zápalových ochorení čriev, obezity, kardiovaskulárnych komplikácií a neurodegeneratívnych ochorení ako AD a Parkinsonova choroba. Chronické užívanie antibiotík, stres, zmeny stravovania, akútne/chronické infekcie, genetika sú hlavné faktory zodpovedné za zmenu mikroflóry [9]. Experimentálne štúdie na gnotobiotických zvieratách a zvieratách, ktoré boli vystavené patogénnej mikrobiálnej infekcii, antibiotikám, probiotikám a fekálnej mikrobiálnej transplantácii, ukazujú vplyv GMB na hostiteľove kognitívne schopnosti a vplyv v patogenéze neurodegenerácie [1].

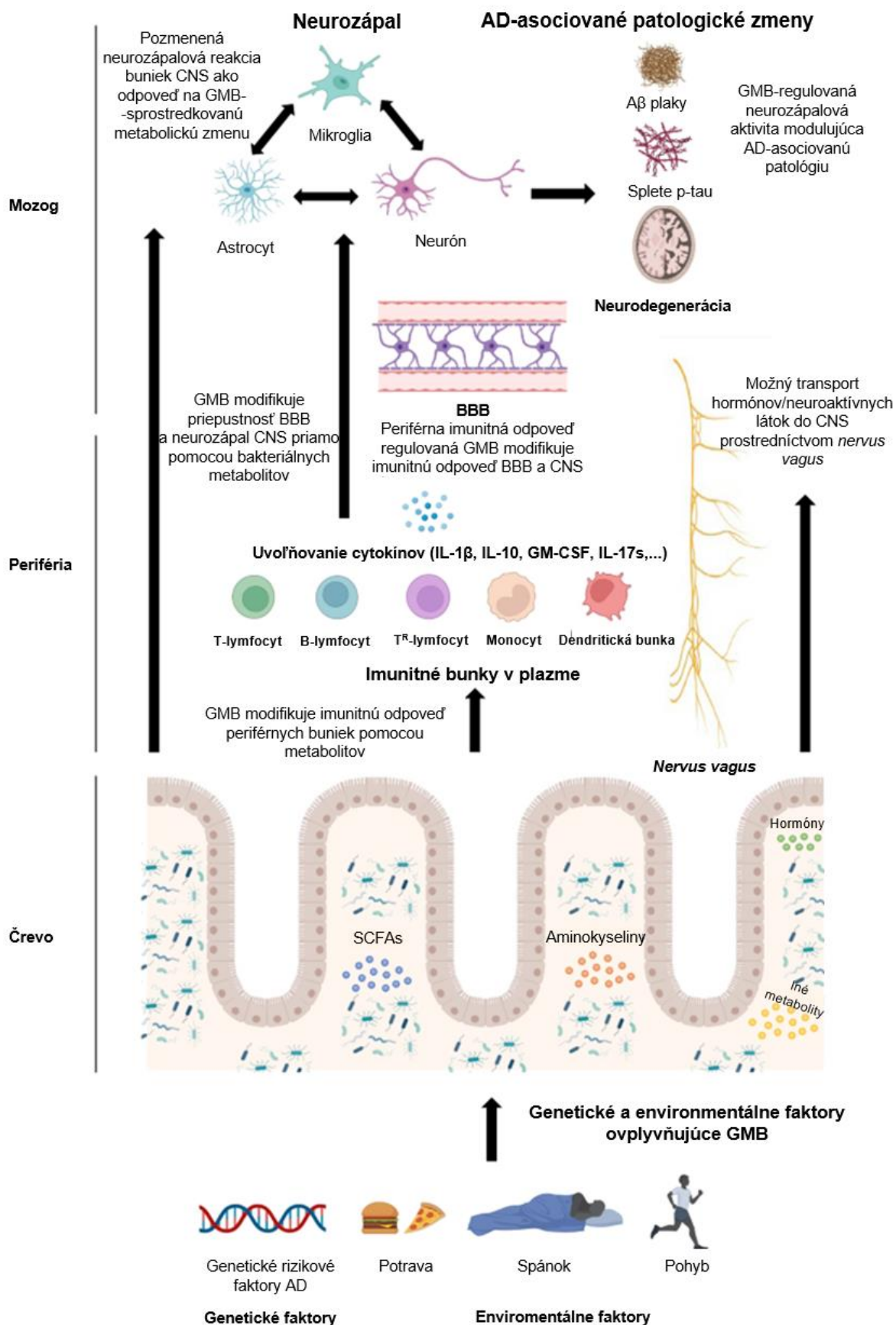
Vplyv dysbiózy na AD

Dysbióza predstavuje určité prepojenie medzi rizikovými faktormi AD a neurodegeneráciou. Starnutie, stres a obezita prispievajú k narušeniu intestinálnej bariéry, čo spolu s patologicky priepustnou BBB môže viesť k neurozápalu [8].

AD je neurodegeneratívne ochorenie, ktoré je najčastejšou príčinou demencie a v súčasnosti má málo klinicky účinných terapií modifikujúcich toto ochorenie. Na vývoj terapií modifikujúcich AD je nevyhnutné lepšie pochopiť mechanizmy iniciácie a progresie tohto ochorenia. Medzi patologické znaky AD patria senilné plaky zložené z amyloidných beta peptidov ($A\beta$), neurofibrilárne kľbká zložené z hyperfosforylovaných foriem tau proteínu asociovaného s mikrotubulmi a neurozápal, ktorý vedie k neurodegenerácii [11]. Neurozápal je spojený s vývojom a progresiou AD. GMB pozostáva z biliónov baktérií, *archaea*, prvokov, vírusov a húb a ukázalo sa, že potenciálne dokáže regulovať neurozápal pri rôznych neurologických ochoreniach vrátane *sclerosis multiplex* [12], Parkinsonovej choroby [13] a AD [14, 15].

Pôsobenie bakteriálnych bunkových zložiek je spojené s aktiváciou imunitných mechanizmov, ktoré následne ovplyvňujú signalizáciu GBA. Homeostáza imunitného systému je dôležitá pre udržanie imunitnej tolerancie komenzálnych kmeňov a súčasnou ochranou pred patogénmi. Potravou vyvolané narušenie hlienovej vrstvy môže vystaviť baktérie imunitným bunkám. Baktérie môžu uvoľniť imunitne aktívne časti bakteriálnej steny, LPS a peptidoglykány a spôsobiť lokálnu zápalovú reakciu, ktorá zvýši priepustnosť črevného epitelu a spôsobí uvoľnenie imunitných mediátorov do systémového obehu, čo vedie k imunitnej aktivácii v rôznych častiach tela, vrátane CNS [16]. LPS ovplyvňujú ENS a CNS pomocou aktivácie TLR (Toll-like receptor) v enterických neurónoch, senzorických aferentných neurónoch a iných bunkách mozgu. Mikroglia a astrocyty sú hlavné bunky, ktoré obsahujú TLR, predovšetkým TLR4. LPS vďaka aktivácii TLR spustí uvoľňovanie prozápalových cytokínov a zápalovú reakciu a ovplyvňuje CNS zvýšením tvorby zápalových cytokínov priamo v CNS alebo v čreve, čím nepriamo ovplyvňuje aj CNS. Aktivácia priamo v CNS je možná vďaka priepustnosti črevnej steny a výskytu LPS v systémovom obeh, vďaka čomu môže LPS plniť dôležitú úlohu v neurozápale a ochoreniach s ňou spojenými (napr. AD; [6, 8]).

GMB-sprostredkovaná regulácia neurozápalu môže prebiehať prostredníctvom priamych alebo nepriamych mechanizmov (obr. 2). Zmeny v GMB môžu modifikovať kompozíciu a množstvo mikrobiálnych metabolitov a periférnu imunitnú odpoveď, čo by následne mohlo ovplyvniť imunitnú odpoveď CNS (obr. 2; [17]). Nedávne štúdie naznačujú, že u pacientov s AD dochádza k zmenám v GMB v porovnaní s pacientmi bez AD [18] a taktiež modifikácia GMB a jej vplyv na rozvoj AD a neurozápal bol dokázaný aj na zvieracích modeloch AD [14, 15, 19, 20], presné mechanizmy, ktorými GMB ovplyvňuje AD, zostáva zatiaľ neobjasnené.



Obrázok 2 Hypotéza zapojenia GMB do patológie AD (prevzaté a upravené podľa [8])
Skratky: BBB – hematoencefalická bariéra; GM-CSF – faktor stimulujúci tvorbu kolónií granulocytov a makrofágov; IL – interleukín; p-tau – hyperfosforylovaný tau proteín; T^R – regulačný T-lymfocyt

Dve počiatkové štúdie v roku 2017 ukázali, že jedinci/pacienti s AD majú zmenené zloženie GMB v porovnaní s jedincami bez AD. Cattaneo et al. [21] merali pomocou kvantitatívnej PCR plazmatické hladiny RNA kódujúce vybrané cytokíny a množstvo konkrétnych GMB taxónov v stolici (*Escherichia/Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis*). Tieto výsledky odhalili zvýšenie mRNA kódujúcej prozápalové cytokíny IL-6, CXCL2 [ligand chemokínu (motív C-X-C) 2], a IL-1 β a zníženie koncentrácie mRNA kódujúcej protizápalový cytokín IL-10 u pacientov s AD v porovnaní s jedincami bez AD. Pozitívna korelácia bola pozorovaná medzi prozápalovými cytokínmi a *Escherichia/Shigella* (ktorá bola predtým asociovaná ako prozápalový taxón) a negatívna korelácia s *Eubacterium rectale* (ktorá bola predtým asociovaná ako protizápalový taxón). Okrem toho Vogt et al. [18] pozorovali pokles bakteriálnej diverzity GMB u pacientov s AD, ako aj pokles *Firmicutes* a *Bifidobacterium* a zvýšenie množstva *Bacteroidetes* v porovnaní s kontrolnou skupinou rovnakého pohlavia. Zhuang et al. [22] zistili pokles *Bacteroidetes* a zvýšenie *Actinobacteria* u pacientov s AD v porovnaní s kontrolou. Liu et al. [23] zistili zníženie *Firmicutes* a zvýšenie počtu proteobaktérií u pacientov s AD v porovnaní s kontrolami. Celkovo vzaté, výsledky z týchto štúdií naznačujú, že zloženie GMB je u pacientov s AD zmenené a že zmeny GMB môžu mať vplyv na progresiu AD. Tieto štúdie sú však korelatívne a na posúdenie, či zmeny v GMB priamo ovplyvňujú patogenézu AD budú potrebné výsledky terapeutických a klinických skúšok sprostredkovaných mikrobiómom ľudskej AD. Okrem toho sa zdá, že existuje malý konsenzus medzi konkrétnymi bakteriálnymi kmeňmi, ktoré sú v týchto štúdiách u pacientov s AD zmenené. Okrem toho sú počty pacientov a kontrol v publikovaných štúdiách pomerne malé (< 50 účastníkov/skupina) a existuje niekoľko mätúcich faktorov, ktoré môžu ovplyvniť zloženie GMB pacienta vrátane geografickej polohy, stravy a expozície životného prostredia. Bude tiež dôležité, aby protokoly odberu stolice boli štandardizované a aby sa brala do úvahy konzistencia stolice, pretože aj tá môže zmeniť výsledky zloženia GMB [24].

Bakteriálny amyloid

Rôzne bakteriálne kmeňe ako *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* sú schopné produkovať funkčné bakteriálne amyloidné proteíny. Bakteriálne amyloidy vykazujú rozdielnu primárnu štruktúru oproti amyloidom v mozgu, avšak ich terciárna štruktúra je podobná [25]. Produkcia amyloidných proteínov pomáha bakteriálnym bunkám udržať vzájomný kontakt a umožňuje tvorbu biofilmu, ktorý je rezistentný voči imunitným a fyzikálnym faktorom, ktoré by mohli deštruovať mikrobiálnu populáciu [26]. Medzi bakteriálne amyloidy patrí „curli“ produkovaný *Escherichia coli*, FapC produkovaný *Pseudomonas fluorescens*, PSMs (modulíny rozpustné vo fenole) produkovaný *Staphylococcus aureus* a mikrocín E492 produkovaný *Klebsiella pneumoniae* [27]. Existujú predpoklady, že bakteriálne amyloidné proteíny prispievajú k patologickému procesu AD dvoma spôsobmi. Prvý spôsob predstavuje „cross-seeding“ agregáciu A β , kde bakteriálne amyloidy pôsobia ako priónové proteíny a indukujú agregáciu hostiteľského amyloidu [28]. Druhým predpokladom je, že samotné mikrobiálne amyloidy dokážu indukovať zápal v rámci CNS a zároveň senzibilizujú imunitný systém, čo vedie k výraznejšej zápalovej reakcii voči endogénnej produkcii neurálneho amyloidu v mozgu [29, 30]. Toto tvrdenie bolo podporené prácou Chen et al. [31], ktorí zistili, že zvieratá exponované baktériám produkujúcim amyloidné proteíny „curli“, vykazovali vyššiu mieru cerebrálneho zápalu v porovnaní so zvieratami exponovanými baktériami, ktoré nemali schopnosť produkovať uvedený

amyloidný proteín. “Curli” je najlepšie popísaný extracelulárny bakteriálny amyloid produkovaný *Escherichia coli* K12. Jeho hlavná štruktúrna zložka, CsgA amyloidný prekursor, obsahuje s patogénom asociované molekulárne vzory, rovnaké ako A β 42, ktoré sú registrované ľudským vrodenným imunitným systémom a aktivujú TLR2 spolu s CD14 (cluster of differentiation 14) – marker LPS [1]. Popisujú sa dva spôsoby, akým sa amyloid dostáva do CNS. Prvý začína v enterocytoch, kde je amyloid integrovaný do chylomikrónov obsahujúcich apolipoproteín E, prostredníctvom ktorých sa krvným obehom dostáva do mozgu. Druhý spôsob predstavuje retrográdny transport cez *nervus vagus* do CNS. Táto teória vyplýva z podobných vlastností A β proteínu a priónov. Zároveň bola táto retrográdna nervová dráha opísaná pre α -synukleín pri Parkinsonovej chorobe [10]. Bakteriálne amyloidy následne aktivujú NF κ B (nukleárny faktor kappa B), čo vedie k nadmernej regulácii prozápalových microRNA-34a, ktoré znižujú expresiu TREM2 (spúšťačiaci receptor exprimovaný na myeloidných bunkách 2) – marker makrofágov, čo znižuje schopnosť mikrogliu fagocytovať peptid A β 42 [1].

Diéta

Prepojenie medzi potravou a rozvojom AD je v súčasnosti už dobre zdokumentované. Epidemiologické štúdie naznačujú, že diéta s vysokým obsahom tukov a obezita sú spojené so zvýšeným rizikom rozvoja AD a demencie [32, 33]. Okrem toho je výskyt AD vyšší v krajinách, ktoré zvyčajne konzumujú potravu bohatú na tuk na rozdiel od stravy s nízkym obsahom tukov. Niekoľko štúdií na AD myších modeloch ukázalo, že u myší, ktoré konzumovali potravu s vysokým obsahom tukov, došlo k urýchleniu rozvoja AD neuropatológie. V modeloch amyloidózy geneticky modifikovaných myší [34, 35] bol po konzumácii stravy s vysokým obsahom tukov pozorovaný zvýšený počet A β plakov v mozgu zvierat. Okrem toho niekoľko štúdií ukázalo, že diéta s vysokým obsahom tukov môže viesť k zvýšeniu zápalových faktorov nervového tkaniva [34-36] a zníženiu výkonu v behaviorálnych testoch súvisiacich s rozvojom AD [35, 37]. Uskutočnili sa však aj niektoré štúdie, ktoré nepozorovali vplyv stravy s vysokým obsahom tukov na neuropatológiu súvisiacu s AD [38]. Rozdiely vo výsledkoch v myších modeloch môžu byť spôsobené rozdielmi v modeli, pohlaví a liečbe. Údaje z klinických štúdií však vo všeobecnosti naznačujú, že diéta s vysokým obsahom tukov a obezita sú rizikovými faktormi pre AD. Naopak, existujú dôkazy naznačujúce, že stredomorská diéta, ktorá obsahuje rastlinné potraviny a „zdravé“ tuky, môže pôsobiť neuroprotektívne [39]. Ballarini et al. [40]. nedávno pozorovali, že dodržiavanie stredomorskej diéty viedlo k nižším stratám objemu šedej hmoty, zlepšeniu pamäti, nižšej koncentrácii A β plakov a t-pau proteínu. Okrem toho sa ukázalo, že ketogénna diéta, ktorá zahŕňa vysoký príjem tukov a nízku spotrebu sacharidov, má taktiež potenciálne využitie pri výskume AD [41]. Štúdie na myších modeloch AD ukázali, že ketogénna diéta môže zlepšiť pamäť, znížiť množstvo amyloidných plakov ako aj znížiť mieru neurodegenerácie a neurozápalu [42]. Okrem toho sa ukázalo, že ketogénna diéta mení zloženie GMB a zlepšuje funkcie neurovaskulatúry, čo by mohlo byť taktiež využiteľné pri terapii AD [43]. Nagpal et al. [44] zistili, že modifikovaná stredomorská ketogénna diéta vedie k zmenám metabolickej produkcie GMB a koncentrácií SCFA u pacientov s miernou kognitívnou poruchou, čo korelovalo s analýzou prítomnosti amyloidu v cerebrospinálnej tekutine. Celkovo sa zdá, že potrava môže ovplyvniť riziko a progresiu AD. Je potrebné vykonať dlhodobé štúdie, aby sa zistilo, či diétne zásahy môžu modifikovať fenotyp AD prostredníctvom GMB. Okrem toho je potrebné vykonať viac experimentov na zvieracích modeloch, aby sa určilo, či sú zmeny GMB a úprava potravy potrebné na modifikáciu fenotypu AD. Pravdepodobne bude existovať isté prepojenie medzi týmito

dvoma zložkami – diéta modifikuje kompozíciu a metabolity GMB, ktorý reguluje periférny zápal a neurozápal, čo môže následne ovplyvniť progresiu patológie AD [8].

Záver (perspektíva)

GMB je hlavným regulátorom zápalu v organizme, a preto je veľmi dôležitý pre rozvoj a progresiu ochorení zahŕňajúcich AD [1, 8, 25, 30,]. Pochopenie mechanizmov, ktorými môže GMB ovplyvniť progresiu AD, môže odhaliť dôležitý terapeutický cieľ. Keďže počiatkové štúdie ukázali hlboký účinok zmeny GMB v patológii súvisiacej s AD [9, 10, 25] a že pacienti s AD majú zmenené zloženie GMB v porovnaní so zdravými kontrolami [18], došlo k explózii záujmu o toto možné prepojenie. Na základe doterajších štúdií existuje hypotéza, že GMB reguluje periférny zápal ako aj zápal CNS pravdepodobne prostredníctvom mikrobiálnych metabolitov (obr. 2), ktoré majú vplyv na patológiu AD. Periférne imunitné zmeny pravdepodobne ovplyvňujú imunitné reakcie v mikrogliách a iných bunkách parenchýmu mozgu, čo môže ovplyvniť amyloidózu a neurodegeneráciu. Navyše SCFA produkované baktériami GMB môžu modulovať amyloidózu [45]. Vzostup genomických technológií a bioinformačných nástrojov pravdepodobne bude nápomocný v úsilí nájsť špecifické cesty pre jednotlivé typy buniek, ktoré sú ovplyvnené GMB a vedú k rozvoju patológie AD. Okrem toho bude zaujímavé pochopiť, ako modifikátory GMB, ako je potrava, geografická poloha, pohlavie, starnutie, pohyb a spánok, môžu ovplyvniť terapeutické zameranie GMB. Dôležitou otázkou je, či je možné terapiu AD založenú na GMB zovšeobecniť alebo či bude potrebné prispôbiť ju každému pacientovi. Hoci výskum objasňujúci spojenie medzi GMB a AD v pomerne krátkom čase značne pokročil, použitie nových nástrojov a prístupov štúdiu posunie dopredu, aby sa nakoniec táto asociácia úplne pochopila a našla terapeutické využitie [1, 8].

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0192/22 a VEGA 1/0274/23.

Literatúra

- [1] Jiang, *JAD*. **2017**, 58(1): 1–15.
- [2] Bielik a Šoltys, *Univerzita Komenského v Bratislave*, **2020**, 132 s., ISBN 978-8-02-234981-9
- [3] Vemuri, *BioMed. Research International*. **2018**, 4178607.
- [4] Thursby, *Biochem. J.* **2017**, 474(11): 1823–1836.
- [5] Pironi, In: *Adult Short Bowel Syndrome: Nutritional, Medical, and Surgical Management. Academic Press*, **2018**, s. 17–26, ISBN 978-0-12-814330-8
- [6] Suganya, *IJMS*. **2020**, 21(20): 7551.
- [7] Cryan, *Physiological Reviews*. **2019**, 99(4): 1877–2013.
- [8] Chandra, *Mol. Neurodegeneration*. **2023**, 18: 9.
- [9] Sharma, *Biomolecules*. **2021**, 11(5): 678.
- [10] Giovannini, *JCM*. **2021**, 10(11): 2358.
- [11] Long, *Cell*. **2019**, 179(2): 312–39.
- [12] Berer, *Nature*. **2011**, 479(7374): 538–41.
- [13] Aho, *Mol. Neurodegener.* **2021**, 16(1): 6.
- [14] Dodiya, *J. Exp. Med.* **2019**, 216(7): 1542–60.
- [15] Dodiya, *J. Exp. Med.* **2021**, 219(1): e20200895.
- [16] Margolis, *Gastroenterology*. **2021**, 160(5): 1486–1501.
- [17] Bairamian, *Mol. Neurodegener.* **2022**, 17(1): 19.
- [18] Vogt, *Sci. Rep.* **2017**, 7(1): 13537.
- [19] Mezö, *Acta Neuropathol. Commun.* **2020**, 8(1): 119.
- [20] Colombo, *eLife*. **2021**, 10: e59826:e59826.
- [21] Cattaneo, *Neurobiol. Aging*. **2017**, 49: 60–8.
- [22] Zhuang, *J. Alzheimers Dis.* **2018**, 63(4): 1337–46.
- [23] Liu, *Brain Behav. Immun.* **2019**, 80: 633–43.
- [24] Vandeputte, *Gut*. **2016**, 65(1): 57–62.
- [25] Shabbir, *Nutrients*. **2021**, 13(2): 690.

- [26] Friedland, *IJMS*. **2021**, 21(5): 1652.
- [27] Schwartz a Boles, *Current Opinion in Microbiology*. **2013**, 16(1): 93–99.
- [28] Zhou, *JBC*. **2012**, 287(42): 35092–35103.
- [29] Qian, *Ageing Research Reviews*. **2021**, 68: 101317.
- [30] Friedland, *PLoS Pathogens*. **2017**, 13(12): e1006654.
- [31] Chen, *Scientific Reports*. **2016**, 6: 34477.
- [32] Ma, *Int. J. Epidemiol.* **2020**, 49(4): 1353–65.
- [33] Nianogo, *JAMA Neurol.* **2022**, 79(6): 584–91.
- [34] Bracko, *Sci. Rep.* **2020**, 10(1): 9884.
- [35] Mazzei, *Aging Cell*. **2021**, 20(8): e13429.
- [36] Medrano-Jiménez, *J. Neuroinflammation*. **2019**, 16(1): 143.
- [37] Rollins, *Neuroimage Clin.* **2019**, 21: 101606.
- [38] Salas, *Neurobiol. Dis.* **2018**, 113: 82–96.
- [39] Rainey-Smith, *Transl. Psychiatry*. **2018**, 8(1): 238.
- [40] Ballarini, *Neurology*. **2021**, 96(24): e2920-32.
- [41] Phillips, *Alzheimers Res. Ther.* **2021**, 13(1): 51.
- [42] Xu, *CNS Neurosci. Ther.* **2022**, 28(4): 580–92.
- [43] Ma, *Sci. Rep.* **2018**, 8(1): 6670.
- [44] Nagpal, *EBioMedicine*. **2019**, 47: 529–42.
- [45] Colombo, *eLife*. **2021**, 10: ôe59826.

**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 projektom
VEGA 1/0192/22**