

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



NOVÉ TRENDY A PERSPEKTÍVY V HISTOLÓGII

X

MARTIN 2024



Nové trendy a perspektívy v histológii X

Recenzovaný zborník prác

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

Recenzenti: prof. RNDr. Silvia Rybárová, PhD.
doc. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

Grafická úprava: doc. RNDr. Mária Kovalská, PhD.

Obálka zborníka: doc. 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 2024

Tlač: Tlačiareň P+M, s.r.o., Turany 2024

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

ISBN 978-80-8187-159-7

EAN 9788081871597

Nihil permanet nisi mutatio

Hérakleitos z Efezu

OBSAH

PREDHOVOR	7
Novákiová et al.	8
Profilovanie lncRNA molekúl u gliómových pacientov a ich korelácia s izocitrátdehydrogenázou	
Vrzgula et al.	13
Korelácia výskytu superoxiddismutázy 2 v nádorových bunkách maligných nádorov pankreasu s veľkosťou primárneho tumoru	
Hiveš Holečková et al.	16
Asociácia polymorfizmov rs1799977 a rs2303428 s hladinami sérového PSA u pacientov s mKRP	
Krajňáková et al.	19
Úloha proteín arginín metyltransferázy 5 v prekancerózných léziách krčka maternice	
Cígerová et al.	24
Imunohistochemická analýza mismatch reparačných proteínov v kolorektálnych karcinómoch	
Polakovičová et al.	28
Zohrávajú imunohistochemicky pozitívne Merkelove bunky úlohu v patogenéze aktinickej keratózy? Imunohistochemická štúdia	
Haviarová et al.	32
Morfológia variability brušnej splete	
Zavhorodnia et al.	36
Makroskopické a mikroskopické hodnotenie vývojových anomálií štítnej žľazy: kazuistika	

Macková et al. 43

Účinok ionizujúceho žiarenia na zastúpenie gliových buniek v mozgu starnúcich potkanov

Murín et al. 47

Exploring Cancer Metabolism Through Fluxomics Based on Polarome analysis

Kapinová et al. 52

Protinádorové účinky Aronia melanocarpa L. na parametre nádorových kmeňových buniek v experimentálnom modeli karcinómu prsníka

Sadloňová et al. 56

Protinádorová aktivita Salvia officinalis v terapeutickom animálnom modeli karcinómu prsníka

Stankovianska et al. 60

Hippophae rhamnoides L. v modeli mamárnej karcinogenézy: hodnotenie mechanizmu účinku in vivo

Stankovianska et al. 64

Modulačné účinky Rakytніка rašetliakového na chemické modifikácie histónov v animálnom modeli karcinómu prsníka

Mokrá et al. 68

Vplyv liečby dexametazónom na imunohistochemické markery fibrózy v modeli pľúcnej silikózy u potkanov

Andrašková et al. 72

Vplyv Wi-Fi žiarenia na vývoj žľaznatého žalúdka kuracích embryí

Holovská et al. 76

Vplyv Wi-Fi žiarenia na distribúciu glykogénu v hepatocytoch kuracieho embrya na 9. embryonálny deň

Tirpáková et al. 80

Quail chorioallantoic membrane as an in vivo model for biomaterial testing

Demčišáková et al. 83

Angiogénny potenciál pórovitého biomateriálu hodnotený pomocou ex-ovo modelu vtácej chorioalantoickej membrány

Pokorná et al. 88

Effects of chemical agents intended for disinfection of eggshells on gene expression of CYP1A5 and CYP3A37

Štefancová et al. 92

Sledovanie vplyvu chemických činidiel určených na dezinfekciu vaječnej škrupiny na molekulovej úrovni

Ševčíková et al. 95

T cell mediastinal lymphoma with leukemic phase in dog.
Case report

Gwashavanhu et al. 99

Účast hipokampu na patogenéze
vybraných neurodegenerativních
ochorení

Lacková et al. 105

Terapeutický potenciál nanočástic
konjugovaných s fytochemikáliami v
predklinických modeloch gynekologických
nádorových ochorení

Holovská et al. 110

Vývoj pečeňových sinusoid

Predhovor

Veda a prax sú dva navzájom súvisiace procesy, ktoré viac či menej ovplyvňujú život každého akademického pracovníka. S týmto konštatovaním ide ruka v ruku aj každoročné publikovanie nášho zborníka „Nové trendy a perspektívy v histológii“, tento rok ide o jeho desiate vydanie.

Všetky doterajšie zborníky prinášali práce vyslovene teoretické a to z každej oblasti medicíny, ale aj práce z každodennej rutinnej praxe. V tomto trende by sme pokračovali aj v budúcnosti.

Zaužívané zvyklosti pri publikovaní predchádzajúcich edícií zborníka tradične dodržiavame aj tento rok.

Martin, Jún 2024

Zostavovatelia zborníka



Profilovanie lncRNA molekúl u gliómových pacientov a ich korelácia s izocitrátdehydrogenázou

Novákiová, Z.¹, Dibdiaková, K.^{1,2}, Galanda, T.³, Račay, P.¹, Hatok, J.¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej patofyziológie, Martin; ³Fakultná nemocnica s poliklinikou F.D.Roosevelta, Neurochirurgická klinika SZU, Banská Bystrica
novakiova2@uniba.sk

Abstract

Gliomas are among the most common forms of brain malignancies in adults, and glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive. Long non-coding RNAs (lncRNAs), which additionally contribute to gliomagenesis at multiple levels, represent a novel approach in unraveling resistance mechanisms. A total of 84 lncRNA (associated with cancer, disease, cell differentiation, inflammatory response, or autoimmunity) genes were analyzed using the RT² lncRNA PCR array Human lncFinder. We observed amplification in 69% of the products, of which 21 had higher expression levels in glioma patients (n = 12) compared to meningioma (n = 10). Significant up-regulation was observed for the genes: H19, HOTAIR, HOTAIRM1, JPX, MALAT1, MIAT, SPRY4-IT4, TERC and XIST. To investigate the potential use of lncRNAs as biomarkers, we examined lncRNA dysregulation dependent on the IDH status detected by immunohistochemistry. We found that several lncRNAs, namely, H19, MALAT1, TUG1, and XIST may function as glioma risk factors. Taken together, the four-lncRNA risk signature was identified as a novel prognostic marker for IDH mutant glioma patients and may potentially lead to improvements in the lives of glioma patients.

Keywords: gliomas, lncRNA, isocitrate dehydrogenase

Úvod

Mozgové malignity, ktoré vznikajú z gliálnych buniek, sú označované ako gliómy, najčastejšie sa vyskytujúce nádory centrálnej nervovej sústavy [1, 2]. Za agresívnu formu primárnych nádorov mozgu sa považuje multiformný glioblastóm (GBM), pre ktorý je typická nepriaznivá prognóza, rapidná progresia i zlá odpoveď na liečbu [3]. Medián dĺžky prežívania pacientov s GBM po diagnóze je 16 – 18 mesiacov, pričom len 5,8 % pacientov sa dožíva 5 rokov [4].

Štandardná liečba sa v klinickej praxi zakladá na chirurgickej resekcii najväčšej bezpečnej oblasti nádoru, po ktorej nasleduje kombinovaná rádioterapia a chemoterapia [4, 5]. Tento prístup je limitovaný nielen hematoencefalickou bariérou, ktorá je prekážkou pre chemoterapeutiká, ale aj rádio- a chemorezistenciou [4, 6].

Gliómy sú považované za genetickú chorobu, na ktorej sa podieľajú gény dvoch hlavných kategórií – onkogény a supresorové gény [7]. Z celého ľudského genómu len 2% tvoria proteín kódujúce oblasti. Nekódujúce RNA (ncRNA) sú rozdelené na základe dĺžky nukleotidového reťazca, pričom ncRNA s dĺžkou viac ako 200 nukleotidov sa nazývajú dlhé ncRNA (*long non-coding RNA*, lncRNA) a plnia kľúčové regulačné úlohy v procesoch transkripcie a translácie [7]. Súčasné poznatky naznačujú tiež, že lncRNA zohrávajú pleiotropnú rolu v regulácii chemorezistencie nádorov [8].

Ďalším z faktorov pri diagnostikovaní a definovaní dĺžky prežívania pacientov s GBM je určenie hladiny izocitrátdehydrogenázy (IDH) pomocou imunohistochemickej

analýzy, resp. detegovania mutácií v géne kódujúcom samotný enzým. IDH je esenciálny enzým zapojený do hlavných metabolických procesov, ako je cyklus TCA, metabolizmus glutamínu, adipogenéza a redoxná regulácia. Existuje v troch izoformách, pričom IDH1 a IDH2 sa používajú ako biomarkery gliómu [9]. My sme sa preto v našej práci rozhodli o koreláciu imunohistochemicky detegovanej IDH1 s expresiou vybraných lncRNA génov.

Materiál a metódy

Na izoláciu celkovej RNA sme použili 15 – 30 mg zmrazeného tkaniva od pacientov s nádormi mozgu (4 gliómy s nízkym stupňom malignity, 8 gliómov s vysokým stupňom malignity a 10 meningiómov), získaných z Neurochirurgickej kliniky Rooseveltovej nemocnice v Banskej Bystrici. Pomocou kitu AllPrep® DNA/RNA (Qiagen, USA) sme 2 µg získanej RNA reverznou-transkripciou prepísali do cDNA, ktorú sme následne v SybrGreen mastermixe o objeme 100 µl vložili do komerčne pripravenej 96-jamkovej platne s príslušnými oligonukleotidmi.

Na samotné stanovenie vybraných lncRNA molekúl sme použili „RT² lncRNA PCR Array Human lncFinder“ formu s detekciou pomocou real-time PCR cykléra ViiA7 (Applied Biosystems, USA). Získané údaje sme korelovali so stavom izocitrátdehydrogenázy 1 (ďalej označovanej ako IDH) kvantifikovanej do troch stupňov (0 – žiadna prítomnosť, 1 – mierny až stredný výskyt pozitivity a 2 – vysoká pozitivita) pomocou imunohistochemickej analýzy firmou Cytopathos, s.r.o (Bratislava).

Výsledky

V štúdiu sme sa pomocou RT-PCR metódy zamerali na stanovenie 84 lncRNA komerčnou array-ou, pričom sme amplifikáciu zaznamenali v 58 z nich (tab. 1). Namerané Ct hodnoty sme analyzovali na základe $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metódy v online nástroji od firmy QIAGEN. Údaje sme normalizovali k hodnotám priemeru troch endogénnych kontrol: ACTB (β-aktín), B2M (β-2-mikroglobulín) a RPLP0 (kyslý proteín P0 veľkej ribozomálnej podjednotky). Následne sme vypočítali násobné zmeny v regulácii exprese GBM vzoriek oproti MNG skupine (tab. 1). Hodnoty násobnej zmeny exprese väčšie ako 2 naznačujú zvýšenú expresiu (nadreguláciu); hodnoty menšie ako -2 vyjadrujú zníženú expresiu (podreguláciu). Štatistická významnosť je vyjadrená pomocou Studentovho t-testu p-hodnotou.

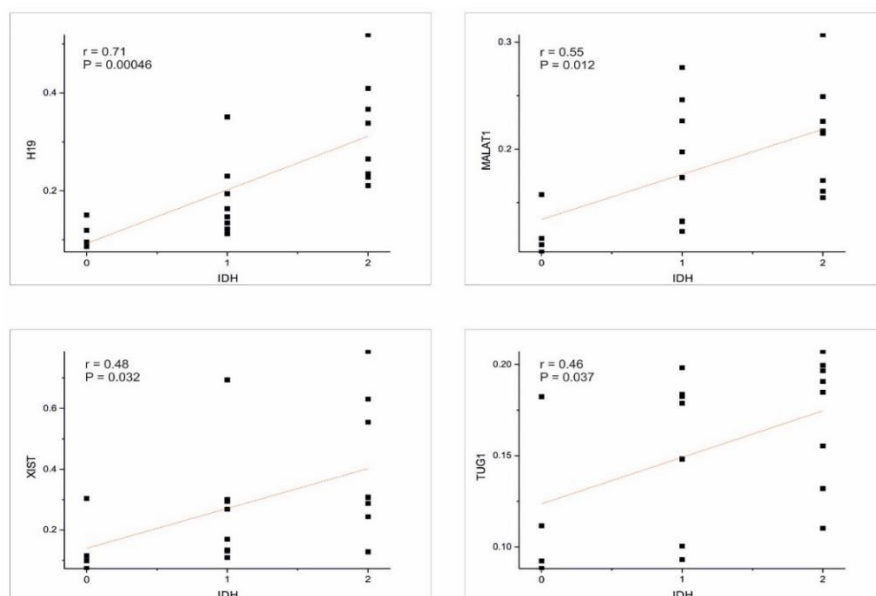
Pri hodnotení dát sme zaznamenali dereguláciu v skupine GBM oproti MNG pri 21 lncRNA, pričom sme sledovali 16 lncRNA so zvýšenou expresiou a 4 so zníženou expresiou (tab. 1). Pri nadregulovaných lncRNA sme v prípade 11 z nich pozorovali signifikantný rozdiel.

Pri génoch so zníženou expresiou to bolo v 2 prípadoch (tab. 1). Konkrétne pre gény NRON (-3,32; p= 0,035) a PTSC3 (-2,95; p= 0,032). Z nadregulovaných génov u GBM nás zaujali tie, ktorých zmeny predstavovali viac ako štvornásobky a teda konkrétne H19 (4,60), HOTAIRM1 (4,43), MIAT (4,55) a XIST (4,90). Ku génom s hodnotou regulácie nad dva patrili tieto lncRNA: BDNF-AS, DISC2, HOTAIR, HULC, JPX, LINC00568, LINC00570, MEG9 a TINCR.

Tabuľka 1 Zoznam stanovených génov lncRNA a ich zmeny v reguláciách medzi skupinami. MNG – meningióm, GBM – glioblastóm. Významné podregulácie sú vyznačené hrubou zelenou farbou, nadregulácie červenou

Poradie génu	Symbol génu	Násobná zmena regulácie GBM / MNG	t-test (p)	Poradie génu	Symbol génu	Násobná zmena regulácie GBM / MNG	t-test (p)
1	AIRN	-2.08	0.145	30	LINC00568	2.75	0.044
2	ATXN8OS	1.04	0.472	31	LINC00570	2.50	0.077
3	BANCR	-1.81	0.156	32	LINC00599	1.50	0.236
4	BCYRN1	1.28	0.326	33	LINC-ROR	amplifikácia iba v MNG	
5	BDNF-AS	2.44	0.052	34	LUCAT1	1.06	0.457
6	BOK-AS1	-1.50	0.196	35	MALAT1	3.16	0.005
7	CDKN2B-AS1	-1.21	0.345	36	MEG3	1.51	0.283
8	DANCR	1.42	0.221	37	MEG9	2.43	0.081
9	DISC2	2.02	0.109	38	MIAT	4.55	0.007
10	DLX6-AS1	1.06	0.456	39	NEAT1	-1.49	0.312
11	EGOT	-1.29	0.322	40	NRON	-3.32	0.035
12	EMX2OS	-1.23	0.373	41	OIP5-AS1	1.07	0.458
13	FAS-AS1	-1.80	0.133	42	PCAT1	-2.19	0.068
14	FTX	-1.35	0.233	43	PRINS	-1.46	0.216
15	GACAT1	1.06	0.463	44	PTCSC1	-1.14	0.396
16	GAS5	-1.18	0.382	45	PTCSC3	-2.95	0.032
17	GNAS-AS1	-1.51	0.189	46	PTEMP1-AS	1.16	0.418
18	H19	4.60	0.009	47	RBM5-AS1	1.13	0.418
19	HAR1A	-1.26	0.312	48	SNHG16	-1.18	0.397
20	HAR1B	-1.17	0.391	49	SOX2-OT	-1.11	0.437
21	HEIH	1.82	0.065	50	SPRY4-IT1	3.96	0.028
22	HOTAIR	2.95	0.016	51	ST7-AS2	1.15	0.403
23	HOTAIRM1	4.43	0.003	52	TERC	3.59	0.021
24	HOXA11-AS	1.61	0.143	53	TINCR	2.15	0.092
25	HULC	2.78	0.038	54	TMEM161B-AS1	1.42	0.284
26	IGF2-AS	amplifikácia iba v GBM		55	TUG1	-1.70	0.176
27	IPW	1.17	0.391	56	TUSC7	-1.73	0.163
28	JPX	2.76	0.036	57	XIST	4.90	0.022
29	KCNQ1OT1	1.22	0.352	58	ZFAS1	1.29	0.348

V druhej časti experimentov sme sa rozhodli u gliómových pacientov korelovať status IDH oproti údajom o hladinách expresie lncRNA. Pozitívny vzťah sme zaznamenali pre gény H19, MALAT1, TUG1 a XIST (obr. 1). Štatistické testovanie sme realizovali pomocou softvéru OriginPro 8.5, metódou lineárnej regresie s dvojfaktorovou ANOVA post hoc analýzou.



Obrázok 1 Korelácia expresie lncRNA so stavom izocitrátdehydrogenázy 1 (IDH). Hodnoty expresie lncRNA sú vyjadrené ako $1/Ct_{(GOI)} - Ct_{(HKG)}$ na osi „y“. Stupeň hladín IDH vyjadrený ako intenzita pozitivity na osi „x“. GOI – „gene of interest“; HKG – housekeeping genes; r – Pearsonov korelačný koeficient; P – pravdepodobnosť získania pozorovanej štatistiky

Diskusia

Dlhé nekódujúce RNA zohrávajú kľúčovú rolu v rôznych aspektoch patofyziológie nádorov mozgu. Ako atraktívne objekty záujmu sa pre nové štúdie javia najmä vďaka svojej tkanivovo-špecifickej expresii [10]. Zmenená expresia lncRNA môže obmedziť základné procesy v bunke a umožniť nástup tumorigenézy ako aj samotnej rezistencie na chemoterapiu [11].

Jedným zo známych epigenetických regulátorov génov je lncRNA *homeobox transcript antisense intergenic RNA* (HOTAIR). Výslednou funkciou je nárast komplexnej trimetylácie chromatinu a potlačenie expresie HOXD génu [7]. Nakoľko je lncRNA HOTAIR nadexprimovaná v GBM, je využívaná ako diagnostický a prognostický marker. Štúdie uskutočnené na predklinických *in vivo* modeloch poukázali na to, že ciele blokované tejto lncRNA viedlo k spomaleniu rastu nádoru [10]. V našich glioblastómových vzorkách sme gén pre spomínanú lncRNA detegovali takmer trojnásobne vyšší ako v prípade meningiómov.

Podobne ako HOTAIR, *X-inactive specific transcript* (XIST) lncRNA sa podieľa na regulácii chromatinu modifikovaním DNA a RNA [7]. XIST podporuje tumorigenézu a angiogenézu gliómov tak, že cielene inhibuje miR-133a – tá pôsobí na transkripčný faktor SOX4, ktorý je spájaný s mnohými fyziologickými procesmi, ako aj samotným vývinom nervového systému [12].

H19 lncRNA má konzervovanú sekundárnu štruktúru RNA a je prekursorom miR-675, prostredníctvom ktorej ovplyvňuje invázivnosť buniek. Je známa pozitívna korelácia stupňa malignity s expresiou H19 a jej miR-675 derivátu [13]. Okrem úlohy pri invázii, je H19 schopná viazať sa na miR-138, ktorá za normálnych podmienok inhibuje *hypoxia-inducible transcription factor 1* (HIF1) a *vascular endothelial growth factor* (VEGF), ktoré sú potrebné pre adaptáciu na rôzny stupeň okysličenia buniek v tumorigenéze [10]. Jej nadreguláciu v glioblastómoch sme potvrdili 4,6 násobne zmenenú.

Expresia lncRNA *metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1* (MALAT1) je v GBM zvýšená a je spájaná s invázivnosťou aj v meningiómoch [14], [15]. V GBM podporuje MALAT1 expresiu *SRY-box transcription factor 2* (SOX2) tým, že potláča miR-129 a ovplyvňuje tak viabilitu, proliferáciu a tumorigenézu gliómových kmeňových buniek [14]. Hladina expresie MALAT1 negatívne koreluje s expresiou miR-145, ktorá vo väčšine nádorových ochorení, vrátane primárnych neoplaziem mozgu, funguje ako nádorový supresor [15].

Pri mozgových nádoroch je známe, že stav mutácie IDH súvisí s pacientovou prognózou a s molekulárnym podkladom gliómu. Skupina Chen a kol. na základe transkriptomických údajov analyzovali vo vzorkách od 775 pacientov s mutantným IDH gliómom, že 21 lncRNA (62,6 % z 33 lncRNA) bolo nadregulovaných a 12 lncRNA bolo podregulovaných. To naznačuje, že zvýšené lncRNA zohrávajú dôležitejšiu úlohu v mutantoch IDH. Nakoniec vybrali štyri lncRNA (JAG1, PVT1, H19 a HAR1A) s nezávislou prognostickou hodnotou, pričom gény JAG1, PVT1 a H19 spájali s rizikom vzniku GBM, zatiaľ čo HAR1A považovali za ochranný gén [16].

My sme dokázali koreláciu v prípade štyroch lncRNA (H19, MALAT1, TUG1 a XIST) s nárastom positivity IDH u pacientov s glioblastómom. Pribúdajú dôkazy, že najmä H19, MALAT1 a TUG1 sú nadmerne exprimované v primárnych gliómoch a tým pádom sú úzko spájané s prítomnosťou IDH mutácií [14, 17, 18].

Okrem úlohy pri tumorigenéze zohrávajú lncRNA molekuly kľúčovú rolu aj v ochrane pred vznikom nádoru. Jednou z protektívnych lncRNA je *non-coding repressor of the nuclear factor of activated T cells* (NRON). NRON sa podieľa na imunitnej odpovedi asociovanej s rakovinou, ktorá zahŕňa aktiváciu T buniek, prezentáciu antigénu

rakovinových buniek a CD8 T bunkovú infiltráciu [19]. Dôležitosť NRON bola pozorovaná v prípade rakoviny prsníka, kde nastal signifikantný pokles v proliferácii a invazívnosti buniek s nadregulovanou NRON lncRNA [20]. Nami pozorovaná 3,2 násobná podregulácia potvrdzuje, že sa jedná o tumor supresorovú lncRNA.

Papillary thyroid carcinoma susceptibility candidate 3 (PTCSC3) lncRNA je považovaná za tumor-supresorovú ncRNA. Reguluje procesy apoptózy, bunkovej proliferácie, migrácie, invazívnosti a angiogenézy. Tumor supresorová funkcia PTCSC3 lncRNA spočíva v potláčaní aktivácie Wnt/ β -katenínovej signálnej dráhy. Cieľovým génom tejto lncRNA je LRP6, ktorý sa nachádza v smere transkripcie pred génmi β -katenínu, cyklínu D1 a C-myc, ktorých expresia je pri nadexprimovanom PTCSC3 znížená. V prípade gliómov je podobne, ako v prípade iných nádorov, pozorovaná znížená hladina PTCSC3 lncRNA [21]. Táto skutočnosť korelovala s našimi pozorovaniami, nakoľko sme potvrdili signifikantnú, 2,95 násobne zníženú expresiu.

Zatiaľ čo súčasné štúdie poskytujú predbežné indície o dopadoch dysregulácie lncRNA a mutácií IDH v gliómoch, pre dokonalejšie pochopenie základného molekulárneho mechanizmu gliomagenézy budú potrebné budúce rozsiahle integrované analýzy.

Záver

Dysregulácia lncRNA prispieva k rozvoju gliómov, ako aj indukciu chemo- a rádiorezistencie v kooperácii s mutovanou IDH, čo môže byť akceptovaný prístup na klasifikáciu a personalizáciu gliómov. Okrem cielenej terapie majú lncRNA potenciál revolučne zmeniť prístupy k tekutej biopsii na detekciu a monitorovanie gliómov. Na potvrdenie exaktnej úlohy vybraných, resp. nových lncRNA sú však nevyhnutné doplňujúce experimenty. Je preto nevyhnutné uznať, že cesta k využitiu plného potenciálu lncRNA v terapii gliómov je ešte len v počiatočnom štádiu.

Táto práca bola podporovaná „Agentúrou na podporu výskumu a vývoja“ na základe Zmluvy č. APVV-18-0088 a UK grantom UK/3045/2024.

Literatúra

- [1] Ghafouri-Fard, *Front. Oncol.* **2021**, 11.
- [2] Kim, *J. Hematol. Oncol.* **2021**, 14/1.
- [3] Grafals-Ruiz, *Front. Oncol.* **2023**, 13.
- [4] Yan, *Front. Genet.* **2022**, 13.
- [5] Tan, *CA Cancer J. Clin.* **2020**, 70/4:299–312.
- [6] Teraiya, *Front. Oncol.* **2023**, 13.
- [7] Gareev, *Noncoding RNA Res.* **2023**, 8/4:562–570.
- [8] Eptaminitaki, *Drug Resistance Updates.* **2022**, 65.
- [9] Mehrjardi, *Cell Death Dis.* **2020**, 11/11.
- [10] Villa and Chiocca, *Neurosurgery.* **2023**, 92/6:1104–1111.
- [11] Pouyan, *Gene Rep.* **2024**, 35.
- [12] Luo, *Exp. Ther. Med.* **2020**, 19/3:1641.
- [13] Shi, *PLoS One.* **2014**, 9/1.
- [14] Roh, *Anim. Cells Syst. (Seoul).* **2023**, 27/1:19–28.
- [15] Joshi, *Molecular Therapy: Oncology.* **2024**, 32/1:200782.
- [16] Chen, *Front. Neurol.* **2020**, 11.
- [17] Tian and Xu, *BMJ Open.* **2015**, 5/8653.
- [18] Chaudhary, *Heliyon.* **2021**, 7/3.
- [19] Chae, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22/13.
- [20] Mao, *Am. J. Transl. Res.* **2020**, 12/8:4683–4692.
- [21] Ghasemian and Poodineh, *Cancer Cell Int.* **2023**, 23/1.

Korelácia výskytu superoxiddismutázy 2 v nádorových bunkách malígnych nádorov pankreasu s veľkosťou primárneho tumoru

Vrzgula, M.¹, Mihalik, J.¹, Gaško, R.², Teslík, J.¹, Hodorová I.¹

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav anatómie, Košice; ²Klinická epidemiológia a bioštatistika, Košice
marko.vrzgula@upjs.sk

Abstract

Our study aimed to investigate the correlation between the occurrence of superoxide dismutase 2 in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor cells and the size of the primary tumor. Superoxide dismutase 2 presence in tumor cells was determined using an indirect immunohistochemical method. Subsequently, the results of this analysis were correlated with tumor size classifications (T1, T2, T3). In the T1 tumor group, all samples tested positive; in the T2 group, 10 out of 12 samples were positive; and in the T3 group, 37 out of 39 samples were positive. Fisher's exact test was employed to evaluate statistical relationships between superoxide dismutase 2 occurrence and tumor size. However, no statistically significant correlation was found between the presence of superoxide dismutase 2 in tumor cells and primary tumor size within our sample group.

Keywords: antioxidants, immunohistochemistry, pancreas, superoxide dismutase

Úvod

Malígne nádory pankreasu patria medzi onkologické ochorenia s najhoršou prognózou. Najčastejším malígnym nádorom pankreasu je duktálny adenokarcinóm (PDAC), ktorý má pôvod v epitelových bunkách pankreatických vývodov. V procese nádorovej premeny epitelových buniek vývodov pankreasu majú zásadný význam alterácie rôznych kritických génov. Okrem početných mutagénov exogénneho pôvodu sa na indukciu genetických mutácií môžu podieľať aj reaktívne formy kyslíka. Za normálnych podmienok je v bunkách udržiavaná rôznymi antioxidantnými mechanizmami intracelulárna redoxná rovnováha. Avšak v dôsledku celého spektra patologických stavov sa hladina reaktívnych foriem kyslíka v bunkách zvyšuje, čím sa vyčerpáva kapacita antioxidantov, čo následne vedie k narušeniu bunkovej homeostázy [1 – 3].

Pred škodlivým vplyvom voľných radikálov chráni organizmus antioxidantné enzýmy. Okrem toho, že majú protektívnu funkciu, regulujú aj rozličné bunkové signálne dráhy [4]. Zásadnú úlohu v enzýmovom antioxidantnom systéme zohráva superoxiddismutáza (SOD), ktorá katalyzuje premenu superoxidu ($\cdot\text{O}_2^-$) na peroxid vodíka (H_2O_2). U ľudí existujú tri rozličné izoformy SOD, ktoré majú v katalytickom centre rozdielne kovové ióny. SOD2 (Mn-SOD) sa vyskytuje ako homotetramér, má ako kofaktor mangán, dosahuje molekulovú hmotnosť 96 kDa a nachádza sa v mitochondriálnom matrix. Mangán v aktívnom centre SOD2 umožňuje degradáciu superoxidu na kyslík a peroxid vodíka podobným spôsobom ako keď v SOD1 a SOD3. SOD2 je syntetizovaná v cytoplazme odkiaľ je transportovaná do mitochondrií, kde je zapojená do dismutácie superoxidu, ktorý vzniká ako vedľajší produkt v rámci dýchacieho reťazca [1].

Materiál a metódy

Prítomnosť SOD2 v nádorových bunkách PDAC bola zisťovaná v 60 vzorkách tumoru. Materiál bol pre účely tejto štúdie zapožičaný vo forme parafínových bločkov po schválení Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice L. Pasteura (UNLP) v Košiciach z Oddelenia patológie UNLP. Tumory zaradené do štúdie boli podľa veľkosti rozdelené do 3 skupín – v skupine T1 boli tumory s priemerom do 2 cm, skupinu T2 tvorili tumory s priemerom 2 až 4 cm a v skupine T3 boli zaradené tumory s priemerom nad 4 cm. Výskyt enzýmu v nádorových bunkách bol stanovený imunohistochemickou metódou, výsledky boli následne korelované s veľkosťou primárneho nádoru. V rámci imunohistochemickej analýzy bola použitá primárna králičia polyklonálna protilátka anti-SOD2 v riedení 1:200. Inkubácia primárnej protilátky prebiehala 60 minút pri laboratórnej teplote. K spracovávaným vzorkám bol pridaný Biotynilovaný Link, Streptavidín-HRP a na vizualizáciu enzýmu diaminobenzidín. Po každom uvedenom kroku nasledoval oplach v oplachovacom roztoku. Na záver boli vzorky tkanív dofarbené hematoxylínom. Pri vykonávaní negatívnej kontroly bol zopakovaný celý postup bez pridania primárnej protilátky. Všetky vzorky boli vyhodnotené nezávisle dvoma pozorovateľmi na svetelnom mikroskope. Prítomnosť sledovaného enzýmu v nádorových bunkách PDAC bola hodnotená kvalitatívne aj kvantitatívne. Kvalitatívne boli vzorky PDAC vyhodnotené posúdením intenzity zafarbenia. Na kvantitatívne hodnotenie bola použitá semikvantitatívna metóda, pričom bolo posudzované percento pozitívnych nádorových buniek v každom tkanivovom reze pri zaokrúhlení na celé percentá metódou podľa Pastornická a kol., 2021. Bola použitá škála uvedená v Tabuľke 1. Pre potreby štatistického spracovania boli považované za pozitívne vzorky tumorov tie, ktoré sme označili znamienkom 2+ a 3+, ostatné vzorky boli považované za negatívne. Na štatistickú analýzu bol použitý Fisherov exaktný test. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota p menšia ako 0,05.

Tabuľka 1 Škála hodnotenia SOD2 imunoreaktívnych vzoriek

Pozitívne bunky v tkanivovom reze	Označenie vzoriek
0 %	-
1-10 %	1+
11-90 %	2+
91-100 %	3+

Výsledky

V našej štúdii bol sledovaný výskyt SOD2 v nádorových bunkách PDAC. V skupine T1 tumorov ($n=9$) boli všetky vzorky pozitívne (100%), v skupine T2 tumorov ($n=12$) bolo SOD2 pozitívnych 10 vzoriek (83%) a v skupine T3 tumorov ($n=39$) bolo pozitívnych 37 vzoriek (95%). Fisherovým exaktným testom bolo potvrdené, že rozdiel v distribúcii SOD2 v rôzne veľkých duktálnych adenokarcinómoch pankreasu nie je štatisticky významný, čiže štatisticky významná korelácia medzi veľkosťou PDAC a prítomnosťou SOD2 v nádorových bunkách nebola dokázaná ($p=0,256$, tab. 2).

Tabuľka 2 Distribúcia SOD2 vzhľadom na rozličnú veľkosť primárneho nádoru

Proteín	T1	T2	T3	χ^2 test
SOD2 +	9	10	37	$p=0,256$
SOD2 -	0	2	2	

Diskusia

V rámci diagnostiky rakoviny pankreasu je hlavnou úlohou nádor v pankrease identifikovať, charakterizovať jeho povahu a priniesť informácie potrebné k jeho liečbe. Určenie štádia nádorového ochorenia, ale najmä určenie statusu resekability onkologického ochorenia, má pre pacienta zásadný význam [6]. V systéme TNM sa hodnotí veľkosť primárneho tumoru, šírenie nádoru do okolia, postihnutie lymfatických uzlín a prítomnosť vzdialených metastáz [7]. S narastajúcou veľkosťou tumoru sa nádorové ochorenie stáva viac rozvinuté a pravdepodobnosť nádorovej infiltrácie okolitých štruktúr sa zvyšuje. V prípade existencie štatisticky významnej korelácie medzi veľkosťou tumoru a výskytom SOD2 v nádorových bunkách by tento enzým mohol poskytovať informáciu o pokročilosti nádorového ochorenia.

Záver

Cieľom práce bolo zistiť, či existuje štatisticky významná súvislosť medzi výskytom SOD2 v nádorových bunkách PDAC a veľkosťou primárneho tumoru. Štatisticky významnú koreláciu medzi výskytom SOD2 v nádorových bunkách PDAC a veľkosťou tumoru sme v našom súbore nepotvrdili.

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

Literatúra

- [1] Fukai a Ushio-Fukai, *Antioxid. Redox. Signal.* **2011**, 15/6:1583–606.
- [2] Lüllmann-Rauch, *Histologie.* **2012**, 527 s., ISBN 978-80-247-3729-4
- [3] Kimáková a Pavlík, *Antioxidanty a ich význam v prevencii chronických ochorení.* **2017**, 155 s., ISBN 978-80-8152-512-4
- [4] Li, *Int. J. Oncol.* **2015**, 46/6:2613–20.
- [5] Pastornická, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22/12:6363.
- [6] Tomáš, *Onkológia.* **2015**, 10/5:291–6.
- [7] Neuwirth, *Kompendium onkologického zobrazování.* **2018**, 468 s., ISBN 978-80-903322-9-4

Asociácia polymorfizmov rs1799977 a rs2303428 s hladinami sérového PSA u pacientov s mKRKP

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

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

Abstract

In routine clinical practice, investigations such as evaluation of clinical status, dynamics of PSA changes, and imaging techniques are utilized to determine the prognosis and response to treatment in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). However, these diagnostic methods are limited in assessing early disease progression. Currently, prostate cancer is the most commonly diagnosed malignant disease in the Slovak male population. One of the several risk factors in the development and progression of prostate cancer is genetics. Specifically, germline mutations with pathogenic characteristics or association with a more aggressive disease phenotype, higher Gleason score, elevated PSA levels, inadequate response to treatment, and poor prognosis for the patient. The aim of this study was to uncover the correlation between the occurrence of identified genetic variations in selected DNA repair genes and PSA levels in selected group of mCRPC patients.

Keywords: prostate cancer, PSA, germline mutations, biomarker

Úvod

V súčasnosti, je karcinóm prostaty (KP) najčastejšie diagnostikovaným malígnym ochorením slovenských mužov. Výskyt tohto ochorenia každoročne stúpa o vyše 3,5 tisíce nových prípadov [1]. Je známych viacero faktorov, ktoré ovplyvňujú vznik KP (napr. vek, rasa, životný štýl, exogénne a endogénne činitele). KP je ochorenie, ktoré je zväčša diagnostikované mužom vo veku 65+. Avšak, pri genetickej predispozícii na toto ochorenie, sa približne u 6-10% mužov môže KP objaviť aj vo veku nižšom ako 50 rokov [2,3]. Zárodočné mutácie v DNA reparačných génoch (DRG) sú potenciálnymi rizikovými faktormi asociovanými s hereditárnym typom KP, pre ktorý je charakteristický včasný nástup ochorenia, agresívnejší fenotyp, nedostatočná terapeutická odpoveď, vyššie Gleasonovo skóre, vyššie hodnoty sérového PSA a najmä progresia do štádia kastračnej rezistencie [4]. Ďalšími potenciálnymi biomarkermi KP s cieľom správneho určenia prognózy KP a terapeutickú odpoveď pacientov, sú cirkulujúce nádorové bunky (CTC) a zostrihový variant androgénového receptora AR-V7. Prítomnosť tejto skrátenej formy androgénového receptora negatívne ovplyvňuje mechanizmus rezistencie na abiraterón a enzalutamid, čím tiež podporuje progresiu ochorenia do štádia kastračnej rezistencie [5,6]. V našej štúdii sme primárne skúmali genetický profil 41 pacientov s metastatickým kastračne rezistentným karcinómom prostaty (mKRKP) liečených abiraterónom alebo enzalutamidom. Cieľom bolo identifikovať zárodočné mutácie v DRG (*ATM*, *ATR*, *BRCA1/2*, *ERCC2/4/5/6*, *MLH1*, *MSH2/6*, *MUTYH*, *NTHL1*, *PALB2*, *RAD50*, *RAD51*, *RAD51C/D*, *RECQL*, *TP53*) s potenciálnym patogénnym charakterom [7]. Títo pacienti boli tiež vyšetrení na prítomnosť CTC a variantu AR-V7. Pacientom boli v pravidelných

časových intervaloch vyšetrované hodnoty sérového PSA. Cieľom tejto analýzy bolo zistiť asociáciu prítomnosti genetických zmien v DRG v 3 skupinách pacientov s vyššími hladinami sérového PSA.

Materiál a metódy

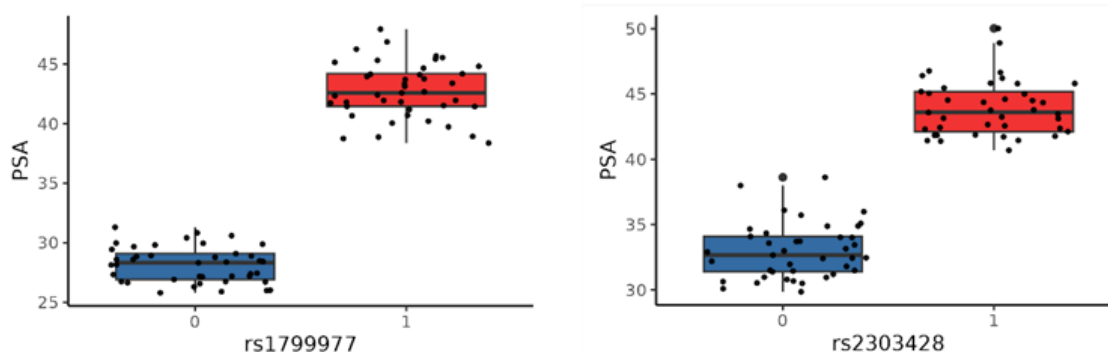
Našu skupinu tvorilo 41 pacientov s potvrdeným mKRKP, liečených abiraterónom alebo enzalutamidom vo veku 55-84 rokov (medián 71,5 rokov). Týchto pacientov sme spolu so zoznamom identifikovaných polymorfizmov z 20 DRG, rozdelili do 3 skupín podľa prítomnosti sledovaných parametrov: CTC-, CTC+/AR-V7- a CTC+/AR-V7+.

Analýzu dát sme uskutočnili pomocou programu R (verzia 4.0.5). Predikciu hodnôt sérového PSA v závislosti od výskytu skúmaných variantov sme uskutočnili pomocou algoritmu RandomForest. Relevantné varianty sme vybrali pomocou trojstupňového algoritmu VSURF. Špecifickosť vybraného algoritmu sme overili pomocou koeficientu determinácie R^2 založeným na odhade *out-of-bag*. Nulovú hypotézu sme testovali t-testom a Welchovou korekciou.

Výsledky

S cieľom určiť asociáciu prítomnosti študovaných polymorfizmov v skupinách CTC-/CTC+ pacientov s vyššími hladinami sérového PSA, sme uskutočnili štatistickú analýzu. Štatisticky významnú koreláciu sme pozorovali pri výskyte polymorfizmov rs1799977 (*MLH1*) a rs2303428 (*MSH2*). U pacientov, u ktorých boli prítomné tieto dva polymorfizmy, sme pozorovali vyššie hodnoty sérového PSA (obr.1, $p < 0,001$).

Polymorfizmus rs1799977 (p.Ile219Val) je lokalizovaný v N-terminálnej doméne ATPázy. Zaznamenali sme ho u 10 CTC-, 9 CTC+/AR-V7- a 2 CTC+/AR-V7+ pacientov. Variant rs2303428 je lokalizovaný v zostrihovom regióne *MSH2*. Zaznamenali sme ho u 4 CTC-, 3 CTC+/AR-V7- a 1 CTC+AR-V7+ pacienta.



Obrázok 1 Grafické znázornenie vplyvu prítomnosti polymorfizmov na hladiny PSA u MKRKP pacientov

Diskusia

Polymorfizmus rs1799977 (p.Ile219Val) je lokalizovaný v takej oblasti proteínu *MLH1*, ktorá kóduje vysoko konzervovanú doménu N-terminálnej ATP-ázy. Zámenou Valínu za Izoleucín nedochádza k významným funkčným proteínovým zmenám. Avšak, prítomnosť tohto polymorfizmu bola zaznamenaná vo viacerých štúdiách asociovaných napr. s Lynchovým syndrómom, hereditárnym kolorektálnym karcinómom, karcinómom pľúc a mnohými ďalšími závažnými ochoreniami, medzi ktoré patrí aj nami študovaný KP [8, 9]. Pri štúdiu vplyvu polymorfizmov v DRG, na rádioterapiu u pacientov s malignitami štítnej žľazy, sa preukázalo, že prítomnosť rs1799977 je pravdepodobne asociovaná so zvýšenou radiosenzitivitou – vyššou

účinnosťou a toxicitou rádioterapie, a to samotnej alebo v kombinácii s chemoterapiou [10, 11].

Druhým polymorfizmom, v asociácii s vyššími hladinami sérového PSA u pacientov s mKRKP, ktorý je lokalizovaný v tesnej blízkosti kódujúcej oblasti, a to v zostrihovom regióne proteínu MSH2, je rs2303428 (c.2006-6T>C). Táto genetická zmena predstavuje potenciálneho narušiteľa stability a funkcie tohto proteínu. Vplyv tohto polymorfizmu na vznik, priebeh a prežívanie pacientov s KP ešte nebol dostatočne objasnený [12]. Avšak, štúdie zamerané na rôzne druhy karcinómov (napr. kolorekta, pľúc, prsníkov, Non-Hodgkinov lymfóm, Lynchov syndróm), poukazujú na význam komplexných interakcií gén-gén a gén-prostredie, od ktorých sa potom odvíja patogénny alebo protektívny charakter polymorfizmu rs2303428 [13, 14, 15].

Záver

Identifikácia a implementácia nových špecifických biomarkerov do klinickej praxe má dôležité postavenie v otázkach včasnej diagnostiky KP, pri výbere vhodnej terapeuticknej liečby a jej monitorovaní. V našej štúdii sme pozorovali štatistiky významnú asociáciu medzi prítomnosťou polymorfizmov rs1799977 a rs2303428 a vyššími hladinami sérového PSA.

Táto práca bola podporená projektom APVV-15-0181.

Literatúra

- [1] Ferlay, *A Cancer Journal for Clinicians*. **2024**, 74/3:229–263.
- [2] Kliment, *Klinická urológia*. **2020**, 16/1:6–12.
- [3] Ibrahim, *BMC Cancer*. 2018, 112/7:20–27.
- [4] Zhen, *Cancer*. **2018**, 124/15:3105–3117.
- [5] Kliment, *Klinická urológia*. **2023**, 19/3:129–133.
- [6] Armstrong, *Clinical advances in hematology & oncology*. **2021**, 19:694–697.
- [7] Holečková, *In Vivo*. **2020**, 34/4:1773–1778.
- [8] Giacomazzi, *JCO Global Oncology*. **2023**, 9:e2300006.
- [9] Djansugurova, *Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis*. **2014**, 5/6:1000197.
- [10] Santos, *Genes*. **2020**, 11/9:1083.
- [11] Dreussi, *International Journal of Molecular Sciences*. **2016**, 17:1482.
- [12] Zanusso, *Oncotarget*. **2017**, 8/14:22863–22875.
- [13] Caja, *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**, 21/15:5561.
- [14] Freeman, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. **2021**, 30:415–426.
- [15] Zhu, *DNA and Cell Biology*. **2018**, 37/7.

Úloha proteín arginín metyltransferázy 5 v prekancerózných léziách krčka maternice

Krajňáková, B.¹, Mešťanová, V.¹, Hurta Csizmár, S.², Výbohová, D.², 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
klinerova2@uniba.sk

Abstract

Cervical cancer is one of the major public health problems affecting middle-aged women. Nowadays, emerging studies have demonstrated the structural and functional role of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) catalyzing epigenetic mechanisms in several cancer diseases, including cervical cancer. PRMT5 catalyzes the symmetric arginine dimethylation of both histone and non-histone proteins. It is defined as an oncoprotein that plays an important role in the regulation of tumor cell proliferation, cell cycle etc. It is also a part of the transcriptional-repressive complexes and affects the epithelial-mesenchymal transition. In our study we used archival paraffin-embedded blocks from adult women, which were immunohistochemically processed. We focused on semi-quantitative evaluation of PRMT5 expression, the immunoreaction intensity and subcellular localization of PRMT5 expression in LSIL and HSIL samples, which we statistically analyzed. Our results showed a significant correlation between the PRMT5 expression and the expression of routinely used diagnostic markers p16^{Ink4a} and Ki67. Based on our result we suppose that PRMT5 could serve a prognostic biomarker during the histopathological assessment of cervical lesions.

Keywords: immunohistochemistry, PRMT5, squamous intraepithelial lesions

Úvod

Karcinóm krčka maternice je štvrté najčastejšie diagnostikované nádorové ochorenie a štvrtá najčastejšia príčina úmrtí u žien. V roku 2020 bolo zaznamenaných približne 604 000 nových prípadov a 342 000 úmrtí celosvetovo [1]. Metylácia arginínu, ako bežná posttranslačná modifikácia, je jednou z najviac prevládajúcich epigenetických dysregulácií hrajúcich dôležitú úlohu pri výskyte a progresii nádorových ochorení [2]. PRMT5 predstavuje proteín arginín metyltransferázu známu svojou schopnosťou katalyzovať metyláciu na špecifických arginínových zvyškoch mnohých proteínov, ako napríklad histónov H2A, H3 a H4, transkripčných faktorov a i. Zároveň sa podieľa na priebehu bunkových procesov, vrátane transkripcie, proliferácie, apoptózy a metastázovania [3]. Ako súčasť komplexu MEP50:PRMT5 je väzba PRMT5 k špecifickým substrátom zosilnená. Substrátová špecificita a bunková funkcia tohto proteínu často závisí od typu väzobných partnerov. Ako súčasť chromátin remodelujúceho komplexu Snail/PRMT5/NuRD vplýva na transkripciu proteínov TET1 a E-cadherinu zapojených do regulácie epitelovo-mezenchymálnej tranzície (EMT) [4]. V súčasnosti rastúci počet vedeckých štúdií preukázal nadmernú expresiu tohto proteínu v širokej škále nádorových ochorení, medzi ktoré patrí napríklad karcinóm pľúc, prsníka, žalúdka, krčka maternice a i. [5]. PRMT5 je exprimovaný v jadre ako aj v cytoplazme buniek [6]. Onkogénna funkcia tohto proteínu značne súvisí s jeho nadmernou expresiou, ktorá koreluje so zlou

prognózou a s celkovým prežívaním pacientiek pri karcinóme krčka maternice. Funkcia PRMT5 sa zdá byť rozdielna v závislosti od jeho subcelulárnej lokalizácie pri rôznych typoch nádorových ochorení [5, 7].

Materiál a metódy

Súčasná štúdia bola vykonaná na 129/150 (LSIL-49, HSIL-80) archívnych vzorkách lézií krčka maternice. Pri hodnotení expresie sme vzorky s nedostatočnou veľkosťou lézie vyradili, preto sa počet vzoriek v jednotlivých skupinách LSIL a HSIL môže líšiť. Skvamózne intraepiteliálne lézie (SIL) boli rozdelené do kategórií LSIL a HSIL.

Na imunohistochemickú analýzu boli použité formalínom fixované a parafrínom zaliate (FFPE) bloky, ktoré boli následne narezané na 3 µm hrubé rezy a vložené na FLEX sklíčka. Po deparafrinizácii xylénom a rehydratácii v alkoholovom rade bol aplikovaný Target Retrieval Solution Low pH, Dako, a peroxid vodíka na vyblokovanie endogénnej aktivity. Metóda histochemického farbenia bola vykonávaná podľa štandardného protokolu s použitím monoklonálnej protilátky Anti-PRMT5 (Abcam, EPR5772, riedenie 1:100). Pre vizualizáciu primárnej protilátky bola použitá Envision TM FLEX/HRP systémová polymérna technika (Dako) s DAB (3,3-diaminobenzidín). Rezy boli dofarbené Mayerovým hematoxylínom (Dako). Digitálne mikrofotografie boli zhotovené pri zväčšení 400x s použitím softvéru QuickPhotoMicro Version 3.2 (Promicra, praha, Česká republika). Expresia PRMT5 v cervikálnych léziách bola nezávisle semikvantitatívne analyzovaná dvoma pozorovateľmi (BK, VM).

Expresia proteínov bola opísaná ako percento pozitívne zafarbených epitelových buniek u SIL krčka maternice. Percento PRMT5-pozitívnych buniek bolo vyjadrené nasledovne: (1 = 1 - 25 %, 2 = 25 - 50 %, 3 = 50 - 75 % a 4 = 75 - 100 % [upravené podľa Jiang a kol.]. Každý vzorke tkaniva bolo priradené skóre podľa intenzity imunoreakcie PRMT5 (0 - žiadne zafarbenie, * - slabá, ** - stredná a *** - silná).

Na štatistickú analýzu bol použitý softvér JASP 0.15, Spearmanov korelačný koeficient a Chí-kvadrát test. P-hodnota < .05 bola stanovená ako minimum pre štatistickú významnosť.

Výsledky

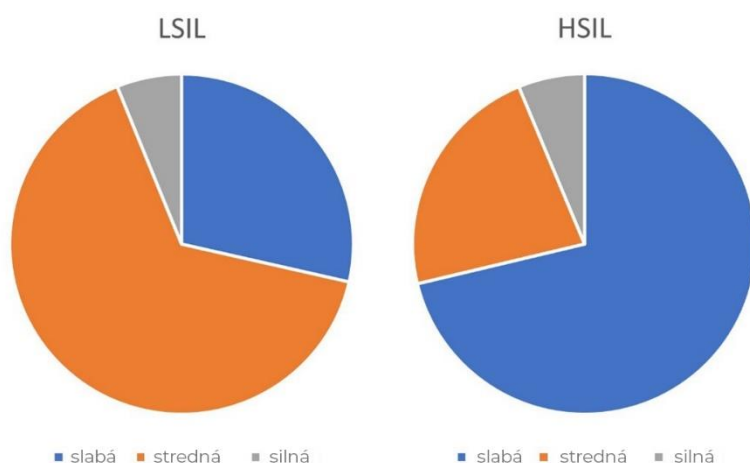
Cieľom našej práce bolo hodnotiť expresiu PRMT5 v progresii cervikálnych neoplázií a následne načrtnúť vzájomný vzťah expresie s vybranými klinicko-patologickými parametrami, ako je vek pacientiek, grading a expresia p16^{INK4a} a Ki67.

Počas imunohistochemickej analýzy 129/150 prípadov lézií krčka maternice bola pozorovaná kombinovaná cytoplazmová a jadrová subcelulárna lokalizácia PRMT5. Intenzita imunoreakcie PRMT5 bola hodnotená oddelene pre cytoplazmovú a jadrovú pozitivitu z dôvodu rozdielnej funkčnej expresie tohto proteínu.

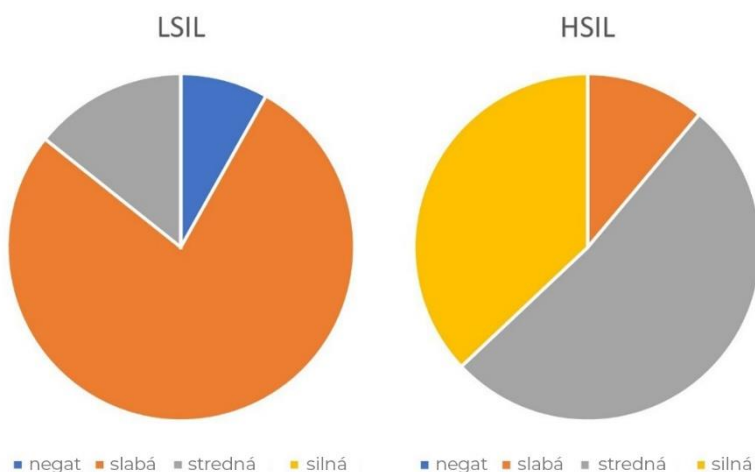
Na základe Chí-kvadrát testu sme zaznamenali štatisticky významné rozdiely v intenzite imunoreakcie cytoplazmovej, ako aj jadrovej expresie PRMT5 medzi skupinami LSIL a HSIL ($p < .001$) (Graf 1, 2). Cytoplazmová expresia PRMT5 vykazovala klesajúcu intenzitu s progresiou ochorenia na rozdiel od jadrovej, ktorá s progresiou stúpala (obr. 1A, B, C). Spearmanova korelačná analýza potvrdila štatisticky významnú negatívnu koreláciu medzi intenzitou jadrovej imunoreakcie PRMT5 a intenzitou PRMT5 cytoplazmatickej imunoreakcie v skupine HSIL. V skupine LSIL sa výsledky považovali za štatisticky nevýznamné.

Korelačná analýza oboch študovaných skupín (LSIL+HSIL) potvrdila:

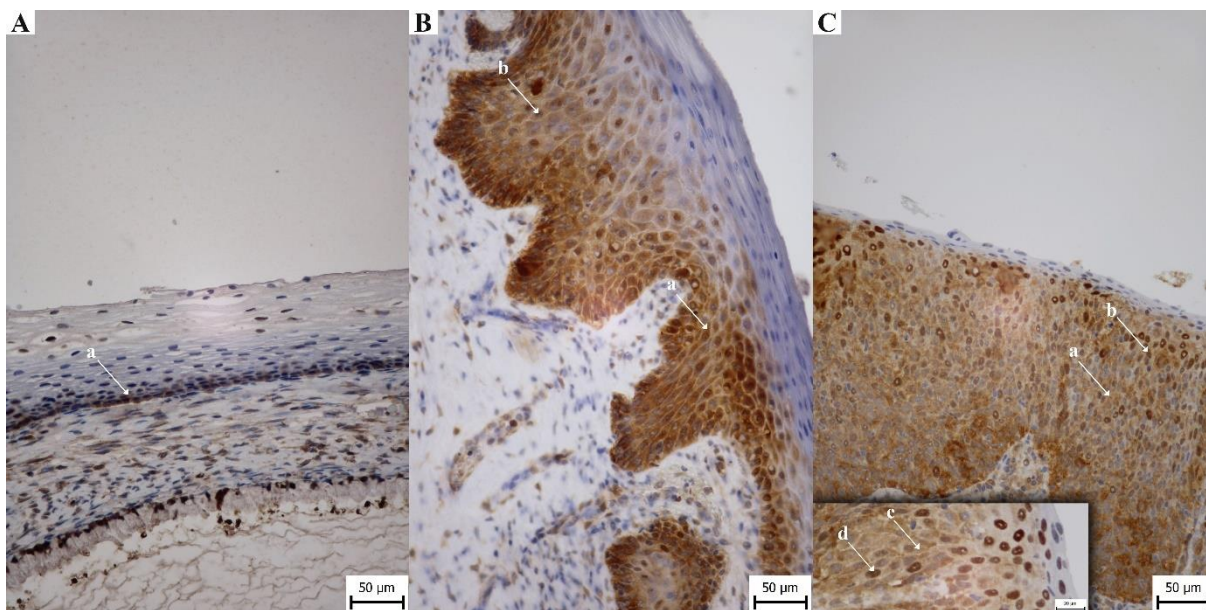
- signifikantne negatívnu koreláciu medzi intenzitou cytoplazmovej a jadrovej imunoreakcie PRMT5,
- signifikantnú pozitívnu koreláciu medzi percentom PRMT5 pozitívnych buniek a intenzitou PRMT5 jadrovej imunoreakcie,
- signifikantnú pozitívnu koreláciu medzi expresiou p16^{Ink4a} a intenzitou PRMT5 jadrovej imunoreakcie,
- signifikantnú negatívnu koreláciu medzi expresiou p16^{Ink4a} a intenzitou PRMT5 cytoplazmovej imunoreakcie,
- signifikantnú pozitívnu koreláciu medzi expresiou Ki67 a intenzitou PRMT5 jadrovej imunoreakcie.



Graf 1 Intenzita imunoreakcie PRMT5 v cytoplazme. LSIL – dominantná stredná; HSIL – dominantná slabá



Graf 2 Intenzita imunoreakcie PRMT5 v jadre. LSIL – dominantná slabá; HSIL – dominantná stredná



Obrázok 1 Expresia PRMT5. A – normálny epitel, cytoplazmová expresia v bazálnej vrstve; B – LSIL, stredná cytoplazmová expresia (šípka a) a slabá jadrová expresia (šípka b) v bazálnej a parabazálnej vrstve cervikálneho epitelu; C - HSIL, slabá cytoplazmová expresia (šípka a, šípka c), stredná jadrová expresia (šípka b, šípka d) stúpajúca od bazálnej k povrchovej vrstve epitelu

Diskusia

Proteín PRMT5 je úzko spájaný s nádorovou transformáciou buniek v mnohých typoch malígnych ochorení. Katalyzuje metyláciu arginínov, ktorá vplyva na aktivitu a expresiu proteínov v procesoch metastázovania a tumorigenézy nádorov. Za posledné roky bola v obmedzenom množstve publikovaných štúdií sledovaná nadmerná expresia PRMT5 v normálnom ako aj v nádorovom epiteli krčka maternice, ktorá koreluje so zlou prognózou tohto ochorenia [4, 5, 7, 8].

V našej práci sme venovali zvýšenú pozornosť hodnoteniu expresie PRMT5 v SIL, konkrétne hodnoteniu intenzity imunoreakcie a subcelulárnej lokalizácie PRMT5, ktoré sa u viacerých nádorových ochorení líšia. Naše výsledky boli v súlade s výsledkami iných štúdií, ktoré potvrdili stúpajúci trend jadrovej expresie PRMT5 s gradingom SCC [4]. Pozorovali sme jadrovú expresiu PRMT5 ktorá stúpala od slabej v LSIL (77.55%; 38/49) po strednú intenzitu imunoreakcie v HSIL (52.50%; 42/80). Cytoplazmová expresia PRMT5 naopak s progresiou SIL klesala (obr. 1A, B, C).

Pomocou molekulárnych metód viacerí autori potvrdili zapojenie PRMT5 do bunkových signálnych dráh. Sledovali pokles expresie PRMT5, ktorá korelovala s poklesom hladiny Akt kinázy, z čoho vyplýva pravdepodobný vplyv PRMT5 na proliferáciu buniek u viacerých typov malignít [8, 9, 10].

Na základe podobnosti epitelov a prítomnosti HPV ako spoločného rizikového faktora sme výsledky našej práce porovnali aj s expresiou PRMT5 v nádoroch hlavy a krku, v ktorých viaceré štúdie poukázali na rozdielnú subcelulárnu lokalizáciu PRMT5. Cytoplazmová expresia PRMT5 sa v jednotlivých diagnózach ústnej dutiny, ako sú orálna epiteliálna dysplázia (OED), orálna intraepiteliálna neoplázia (OIN) a orálny spinocelulárny karcinóm (OSCC) nepreukázala ako významná. Jadrová expresia PRMT5 korelovala s progredujúcim štádiom nádoru pri skvamocelulárnom karcinóme hlavy a krku (HNSCC) [11]. Taktiež bola pozorovaná v p16^{Ink4a} negatívnych orofaryngeálnych nádorových tkanivách [12]. V našej práci sme pozorovali pozitívnu a negatívnu koreláciu medzi expresiou p16^{Ink4a} a jadrovou ako aj cytoplazmovou expresiou PRMT5 v SIL.

Expresia PRMT5 bola pozorovaná aj v karcinóme prsníka, kde korelovala s expresiou Ki67, čo je v súlade s našimi výsledkami v SIL [13]. V našej práci sme pozorovali pozitívnu koreláciu medzi expresiou Ki67 a PRMT5 jadrovou intenzitou imunoreakcie. Na základe nami získaných výsledkov by sme mohli predpokladať možný vplyv PRMT5 na invazívnosť nádorových buniek krčka maternice, čím by sa mohla potvrdiť jeho onkogénna funkcia. Na potlačenie expresie PRMT5 sa v súčasnosti vyvíjajú špecifické inhibítory [14, 15]. V našej práci expresia skúmaného proteínu korelovala s klinicko-patologickými parametrami vrátane veku pacientiek, gradingu nádoru, expresie p16^{Ink4a} a Ki67. Čo sa týka korelácie medzi jadrovou expresiou PRMT5 a expresie p16^{Ink4a} a Ki67, proteín PRMT5 naznačuje svoj možný prediktívny a prognostický potenciál v regulácii prežívania nádorových buniek a progresie nádorového ochorenia krčka maternice.

Záver

Cieľom našej práce bolo priblížiť funkciu a zároveň s použitím archívneho materiálu imunohistochemicky zhodnotiť expresiu proteínu PRMT5 zapojeného do tumorigenézy prekancerózných lézií krčka maternice. Zistenia a hypotézy stanovené na základe získaných výsledkov by mohli lepšie objasniť funkciu študovaného proteínu v nádorových procesoch, ako aj uviesť proteín PRMT5 medzi potencionálne plauzibilné markery v prognóze prekancerózných cervikálnych lézií. Zároveň si uvedomujeme, že pre lepšie overenie výsledkov je potrebné našu prácu doplniť ako metodicky, tak aj navýšením súboru pacientiek.

Práca bola podporená projektom GRANT UK Č. UK/20/2023.

Literatúra

- [1] Sung, *CA Cancer J. Clin.* **2021**, 71/3:209–249.
- [2] Guccione, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, 20/10:642–657.
- [3] Yuan, *Cell. Oncol. (Dordr.)* **2021**, 44/1:33–44.
- [4] Gao, *Cell Death Differ.* **2021**, 28/9:2818–2836.
- [5] Motolani, *Life (Basel)*. **2021**, 11/10:1074.
- [6] Borzsei, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23/19:11316.
- [7] Jiang, *Theranostics*. **2021**, 11/18:9162–9176.
- [8] Ma, *J. women's Health Dev.* **2022**, 5/4:117–126.
- [9] Yin, *Nat. Commun.* **2021**, 12/1:3444.
- [10] Zhang, *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, 23/2:1333–1342.
- [11] Amano, *Pathol. Int.* **2018**, 68/6:359–366.
- [12] Kumar, *Oncotarget*. **2017**, 8/9:14847–14859.
- [13] Wu, *Tumour Biol.* **2017**, 39/4:1–11.
- [14] Dong, *Pharmazie*. **2018**, 73/5:269–273.
- [15] Feustel, *Int. J. Immunother. Precis. Oncol.* **2022**, 5/3:58–67.

Imunohistochemická analýza mismatch reparačných proteínov v kolorektálnych karcinómoch

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

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ²Altium International, s.r.o., Praha
veronika.cigerova@uniba.sk

Abstract

This study was designed to evaluate the expression of mismatch repair (MMR) proteins in colorectal cancer (CRC). MMR proteins expression was observed by immunohistochemical analysis in 111 CRC samples. We assessed the correlation between MMR proteins expression and clinico-morphological parameters of CRC. MSH2 and MSH6 showed 100% expression and loss of expression was detected in 8% of cases in MLH1 and in 9% of cases in PMS2. In MLH1, we found significant associations between grade and intensity and percentage of positive cells and between vascular invasion and percentage of positive cells. In MSH2, we noticed significant association between percentage of positive cells and age and stage. In MSH6 and PMS2, we did not detect significant relationships with clinico-morphological parameters. Compared with molecular MSI testing, immunohistochemical analysis of MMR protein expression represents a practical and reliable method for the routine detection of most CRCs with MSI.

Keywords: mismatch repair proteins, microsatellite instability, colorectal cancer, immunohistochemistry

Úvod

Kolorektálny karcinóm (CRC) je celosvetovo tretie najbežnejšie nádorové ochorenie u mužov a druhé u žien. CRC je zvyčajne asymptomatický až do pokročilých štádií, preto je dôležitá jeho včasná detekcia. Na jeho vzniku sa môžu podieľať rôzne rizikové faktory súvisiace so životným štýlom alebo kumulatívne účinky genetických zmien v protoonkogénoch, tumor-supresorových génoch a mismatch reparačných (MMR) génoch [1, 2, 3].

MMR proteíny (MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2) identifikujú a opravujú nekompatibilné párovanie báz v DNA, ktoré sa bežne vyskytuje počas replikácie. Za normálnych podmienok sa spájajú do funkčných komplexov – heterodimérov. MSH2-MSH6 heterodimér rozpoznáva chyby v DNA a signalizuje poškodenie. Druhý heterodimér MLH1-PMS2 chyby opravuje a zároveň sa podieľa na zastavení bunkového cyklu a indukcii apoptózy v reakcii na poškodenie DNA. Mutácie v MMR génoch majú za následok mikrosatelitnú instabilitu (MSI) a zvyčajne vedú k absencii detegovateľného génového produktu, čo sa využíva pri imunohistochemickej analýze na stanovenie straty expresie MMR proteínov. Ak nie je exprimovaný MLH1 alebo MSH2, tak často nepozorujeme ani expresiu ich heterodimérnych partnerov (PMS2 resp. MSH6). MSI vedie k neschopnosti rozpoznať a opraviť chyby, ktoré sa vyskytujú počas replikácie DNA. Strata aktivity MMR génov urýchljuje akumuláciu mutácií aj v iných génoch, ktoré sa podieľajú na apoptóze a kontrole rastu a predisponujú k rýchlejšiemu prechodu od adenómu na karcinóm [4, 5, 6].

Cieľom tejto práce bolo imunohistochemicky analyzovať expresiu MMR proteínov u pacientov s CRC a korelovať ju s klinicko-morfologickými parametrami CRC.

Materiál a metódy

Imunohistochemicky sme vyšetrili parafrínový materiál z 99 vzoriek CRC, ktoré pochádzali z diagnosticky uzavretých prípadov. Z každej vzorky boli pripravené 4 μm hrubé rezy na imunohistochemické reakcie na dôkaz MMR proteínov (MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2). Preparáty boli deparafrinované, rehydratované a revitalizované v PT Linku vo vodnom kúpeli (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high pH, 50x; Dako, Dánsko). Na vzorky bol aplikovaný peroxidázový blok (10 ml H_2O_2 /100 ml destilovanej vody; mikroCHEM, Slovensko) a následne boli inkubované s primárnou protilátkou (MLH1 - klon ES05 (myšia; Dako, Dánsko), MSH2 - klon FE11, (myšia; Dako, Dánsko), MSH6 - klon EP49 (králičia Dako, Dánsko), PMS2 - klon EP51 (králičia Dako, Dánsko) – 150 μl na 20 min), s linkerom (EnVision™ FLEX+Mouse Linker (Dako, Dánsko) – 150 μl na 20 min) – len v prípade MSH2 a so sekundárnou protilátkou (EnVision™ FLEX/HRP (Dako, Dánsko) – 150 μl ; na 20 min). Ďalej nasledovala vizualizácia DAB chromogénom (3,3'-diaminobenzidín; komerčný kit – 1 ml EnVision™ FLEX Substrate Buffer a 1 kvapka EnVision™ FLEX DAB+Chromogen; Dako, Dánsko), kontrola pod svetelným mikroskopom (ZEISS, Slovensko), dofarbenie jadier hematoxylínom, dehydratácia a montovanie. V analyzovanom súbore CRC boli hodnotené nasledovné klinicko-morfologické charakteristiky: vek pacientov, pohlavie, grade, stage, lokalizácia lézie, stav lymfatických uzlín a vaskulárna invázia. Pri interpretácii získaných imunohistochemických vyšetrení sme semikvantitatívne hodnotili percento pozitívnych buniek, subcelulárnu lokalizáciu a intenzitu imunoreakcie. Štatistické hodnotenie bolo realizované pomocou testu Chi-square (χ^2) v softvéri R (verzia 3.2.3). Výsledky s p-hodnotou pod 0,05 boli považované za štatisticky signifikantné.

Výsledky

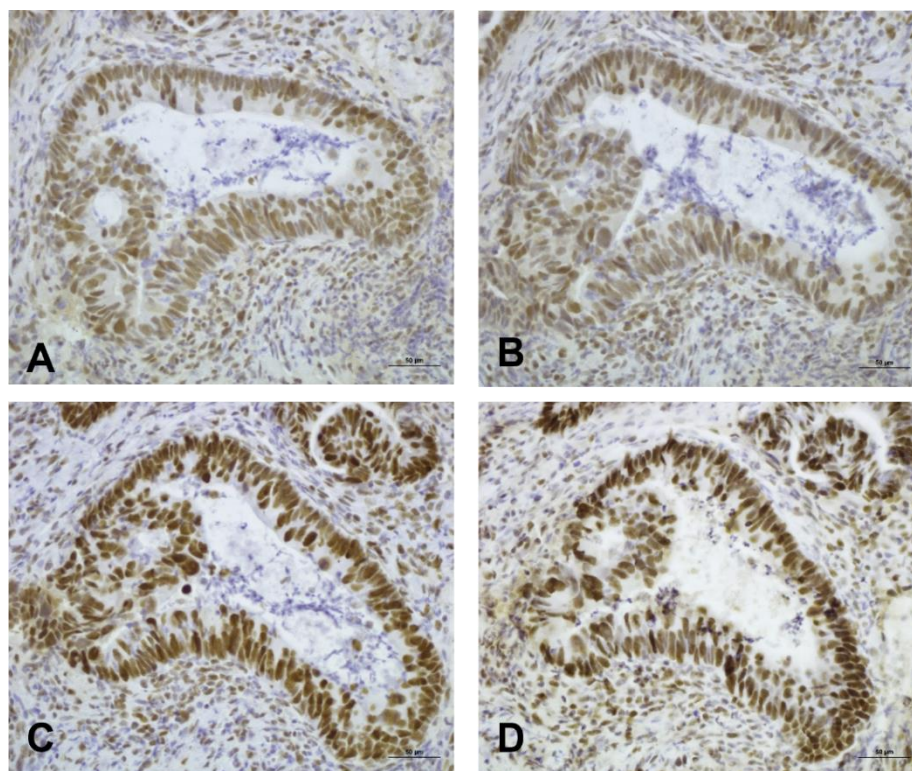
Proteín MLH1 bol exprimovaný v 91,9% prípadov. Všetky pozitívne prípady vykazovali jadrovú pozitivitu. Intenzita imunoreakcie bola v 14,2% slabá, v 43,4% stredná a v 34,3% silná. Prevládali prípady (81,8%), v ktorých bolo viac ako 50% MLH1-pozitívnych buniek. Chi kvadrát testom boli preukázané signifikantné asociácie medzi gradingom a intenzitou imunoreakcie a percentom MLH1-pozitívnych buniek ($p < 0,05$). Signifikantne asociovala aj vaskulárna invázia s percentom pozitívnych buniek ($p < 0,05$). Ostatné klinicko-morfologické charakteristiky CRC nekorelovali s imunohistochemickými parametrami exprese MLH1 ($p > 0,05$).

Proteín MSH2 bol exprimovaný vo všetkých 99 prípadoch CRC (100%). Pozitívne prípady vykazovali jadrovú pozitivitu. Slabá intenzita imunoreakcie bola zaznamenaná v 5,1% prípadov, stredná v 38,4% a silná v 56,5% prípadov. Prevládali prípady (93,9%), v ktorých bolo viac ako 50% MSH2-pozitívnych buniek. Chi kvadrát test potvrdil signifikantné vzťahy medzi vekom pacientov a percentom MSH2-pozitívnych buniek ($p < 0,05$). Signifikantne asocioval aj klinicko-morfologický parameter stage s percentom pozitívnych buniek ($p < 0,05$). Pri stave LU sme pozorovali tendenciu k asociácii s intenzitou imunoreakcie ($p = 0,058$). Ostatné klinicko-morfologické charakteristiky CRC nekorelovali s expresiou MSH2 ($p > 0,05$).

Proteín MSH6 bol exprimovaný vo všetkých prípadoch (100%). Pozitívne prípady vykazovali jadrovú pozitivitu. V 3,0% vzoriek sme detegovali slabú intenzitu, v 33,3% strednú pozitivitu a v 65,7% bola zistená silná pozitivita imunoreakcie. Prevládali prípady (97,0%), v ktorých bolo viac ako 50% MSH6-pozitívnych buniek. Chi kvadrát test nepreukázal žiadne signifikantné asociácie medzi klinicko-morfologickými charakteristikami CRC a parametrami exprese MSH6 ($p > 0,05$).

Proteín PMS2 bol exprimovaný 90,9% prípadov CRC. Deväť (9,1%) prípadov bolo

hodnotených ako negatívne. Vo všetkých pozitívnych prípadoch bola detegovaná jadrová pozitivita. Slabá intenzita bola zaznamenaná v 12,1% vzoriek, stredná v 45,5% a silná v 33,3% prípadov CRC. Prevládali prípady (83,8%), v ktorých bolo viac ako 50% PMS2-pozitívnych buniek. Chi kvadrát test nepotvrdil žiadne signifikantné vzťahy medzi klinicko-morfologickými charakteristikami CRC a parametrami expresie PMS2 ($p>0,05$). Tendenciu ku korelácii sme pozorovali len v prípade parametra grade s intenzitou imunoreakcie ($p=0,082$).



Obrázok 1 Porovnanie pozitivity imunoreakcie na dôkaz MMR proteínov v heterodiméroch MLH1-PMS2 a MSH2-MSH6. Slabá jadrová pozitivita MLH1 (A) a rovnako slabá jadrová pozitivita PMS2 (B). Stredná jadrová pozitivita MSH2 (C) a rovnako stredná jadrová pozitivita MSH6 (D)

Diskusia

V našej práci sme hodnotili expresiu MMR proteínov v sporadických CRC. Proteíny MSH2 a MSH6 vykazovali 100% expresiu. K strate expresie došlo pri MLH1, kde sme zaznamenali 8% negatívnych prípadov a pri PMS2, kde bolo 9% negatívnych prípadov.

Výsledkom hypermetylácie promótorovej oblasti génu MLH1 je transkripčné utlmenie tohto génu a absencia expresie proteínu. Keďže MMR proteíny fungujú v komplexoch, nedostatok jedného proteínu je často sprevádzaný stratou partnerského proteínu. Strata expresie MLH1 môže viesť k sekundárnej strate expresie PMS2. Strata expresie MSH2 je takmer vždy spojená s absenciou proteínu MSH6, čo naznačuje prítomnosť Lynchovho syndrómu [4, 7]. Keďže sa jednalo o sporadické CRC môžeme predpokladať, že pri MLH1 došlo k strate expresie v dôsledku hypermetylácie.

Výsledky súčasných štúdií naznačujú, že imunohistochemická analýza expresie MMR proteínov je praktickou, spoľahlivou a pomerne lacnou metódou na rutinnú detekciu prevažnej väčšiny pacientov s MSI [8, 9, 10]. V porovnaní s molekulárnym MSI testovaním (PCR), ktoré je nákladné a dlhotrvajúce, sa vyznačuje vysokou citlivosťou (77-100%) a špecifickosťou (98-100%). Ak sa imunohistochemickou analýzou potvrdí

strata expresie MMR proteínu, môže byť ďalej použité génové sekvenovanie a to pri pacientoch s vysokým rizikom Lynchovho syndrómu. Pri normálnej expresii všetkých štyroch MMR proteínov sa predpokladá, že nádor vykazuje mikrosatelitnú stabilitu a PCR nie je potrebná [8, 11].

Štatistickou analýzou sme hodnotili vzťah medzi MMR proteínmi a klinicko-morfologickými parametrami (vek, pohlavie, grade, stage, lokalizácia lézie, stav LU, vaskulárna invázia). Pri MLH1 sme zistili signifikantné asociácie medzi gradingom a intenzitou (vyšší grade mal tendenciu súvisieť skôr s vyššou intenzitou) a percentom pozitívnych buniek (nižší grade bol skôr asociovaný s percentom pozitívnych buniek nad 50%) a medzi vaskulárnou inváziou a percentom pozitívnych buniek (negatívna vaskulárna invázia asociovala s percentom nad 50%). Ďalej sme pozorovali signifikantný vzťah medzi percentom MSH2-pozitívnych buniek a vekom (vysoký vek bol asociovaný s vysokým percentom pozitívnych buniek) a stagingom (Stage III bol tiež asociovaný s vysokým percentom pozitívnych buniek). Pri MSH6 a PMS2 sme nezaznamenali žiadne signifikantné vzťahy so sledovanými parametrami.

Karahan a kol. popisujú, že strata expresie MMR proteínov koreluje s gradingom (G3), lokalizáciou lézie (cékum a vzostupná časť hrubého čreva) a typom nádoru (mucinózny) [6]. Chen a kol zaznamenali, že strata expresie proteínov MLH1 a PMS2 korelovala s lokalizáciou nádoru (ileocéum) a stagingom (Stage IV) a strata expresie MSH2 a MSH6 korelovala s vekom (≤ 65 rokov), lokalizáciou nádoru (*colon transversum*) a stagingom (Stage III) [9]. Ismael a kol. vo svojej práci pozorovali signifikantný vzťah medzi expresiou MMR proteínov (mikrosatelitnou stabilitou) a vekom pacientov (vysoký vek, nad 50 rokov), gradingom (nižší grade) a lokalizáciou lézie (distálna časť hrubého čreva) [12]. Tieto výsledky môžu byť dôsledkom rozdielu v genetickom a dedičnom pozadí medzi pacientmi zahrnutými do týchto štúdií (napr. Ismael a kol. mali výlučne egyptských pacientov) a použitím aj molekulárnych analýz popri imunohistochemických vyšetreniach.

Záver

MSI je jedným z najštudovanejších potenciálnych molekulárno-genetických prognostických a prediktívnych markerov pri CRC. MSI pozitívne nádory majú dobrú prognózu a malú pravdepodobnosť metastázovania v porovnaní s MSI negatívnymi nádormi, čo podčiarkuje význam MSI nielen ako prediktívneho, ale aj ako prognostického markera. IHC analýza expresie MMR proteínov predstavuje v porovnaní s molekulárnym MSI testovaním praktickú a spoľahlivú metódu pre rutinnú detekciu prevažnej väčšiny CRC s MSI.

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

Literatúra

- [1] Sung, *CA Cancer J. Clin.* **2021**, 71:209–249.
- [2] Gonzales-Pons, *BioMed Research International.* **2015**, 2015:14.
- [3] Lech, *World J. Gastroenterol.* **2016**, 22:1745–1755.
- [4] Taieb, *European Journal of cancer.* **2022**, 175:136–157.
- [5] Jin and Sinicrope, *Cancers.* **2021**, 13:300.
- [6] Karahan, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, 8:4044–4053.
- [7] Bateman, *J. Clin. Pathol.* **2021**, 74:264–268.
- [8] De Salins, *ESMO Open.* **2021**, 6:100120.
- [9] Chen, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2019**, 12:3685–3699.
- [10] Li, *PLoS ONE.* **2017**, 12:e0181615.
- [11] Gibson, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, 12:171–176.
- [12] Ismael, *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **2017**, 5:9–13.

Zohrávajú imunohistochemicky pozitívne Merkelove bunky úlohu v patogenéze aktinickej keratózy? Imunohistochemická štúdia

Polakovičová, S.¹, Polák, Š.², Janega, P.³

¹Comenius University in Bratislava, Faculty of Medicine, Institute of Histology and Embryology, Bratislava; ²Comenius University in Bratislava, Faculty of Medicine, Institute of Anatomy, Bratislava; ³Comenius University in Bratislava, Faculty of Medicine, Institute of pathological anatomy Faculty of Medicine and University hospital, Bratislava
simona.polakovicova@fmed.uniba.sk

Abstract

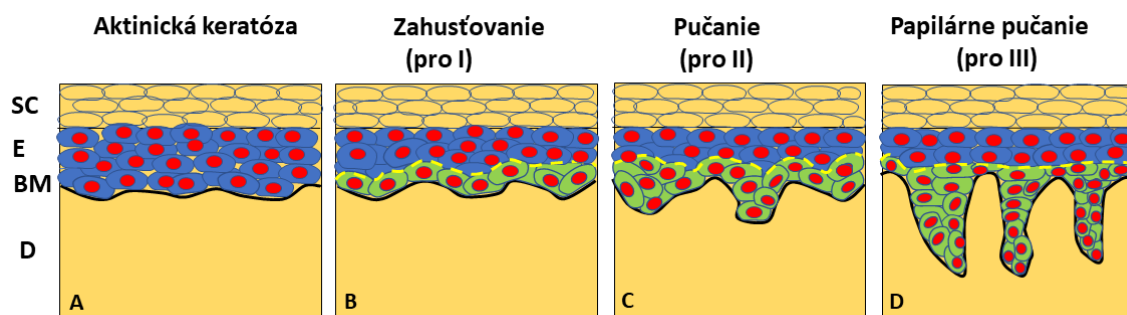
Actinic (solar) keratosis (AK) is a chronic, pre - cancerous skin lesion induced by UV-B irradiation. This lesion has an increasing incidence in people with fair skin types. When UV exposure is chronic and cumulative, the risk of developing of AK is increased. Typical localization of AK include the face, bald scalp in men, upper back, arms and dorsum of the hands in elderly. Classification based on lesion thickness has limitations and a new classification has been developed called AKASI- Actinic Keratosis Area and Severity Index. In chronically damaged actinic skin hyperplastic Merkel cells (MCs) have been described. Hyperplasia of MCs are documented in the hypertrophic histological type of AK. Chronic exposure to UV light may be the cause of MCs hyperplasy. Hyperplastic MCs were localized in the basal parts of the epidermis, where they formed rows and showed architectural abnormalities. It is unclear why MCs proliferate and are involved in pathological processes in the skin, so we decided to study them in AK lesions using immunohistochemistry. Our study showed 73 % CK-19, 91 % NSE and 82 % SYP positive MCs forming clusters in actinic keratosis lesions, which is not normal and could indicate cell transformation.

Keywords: Merkel cells, CK19, SYP, NSE

Úvod

Actinická (solárna) keratóza (AK) je chronická, prekancerózna lézia zapríčiná chronickou expozíciou UV žiarením. Kožná lézia má stúpajúci výskyt u ľudí s bledším typom pleti [1]. Klinicky je charakterizovaná ako drsná, červená makula alebo papula so známami hyperkeratózy a neostroohraničenými okrajmi. Bez adekvátnej liečby môže progredovať do cornu cutaneum [2], alebo invazívneho squamocelulárneho karcinómu (iSCC) [3]. Riziko progresie je nejasné, ale v jednej prospektívnej štúdii bolo odhadnuté riziko 0,60% v jednom roku a 2,57 % v štyroch rokoch [3]. Podľa Marks et al. [4] 75- 96 na 100.000 aktinických keratóz progreduje do iSCC za rok, ale 26,9% môže progredovať počas 12 mesačného obdobia, ak nie sú jedinci vystavení UV žiarením. 60% SCC vzniká z pre existujúcej AK [5]. Najčastejšími miestami výskytu AK sú tvár, neovlasená pokožka hlavy u mužov, horná časť chrbta, paže a chrbát rúk u starších jedincov. Ak je expozícia UV- B žiarením chronická a akumulatívna, riziko výskytu je vyššie [6]. UV- B žiarenie je najdôležitejším faktorom, vedúcim ku poškodeniu DNA keratinocytov [2]. AK charakterizuje výskyt dysplastických keratinocytov [6]. AK sa diagnostikuje klinicky a na základe klasifikácie založenej na hrúbke lézie, ktorá koreluje s histologickým gradingom, ale má svoje limitácie [1]. Preto bola vyvinutá nová klasifikácia AKASI- Actinic Keratosis Area and Severity Index [1]. Histologicky sa AK definuje prítomnosťou intraepitelových atypií keratinocytov, ktoré nezasahujú celú hrúbku epitelu. Častá je parakeratóza striedajúca sa s hyperkeratózou, zmiešaný chronický zápalový infiltrát z histiocytov a lymfocytov,

akantóza prípadne naopak atrofia epidermy a akantolýza [2]. Pozorovať môžeme zvýšenú mitotickú aktivitu a ložiskové nekrózy keratinocytov. Klasifikácia podľa Röwer- Huber et al. [6] je založená na proliferácii atypických keratinocytov bazálne [1] (obr. 1).



Obrázok 1 Klasifikácia aktinickej keratózy podľa Röwer- Huber [6] U všetkých štyroch typov AK je bazálna membrána neporušená (A-D), pozorujeme ale proliferáciu v bazálnej časti epidermy do dermy, s prítomnosťou atypických keratinocytov. C. a D. súvislá čiara označuje stupeň proliferácie smerom nadol. A.) AK bez bazálneho rastu, B.) zahusťovanie (pro I) naznačuje viac bazofilné atypické keratinocyty bližšie ku bazálnej membráne, C.) pučanie (pro II) malých púčikov do dermis, D.) papilárne pučanie (pro III) prstovitých výbežkov tvorených atypickými keratinocytmi do dermis bez invázie, SC - stratum corneum, E - epidermis, BM - bazálna membrána, D - dermis

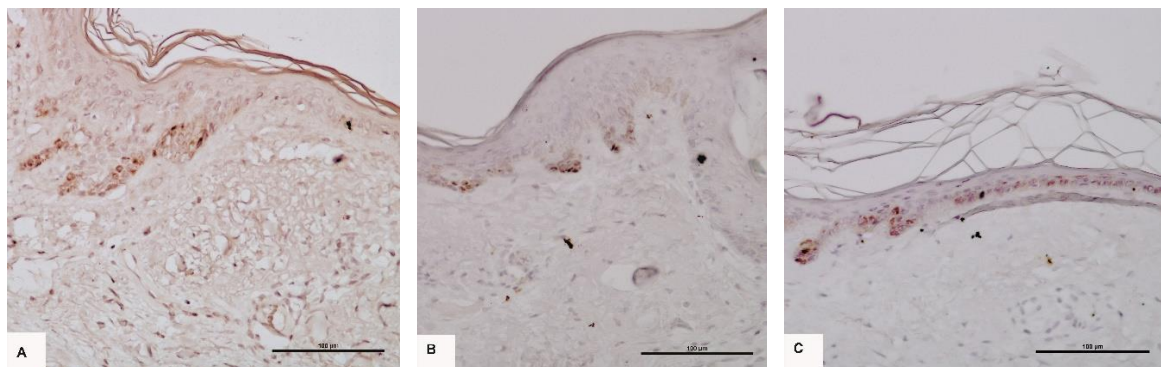
Gould et al., v roku 1984 [7] a 1985 [8] opísal v koži chronicky poškodenej slnečným žiarením hyperplastické Merkelove bunky (MB). Za fyziologických podmienok sú MB prítomné v bazálnej vrstve pokožky, koncentrované najmä v koži dlaní a stupajú, ale vyskytujú sa aj v slizniciach [9]. Ich úlohou je vnímanie jemných podnetov, a preto sa zaradujú ku mechanoreceptorom [10]. Podľa Lucarz and Brand [11], sú funkčne rozdelené do niekoľkých podskupín s rôznymi funkciami: mechanorecepcia, chemorecepcia a endokrinné funkcie. MB ktoré nie sú v kontakte s nervovým vláknom, patria ku bunkám APUD systému [11]. Môžu zohrávať významnú úlohu v proliferácii a diferenciácii keratinocytov [12]. V hypertrofickom type AK boli dokumentované hyperplastické MB [13]. Boulas a Misery [9] v roku 2007 zaznamenal ich vysoký počet (od 2 do 400 na cm²) v léziách AK, čo dal do súvisu s chronickou expozíciou UV žiareniu. Hyperplastické MB boli lokalizované v bazálnych častiach epitelu pokožky, kde vytvárali bunkové stĺpce, izolované alebo v skupinkách a vykazovali architektonické abnormality [13]. Je nejasné prečo sú MB zapojené do patologických procesov v koži. Na ich identifikáciu vo svetelnej mikroskopii sa používa imunohistochemická metodika s použitím markerov proti cytokeratínu CK- 18, 19, 20 [14], ďalej neuron-špecifická enoláza (NSE), špecifická pre neuróny a bunky APUD systému [15] a synaptofyzín (SYP). Messa et al. [16], dokázal SYP-pozitívne MB v bazálnej vrstve pokožky u dospelého človeka.

Materiál a metódy

Vyšetřili sme vzorky kože 11 pacientov s diagnózou aktinickej keratózy. Priemerný vek pacientov bol 68 rokov, najmladší pacient mal 55 rokov, najstarší 91 rokov. Vzorky tkaniva boli fixované 24 hodín vo formalíne, zaliate do parafínu a nakrájané na 4 µm hrubé rezy. Tkanivo bolo ďalej spracované imunohistochemicky na dôkaz antigénu proti cytokeratínu 19 (CK19- clone RCK108, Flex RTU), neurón-špecifickej enoláze (NSE- clone BBS/NC/VI-H14 RTU (Link), ref. IR612) a synaptofyzínu (SYP- clone DAK-SYNAP Ready-to-Use (Link), ref. IR660). Pozitívnou kontrolou boli vzorky kože od pacientov s karcinómom z MB (MCC), kde sú bunky pozitívne na všetky tri antigény.

Druhou pozitívnu kontrolou boli vzorky zdravej kože. Snímky boli zachytené pomocou svetelného mikroskopu Nikon Eclipse 80i a fotoaparátu Nikon DS-Fi1camera.

Výsledky



Obrázok 2 A a C. 71 ročný muž, kožná lézia z ucha, Ca in situ- III stupeň, CK-19 (A) a SYP (C) pozitívne MB v bazálnej vrstve epitelu, viditeľné prstovité protrúzie atypických keratinocytov vyčnievajúcich smerom do dermis, B. 65 ročný muž, kožná lézia z tváre, stupeň I, NSE pozitívne MB v bazálnej vrstve epitelu. A.,B.,C- orig. zväčšenie 200x

CK-19 pozitívne MB boli identifikované v epiteli kože z AK u 8 z 11 pacientov (73 %), NSE pozitívne MB boli identifikované u 10 of 11 (91%) a SYP pozitívne MB boli u 8 z 11 pacientov (82%). Pozitivita markerov bola slabá až stredná. Bunky tvorili prevažne hniezda na koncoch epidermálnych papíl a boli dobre viditeľné pre ich oválny tvar. Častejší výskyt buniek bol u mužov ako u žien (7:4). Najčastejšia lokalita výskytu bola koža z oblasti hlavy (9 z 11 pacientov).

Diskusia a záver

Hoci MB boli objavené pred mnohými rokmi, ich úloha v patologických procesoch ostáva zatiaľ nejasná. V práci Moll et al. [17] bol dokumentovaný veľký počet hyperplastických MB v pokožke chronicky vystavovanej UV žiareniu. Podľa Merot a Mooy [13] agregácia MB bola typická v zhrubnutých miestach u hyperplastického typu AK. Niektorí autori detegovali MB v skupinkách tvoriace hniezda v koži s radiačnou dermatitídou [18]. V našej štúdii sme tiež detekovali CK-19, NSE a SYP pozitívne MB tvoriace zoskupenia v bazálnej vrstve epidermis. NSE je špecifický nádorový marker a jeho pozitivita dokazuje ich neuroendokrinný pôvod. Pozitivita SYP dokazuje ich mechanorecepčnú funkciu. Podľa Wiedenmann et al. [19] vezikuly obsahujúce synaptofyzín sa tvoria počas malígneho rastu a transformácie. Naš výskum dokázal 82 % SYP pozitívnych MB v léziách AK, čo môže naznačovať bunkovú transformáciu. Nie je jasné prečo MB proliferujú a sú zapojené do patologických procesov v koži, ale náš výskum môže pomôcť objasniť ich funkciu v chronicky exponovaných kožných léziách.

Táto práca bola vypracovaná v spolupráci s Ústavom anatómie a patologickej anatómie LFUK a Univerzitnou nemocnicou Univerzity Komenského v Bratislave, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovensko, a schválená Etickou komisiou č.65/2022, Dátum: 31.8.2022.

Literatúra

- [1] Schmitz, *JEADV*. **2018**, 32:745–751.
- [2] Anwar, *Clinics in dermatology*. **2004**, 22:189–196.

- [3] Fernandez-Figuera, *JEADV*. **2015**, 29, 991–997.
- [4] Marks, *Lancet*. **1988**, 1:795–797.
- [5] Marks. *Br. J. Dermatol.* **1990**, 122/35:49–54.
- [6] Roewert- Hube and Stockfleth, *British Journal fo Dermatology*. **2007**, 157/2:18–20.
- [7] Gould, *Elsevier*. **1984**, 545–580.
- [8] Gould, *Lab. Invest.* **1985**, 52:334–353.
- [9] Boulais and Misery, *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, 57/1:147–165.
- [10] Hartschuh and Grube, *Arch. Dermatol. Res.* **1979**, 265:115–122.
- [11] Lucarz and Brand, *Eur. J. Cell. Biol.* **2007**.
- [12] Tachibana, *Arch. Histol. Cytol.* **1995**, 58:379–396.
- [13] Mérot and Mooy, *Dermatologica*. **1989**, 178:189–193.
- [14] Moll, *J. Invest. Dermatol.* **1995**; 104/6:910–5.
- [15] Gu, *AJP*. **1981**, 104/1:63–68.
- [16] Mesa, *Ann. Anat.* **2022**, 243:151955.
- [17] Moll, *Arch. Dermatol. Res.* **1990**, 282:213–216.
- [18] Hartschuh and Schultz. *J. Cutan. Pathol.* **1997**, 24:477–483.
- [19] Wiedenmann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, 83:3500–3504.

Morfológia variability brušnej splete

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

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Anatomický ústav, Bratislava; ²Úrad pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou, Ústav súdneho lekárstva, Bratislava; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta a Univerzitná nemocnica Bratislava, Neurochirurgická klinika, Bratislava
zora.haviarova@fmed.uniba.sk

Abstract

Coeliac plexus is approached due to diagnosis and treatment of intractable pain in abdominal region. Various coeliac plexus blocks are used and variations in its structure are causes of failures of such procedures. 20 human cadavers (17 male, 3 females, age range 30-86 yrs, without abdominal pathology) were dissected in supine position. Abdominal autonomics was studied bilaterally after incision of abdominal wall, peritoneal sac was cut and abdominal organs were removed. Size, average distance, number and nervous contribution of coeliac ganglia were documented. Sympathectomy (splanchnicectomy), as well as coeliac blocks (under US, CT control or laparotomic, aimed at pain relief), should take into account these possible variabilities.

Keywords: coeliac plexus, coeliac ganglion, variability

Úvod

Brušná spleť (plexus coeliacus) [6] tvorí podstatnú časť prevertebrálneho úseku sympatickej časti PNS, inervuje orgány brušnej dutiny. Jej štruktúra a spojenie s nervami susedných orgánov, s inými spleťami a jeho zložkami sú nestabilné, súvisia s charakterom distribúcie gangliových zoskupení. Lokalizácia brušného ganglia (ganglion coeliacum) je zväčša opísaná vzhľadom na okolité štruktúry a vykazuje rozdiely vo veľkosti a všeobecnej morfológii [16, 20]. Brušné gangliá (ganglia coeliaca) sa nachádzajú po stranách brušného kmeňa (truncus coeliacus) ako nepravidelné nervové masy (zvyčajne okolo 2 cm veľké), medzi začiatkom brušného kmeňa (truncus coeliacus) a hornou okružovou tepnou (a. mesenterica sup.), mediálne od nadobličiek a pred ramenami bránice (crura diaphragmatis). Existuje variabilita v počte, tvare a presnej lokalizácii: zvyčajne 2, 1 na každej strane, pravý umiestnený za dolnou dutou žilou (v. cava inferior) a ľavý za začiatkom slezinnej tepny (a. splenica). Hrudný veľký útrobný nerv (n. splanchnicus major) sa pripája k hornej časti ganglia a malý útrobný nerv (n. splanchnicus minor) [6] sa pripája k dolnej časti [3, 18]. Brušná spleť je najväčšia autonómna spleť spájajúca brušné gangliá na úrovni T12–L1 okolo brušného kmeňa (truncus coeliacus) a hornej okružovej tepny (a. mesenterica sup.) [5, 18, 20]. Viscerálne aferentné vlákna brušnej splete prenášajú bolesť a iné pocity z proximálnych brušných vnútorných orgánov [10, 18]. Neurolyza brušnej splete (a blokáda brušných ganglií) pri „syndróme bolesti v hornej časti brucha“ je účinná alternatíva manažmentu bolesti po zlyhaní farmakologickej liečby [4, 16]. Od r. 1914 sa používajú rôzne techniky a prístupy so svojimi obmedzeniami a možnými komplikáciami [8, 14, 15]. Napriek súčasnej rádiologickej možnosti zacielenia lokálneho anestetika alebo neurolytika do postihnutej oblasti sa pre neúspešné výsledky sústredila pozornosť na anatómiu a možnú variabilitu v brušných gangliách a spleti. Podľa Santanu [16], do r. 2021 sa v literatúre našli iba 4 štúdie o variabilite brušnej splete, všetky vykonané prostredníctvom kadaverózných štúdií.

Naša štúdia mala za cieľ prispieť k tejto téme podobnou štúdiou realizovanou na slovenskej populácii.

Materiál a metódy

Práca bola realizovaná na 20 ľudských telách (17♂a3♀), vekovo v rozmedzí 30- 86 rokov (do 24hod. po smrti), bez brušných anomálií. U všetkých bol bilaterálne odpitvaný ANS; v polohe na chrbte. Rezom obojstranne pozdĺž kľúčnych kostí laterálne bola odklopená koža a podkožné tkanivo, oddelené kľúčne kosti, rebrá prerezané v strednej axilárnej čiare, odstránená predná hrudná stena. Po odstránení pľúc a obsahu mediastína a stiahnutí nástennej pleury boli odhalené hrudné prevertebrálne sympatikové reťazce, gangliá, hrudných útrobných nervy (nn. thoracici splanchnici), pričom väčšina bránice bola odstránená a preštudované spojenia medzi gangliami a hrudnými útrobnými nervami. Po preparácii blúdivého nervu (n. vagus), sympatika (truncus sympathicus), miechové nervy (nn. spinales), ich vetvy a bránicový nerv (n. phrenicus) boli ozrejmené. U starších mŕtvol bola výrazne nižšia elasticita a pevnosť nervov. Prístup k nervovým štruktúram brušnej dutiny, vrátane ANS, bol z pozdĺžneho rezu od proc. xiphoideus k symfýze, obchádzajúc pupok, cez linea alba a prednú stenu peritoneálneho vaku, odkrýjúc peritoneálnu dutinu. Boli mobilizované (pozdĺž mezenteria, od lig. Treitz smerom k céku) vzostupné a zostupné hrubé črevo (colon ascendens, colon descendens), incidované pravý a ľavý parakolický mezenterický koreň (radices mesenterii) a sigmoideum (colon sigmoideum) oddelené od rekta.. Brušná spleť bola viditeľná po vyšetrení a odstránení brušných orgánov. Pozornosť bola venovaná aj obličkovým cievam, močovej rúre, dolným okružovým a gonadálnym cievam a spletiam [12]. Tkanivá identifikované ako gangliá boli excidované na histologické vyšetrenie, imunohistochemickú analýzu a overenie fixáciou v 10% roztoku formalínu (24 hodín) a zaliatí do parafínu. Bločky boli narezané na hrúbku 5 µm rezov, zafarbené hematoxylínom-eozínom (H&E) a vyšetrené mikroskopicky.

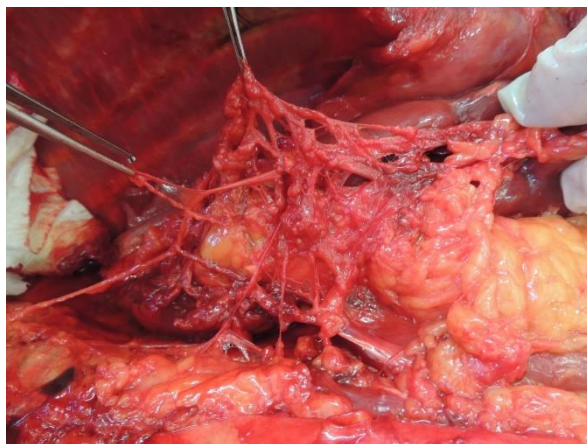
Tabuľka 1 Výsledky našej práce- vo vzťahu k typu splete, veľkosti a počtu brušných ganglií a ich priemernej vzdialenosti od truncus coeliacus

typ usporiadania plexus coeliacus	14 (difúzny typ)	6 (koncentrický typ)
veľkosť najväčšieho ganglion coeliacum	45mm (vpravo)	25mm (vľavo)
všeobecná veľkosť ganglion coeliacum	0.5cm (minimálne)	4.5cm (maximálne)
priemerná vzdialenosť od truncus coeliacus	0.6cm (vpravo)	0.9 (vľavo)
celkový počet ggll. coeliaca v spleti	2 (minimálne)	12 (maximálne)

Výsledky

Výsledky našej práce zobrazuje Tabuľka 1. Gangliá boli difúzne (14 prípadov, 70 %, obr. 1) alebo koncentricky (6 prípadov, 30 %, obr. 2) organizované (tab. 1).

Brušná spleť takmer vždy dostáva vetvy z veľkých útrobných a blúdivých nervov. Zriedkavo chýbali oba bránicové nervy. Niekedy boli pozorované príspevok malého útrobného nervu, bránicového nervu a prídavného bránicového nervu (60 %).



Obrázok 1 Difúzny typ brušnej splete- detail

Diskusia

V prípadoch, keď sú gangliové masy tvoriace brušnú spleť koncentrované ako veľké gangliá („semilunárne“ gangliá) (obr. 3), sú spojenia s obličkovými, aortálnymi a bráničnými spleťami dobre definované. V nadväznosti na prácu Santana [16] výsledky môžu byť doplnené prácami Hur [7], Zhang [19], du Plessis [4] a Ambali [1]. V našej štúdii sme sa nezaoberali topografiou brušných ganglií, ako vyplýva z vyššie uvedených štúdií, ich poloha sa pohybovala na úrovni medzi stavcom T11-T12 [1, 19] až do stredu úrovne L2 [20]. Veľkosť nášho najväčšieho brušného ganglia bola 45 mm vpravo, takáto veľkosť zatiaľ nebola popísaná (najväčšia spomínaná je 36 mm u du Plessis [4]).



Obrázok 2 Koncentrický typ brušnej splete- brušné ganglion



Obrázok 3 Ďalší typ koncentricky usporiadanej brušnej splete- brušné ganglion v tvare „polmesiačikovitého“ ganglia (ganglion semilunare)

Celková veľkosť brušného ganglia vľavo nepresiahla veľkosť uvádzanú inými autormi. Priemerná vzdialenosť brušného ganglia od brušného kmeňa bola 0,6 cm a 0,9 cm, čo súhlasí s výsledkami Warda [20]. My sme nesledovali tvar brušného ganglia: oválny [20], trojuholníkový [4, 13], ktoré autori uvádzajú ako najčastejšie, ale Zhang [19] pozoroval laminárny tvar ako najčastejší. Rozdiely boli tiež pozorované v celkovom počte brušných ganglií splete: všetci autori uvádzajú aspoň 1 ganglion na každej strane [19] a Ambali [1]. vo veľkých štúdiách na 65 a 50 mŕtvolách uviedli iba 1 ganglion na každej strane. Len Marino [11] uvádza 3 gangliá na každej strane, ostatné sa väčšinou pohybujú medzi 1-5 [20]. My sme pozorovali sme maximálne 12 celiakálnych ganglií (pravá a ľavá strana spolu), čo tiež presahuje spomínaný rozsah. Veľký útrobný nerv vychádza zo 7., 8. a 9. hrudného ganglia, ale horná a dolná hranica sa môžu líšiť. Iba v 12 % prípadov sú symetrické [9]. Malý útrobný nerv môže chýbať v 7 % na pravej strane a v 2 % na oboch stranách. Zvyčajne vzniká z 10. a 12. hrudného ganglia. Jit a Mukerjee [2] identifikovali výstup malého útrobného nervu z 1 ganglia pozostávajúceho z 1 nervového koreňa v 37 % prípadov. Etiológia bolesti pri rakovine pankreasu je zvyčajne spôsobená nádorovou inváziou do brušnej a/alebo okružovej splete [17]. Jedným z najefektívnejších postupov v liečbe bolesti pankreasu je disekcia hrudných útrobných nervov, konkrétne malého útrobného nervu. Žiaľ, vzhľadom na blízkosť ductus thoracicus môže dôjsť k jeho náhodnému poškodeniu, s následkom rozvoja pooperačného chylotoraxu [3].

Záver

Znalosť variability morfológie brušnej splete a jej brušných ganglií je dôležitá pre úspešnosť výsledku sympathektómii- splanchnicektómii, ako aj rôznych typov „brušných“ blokády vykonávaných pre na zmiernenie ťažko zvládnuteľnej bolesti brušných orgánov.

Literatúra

- [1] Ambali, *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*. **2022**, 9/7:5508.
- [2] Andtbacka, *Minerva Chir.* **2004**, 59/2:123–136.
- [3] Čihák, *Grada Publishing*. **2002**, 516 s., ISBN 9788024756363
- [4] du Plessis and Loukas, *Clinical Anatomy*. **2022**, 35/7:998–1006.
- [5] Edwards and Baker, *Anat. Rec.* **1940**, 77/3:335–342.
- [6] Holomáňová and Brucknerová, *Elán, Bratislava*, **2003**, 154 s., ISBN 80-85331-39-X
- [7] Hur, *J. Korean Pain. Soc.* **1989**, 2/2:135–144.
- [8] Ischia, *Current Review of Pain*. **2000**, 4:127–133.
- [9] Jit and Mukerjee, *J. Anat. Soc. India*. **1960**, 9:55–82.
- [10] Loukas, *Clinical Anatomy*. **2010**, 23:512–522.
- [11] Marino, *Surg. Radiol. Anat.* **1996**, 18:167–172.
- [12] Matejčík, *AEPress*, **2012**, 127 s. ISBN 978-80-88880-97-4
- [13] Paz and Rosen, *Acta Anat.* **1989**, 36:129–133.
- [14] Pereira, *Radiol. Bras.* **2014**, Set/Out;47/5:283–287.
- [15] Rana, *Curr. Pain Headache Rep.* **2014**, 18:394.
- [16] Santana, *J. Morphol. Sci.* **2021**, 38:362–366.
- [17] Selzer, *J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech. A.* **1999**, 9/3:273–276.
- [18] Standring, *Elsevier Limited*, **2021**, 1588 s., ISBN 978-0-70207705-0
- [19] Zhang, *AJR*. **2006**, 186:1520–1523.
- [20] Ward, *Anesth. Analg.* **1979**, 58/6:461–465.

Makroskopické a mikroskopické hodnotenie vývojových anomálií štítnej žľazy: kazuistika

Zavhorodnia, I.¹, Samec, M.², Hešková, G.¹, Straka, L.³, Janík, M.³, Výbohová, D.¹

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

²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie,

Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Univerzitná nemocnica a Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav súdneho lekárstva a medicínskych expertíz, Martin

zavhorodnia1@uniba.sk

Abstract

Thyroid gland (TG) is an endocrine organ, that develops from a pouches thyroid diverticulum between the first and second pharyngeal pouches during the 4th week of gestation. Eventually it descends via thyroglossal duct from the level of foramen caecum in front of the hyoid bone, thyroid cartilage, and cricoid cartilage, until it reaches its physiological position between CV and T1 vertebra. Due to its distant descend and eventual complete or partial obliteration of the thyroglossal duct, TG is objected to great variability of anatomical variations such as occurrence of pyramidal lobe (LP), levator glandulae thyroideae (LGT), accessory thyroid tissue (ATT). This study presents a rare case report of rare occurrence of several LPs and LGTs in one TG.

Dissection of a 45-year-old female cadaver (non-embalmed, non-frozen) was conducted at the Department of Forensic Medicine and Medicolegal Expertises, University Hospital in Martin, Comenius University in Bratislava. *En bloc* dissection method for evisceration of cervical and thoracic complex of organs was used. TG was dissected by infero-posterior approach for precise detection of the anatomical structures. Samples were stained with HE and analyzed under magnification of 40x, 100x, 200x, and 400x.

Macroscopic evaluation of TG showed three unusual morphological structures: one on the right side, and two on the left side. On the right side, short LP and thyreopyramidal LGT were observed. On the left side, hypopyramidal LGT was located medially, and LP of atypical shape of "hourglass" with fibrous band was detected laterally. Microscopic evaluation revealed that the LGT on the right side and medial LGT on the left side are muscular structures without thyroid follicles in it. Fibrous band of the LP on the left side confirmed presence of the thyroid follicles, muscular fibers as well as collagen fibers. Knowledge gained from the study is applicable in thyroid surgery, as incomplete resection of PL and LGT may increase risk of thyroid cells residual *in situ*. As sometimes LGT may include remnants of the thyroid follicles, this may aid in initiation of recurrence of thyroid malignancy or thyroid pathological process, as well as poor response to radioactive iodine 131I therapy.

Keywords: Thyroid gland, thyroid surgery, levator glandulae thyroideae, developmental anomalies

Úvod

Štítna žľaza (ŠŽ) je žľaza s vnútorným vylučovaním, ktorá sa ako jedna z prvých vyvíja v embryonálnom štádiu. ŠŽ sa vyvíja z divertikulu štítnej žľazy medzi prvým a druhým faryngeálnym vakom počas 4. týždňa tehotenstva [1]. Neskôr ŠŽ zostupuje cez *ductus thyroglossus* z úrovne *foramen caecum linguae* pred os hyoideum, cartilago thyroidea a cartilago cricoidea, až kým nedosiahne svoje fyziologické miesto v úrovni stavcov

CV až TI [1, 2]. ŠŽ vzhľadom na jej výrazný zostup a prípadnú úplnú alebo čiastočnú obliteráciu *ductus thyroglossus*, predstavuje značne variabilnú štruktúru asociovanú s anatomickými variáciami, ako sú: *lobus pyramidalis* (LP), *levator glandulae thyroideae* (LGT), *agenesis isthmi* (AI), agenéza lalokov ŠŽ, ektopické tkanivo ŠŽ, akcesórne tkanivo ŠŽ, ako aj cysty z *ductus thyroglossus* [3]. Bežne pozorované vývojové anomálie ŠŽ, ako sú LP a LGT, sa vyskytujú v populácii približne vo frekvencii 52,5 % a 40 % [3], 25 % a 38,33 % [4], 64 % a 64 % [5].

LP pozostáva z koloidu vo funkčných folikuloch ŠŽ lemovaných kubickým epitelom. LP býva lokalizovaný buď na laloku ŠŽ (vpravo, resp. vľavo), alebo v strednej línii krku. LGT sa považuje za fibromuskulárnu štruktúru, ktorá vystupuje z *apex* LP [6]. Predpokladá sa, že má fibrózny alebo muskulárny charakter, pričom je možná prítomnosť folikulov ŠŽ. LGT sú klasifikované do 5 typov [3]: hyopyramidálne (HP), hyoglandulárne (HG), tyreopyramidálne (ThP), tyreoglandulárne (ThG), tracheoglandulárne (TrG), na základe ich odstupu a úponu, pričom v jednej ŠŽ sa LP a LGT môžu vyskytovať jednotlivo alebo sa môžu navzájom spájať.

Nekompletná resekcia LP a LGT môže spôsobiť komplikácie počas chirurgického zákroku na ŠŽ ako sú totálna tyreidektómia alebo subtotálna tyreidektómia. Vzhľadom na to, že LP môže byť miestom patologických procesov, jeho rezíduum ponechané *in situ* ako LP samotné alebo spolu s LGT môže vyvolať recidívu Graves-Basedowovej choroby alebo malígneho ochorenia ŠŽ [2, 7, 8]. Okrem toho zvyšky folikulov ŠŽ v LP alebo LGT môžu absorbovať rádioaktívny ¹³¹I, čo znižuje jeho účinnosť v terapii malígnych ochorení, pokiaľ ide o solitárne rozptýlené rakovinové bunky v organizme [7]. Cieľom predkladanej štúdie je prezentovať zriedkavý prípad výskytu viacerých LP a LGT v jednej ŠŽ a poukázať na možný výskyt viac ako jednej anatomickej variácie naraz.

Materiál a metódy

Štúdia bola vykonaná na Ústave súdneho lekárstva a medicínskych expertíz Univerzitnej nemocnice v Martine, Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Kadaver, zahrnutý do danej štúdie, je súčasťou väčšej prospektívnej kadaverickej štúdie o vývojových anomáliách ŠŽ, schválenej ÚDZS a etickou komisiou JLF UK (EK 50/2024).

Cervikálny a hrudný komplex orgánov bol vypitvaný pitevnou metódou *en bloc* [9], po ktorej nasledovala pitva ŠŽ. Pre súčasnú štúdiu sme použili infero-dorzálny prístup k LP a LGT, ktorý poskytuje kompletnú, bezpečnú a presnú pitvu uvedených anatomických štruktúr so zníženým rizikom poškodenia. *Musculi infrahyoidei* boli odklopené kraniálne na úroveň *os hyoideum*. Peán bol zavedený medzi *cartt. tracheales/cricoidea/thyroidea* a LP/LGT. Nakoniec boli LP a LGT nadvihnuté a ich hranice boli presne rozlíšené pre ďalšie morfológické hodnotenia.

LP a LGT boli fotografované *in situ*; ich morfológické charakteristiky boli zaznamenané. Po excízie LP a LGT, ich vzorky boli vložené do 10% roztoku formalínu a transportované na ďalšie spracovanie tkaniva: histologické farbenie a analýzu do Martinského bioptického centra v Žiline.

Po spracovaní štandardným histologickým postupom, vzorky boli zaliate do parafrínových bločkov a narezané mikrotómom na rezy s hrúbkou 5 µm a ofarbené hematoxylínom a eozínom na vizualizáciu folikulárnych buniek ŠŽ (kubické bunky) v LP/LGT a väzivových/svalových vlákien v LGT. Na fotodokumentáciu bol použitý svetelný mikroskop Olympus BX43 s fotoaparátom Canon EOS 2000D. Preparáty boli analyzované pri celkovom zväčšení 40x, 100x, 200x a 400x.

Výsledky

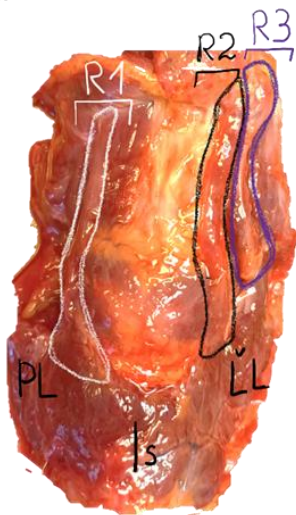
Počas pitvy ŠŽ u 45-ročnej ženy sme pozorovali tri komplexy anatomických variácií (obr.1 - 3):

- R1 komplex: jeden LP-LGT komplex na pravej strane;
- R2 komplex: jeden samostatný LGT mediálnejšie na ľavej strane;
- R3 komplex: jeden samostatný LP atypického tvaru laterálnejšie na ľavej strane.

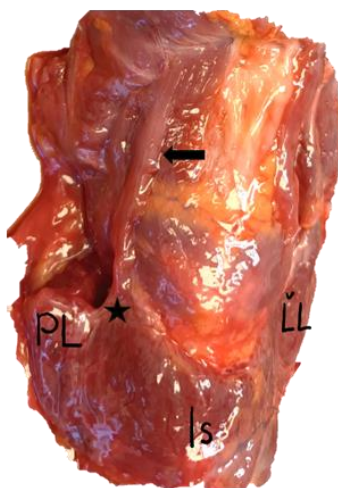
Na pravej strane bol LP spojený s LGT. Anatomické štruktúry boli označené ako R1 (Residue-1) (obr. 2). LP vychádzal z pravého laloka ŠŽ, približne 18 mm laterálne od strednej čiary krku (0 mm). LP bol lokalizovaný pod úrovňou *incisura thyroidea inferior* (ITI). Kraniokaudálny rozmer LP a mediolaterálny rozmer jeho bázy dosiahli 11 x 10 mm. Tento LP pokračoval ako LGT, ktorý sa upínal na *lamina dextra cart. thyroideae*. Dĺžka a šírka tohto LGT bola 45 x 4 mm. Makroskopicky sa javilo, že daný tyreopyramidálny LGT môže mať muskulárny charakter, keďže štruktúra vykazovala dobre rozlíšiteľné tenké svalové vlákna.

Komplex R2 (obr.3), predstavuje samostatný LGT, ktorý vychádzal z horného okraja ľavého laloku ŠŽ, a pripája sa k ľavej strane *os hyoideum*. Štruktúra ležala približne 12 mm laterálne od *linea mediana* krku. Rozmery LGT boli 63 x 9 mm. LGT z R2 komplexu sa považovalo za muskulárne, pretože sa javilo ako svetloružová štruktúra s dobre viditeľnými vláknami, orientovanými kraniokaudálnym smerom.

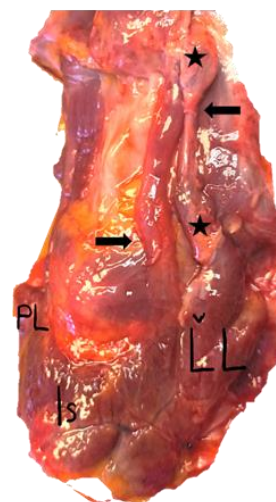
Komplex R3 sme primárne hodnotili ako LP atypického tvaru „presýpacích hodín“, umiestnenú laterálne od komplexu R2, na ľavej strane ŠŽ (obr. 3). LP siahal nad úroveň ITI a prevyšoval ju o +40 mm. Rozmery daného LP: výška a šírka boli 53 x 12 mm. Uprostred R3 komplexu sme pozorovali fibróznu štruktúru, ktorá sa podobala na LGT. Preto sme rozdelili komplex R3 na tri časti: a) kaudálny LP, ktorý meral 33 x 12 mm; b) fibrózny úsek v strede, 3 x 1.5 mm; c) kraniálne akcesórne tkanivo ŠŽ s rozmermi 17 x 12 mm. Podľa makroskopického hodnotenia, fibrózny úsek komplexu R3 bol krátky, bielej farby, podobal sa na krátke LGT medzi dvoma úsekmi štítného tkaniva.



Obrázok 1 Ventrálny pohľad. Komplex R1: LP (komplex R1), spojený s LGT; Komplex R2: LGT; Komplex R3: LP (komplex R3) v tvare „presýpacích hodín“



Obrázok 2 Ventrolaterálny pohľad. Zobrazenie komplexu R1. Prítomnosť LP (hviezda) a LGT (šípka)

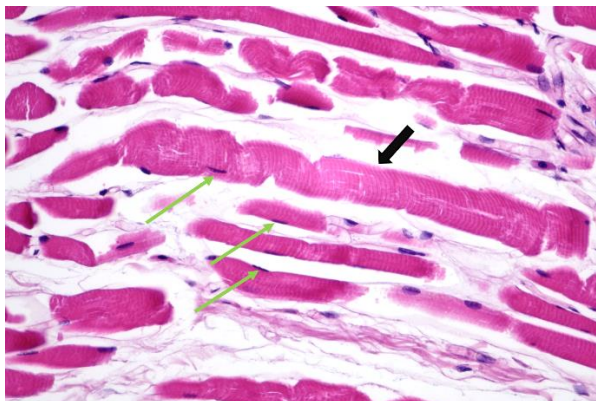


Obrázok 3 Ventrolaterálny pohľad. Zobrazenie komplexu R2 a R3. R2: Prítomnosť LGT (šípka vľavo). R3: Prítomnosť LP, resp. akcesórneho tkaniva ŠŽ (hviezdy) a tenkého fibrózneho úseku (šípka)

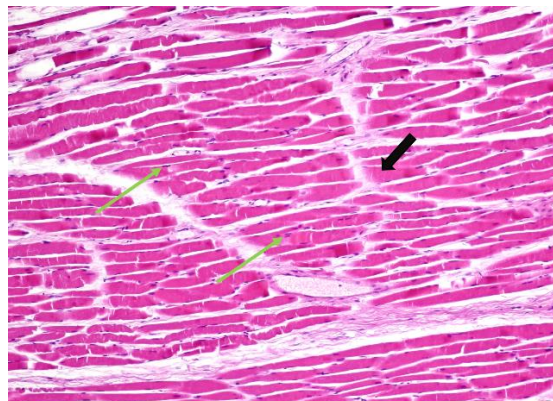
Vysvetlivky: Is – isthmus ŠŽ; PL – pravý lalok; LL – ľavý lalok; čierna šípka – LGT; čierna hviezda – LP

Mikroskopická analýza

Štruktúra R1 (obr. 1,2), zahŕňala LP a LGT. Počas mikroskopickej analýzy pri zväčšení 200x a 400x bolo dobre rozlíšiteľné priečne pruhovanie, charakteristické pre svalové vlákna (obr. 4). V danom LGT neboli pozorované žiadne folikuly ŠŽ s koloidom.

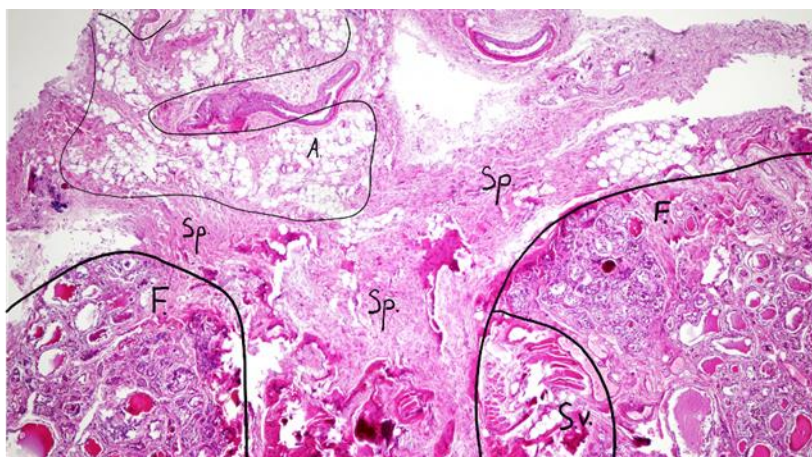


Obrázok 4 Štruktúra R1: HE, 400x. Priečne pruhovanie svalových vlákien (čierna šípka). Jadrá svalových buniek (zelené šípky)

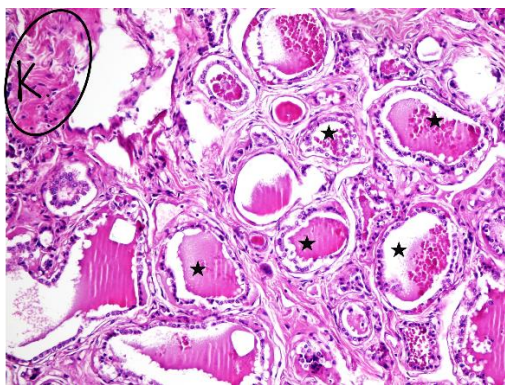


Obrázok 5 Štruktúra R2: HE, 100x. Priečne pruhovanie svalových vlákien (čierna šípka). Jadrá svalových buniek (zelené šípky)

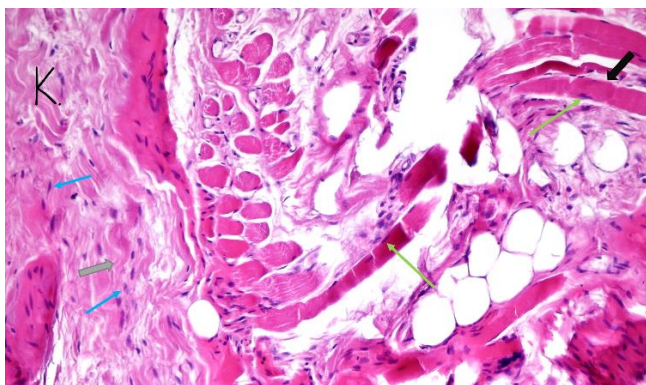
Makroskopicky bola štruktúra R3 považovaná za LP neobvyklého tvaru „presýpacích hodín“ (obr. 1,3). Počas pitvy sme zobrali dve vzorky z najužšieho miesta komplexu R3: kraniálnejšie (obr. 6,7,8) a zo stredu (obr. 9,10). Kraniálna časť fibrózneho úseku (obr. 6) pozostávala z: a) väčšieho množstva folikulov ŠŽ; b) väzivových vlákien (kolagénové/elastické vlákna); c) adipocytov; d) svalových vlákien (obr. 8). Pri väčšom rozlíšení boli folikuly ŠŽ a kolagénové vlákna dobre viditeľne (obr. 7).



Obrázok 6 Štruktúra R3 (kraniálne): HE, 40x. Kraniálna časť fibrózneho úseku. F – folikuly ŠŽ, Sp. – spojivové vlákna (kolagénové vlákna), A. – adipocyty, S.v. – svalové vlákna



Obrázok 7 Štruktúra R3 (kraniálne): HE, 400x. Folikuly ŠŽ obklopené kubickým epitelom so zvyškami koloidu (čierne hviezdy). Kolagénové vlákna (K., zakrúžkované), fibroblasty a fibrocyty sú viditeľné



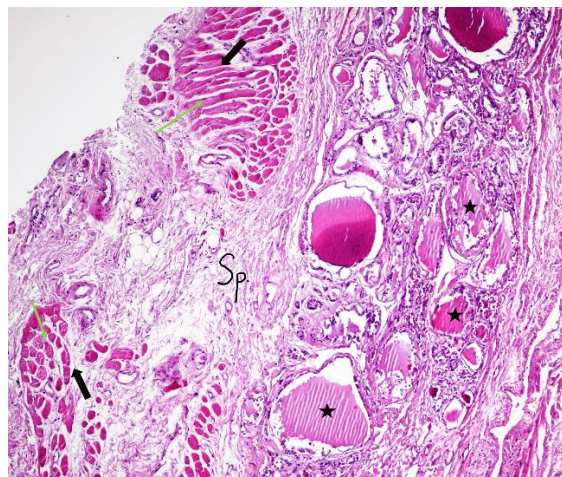
Obrázok 8 Štruktúra R3 (kraniálne): HE, 400x. Priečne pružovanie svalových vlákien (čierna šípka), jadra svalových buniek (zelené šípky). K – kolagénové vlákna. Kolagénové vlákna (sivá šípka) s fibroblastami a fibrocytmi (modré šípky)

Mikroskopické hodnotenie vzorky zo stredného úseku R3 (obr. 9,10) potvrdilo prítomnosť väčšieho množstva väzivových vlákien v danom úseku v porovnaní s makroskopickým pozorovaním. Okrem toho sme mikroskopicky vo vzorke zaznamenali veľké percento svalových vlákien (obr. 9). V porovnaní s kraniálnejším úsekom, daná vzorka obsahovala menej folikulov ŠŽ a menej adipocytov. Okrem toho kolagénové/elastické vlákna boli tiež prítomné (obr. 9,10).

V prípade štruktúry R2, sme tiež potvrdili výsledky makroskopickej analýzy. LGT predstavoval svalový zvyšok po *ductus thyroglossus* (obr. 5) bez stanovenia prítomnosti akýchkoľvek folikulov ŠŽ s koloidom.



Obrázok 9 Štruktúra R3 (stredná časť): HE, 400x. Stredná časť fibrózneho úseku. Obsahuje viac spojivového tkaniva. F – folikuly ŠŽ; Sp. – spojivové vlákna (kolagénové vlákna); S.v. – svalové vlákna



Obrázok 10 Štruktúra R3 (stredná časť): HE, 400x. Folikuly ŠŽ obklopené kubickým epitelom so zvyškami koloidu (čierne hviezdy). Priečne pružovanie svalových vlákien (čierna šípka), jadra svalových buniek (zelené šípky)

Diskusia

Väčšina predchádzajúcich štúdií bola zameraná na sledovanie všeobecného výskytu LP a LGT. Len niekoľko autorov uvádzalo ojedinelé prípady vývojových anomálií ŠŽ s histologickou analýzou (tab.1). Ako príklad je možno uviesť výsledky štúdií

Chaudhary, 2013 a Kima, 2010 [10, 11], ktoré opisujú kazuistiky s absenciou LP s výskytom samostatného LGT prítomným u 55-ročného muža a 51-ročnej ženy. V oboch štúdiách boli LGT lokalizované na ľavej strane, hoci sa líšili typom, resp. miestom úponu (tab.1). V iných štúdiách [12, 13] autori pozorovali LGT s niekoľkými výbežkami na ľavej a pravej strane, resp. (tab.1). V týchto štúdiách boli prítomné aj malé LP, spojené s jedným z výbežkov LGT. V štúdii Gregory, 2007 [14] počas pitvy bolo opísané široké pripojenie tyreoglandulárneho muskulárneho LGT na *cartilago thyroidea* u 61-ročného muža. Taktiež bol pozorovaný samostatný LP, ktorý nebol spojený so širokým LGT na ľavej strane. Štúdie Gupta, 2011 a Kumar, 2015 [15, 16] identifikovali komplex LP-LGT na pravej strane u dvoch mužov (tab.1). Okrem toho sa v troch ďalších štúdiách zistila agenéza isthmus (AI) spolu s prítomnosťou LP a/alebo LGT [15, 17, 18] (tab.1).

Tabuľka 1 Kazuistiky/prípady z iných štúdií

Štúdia	Popis pozorovaných anatomických variácií
Chaundhary, 2013 [10]	LP – neprítomný LGT – muskulárny, HG, s folikulmi ŠŽ, 30 x 6 mm, ľavá strana
Kim, 2010 [11]	LP – neprítomný LGT – ThG, ľavá strana; duplikovaný m.omohyoideus na pravej strane
Loukas, 2008 [12]	Malý LP s početnými výbežkami LGT, stredná línia krku, 58 x 8.9 mm
Pacifico, 2019 [13]	LP – pravá strana LGT – muskulárny, s dvoma výbežkami (HP, 53 mm; and HCr, 26 mm), pravá strana
Gregory, 2007 [14]	LP – ľavá strana, nespojený s LGT LGT – muskulárny, ľavá strana, ThG (široký úpon na <i>cartilago thyroidea</i>)
Gupta, 2011 [15]	LP – pravá strana, 23 x 15 mm; AI – prítomný LGT – HP, 35 x 3.5 mm
Kumar, 2020 [16]	LP – z horného okraja isthmus ŠŽ, pravá strana LGT – muskulárny, HP, pravá strana, 65 x 15 mm
Susan, 2009 [17]	LP – bilaterálne z pravého a ľavého laloku ŠŽ; AI – prítomný LGT – z každého LP do os <i>hyoideum</i> (HP),
Vithana, 2023 [18]	LP – bilaterálne z pravého a ľavého laloku ŠŽ; AI – prítomný LGT – neprítomný
LP – <i>lobus pyramidalis</i> ; LGT – <i>levator glandulae thyroideae</i> ; HP – hyopyramidálny; HG – hyoglandulárny; ThG – tyreoglandulárny; HCr – hyokrikoidný; AI – agenéza isthmus; ŠŽ – štítna žľaza	

V našej štúdii sme opísali atypický počet LP a LGT na jednej ŠŽ, ako aj ich morfológické charakteristiky. Predkladaná kazuistika upozorňuje na možný výskyt viac ako jednej anatomickej variácie v rámci jednej ŠŽ. V našej práci sme sa zameriavali najmä na komplex R3, kde sa tenký fibrózny úsek vyskytuje uprostred parenchýmu ŠŽ vystupujúceho smerom k os *hyoideum* a rozdeľuje ho na dve časti. Hoci makroskopický fibrózny úsek sa javí ako biela štruktúra s pravdepodobným vysokým výskytom kolagénových vlákien, vo vzorke sme mikroskopicky zaznamenali veľké percento aj svalových vlákien, čo nebolo možné predpokladať počas pitvy. Taktiež v kraniálnej časti fibrózneho úseku bolo zistené veľké množstvo folikulov ŠŽ, ktoré sme

definovali ako akcesórne tkanivo ŠŽ. V prípade ponechania kraniálneho úseku danej štruktúry *in situ* môžu byť spôsobené komplikácie, ako napríklad diseminácia rakovinových buniek alebo vyvolávanie recidívy iných patológií ŠŽ, ako aj spôsobiť zhoršenie odpovede na liečbu rádioaktívnym ¹³¹I [7]. Preto je dôležité skontrolovať kompletný priebeh anatomickej štruktúry od odstupu až po úpon.

Štruktúra R2 je dobré detekovateľná počas pitvy, hoci jej kaudálna tretina je viac priehľadná a tenšia ako zvyšok R2. Okrem toho LGT na pravej strane (štruktúra R1), ktorá leží ventrálne od *musculus thyrohyoideus*, môže byť ťažko detekovateľná kvôli jeho podobnosti s uvedenou svalovou štruktúrou farebne aj svojim vzhľadom.

Záver

Naša štúdia upozorňuje na možný výskyt anomálií ŠŽ. Poznatky získané z tejto štúdie sú použiteľné v chirurgii ŠŽ, keďže neúplná resekcia LP a LGT môže zvýšiť riziko výskytu reziduálnych buniek ŠŽ *in situ*. Keďže niekedy LGT môže zahŕňať zvyšky folikulov ŠŽ, môže to spôsobiť iniciáciu recidívy malígneho ochorenia ŠŽ alebo iného patologického procesu štítnej žľazy, ako aj zle odpovede na liečbu rádioaktívnym ¹³¹I.

Ďakujeme RNDr. Daniele Melovej a Martinskému bioptickému centru v Žiline za technickú podporu tejto štúdie: histologické farbenie a histologickú analýzu vzoriek štítnej žľazy.

Literatúra

- [1] Mansberger, *Surg. Clin. North. Am.* **1993**, 73:727–746.
- [2] Braun, *Surg. Radiol. Anat.* **2007**, 29:21–27.
- [3] Dessie, *Anat. Cell. Biol.* **2018**, 51:243–250.
- [4] Raut, *Int. J. Anat. Res.* **2018**, 6:5538–5543.
- [5] Diana, *Int. J. Anat. Res.* **2019**, 7:7193–7198
- [6] Milojević, *Arch. Biol. Sci.* **2021**, 73/1:73–81.
- [7] Ryu, *Ultrasound Med. Biol.* **2014**, 40:1442–1446.
- [8] Wei, *Endocr. Pathol.* **2015**, 26:75–79.
- [9] Skowronek, *Arch. Med. Sądowej Kryminol.* **2010**, 60:48–54.
- [10] Chaudhary, *JCDR.* **2013**, 7/7:1421.
- [11] Kim, *Yonsei. Med. J.* **2010**, 51/6:984–6.
- [12] Loukas, *Anat. Sci. Int.* **2008**, 83/4:273–276.
- [13] Pacífico, *Int. J. Anat. Var.* **2019**, 12/2:10.
- [14] Gregory, *Clinical anatomy.* **2007**, 20/8:966–967.
- [15] Gupta, *J. Clin. Diagn. Res.* **2011**, 5/8:1634–6.
- [16] Kumar, *JHAS.* **2015**, 5/01:086–087.
- [17] Susan, *IJAV.* **2009**, 2:29–30.
- [18] Vithana and Rajakaruna, *Ear Nose Throat. J.* **2023**, doi: 10.1177/01455613231152086

Účinok ionizujúceho žiarenia na zastúpenie gliových buniek v mozgu starnúcich potkanov

Macková, L.¹, Báľentová, S.¹, Kalenská, D.², Muriň, P.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; ³Onkologické centrum UNM, Martin
mackova154@uniba.sk

Abstract

In our study, we investigated the effect of ionizing radiation on aging rats after fractionated whole brain irradiation (fWBI) with a clinically relevant dose. Adult male Wistar rats at 5 months of age received fWBI with a total dose of 32 Gy delivered in 4 fractions (8 Gy dose per fraction) once a week on the same day for 4 consecutive weeks. We used immunofluorescence staining, confocal microscopy, and image analysis of tissue slides to determine changes in glial cells in two brain neurogenic regions: the subventricular zone in the wall of the lateral ventricles and the hippocampal dentate gyrus. In both neurogenic regions, we found a slight increase in the number of astrocytes and microglia nine months after irradiation. The reason for the weak response of glial elements to irradiation could be not only the longer survival time, but also the advanced age at the time of starting the irradiation.

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

Úvod

Frakcionované ožiarovanie celého objemu mozgu patrí v súčasnosti medzi najviac používané terapeutické modalitty pacientov s mnohopočetnými metastázami. Vďaka dokonalejším ožarovacím a zobrazovacím technikám dochádza k dlhšiemu mediánu prežívania pacientov s uvedenou diagnózou [1]. Tento fakt však zvyšuje riziko výskytu funkčných, neurokognitívnych zmien (napr. zmeny dlhodobej pamäte, prejavy demencie), ktoré významne znižujú kvalitu života onkologických pacientov [2]. Morfologické zmeny v tkanivovom mikroprostredí mozgu po ožiarení zahŕňajú poškodenie endotelu ciev, narušenie stability hematoencefalickej bariéry, astrogliózu, aktiváciu mikroglie, apoptózu prekursorov oligodendrocytov a tiež vyvolanie zápalovej odpovede [3, 4]. Účinok ionizujúceho žiarenia môže byť modulovaný vekom skúmaného potkana. 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 mikroglie a takmer žiadne zmeny v zastúpení nezrelých neurónov a to 10 týždňov po expozícii [5, 6]. So starnutím menia mikrogliové bunky svoju morfológiu a môžu vykazovať zníženú kapacitu pre normálne funkcie súvisiace s migráciou a schopnosťou prejsť z prozápalového do protizápalového stavu pri regulovaní odpovede na poškodenie. Tento posun potenciálne prispieva k zvýšenej náchylnosti na poškodenie a k neurodegenerácii [7]. Cieľom našej štúdie bolo zistiť a popísať, ako frakcionované ožiarovanie mozgových hemisfér, mozgového kmeňa a časti krčnej miechy potkanov vo vyššom veku ovplyvní populáciu astrocytov a mikroglie v neurogénnych oblastiach mozgu.

Materiál a metódy

V experimente sme použili dospelé, biele samce potkanov, kmeň Wistar (n=2), ktoré sme nechali prežívať do veku deväť mesiacov. Potkany sme rozdelili na kontrolnú skupinu (n=2) a druhú skupinu (n=2) sme po dosiahnutí veku 5 mesiacov ožarovali celkovou dávkou (cD=32 Gy, rozdelenou na 4 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 mozgové hemisféry, mozgový kmeň a časť krčnej miechy. U oboch skupín zvierat sme po 4 až 5 mesačnom prežívaní (vo veku 9 mesiacov) vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu pomocou fyziologického roztoku a následne 4 % paraformaldehydu. Po dekapitácii a vybratí orgánov sme z mozgových hemisfér narezali sériové, sagitálne kryorezy s hrúbkou 30µm. 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.

Výsledky

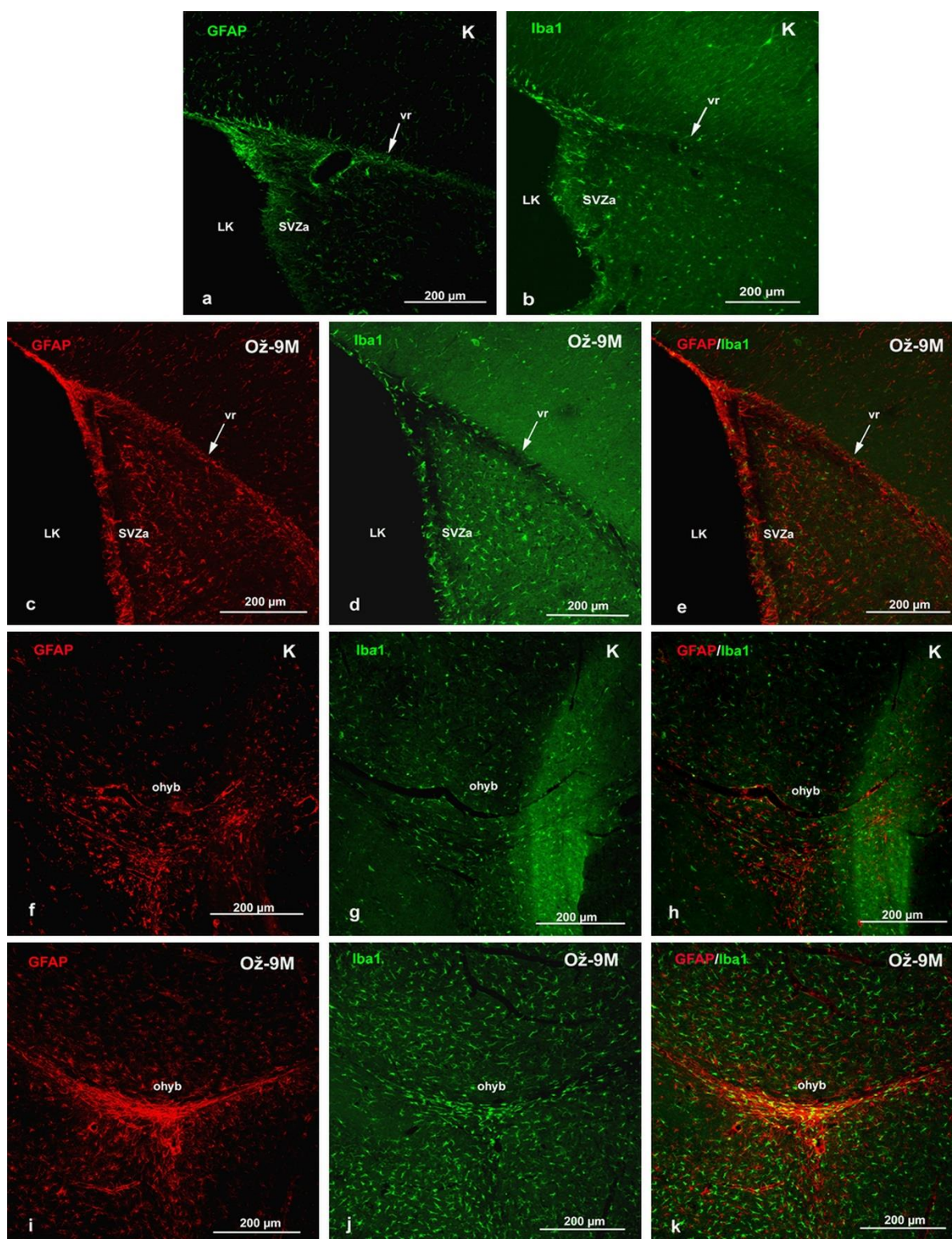
Hoci morfometrická analýza preparátov mozgu ožiarených potkanov ešte nie je ukončená, predbežné výsledky ukazujú na mierny nárast populácie GFAP-IR astrocytov v jednotlivých oblastiach v rámci RMS. V prípade Iba1-IR mikroglie sme taktiež identifikovali určité zvýšenie pozdĺž migračnej trasy (obr.1).

Diskusia

Predbežné výsledky štúdie ukazujú, že frakcionované ožarovanie mozgu u potkanov vo vyššom veku má dopad na populáciu astrocytov a mikroglie, ktoré osídľujú neurogénne oblasti mozgu potkanov. V našej predchádzajúcej štúdii sme po ožarení rovnakou cD=32 Gy a kratšom intervale prežívania potkanov (9-11 týždňov) zistili signifikantný nárast GFAP-IR astrocytov pozdĺž migračnej trasy a taktiež v gyrus dentatus hipokampu. Tieto údaje korešpondovali s nárastom koncentrácie myoinositolu – markera astrocytov v striate a hipokampe, ktorý sme identifikovali pomocou merania protónovou magnetickou rezonančnou spektroskopiou (¹H MRS). Nárast mikroglie taktiež zistený v tejto štúdii mohol byť ukazovateľom zápalu a súvisieť so zvýšením objemu v striate a hipokampe [8]. Pokročilejší vek v čase ožarovania a ukončenia experimentu mohol maskovať niektoré zmeny po ožarení, ako uvádzajú predchádzajúce štúdie [9, 10]. Výsledky morfometrickej analýzy by však bolo potrebné porovnať s dátami získanými inými metódami, napr. ¹H MRS.

Záver

Na základe našich pozorovaní sa javí, že zmeny v populácii buniek v neurogénnych oblastiach mozgu môžu byť spôsobené nielen ožarovanou oblasťou, veľkosťou frakcie, celkovej dávky a doby prežívania po ožarení, ale aj vekom ožarovaného jedinca. Histopatologické zmeny v tkanive mozgu sú často spojené s funkčnými zmenami a prejavmi, ktoré majú na kvalitu života pacienta negatívny dopad a sú prognosticky nepriaznivé.



Obrázok 1 Mikrofotografie sagitálnych rezov mozgu kontrolných (K) a ožiarených potkanov prežívajúcich deväť mesiacov po frakcionovanom ožarení mozgu (Ož-9M). Imunofluorescenčné farbenie na detekciu glial fibrillary acidic protein (GFAP) – markera astrocytov (zelená resp. 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) a v ohybe v rámci rostrálnej migračnej dráhy. Po ožarení nastalo mierne zvýšenie astrocytov v SVZa (a, c), ohybe (f, i) a mikroglie v SVZa (b, d) a ohybe (g, j)

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] Kalm, *Radiat. Res.* **2009**, 171:66–76.
- [3] Greene-Schloesser, *Front. Oncol.* **2012**, 2:73.
- [4] Yuan, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2006**, 66:860–866.
- [5] Baskar, *Front. Mol. Biosci.* **2014**, 1:24.
- [6] Schindler, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2008**, 70/3:826–834.
- [7] Harry, *Pharmacol. Ther.* **2013**, 1:12–13.
- [8] Báľentová, *Neurochem. Int.* **2021**, 145:104985.
- [9] Shi, *Brain Res.* **2011**, 1385:307–316.
- [10] Tang, *Brain Dev.* **2017**, 39/4:277–293.

Exploring Cancer Metabolism Through Fluxomics Based on Polarome analysis

Murín, R.¹, Gondáš, E.², Šofranko, J.¹

¹Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Department of Medical biochemistry, Martin; ²Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Department of Pharmacology, Martin
murin@fmed.uniba.sk

Abstract

Cancer, a multifaceted disease characterized by uncontrolled cell growth and proliferation, has been the subject of intensive research for decades. One of the key hallmarks of cancer is the rewiring of cellular metabolism to sustain rapid proliferation, invasion, and metastasis. Metabolic reprogramming in cancer cells involves alterations in various metabolic pathways to meet the increased demand for energy, biosynthetic precursors, and reducing equivalents. Recent advances in omics techniques such as metabolomics, transcriptomics, and proteomics allow for a more comprehensive approach to analyzing dynamic metabolism fluxes – fluxomics. Fluxomics offers a way to study metabolic fluxes, enabling the elucidation of the intricate metabolic alterations underlying cancer progression. In this respect, our novel protocol for LC-MS analysis allows for quantitative analysis of polar and ionic molecules, polaromics. Our recent fluxomic data based on polarome analysis revealed novel features of cancer cellular metabolism and provide unique evidence about the dependence of cancer cell survival on sustaining mitochondrial metabolism, both by strengthening their anaplerotic capacity with overproduction of mitochondrial carboxylase and furnishing acetyl-CoA molecules originating from the catabolism of leucine into the citric acid cycle. Furthermore, we identified changes in metabolic pathways that support the hypothesis of metabolic heterogeneity among cancer cells.

Keywords: fluxomics, metabolomics, polaromics, cancer metabolism, epimetabolite

Introduction

Understanding Cancer Metabolism

Cancer cells exhibit distinct metabolic phenotypes compared to their normal counterparts. While normal cells primarily rely on the entry of glucose-derived pyruvate into mitochondrial metabolism and support oxidative phosphorylation for ATP generation, cancer cells often preferentially utilize aerobic glycolysis and generate substantial amounts of lactic acid. Even though this shift in energy metabolism allows cancer cells to meet the increased demand for ATP, they need to sustain their mitochondrial metabolism as the source of biosynthetic intermediates. Moreover, cancer cells exhibit rewired metabolic pathways to support macromolecular biosynthesis, redox homeostasis, and metabolic intermediates essential for cell growth and rapid reproduction [1 – 5].

The Role of Fluxomics in Studying Cancer Metabolism

Metabolism is a dynamic process, while analytical techniques can provide information about biological systems in certain time, there is a need to put it to a wider context. Fluxomics [6, 7], which involves the quantitative analysis of metabolic fluxes within a biological system, provides a comprehensive understanding of metabolic reprogramming in cancer. By integrating stable isotope tracing techniques with

computational modeling, fluxomics enables the measurement of metabolic fluxes through different pathways and the identification of key nodes regulating metabolic reprogramming in cancer cells [8]. By estimating the incorporation of labeled carbons into downstream metabolites using mass spectrometry or nuclear magnetic resonance spectroscopy, fluxomics provides quantitative information on metabolic fluxes. This approach can reveal alterations in substrate utilization and entry into metabolic pathways, such as ^{13}C -glucose conversion by glycolysis, the pentose phosphate pathway, citric acid cycle, and amino acid metabolism in cancer cells compared to normal cells [6]. A crucial role in interpreting stable isotope tracing data and inferring metabolic fluxes is played by computational modeling [8]. By integrating experimental data with mathematical models of metabolic networks, fluxomics enables the estimation of flux distributions and metabolic flux ratios in cancer cells. Computational simulations can identify metabolic pathways that are upregulated or downregulated in cancer, providing mechanistic insights into metabolic reprogramming [9]. Additionally, flux balance analysis and metabolic flux modeling can predict the effects of genetic or pharmacological interventions on cancer metabolism, facilitating the identification of potential therapeutic targets [10 – 12].

Applications of Fluxomics in Cancer Research

Fluxomics has been widely applied to study various aspects of cancer metabolism, including: 1) Identification of metabolic vulnerabilities, 2) Biomarker discovery, 3) Personalized medicine, and 4) Drug discovery and development [7 – 12].

1. Identification of Metabolic Vulnerabilities: Fluxomics can identify metabolic pathways that are essential for cancer cell proliferation and survival. By targeting key metabolic nodes identified through flux analysis, novel therapeutic strategies can be developed to selectively inhibit cancer cell metabolism while sparing normal cells.
2. Biomarker Discovery: Alterations in metabolic fluxes can serve as biomarkers for cancer diagnosis, prognosis, and treatment response. Fluxomics-based biomarker discovery enables the development of non-invasive metabolic imaging techniques for cancer detection and monitoring.
3. Personalized Medicine: Fluxomics can facilitate the implementation of personalized cancer therapies by characterizing metabolic heterogeneity among tumors and predicting individualized responses to metabolic inhibitors or chemotherapeutic agents.
4. Drug Discovery and Development: Fluxomics-guided drug screening approaches can identify compounds that selectively target metabolic vulnerabilities in cancer cells. This accelerates the development of novel anticancer drugs and repurposing of existing drugs with metabolic targets.

We have exploited the possibility of fluxomics to provide insights into the dynamic behavior of metabolic pathways in cancer cells. By applying pharmacological inhibitors of pyruvate carboxylase, we identified the essential role of this enzyme in sustaining the viability of human glioblastoma cells and astrocytes [13, 14]. The expansion of this knowledge by using immunodetection methods revealed that pyruvate carboxylase is ubiquitously expressed among several types of brain cancers as well as prostatic tumors [15, 16]. Fluxomics studies on cultured glioblastoma cells revealed that cancer cells readily dispose of branched-chain amino acids from their milieu. By using isotopically labeled leucine, we have already quantified the metabolic flux of carbon atoms originating from leucine in glioblastoma, astrocytoma and neuroblastoma cells

[17]. Based on our observation that cancer cells catabolize leucine to acetyl-CoA that can enter the citric acid cycle, we investigated the expression of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase among different types of brain tumors. Indeed, immunohistochemical staining of human brain tumor samples revealed that cancer cells are expressing this carboxylase, and therefore, we have hypothesized that brain tumor cells possess the enzymatic capability to support their mitochondrial metabolism with acetyl-CoA molecules generated from leucine. In addition to leucine catabolism, the metabolism of the two-remaining branched-chain amino acids – isoleucine and valine – is recently investigated. Interestingly, fluxomic studies focusing on the metabolism fluxes of essential amino acids pointed to a fact that the enrichment of culture media with some essential amino acids in the presence of cancer cells might be a consequence of the enhanced capability of cancer cells to utilize extracellular proteins as the source of amino acids. Indeed, that observation is under detailed investigation now, and our data stress the capability of cancer cells to engulf extracellular proteins from the extracellular space (Fig. 1,2; [Sofanko et al. unpublished data]). A few recent publications deal with the possible existence of heterogeneity in metabolism among cancer cells [18 – 21]. In this respect, we have introduced the polaromics, which are based on the exploitation of the novel LC-MS analysis of polarome dynamics [22, 23]. The recently obtained results reveal the profound metabolic heterogeneity between different types of glioblastoma cells [23]. The possibility to study the signaling/regulatory or cytotoxic effects of compounds on fluxomics we have modified LC-MS based polaromic analysis to quantify the alterations of cellular metabolism in the presence of 2-hydroxyglutarate and other putative epimetabolites, the compounds with potential to affect the epigenetically regulated gene expression [24].

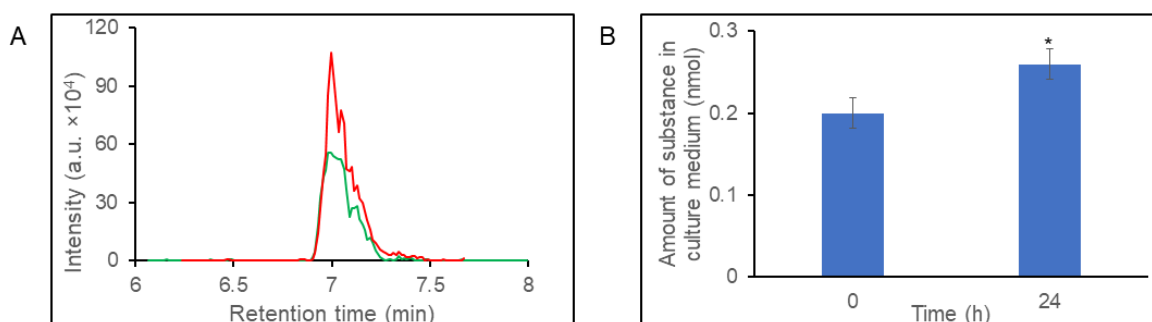


Figure 1 Chromatogram of phenylalanine in cell culture medium (a), before incubation (green) and after 24 h incubation (red), and increase of amount of substance of phenylalanine in cell culture medium after 24 h (b). Samples were analyzed in triplicates and the mean \pm standard error of the mean (SEM) is expressed

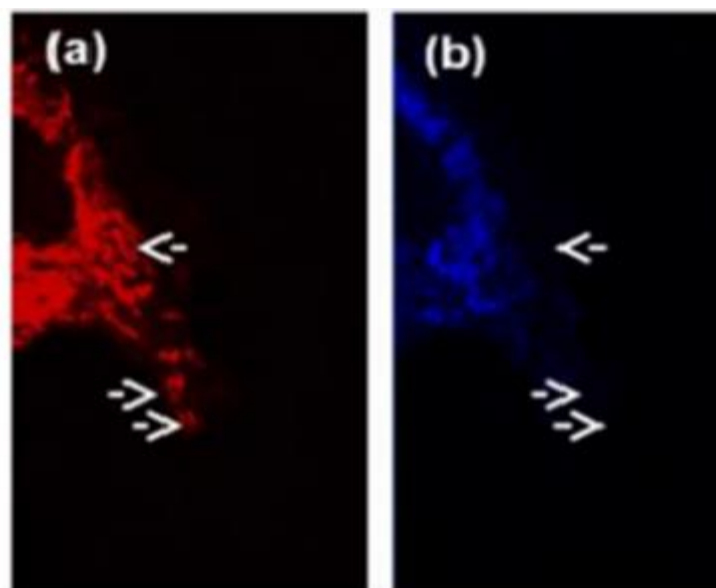


Figure 2 Photomicrographs of glioblastoma cells depicting mitochondria (a) and covalent conjugate of albumin with Uniblu A (b)

Challenges and Future Perspectives

Despite its potential, fluxomics faces several challenges, including the complexity of metabolic networks, technical limitations in stable isotope tracing techniques, and computational modeling constraints. Overcoming these challenges requires interdisciplinary collaborations between experimental biologists, analytical chemists, mathematicians, computational biologists, and biochemists. Additionally, incorporating genetic manipulations, such as gene knockouts or overexpression into fluxomics studies can provide valuable insights into the regulation and control of metabolic fluxes within cells. Future advancements in fluxomics methodologies, including single-cell fluxomics and in vivo metabolic imaging, hold promise for further unraveling the complexities of cancer metabolism and translating findings into clinical applications.

Conclusion

Fluxomics represents a powerful approach for studying cancer metabolism, offering insights into the metabolic alterations driving tumorigenesis and identifying novel therapeutic targets. By integrating stable isotope tracing techniques with computational modeling, fluxomics enables the quantitative analysis of metabolic fluxes and provides a systems-level understanding of cancer metabolism. Continued advancements in fluxomics methodologies hold the potential to revolutionize our understanding of cancer biology and pave the way for personalized metabolic therapies in oncology.

References

- [1] Cairns, *Nat. Rev. Cancer*. **2011**, 11/2:85–95.
- [2] Martínez-Reyes, *Nat. Rev. Cancer*. **2021**, 21/10:669–680.
- [3] Porporato, *Cell Res*. **2018**, 28/3:265–280.
- [4] Vasan, *Cell Metab*. **2020**, 32/3:341–352.
- [5] Sainero-Alcolado, *Cell Death Differ*. **2022**, 29/7:1304–1317.
- [6] Cascante, *Essays Biochem*. **2008**, 45:67–81.
- [7] Emwas, *Front. Pharmacol*. **2022**, 13:805782.
- [8] Lagziel, *BMC Biol*. **2019**, 17/1:51.
- [9] Lee, *Nat. Commun*. **2019**, 10/1:1351.
- [10] Huang, *Nat. Commun*. **2023**, 14/1:4883.

- [11] Ahn, *Mol. Syst. Biol.* **2017**, 13/11:953.
- [12] Danzi, *Signal Transduct. Target Ther.* **2023**, 8/1:137.
- [13] Gondáš, *Gen. Physiol. Biophys.* **2021**, 40/2:127–135.
- [14] Gondáš, *Physiol. Res.* **2023**, 72/3:403–414.
- [15] Gondáš, *Neurochem. Res.* **2023**, 48/6:1728–1736.
- [16] Gondas, *Bratisl. Lek. Listy.* **2022**, 123/7:487–490.
- [17] Gondáš, *Cancers (Basel).* **2022**, 14/3:585.
- [18] Meacham, *Nature.* **2013**, 501/7467:328–337.
- [19] Dagogo-Jack, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, 15/2:81–94.
- [20] Kim, *Cell. Metab.* **2019**, 30/3:434–446.
- [21] Gentric, *Antioxid. Redox Signal.* **2017**, 26/9:462–485.
- [22] Šofranko, *Pharmaceuticals (Basel).* **2024**, 17/3:345.
- [23] Šofranko, *Metabolomics.* **2024**, 14/297.
- [24] Gondas, *Neurochemical Research.* **2024**, doi: 10.21203/rs.3.rs-3993891/v1

Protinádorové účinky *Aronia melanocarpa* L. na parametre nádorových kmeňových buniek v experimentálnom modeli karcinómu prsníka

Kapinová, A.¹, Mazuráková, A.², Lacková, L.³, Stankovianska, M.⁴, Adamkov, M.³, Kubatka, P.³

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

²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin;

³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin
andrea.kapinova@uniba.sk

Abstract

A diet rich in various bioactive plant-derived substances – phytochemicals, with a wide range of additive and/or synergistic mechanisms of action, exerts significantly beneficial effects in the prevention and/or therapy of various types of cancer, including breast carcinoma. This study aimed to evaluate the antitumor effects of phytochemicals contained in *Aronia melanocarpa* L. (aronia) on cancer stem cell markers in a chemopreventive, chemically-induced model of mammary carcinogenesis in female rats. Chemoprevention by aronia was achieved by its dietary administration in two experimental groups – in a concentration of 0.3 % and 3 %. The third group of animals, the group without chemoprevention, served as a control. Results of our study demonstrated significant anti-cancer stem cell effects of aronia in the group with its higher dose compared to the control. The anti-cancer stem cell activity of aronia was associated with a significant reduction of cancer stem cell marker CD133 expression. Well-documented antitumor activities of phytochemicals and plant-derived nutraceuticals in *in vivo* studies are an important prerequisite for well-designed clinical trials crucial to adapting breast cancer management strategies to individual patient profiles.

Keywords: *Aronia melanocarpa* L., antitumor effects, cancer stem cells, breast carcinoma, rats

Úvod

Fytosubstancie vo forme celistvých rastlinných funkčných potravín, izolovaných fytochemikálií alebo ich zmesí, sa vďaka ich prirodzenému pôvodu, preukázanej účinnosti v predklinickom výskume, relatívne nízkej cene, či bezpečnému toxikologickému profilu, považujú za potenciálne vhodnú stratégiu v chemoprevencii respektíve adjuvantnej liečbe ku konvenčnej terapii u rôznych nádorových ochorení [1 – 4]. Rakovina prsníka je v súčasnosti najčastejšie diagnostikovaným nádorovým ochorením u žien [5]. Rozsiahly epidemiologický výskum poukazuje na asociáciu medzi zníženým rizikom rakoviny prsníka a zvýšeným príjmom celistvých rastlinných potravín [6]. Experimentálne štúdie sú nevyhnutné pre posúdenie účinnosti a bezpečnosti nových chemopreventívnych a terapeutických látok. V našej experimentálnej štúdii rakoviny prsníka sme sa zamerali na analýzu mechanizmu protinádorového účinku *Aronia melanocarpa* L. (arónia) na parametre nádorových kmeňových buniek (CSCs). Arónia je bohatým zdrojom antokyanínov s preukázanými antioxidantnými, protizápalovými a rozsiahlymi protinádorovými účinkami [7 – 11]. Zavedenie použitia fytosubstancií do rutínnej onkologickej praxe si však ďalej vyžaduje

komplexný klinický výskum, ktorý musí precízne definovať ich účinky na ľudský organizmus, vrátane mechanizmu účinku, vhodného dávkovania či spôsobu podávania u onkologických pacientov.

Materiál a metódy

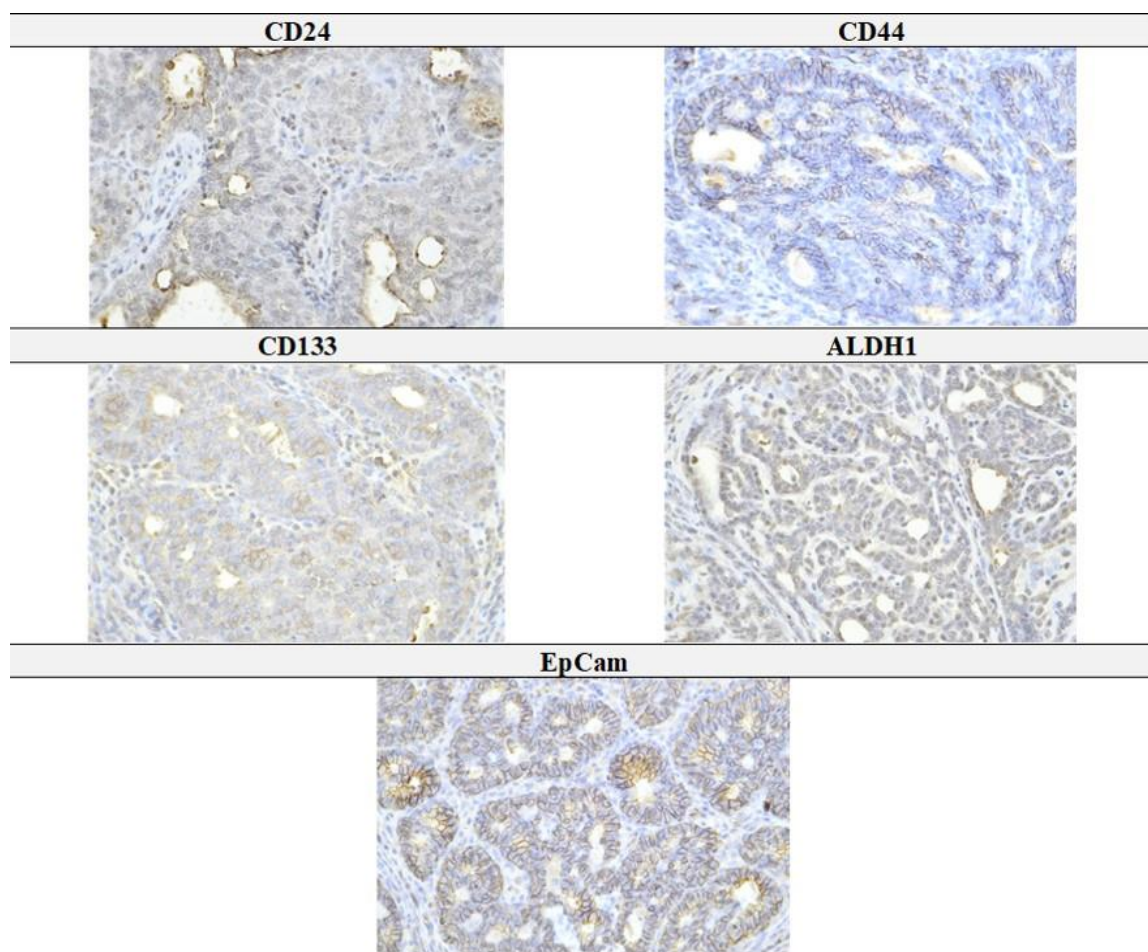
Experiment bol schválený Etickou komisiou JLF UK (EK12/2022) a ŠVPS SR (No. Ro-3239/15-221 a Ro-1640/17-221). V experimente boli použité panenské samice potkana kmeňa Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Nemecko) vo veku 5 týždňov. Mamárna karcinogenéza bola vyvolaná intraperitoneálnou aplikáciou N-metyl-N-nitrozourey (Sigma, Deisenhofen, Nemecko) v priemere na 42. postnatálny deň, a to v jednorázovej dávke 50 mg/kg hmotnosti zvieraťa. Uvedený animálny model imituje premenopauzálne obdobie u vysoko rizikových žien pre rozvoj karcinómu prsníka. Fytosubstancia bola zvieratám aplikovaná v potrave (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Nemecko) počas celej doby trvania štúdie (t.j. 15 týždňov). Zvieratá v počte 75 kusov boli rozdelené do 3 experimentálnych skupín (25 zvierat na jednu skupinu): 1. skupina – kontrolná, bez chemoprevenencie, 2. skupina – arónia podávaná v nižšej koncentrácii (0,3 %), 3. skupina – arónia podávaná vo vyššej koncentrácii (3 %). Pri definovaní dávky fytosubstancie primárne vychádzame z klinického dávkovania (nižšia dávka), avšak s prihliadnutím na potenciálne odlišnú farmakokinetiku/dynamiku fytofarmaka v nami použitom experimentálnom modeli (vyššia dávka). Presné dávkovanie fytosubstancie taktiež odráža naše mnohoročné skúsenosti v rámci predchádzajúcich štúdií, kedy sme v danom experimentálnom modeli úspešne analyzovali viaceré rastlinné potraviny s protinádorovým účinkom [12 – 18].

Na konci experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Mamárne nádory boli vypitvané a ich rozmery zaznamenané. Časť vzoriek tkaniva mamárnych nádorov bola zafixovaná v 10 %-nom roztoku pufovaného formalínu a následne technikou parafínových rezov bola pripravená na histologické a imunohistochemické vyšetrenie. Pre imunohistochemickú analýzu vybraných markerov CSCs boli vybrané najreprezentatívnejšie oblasti mamárneho nádorového tkaniva bez regresívnych zmien, zahŕňajúce v sebe typizačné charakteristiky a najväčšie zastúpenie vitálnej epitelovej zložky. Detekcia vybraných proteínov bola realizovaná nepriamou imunohistochemickou analýzou s použitím komerčne dostupných protilátok špecifických pre potkany. Imunohistochemické značenie protilátkami proti vybraným markerom CSCs (Autostainer Link 48, Hermes) bolo uskutočnené podľa odporúčaní výrobcov. Koncentrácie použité pre vybrané primárne protilátky boli nasledovné: CD24 1:200, CD44 1:200; CD133 1:150; ALDH1A1 1:500; EpCam 1:160. Primárne protilátky boli vizualizované pomocou sekundárneho detekčného systému (EnVision, Dual Link System-HRP, USA) s použitím diaminobenzidín tetrahydrochloridu ako substrátu. Reprezentatívne oblasti rezov nádorového tkaniva boli mikroskopicky analyzované a následne nasnímané pri 400-násobnom zväčšení (Olympus BX41N). Pre vyhodnotenie imunohistochemickej expresie antigénu bola použitá morfometrická analýza digitálnych záberov za využitia softvéru QuickPhoto Micro, verzie 3.1 (Promicra, Praha). ANOVA bola použitá pre štatistické vyhodnotenie získaných dát.

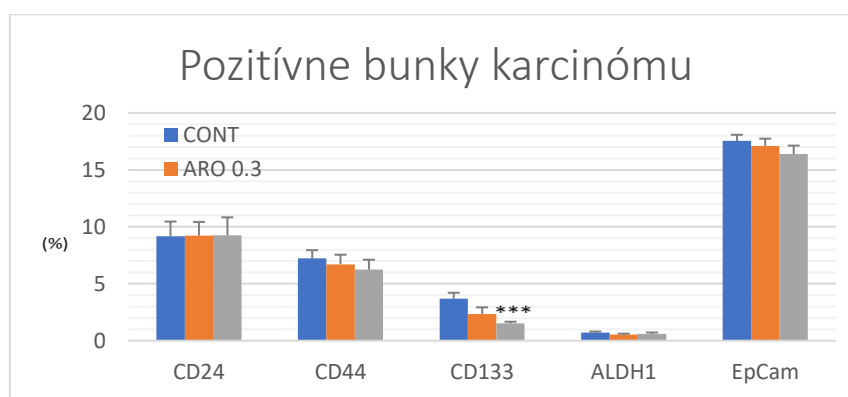
Výsledky

Arónia podávaná zvieratám vo vyššej koncentrácii signifikantne znížila expresiu markera CD133 v mamárnych nádoroch o 58,5 % ($P < 0,001$) v porovnaní s kontrolou. V prípade nižšej dávky bol pokles v expresii CD133 v porovnaní s kontrolou miernejší (36,5 %, $P = 0,10$). Pokles v expresii ďalších vybraných markerov CSCs (CD24, CD44, EpCAM, ALDH1) nebol štatisticky významný ani v jednej z liečených skupín

v porovnaní s kontrolnou skupinou, avšak zreteľná tendencia dávkovo závislého poklesu expresie bola pozorovaná u CD44, ALDH1 a EpCam (obr. 1 a 2).



Obrázok 1 Reprezentatívne zábery expresie markerov CSCs vo vzorkách tkaniva mamárnych nádorov samíc potkanov po liečbe aróniou. Pre detekciu proteínov boli použité nasledovné protilátky (všetky polyklonálne): ALDH1A1 (ThermoFisher, Rockford, IL, USA), EpCAM (Abcam, Cambridge, MA, USA), CD24 (GeneTex, Irvine, CA, USA), CD44 (Boster, Pleasanton, CA, USA), CD133 (Abcam, Cambridge, MA, USA). Konečné zväčšenie: x400



Obrázok 2 Imunoexpresia markerov CSCs vo vzorkách tkaniva mamárnych nádorov samíc potkanov po liečbe aróniou. Dáta sú vyjadrené ako priemer \pm SEM. Významný rozdiel: *** $P < 0,001$ v porovnaní s kontrolou. Graf demonštruje proteínovú expresiu kvantifikovanú ako percentuálny priemer antigén-pozitívnych oblastí v štandardnom poli (0,5655 mm²) tzv. „hotspot“ oblastí v rámci nádorového tkaniva. Minimálny počet obrázkov analyzovaných na jeden parameter predstavoval n=60

Diskusia

CSCs predstavujú subpopuláciu buniek so schopnosťou sebaobnovy a diferenciácie do rôznych typov buniek, ktoré sú významné zapojené do viacstupňového procesu karcinogenézy. Vplyv majú na proces iniciácie, promócie, či progresie nádoru, ovplyvňujú proces metastázovania, ako aj rezistenciu na protinádorovú terapiu [19]. V rámci klinickej praxe a onkologického výskumu existuje niekoľko klinicky validovaných markerov CSCs, z ktorých CD24, CD44, CD133, ALDH1 a EpCAM sa stali centrom nášho záujmu [20, 21]. V našich predchádzajúcich štúdiách, expresia viacerých z týchto markerov bola štatisticky významne ovplyvnená zmesou fytochemikálií obsiahnutých v niekoľkých rastlinných funkčných potravinách (oregáno, klinček, tymián, škorica, či sumach) [14 – 18]. V tejto štúdii arónia v závislosti od dávky signifikantne znížila expresiu markera CD133 v porovnaní s kontrolou. Inhibičný vplyv arónie na CSCs prsníka bol pozorovaný taktiež v nedávnej štúdii iných autorov [22]. Predpokladáme, že za významným protinádorovým a chemopreventívnym účinkom arónie sú aditívne a/alebo synergické účinky zmesi fytochemikálií v nej obsiahnutých, ovplyvňujúce viaceré bunkové signálne dráhy, vrátane tých, ktoré regulujú CSCs.

Záver

Analýza mechanizmu protinádorového účinku *Aronia melanocarpa* L. preukázala signifikantný účinok na parametre CSCs v nami použitom experimentálnom modeli karcinómu prsníka. Nevyhnutná je však ďalšia analýza špecifických mechanizmov zodpovedných za nami zistený anti-CSCs účinok arónie, vrátane objasnenia zodpovedajúcich bunkových signálnych dráh. Chemopreventívny prístup voči nádorovým ochoreniam, ktorý imituje naša experimentálna štúdia modelu karcinómu prsníka, spolu s multiomickou analýzou významných markerov nádorovej dynamiky je jedným z dôležitých aspektov pokročilej stratégie prediktívnej, preventívnej a personalizovanej (3P) medicíny vedúcej k individualizovanému prístupu riešenia problematiky ochorenia.

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

Literatúra

- [1] Abotaleb, *Cancers*. **2018**, 11:28.
- [2] Abotaleb, *Biomolecules*. **2020**, 10:221.
- [3] Kapinová, *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 96:1465–1477.
- [4] Kapinová, *Environ. Health Prev. Med.* **2018**, 23:36.
- [5] Sung, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. **2021**, 71:209–249.
- [6] Farvid, *Br. J. Cancer*. **2021**, 125:284–298.
- [7] Sidor and Gramza-Michałowska, *Molecules*. **2019**, 24:3710.
- [8] Liang, *Biochimie*. **2019**, 162:107–115.
- [9] Li, *Nutr. Res.* **2022**, 107:48–64.
- [10] Wei, *Chem. Biodivers.* **2020**, 17:e2000654.
- [11] Tamkutė, *Food Research International*. **2022**, 161:111803.
- [12] Kubatka, *Nutrition*. **2015**, 31:560–9.
- [13] Kubatka, *Eur. J. Nutr.* **2016**, 55:955–65.
- [14] Kubatka, *Eur. J. Nutr.* **2017a**, 56:1303–1316.
- [15] Kubatka, *J. Cell. Mol. Med.* **2017b**, 21:2837–2851.
- [16] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20:1749.
- [17] Kubatka, *Molecules*. **2020a**, 25:1399.
- [18] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2020b**, 22:183.
- [19] Crabtree and Miele, *Biomedicines*. **2018**, 6:77.
- [20] Liu, *Cancer Biomark.* **2020**, 28:293–299.
- [21] Shima, *Gland. Surg.* **2017**, 6:82–88.
- [22] Choi, *Mol. Carcinog.* **2018**, 57:1467–1479.

Protinádorová aktivita *Salvia officinalis* L. v terapeutickom animálnom modeli karcinómu prsníka

Sadloňová, V.¹, Mazuráková, A.², Lacková, L.³, Samec, M.⁴, Stankovianska, M.⁵, Adamkov, M.³, Kubatka, P.³

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav mikrobiológie a imunológie, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin; ⁵Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin
vladimira.sadlonova@uniba.sk

Abstract

This research aimed to analyse the antitumor activity of *Salvia officinalis* L. (*Lamiaceae*; *Salvia officinalis herba*) in a therapeutic 4T1 mouse model of breast carcinoma. The effects of dietary administered *S. officinalis* in two concentrations (0.1% /SAL 0.1/ and 1% /SAL 1/) were assessed. In this study, a non-significant tumor volume decrease after *S. officinalis* treatment was associated with a significant reduction in the mitotic activity index of 4T1 tumors by 37.5% (SAL 0.1) and 31.5% (SAL 1) vs. controls (set as a blank group with not applied salvia in the diet). In addition, *S. officinalis* at higher doses significantly decreased necrosis/whole tumor area ratio by 46% compared to control tumor samples. Our experimental study demonstrated the significant treatment effects of *S. officinalis* in the mouse breast carcinoma model.

Keywords: antitumor activity, breast carcinoma, mouse model, *Salvia officinalis* L.

Úvod

Šalvia - *Salvia* (S.) *officinalis* L. - šalvia lekárska je rastlina z čeľade *Lamiaceae* (hluchavkovité). Má pôvod v oblastiach Stredného východu a Stredomoria. V súčasnosti má rozšírenie takmer po celom svete. V tradičnej medicíne sa používa pri liečbe rôznych ochorení spojených so zápalom ako sú napr. reumatizmus, dna, vredy, hnačka, ale aj iných ochorení a patologických stavov ako sú tremor, paralýza, záchvaty, hyperglykémia a závraty [1].

Šalvia je zdrojom mnohých fytochemikálií prítomných v kvetoch, listoch a stonke. Ide o deriváty monoterpénov (gáfor, cineol, deriváty borneolu, thujón) a seskviterpénov (karyofylén), taníny (kyselina rozmarínová, kyselina salvianolová), diterpenoidy (deriváty karnosolu) a flavonoidy (cirsiol, deriváty luteolínu a apigenínu a fenolové glykozidy). Sú popísané mnohé jej významné účinky na organizmus ako protizápalové, antioxidačné, antimikrobiálne, hypolipidemické, hypoglykemické, ale aj antimutagénne a protinádorové [1]. Protizápalové a antioxidačné účinky šalvie sa dávajú do súvisu s jej protinádorovým pôsobením [2].

Cieľom našej experimentálnej práce bolo analyzovať protinádorovú aktivitu *S. officinalis* v terapeutickom syngénnom 4T1 modeli karcinómu prsníka použitím myší kmeňa Balb/c.

Materiál a metódy

V animálnom modeli karcinómu prsníka sme použili samice myší BALB/c (Velaz, Praha, Česká republika) vo veku 10 týždňov s hmotnosťou 17 - 19 g. Zvieratá boli

aklimatizované na kontrolované prostredie viváriá, čo predstavovalo 12-hodinový cyklus umelého svetla, teplotné rozpätie $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a rozsah relatívnej vlhkosti 40 % - 60 %. Zvieratá boli kŕmené *ad libitum* diétou Ssniff® (R-Z/M-Z s nízkym obsahom fytoestrogénov; Soest, Nemecko) a mali neobmedzený prístup k vode.

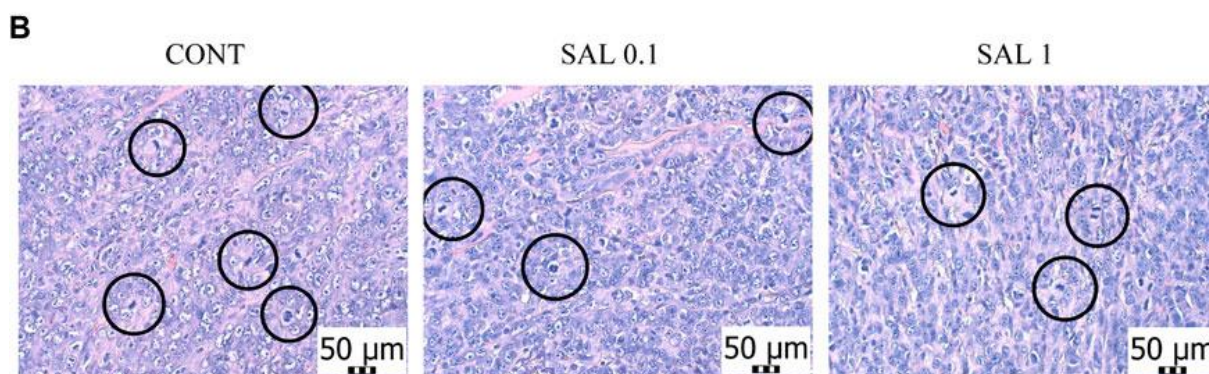
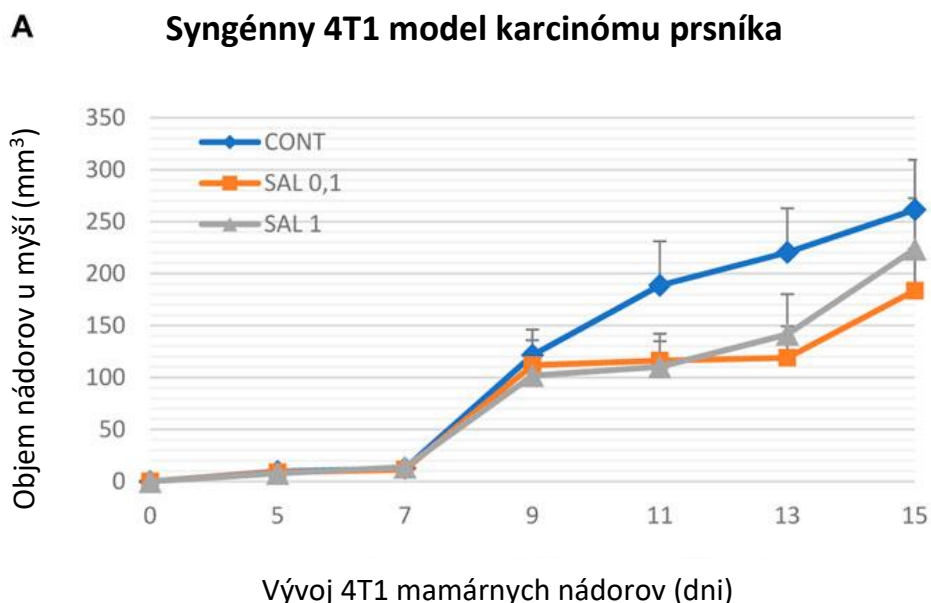
Na vyvolanie mamárnej karcinogenézy (myšieho mamárneho adenokarcinómu) sme použili 1×10^5 4T1 buniek na jedno zviera, ktoré sme aplikovali subkutánne do abdominálnej oblasti [3, 4, 5]. *S. officinalis* (Caledula, Nová Ľubovňa, Slovensko; miesto pôvodu: severovýchodné Slovensko) bola podávaná myšiam odo dňa, kedy im boli inokulované 4T1 bunky, až po dobu 15 dní. *S. officinalis* bola aplikovaná v skupine SAL 0,1 v nižšej koncentrácii t.j. 1 g/kg – 0,1% (w/w) a v skupine SAL 1 vo vyššej koncentrácii t.j. 10 g/kg – 1 % (w/w). Nižšia koncentrácia zodpovedala dávke u ľudí, ktorá je typická pre stredomorskú stravu (asi 2 g denne). Vzhľadom na možnú rozdielnú farmakokinetiku a farmakodynamiku *S. officinalis* u ľudí a zvierat – myší sme použili aj vyššiu koncentráciu *S. officinalis* v potrave. Táto vyššia dávka bola navyše aj tzv. poistnou dávkou, keďže dávkovanie *S. officinalis* v strave v modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy u hlodavcov nebolo doteraz stanovené. Šalvia bola spracovaná do potravy metódou studenej peletizácie, aby sa neznehodnotili termolabilné fytochemikálie.

Celkový počet zvierat – myší bol 78, tie sme náhodne rozdelili do troch experimentálnych skupín, a to 1. skupina – kontrolná bez liečby *S. officinalis* v potrave, 2. skupina s nižšou koncentráciou *S. officinalis* a 3. skupina s vyššou koncentráciou *S. officinalis*. Od štvrtého dňa po inokulácii 4T1 buniek myšiam sme sledovali rast nádorov (objem). Zvieratá sme palpovali a hodnotili sme prítomnosť a veľkosť každého mamárneho nádoru. Monitorovali sme aj príjem potravy a vypočítali priemerné denné dávky *S. officinalis* podávané myšiam v každej skupine. Na konci experimentu boli myši usmrtené rýchlo dekapitáciou, mamárne nádory boli excidované a zmerané [3, 4, 5]. Každá vzorka tkaniva karcinómu myší bola rutinne fixovaná vo formalíne a zaliata do parafínu.

V rámci hodnotenia sa definoval podiel nekróz po liečbe šalviou, určila sa priemerná plocha nádoru a priemerná plocha nekrózy (počet všetkých nekróz delený počtom nádorov) každého nádoru. Oblasť nádoru a rozsah nekrózy boli stanovené na histologickom preparáte. Ak mal nádor kruhový obrys, bola plocha určená ako πr^2 (r = polomer); ak nádor vykazoval charakteristiku elipsy, bola plocha určená ako $\pi \times a \times b$ (a, b = poloosi); ak nádor vykazoval charakteristiku obdĺžnika, plocha sa určila ako $a \times b$ (strany a, b obdĺžnika) a ak mal nádor tvar lichobežníka, plocha sa určila ako $(a + c) \times v/2$. Ak nádor dosiahol veľkosť jedného z vysokovýkonných polí (HPF) (napr. s objektívom 4x), plocha sa určila na základe tohto mikroskopického poľa. Na histologickom preparáte boli načrtnuté obrysy nekrózy a plocha nekrózy bola zvyčajne určená ako ich rozsah podľa veľkosti HPF, prípadne násobok plochy HPF (pri objektíve 4x = 23,76 mm², pri objektíve 10x = 3,8 mm², s objektívom 20x = 0,95 mm²). Najmenšou hodnotiteľnou nekrózou bol jej rozsah v jednom HPF (0,24 mm²; t.j. pri zväčšení 400x s priemerom zorného poľa 0,5 mm). Ak bola nekróza menšia ako HPF, bola vyhodnotená ako bodová. Mitotické skóre bolo určené počtom mitotických útvarov nájdených v 10 po sebe idúcich HPF v mitoticky najaktívnejšej časti nádoru. Počítali sa len identifikovateľné mitotické obrazce; hyperchromatické, karyoretické alebo apoptotické jadrá boli vylúčené. V zriedkavých prípadoch, keď bola celková plocha nádoru u myší menšia ako súčet 10 HPF, sa vyhodnotil počet mitóz v piatich HPF a vynásobil sa dvomi.

Výsledky

S. officinalis zreteľne, hoci nie štatisticky významne znížila objem 4T1 myších nádorov v oboch liečených skupinách v porovnaní s neliečenými zvieratami (obr. 1). Histopatologické hodnotenie nádorových buniek odhalilo významný pokles indexu mitotickej aktivity po terapii *S. officinalis* o 37,5 % (SAL 0,1) a 31,5 % (SAL 1) oproti kontrolám ($p < 0,001$) (tab. 1; obr. 1). Vyhodnotenie pomeru nekróz na plochu histopatologicky vyšetrovaného nádoru odhalilo signifikantné zníženie o 46 % ($p < 0,05$) po vyššej dávke *S. officinalis* v porovnaní s neliečenými (kontrolnými) zvieratami (tab. 1).



Obrázok 1 Syngénny 4T1 model u myší. (A) Objem 4T1 adenokarcinómov prsníka v myšom syngénnom modeli po liečbe *S. officinalis*. (B) Index mitotickej aktivity po liečbe *S. officinalis* v nádoroch 4T1 u myší Balb/c. Mitotické figúry sú zvýraznené v kruhoch; farbenie H&E; zväčšenie 400x. CONT – kontrolná skupina, SAL 0,1 – skupina s diétne aplikovanou šalviou v koncentrácii 1 g/kg v strave; SAL 1 – skupina s diétne aplikovanou šalviou v koncentrácii 10 g/kg v strave. Údaje sú uvedené ako priemer \pm SEM

Tabuľka 1 Histopatologické hodnotenie vzoriek nádorov 4T1 po terapii *S. officinalis* u myší Balb/c

Parameter	KONT	SAL 0,1	SAL 1
Pomer nekrózy na plochu nádoru	0,146 ± 0,023	0,168 ± 0,040	0,079 ± 0,015*
Index mitotickej aktivity	30,25 ± 1,62	18,90 ± 1,00***	20,70 ± 2,13***

Údaje sú uvedené ako priemer ± SEM. Signifikantný rozdiel, *p < 0,05, ***p < 0,001 vs CONT

KONT – kontrolná skupina, SAL 0,1 – skupina s diétne aplikovanou šalviou v koncentrácii 1 g/kg v strave, SAL 1 – skupina s diétne aplikovanou šalviou v koncentrácii 10 g/kg v strave

Diskusia a záver

Výsledky našej experimentálnej štúdie poukázali na protinádorovú aktivitu *S. officinalis* v 4T1 modeli karcinómu prsníka u myší. Zaznamenali sme síce štatisticky nevýznamný, avšak zreteľný pokles objemu nádorov u myší po liečbe *S. officinalis*, ktorý bol spojený so signifikantným znížením podielu nekrózy v nádoroch, ako aj s významným znížením indexu mitotickej aktivity nádorových buniek *in vivo*. V našich predchádzajúcich experimentoch, v ktorých sme použili rovnaký myší model, ako aj dávku podávaných rastlinných nutraceutík (ovocné šupky *Rhus coriaria* L., kôra *Cinnamomum zeylanicum* L. a *Thymus vulgaris* L.) sme preukázali ich významné terapeutické účinky [3, 4, 5]. Spomínané protinádorové účinky rastlinných nutraceutík boli porovnateľné alebo dokonca lepšie v porovnaní s konvenčnými syntetickými látkami (paclitaxel) analyzovanými pomocou rovnakého myšacieho modelu 4T1 karcinómu prsníka [6, 7, 8]. Potlačenie signálnych onkogénnych dráh pomocou fytochemikálií môže zlepšiť terapeutický výsledok zvýšením citlivosti rakovinových buniek alebo zvrátením rezistencie na štandardné terapeutické postupy [9]. Napriek dokázaným protinádorovým účinkom šalvie ale aj iných rastlinných potravín v našom laboratóriu pomocou terapeutického myšacieho modelu 4T1, ich potenciálne využitie v terapii humánneho karcinómu prsníka si vyžaduje ďalšie intenzívne skúmanie na predklinickej a klinickej úrovni. Model 4T1 *in vivo* má niekoľko dôležitých obmedzení, napríklad používa iba jednu nádorovú bunkovú líniu a má vysoký stupeň uniformity v experimentálnych podmienkach, ktoré nemožno dosiahnuť v klinickom prostredí. Na zabezpečenie efektívnej zdravotnej starostlivosti o pacientov s karcinómom prsníka si moderná medicína vyžaduje individuálny prístup a identifikáciu najnovších a efektívnejších terapeutických stratégií vrátane zvýšenej citlivosti rakovinových buniek na konvenčné chemoterapeutiká [10].

Rastlinné nutraceutiká vykazujú signifikantnú protinádorovú aktivitu terapeutikom animálnom modeli karcinómu prsníka. Ich aplikácia v rámci nových liečebných stratégií karcinómu prsníka si však vyžaduje pokračujúce intenzívne klinické hodnotenia.

Finančná podpora: grant VEGA 1/0045/23.

Literatúra

- [1] Ghorbani and Esmaeilizadeh, *J. Tradit. Complement. Med.* **2017**, 7:433–440.
- [2] Bonesi, *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* **2017**, 16:70–86.
- [3] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20:1749.
- [4] Kubatka, *Molecules.* **2020a**, 25:1399.
- [5] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2020b**, 22:183.
- [6] Demečková, *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 89:245–256
- [7] Solar, *Oncol. Rep.* **2017**, 37:368–378.
- [8] Grasselly, *Front. Immunol.* **2018**, 9:2100.
- [9] Liskova, *EPMA J.* **2021**, 12:155–176.
- [10] Kubatka, *Front. Pharmacol.* **2024**, 15:1216199.

Hippophae rhamnoides L. v modeli mamárnej karcinogenézy: hodnotenie mechanizmu účinku *in vivo*

Stankovianska, M.¹, Mazuráková, A.², Lacková, L.³, Kapinová A.⁴, Adamkov, M.³,
Kubatka, P.³

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Biomedical Center, Martin
stankovianska.m@gmail.com

Abstract

Comprehensive preclinical oncology research points to the significant role of phytochemicals or whole plant nutraceuticals in the modulation of signalling pathways associated with oncostatic activities. This study uses the rat breast carcinoma model to assess *Hippophae rhamnoides* L. (seaberry) 's anticancer activities. Our study aimed to analyse the effects of seaberry on selected parameters of apoptosis, proliferation, angiogenesis, and antioxidant activity in a chemopreventive, chemically-induced rat model of breast carcinogenesis. *Seaberry* (as fruit peel powder) was administered in the diet at two concentrations of 0.3% (w/w) and 3% (w/w) during the whole experiment. The chemoprevention by seaberry showed a significant reduction in the ratio of poorly and well-differentiated (high/low grade, HG/LG) carcinomas after the higher seaberry dose compared to control carcinomas without chemoprevention. Immunohistochemical evaluation of rat tumour specimens revealed significant beneficial changes after chemoprevention. Seaberry significantly increased two apoptotic parameters – cytoplasmic caspase-3 and Bax expressions vs. the control group. The treatment with seaberry decreased the expression of Bcl-2 protein, but the change reached only the boundary statistical significance. However, we revealed a significant increase in the Bax/Bcl-2 ratio in both treated groups vs controls. In addition, seaberry decreased expression of proliferation marker Ki67 and expression of angiogenesis marker VEGF compared to control tumour samples. Finally, seaberry reduced cytoplasmic levels of MDA compared to the control group. Seaberry in the chemopreventive animal model of breast carcinoma demonstrated significant oncostatic activities through the modulation of apoptosis, proliferation, angiogenesis, and oxidation.

Keywords: rat, breast carcinoma, chemoprevention, seaberry

Úvod

Epidemiologické štúdie, ako aj údaje z predklinického výskumu preukázali, že fytochemikálie z potravinových zdrojov, ako je ovocie, zelenina, liečivé rastliny a čaj, majú priaznivé účinky na organizmus a ich systematický a dlhodobý príjem (4-5-krát týždenne počas niekoľkých rokov) súvisí so zníženým rizikom karcinómu prsníka [1 – 3]. Protirakovinové vlastnosti rastlinných nutraceutík obsahujúcich široké spektrá fytochemikálií sa prejavujú tým, že pôsobia ako významné modulátory bunkovej signalizácie. Fytochemikálie vykazujú onkostatické aktivity tým, že obmedzujú iniciáciu, promóciu a progresiu malignity ovplyvnením mechanizmov, ako je bunkový cyklus, programovaná bunková smrť, neovaskularizácia, oxidácia, aktivita kmeňových buniek, metastázy, či epigenetické regulácie [4].

Rastlinné nutraceutiká vrátane drobných bobuľovín majú veľký potenciál v medicíne vďaka ich pleiotrofným účinkom na organizmus. Rakytník rašetliakový (*Hippophae rhamnoides* L.) obsahuje zmes flavonoidov, pričom najviac sú zastúpené izohamnetín, kvercetín a kempferol, a tieto tvoria hlavné farmakologické vlastnosti plodu [5]. Hypotéza tejto štúdie bola založená na poznatku, že aplikácia vhodných rastlinných nutraceutík bohatých na špecifické fytochemikálie vrátane flavonoidov s potenciálnym aditívnym alebo synergickým spôsobom účinku môže vykazovať významné protinádorové účinky [6]. Cieľom tejto štúdie bolo analyzovať protinádorové aktivity *H. rhamnoides* použitím chemopreventívneho animálneho modelu mamárnej karcinogenézy. V mechanistických analýzach sme hodnotili klinicky overené nádorové biomarkery bunkovej smrti, proliferácie, vaskularizácie, či oxidačného poškodenia.

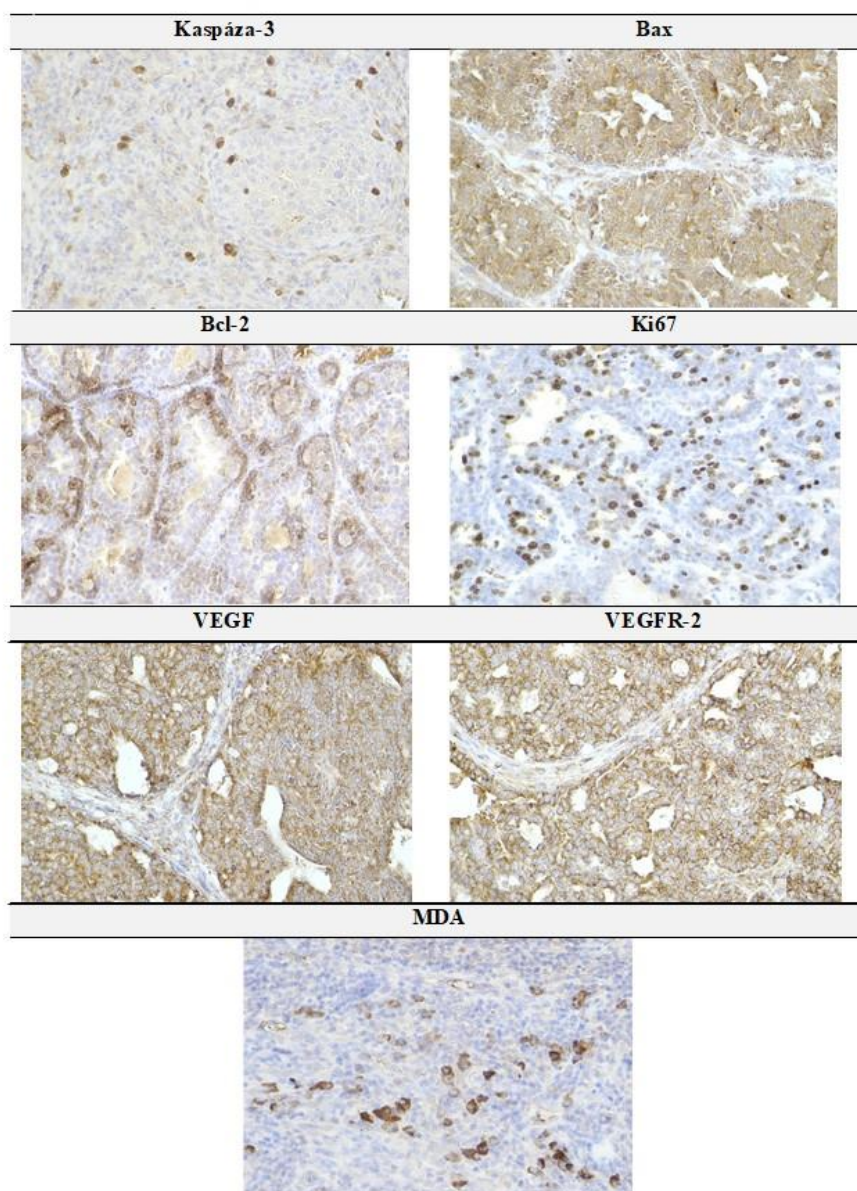
Materiál a metódy

V experimente sme použili panenské samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley (Charles River) vo veku 32-36 dní. Mamárnu karcinogenézu sme vyvolali intraperitoneálnou aplikáciou N-metyl-N-nitrozourey (Sigma, Deisenhofen, Nemecko). Fytosubstanciu (šupky plodu Rakytníka rašetliakového) sme aplikovali v potrave (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Nemecko) počas celej doby štúdie (13 týždňov). Zvieratá v počte 75 kusov boli rozdelené do 3 skupín: 1. kontrolná skupina bez chemoprevencie, 2. skupina s fytosubstanciou v nižšej koncentrácii (0.3%), 3. skupina s fytosubstanciou vo vyššej koncentrácii (3%). Pri dávkovaní rakytníka sme vychádzali z našich skúseností v predchádzajúcom období [2 – 4]. Počas pitvy boli mamárne nádory vypitvané. Časť vzoriek tkaniva mamárnych nádorov bola zafixovaná v 10 %-nom roztoku pufrovaného formalínu a následne technikou parafínových rezov pripravená na histologické a imunohistochemické vyšetrenie. Nádory boli klasifikované podľa kritérií pre klasifikáciu mamárnych nádorov potkanov [2 – 4]. Pri hodnotení protinádorového účinku rakytníka u samíc potkanov sme sa zamerali na imunohistochemické stanovenie vybraných parametrov nádorových kmeňových buniek (kaspáza-3, bax, Bcl-2, Ki67, VEGF, VEGFR2, MDA) v rámci reprezentatívnych oblastí nádorového tkaniva parafínových bločkov. Detekcia vybraných proteínov bola zrealizovaná nepriamou imunohistochemickou metódou pomocou komerčne dostupných protilátok. Vizualizácia primárnych protilátok bola uskutočnená prostredníctvom sekundárneho detekčného systému (EnVision, Dual Link System-HRP, USA) s použitím diaminobenzidín tetrahydrochloridu ako substrátu. Reprezentatívne oblasti rezov tkaniva boli nasnímané a analyzované pri 400-násobnom zväčšení (Olympus BX41N). Expresia proteínov bola kvantifikovaná ako priemerná percentuálna hodnota antigén pozitívnych oblastí v štandardných poliach (0,5655 mm²) nádorových "hot spot" oblastí. Morfometrická analýza digitálnych záberov bola uskutočnená za použitia softvéru QuickPhoto Micro, verzie 3.1 (Promicra, Praha). Antigén pozitívne oblasti boli vyhodnotené prostredníctvom fázovej analýzy so štandardnými prahovými hodnotami pre strednú a silnú intenzitu imunoreaktivity. Analyzovaných bolo minimálne 60 záberov na jeden skúmaný parameter. V štatistickom hodnotení získaných dát sme použili Mann-Whitneyho test a ANOVA. Experiment schválila Etická komisia JLF UK (EK12/2022) a ŠVPS (5056-3/2022-220).

Výsledky

Chemoprevencia rakytníkom signifikantne zlepšila prognózu mamárnych karcinómov prostredníctvom výrazného zníženia pomeru slabo a dobre diferencovaných lézií voči kontrolám. Čo sa týka analýzy mechanizmu chemopreventívneho účinku, rakytník v závislosti od dávky signifikantne zmenil dva apoptotické parametre, zvýšil expresie

cytoplazmatických proteínov kaspázu-3 a Bax. Chemoprevencia rakyníkom znížila expresiu proteínu Bcl-2, ale zmena dosiahla iba hranicu štatistickej významnosti. Súčasne sme zistili signifikantné zvýšenie pomeru Bax/Bcl-2 v oboch skupinách s chemoprevenciou voči kontrolám. Okrem toho, rakyník rašetliakový vo vyšších dávkach znížil expresiu proliferatívneho markera Ki67 a v nižších aj vyšších dávkach signifikantne znížil marker angiogenézy VEGF v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Šupky plodu rakyníka tiež znížili cytoplazmatické hladiny MDA (marker oxidácie lipidov) v závislosti od dávky v porovnaní s kontrolnou skupinou. Expresia ďalšieho parametra angiogenézy - VEGFR-2 zostala po chemoprevencii nezmenená. Reprezentatívne fotografické zábery exprese uvedených markerov apoptózy, proliferácie, angiogenézy a oxidačného poškodenia v mamárnych karcinómoch samíc potkanov sumarizuje Obrázok 1.



Obázok 1 Reprezentatívne obrázky exprese kaspázy-3, Bax, Bcl-2, Ki67, VEGFA, VEGFR-2 a MDA v tkanive karcinómu mliečnej žľazy potkana. Na detekciu boli použité: polyklonálna protilátka proti kaspáze-3 (Bioss, Woburn, USA), polyklonálne protilátky Bax a Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Paso Robles, CA, USA), monoklonálna protilátka Ki67 (Dako, Glostrup, Dánsko), monoklonálna VEGFA a VEGFR-2 (Santa Cruz Biotechnology, Paso Robles, CA, USA) a polyklonálna protilátka MDA (Abcam, Cambridge, MA, USA); zväčšenie ×400

Diskusia

Súčasnú experimentálnu štúdiu poukazujú na regulačné aktivity fytochemikálií a ich prirodzených zmesí na kľúčové mechanizmy iniciácie, promócie a progresie karcinogenézy, vrátane procesov apoptózy, proliferácie, angiogenézy alebo oxidačného poškodzovania buniek [2 – 4, 7]. V tomto smere sme hodnotili mechanizmy protinádorového účinku rakytníka v rámci chemopreventívneho modelu prostredníctvom imunohistochemických analýz vybraných markerov vyššie uvedených mechanizmov. Rakytník preukázal významnú protinádorovú aktivitu v chemopreventívnom modeli experimentálneho karcinómu prsníka prostredníctvom proapoptotických, antiangiogénnych, antiproliferatívnych a antioxidačných účinkov. Naše výsledky poukázali na aktiváciu nešpecifických signálnych dráh v rakovinových bunkách [4], ktoré boli spojené s protirakovinovou účinnosťou rakytníka v modeli *in vivo*.

Predklinicky dobre zdokumentované protirakovinové aktivity fytochemikálií a rastlinných nutraceutík sú dobrým teoretickým východiskom pre zlepšenie individuálnych výsledkov rizikových jedincov, a preto môžu byť potenciálne aplikované na primárnu (prevencia vzniku rakoviny), sekundárnu (prevencia potenciálneho metastatického šírenia) a terciárnu (prevencia kaskádových komplikácií) starostlivosť v klinickej onkologickej praxi [8]. V tomto ohľade sú precízne analýzy mechanizmu pôsobenia chemopreventív vo vzťahu ku genotypu jedinca kľúčové pre prispôbenie algoritmov manažmentu karcinómu prsníka individuálnym profilom pacientov. Rýchlo rastúci výskyt karcinómu prsníka v populácii a najmä agresívne metastatické podtypy karcinómu prsníka nachádzajúce sa v mladej ženskej populácii podnecujú lekárov k aplikácii pokročilých skríningových metód a cieľených individualizovaných a preventívnych prístupov v celkovom manažmente karcinómu prsníka [9]. Koncepty prediktívnej diagnostiky, stratifikácia pacienta, cieľená prevencia a liečba zameraná na individualizované multiomické charakteristiky pacienta predstavujú efektívne nástroje pre nákladovo efektívnu preventívnu aplikáciu rastlinných nutraceutík na optimalizáciu manažmentu karcinómu prsníka.

Finančná podpora: grant VEGA 1/0045/23.

Literatúra

- [1] Pourzand, *J. Breast Cancer*, **2016**, 19:292–300.
- [2] Kubatka, *Nutrition*. **2015**, 31:560–69.
- [3] Kubatka, *Eur. J. Nutr.* **2017**, 56:1303–16.
- [4] Kubatka, *Front. Pharmacol.* **2024**, 15:1216199.
- [5] Xia, *Phytomedicine*. **2023**, 115:154832.
- [6] Kapinova, *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 96:1465–77.
- [7] Bishayee, *Nutr. Cancer*. **2016**, 68:120–130.
- [8] Mazurakova, *EPMA J.* 2022, 13:315–34.
- [9] Polivka, *EPMA J.* **2018**, 9:1–13.

Modulačné účinky Rakytníka rašetliakového na chemické modifikácie histónov v animálnom modeli karcinómu prsníka

Stankovianska, M.¹, Mazuráková, A.², Lacková, L.³, Kapinová A.⁴, Adamkov, M.³, Kubatka, P.³

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Biomedical Center, Martin
stankovianska.m@gmail.com

Abstract

Naturally occurring mixtures of phytochemicals present in plant foods are proposed to possess tumor-suppressive effects. In this study, we aimed to evaluate the antitumor effects of *Hyppophae rhamnoides* L. in a chemically-induced mammary carcinoma model *in vivo*, focusing on the modulatory action in histone posttranslational chemical modifications. Dried seaberry peels were continuously administered at two concentrations of 0.3% and 3% in the diet. After autopsy, histopathological and immunohistochemical analyses of rodent mammary carcinomas were performed. Compared to control specimens, evaluation of epigenetic alterations in rat tumor cells *in vivo* showed a positive significant dose-dependent increase in the lysine acetylation status of H4K16 and a significant dose-dependent increase in lysine trimethylations in H4K16. On the other hand, trimethylation levels of H3K4 and H3K9 after chemoprevention were positively decreased (but non-significantly) compared to control groups. A better understanding of the global patterns in the posttranslational histone modifications with the specific consequences for the structure and activity of nuclear chromatin may uncover new molecular targets for dietary phytochemicals potentially applied in managing breast carcinoma including cancer chemoprevention.

Keywords: rat, breast carcinoma, chemoprevention, seaberry, histone chemical modifications

Úvod

Karcinóm prsníka podľa posledných dát zostáva vo svete najčastejšie diagnostikovanou rakovinou v populácii žien. Konvenčná terapia karcinómu prsníka je aj napriek vyčerpaným dostupným moderným terapeutickým postupom nedostatočná a dochádza ku vysokému výskytu recidívy, progresie a vzniku rezistencie ochorenia na terapiu. Navyše, z hľadiska nežiadúcich účinkov, konvenčná terapia je neselektívna, zameriava sa na aktívne proliferujúce bunky, čo v konečnom dôsledku vedie aj ku deštrukcii zdravých buniek. Vzhľadom na úskalia súčasnej terapie preto vzniká potreba vyvinúť nové terapeutické modalities. S týmto cieľom sa počas posledných niekoľkých desaťročí skúmajú tradične používané liečivé rastliny, ktoré obsahujú bioaktívne zlúčeniny, fytochemikálie, ktoré sú objektom záujmu pre svoje priaznivé účinky na organizmus [1]. Diétne fytochemikálie sa v súčasnosti študujú s veľkým záujmom kvôli ich schopnosti regulovať epigenóm, čo môže viesť k prevencii rakoviny. Predklinický výskum preukázal, že niektoré prírodné celistvé potraviny majú signifikantný

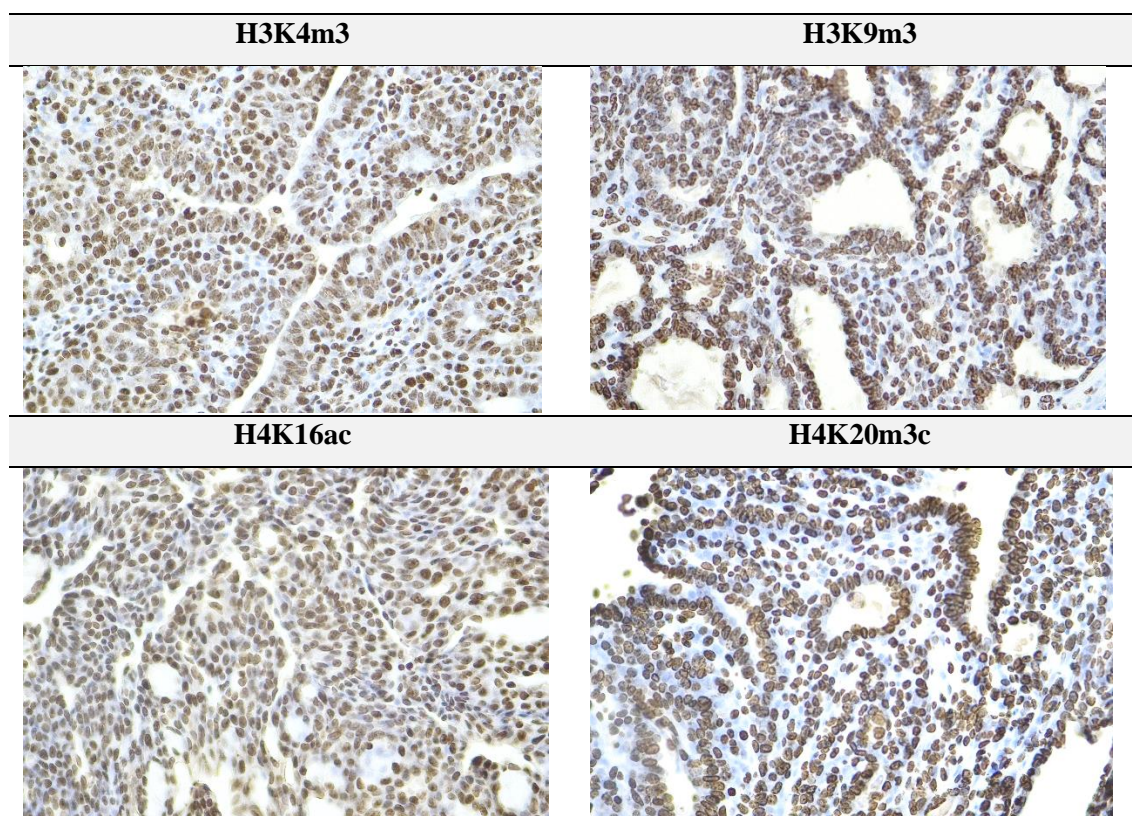
epigenetický vplyv na metylácie DNA, expresie regulačných microRNA, či na posttranslačné chemické modifikácie histónov. Inhibítory DNA metyltransferázy (DNMT) a inhibítory históndeacetylázy (HDAC) môžu modulovať epigenetický aparát reguláciou procesov metylácie DNA a acetylácie/deacetylácie histónov, čo vedie ku kontrole génovej expresie a významným účinkom na onkogénne signálne dráhy [2]. S cieľom skúmať účinok fytochemikálií na epigenetické mechanizmy sme si zvolili Rakytník rašetliakový (*Hippophae rhamnoides* L.), ktorý obsahuje karotenoidy, polyfenoly, fytosteroly a ďalšie biologicky aktívne látky [3]. Rakytník sme použili v chemopreventívnom animálnom modeli mamárnej karcinogenézy. V analýzach boli následne hodnotené štyri biomarkery posttranslačných chemických modifikácií histónov, ktoré predstavujú validované markery v onkologickom výskume.

Materiál a metódy

V experimente sme použili samice potkanov Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Nemecko) vo veku 5 týždňov. Zvieratá boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca pri teplote 23 ± 2 °C, relatívnej vlhkosti 40-60 % a umelom svetelnom režime svetlo/tma 12:12 h). Karcinogézu sme u potkanov indukovali intraperitoneálne (jednorazová dávka 50 mg/kg telesnej hmotnosti v 42. deň postnatálneho vývoja) pomocou N-nitrozo-N-methylurey (NMU, Sigma, Deisenhofen, Nemecko). Uvedený animálny model samíc potkanov imituje premenopauzálne obdobie žien s vysokým rizikom rozvoja rakoviny prsníka. Chemoprevenca rakytníkom (*Hippophae rhamnoides* L.) bola aplikovaná v diéte (Ssniff, Soest, Nemecko); začala týždeň pred podaním karcinogénu a trvala 13 týždňov. Zvieratá boli rozdelené do 3 skupín: kontrolná skupina bez aplikácie fytosubstancie (KONT), skupina s obsahom rakytníka v potrave s nižšou koncentráciou (3 g/kg) (0.3 %) a skupina s rakytníkom v potrave s vyššou koncentráciou (30 g/kg) (3 %). Posledný týždeň experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou a okamžite im bolo odobrané nádorové tkanivo, ktoré sme zafixovali formalínom a zaliali do parafínu. Pre imunohistochemickú analýzu bola vybraná najvýznamnejšia časť nádoru prsníka potkana v parafínovom bloku (ktorý zahŕňa typizačné charakteristiky a najväčšie zastúpenie vitálnej epitelovej zložky nádoru, t.j. bez regresívnych zmien, ako je rozsiahla nekróza). Detekcia vybraných markerov pre mechanistickú štúdiu sa uskutočňovala nepriamou imunohistochemickou metódou na celých parafínových rezoch s použitím komerčne dostupných protilátok špecifických pre potkany. Imunohistochemické farbenie (Autostainer Link 48 /Hermes/) bolo spracované podľa odporúčania výrobcov a koncentrácia použitá pre každú primárnu protilátku bola nasledujúca: H3K4m3 1:500, H3K9m3 1:400, H4K20m3 1:300, H4K16ac 1:200. Primárne protilátky boli vizualizované sekundárnym farbením (EnVision, Dual Link System-HRP, kat. č. K060911, Dako North America, Carpinteria, CA, USA) s použitím substrátu (diaminobenzidín tetrahydrochlorid). U negatívnych kontrol sa vynechalo farbenie primárnymi protilátkami. Vyhodnotenie imunohistochemickej expresie antigénu bolo získané morfológickou metódou. Digitálne obrázky boli pozorované mikroskopicky (Olympus BX41N, Tokio, Japonsko) pri zväčšení 400x a ich morfológická analýza bola vykonaná pomocou softvéru QuickPHOTO MICRO, verzia 3.1 (Promicra, Praha, Česká republika). Hodnoty boli porovnávané medzi liečenými (rakytník 0,3% a rakytník 3%) a neliečenými kontrolnými vzorkami nádorových tkanív samíc potkanov, pričom sa analyzovalo najmenej 60 vzoriek nádoru na jeden marker.

Výsledky

Reprezentatívne obrázky exprese posttranslačných chemických modifikácií histónov H3 a H4 v bunkách mamárneho karcinómu *in vivo* modelu potkanov po chemoprevencii rakytníkom sú znázornené na obrázku 1. Rakytník signifikantne zvýšil hladiny H4K16ac v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Rakytník vo vyšších dávkach signifikantne zvýšil hladiny H4K20m3 v porovnaní s kontrolou. Taktiež, v porovnaní s kontrolami, bol po chemoprevencii oboma dávkami rakytníka pozorovaný mierny, od dávky závislý nevýznamný pokles hladín H3K4m3 a H3K9m3.



Obrázok 1 Reprezentatívne obrázky H3K4m3, H3K9m3, H4K20m3, H4K16ac v tkanive karcinómu mliečnej žľazy potkana. Na detekciu sa použili polyklonálne protilátky H3K4m, H3K9m3 a H4K20m3 (Abcam, Cambridge, MA, USA) a monoklonálna protilátka H4K16ac (Abcam, Cambridge, MA, USA); zväčšenie: $\times 400$

Diskusia a závery

Rozsiahly onkologický výskum v poslednom desaťročí ukázal, že prospešné epigenetické zmeny možno vyvolať buď terapeuticky alebo prostredníctvom zmien v stravovacích návykoch [4]. Bioaktívne molekuly rastlinného pôvodu (fytochemikálie) sú v rámci onkologického výskumu mimoriadne zaujímavé. Množstvo fytochemikálií alebo prirodzených zmesí rastlinných sekundárnych metabolitov prítomných v celých potravinách vykazuje významné protinádorové vlastnosti prostredníctvom viacerých bunkových signálnych dráh a mechanizmov, a tak predstavuje perspektívne a potenciálne účinné nástroje chemoprevencie vrátane epigenetickej modulácie a cielenej terapie nádorových ochorení [5].

Na rozdiel od genetických (vrodených, nemodifikovateľných) komponentov karcinogenézy, epigenetické zmeny, ktoré sú obzvlášť dôležité pre rozvoj sporadických prípadov rakoviny (u karcinómu prsníka tvoria okolo 85 % všetkých prípadov) sú zreteľne spojené s rizikovými faktormi životného prostredia a životného

štýlu vrátane stravovacích návykov [6]. Tieto poznatky vedú k značnému záujmu o nutriepigenomiku, ktorá sa zameriava na vplyv dietetických faktorov na epigenetické modulácie [1, 4, 8]. Tento prístup si získal značnú pozornosť, pretože epigenetické zmeny sú reverzibilné a/alebo modifikovateľné. Rozsiahly onkologický výskum ukázal, že rastlinné prírodné molekuly môžu byť účinné pri modulácii epigenetických zmien spojených s promóciou a progresiou rakoviny, ako aj s primárnou chemopreenciou, t.j. ovplyvnením karcinogenézy v skorých štádiách počas iniciácie [7].

Modulácia enzýmov chemicky modifikujúcich históny pomocou izolovaných fytochemikálií alebo rastlinných extraktov (so zmesami fytochemikálií), ktoré sú schopné (de)aktivovať expresiu špecifických génov na normálnu úroveň a tak modulovať onkogénne signálne dráhy a následne indukovať apoptózu alebo znížiť proliferáciu, metastatické šírenie a oxidačný stres v transformovaných bunkách, predstavuje výzvu pre predklinických a klinických onkológov. Nové výskumné dáta demonštrujú vysokú variabilitu chemických posttranslačných modifikácií histónov v jednotlivých bunkách v rámci primárnej nádorovej masy, a tak odhaľujú nový rozmer heterogenity nádoru. Rozdiely medzi rakovinovými bunkami v nádorovom tkanive sú pozorované napr. na úrovni acetylácie a metylácie špecifických histónových proteínov. Epigenetická heterogenita v bunkách významne súvisí s klinickým výsledkom onkologických pacientov ale aj jedincov s rizikom rakoviny [8]. Multiomická diagnostika rakoviny, vrátane analýz epigenetických fluktuácií, progresívnych skriningových programov a individualizovaného profilovania a stratifikácie pacientov, sú požiadavky dôležité pre klinickú prax, ktorá umožňuje a uľahčuje personalizované, prediktívne a preventívne klinické pokroky u jednotlivcov (3P medicína) [9].

Komplexné klinické riešenie epigenetických biomarkerov má veľký potenciál zlepšiť celkový manažment rakoviny (vrátane karcinómu prsníka) v prospech 3P lekárskej starostlivosti a možno ich považovať za principiálny nástroj pre ich potenciálne využitie aj pri iných multifaktoriálnych ochoreniach a genetických predispozíciách. Napriek tomu, že doteraz plne nechápeme presnú povahu mechanizmov, ktorými fytochemikálie vykazujú epigenetické pôsobenie, aplikácia rastlinných prírodných látok predstavuje perspektívny klinický prístup, napríklad pri zvyšovaní citlivosti na štandardnú protinádorovú terapiu alebo aplikáciu v rámci chemoprevenencie rakoviny.

Finančná podpora: grant VEGA 1/0045/23.

Literatúra

- [1] Aumeerudy, *CA Cancer J. Clin.* **2019**, 125:1600–1611.
- [2] Sharma, *Exp. Cell Res.* **2022**, 416:113160
- [3] Wang, *Front. Nutr.* **2022**, 6:9:1036295
- [4] Önder, *Expert Rev. Proteomics.* **2015**, 12:499–517.
- [5] Kubatka, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20:1749.
- [6] Lee, *Int. J. Cancer.* **2017**, 140:581–590.
- [7] Uramova, *EPMA J.* **2018**, 9:403–419.
- [8] Kurdistani, *Br. J. Cancer.* **2007**, 97:1–5.
- [9] Fröhlich, *EPMA J.* **2018**, 9:175–186.

Vplyv liečby dexametazónom na imunohistochemické markery fibrózy v modeli pľúcnej silikózy u potkanov

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

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, BioMed, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin

daniela.mokra@uniba.sk

Abstract

Because of lack of effective therapy of lung silicosis, purpose of this pilot study was to evaluate effects of early administration of dexamethasone on immunohistochemical markers of lung fibrosis in a rat model of silicosis. The model of silicosis was induced by a single oropharyngeal instillation of silica (50 mg/ml/animal), control animals received sterile saline. The treatment with intraperitoneal (i.p.) dexamethasone initiated a next day after silica instillation and was given 2-times a week at a dose of 1 mg/kg. Animals were euthanized 14 or 28 days after the treatment onset. Immunohistochemical analysis was used for detection of smooth muscle actin and vimentin in the walls of bronchioles and pulmonary vessels. Dexamethasone treatment reduced a thickness of smooth muscle mass and decreased a count of vimentin-positive cells in the bronchiolar and vascular walls, demonstrating a therapeutic potential of early dexamethasone treatment in the lung silicosis.

Keywords: silicosis, inflammation, lung fibrosis, dexamethasone

Úvod

Inhalácia kremíkových častíc (siliky) spôsobuje vznik chronického zápalu, oxidačného poškodenia a fibrózy pľúc, tzv. pľúcnu silikózu [1]. Hoci pribúdajú poznatky o patogenetických mechanizmoch silikózy, zatiaľ neexistuje dostatočne efektívna liečba tohto ochorenia [2]. Vzhľadom na široké spektrum protizápalových účinkov kortikosteroidov [3] sme predpokladali, že včasné podanie dexametazónu by mohlo pozitívne ovplyvniť fibrotické zmeny v pľúcach experimentálnych zvierat s modelom silikózy. V príspevku prezentujeme výsledky analýzy hrúbky steny bronchiolov a pľúcnych ciev na základe prítomnosti alfa-aktínu hladkej svaloviny (α -smooth muscle actin, SMA) a počtu vimentín-pozitívnych buniek (fibroblasty, makrofágy) v tkanive pľúc a v endoteli pľúcnych ciev, a to u zvierat so silikózou, ktoré boli liečené dexametazónom v porovnaní s neliečenými zvieratami so silikózou a so zdravými kontrolami po 14 resp. 28 dňoch od podania siliky (alebo fyziologického roztoku u kontrol).

Materiál a metódy

V experimentoch sme použili samce potkanov SPF kmeňa Wistar s hmotnosťou 250-400 g. Na vyvolanie modelu pľúcnej silikózy sme použili jednorazové orotracheálne podanie siliky (50 mg/ml/zviera) v inhalačnej anestéze (Sil, n=6). Kontrolným zvieratám sme podali zodpovedajúci objem sterilného fyziologického roztoku (Kontr, n=6). Časť zvierat so silikózou sme liečili dexametazónom (2-krát týždenne, dávka 1 mg/kg i.p.; Sil+Dex, n=6). Po 14 resp. 28 dňoch od začiatku podávania liečby sme zvieratá usmrtili

letálnou dávkou 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% H₂O₂ počas 10 min. a farbili pomocou primárnej polyklonálnej protilátky proti SMA (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 priemer \pm SD. Hodnoty $p < 0,05$ 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 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 (bronchioly: $p < 0,01$, ciev: $p < 0,001$) (tab. 1, tab. 2).

Tabuľka 1 Zmena hrúbky steny bronchiolov a pľúcnych ciev (v μm) na základe farbenia pomocou protilátky proti α -SMA a počet vimentín (VIM)-pozitívnych buniek (fibroblasty, makrofágy) v pľúcnom tkanive a endoteli pľúcnych ciev – silikóza 14 dní

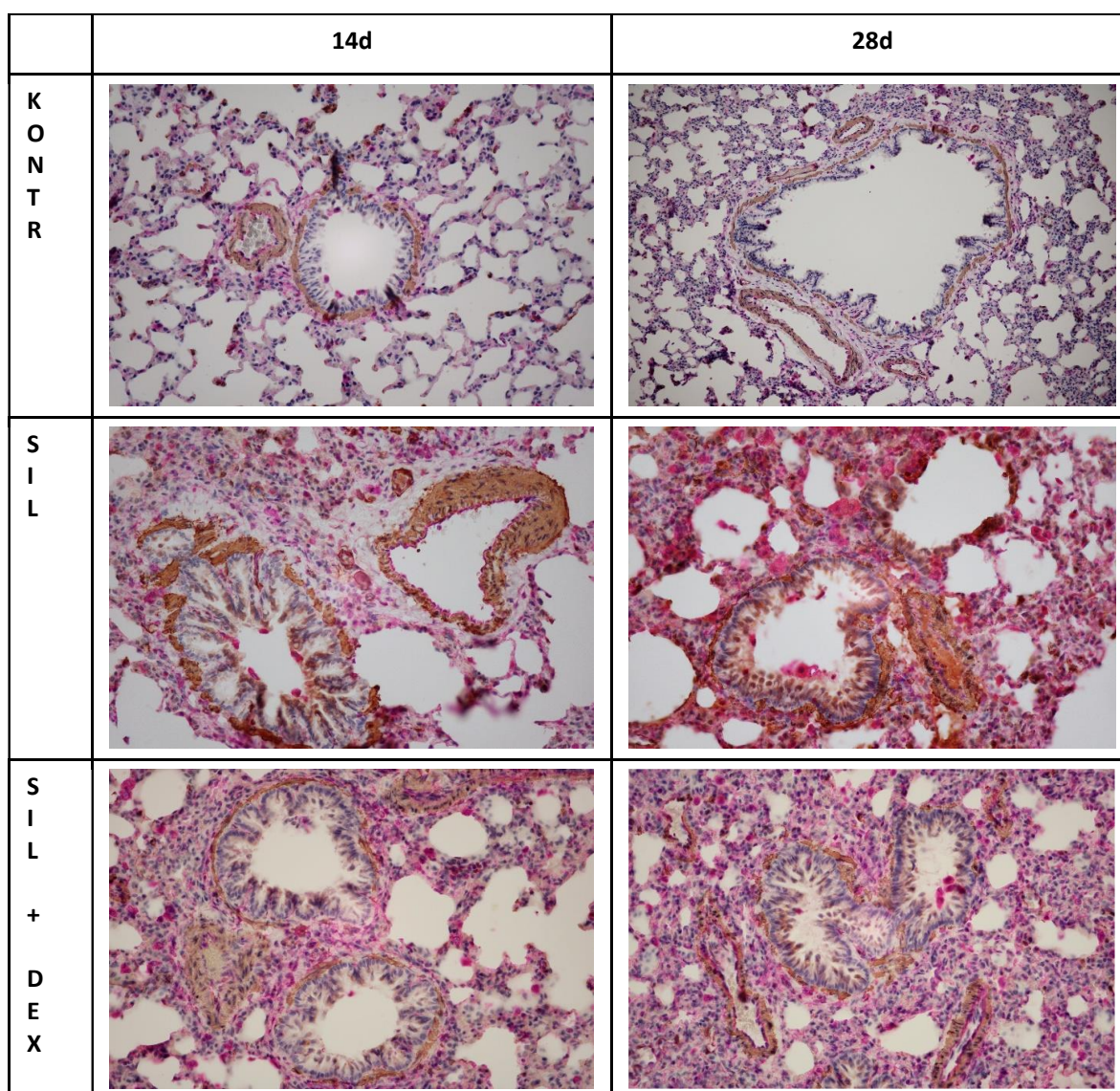
	Kontr 14d	Sil 14d	Sil+Dex 14d
SMA-bronchioly	18,2 \pm 2,9	23,8 \pm 4,9*	15,0 \pm 3,4**
SMA-ciev	17,3 \pm 4,5	26,7 \pm 7,5*	21,2 \pm 8,7
VIM-fibroblasty	74,3 \pm 29,8	156,4 \pm 18,1***	121,7 \pm 40,4
VIM-makrofágy	20,3 \pm 7,9	46,7 \pm 15,8**	26,0 \pm 17,4*
VIM-pľúca spolu	94,5 \pm 32,1	203,1 \pm 28,4***	147,7 \pm 26,3**
VIM-endotel	7,6 \pm 5,9	23,7 \pm 9,3**	9,8 \pm 3,3**

Tabuľka 2 Zmena hrúbky steny bronchiolov a pľúcnych ciev (v μm) na základe farbenia pomocou protilátky proti α -SMA a počet vimentín (VIM)-pozitívnych buniek (fibroblasty, makrofágy) v pľúcnom tkanive a endoteli pľúcnych ciev – silikóza 28 dní

	Kontr 28d	Sil 28d	Sil+Dex 28d
SMA-bronchioly	17,3 \pm 2,3	26,3 \pm 6,5**	13,3 \pm 1,2***
SMA-ciev	20,2 \pm 3,1	30,5 \pm 4,3***	16,3 \pm 2,7***
VIM-fibroblasty	99,4 \pm 23,7	159,6 \pm 15,6***	119,2 \pm 29,3**
VIM-makrofágy	23,3 \pm 11,8	61,1 \pm 18,7***	41,7 \pm 27,4
VIM-pľúca spolu	122,6 \pm 33,9	220,8 \pm 26,7***	160,8 \pm 17,3***
VIM-endotel	9,9 \pm 6,1	27,0 \pm 9,0***	14,5 \pm 3,3***

Podanie siliky zvýšilo aj počty vimentín-pozitívnych buniek v pľúcach v porovnaní s kontrolami. Signifikantné zvýšenie počtu vimentín-pozitívnych fibroblastov a makrofágov ako aj ich súčtu a tiež zvýšenie počtu vimentín-pozitívnych endotelových buniek sme zistili po 14 aj po 28 dňoch od podania siliky (všetky $p < 0,01$ alebo $p < 0,001$) (tab. 1, tab. 2).

Liečba dexametazónom znížila hrúbku hladkej svaloviny v stene bronchiolov a pľúcnych ciev, pričom tento rozdiel oproti neliečeným zvieratám bol po 14 dňoch signifikantný len v bronchoch ($p < 0,01$) a po 28 dňoch v bronchoch aj cievach (bronchioly: $p < 0,001$, cievky: $p < 0,001$). Dexametazón znížil aj počty vimentín-pozitívnych buniek v pľúcach, pričom niektoré signifikantné rozdiely bolo možné pozorovať už po 14 dňoch liečby (tab. 1, tab. 2).



Obrázok 1 Dvojité farbenie na α -SMA a vimentín - pľúca zdravých potkanov (Kontr), neliečených zvierat so silikózou (Sil) a zvierat s modelom silikózy, ktoré boli liečené dexametazónom (Sil+Dex) (ilustračný obrázok)

Diskusia

Zápalové zmeny v pľúcach, ktoré sú spôsobené prítomnosťou silikových častíc [1 – 3], vedú k zvýšenej proliferácii myofibroblastov, zmnoženiu extracelulárnej matrix,

ukladaniu depozitov kolagénu a zhrubnutiu vrstvy hladkej svaloviny bronchiolov a pľúcnych ciev [4 – 6]. Naše výsledky sú plne v súlade s výsledkami vyššie uvedených autorov. S progresiou ochorenia sa postupne zvyšovala hrúbka vrstvy hladkej svaloviny v stene bronchiolov a ciev, ako aj počty vimentín-pozitívnych buniek v pľúcach. V tejto štúdii sme použili dvojité farbenie na identifikáciu prítomnosti α -SMA a vimentínu v pľúcach (obr. 1). Prítomnosť α -SMA, markera diferenciácie myofibroblastov, sa zvyšovala už po 14 dňoch od podania siliky a tieto zmeny sa ešte zvýraznili po ďalších 14 dňoch experimentu. Podobne aj prítomnosť vláknitého proteínu vimentínu, ktorý sa nachádza v rôznych bunkách vrátane fibroblastov, endotelových buniek a imunitných buniek a ktorý zvyšuje invazivitu fibroblastov, stimuluje epitelovo-mezenchýmovej premenu a tvorbu extracelulárnej matrix, sa po podaní siliky významne zvýšila. Podanie dexametazónu zmiernilo narastanie masy hladkej svaloviny v bronchioloch a pľúcnych cievach a znížilo aj počty vimentín-pozitívnych buniek v porovnaní s neliečenými zvieratami. Naše výsledky sú v súlade s inými experimentálnymi prácami, kde podanie dexametazónu viedlo k zníženiu iných markerov fibrózy [7 – 10].

Záver

Naša pilotná štúdia ukázala, že včasné podanie dexametazónu malo výrazný antifibrotický a antiremodelačný efekt v modeli pľúcnej silikózy, čo naznačuje možné perspektívy jeho použitia v liečbe včasnej fibrózy u ľudí vystavených expozícii silike.

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

Literatúra

- [1] Barnes, *Respirology*. **2019**, 24:1165–1175.
- [2] Adamcakova and Mokra, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22:4162.
- [3] Rhen and Cidlowski, *N. Engl. J. Med.* **2005**, 353:1711–1723.
- [4] Fubini and Hubbard, *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, 34:1507–1516.
- [5] Sugimoto, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2019**, 60:232–243.
- [6] Du, *Theranostics*. **2019**, 9:1878–1892.
- [7] Dik, *Thorax*. **2003**, 58:765–771.
- [8] Van Dyke, *Agents Actions*. **1994**, 41:44–49.
- [9] Sacks, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 253:181–184.
- [10] Barbarin, *Respir. Res.* **2005**, 6:112.

Vplyv Wi-Fi žiarenia na vývoj žľaznatého žalúdka kuracích embryí

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 work was to study the effect of Wi-fi radiation at a frequency of 2.4 GHz used in modern wireless technologies on the histological structure and some morphometric parameters of the glandular stomach of chicken embryos on the 14th day of incubation using light microscopy. Chicken embryos are an important experimental animal model used in modern research for easy access, as well as easy application of radiation at an early stage. Morphometrical differences between the Wi-Fi and control groups were only negligible. In the statistical model, some of the pairwise comparisons of Wi-Fi versus control group had P-values lower than 0.05. Although the effect of Wi-Fi exposure was not that significant at light microscopy level, it caused a significant increase in collagen production and congestion of blood vessels in connective tissue of the glandular stomach wall, which may be associated with the potential health risks.

Keywords: chicken embryo, Wi-Fi, stomach, collagen

Úvod

Kuracie embryá patria medzi experimentálne zvieratá veľmi často používané v modernom výskume pre ich ľahkú dostupnosť, ako aj jednoduchú aplikáciu žiarenia v ranom štádiu vývinu. Existujú štúdie, ktoré naznačujú prepojenie medzi vystavením neionizujúcemu rádiovému elektromagnetickému žiareniu (RF EMŽ) a abnormalitami v skorých štádiách vývoja kuracích embryí [1]. Je známe, že tento typ žiarenia reaguje s biologickými systémami nielen na termálnej úrovni, ale vyvoláva zmeny aj na úrovni netermálnej [2, 3]. Podobne ako u iných vtákov aj žalúdok kurčiat sa skladá z dvoch častí: žľaznatého (proventrikulus) a svalnatého žalúdka. Proventrikulárne žľazy sa začínajú tvoriť už v počiatočných vývojových štádiách prenikaním endodermu do vrstvy mezodermu. Zhruba na 6. deň inkubácie sa objavujú prekursori tubulárnych žliaz. Približne na 9. embryonálny deň (ED) sú už luminizované a od 11.ED sa začínajú rozvetvovať [4]. Aj keď žalúdok vtákov má svoje špecifiká, základné vývojové procesy sa principiálne zhodujú s vývojom žalúdka u cicavcov. Táto štúdia bola navrhnutá tak, aby bolo možné zistiť, či Wi-Fi žiarenie (2,45 GHz), dnes tak široko používané v moderných bezdrôtových zariadeniach, môže byť environmentálnym faktorom vyvolávajúcim morfológické zmeny v stene žalúdka kuracieho embrya exponovaného mikrovlnnému žiareniu nepretržite od 1. do 14. dňa inkubácie.

Materiál a metódy

V našom experimente boli použité oplodnené vajcia Kury domácej (*Gallus gallus domesticus*) získané z certifikovaného chovu (Párovské Háje, Nitra). Vajcia boli náhodne rozdelené do dvoch skupín - kontrolnej (KO, n = 6) - bez vystavenia mikrovlnnému EMŽ a exponovanej (Wi-fi, n = 6) - vystavenej EMŽ s frekvenciou 2,45 GHz nepretržite počas prvých 14 dní inkubácie. Inkubácia vajčiek oboch skupín sa uskutočnila paralelne v dvoch automatických inkubátoroch (River system ET49 automatic) pri štandardných podmienkach (teplota 37,5° C, vlhkosť vzduchu 60 %).

Embryá odobraté na 14. deň inkubácie boli usmrtené cervikálnou dislokáciou a fixované v mDF roztoku (modified Davidson's fluid). Histologické preparáty embryí boli zhotovené štandardným postupom, zafarbené hematoxylín-eozínom (HE) a pikrosíriusovou červenou (PR) na identifikáciu kolagénu a študované svetelným mikroskopom. Následne bola vykonaná histomorfometrická analýza jednotlivých vrstiev steny žalúdka. Na fotodokumentáciu bol použitý svetelný mikroskop Zeiss Primostar s kamerou PromiCam PRO. Morfometrické údaje boli získané pomocou programu Quick Photo Industrial 3.2. Pre každú premennú bolo vykonaných 10 meraní v najmenej 3 rezoch v každej vzorke embrya. Štatistickú významnosť rozdielov medzi kontrolnou a exponovanou skupinou sme analyzovali párovým t-testom GraphPad Prism 3.0 (USA) s uvedením priemeru a smerodajnej odchýlky (Mean \pm SD). Hodnoty sme považovali za štatisticky významné pri * $p < 0,05$ a za štatisticky vysoko významné pri hodnote *** $p < 0,001$.

Výsledky

Celkový makroskopický vzhľad embryí odobratých na 14.ED bol normálny, bez evidentných rozdielov medzi kontrolnou a exponovanou skupinou. Žľaznatý žalúdok pozostával z 3 vrstiev – sliznice, svalovej vrstvy a serózy. V histologických rezoch žalúdka kuracích embryí exponovaných Wi-Fi žiarením sme pozorovali tendenciu k znižovaniu výšky epitelu a svalovej vrstvy (*tunica muscularis*) a naopak zvyšovanie hrúbky väzivovej vrstvy (*propria submucosa*) a serózy. Výsledky lineárnych meraní jednotlivých vrstiev steny proventrikula sú uvedené v tabuľke 1.

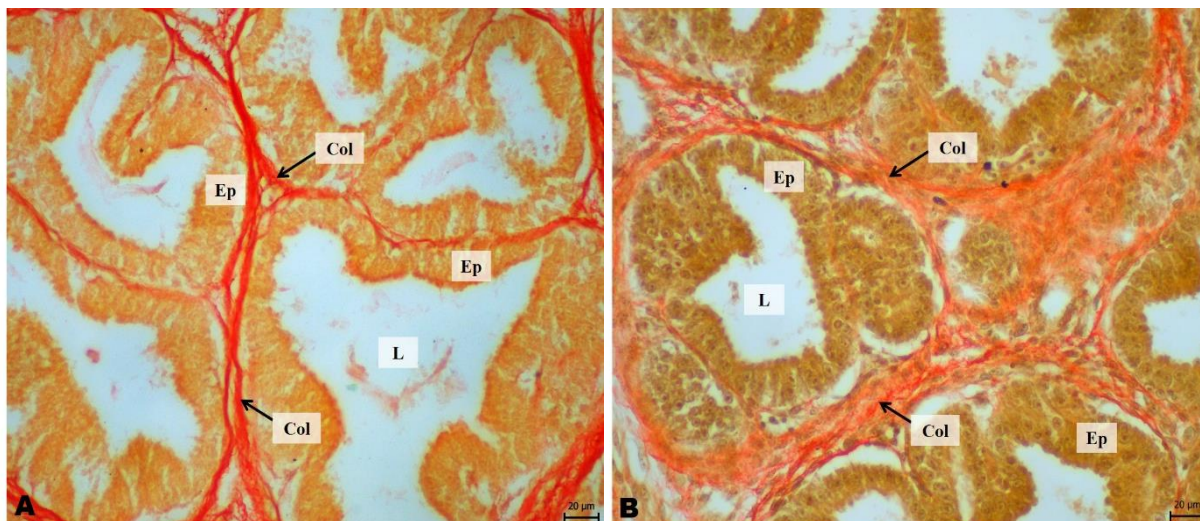
Pri histologickom vyšetrení HE rezov žalúdka sme nezistili žiadne významné štrukturálne rozdiely indukované expozíciou RF EMŽ. Sliznica žľaznatého žalúdka vytvárala riasy a bola pokrytá vrstvou sekrétu bohatého na glykozaminoglykány. V tomto vekovom štádiu epitel vystielajúci dutinu žľaznatého žalúdka a žliaz bol už z väčšej časti transformovaný na jednovrstvový kubický až cylindrický epitel, aj keď jeho bunková morfológia nebola ešte úplne pravidelná. Svalová vrstva sliznice žalúdka nebola prítomná ani v kontrolnej, ani v exponovanej skupine. Vzhľadom na jej absenciu sa submukóza nedala odlíšiť od *lamina propria mucosae*. Väzivová vrstva (*propria submucosa*) žľaznatého žalúdka v oboch skupinách obsahovala bohato rozvetvené žľazy tubulárneho charakteru. V porovnaní s kontrolnou skupinou histochemické farbenie PR odhalilo v skupine zvierat vystavených Wi-Fi zrnčenie kolagénových vlákien vo väzive obklopujúcom proventrikulárne žľazy (obr.1) a výrazné rozšírenie ciev. *Tunica muscularis* obsahovala 3 vrstvy hladkej svaloviny s rôznou orientáciou. V exponovanej skupine svalová vrstva steny žalúdka vykazovala tesnejšie usporiadanie hladkosvalových buniek.

Pri štatistickom hodnotení hrúbky jednotlivých vrstiev steny žalúdka, niektoré z párových porovnaní kontrola verzus expozícia mali P nižšie ako 0,05 (tab. 1). Rozdiely nameraných hodnôt boli vo všeobecnosti nižšie ako 15%.

Tabuľka 1 Výsledky merania vrstiev steny žľaznatého žalúdka 14- dňových embryí

typ žalúdka - žľaznatý	KO	Wifi
	Priemer \pm SD	Priemer \pm SD
epitel	23,8 \pm 7,38 μ m	18,23 \pm 3,49 μ m
propria submucosa	404 \pm 18,64 μ m	431 \pm 16,4* μ m
svalová vrstva	133,1 \pm 11,0 μ m	99,8 \pm 10,4* μ m
seróza	46,4 \pm 10,8 μ m	56,1 \pm 11,0 μ m

Štatistická významnosť rozdielov medzi kontrolnou (KO) a exponovanou skupinou (Wi-Fi): * $p < 0,05$



Obrázok 1 Žľazy žalúdka kuracieho embrya na 14. deň inkubácie (PR); zväčšenie 400 ×. A: kontrolná skupina; B: Wi-fi skupina; Ep – epitel žľazy; L – lúmen žľazy; Col – kolagén farbiaci sa na červeno

Diskusia

Vývoj orgánov je extrémne citlivý proces, ktorý môže byť ovplyvnený mnohými exogénnymi faktormi. Jedným z nich je nepochybne RF EMR [5]. Prudko rastúce využívanie moderných bezdrôtových technológií ako sú mobilné telefóny, Wi-Fi routery a ďalšie, si vyžaduje posúdenie jeho možných nepriaznivých účinkov na organizmus. Rôzne štúdie naznačujú, že okrem tepelného účinku, ktorý sa vyskytuje pri relatívne vysokých hodnotách SAR, existuje interakcia RF polí s biologickými systémami sprostredkovaná netepelným mechanizmom [6]. V našej štúdii sme inkubovali vajčka v kontrolovanom prostredí pomocou experimentálnej expozície Wi-Fi žiarením s frekvenciou 2,45 GHz oproti tienenej kontrole. Sledovali sme biologické parametre, ktoré zahŕňali morfológické abnormality embryí a následne histologickú štruktúru žľaznatého žalúdka u 14 - dňových kuracích embryí. Embryá v tomto štádiu vývoja mali stenu proventrikula zloženú z troch vrstiev: sliznice, svalovej vrstvy a serózy. Žalúdočná sliznica obsahuje žľazy a bunky vylučujúce hlien, ktorý vytvára ochrannú bariéru proti mechanickému treniu a pôsobeniu tráviacich kyselín [7]. Na 14.ED boli žľazy žalúdka v oboch skupinách bohato rozvetvené. Prehľadným farbením (HE) sme medzi kontrolnou a exponovanou skupinou 14- dňových kuracích embryí nepozorovali výrazné štrukturálne rozdiely v stene žalúdka. Avšak s použitím histochemickej metódy PR sme identifikovali rozdiel v zastúpení kolagénu medzi oboma skupinami. V kontrolnej skupine sme pozorovali relatívne malé množstvo kolagénu vo väzive a svalovej vrstve, avšak v skupine exponovaných embryí bolo množstvo kolagénu výrazne zvýšené. Mimoriadne intenzívne sa farbilo najmä v okolí žliaz a krvných ciev, ktoré boli rozšírené pravdepodobne ako následok termálneho efektu RF EMR. Podľa Paula a kol. (1992) je od 6. do 8. dňa vývoja kuracieho embrya kolagén lokalizovaný intracelulárne a od 9. dňa sa kolagénové vlákna začínajú objavovať extracelulárne v blízkosti predpokladanej *lamina propria* a vo vyvíjajúcich sa tubulárnych žľazách [8]. Nami pozorovaná zvýšená produkcia kolagénu môže súvisieť s hemodynamickými zmenami spôsobenými pravdepodobne termálnou kongesciou ciev vplyvom Wi-Fi žiarenia [9].

Záver

Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať možné biologické účinky rádiových elektromagnetických polí dnes tak široko používaných v moderných bezdrôtových technológiách v dobre kontrolovanom experimentálnom prostredí s použitím kuracieho embrya ako zvieracieho modelu. Na základe našich výsledkov získaných pozorovaním štruktúry žľaznatého žalúdka u kuracieho embrya môžeme konštatovať, že Wi-Fi žiarenie ovplyvnilo jeho vývoj aktiváciou produkcie kolagénu v jeho stene a výraznou kongesciou ciev vo väzive, čo môže byť spojené s potenciálnymi zdravotnými rizikami.

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

Literatúra

- [1] Regel, *Environ. Health Perspect.* **2006**, 114:1270–12.
- [2] French, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, 43:13–18.
- [3] Donnellan, *Cell Biol. Int.* **1997**, 21:427–439.
- [4] Bellairs, *Atlas of chick developmen.* **2005**, ISBN 0-12-084791-4
- [5] Sly and Carpenter, *Rev. Environ. Health.* **2012**, 27:151–157.
- [6] Foster, *Health Phys.* **2007**, 92/6:609–20.
- [7] Kierszenbaum, *Histology and cell biology*, Elsevier, **2008**, 445–447.
- [8] Paul, *Cell Tissue Res.* **1992**, 270:377–382.
- [9] Rennie, *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2017**, 4/4:24.

Vplyv Wi-Fi žiarenia na distribúciu glykogénu v hepatocytoch kuracieho embrya na 9. embryonálny deň

Holovská, K.¹, Andrašková, S.¹, Molnár, J.², Almášiová, V.¹

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

²Technická univerzita v Košiciach, Katedra teoretickej a priemyselnej elektrotechniky, Fakulta elektrotechniky a informatiky, Košice
katarina.holovska@uvlf.sk

Abstract

The liver is the most metabolically active organ of the developing individuals. Glycogen represents the intracellular storage form of glucose, which provides energy for different metabolic processes and undisturbed morphogenesis. The aim of our study was to observe the effect of Wi-Fi radiation on the distribution of glycogen in hepatocytes in chicken embryos at embryonic day 9. In the control group, glycogen was observed throughout the liver. In hepatocytes, glycogen granules were located on the periphery of cells (in the vascular or in the biliary poles). In the experimental group, there was an increase in the staining intensity of glycogen. It was significant in the hepatocytes located close to the large blood vessels. Unlike the control group, glycogen granules were not stained in hepatocytes located at the periphery of the liver.

Keywords: liver, chicken embryo, glycogen, non-ionizing electromagnetic radiation

Úvod

Optimálny vývoj kuracieho embrya závisí od inkubačných podmienok a od živín, ktoré sú prítomné v žltku [4]. ATP, ktorá sa uvoľňuje pri metabolizme týchto živín, slúži ako zdroj energie počas morfogénzy. Okrem toho žltok musí zabezpečiť dostatočne veľké množstvo energie, ktoré sa využije v čase liahnutia. Niekedy to môže predstavovať až 10% energie, ktorá je potrebná na celý vývoj jedinca [19]. Pre zrelý, ako aj pre vyvíjajúci sa organizmus je glukóza najdôležitejším zdrojom energie. Uskladňuje sa v hepatocytoch vo forme glykogénu [2]. Bolo zistené, že kurčatá majú vysokú hladinu glukózy v krvi, ktorá je približne dvakrát vyššia ako hladina glukózy u zdravých ľudí [12]. Táto hyperglykémia je charakteristická pre vtáky, ale u iných druhov zvierat sa nevyskytuje [18]. Mnohé štúdie poukázali na fakt, že hladina glukózy v krvi kuracích embryí sa počas inkubácie postupne zvyšuje [5, 11]. Roy a kol. [17] uvádzajú, že hladina glukózy u kuracích embryí v prvej tretine inkubačnej doby bola 100 mg/dL a pri vyliahnutí až 200 mg/dL. V závislosti od množstva glukózy v krvi sa v pečeni odbúrava glykogén a poskytuje tak energiu pre rôzne procesy [2, 4, 6]. Zaujímalo nás do akej miery môže neionizujúce elektromagnetické žiarenie (NEMŽ), ktorého zdrojom bolo Wi-Fi, ovplyvniť jeho prítomnosť v pečeni kuracích embryí na 9. embryonálny deň (ED).

Materiál a metódy

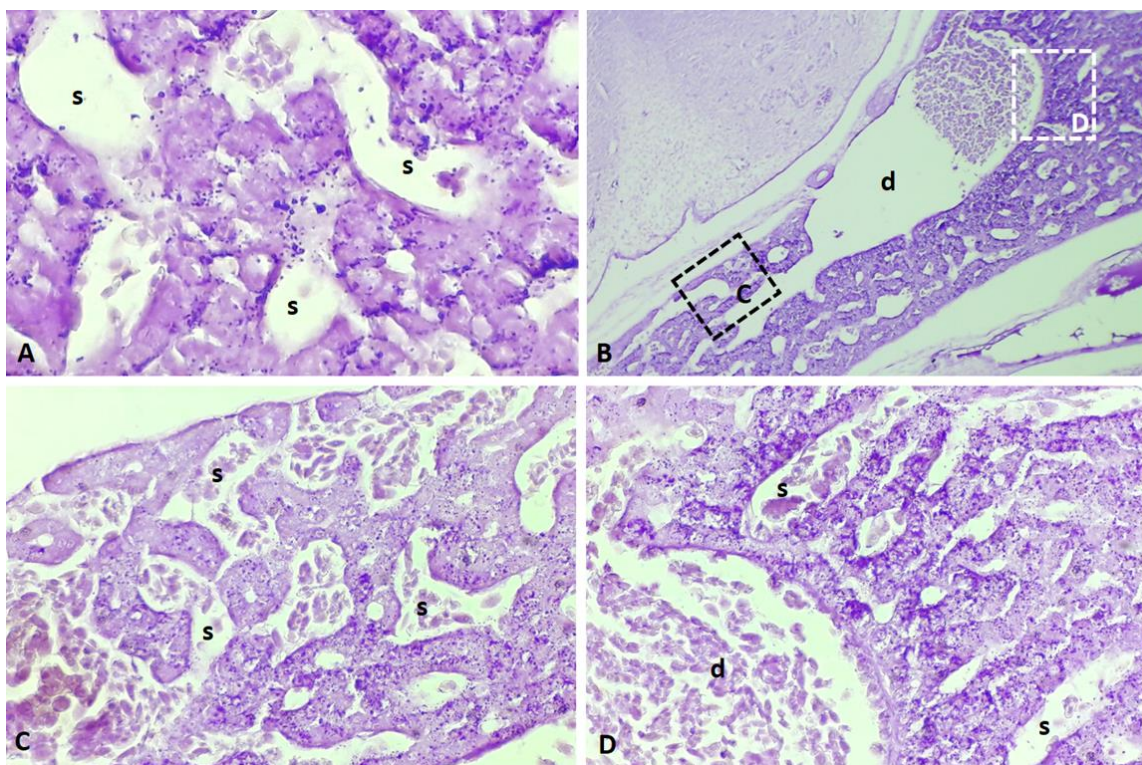
V pokuse boli použité oplodnené kuracie vajcia z certifikovaného chovu Párovské Háje (Nitra), ktoré boli náhodne rozdelené do dvoch skupín – kontrolnej (n = 6) a experimentálnej (n = 6). Vajcia boli inkubované pri štandardných inkubačných podmienkach pri teplote 37,5 °C a vlhkosti vzduchu 60 %. Experimentálna skupina bola prostredníctvom antény Mikrotik Metal 52 ac 15s od 1. ED vystavená NEMŽ s frekvenciou 2,4 GHz s priemernou silovou hustotou 300 $\mu\text{W}/\text{m}^2$ 24 h denne, po dobu 9 dní. Na 9. ED boli vzorky pečene odobrané a fixované v mDF (Modified Davidson's fluid) a zaliate do parafínu. Následne 5-10 μm rezy boli ofarbené metódami

hematoxylín-eozínom (HE), a na dôkaz glykogénu bola použitá PAS reakcia. Vzorky pečene boli následne fotodokumentované pomocou mikroskopu Olympus CX 43 (Olympus, Japonsko) a kamery Promicra (Česká republika).

Výsledky

V kontrolnej skupine boli hepatocyty usporiadané do acinov a krátkych dvojradových trámčov. Bunky boli nízke, cylindrické alebo pyramídové s okrúhlym, euchromatickým jadrom a výrazným jadriekom. V rastových zónach (periféria pečene – ventrálna časť) boli hepatocyty menšie, kubického tvaru so svetlou cytoplazmou. Medzi trámcami a acinmi sa formovali pečňové sínusoidy, ktoré boli vystlané endotelovými bunkami. Sínusoidy na periférii pečene mali široký a nepravidelný lúmen, zatiaľ čo sínusoidy v centrálnej časti orgánu mali užší lúmen. Glykogén sa vyskytoval v celom parenchýme pečene. Granuly glykogénu boli pomerne veľké a vyskytovali sa na vaskulárnom, ako aj na žľčovom póle buniek. Centrálna časť hepatocytov bola bez granúl glykogénu (obr. 1A).

V experimentálnej skupine sme nepozorovali žiadne výrazne morfológické zmeny v štruktúre pečene. Avšak na niektorých miestach došlo k dilatácii žľcových kapilár. Distribúcia glykogénu v pečeni sa taktiež zmenila. Granuly glykogénu sme nepozorovali v hepatocytoch na periférii orgánu (obr. 1B, C), zatiaľ čo v blízkosti veľkých ciev bola cytoplazma hepatocytov výrazne PAS pozitívna (obr. 1D). Granuly glykogénu sa vyskytovali v celej cytoplazme buniek, ale boli menšie ako v kontrolnej skupine.



Obrazok 1 Pečeň kuracieho embrya na 9. ED. A: kontrolná skupina. B: experimentálna skupina. C: experimentálna skupina - detail. D: experimentálna skupina - detail. d – *ductus venosus*, s – sínusoidy. (PAS reakcia) Zväčšenie (A - 400 ×; B - 40 ×; C, D - 200 ×)

Diskusia

Vtáacie embryá sú počas celého svojho vývoja vyživované látkami zo žltka, ktoré slúžia na tvorbu zlúčenín s vysokou energetickou hodnotou, ako je glykogén [6, 7, 14]. Glykogén je hlavnou zásobnou formou glukózy v tkanivách a orgánoch, pričom jeho množstvo závisí od doby inkubácie. Allen a kol. [1] sledovali obsah glykogénu v tele vyvíjajúceho sa kuracieho embrya. Autori pozorovali, že glykogén bol neustále prítomný v žltkovom vaku a to od najskorších štádií vývoja (v štádiu 6 somitov), až po vyliahnutie kurčiat. U pätnásť a dvadsaťštyri hodinových embryí sa glykogén našiel v ektoderme v oblasti formujúcej sa hlavy, a to ako vo vyvíjajúcom sa nervovom systéme, tak aj v ektoderme pod záhybom hlavy. Len čo sa začalo vyvíjať srdce, súčasne s tým sa v danej oblasti objavil glykogén. Neskôr bol glykogén pozorovaný v endoderme vyvíjajúceho sa čreva (hojnejší v oblasti zadného čreva, ako v oblasti predného čreva). Na 6. ED sa glykogén vyskytoval v svalovom tkanive okolo očí, kde jeho množstvo postupne rástlo. Na 7. ED a 8. ED bol pozorovaný v tkanive pod jazykom, vo vyvíjajúcom sa chrupkovom modeli lebkovej kosti a v svalovom tkanive po stranách tela. Na 10. ED sa vyskytoval už takmer v celom tele kuracieho embrya [1]. Dalton a kol. [3] sledovali množstvo glykogénu v kuracích embryách na 7. ED. Pomocou farbenia Bestov karmín ho identifikovali v hepatocytoch. Toto zistenie bolo následne potvrdené pozorovaním Lee [9], ktorý zistil prítomnosť glykogénu v pečeni kuracieho embrya, medzi 7. ED a 8. ED, ešte pred tvorbou inzulínu v Langerhansových ostrovcích [15, 16]. Dayan a kol. [4] vo svojej štúdii sledovali výskyt glykogénu v prsnom svale, v pečeni a v tkanive žltkového vaku. Maximálne hodnoty glykogénu v týchto orgánoch boli zistené na 17. ED až 19. ED, po čom nasledoval jeho prudký pokles. Táto štúdia súčasne poukázala na úlohu žltkového vaku (nielen pečene), ako dôležitého zdroja glykogénu počas vývoja kuracieho embrya.

Cieľom našej práce bolo sledovať prítomnosť glykogénu v pečeni na 9. ED a jeho prípadné zmeny v distribúcii vplyvom NEMŽ, ktorého zdrojom bolo WiFi. WiFi predstavuje umelé, neionizujúce elektromagnetické žiarenie. V súčasnej dobe s intenzívnym rozvojom bezdrôtových technológií, sú živé organizmy neustále vystavené jeho vplyvu. Účinok NEMŽ bol sledovaný na rôznych tkanivách a orgánoch u rôznych zvieracích modeloch [8, 10]. Napriek tomu chýbajú informácie o jeho vplyve na metabolizmus sacharidov. Z našich pozorovaní vyplýva, že NEMŽ spôsobilo zmeny v intenzite farbenia a v distribúcii glykogénu v pečeni. Kým v kontrolnej skupine bol glykogén pozorovaný hlavne na periférii hepatocytov (na vaskulárnom, alebo na žlčovom póle), v experimentálnej skupine boli granuly lokalizované v celej cytoplazme bunky. Najintenzívnejšie sa glykogén farbíl v okolí veľkých ciev, kým na periférii pečene sme granuly glykogénu nepozorovali. Predpokladáme, že nami pozorované zmeny v množstve a distribúcii glykogénu súvisia s adaptáciou buniek na žiarenie. Vychádzame z pozorovaní iných autorov, ktorí sledovali nádorové bunky a ich rezistenciu voči žiareniu. Matthews a kol. [13] pozorovali v nádorových bunkách pľúc a mliečnej žľazy akumuláciu glykogénu, čo bolo súčasne spojené s zvýšenou odolnosťou voči žiareniu. Akonáhle vplyvom liečiv došlo k zníženiu množstva glykogénu v bunkách, zvýšila sa aj ich citlivosť na radiáciu. Z toho dôvodu predpokladáme, že nami pozorované zvýšenie intenzity farbenie hepatocytov na glykogén môže súvisieť s obrannými mechanizmami, ktoré majú chrániť hepatocyty voči účinku NEMŽ.

Záver

Naše pozorovania predstavujú prvotné informácie, ktoré poukazujú na zmeny v distribúcii glykogénu v pečeni u kuracích embryí vplyvom NEMŽ ako je WiFi. Dané žiarenie s frekvenciou 2,4 GHz nespôsobilo výrazné morfológické zmeny v štruktúre pečene. Avšak pomocou PAS metódy sme identifikovali zmeny v intenzite farbenia a v distribúcii glykogénu v hepatocytoch. Nami pozorované zmeny neboli síce výrazné, ale upozorňujú na možné riziko, ktoré je spojené s každodenným a neustálym vystavením organizmu vplyvu NEMŽ.

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

Literatúra

- [1] Allen, *Biological Bulletin*. **1919**, 36/1:63–70.
- [2] Bayçumendur and Ergün, *Kocatepe Veterinary Journal*. **2022**, 15/1:15–28.
- [3] Dalton, *Anatomical Record*. **1937**, 68:393–405.
- [4] Dayan, *Frontiers in Physiology*. **2023**, 14:1–10.
- [5] Evans and Scholz, *Journal of Nutrition*. **1973**, 103:242–250.
- [6] Christensen, *Poultry Science*. **1999**, 78/6:890–898.
- [7] Christensen, *Poultry Science*. **2001**, 80/12:1729–1735.
- [8] Kashani, *Open Medicine*. **2023**, 18/1:1–24.
- [9] Lee, *Anatomical Record*. **1951**, 110:465–74.
- [10] Li, *Scientific Reports*. **2017**, 7:1–8.
- [11] Lu, *Poultry Science*. **2007**, 86:673–683.
- [12] Martinez and Gutiérrez-Guerrero, *Journal of Molecular Evolution*. **2020**, 88:715–719.
- [13] Matthews, *PLoS One*. **2015**, 10/8:1–15.
- [14] Moran, *Poultry Science*. **2007**, 86/5:1043–1049.
- [15] O'Connor, *Nature*. **1953**, 172/4380:678–689.
- [16] Potvin and Aron, *C.R. Soc. Biol, Paris*. **1927**, 96:267–269.
- [17] Roy, *Journal of Poultry Science*. **2013**, 50:381–387.
- [18] Shibata, *Journal of Poultry Science*. **2023**, 60/2:1–14.
- [19] Vleck and Bucher, *Oxford University Press. New York*, **1998**, 89–116.

Quail chorioallantoic membrane as an *in vivo* model for biomaterial testing

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

¹University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Department of Biology and Physiology, Košice; ²University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Department of Morphology Disciplines, Košice
zuzana.tirpakova@student.uvlf.sk

Abstract

Chorioallantoic membrane (CAM) of chicken embryo is a highly vascularized extra-embryonic structure. Due to Directive of European Union (2010/63/EU) limiting the use of animals in research, CAM has been applied in biomaterial testing as a cost-effective, easily accessible *in vivo* alternative model. Although CAM of chicken embryo is primarily used in research, quail model offers advantages such as shorter generation interval, shorter embryonic development, higher experimental turnover, and use of quail specific endothelial marker. In the presented study, we tested angiogenic potential of acellular polyhydroxybutyrate and chitosan (PHB/CHIT) based biomaterial to evaluate the capacity of *ex ovo* quail CAM model. PHB/CHIT was used alone or previously soaked in vascular endothelial growth factor (VEGF-A), saline solution (PHY) or in endogenous angiogenesis inhibitor Angiostatin. Biomaterial was placed on CAM on embryonic day (ED) 6. The samples were analyzed by RT-qPCR, targeting pro-angiogenic factors VEGF-A, angiopoietin 2 (ANG2) and VE-Cadherin. The results showed elevated gene expression of VEGF-A, ANG-2 and VE-Cadherin in dry PHB/CHIT scaffold. We explored the possibilities and expanded the methodology for biomaterial testing on quail CAM model in *ex ovo* conditions suggesting a comparable potential to chicken CAM model.

Keywords: chorioallantoic membrane, quail embryo, alternative methods

Úvod

Chorioalantoická membrána (CAM) vtáčieho embrya je vysoko vaskularizovaná extra-embryonická štruktúra, ktorá slúži ako respiračný a vylučovací orgán počas embryonálneho vývinu [1]. CAM zároveň predstavuje *in vivo* platformu na testovanie biomateriálov, liečiv, cytotoxicity, angiogénneho potenciálu; svoje využitie nachádza aj v rakovinovom výskume [2]. Imunitný systém embrya sa vyvíja až v neskorších štádiách embryonálneho vývinu, vďaka čomu na CAM možno aplikovať aj bunky a tkanivá iných animálnych druhov [3]. Zaradenie CAM ako experimentálneho modelu je zároveň v súlade s 3R princípmi určenými legislatívou Európskej únie (2010/63/EU) o redukovaní zvierat využívaných vo vede [4, 5]. V súčasnosti sa na testovanie v rámci CAM modelu využíva predovšetkým kuracie embryo [6]. Predstavovaný výskum sa zameriava na využitie CAM prepeličieho embrya na testovanie biomateriálov ako novej alternatívy ku kuraciemu embryu. Testovaný biomateriál bol vyvinutý kombináciou polyhydroxybutyrátu (PHB) a chitosanu (CHIT) za účelom regenerácie kosti a chrupky [7]. Aplikácia PHB/CHIT na povrch CAM prebehla na 6. deň embryonálneho vývinu (ED6). Vzorky boli zozbierané 5 dní po implantácii biomateriálu. Hodnotenie zmien exprese génov spojených s angiogenezou boli pozorované prostredníctvom RT-qPCR.

Materiál a metódy

Oplodnené vajčká prepelice japonskej (*Coturnix coturnix japonica*, $n = 158$) z prepeličej farmy (Mala Ida, Košice, Slovensko) boli inkubované horizontálne pri $38,2 \pm 0,5^\circ\text{C}$ a 58% relatívnej vlhkosti (RH) po dobu 56h. Následne boli očistené 70% etanolom a vyklopením presunuté do 6-jamkovej kultivačnej platničky. Embryá boli ďalej kultivované v rovnakých podmienkach ($38,2 \pm 0,5^\circ\text{C}$, 60% RH). Biomateriál bol na CAM implantovaný na ED6. Testovaný biomateriál predstavoval vysokoporézny kompozit polyhydroxybutyrátu a chitosanu pripravený vedeckou skupinou Medvecky et al. [7]. Biomateriál bol aplikovaný suchý alebo vopred nasiaknutý fyziologickým roztokom ($n = 40$; PHB/CHIT+PHY; Sodium Chloride 0.9%) alebo roztokom VEGF-A ($n = 40$; PHB/CHIT+VEGF-A; 25 ng/mL riedené v roztoku PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Vzorky boli zozbierané na ED11 a to vystrihnutím biomateriálu z CAM. Zo vzoriek bola následne extrahovaná celková RNA prostredníctvom QIAshredder a Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Čistota RNA bola hodnotená prostredníctvom NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). V procese sme aplikovali dvojkrokový RT-qPCR prístup, v prvom kroku prebehla syntéza komplementárnej DNA (cDNA) a to využitím High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems™, Waltham, MA, USA). Na prípravu 20 μL cDNA bol použitý 1 μg celkovej RNA. V druhom kroku prebehla kvantifikácia génov z cDNA za využitia primerov pre *VE-Cadherin* (CDH5), *Angiopoietin 2* (ANGT2), *vaskulárny endotelový rastový faktor A* (VEGFA), *a receptor 2 vaskulárneho endotelového rastového faktorova* (VEGFR2). V PCR zmesi bol využitý SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, Waltham, MA, USA) spolu so špecifickými primermi (300 nM) a vodou neobsahujúcou nukleázu. Priebeh PCR reakcie pozostával z počiatočného denaturačného kroku (10 min; 95°C) a 40 cyklov denaturačného kroku (15 sekúnd; 95°C) spolu s anealingom (1 min; 60°C). Absencia nešpecifických amplifikácií bola kontrolovaná analýzou disociačnej krivky. Údaje monitorujúce génovú expresiu boli získané metódou $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ a normalizované k endogénnej kontrole GAPDH. Úroveň exprese bola ďalej vyjadrená ako násobok zmeny voči kontrole, t. j. čistému biomateriálu.

Výsledky

PCR analýza preukázala signifikantné zníženie exprese VEGFA, VEGFR2 a CDH5 vo vzorkách PHB/CHIT+PHY ($p < 0.001$). Expresia ANGT2 bola v porovnaní s čistým kontrolným biomateriálom pomerne stabilná. Kombinácia PHB/CHIT+VEGF-A preukázala signifikantnú up-reguláciu všetkých sledovaných génov (VEGFA, VEGFR2, ANGT2 a CDH5, $p < 0.001$).

Diskusia

Inovativnosť tejto štúdie je založená na rozšírení metód analýzy angiogeného potenciálu a testovania biomateriálov na CAM modely prepeličieho embrya. Prepeličie embryo oproti kuraciemu embryu ponúka niekoľko výhod, ako je kratší embryonálny vývoj (16 dní u prepeličieho embrya; 21 dní u kuracieho embrya), kratší generačný interval, menšiu veľkosť embrya, ktorá v ex ovo podmienkach umožňuje kultiváciu v 6-jamkových kultivačných platniach a teda, vyšší experimentálny obrat [6]. Nasiaknutie biomateriálu roztokom obsahujúcim VEGF-A vyústilo do zvýšenej exprese VEGF-A a VEGFR-2, ktoré sú spojené s podporou angiogénnych procesov [8]. Naopak, prítomnosť fyziologického roztoku signifikantne znížila expresiu VEGF-A a VEGFR-2. Potenciálnym vysvetlením je možné viazanie soľných iónov s PHB/CHIT biomateriálom a vznik hypotonického prostredia, ktorý môže ovplyvniť produkciu

VEGF [9]. Zároveň bola vo vzorkách PHB/CHIT+PHY pozorovaná signifikantná upregulácia ANG-2, čo však zdôvodňujeme premenlivou úlohou ANG-2, ktorá reaguje na kontext prebiehajúcej angiogenézy [10].

Záver

V našej štúdii sme sa sústredili na implementáciu *ex ovo* prepeličieho embrya ako potenciálneho *in vivo* modelu pre testovanie interakcií biomateriálu s prítomnou vaskulatúrou, biokompatibilitou a biomateriálov na účely regeneračnej medicíny. RT-qPCR analýzou zmien v expresii génov súvisiacich s angiogenézou sme sa zameriavali na rozšírenie metodík vhodných na identifikáciu angiogenného potenciálu biomateriálu.

Práca bola podporená projektom APVV-20-0073, VEGA 1/0074/24 a KEGA 004UVLF-4/2023.

Literatúra

- [1] Ribatti, *Reproductive Toxicology*. **2017**, 70:97–101.
- [2] Palumbo, *Biology (Basel)*. **2023**, 12.
- [3] Harper, *Cancers (Basel)*. **2021**, 13.
- [4] Sarogni, *iScience*. **2022**, 25:103980.
- [5] Oliinyk, *Cells*. **2023**, 12:592.
- [6] Kundeková, *Biology (Basel)*. **2021**, 10:301.
- [7] Medvecky, *J Mater Sci Mater Med*. **2014**, 25:777–789.
- [8] Abhinand, *J Cell Commun Signal*. **2016**, 10:347–354.
- [9] Gentile, *PLoS One*. **2011**, 6:e25193.
- [10] Akwii, *Cells*. **2019**, 8.

Angiogénny potenciál pórovitého biomateriálu hodnotený pomocou ex-ovo modelu vtácej chorioalantoickej membrány

Demčišáková, Z.¹, Tirpáková, Z.², Luptáková, L.², Medvecký, L.^{1,3}, Petrovová, E.¹

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

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

³Slovenská akadémia vied, Ústav materiálového výskumu, Košice

zuzana.demcisakova@gmail.com

Abstract

The use of the chorioallantoic membrane (CAM) model has become an integral part of the biocompatibility testing process in the development of innovative materials for regenerative strategies and tissue engineering applications. In the present study, we used the ex-ovo quail CAM model to evaluate the angiogenic potential of an acellular material based on polyhydroxybutyrate and chitosan (PHB/CHIT) intended for clinical use in the field of hard tissue defects regeneration, depending on the addition of vascular endothelial growth factor (VEGF-A), physiological solution (PHY) and an endogenous angiogenesis inhibitor (angiostatin). On the 6th day of embryonic development (ED), the tested PHB/CHIT was implanted on the CAM alone or with the addition of VEGF-A, PHY and angiostatin. The presence of blood vessels in the pores of the implant and in the surrounding CAM tissue was analysed 72 hours after implantation of the material (ED9). Morphological analysis of *in vivo* angiogenic activity of PHB/CHIT confirmed its angiogenic potential without the need to stimulate angiogenesis by adding the pro-angiogenic factor VEGF-A. The lowest angiogenic potential was observed in the material after the addition of angiostatin. We concluded that PHB/CHIT has a strong endogenous angiogenic potential and could be a promising material in the treatment of hard tissue defects.

Keywords: angiogenesis, biocompatibility, chorioallantoic membrane, quail embryo

Úvod

Chorioalantoická membrána (CAM) je vysoko vaskularizovaná extraembryonálna membrána, ktorá vzniká fúziou mezodermálnych vrstiev chorionu a alantoisu na štvrtý deň embryonálneho vývinu vtáčieho embrya (ED4) [1]. Predstavuje primárny respiračný a exkretory orgán vtáčieho embrya, ktorý v priebehu embryonálneho vývinu zabezpečuje viacero funkcií: podieľa sa na transporte sodíka a chloridu z alantoisu, transportom vápnika z vaječnej škrupiny do embryonálnej vaskulatúry má podiel na mineralizácii kostí, udržiava acidobázickú rovnováhu, formuje stenu alantoisového vaku, a podieľa sa na spätnej reabsorpcii vody a iónov z alantoisu [2]. CAM reprezentuje alternatívny animálny modelový systém, ktorý predstavuje medzistupeň medzi jednoduchým *in vitro* modelom a komplexným systémom *in vivo*, ktorého použitie na experimentálne účely je v súlade s princípmi 3R [3]. Uplatnenie nachádza najmä v oblasti bioinžinierstva, v štúdiu tkanivových transplantátov, nádorovej biológie a genomiky. V posledných rokoch sa štúdium CAM vtáčieho embrya stalo populárnym v rámci experimentálnych štúdií v oblasti tkanivového inžinierstva, ktoré sú orientované najmä na využitie jej potenciálu pre štúdium biokompatibility materiálov [4]. V rámci štúdie sme hodnotili angiogénnu odpoveď CAM prepeličieho embrya po implantovaní acelulárneho materiálu pripraveného na báze polyhydroxybutyrátu a chitosanu, vyvíjaného a syntetizovaného za účelom klinického použitia v oblasti regenerácie tvrdých tkanív, ako nevyhnutného predpokladu stanovenia biologickej kompatibility.

Materiál a metódy

Polyhydroxybutyrát-chitosanový kompozit (PHB/CHIT) bol pripravený podľa metódy Medvecký a kol. [5]. Na posúdenie biokompatibility a angiogénneho potenciálu testovaného materiálu na CAM sme použili modifikovanú metódu podľa Ribatti a kol. [6]. Oplodnené vajcia prepelice japonskej (*Coturnix coturnix japonica*, $n = 158$) boli získané a transportované z farmy Malá Ida (Košice, Slovensko). Za štandardných inkubačných podmienok ($38,2 \pm 0,5$ °C, 58 % relatívna vlhkosť) boli umiestnené do liahne s núteným obehom a konštantnou vlhkosťou vzduchu. Po 56. hodinách od začiatku inkubácie boli vajcia z liahne vybrané, otvorené a embryá vyklopené do sterilných 6-jamkových kultivačných platní (TPP, Švajčiarsko) technikou. Vyklopené prepeličie embryá sme následne vrátili späť do liahne, kde boli inkubované za konštantných inkubačných podmienok ($38,2 \pm 0,5$ °C, 60 % relatívna vlhkosť) až do dňa implantácie materiálu. Na ED6 bol testovaný materiál (PHB/CHIT, 2x2x1 mm) implantovaný na povrch CAM samostatne/alebo vopred ošetrovaný vo fyziologickom roztoku (PHB/CHIT+PHY, Sodium Chloride 0,9 %), s prídavkom rastového faktora VEGF-A (PHB/CHIT+VEGF-A, aplikačná dávka 25 ng/mL PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a inhibítora angiogenézy (PHB/CHIT+ANGIOSTATIN, 47 µg/mL PBS, Human Angiostatin, Prolytix, Burlington, VT, USA). Testovaný materiál sme hodnotili vo vzťahu biokompatibility k okolitým cievam CAM na ED9, a to prostredníctvom vaskulárneho indexu, teda rozdielu medzi počtom krvných ciev prítomných v okolí implantovaného PHB/CHIT v deň implantácie a počtom krvných ciev vrastajúcich do PHB/CHIT po 72. hodinách od implantácie. Fotodokumentácia ciev chorioalantoickej membrány bola získaná použitím stereomikroskopu Olympus SZ61 (Tokio, Japonsko) a digitálnej kamery PROMICAM 3 (Praha, Česká republika). V štandardných histologických rezoch ofarbených metódou hematoxylín-eozín/Alcianová modrá sme morfológicky hodnotili počet ciev CAM vrastajúcich do biomateriálu, resp. prítomných v okolí implantovaného biomateriálu s použitím svetelného mikroskopu Olympus CX43 (Tokio, Japonsko) s digitálnou kamerou PROMICAM 3-5CP+ (Praha, Česká republika). Získané údaje sme štatisticky analyzovali štatistickým programom GraphPad Prism 10 (One-Way ANOVA, Šidákov test). Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SD (štandardná odchýlka) z troch nezávislých experimentov. Hodnoty $p < 0,0001$ boli považované za štatisticky významné.

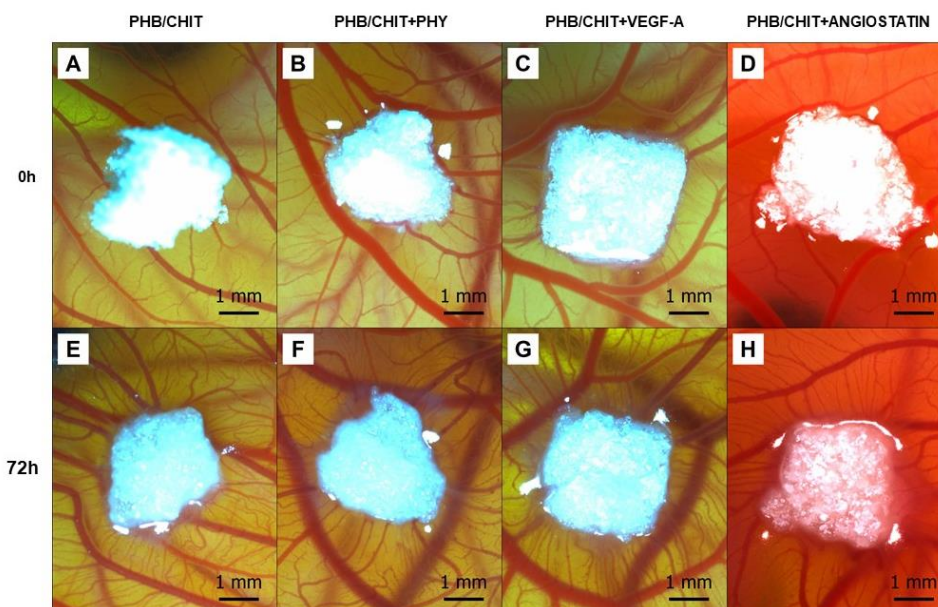
Výsledky

Biologickú kompatibilitu testovaného acelulárneho biomateriálu sme hodnotili na základe jeho *in vivo* angiogénnej aktivity použitím CAM modelu prepeličieho embrya. Makroskopickým hodnotením angiogénnej odpovede a *in vivo* angiogénnej aktivity testovaného PHB/CHIT sme preukázali vyšší angiogénny potenciál v materiáli ošetrovanom fyziologickým roztokom (PHB/CHIT+PHY, $79,42 \pm 7,69$ %) v porovnaní s PHB/CHIT+VEGF-A ($76,27 \pm 7,68$ %) a neošetrovaným PHB/CHIT ($77,05 \pm 8,20$ %). Signifikantne nižšie ($p < 0,0001$) hodnoty v priemernom prírastku novo formovaných krvných ciev sme pozorovali v materiáli ošetrovanom endogénnym inhibítorom angiogenézy (PHB/CHIT+ANGIOSTATIN, $61,95 \pm 12,33$ %) v porovnaní s neošetrovaným PHB/CHIT a PHB/CHIT ošetrovaným s VEGF-A a PHY (tab. 1).

Tabuľka 1 Vaskulárny index vyjadrený ako rozdiel medzi počtom krvných ciev v okolí materiálu v čase aplikácie (ED6) a 72 hodín od implantácie PHB/CHIT (ED9). Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SD z troch nezávislých experimentov; biologické replikáty: PHB/CHIT: n = 40, PHB/CHIT+PHY: n = 40, PHB/CHIT+VEGF-A: n = 40, PHB/CHIT+ANGIOSTATIN: n = 38, technické replikáty: 2 obrázky pre každý biologický replikát

Materiál	Vaskulárny index [%]
PHB/CHIT	77,05 \pm 8,20
PHB/CHIT+PHY	79,42 \pm 7,69
PHB/CHIT+VEGF-A	76,27 \pm 7,68
PHB/CHIT+ANGIOSTATIN	61,95 \pm 12,33

Materiál bol pevne adherovaný k povrchu CAM, čím sa zachovala pozícia implantátov v mieste aplikácie v priebehu celého experimentu. V okolí implantátu sme sledovali prítomnosť krvných ciev, ktoré radiálne vrastali do materiálu. Vrastanie krvných ciev do implantátu bolo znakom biologickej kompatibility materiálu voči tkanivu okolitej CAM (obr. 1).



Obrázok 1 Vrastanie krvných ciev CAM smerom k implantátu v čase implantácie (ED6, 0h; A-D) a novovytvorené krvné cievy 72 hodín (ED9) po implantácii (E-H); mierka: 1 mm

Morfometrická analýza počtu krvných ciev detegovaných v okolí implantovaného materiálu, resp. priamo vrastajúcich do materiálu, nepreukázala signifikantne významné rozdiely v počte krvných ciev v neošetrenom PHB/CHIT ($43,06 \pm 5,96$) v porovnaní s materiálom, ktorý bol ošetrený pridaním pro-angiogénneho faktora VEGF-A (PHB/CHIT+VEGF-A, $43,83 \pm 6,12$) a PHY ($39,11 \pm 2,08$). Najnižší angiogénny potenciál bol pozorovaný v materiáli po pridaní endogénneho inhibítora angiogenézy (PHB/CHIT+ANGIOSTATIN, $31,61 \pm 4,98$). Histologickou analýzou angiogénnej odpovede CAM na implantovaný PHB/CHIT sme detegovali prítomnosť epitelových buniek ektodermy CAM v blízkosti materiálu. Pozorovaná bola inkorporácia mikrokľukov tkaniva CAM do materiálu, čo naznačuje dobrú biokompatibilitu a bioaktivitu testovaného materiálu so živým tkanivom. Materiál ošetrený pridaním endogénneho inhibítora angiogenézy vykazoval morfológické odlišnosti okolitého CAM tkaniva, prejavujúcich sa predovšetkým v nižšom počte novovytvorených krvných ciev v okolí implantátu.

Diskusia

Vtáčia chorioalantoická membrána predstavuje ľahko dostupný a cenovo efektívny alternatívny modelový systém, ktorý je vďaka rozsiahlej vaskularizácii vhodné použiť ako experimentálny model na štúdium angiogenézy, ako aj na predklinické testovanie biokompatibility a funkčnosti materiálov [7, 8]. Umožňuje rýchly dôkaz prerastania krvných ciev do materiálu pred jeho testovaním v podmienkach *in vivo* na zvieratách, a hodnotí tak jeho regeneračnú schopnosť z hľadiska angiogenézy a biokompatibility [9]. Biokompatibilitu testovaného acelulárneho PHB/CHIT sme posudzovali na základe hodnotenia *in vivo* angiogénnej aktivity PHB/CHIT pomocou CAM modelu prepelice japonskej, v závislosti od ošetrovania materiálu fyziologickým roztokom, pridaním pro-angiogénneho rastového faktora VEGF-A a endogénneho inhibítora angiogenézy. Angiogénna aktivita s využitím konvenčne používaného kuracieho CAM modelu bola skúmaná ako odpoveď na rôzne biologické aj nebiologické materiály (napr. celulóza, fibrín, kolagén a želatína) [10], rastové faktory (napr. VEGF-A, VEGF-C, FGF-2), cytokíny, hormóny, lieky, tkanivové extrakty [9] a polymérne nosiče (viskózna a želatínová špongia, agaróza a polyakrylamidový gél) [11]. CAM model, ako *in ovo* metóda na hodnotenie tkanivovej odpovede, bol použitý pri testovaní biomateriálov na báze kolagénu, poly-2-hydroxyetylmetakrylátového polyméru, polykaprolaktónu, matricových hydrogélů a bioaktívneho skla [12]. Materiály sa líšia schopnosťou ovplyvniť angiogénnu odpoveď CAM na základe rozličnej povrchovej aktivity, ako aj odlišných fyzikálno-chemických charakteristík. Homogénne materiály pôsobia pro-angiogénne, a teda podporujú tvorbu nových krvných ciev. Nehomogénne materiály pôsobia antiangiogénne, čo sa prejaví inhibíciou vzniku a rastu krvných ciev [10]. Z chemických charakteristík ovplyvňujúcich biokompatibilitu a angiogénny potenciál materiálu, je rozhodujúca jeho pórovitosť. Veľkosť pórov materiálu ovplyvňuje mobilitu a diferenciáciu buniek, čím priamo vplýva jeho vaskularizáciu. Nízka pórovitosť a malý priemer pórov (menej ako 26 μm) pôsobia na bunkovú penetráciu negatívne, naopak vysoká pórovitosť materiálu (96 %) a stredná veľkosť pórov (26-28 μm) rast tkaniva a krvných ciev podporuje [13]. Testovaný acelulárny PHB/CHIT sa vyznačoval vysokou pórovitosťou, pričom 90 % všetkých pórov dosahovalo priemer menej ako 100 μm , a len 5 % pórov malo priemer väčší ako 200 μm [12].

Záver

V rámci štúdie sme overili využiteľnosť modelu prepeličej CAM ako alternatívy ku konvenčne používanému modelu kuracej CAM pre posúdenie biokompatibility acelulárneho pórovitého PHB/CHIT kompozitu, určeného pre klinické využitie v oblasti regenerácie tvrdých tkanív. Pri posudzovaní biokompatibility sme vychádzali z ukazovateľa, ktorým bol angiogénny potenciál testovaného materiálu. Najvyšší angiogénny potenciál sme pozorovali v materiáli, ktorý bol ošetrovaný fyziologickým roztokom, čím sa zmenou veľkosti pórov vytvorili vhodné podmienky pre vrastanie ciev. Sledovali sme reakciu tkaniva CAM v okolí implantovaného materiálu, ako aj prítomnosť novovytvorených krvných ciev vo vnútri kompozitu, ako znaku biokompatibility a bioaktivity materiálu. Detekcia zmien v procese angiogenézy robí z tohto modelu vhodný modelový systém pre rýchly skrining biokompatibility materiálov špeciálne navrhnutých pre oblasť tkanivového inžinierstva pred ich použitím na vyšších stavovcoch ako experimentálnych zvieratách.

Publikácia vznikla za finančnej podpory projektov IGA UVLF 14/2023 „Štúdium angiogénnej odpovede ciev chorioalantoickej membrány vtáčieho embrya vo vzťahu

k vybraným inovatívnym biomateriálom určených pre regeneračnú medicínu“, APVV-20-0073 a VEGA 1/0074/24.

Literatúra

- [1] Kundekova, *Biology*. **2021**, 10:301.
- [2] Ribatti, *Reproductive Toxicology*. **2017**, 70:97–101.
- [3] Chen, *Cells*. **2021**, 10:463.
- [4] Liu, *Experimental Animals*. **2018**, 67:1–6.
- [5] Medvecky, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **2013**, 25:777–789.
- [6] Ribatti, *Nature Protocols*. **2006**, 1:85–91.
- [7] Baiguera, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **2012**, 100:1425–1434.
- [8] Maina, *Springer*, **2017**, 250 s., ISBN 978-3-319-44153-5
- [9] Mangir, *ASC Biomaterials Science & Engineering*. **2019**, 5:3190–3200.
- [10] Zwaldo-Klarwasser, *Journal of Material Science: Materials in Medicine*. **2001**, 12:195–199.
- [11] Oates, *Biomaterials*. **2007**, 28:3679–3686.
- [12] Giretova, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2019**, 189:556–575.
- [13] Samourides, *Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications*. **2020**, 108:110384.

Effects of chemical agents intended for disinfection of eggshells on gene expression of CYP1A5 and CYP3A37

Pokorná, B.¹, Breivik, A.¹, Štefancová, S.¹, Petrovová E.², Luptáková, L.¹

¹University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Department of Biology and Physiology, Košice; ²University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Department of Morphology disciplines, Košice
bronislava.pokorna@student.uvlf.sk

Abstract

Eggshells can be contaminated with many microorganisms, including bacterial pathogens, and thus present a risk for the transmission of foodborne diseases to consumers. Most egg processors use egg washing and disinfection systems to decontaminate eggshell surfaces before packaging, but current disinfection technologies used in the commercial industry may not entirely remove bacteria from eggshell surfaces. Our work aimed to determine the effect of selected disinfectants and methods used to disinfect eggshells (70% ethanol, betadine, UV-C, and hydrogen peroxide) on the gene expression of genes encoding enzymes involved in the detoxification process, such as CYP1A5 and CYP3A37, in the collected tissues (brain, heart, liver, and muscles). Our findings suggest differential regulatory effects of the tested chemicals and UV exposure on CYP3A37 and CYP1A5 gene expression in different tissues of developing chicken embryos.

Keywords: eggshell, disinfection, gene expression, stress factors

Introduction

In 2022, 87 million metric tons of eggs were produced worldwide [1]. With such an enormous demand, it is principal to maintain a high level of food safety ensuring safe consumption for humans. Although eggs are 90% sterile when exiting the hen, they have the potential to be contaminated by disease transmitted by the hen, as well as by contact with the ground and the surrounding environment after laying [2]. Washing is a requirement for eggs for human consumption in many areas, including the US, Australia, and Japan, but not in the EU and China. Immunization of hens is prioritized over washing the eggs in the EU, and vaccines e.g. against *E. coli*, *S. enteritidis*, and *Brucella*. In areas with low immunization regulation, it gives a high risk of contaminated eggs making it to the market [3]. Several methods are used to reduce the risk of pathogen contamination, but many chemicals have the risk of damaging the cuticle around the shell; therefore, it is necessary to develop other decontamination methods [4].

Materials and methods

Fertilized chicken eggs (*Gallus gallus domesticus*, n = 90) were purchased from the Hatching Chicken Farm (Párovské Háje, Nitra, Slovakia). We divided them into five groups based on the application of different disinfectants, namely, 70% ethanol (EtOH), UV radiation, 1.5% hydrogen peroxide (H₂O₂), betadine, and finally, distilled water for the control group. We applied disinfectants using spray bottles and paper towels, taking care to cover the entire surface of the egg. A group of eggs for UV radiation disinfection was placed in a UV chamber for 15 minutes before incubation. After disinfection, all groups of hatching eggs were incubated *in ovo* in an automatic

incubator (COVINA ET 49, Italy) with constant humidity and temperature (60 %, 37.5 °C). Sampling took place on ED9. Selected organs (heart, liver, pectoral muscles, brain) were dissected from the embryos and were weighed and placed in collection tubes for RNA extraction. According to the protocol, we used the RNeasy Mini Kit isolation kit (Qiagen, Germany) to extract total RNA from tissue. The quantification of RNA was conducted using the NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). We used High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) for reverse transcription of RNA into cDNA. For the evaluation of the gene expression of selected genes (CYP3A37 and CYP1A5), we analysed the data obtained using two-step RT qPCR approach. SYBR Green (Power SYBR™ Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA) was used as a fluorescent dye; we included the melting analysis as the last step of real-time PCR for each gene to distinguish specific and non-specific products. We used the GAPDH gene as an endogenous control. The obtained data was analysed in the GraphPad Prism program (version 9.3, USA) using two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. The value of statistical significance was $p < 0.001$. Data were evaluated as mean \pm SD.

Results

After analysis of CYP3A37 gene expression, we observed a significant up-regulation of all used chemicals and UV-C in the liver. A significant up-regulation of the studied gene was also observed in the brain after 70% EtOH. On the other hand, we observed significant down-regulation in the muscle after disinfection with hydrogen peroxide and in the brain after using betadine ($p < 0.001$; Fig. 1).

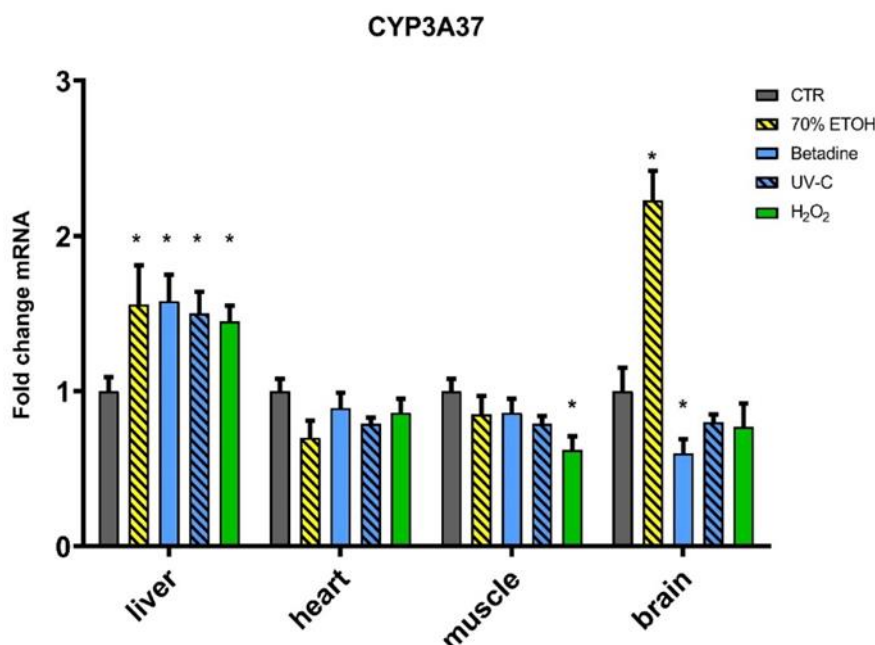


Figure 1 Gene expression of CYP3A37 in the different tissues

Analysis of CYP1A5 gene expression revealed the existence of a significant up-regulation, which we observed in the liver after disinfection with 70% EtOH, betadine, and hydrogen peroxide. There is also an upregulation in the muscle and in the brain after betadine ($p < 0.001$). We observed a statistically significant down-regulation in the

heart after disinfection with 70% EtOH, in muscles after using 70% EtOH and UV-C, and in the brain after using hydrogen peroxide (Fig. 2).

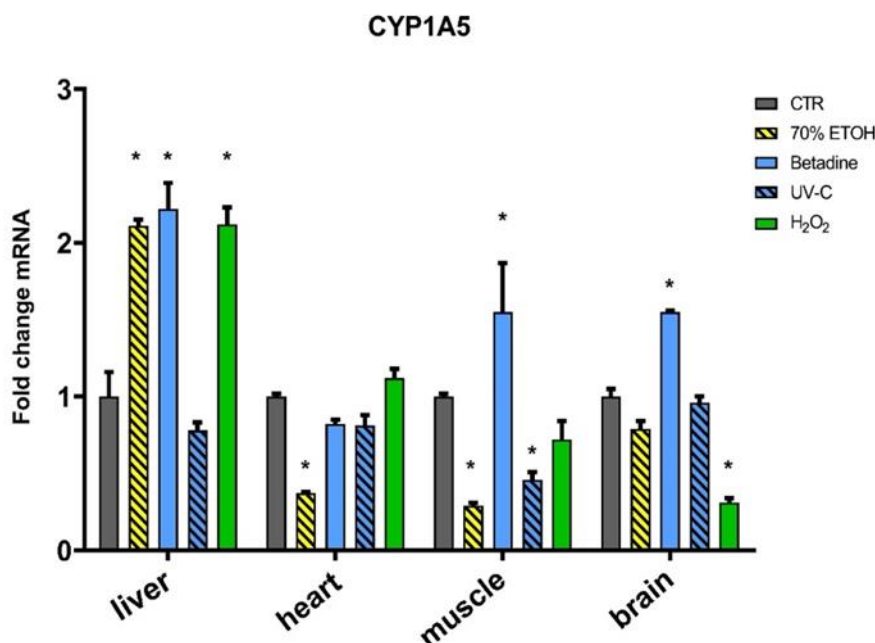


Figure 2 Gene expression of CYP1A5 in the different tissues

Discussion

Living organisms are exposed to several structurally different chemical substances in their everyday environment. In addition to substances of natural origin, the body also receives synthetic foreign substances (xenobiotics), which are potentially harmful, and the body uses a wide range of chemical reactions to eliminate them [5]. It is common practice for hatching eggs to be disinfected to kill microorganisms on the surface of the eggshell to prevent contamination with multiple pathogenic bacterial species that can cause poor hatchability and reduced chicken performance in broiler industrial production [6]. Polar substances are easily excreted in the urine; in the case of less polar substances in the body, metabolism takes place to reduce their lipophilicity. Metabolism involves a large group of cytochromes P450 and is a complex process consisting of two phases. The first phase includes functional reactions such as oxidation, reduction, and hydrolysis, which increase the molecule polarity and allow the second phase to proceed. Phase I enzymes include the superfamily of cytochrome P450s (CYPs), alcohol dehydrogenases, esterases, and peroxidases [7]. Xenobiotic-metabolizing capacity plays a significant role in determining sensitivity to foreign chemical substances. It is well-known that CYPs that metabolize xenobiotics are mostly expressed in the liver, and the mRNA expression levels of CYPs are positively correlated with their enzymatic activity and protein levels, the strength of which, however, depends on the isoform [8]. Approximately 10,000 avian species are currently known and exposed to drugs, pesticides, and other environmental chemicals. Therefore, their xenobiotic-metabolizing ability is the main field of research. Similarly to mammals, chickens have two CYP1A genes (CYP3A37 and CYP1A5), which are orthologous to mammalian CYP1A1 and CYP1A2, respectively. The importance of chicken CYP1As in the metabolism of endogenous compounds has been documented in many previous studies [9]. Our study was focused on monitoring the effect of various

chemical disinfectants on the gene expression of two genes from the P450 cytochrome family. Statistically significant up-regulation of the expression of CYP3A37 in the liver in our study was related to 70% EtOH, betadine, hydrogen peroxide, and UV-C. We noticed up-regulation only in the case of 70% EtOH in the brain. We observed the significant up-regulation of the CYP1A5 in the liver after 70% EtOH, betadine, and hydrogen peroxide. Various studies have focused on evaluating the gene expression of some CYP genes, such as the study focused on the metabolism of T-2 toxin by chicken cytochrome P450. This study reported that the toxin remarkably induced CYP1A5 and CYP1A4 expression in the embryonal hepatic cells. There was an up-regulation of the expression of CYP1A4 and CYP1A5 by 132-fold and 47-fold, respectively, and CYP3A37 by 5.3-fold (Shang, Jiang, Deng 2013). Another study studied the effect of tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure to chicken embryo's liver cell cultures, and the results showed the up-regulation of CYP1A5 by 25-fold and CYP1A4 by 61-fold [10]. In the case of CYP3A37, Yuan et al. [11] confirmed the key role of this enzyme in the metabolism of T-2 toxin. Jönsson et al. (2016) focused on the effect of formylindole carbazole (FICZ) after its injection into chicken embryos. The results showed the upregulation of CYP1A5 and CYP1A4, with increased liver toxicity and embryonal mortality.

Conclusions

Our findings point to different regulatory effects of the tested chemicals and UV exposure on CYP3A37 and CYP1A5 gene expression in various tissues. The use of maternity disinfectants can have a physical effect on the embryos. Further investigation of the mechanisms could provide valuable insights into the potential long-term consequences of these disinfectants and UV-C on gene expression regulation and physiological responses in liver, brain, muscle, and heart tissues.

This research was funded by VEGA 1/0373/24 and KEGA 004UVLF-4/2023.

References

- [1] <https://www.statista.com/statistics/263972/egg-production-worldwide-since-1990/>; Updated March 21. **2024**.
- [2] Turtoi and Borda, *World's Poultry Science Journal*. **2014**, 70/2:265–278.
- [3] Chen, *Poultry Science*. **2019**, 98/2:940–948.
- [4] Olsen, *Poultry science*. **2017**, 96/11:3901–3911.
- [5] Ioannides, *Xenobiotica*. **2002**, 32/6:451–478.
- [6] Esteves, *Journal of Xenobiotics*. **2021**, 11/3:94–114.
- [7] Watanabe, *PLoS ONE*. **2013**, 8/9:75689.
- [8] Luptakova, *Toxics*. **2021**, 9/3:55.
- [9] Shang, *International Journal of Molecular Sciences*. **2013**, 14/ 6:10809–10818.
- [10] Head and Kennedy, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **2007**, 145/4:617–624.
- [11] Yuan, *Food and Chemical Toxicology*. **2013**, 62:622–627.

Sledovanie vplyvu chemických činidiel určených na dezinfekciu vaječnej škrupiny na molekulovej úrovni

Štefancová, S.¹, Pokorná, B.¹, Balog, P.¹, Luptáková, L.¹

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice
slavomira.stefancova@student.uvlf.sk

Abstract

This study examines the effect of chemical disinfectants on eggshell at the molecular level. We found significant changes in the expression of HSP90 and HSP70 genes in different tissues of chicken embryos after the use of disinfection chemicals. The use of 70% ethanol, betadine and UV-C caused up-regulation of the HSP90 gene in the liver and muscle, but down-regulation in the heart. In the brain, down-regulation was caused by only 70% ethanol and H₂O₂. The HSP70 gene was up-regulated in the heart after the use of betadine, UV-C and H₂O₂, in the liver but only after the use of betadine, and in the muscle after the use of betadine and H₂O₂. Down-regulation of the HSP70 gene was recorded in the brain after the use of all tested chemicals and UV-C. These changes suggest that disinfectants can cause oxidative stress and affect gene expression of stress factors. In order to fully assess their impact on egg development, it is important to monitor other factors such as morphology, embryotoxicity and the occurrence of malformations.

Keywords: gene expression, embryology, HSP70, HSP90

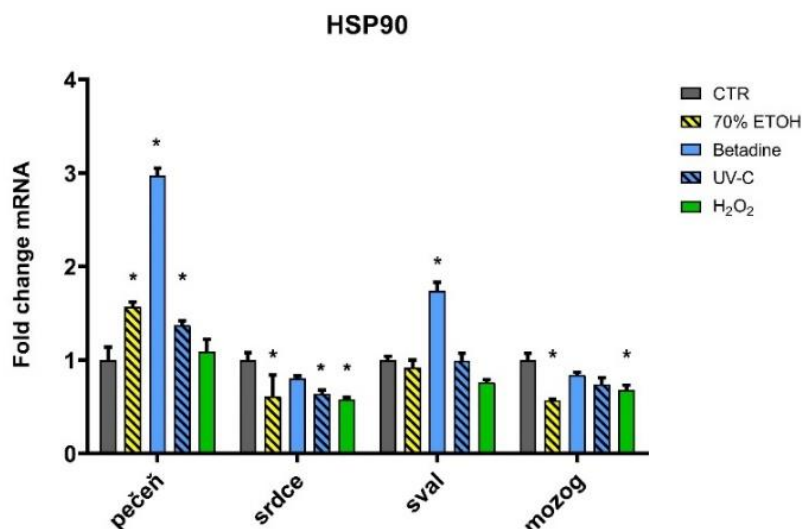
Úvod

V súčasnosti sa čoraz atraktívnejším modelom v biomedicínskom výskume stáva kuracie embryo a jeho chorioalantoická membrána. Tento model má mnoho výhod v porovnaní s inými klasickými modelmi, pretože je nákladovo efektívny, časovo nenáročný a jednoduchšie sa používa [2]. V tejto štúdii sa stretávame s génmi HSP70 a HSP90, ktoré fungujú ako molekulárne chaperóny v reakcii na rôzne stresové faktory, podporujú správne skladanie proteínov a zabráňujú agregácii denaturovaného proteínu [1].

Materiál a metódy

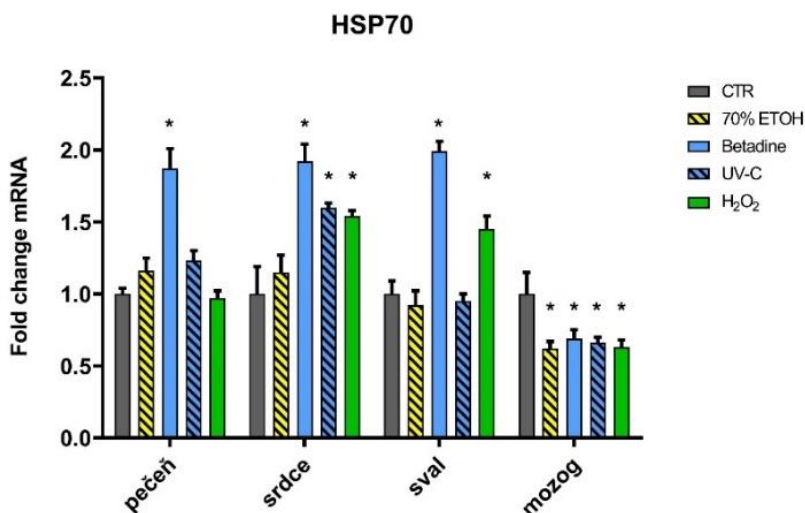
V našej experimentálnej práci bolo použitých spolu 90 oplodnených kuracích vajíčok pochádzajúcich z Liaharenského podniku Párovské Háje. Vajíčka boli rozdelené do 5 študijných skupín t.j. po 18 kusov. Každá skupina bola dezinfikovaná pomocou iného činidla alebo metódy (70 % etanol, betadine, UV a peroxid vodíka). Vajíčka boli inkubované do 9. dňa embryonálneho vývinu a na 9. deň sme uskutočnili odber vzoriek. Použili sme Real-Time PCR (qPCR) a mastermix, ktorý obsahoval SYBR Green (cyanínové farbivo) na sledovanie zmien v génovej expresii pre naše cieľové gény, ktorými boli HSP70 a HSP90. Celkový reakčný objem pre qPCR bol 10 µl, pričom na reakciu sa použil 1 µl templátu (cDNA). GAPDH nám slúžil ako vnútorná kontrola (prevádzkový gén) a každá vzorka sa analyzovala ako triplikát, aby sa zabezpečila spoľahlivosť výsledkov. qPCR sme vykonávali v prístroji LightCycler 480 od spoločnosti Roche. Údaje sme štatistiky analyzovali pomocou softvéru GraphPad Prism (verzia 9.3, USA) s použitím analýzy pomocou dvojcestnej ANOVA s testom Dunnett's multiple comparisons test. Hodnota štatistickej významnosti bola $p < 0,0001$. Údaje boli vyhodnotené ako priemer \pm SD.

Výsledky



Obrázok 1 Génová expresia génu HSP90 v jednotlivých vzorkách

Počas analýzy génovej expresie génu HSP90 sme zaznamenali signifikantne zvýšenú expresiu v pečeni pri použití 70 % etanolu, betadínu a UV-C, zatiaľ čo v srdci bola zistená signifikantná down-regulácia pri použití 70 % etanolu, UV-C a H₂O₂. Vo svaloch bol pozorovaný signifikantný nárast iba pri použití betadínu. V mozgu bola zaznamenaná signifikantná down-regulácia pri 70 % etanole a H₂O₂ (obr. 1).



Obrázok 2 Génová expresia génu HSP70 v jednotlivých vzorkách

Pri analýze génovej expresie génu HSP70 sme zistili signifikantnú up-reguláciu v pečeni len pri betadíne (podobne ako pri HSP90). V srdci sme tiež pozorovali signifikantnú up-reguláciu po použití betadínu, UV-C a H₂O₂. Vo svaloch bol zaznamenaný nárast génu pri betadíne a H₂O₂. V mozgu sme zaznamenali iba signifikantnú down-reguláciu pri všetkých testovaných chemikáliách a UV-C (obr. 2).

Diskusia

Vystavenie buniek rôznym stresorom, ako je tepelný šok, peroxid vodíka, infekcia, zápal alebo chemikálie, vedie k hromadeniu stresových proteínov známych ako proteíny tepelného šoku (HSPs), ktoré fungujú ako intracelulárne chaperóny a poskytujú cytoprotekciu proti stresu. Ich indukcia je riadená faktormi tepelného šoku (HSF) [3]. Stresové proteíny tepelného šoku zohrávajú úlohu pri adaptácii na environmentálny stres a chránia tkanivá pred štrukturálnym poškodením počas nasledujúcich expozícií [4]. Keďže dezinfekčné prostriedky môžu mať škodlivý účinok na bunky, zameriavali sme sa na ich vplyv na génovú expresiu stresových faktorov. Sústredili sme sa na analýzu stresových faktorov HSP90, HSP70 v mozgu, pečeni, svalu a srdci. Naše výsledky ukázali zvýšenú génovú expresiu týchto faktorov v rôznych tkanivách po dezinfekcii, s výnimkou mozgu, kde sa po dezinfekcii betadínom vyskytla najmenšia zmena. Navyše, alkohol ovplyvňuje aktivitu transkripčných faktorov a génov HSP70 a HSP90, ktoré súvisia s ochranou bunky pred stresom. Najmenej často bola up-regulácia génov vyvolaná dezinfekciou 70 % etanolom. Na druhej strane sme ale signifikantnú down-reguláciu sledovaných génov zaznamenali práve po dezinfekcii 70 % etanolom. Analýza odhalila, že alkohol reguloval aktivitu naviazania HSF-1 a nie HSF-2. HSP70, cieľový gén indukovaný HSF-1, bol prechodne zvýšený alkoholom do 24 hodín, ale predĺžená expozícia alkoholu znížila HSP70. Pri géne HSP90 sme zistili, že krátkodobé pôsobenie alkoholu viedlo k zníženiu génovej exprese. Je však dôležité do ďalších analýz zahrnúť aj iné transkripčné faktory, ako je NF- κ B, aby sme lepšie porozumeli mechanizmu ochrany buniek pred oxidačným stresom [3].

Záver

V tomto výskume sme sledovali vplyv rôznych detergentných činidiel – destilovanej vody, 70 % etanolu, betadínu, peroxidu vodíka a ultrafialového žiarenia na génovú expresiu kuracích embryí. Zistili sme, že najvýraznejšia zmena v génovej expresii génu HSP90 bola pozorovaná v pečeni po ošetroaní betadínom, zatiaľ čo down-reguláciu sme zaznamenali v svaloch po expozícii etanolu a v srdci po použití peroxidu vodíka. Gén HSP70 bol signifikantne up-regulovaný vo svaloch, srdci a pečeni po použití betadínu, ako aj v srdci po expozícii UV-C a H₂O₂. Naopak, výrazné zníženie transkripcie génu sme pozorovali v mozgu po aplikácii všetkých testovaných chemikálií a UV-C. V závere môžeme konštatovať, že použitie dezinfekčných prostriedkov na čistenie vaječnej škrupiny môže vyvolať oxidačný stres, ktorý ovplyvňuje génovú expresiu stresových faktorov. Pre celkové posúdenie ich vplyvu na vývin vajec je potrebné sledovať nielen ich vplyv na molekulovej úrovni ale aj zmeny morfológie, embryotoxicitu, výskyt malformácií, popr. krvácaním na kuracom embryu.

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0074/24 a KEGA 004UVLF-4/2023.

Literatúra

- [1] Ding, *Front. Physiol.* **2021**, 12:753914.
- [2] Garcia, *Frontiers in Immunology*, **2021**, 12.
- [3] Mandrekar, *J. Leukoc. Biol.*, **2008**, 28/5:1335–1345.
- [4] Zabinsky, *Seminars in Cell & Developmental Biology*. **2019**, 88:21–35.

T cell mediastinal lymphoma with leukemic phase in dog.

Case report

**Ševčíková, Z. ¹, Karaffová, V. ¹, Márková, K. ², Figurová, M. ³ Revajová, V. ¹,
Hudec, E. ¹, Szabóová, R⁴**

¹University of Veterinary Medicine Košice, Department of Morphological Disciplines, Košice; ² Private veterinary surgeon, Kysak 327, Kysak; ³University of Veterinary Medicine Košice, Small Animal Clinic, University Veterinary Hospital, Košice; ⁴University of Veterinary Medicine Košice, Department of Biology nad Physiology, Košice
zuzana.sevcikova@uvlf.sk

Abstract

A four years old German shepherd dog with general discomfort was presented. Clinical, biochemical, haematological, RTG and USG examinations were realized. Complete blood cell count revealed, among other things leucocytosis and lymphocytosis. The animal's health deteriorated rapidly, so the euthanasia was proposed. Necropsy revealed splenomegaly, mild hepatomegaly, and the occurrence of structureless mass of tissue in cranial mediastinum, as well. The histopathologic and immunohistochemical (IHC) diagnosis was mediastinal intermediate - large T cell lymphoma with diffuse architecture and with leukemic phase.

Keywords: dog, lymphoma, mediastinal form, leukemic phase

Introduction

Canine lymphomas collectively represent approximately 7-14% of all cancers diagnosed in dogs and 83% of all canine hematopoietic malignancies. The extranodal form of neoplasia include the mediastinal one. This form of disease is characterized by enlargement of the cranial mediastinal lymph nodes, thymus or both. It is more common in younger dogs [13]. Some patients with lymphoma can also have circulating lymphoma cells (with or without bone marrow involvement), which has various terms, including leukemic phase of lymphoma [7].

The present work describes clinical and pathological features of mediastinal lymphoma with leukemic phase in dog.

Material and methods

A four years old German shepherd dog (27 kg) with general discomfort was presented. According to the owner, weight loss (5 kg), decreased physical activity and sluggishness were observed. Clinical, biochemical, haematological, RTG and USG examinations were realized. The animal's health deteriorated rapidly, so the euthanasia was proposed. The necropsy was proceeded and samples for cytology, histopathology and IHC were taken.

Results

Clinical examination revealed cardiac arrhythmia and heavier hearing of hearth rhythms from left side of the body. The examination of urine found the presence of Lc (+++) and blood (+) in urine, biochemistry revealed azotemia with the following values: creatinine 310 µmol/l (ref. 28 -159), urea 26, 2 mmol/l (ref 2.5 - 9.6), triglycerides 1.19 mmol/l (ref. 0 - 1.13) and hypercalcemia 4.03 mmol/l (ref. 1.98-3). Hematology showed leucocytosis (67.09×10^9 /L, ref. $5.05-16.76 \times 10^9$ /L), lymphocytosis (57.27×10^9 /L,

ref. $1.05 - 5.10 \times 10^9 /L$), monocytosis ($2.92 \times 10^9 /L$, ref. $0.16 - 1.12 \times 10^9 /L$) and thrombocytopenia ($38 \times 10^9 /L$, ref. $148 - 484 \times 10^9 /L$).

RTG examination found the mass of tissue in cranial mediastinum with a slight dorsal shift. USG proved the hyperechogenicity of renal cortex and of the layer between the cortex and medulla. Spleen was diffusely enlarged, liver was hyperechogenic with highlighted interstitium.

During necropsy the splenomegaly, mild hepatomegaly, and the enlargement and infiltration of cranial mediastinal field by structureless mass of tissue (Fig. 1) were found, as well. Cytology and histopathology of this mass revealed the proliferation of homogenous intermediate to large lymphoid cells. These cells were observed also in the spleen, in liver (mainly in perivascular space) and in lesser extend in kidneys.

The diagnosis of intermediate - large cell mediastinal lymphoma with diffuse architecture was accepted. To gain the information about the origin of neoplastic cells the IHC was realized (Laboklin Ltd). 99% of cells were positive for CD3 (marker for T lymphocytes) (Fig. 2), 1% of cells were positive for CD20 and CD79a (markers for B lymphocytes). The immunohistochemical examination was consistent with a T cell lymphoma.

Discussion

Canine lymphomas are a diverse group of cancers, and are among the most common cancers diagnosed in dogs. Mediastinal form of disease occurs in approximately 5% of cases [12].

Clinically, commonly dogs with mediastinal lymphoma are presented with respiratory distress cause by space-occupying mas and pleural effusion. In our case decreased physical activity and sluggishness, cardiac arrhythmia and heavier hearing of hearth rhythms from left side of the body were detected.

The presentation of this neoplasia is complicated by some paraneoplastic processes [5] that were found also in our case. Hypercalcemia, which is found in 10% to 40% of dogs with lymphoma [13], is responsible for polydipsia/polyuria. It occurs secondary to malignant cell and results from the production of PTH-related peptide (parathyroid hormone [PTH]-rP) by CD4+ T-cell lymphoblasts. Hypercalcemia and monocytosis are very often associated with poor prognosis of neoplasia [3, 7]. The latter one is caused by increased of monocyte chemotactic protein, possible by secretion of granulocyte-macrophage colony stimulation factor [4]. Thrombocytopenia was found to be the most common abnormality on the complete blood count in retrospective study dealing with mediastinal lymphoma in dogs [8].

Other haematological results revealed leucocytosis and lymphocytosis, which occurs approximately in 20% of affected dogs and may be indicative of bone marrow involvement and leukemia [11]. The blood involvement as seen in this work, may be present also in advanced cases of lymphoma. The distinction between lymphoma with leukemic phase and lymphoid leukaemia may be difficult [8]. Since some characteristics of canine lymphoid leukaemia were not present in our case (anemia, neutropenia, generalized lymphadenopathy) lymphoma with a leukemic phase was considered most likely.

Biochemistry panel resulted to azotemia diagnosis which may be present because of many factors, including dehydration, persistent hypercalcemia leading to calcification of the renal cortex, or renal involvement of the lymphoma [6].

Canine lymphoma can be classify into subtypes using the Revised European American Lymphoma/World Health Organization (REAL/WHO) system. This system comprises anatomical, morphological and immunophenotypic criteria (B-cell and T cell

immunophenotypes) [11]. Unfortunately, unlike in humans (non-Hodgkin lymphoma), there are no veterinary prognostic scoring systems routinely used for canine lymphoma [2].

It is important to determine the histological grade of lymphoma which could be, in the case of dogs, as low or intermediate to high and the architecture as diffuse or follicular. The most common form of canine mediastinal lymphoma are lymphoblastic and large cell one [8]. In our case the intermediate - large cell type with diffuse architecture was observed.

The prognosis of canine lymphoma depends on many factors, but the immunophenotype is one of the most important [10]. T-cell lymphoma is generally associated with a worse prognosis. Dogs with T-cell lymphoma treated with multiagent chemotherapy have reported median survival times of < 8 months, whereas dogs with B-cell lymphoma treated with the same protocol have median survival times exceeding 15 months [1, 10]. In people, mediastinal lymphoma can be either of T-cell or B-cell phenotype respectively. In veterinary medicine are mediastinal mass associated with T-cell phenotype, with a worse outcome as compared to B-cell lymphoma [9]. This information is consistent with result of IHC which proved the T cell type of neoplasia. The results of both histopathology and IHC were in the agreement with the rapid unfavourable progress of the process.

Conclusion

A four years old German shepherd dog (27 kg) with general discomfort was presented. Clinical, haematological, biochemical, RTG and USG examination were realized. Complete blood cell count revealed, among other things leucocytosis and lymphocytosis. The animal's health deteriorated rapidly, so the euthanasia was proposed. Necropsy revealed splenomegaly, mild hepatomegaly, and the occurrence of structureless mass of tissue in cranial mediastinum, as well. The histopathologic and IHC diagnosis was mediastinal intermediate - large T cell lymphoma with diffuse architecture and with leukemic phase.

References

- [1] Borska, *Can. Vet. J.* **2009**, 50:411–416.
- [2] Fontaine, *Vet. Comp. Oncol.* **2017**, 15/4:1513–1526, in: Sanches-Solé, et al, 2021, *Open Vet J* 11(4): 734-746, doi: 10.5455/OVJ.2021.v11.i4.26
- [3] <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=5124197&pid=11343>; Updated July 29, **2020**
- [4] <https://www.cliniciansbrief.com/article/differential-diagnosis-monocytosis>; Updated July, **2023**
- [5] <https://www.isvma.org/wp-content/uploads/2021/09/ParaneoplasticSyndromesinDogsandCats.pdf>; Updated **2021**
- [6] <https://hospital.cvm.ncsu.edu/services/small-animals/cancer-oncology/oncology/canine-lymphoma/> Updated **2024**
- [7] eClinpath.com. Cornell University, <https://eclinpath.com/hematology/leukemia/leukemia-types/> Updated **2024**
- [8] Moore, *Vet Comp Oncol.* **2018**, 16 (1): E45-E51, doi: 10.1111/vco.12331
- [9] Perpiñán, *J. of Vet Diagnostic Investigation*, **2011**, 23/4:817–820.
- [10] Sanches-Solé, *Open Vet. J.* **2021**, 11/4:734–746.
- [11] Sutthigran, *Veterinary World.* **2024**, 344–355.
- [12] Zadvieli, *Veterinary Quarterly.* **2016**, 36/2:76–104.
- [13] Withrov, *Elsevier*, **2017**, 608–638 s., ISBN 978-1-4377-2362-5

Figures

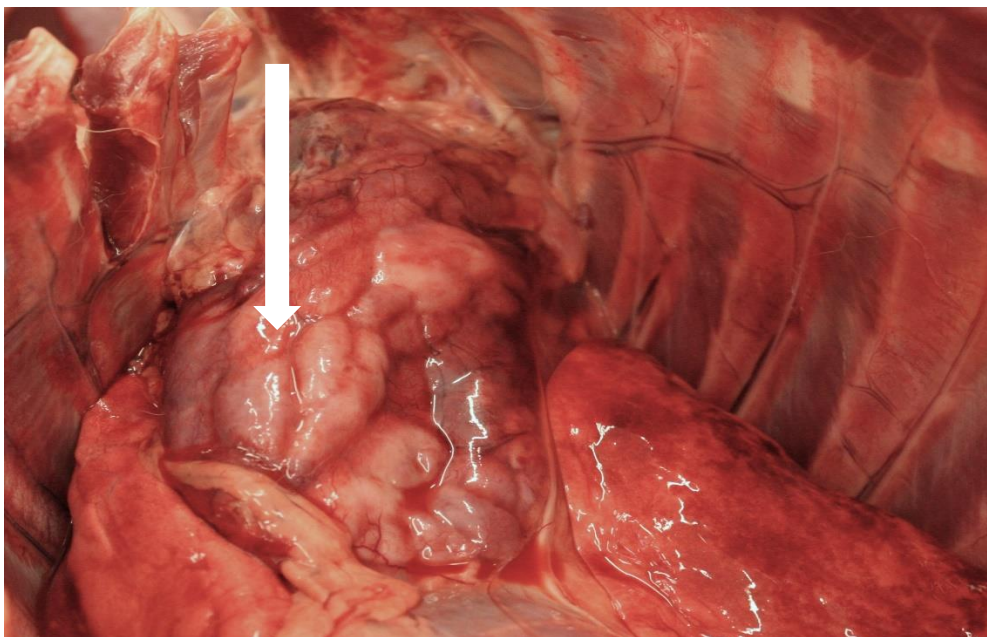


Figure 1 The enlargement and infiltration of cranial mediastinal field by structureless mass of tissue were found (arrow) Source: Own picture

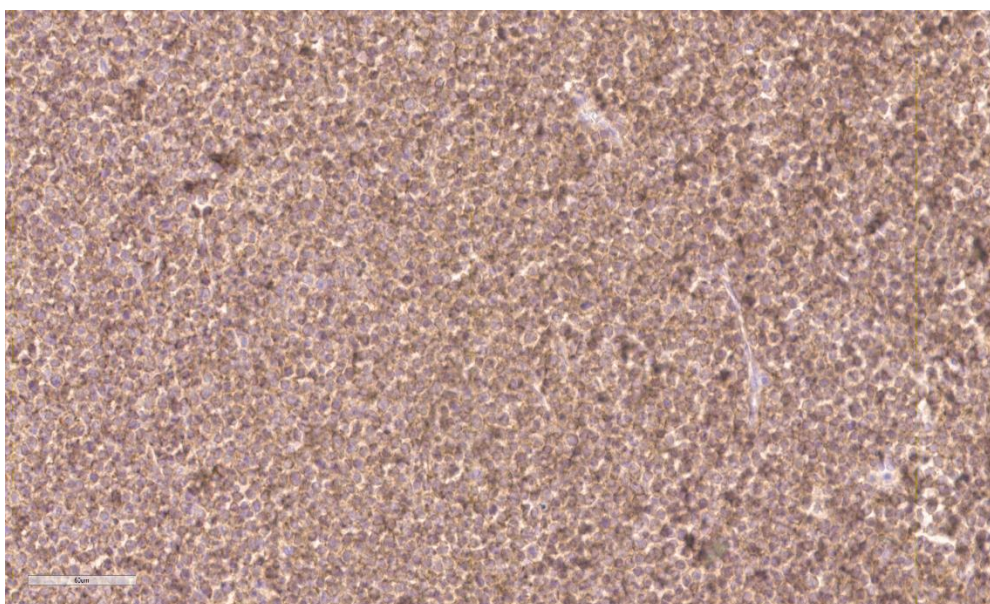


Figure 2 The result of IHC revealed that 99% of cells were positive for CD3 (marker for T lymphocytes) Source: Laboklin Ltd.

Účasť hipokampu na patogenéze vybraných neurodegeneratívnych ochorení

Gwashavanhu, RR.¹, Hnilicová, P.², Kalenská, D.³, Lacková, L.¹, Kovalská, L.⁴,
Lehotský, J.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, 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 stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Martin; ⁵Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin
maria.kovalska@uniba.sk

Abstract

Neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and multiple sclerosis (SM), are characterised by the progressive loss of neuron structure or function, leading to their death. These diseases often significantly impact the hippocampus, a critical brain region responsible for memory and learning. In Alzheimer's disease, there is a marked reduction in hippocampal volume, which correlates with cognitive decline. Pathological changes, such as the accumulation of beta-amyloid and tau proteins, cause neuronal death and synaptic dysfunction in the hippocampus. Similarly, in Parkinson's disease and SM, the hippocampus can be secondarily affected, contributing to the non-motor symptoms of these diseases, such as cognitive impairments and mood changes. Understanding the mechanisms leading to neurodegeneration in the hippocampus is not just crucial but urgent for developing effective therapeutic strategies to slow or halt the progression of these diseases. This short review focuses on current knowledge regarding the role of the hippocampus in neurodegenerative diseases, highlighting the molecular and cellular mechanisms underlying these pathologies.

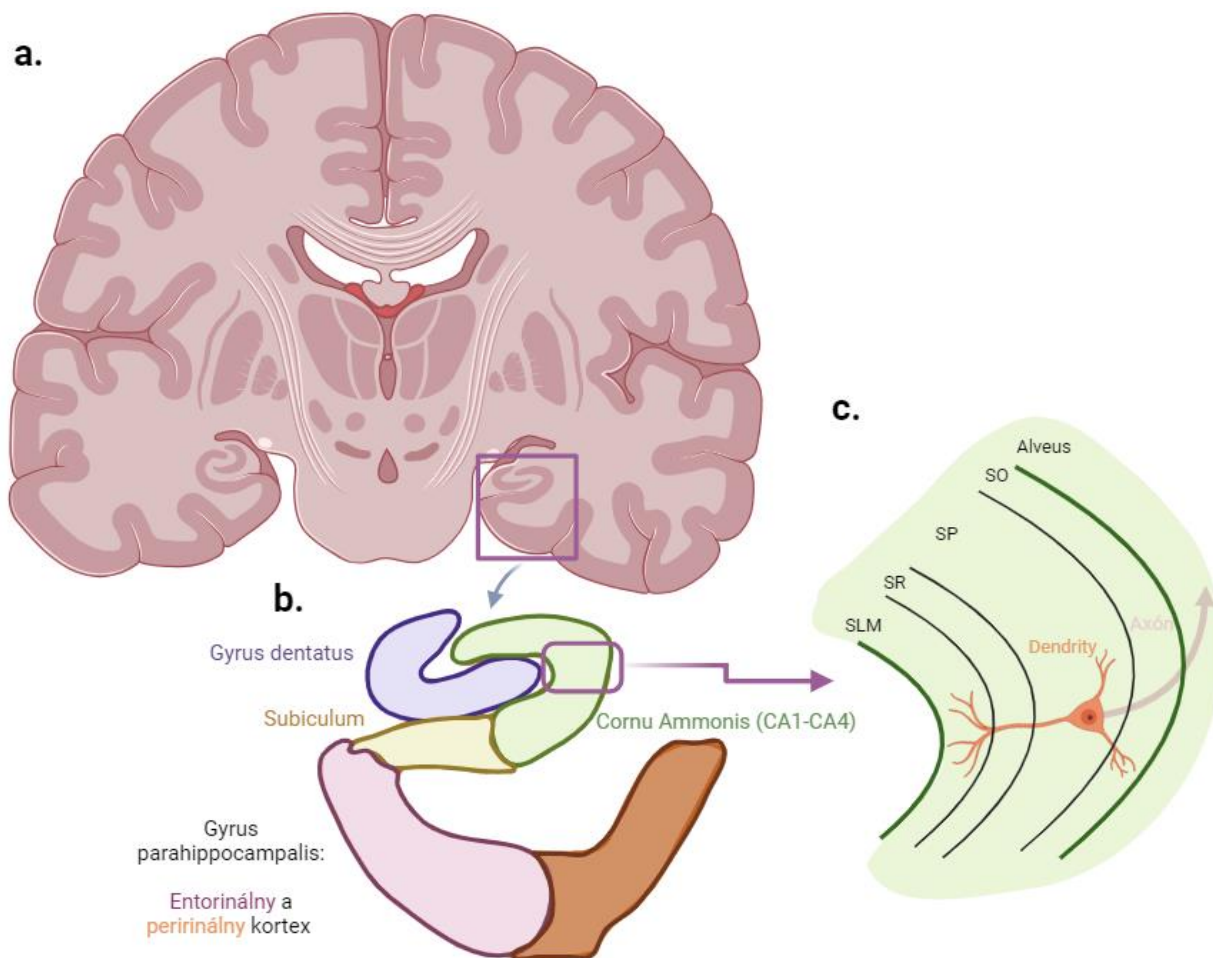
Keywords: hippocampus, neurodegeneration, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis

Úvod

Hipokampus (lat. *hippocampus*) je dôležitou časťou mozgu človeka ako aj ďalších stavovcov. Je súčasťou limbického systému a zohráva významnú úlohu pri transformácii krátkodobej pamäti na dlhodobú a pri priestorovej orientácii. Človek a iné cicavce majú dva hipokampy, každý v jednej hemisfére. Hipokampus je úzko prepojený s mozgovou kôrou a u cicavcov sa nachádza v mediálnom temporálnom laloku (strednom spánkovom laloku). Anatomicky ho delíme na tri časti: hlavu, telo a chvost [1].

Hippocampus v širšom zmysle pozostáva z troch alokortikálnych štruktúr: *cornu Ammonis*, *fascia dentata* a *subiculum*. Okrem subikula, ktoré je prechodnou kôrou medzi entorinálnou oblasťou a *cornu Ammonis*, celá alokortikálna časť hipokampu, ktorá sa povrchovo premieta do *gyrus parahippocampalis*, pozostáva z dvoch podlhovastých cylindrických závitov – tých, ktoré sú na jednej strane otvorené – a to *cornu Ammonis* a *fascia dentata*, pričom otvorená časť *fascia dentata* smeruje k dolnému oddielu *cornu Ammonis*. Na priečnom reze majú oba útvary tvar písmena C. *Cornu Ammonis* možno rozdeliť na niekoľko vrstiev. Najvnútornejšiu vrstvu tvorí

alveus obsahujúci eferentné vlákna, po ňom nasleduje *stratum oriens* s multipolárnymi košíčkovitými bunkami. Telá pyramídových buniek tvoria *stratum pyramidale*, za ktorým hneď nasleduje *stratum radiatum*. Vetvy dlhých apikálnych dendritov pyramídových buniek vytvárajú *stratum lacunosum* a na povrchu je *stratum moleculare*. Na základe rozdielov v bunkovej skladbe sa *cornu Ammonis* od subikula smerom k *fascia dentata* člení na štyri polia: *cornu Ammonis* 1 – 4 (CA1 – CA4; obr. 1). Pri posudzovaní jednotlivých vrstiev *cornu Ammonis* treba brať do úvahy, že v dôsledku vývojových zmien sú jeho hlboké vrstvy obrátené ku dnu bočnej komory, zatiaľ čo povrchové vrstvy sú pokryté kôrovou platničkou, ktorú tvorí *fascia dentata* [1 – 3].



Obrázok 1 Hipokampus a jeho cytoarchitektonika (vytvorené pomocou BioRender©; <https://app.biorender.com/>; dostupné 21.5. 2024; upravené podľa [1 – 3]). **a.** koronárny rez mozgom; **b.** anatomické súčasti hipokampu; **c.** vrstvy *cornu Ammonis* od najvnútornejšie (*alveus*) až po najpovrchovejšie vrstvu (*stratum lacunosum-moleculare*)

Vysvetlivky: SO – *stratum oriens*; SP – *stratum pyramidale*; SR – *stratum radiatum*; SLM – *stratum lacunosum-moleculare*

Hipokampus a neurodegeneratívne ochorenia

Postupným poškodením určitých oblastí mozgu, ktoré vedie k stratám funkcií nervového systému (NS) a symptómom, ako je pokles kognitívnych schopností, poruchy pohybu alebo zmeny v správaní, sa vyznačuje väčšina neurodegeneratívnych ochorení (ND). Kľúčovú úlohu pri uchovávaní deklaratívnej pamäti a priestorovo

súvisiacej pamäti hrá hipokampus. Je chronicky známe a mnohé výskumy potvrdzujú, že zmeny v hipokampe sú spojené s vývojom určitých ND [4].

Rozpoznanie a pochopenie úlohy, ktorú zohráva hipokampus vo vzťahu k neurodegenerácii, môže byť kľúčom k identifikácii nových terapií a stratégií liečby pre tieto smrteľné ochorenia. Nové poznatky ďalšieho výskum v tejto oblasti, by mohli viesť k lepšiemu porozumeniu a neskôr aj k účinnejším liečebným postupom [4 – 6].

Alzheimerova choroba (AD)

Účasť hipokampu na patogeneze AD bola preukázaná v rôznych klinických [5, 7] a predklinických štúdiách [6, 8 – 10]. AD je charakterizovaná postupnou stratou pamäti a kognitívnych schopností. Postihnutie hipokampu je jedným z hlavných patologických znakov AD. Degeneráciu neurónov v hipokampe a iných kognitívnych oblastiach spôsobuje nahromadenie beta-amyloidných (β A) plakov a neurofibrilárnych spleťí v mozgu. Zmenšený objem a veľkosť hipokampu, ako aj degenerácia neurónov v tejto oblasti, sa považuje za kľúčový faktor pri vývoji AD. Pri AD je prvou oblasťou patologických zmien podoblasť CA1, po ktorej nasleduje *subiculum*, CA2, CA3 a *gyrus dentatus* [11]. Vo väčšine štúdií, ktoré sledovali pacientov s miernou až závažnou formou AD, bola pozorovaná celková strata neurónov najmä v oblasti CA1 [12]. Zhoršená funkčná konektivita hipokampu s viacerými inými oblasťami mozgu vedie u AD-pacientov k súboru neuropsychologických abnormalít [13].

V ranom štádiu AD je kognitívna porucha vo veľkej miere spôsobená synaptickou dysfunkciou [14]. Príčiny synaptickej dysfunkcie pri AD zahŕňajú zníženie celkového počtu buniek [15], synaptické poškodenie v dôsledku prítomnosti rozpustného β A [16], poškodenia glie [17] a významný pokles synaptických vezikúl [18]. Synaptické zlyhanie v hipokampe bolo preukázané u pacientov s AD [14] aj u zvieracích modelov [19]. Hipokampálna synaptická dysfunkcia je v skutočnosti raným patologickým znakom AD a predstavuje základnú príčinu zhoršenia pamäti [5]. U pacientov s AD sa hipokampálna synaptická dysfunkcia prejavuje ako znížený počet synáps [20], a v experimentálnych modeloch ako zhoršená regenerácia/genéza synapsí [21], strata synaptických proteínov (t.j. synaptofyzín, synaptogyrín, synaptotagmín a syntaxín 1; [8, 9]) a narušené synaptické signalizačné kaskády (t.j. mitogénom aktivované proteínkinázy; [22, 23]). Pamäťové poruchy začínajú jemnými zmenami v synaptickej aktivite hipokampu a postupne prechádzajú do závažnej straty neurónov [24]. Je zaujímavé, že synaptická dysfunkcia sa objavuje pred tvorbou β A plakov, čo naznačuje, že tvorí základ počiatočného vývoja tohto ochorenia [25].

Parkinsonova choroba (PD)

Druhým najrozšírenejším ND je celosvetovo PD [26]. Toto ochorenie vzniká dysfunkciou dopaminergných (DA) neurónov v extrapyramídovom trakte stredného mozgu spolu s akumuláciou α -synukleínových proteínov (Lewyho teliesok) v nervovom systéme. Poškodenie DA neurónov je charakteristickým znakom PD, a preto sa veľká pozornosť sústreďuje na štrukturálne, molekulárne a funkčné zmeny v nigrostriatálnom systéme. Nemotorické symptómy PD spojené s hipokampom však tiež významne ovplyvňujú kvalitu života pacientov [27]. Medzi tieto symptómy patrí demencia PD-typu, kognitívny deficit (pozornosť, plánovanie a rozhodovanie) a poruchy spánku, ktoré sú evidentné v ranej aj pokročilej fáze PD [28]. Iné nemotorické symptómy, ako sú hyposmia, nystagmus, zápcha, úzkosť, depresia a apatia, sa môžu objaviť ešte pred začiatkom motorických prejavov PD [29]. Niekoľko prác naznačuje kľúčovú interakciu medzi DA a hipokampálnou neuroplasticitou pri nemotorických symptómoch [4, 30, 31].

Synaptické mechanizmy, ktoré sú základom kognitívneho poškodenia pri PD, sú popísané v mnohých predklinických štúdiách [32, 33]. Predchádzajúce klinické analýzy ukázali akumuláciu Lewyho teliesok v CA2 oblasti hipokampu, čo korelovalo so závažnosťou kognitívnej poruchy u pacientov s PD [34, 35]. Niektoré staršie štúdie analyzujúce objemové zmeny a neurónové a gliové populácie v rôznych hipokampálnych oblastiach v rezoch farbených pomocou Giemsa [36] a krezylou violeťou [37] dospeli k záveru, že medzi skupinami pacientov s PD a bez PD neexistujú žiadne rozdiely [36]. Proteomické analýzy ukázali, ako akumulácia α -synukleínu ovplyvňuje homeostázu proteínov, čo vedie k bunkovej smrti DA neurónov [38].

V nedávnej klinickej štúdii od Villar-Conde et al. [35] bola v CA2 oblasti hipokampu detegovaná α -synukleinopatia bez zmien objemu hipokampu, neurodegenerácie, mikrogliózy alebo astrogliózy. Proteomickou analýzou autori identifikovali 83 proteínov, pomocou ktorých mohli jasne definovať rozdiely medzi skupinami pacientov s PD a pacientov bez PD. Niektoré proteíny (napr. δ 2-katenín a α 1-syntrofín) boli nadmerne regulované, zatiaľ čo iné (napr. transmembránový proteín 163 a caskin-1) mali zníženú reguláciu. Uvedené proteíny sú asociované so synaptickými štruktúrami v PD hipokampe, čo naznačuje, že hipokampálne zmeny pri PD nastávajú na úrovni synapsií. Nedávne pokroky v štúdiách skúmajúcich genetický základ génov pre rozvoj PD odhalili gény (napr. pre auxilín, synaptojanín 1, endofilín A1 a parkín), ktoré môžu súvisieť s narušením endocytózy synaptických vezikúl a prispievajú k patogenéze tohto ochorenia [39].

Roztrúsená skleróza (SM)

SM je progresívne autoimunitné, neurozápalové a ND nervového systému, ktoré vzniká v dôsledku autoimunitného "útoku" na myelinizované axóny. Tento autoimunitný proces spôsobuje zápal vedúci k poškodeniu oligodendrocytov a demyelinizácii v CNS [40]. Patologickým znakom SM sú perivaskulárne zápalové lézie, ktoré vedú k tvorbe demyelinizačných plakov [41, 42]. Väčšinu zápalového infiltrátu tvoria T-lymfocyty (dominujú CD8+ T-lymfocyty obmedzené na hlavný histokompatibilný komplex triedy I) spolu s menším počtom B-lymfocytov a plazmatických buniek [43]. U mnohých pacientov s SM je postihnutie hipokampu charakterizované demyelinizáciou, poškodením neurónov a synaptickými abnormalitami.

Demyelinizácia hipokampu je u pacientov so SM bežná a rozsiahla [44]. Kognitívny pokles je tiež typickým príznakom u pacientov so SM, a to aj v neprítomnosti motorického poškodenia [45]. Pacienti so SM často trpia dlhodobými poruchami pamäti [46], poruchami pozornosti a zníženou rýchlosťou spracovania informácií [47]. Medzi nemotorické aspekty SM patrí depresia a psychóza, ktoré sú spojené s dysfunkciou hipokampu a stratou konektivity s viacerými mozgovými oblasťami [48]. Demyelinizované hipokampy u pacientov so SM vykazujú negatívny vplyv na molekuly zodpovedné za axonálny transport, synaptickú integritu a plasticitu, homeostázu glutamátu, a narušajú procesy učenia a pamäti [44]. Tieto oblasti tiež vykazujú výrazný pokles v počte synapsií [49]. V SM hipokampoch boli zaznamenané zmeny v N-metyl-D-aspartátových receptoroch so selektívnym zvýšením interleukínu-1 β a aktiváciou mikroglie [50]. Karavasilis et al. [51] identifikovali rané štruktúrne zmeny v hipokampe u pacientov s SM, aj keď ešte nemali neuropsychologicky potvrdený pamäťový deficit. Pacienti so SM mali zníženú funkčnú konektivitu hipokampu, zníženú hustotu šedej hmoty hipokampu a narušenú integritu perforačnej dráhy. Podobné výsledky dosiahli aj Gu et al. [47], ktorí u pacientov s relaps-remitujúcou SM zistili, že funkčná konektivita a štruktúrne abnormality v hipokampe korelovali s úrovňou kognitívnych funkcií a rozsahom ochorenia. V hlodavčom modeli SM, Nooraei et al. [52] zistili, že úroveň

demyelinizácie korelovala s procesom priestorového učenia a pamäti. Títo autori tiež zaznamenali zvýšenie skóre neurologickej závažnosti. Demyelinizácia zvyšovala expresiu kaspázy-3 a znižovala expresiu nestínu, čo priamo korelovalo s rozsahom poškodenia [52].

Záver

Zdá sa, že fyziologická úloha hipokampu pri rozvoji rôznych ND je zásadná a narušenie jeho synaptickej plasticity spúšťa kaskádu rôznych reakcií vedúcich k progresii ochorenia. Pokrok v porozumení molekulárnych a bunkových mechanizmov, ktoré vedú k neurodegenerácii v hipokampe, poskytuje nové možnosti pre terapeutické intervencie. Cieľom budúceho výskumu by malo byť hľadanie spôsobov, ako zabrániť alebo zvrátiť tieto patologické zmeny, pričom by sa mali skúmať možnosti neuroprotektie, zníženia neurozápalu a podpory regenerácie neurónov. Vyvinutie účinných terapeutických stratégií môže významne zlepšiť kvalitu života pacientov postihnutých týmito ochoreniami a spomaliť progresiu ochorenia. Celkovo je jasné, že hlbšie porozumenie úlohe hipokampu v neurodegeneratívnych procesoch je nevyhnutné pre pokrok v liečbe týchto devastujúcich chorôb.

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

Literatúra

- [1] Chauhan, *Brisbane (AU): Exon Publications*. **2021**, 17–30 s., ISBN 978-0-6450017-9-2
- [2] Fogwe, *StatPearls Publishing*. **2023**, PMID: 29489273.
- [3] White, *Pediatr. Res.* **2024**, doi: 10.1038/s41390-024-03105-7
- [4] Weerasinghe-Mudiyanselage, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23:3349.
- [5] Soria Lopez, *Handb. Clin. Neurol.* **2019**, 167:231–255.
- [6] Fotuhi, *Mol. Biol. Rep.* **2020**, 47:4651–4657.
- [7] Reitz, *Biochem. Pharmacol.* **2014**, 88:640–651.
- [8] Liu, *J. Alzheimers Dis.* **2020**, 76:491–504.
- [9] Tsai, *Brain Struct. Funct.* **2020**, 225:751–761.
- [10] Kovalska, *Cells*. **2023**, 12/16:2087.
- [11] De Flores, *Neuroscience*. **2015**, 309:29–50.
- [12] Padurariu, *Psychiatr. Danub.* **2012**, 24:152–158.
- [13] Sampath, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2017**, 13:1509–1519.
- [14] Skaper, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. **2017**, 16:220–233.
- [15] Scheff, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1998**, 57:1146–1153.
- [16] Volpicelli-Daley, *Neuron*. **2011**, 72:57–71.
- [17] Talantova, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2013**, 110:E2518–E2527.
- [18] Counts, *Neuropharmacology*. **2014**, 79:172–179.
- [19] Cuestas Torres, *Rev. Neurosci.* **2020**, 31:245–268.
- [20] Scheff, *Neurology*. **2007**, 68:1501–1508.
- [21] Zhang, *Hippocampus*. **2017**, 27:1250–1263.
- [22] Kovalska J. *Physiol. Pharmacol.* **2015**, 66/6:887–97.
- [23] Sun, *Brain Res.* **2018**, 1697:1–9.
- [24] Selkoe, *Science*. **2002**, 298:789–791.
- [25] Oddo, *Neuron*. **2003**, 39:409–421.
- [26] Dorsey, *Lancet Neurol.* **2018**, 17:939–953.
- [27] Barone, *Int. Rev. Neurobiol.* **2017**, 133:499–516.
- [28] Regensburger, *Neural Plast.* **2014**, 2014:454696.
- [29] Barone, *Mov. Disord.* **2009**, 24:1641–1649.
- [30] Leentjens, *Mov. Disord.* **2003**, 18:414–418.
- [31] Ballanger, *Mov. Disord.* **2012**, 27:84–89.
- [32] Wang, *Neurotherapeutics*. **2019**, 16:1210–1224.
- [33] Esmaeili-Mahani, *J. Chem. Neuroanat.* **2021**, 111:101884.
- [34] Armstrong, *J. Neural. Transm.* **2014**, 121:171–181.
- [35] Villar-Conde, *J. Parkinsons Dis.* **2021**, 11/3:1345–1365.
- [36] Joelving, *Hippocampus*. **2006**, 16:826–833.

- [37] Harding, *Ann. Neurol.* **2002**, 51:125–128.
- [38] Dixit, *Cell. Mol. Neurobiol.* **2019**, 39:901–915.
- [39] Nguyen, *Trends Neurosci.* **2019**, 42:140–149.
- [40] Cotsapas, *Handb. Clin. Neurol.* **2018**, 148:723–730.
- [41] Kobelt, *Mult. Scler. J.* **2017**, 23:1123–1136.
- [42] Karussis, *J. Autoimmun.* **2014**, 48–49:134–142.
- [43] Lassmann, *J. Neurol. Sci.* **2013**, 333:1–4.
- [44] Dutta, *Ann. Neurol.* **2011**, 69:445–454.
- [45] Chiaravalloti, *Lancet Neurol.* **2008**, 7:1139–1151.
- [46] Gaudino, *Neuropsychiatry Neuropsychol. Behav. Neurol.* **2001**, 14:32–44.
- [47] Gu, *Neural Regeneration Research.* **2022**, 17/5:1115–1124.
- [48] Rocca, *Lancet Neurol.* **2018**, 17:918–926.
- [49] Michailidou, *Ann. Neurol.* **2015**, 77:1007–1026.
- [50] Di Filippo, *Neurobiol. Dis.* **2013**, 52:229–236.
- [51] Karavasilis, *Brain Imaging Behav.* **2019**, 13/4:1049–1059.
- [52] Nooraei, *Brain Behav.* **2022**, 12/8:e32723.

Terapeutický potenciál nanočastíc konjugovaných s fytochemikáliami v predklinických modeloch gynekologických nádorových ochorení

Lacková, L.¹, Mazuráková, A.², Samec, M.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; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin
lenka.lackova@uniba.sk

Abstract

In women, many gynecologic malignancies can lead to death. The main reason of cancer related death is primarily high heterogeneity of tumors that often cause treatment failure. Despite many used conventional therapies (chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy), drug resistance often occurs, especially due to the survival of resistant cancer stem cells. Therefore, it is still important to develop the novel therapeutic drugs. Nanotechnology is a potential strategy to overcome multidrug resistance and disease progression. Specifically designed nanoparticles can act as the carriers for targeted drug delivery into tumor sites. Besides, plant-based food rich in phytochemicals exerts many anticancer properties, including antioxidant, proapoptotic, anti-inflammatory, anti-angiogenic and other health benefits. Thanks to their positive properties, phytochemical-based nanodrugs can enhance therapeutic efficacy, improve cellular uptake of these agents in tumor sites, decrease the multidrug resistance, and mitigate the side effects of toxic therapies. Many preclinical studies have described the anticancer effects of phytochemical-based nanodrugs in gynecologic malignancies, what can lead to new potential way in cancer treatment.

Keywords: nanodrugs, nanoparticles, phytochemicals, gynecologic cancer

Úvod

Podľa štatistickej analýzy rakoviny (GLOBOCAN 2020) sa v ženskej populácii umiestnila rakovina prsníka na prvom mieste z hľadiska incidence ako aj mortality. Na popredných priečkach zaujali miesto aj ďalšie gynekologické malignity: rakovina krčka maternice, ovariálny alebo endometriálny karcinóm. Tieto nádorové ochorenia spôsobujú každoročne mnohé úmrtia, najmä v dôsledku vysokej heterogenity nádorov, ktorá z dôvodu liekovej rezistencie vedie k zlyhaniu konvenčných terapií, čo umožňuje progresiu ochorenia [1]. Z tohto dôvodu je veľmi dôležitý neustály vývoj nových protinádorových liečiv.

Nanotechnológie sú široko využívané v rôznych oblastiach: v kozmetike, elektronike, ale aj v diagnostických a terapeutických medicínskych aplikáciách. Práve za posledných niekoľko desaťročí sa výrazne rozšírila oblasť nanomedicíny [2]. Nanomedicína zahŕňa použitie rôznych nanočastíc (1-1000 nm), ktoré sú nadizajnované tak, aby sa cielene dodávali do miest nádorov, ale bez poškodenia okolitých zdravých tkanív [3].

Rastlinná strava bohatá na fytochemikálie vykazuje mnohé protinádorové účinky: antioxidantné, proapoptotické, anti-inflamačné, anti-angiogénne, anti-metastatické alebo anti-genotoxické. Napriek mnohým zdravím prospešným účinkom fytochemikálií môže byť terapeutická účinnosť znížená, nakoľko majú nízku biologickú dostupnosť a sú ťažšie rozpustné vo vode [4]. Práve enkapsulácia fytochemikálií do nanonosičov

by mohla zvýšiť ich účinnosť. Špecificky nadizajnované nanonosiče by mohli predstavovať potenciálny systém dodávania liečiva, čím sa umožní jeho špecifické uvoľňovanie až v cieľovom mieste (v nádorových bunkách) [5].

Nanočastice

Výhodou nanočastíc je ich malý rozmer (1-1000 nm), čo im umožňuje prekonať rôzne biologické bariéry v tele (bunka, jadro) [6]. Skladajú sa z vnútorného a vonkajšieho jadra. Vnútorne jadro pozostáva z micel, magnetických nanočastíc, lipozómov, uhlíkových nanorúrok, kvantových bodiek alebo dendrimérov. Vonkajšie jadro tvorí ochranný obal pre lepšiu biologickú kompatibilitu a biologickú odbúrateľnosť. Najčastejšie používanými obalmi sú polyméry PLGA (z angl. poly(lactic-co-glycolic acid)) a PEG (z angl. polyethylene glycol) [2]. Na povrch nanočastíc sa viažu ligandy (liečivo, miRNA, siRNA, ssDNA, protilátky, peptidy...), ktoré sú nadizajnované tak, aby boli schopné špecificky zacieliť nádorové bunky, napr. prostredníctvom selektívnej väzby na nadmerne exprimované receptory [7].

Nanočastice sa pripravujú dvoma spôsobmi: stratégiou zdola nahor (bottom-up) alebo stratégiami zhora nadol (top-down). Stratégia zdola nahor je založená na spájaní atómov do nanočastíc, napríklad ko-precipitáciou, sol-gélovou metódou, chemickou redukciou, hydrotermálnou metódou, pyrolýzou, depozíciou alebo biologickou metódou, tzv. zelenou syntézou. Stratégia zhora nadol predstavuje fyzickú degradáciu materiálu produkujúcu menšie molekuly až výsledné nanočastice. Najčastejšie sa využíva vysokoenergetické mechanické mletie, laserová ablácia, tepelné odparovanie alebo metóda oblúkového výboja [8].

Protinádorová terapia nanoliečivami

Americký Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (FDA, z angl. US Food and Drug Administration) schválil mnohé liečivá na liečbu niektorých typov nádorových ochorení. FDA-schválené nanoliečivá majú rôzne špecifické zacielenie, napríklad na poškodenie DNA, imunostimuláciu, syntézu proteínov, inhibíciu hormónov alebo mikrotubulov [9]. Okrem toho, akumulácia nanočastíc v mieste nádoru tiež spôsobuje poškodenie a dysfunkciu mitochondrií, zvýšenú expresiu apoptotických faktorov, oxidáciu enzýmov a proteínov, denaturáciu proteínov, rozklad ribozómov, generovanie reaktívnych foriem kyslíka (ROS), resp. prerušenie transportu elektrónov [10]. V roku 1995 bol prvým FDA-schváleným nanoliečivom Doxil®, PEG-lipozomálny doxorubicín, na liečbu metastatického karcinómu vaječníkov a Kaposiho sarkómu [11]. Na liečbu rôznych druhov nádorových ochorení boli neskôr FDA-schválené aj metalické nanočastice (Aurimmune®, AuNPs®), polymérové konjugáty (Eligard®, SMANCS), lipidové nanoformulácie (Marqibo®, Doxil®), rekombinantné vírusy (Gendicine®) alebo aj bylinné nanočastice (nanoformulovaný kurkumín) [9].

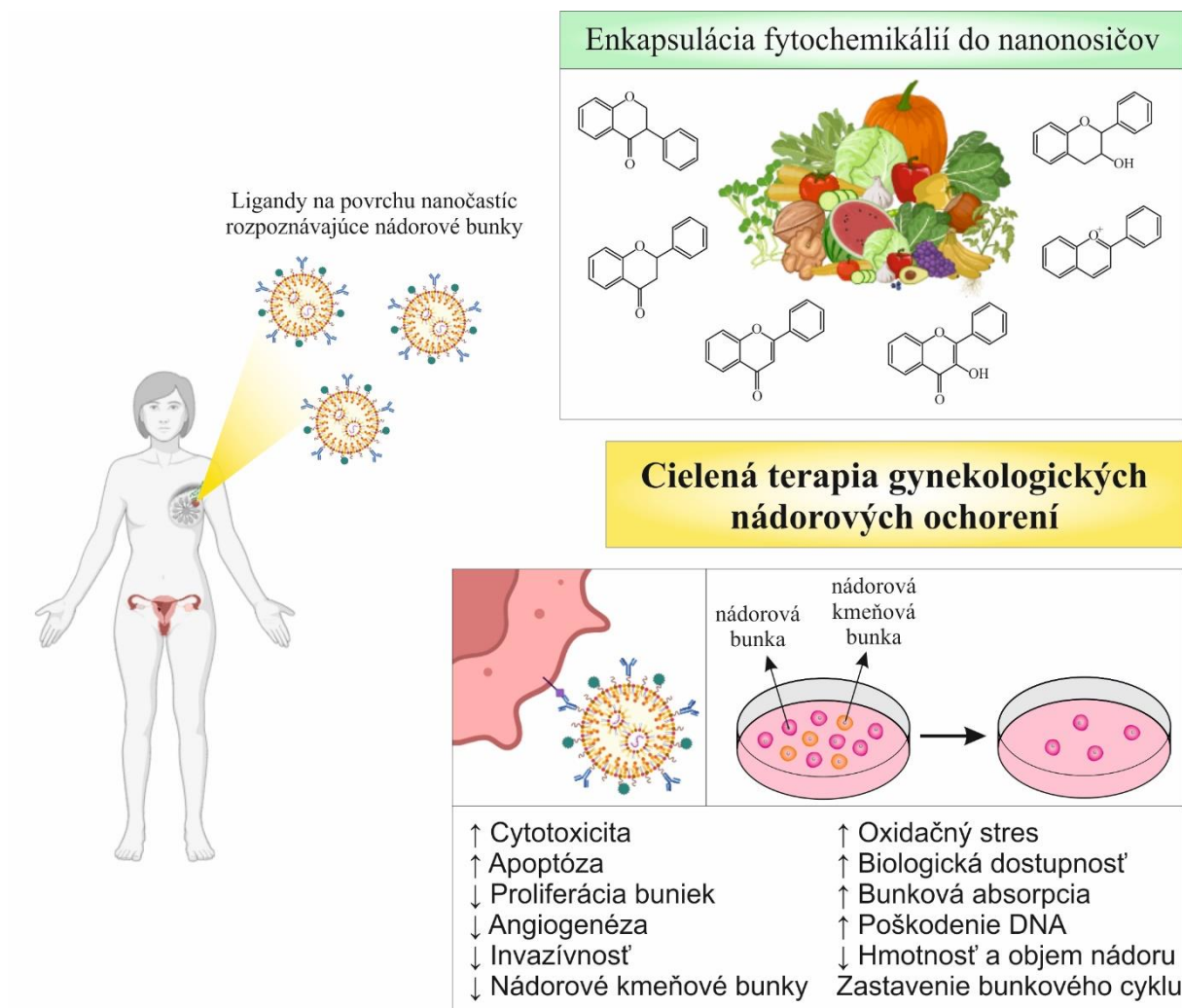
Nanočastice konjugované s fytochemikáliami v predklinických štúdiách gynekologických nádorových ochorení

Fytochemikálie sú biologicky aktívne látky, ktoré sa bežne vyskytujú v zelenine, ovocí, obilninách alebo orechoch. Rozdeľujeme ich do piatich základných skupín: fenoly, karotenoidy, alkaloidy, organosírne a dusíkaté zlúčeniny [12]. Vďaka ich zdraviu prospešným protinádorovým a antioxidačným účinkom sú vhodnými kandidátmi na liečbu nádorových ochorení [10]. Tabuľka 1 zahŕňa prehľad predklinických štúdií zameraných na nanočastice konjugované s fytochemikáliami v *in vitro* a *in vivo* modeloch gynekologických nádorových ochorení a Obrázok 1 ilustruje mechanizmus týchto protinádorových účinkov.

Tabuľka 1 Predklinické štúdie protinádorových účinkov nanočastíc konjugovaných s fytochemikáliami

Nanočastice konjugované s fytochemikáliami	Experimentálny dizajn	Protinádorový účinok	Zdroj
Resveratrol-nanočastice zlata	Ľudské MDA-MB-231 nádorové bunky rakoviny prsníka	↑ Biologická dostupnosť, ↓ životaschopnosť buniek, ↑ bunková absorpcia	[13]
Kyselina listová-BSA-difluórovaný kukrumín	Ľudské SKOV-3 bunky rakoviny vaječníkov a HeLa bunky rakoviny krčka maternice	Zacielenie na folátový receptor: ↑ apoptóza, ↓ životaschopnosť buniek, synergizmus a zvýšený účinok kombinácie terapie	[14]
Kurkumín-PGS	Ľudské HPV18+ a HeLa bunky rakoviny krčka maternice	↑ Cytotoxická, ↑ apoptóza, ↑ p53, ↑ p21, ↑ Bax, ↓ HPV E6 onkogén, ↑ kaspáza-3, ↑ PARP, zastavenie bunkového cyklu	[15]
Nanočastice zlata-witanolid-A	Ľudské SKBR-3 bunky rakoviny prsníka	↑ Antiproliferatívne účinky, ↓ rast buniek, ↑ bunková absorpcia, ↓ životaschopnosť buniek	[16]
Quercetín-chitosan-oxid meďnatý	Ľudské MCF-7 bunky rakoviny prsníka; DMBA-indukovaná mamárna karcinogéza u samíc Sprague-Dawley potkanov	<i>In vitro</i> : ↑ cytotoxický účinok <i>In vivo</i> : ↓ hmotnosť a objem nádoru prsníka, ↓ proliferácia, ↓ PCNA gén, ↑ apoptóza, ↑ p53, ↑ uvoľňovanie cytochrómu c, ↑ kaspáza-3, zastavený bunkový cyklus v G2/M fáze	[17]
Oxid zinočnatý-quercetín	Ľudské PA-1 bunky rakoviny vaječníkov	↑ Oxidačný stres, depolarizácia mitochondriálnej membrány, ↑ neskorá apoptóza, aktivácia vnútornej signálnej dráhy apoptózy	[18]
Selénové nanočastice-Apigenín	Ľudské MCF-7 nádorové bunky rakoviny prsníka	↓ Proliferácia buniek, ↓ životaschopnosť buniek, ↑ oxidačný stres, ↑ reaktívne formy kyslíka, ↑ apoptóza, ↓ Bcl-2, ↑ Bax, ↑ kaspáza-3, ↑ uvoľňovanie cytochrómu c, ↑ poškodenie DNA	[19]
Kyselina hyalurónová-PLGA-paclitaxel-kurkumín	MCF-7 agregáty epitelových kmeňových buniek prsníka a MCF-7 xenografty myší Balb/c	↓ Populácia nádorových kmeňových buniek, ↓ tvorba agregátov epitelových kmeňových buniek prsníka, ↓ migrácia, ↓ rast, zacielenie na CD44 a ALDH1	[20]
Kurkumín-naringenín-dextran-magnetické nanočastice	Ľudské MCF-7 nádorové bunky rakoviny prsníka; DMBA-indukovaná mamárna karcinogéza u potkanov	↓ Proliferácia, ↑ apoptóza, ↑ reaktívne formy kyslíka, ↑ P53, ↑ P21, ↓ TNFα, ↓ objem nádoru, zastavenie bunkového cyklu, ↓ CD44	[21]
Sulforafan-mineralizovaná kyselina hyalurónová-SS-tetradecyl	MDA-MB-231, Hs578t a MCF7 bunky rakoviny prsníka; MDA-MB-231 xenografty myší Balb/C	↓ rast nádoru, ↓ invazívnosť, ↓ samoobnovenie nádorových kmeňových buniek, ↓ CD44, ↓ CD133, ↓ Bmi1	[22]
Quercetín-PLGA	HeLa bunky rakoviny krčka maternice a MCF-7 nádorové bunky rakoviny prsníka; DMBA-indukovaná mamárna karcinogéza u samíc Sprague-Dawley potkanov	<i>In vitro</i> : ↓ životaschopnosť ľudských nádorových línií, ↑ apoptóza, ↓ PI3K/AKT, ↑ FoxO1, ↑ kaspáza-3, ↑ kaspáza-7 <i>In vivo</i> : ↓ priemerný počet nádorov, predĺženie obdobia latencie	[23]

Vysvetlivky: ↑ zvýšený; ↓ znížený; BSA, bovine serum albumin; PGS, poly(glycerol sebacate); PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid); DMBA, 7,12-dimetylbenz[a]-antracén



Obrázok 1 Mechanizmus protinádorových účinkov nanočastíc konjugovaných s fytochemikáliami v gynekologických nádorových ochoreniach. Obrázok bol vytvorený prostredníctvom BioRender a CorelDRAW

Záver

Nanočastice konjugované s fytochemikáliami predstavujú terapeutický potenciál pre klinickú aplikáciu. Ich použitie môže zvýšiť efektívnosť protinádorových terapeutických stratégií, zmierniť ich vedľajšie toxické účinky alebo zlepšiť bunkovú absorpciu terapeutických látok v mieste nádoru. Podľa predklinických štúdií môžu tiež špecificky zacieliť nádorové kmeňové bunky, čím by sa mohla znížiť lieková rezistencia, riziko relapsu nádoru a potenciálneho metastatického šírenia. Ich využiteľnosť však závisí od rôznych faktorov, ktoré je potrebné detailne preskúmať. Takýmito faktormi je veľkosť a tvar nanočastíc, povrchová funkčnosť, fyzikálne a chemické vlastnosti, rozpustnosť, stabilita, vylučovanie nanočastíc z tela, účinnosť liečiva, možná toxicita nanonosičov, resp. ich potenciálna distribúcia do rôznych orgánov.

Literatúra

- [1] Sung, *CA Cancer J. Clin.* **2021**, 71/3:209–249.
- [2] Najahi-Missaoui, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 22/1:385.
- [3] Patra, *J. Nanobiotechnology.* **2018**, 16/1:71.
- [4] Koklesová, *EPMA J.* **2020**, 11/2:261–287.
- [5] Kumar, *Chem. Biol. Interact.* **2022**, 351:109745.

- [6] De Jong and Borm, *Int. J. Nanomedicine* **2008**, 3/2:133–49 .
- [7] Sun, *Engew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53/46:12320–64.
- [8] Nagarajan, *Am. Chem. Soc.* **2008**, 996:2–14.
- [9] Alphandéry, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2015**, 15/10:1233–55.
- [10] Koklesova, *Front Pharmacol.* **2023**, 14:1121950.
- [11] Barenholz, *J. Control Release.* **2012**, 160/2:117–34.
- [12] Liu, *J. Nutr.* **2004**, 134:3479S–3485S.
- [13] Thipe, *Int. J. Nanomedicine.* **2019**, 14:4413–4428.
- [14] Gawde, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **2018**, 167:8–19.
- [15] Massironi, *Molecules.* **2022**, 27/20:6997.
- [16] Tabassam, *Int. J. Nanomedicine.* **2020**, 15:6649–6658.
- [17] Elsayed, *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 185:134–152.
- [18] Ramalingam, *Life Sci.* **2022**, 309:121022.
- [19] Al-Otaibi, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2022**, 29:47539–47548.
- [20] Yang, *J. Mater. Chem. B.* **2017**, 5:6762–6775.
- [21] Askar, *Tumor Biol.* **2021**, 43:225–247.
- [22] Gu, *Carbohydr. Polym.* **2021**, 269:118294.
- [23] Yadav, *Pharmaceutics.* **2022**, 14/7:1326.

Vývoj pečeňových sínusoid

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

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

Abstract

The vascular system represents an important part of the developing liver. The first hepatic vessels in the hepatic primordium are the hepatic sinusoids and portal veins, while the central veins and portal arteries are formed later. The endothelium of blood vessels is specific in different regions of the developing liver. It is probably related to the hematopoietic function of this organ. In the early stages of development, the hepatic sinusoids are lined by a continuous endothelium. But its structure subsequently changes and becomes permeable to blood cells and regulatory molecules. The subendothelial basement membrane disappears, the composition of the extracellular matrix changes, and in the endothelial cells the fenestrations are formed. Towards the end of prenatal ontogeny, the size of fenestrations in the endothelial cells gradually decreases, and their structure and phenotype approach those of mature endothelial cells.

Keywords: development, endothelial cells, liver sinusoids, fenestration

Úvod

Tvorba pečeňového púčika je sprevádzaná formovaním jeho cievneho systému, ktorý sa vyvíja kombináciou procesov ako je vaskulogenéza a angiogenéza [8, 14, 17]. Len čo sa z entodermu predného čreva vyvine hepatálne divertikulum, obklopie ho angioblasty alebo endotelové bunky a oddelia ho od mezenchýmu *septum transversum* [14, 21, 26]. Ako prvé cievy sa objavujú pečeňové sínusoidy, ktoré pochádzajú z už existujúcich vitelinných ciev [22], kým centrálné vény a portálne (inierbulárne) artérie sa vytvoria neskôr [8]. Z literatúry je známe, že cievny systém zahŕňa heterogénny súbor špecializovaných endotelových buniek (EB) [7]. Táto diverzita je spôsobená jedinečnou schopnosťou EB prispôbiť sa mikroprostrediu a plniť špecifické bunkové a metabolické procesy, ktoré sú charakteristické pre každý orgán. Okrem interorgánovej heterogenity majú EB aj pozoruhodnú vnútroorgánovú diverzitu, ktorú možno pozorovať práve v pečeni [7]. Predpokladá sa, že to súvisí s hematopoetickou funkciou tohto orgánu počas perinatálneho vývoja jedinca [16].

Pečeňové sínusoidy u dospelých jedincov patria medzi najviac diferencované cievy [2]. Prebiehajú medzi trámami hepatocytov z periferie pečeňového lalôčika smerom k *vena centralis*. Pečeňové sínusoidy riadia obojsmernú výmenu látok medzi hepatocytmi a krvou. Ich endotelová výstelka je tvorená fenestrovanými endotelovými bunkami, ktoré sú oddelené od susedných hepatocytov Disseho priestorom. V pečeni zdravých jedincov sa pod endotelom netvorí žiadna organizovaná subendotelová bazálna membrána. Avšak Disseho priestor obsahuje veľké množstvo extracelulárneho matrixu (ECM), ktorého zloženie je vysoko špecifické. Neobsahuje klasické laminíny, ale je bohatý na kolagény (typu I, III, IV, VI a XVIII), fibronektín, tenascín a syndekány [2, 3, 4]. Endotel pečeňových sínusoid sa vyznačuje aj veľmi špecifickým imunofenotypom, ktorý ich odlišuje od ostatných populácií endotelových buniek v tele jedinca [2, 12]. Chýba im niekoľko typických mikrovaskulárnych endotelových markerov, ako je CD34, PECAM-1 alebo CD31. Ale na rozdiel od toho

exprimujú iné, pre pečeňové sínusoidy charakteristické markery (CD4, ICAM-1 a iné) [15].

Ako už bolo spomenuté, počas hepatogenézy sa ako prvé cievy objavujú práve pečeňové sínusoidy. Vaskularizácia pečeňového primordia u myši začína už na 8,5 - 10 embryonálny deň (ED), keď sa medzi mezenchýmom *septum transversum* a pečeňovým divertikulom objavujú primitívne sínusoidné štruktúry, vystlané EB [5, 19]. Ako vyplýva z literatúry, pôvod EB pečeňových sínusoid nie je úplne jasný [2-Collardeau-Frachon 2008]. Predpokladá sa, že pečeňové sínusoidy pochádzajú z už existujúcich kapilárnych ciiev v *septum transversum*, ktoré je obklopené rýchlo rastúcimi trámami hepatocytov. Podľa inej teórie pečeňové sínusoidy vznikajú z už existujúcich ciiev *venae vitellinae*, *venae umbilicales et venae cardinales* [19, 23]. Ďalšie štúdie poukázali, že časť EB pečeňových sínusoid pochádza z hemangioblastov [10, 24, 27].

Diferenciácia pečeňových sínusoid bola podrobne opísaná pomocou rôznych morfológických metód, ako je elektrónová mikroskopia a imunohistochemia. Ako už bolo spomenuté, vaskularizácia pečeňového primordia začína u myši už na 8,5 ED, kým u človeka približne na 4. gestačný týždeň. Endotelová výstelka je spočiatku súvislá, bez fenestrácií s bazálnou membránou [18]. Extracelulárny matrix v Disseho priestore obsahuje zložky, ktoré sú charakteristické pre subendotelovú bazálnu membránu (vrátane laminínov). Endotelové bunky obsahujú charakteristické markery endotelových buniek, ako sú CD34 a CD31, ale chýbajú im markery charakteristické pre endotelové bunky pečeňových sínusoid [3]. Medzi 5. a 12. gestačným týždňom nastávajú výrazné zmeny v štruktúre sínusoid. Medzi 8. a 10. gestačným týždňom ECM v Disseho priestore už neobsahuje niektoré zložky, ako je napríklad laminín [2, 3]. V tom istom období endotelová výstelka nadobúda cytoplazmatické fenestrácie [5]. Na 12. gestačný týždeň sú fenestrácie prekryté diafragmou, ktorá počas ďalšieho vývoja vymizne [5, 9].

U zvieracích modelov, bol vývoj fenestrácií v endotelových bunkách pečeňových sínusoid pozorovaný na 17. ED u potkana a na 15. ED u myši [5]. U potkanov boli fenestrácie v endotelových bunkách veľké a dosahovali priemer viac ako 250 nm. Boli oveľa väčšie ako fenestrácie pozorované v pečeni dospelých jedincov [1]. Mnohí autori pozorovali, že v tomto procese má dôležitú úlohu rastový faktor VEGF (vaskulárny endotelový rastový faktor), ktorý je obzvlášť dôležitý pri indukcii tvorby fenestrácií [25], ako aj pri ich udržiavaní [2, 6]. Ďalšie štúdie poukázali na rozsiahle zmeny v medzibunkových kontaktoch, čo bolo sprevádzané výraznými zmenami aj v ECM, ktorý bol chudobný na laminín a bohatý na tenascín [3, 4]. Tieto zmeny boli pozorované v čase, kedy v pečeni začala prebiehať hematopoéza. V tomto štádiu vývoja mali pečeňové sínusoidy podobnú štruktúru ako sínusoidy v kostnej dreni. Táto prvá etapa diferenciácie pečeňových sínusoid je nevyhnutná na prispôsobenie sa ciiev hematopoetickej funkcii tohto orgánu [2]. V ďalšej fáze bunky získavajú špecifické markery ako je CD4 (v 12. týždni gravidity u človeka) a CD14 (v 20. týždni gravidity u človeka), ktoré sú charakteristické pre bunky v postnatálnom období [3]. Tretie štádium diferenciácie pečeňových sínusoid zahŕňa perinatálne obdobie. U potkanov bolo zistené, že definitívna štrukturálna diferenciácia pečeňových sínusoid v perinatálnom období je sprevádzaná vymiznutím veľkých fenestrácií v EB [1].

Ako vyplýva z literatúry, vaskulárna zložka pečeňového primordia má dôležitú úlohu aj pri samotnej diferenciácii pečene [13]. V experimentoch, kde boli použité transgénne myši s deficitom VEGFR2 (jeden z receptorov angiogénneho faktora VEGF), vývoj pečene prebiehal až do vytvorenia viacvrstvého epitelu na ventrálnej časti predného čreva. Avšak v neprítomnosti endotelových buniek došlo k narušeniu migrácie

hepatocytov do *septum transversum*, čo následne viedlo k absencii plne vyvinutého pečenevého primordia [14]. Rovnaké výsledky boli pozorované aj v *in vitro* experimentoch, keď bola tvorba ciev v pečenevom púčiku inhibovaná, čo následne spôsobilo narušenie rastu pečenevých buniek [2, 14]. Tieto experimenty poukazujú na dôležitú signálnu úlohu EB v počiatočných štádiách hepatogenézy [2]. Dôležitú úlohu v tomto procese zohrávajú aj extracelulárne proteíny ako je BMP (kostný morfogenetický proteín) [20], FGF (fibroblastový rastový faktor) [11] a TGFbeta (transformujúci rastový faktor beta) [13].

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

Literatúra

- [1] Barbera-Guillem, J. *Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **1986**, 97:197–206.
- [2] Collardeau-Frachon, *Anat. Rec. (Hoboken)*. **2008**, 291/6:614–27.
- [3] Couvelard, *Blood*. **1996**, 148:165–175.
- [4] Couvelard, *Hepatology*. **1997**, 39:336–349.
- [5] Enzan, *Microsc. Res. Tech.* **1997**, 39:336–349.
- [6] Funyu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 280:481–485.
- [7] Goldman, *Stem Cell Reports*. **2014** 14/3:556–565.
- [8] Gouysse, J. *Hepatology*. **2002**, 37:730–740.
- [9] Herrnberger, *PLoS One*. **2014**, 9:1–26.
- [10] Jaffredo, *Exp. Hematol*, **2005**, 33:1029–1040.
- [11] Jung, *Science*. **1999**, 284:1998–2003.
- [12] Lalor, *World J. Gastroenterol.* **2006**, 12:5429–5439.
- [13] Lammert, *Mech. Dev.* **2003**, 120:59–64.
- [14] Matsumoto, *Science*. **2001**, 294:559–563.
- [15] Mouta Carreira, *Cancer Res.* **2001**, 61:8079–8084.
- [16] Payushina, *ISRN Cell Biology, International Scholarly Research Network*. **2012**, 1–7.
- [17] Perez-Pomares, *Dev. Dyn.* **2004**, 229:465–474.
- [18] Poisson, J. *Hepatology*. **2017**, 66/1:212–227.
- [19] Rahmawati, *Stem Cell Res. Ther.* **2023**, 30;14/1:1–14.
- [20] Rossi, *Genes. Dev.* **2001**, 15:1998–2009.
- [21] Shiojiri and Sugiyama, *Hepatology*. **2004**, 40:346–355.
- [22] Soares-da-Silva, *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, 22/8:1–20.
- [23] Swartley, *Toxicol. Pathol.* **2016**, 44:705–25.
- [24] Walter, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2014**, 306:849–862.
- [25] Yokomori, *Liver*. **2003**, 23:467–475.
- [26] Zhao, *Hepatology*. **2005**, 41/5:956–967.
- [27] Zovein, *Cell Stem Cell*. **2008**, 3:625–636.

**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**