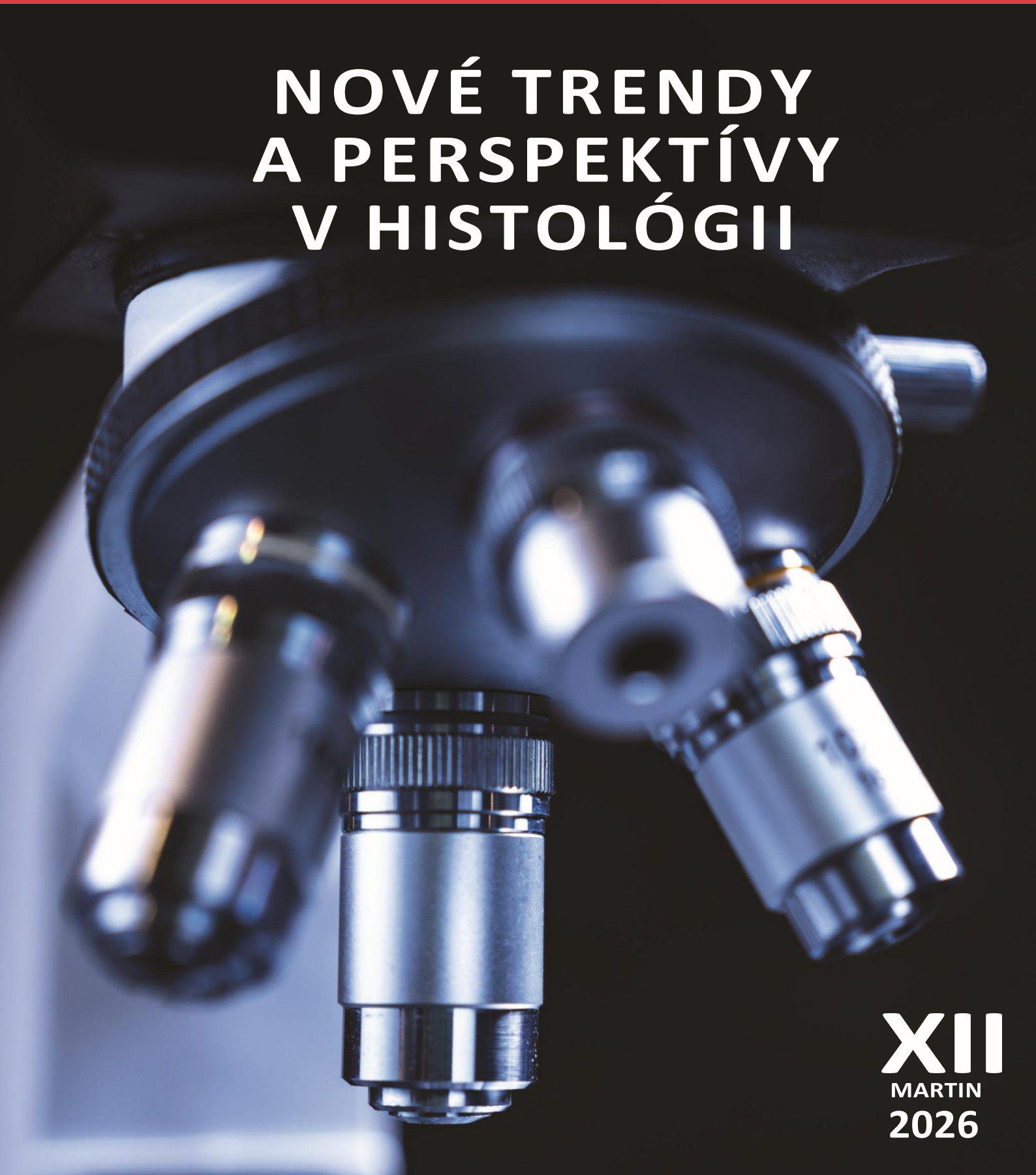
UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA UK V MARTINE
ÚSTAV HISTOLÓGIE A EMBRYOLÓGIE JLF UK

NOVÉ TRENDY A PERSPEKTÍVY V HISTOLÓGII



XII
MARTIN
2026

Na základe posúdenia recenzentov povoľujem vydanie recenzovaného vedeckého zborníka:

„Nové trendy a perspektívy v histológií XII“,

ktorý obsahuje príspevky autorov z viacerých univerzít a vedeckých pracovísk a bol pripravený pod vedením Ústavu histológie a embryológie JLF UK v Martine, Univerzity Komenského v Bratislave ako organizačného garanta.

V Martine, dňa 26.6.2026

RNDr. Veronika Mešťanová, PhD.
vedúca Ústavu histológie a embryológie
Jesseniova lekárska fakulta UK v Martine
Univerzita Komenského v Bratislave

Nové trendy a perspektívy v histológii XII
Recenzovaný zborník prác

Editori:	**RNDr. Veronika Mešťanová, PhD.** **Ing. Bibiana Krajňáková, PhD.**
Recenzenti:	**prof. MUDr. Katarína Adamicová, PhD.** **doc. MVDr. Štefan Tóth, PhD.**
Grafická úprava:	**Ing. Bibiana Krajňáková, PhD.**
Obálka zborníka:	**Mgr. Miloš Hrabovský**

Zborník neprešiel jazykovou korektúrou.
Za obsahovú, ako aj gramatickú stránku zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov.
Všetky práva vyhradené. Žiadna časť tohto zborníka nemôže byť reprodukovaná bez súhlasu vydavateľa.

Vydavateľ:	Jesseniova lekárska fakulta v Martine, UK v Bratislave
Dostupnosť on-line:	http://www.jfmed.uniba.sk

ISBN 978-80-8187-187-0

EAN 9788081871870

Táto publikácia vznikla vďaka podpore projektu: „Simulačné centrum Jesseniovej lekárskej fakulty UK v Martine“, kód projektu: 401101B754. Tento projekt je spolufinancovaný Európskou úniou v rámci Programu Slovensko.

„Najkrajšia vec, ktorú môžeme zažiť, je tajomstvo. Je zdrojom všetkého pravého umenia a celej vedy.“

Albert Einstein

OBSAH

KLINICKO-MORFOLOGICKÉ ŠTÚDIE		
Bartoš V.	Extrauterinný lipoleiomyóm vyrastajúci z parietálneho peritonea prednej brušnej steny: kazuistika	**6**
Blaha T.	Prežívanie pacientov so sval neinfiltrujúcim nádorom močového mechúra	**13**
Hurníková J.	ICC and IHC Detection of hVEGF in rAAV-hVEGF Transduced *In Vitro* and *In Vivo* Models	**18**
Kuffa V.	Vzťah PI-RADS skóre k výskytu klinicky signifikantného karcinómu prostaty	**23**
Mazuráková A.	*Ossa suturarum*: observačná štúdia morfologických nálezov a prehľad literatúry	**28**
Mokrá D.	Hodnotenie edému a apoptózy epitelových buniek pľúc králikov s modelom akútneho poškodenia pľúc – porovnanie dvoch typov CMV ventilátorov	**33**
Neuschlová M.	FeNO a periférna eozinofília ako biomarkery zápalu typu 2 u detí s astmou	**37**
Samec M.	Účinok SGLT2 inhibítorov na klonogénny potenciál metastatickej línie kolorektálneho karcinómu	**43**
Ševčíková Z.	Neobvyklý prípad mačky infikovanej felínnym leukemickým vírusom	**48**
PREDKLINICKÉ ŠTÚDIE		
Andrašková S.	Vplyv prenatálnej expozície mikrovlnného žiarenia na semenníky peripubertálnych samcov potkanov	**53**
Andrejčáková Z.	Imunohistochemická analýza HSP 70 u výkrmových ošípaných po aplikácii ľanového semena do krmiva	**57**
Babjáková D.	Vplyv suplementácie n-3 PNMK (DHA, EPA) a enterolaktónu na expresiu oxytocínových receptorov v maternici myší	**61**
Bálentová S.	Vplyv ionizujúceho žiarenia na populáciu Kupferových buniek v pečeni za experimentálnych podmienok	**66**
Demčišáková Z.	Fosfohistón H3 ako marker bunkovej proliferácie pri hodnotení biokompatibility v CAM modeli	**69**
Galajda R.	Štrukturálne zmeny na orgánoch modelového organizmu *Neocaridina davidi* po expozícii acetamipridom	**73**
Holovská K.	Štruktúra prídavných lalokov v lumbosakrálnej oblasti u kuracieho embrya na 14. embryonálny deň	**78**
Krepelková Z.	Makroskopické a histopatologické hodnotenie pokročilých ulcerácií pars oesophagea u výkrmových ošípaných	**82**
Pokorná B.	Histologická analýza zmien zásob glykogénu v pečeni kuracích embryí po expozícii etanolu	**87**

Polláková M.	Histologické hodnotenie vaskulárnych zmien indukovaných jedom africkej „pľuvajúcej kobry“ druhu *Naja nigricincta woodi* na modeli kuracej chorioalantoickej membrány	**92**
Schwarzbacherová V.	Analysis of the genotoxic and cytotoxic effect of a mixture of miconazole-nitrate and acetamiprid in bovine lymphocytes *in vitro* after prolonged exposure	**99**
Szabó I.	Morfologické a degeneratívne zmeny epitelu ventrikula u *Apis mellifera* spôsobené infekciou *Nosema spp*.	**104**
Šarocká A.	Účinky čerstvých a sušených plodov rakytníka rešetliakového na hustotu osteocytov a lakún u ZDF potkanov	**109**
Štefancová S.	Vplyv preinkubácie na moduláciu embryonálneho vývinu a expresiu adiponektínu v prsnom svale kurčaťa	**114**
PREHĽADOVÉ ŠTÚDIE		
Dobšovičová M.	Biotin-Dependent Carboxylases in Brain Tumor Metabolism: Pyruvate Anaplerosis, BCAA Catabolism, Lipogenesis and Candidate Metabolic Vulnerabilities	**119**
Kapinová A.	Molecular biomarkers and histological progression in IgA nephropathy: the role of galactose-deficient IgA1 and microRNA	**124**
Kašubová I.	Potransplantačný *diabetes mellitus*: úloha β-bunkovej dysfunkcie, imunosupresie a mikroRNA v patogenéze a diagnostike	**128**
Krajňáková B.	Pokroky v imunohistochémii a ich význam pre personalizovanú medicínu a digitálnu patológiu	**132**
Podhradská Z.	Morfologické kritériá viability blastocýst po devitrifikácii	**138**
DIDAKTICKÉ ŠTÚDIE		
Mešťanová V.	Implementácia softvéru ZEISS LabScope Teacher do výučby histológie: cesta k vytvoreniu digitálnej triedy	**143**
Výbohová D.	Učebné preferencie verzus akademická úspešnosť v anatómii: mýtus alebo realita?	**151**

PREDHOVOR

Vážené kolegyne, vážení kolegovia,

Einsteinove slová pripomínajú, že práve zvedavosť, túžba objavovať a snaha porozumieť doposiaľ nepoznanému predstavujú hnaciu silu vedeckého pokroku. Každá nová otázka, experiment, klinické pozorovanie či pedagogická inovácia sú súčasťou neustáleho hľadania poznania, ktoré posúva medicínu aj medicínske vzdelávanie vpred.

Predkladaný zborník je odrazom tejto neustálej snahy o poznanie. Spája výsledky základného, experimentálneho a klinického výskumu s inováciami vo vzdelávaní, pretože kvalitná medicína vzniká tam, kde sa vedecké objavy prirodzene prepájajú. S potešením s vami zdieľame tento recenzovaný zborník, čím sa vytvára priestor na prezentáciu aktuálnych poznatkov, výskumných výsledkov a inovatívnych prístupov v biomedicínskych vedách.

Tohtoročné vydanie je výnimočné zaradením novej didaktickej sekcie, ktorá reflektuje rastúci význam pedagogického výskumu a inovácií vo vysokoškolskom medicínskom vzdelávaní. Rozvoj moderných technológií, digitalizácia výučby, simulačné metódy či nové prístupy k hodnoteniu študentov sa stávajú neoddeliteľnou súčasťou prípravy budúcich zdravotníckych pracovníkov. Veríme, že vytvorením priestoru pre publikovanie prác zameraných na medicínsku edukáciu podporíme výmenu skúseností, šírenie osvedčených pedagogických postupov a ďalší rozvoj kvality vysokoškolského vzdelávania.

Ďakujeme všetkým autorom za ich príspevky, recenzentom za odborné posúdenie rukopisov a členom redakčného tímu za ich čas a úsilie venované príprave tohto zborníka. Veríme, že publikované práce budú inšpiráciou pre ďalší vedecký aj pedagogický rozvoj a prispejú k prehlbovaniu spolupráce medzi pracoviskami.

Prajeme vám podnetné čítanie.

S úctou,

zostavovatelia zborníka

Martin, Jún 2026

Extrauterinný lipoleiomyóm vyrastajúci z parietálneho peritonea prednej brušnej steny: kazuistika

Bartoš, V.

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

Abstract

Lipoleiomyoma is a benign tumor consisting of smooth muscle and mature adipose tissue. It is usually diagnosed in the uterus, only exceptionally in extrauterine sites, mostly in the (retro)peritoneum of the abdominal and pelvic cavities. The article describes a case of a 70-year-old woman who was diagnosed to have an intra-abdominal tumor measuring 19x13x8 cm, found in the left mesohypogastrium. CT scan showed a large, sharply demarcated solid tumor resistance arising from parietal peritoneum of the anterior abdominal wall. Histologically, it consisted of proliferated smooth muscle, which contained aggregates of mature adipose tissue as a minor component. The smooth muscle was immunohistochemically positive for desmin, smooth muscle actin, estrogen and progesterone receptors, but surprisingly, it was negative for vimentin. The definitive diagnosis was a peritoneal lipoleiomyoma. The article is interesting from clinical and pathological aspects. Extrauterine (lipo)leiomyomas occur mainly in the abdominal and pelvic cavities of postmenopausal women and are usually positive for estrogen and progesterone receptors, so their etiology appears to be similar to that of uterine leiomyomas. Therefore, in older women, they should be included in differential diagnosis of solid tumors arising from the (retro)peritoneum. From a pathological point of view, the work points out that leiomyoma can be negative for vimentin, that should be kept in mind at the biopsy examination of small probatory samples.

Keywords: soft tisssue lipoleiomyoma, intraabdominal site, (retro)peritoneal location

Úvod

Lipoleiomyóm je benígny nádor pozostávajúci z diferencovanej hladkej svaloviny a zrelého tukového tkaniva. V prevažnej väčšine prípadov sa diagnostikuje v maternici, kde predstavuje zriedkavý histologický variant leiomyómu. Výnimočne sa vyskytuje aj mimo maternice, najčastejšie v brušnej alebo panvovej dutine ako primárna peritoneálna alebo retroperitoneálna lézia [1-3]. Vzhľadom na svoju často atypickú lokalitu a väčšie rozmery môže klinicky spôsobovať diagnostické rozpaky. V prezentovanom príspevku je opísaný zriedkavý prípad lipoleiomyómu väčších rozmerov vyrastajúci z peritonea brušnej steny.

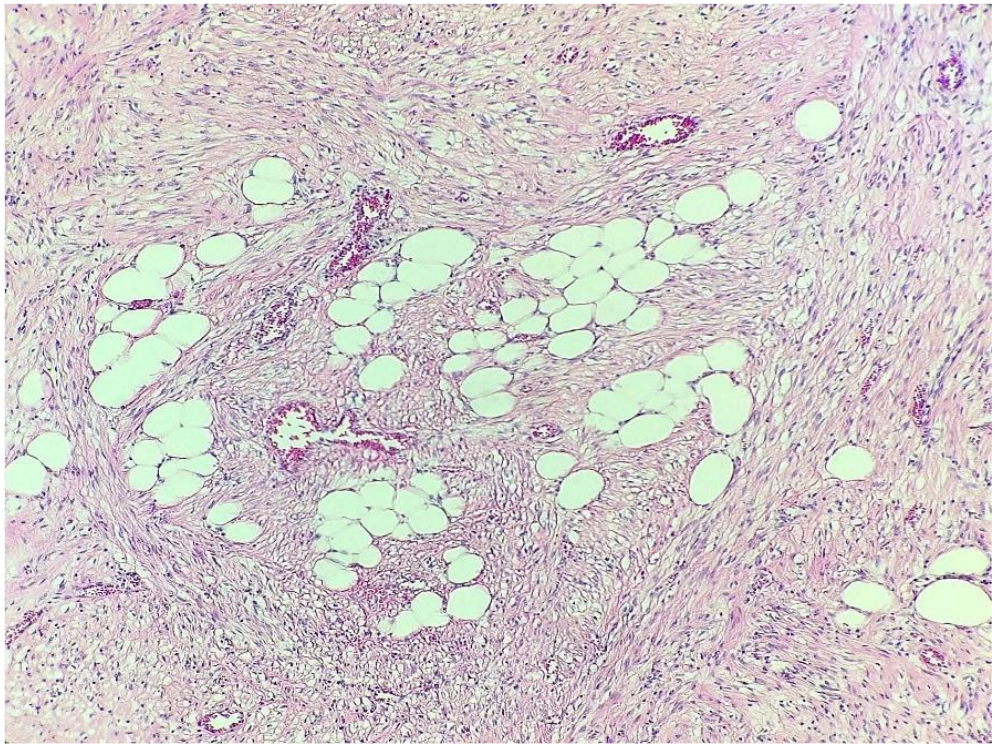
Prípad z praxe

70 ročná žena mala diagnostikovaný intraabdominálny tumor lokalizovaný v ľavom mezohypogastriu. CT vyšetrenie zobrazilo veľkú ostro demarkovanú solídnu tumoróznu expanziu vyrastajúcu z parietálneho peritonea prednej brušnej steny. Nádor bol laparoskopicky chirurgicky exstirpovaný in toto a po fixácii vo formalíne zaslaný na pracovisko patológie. Makroskopicky išlo o sčasti narezaný tumorózny útvar rozmerov 19 x 13 x 8 cm, na povrchu obalený peritoneálnou blanou (Obr. 1). Na

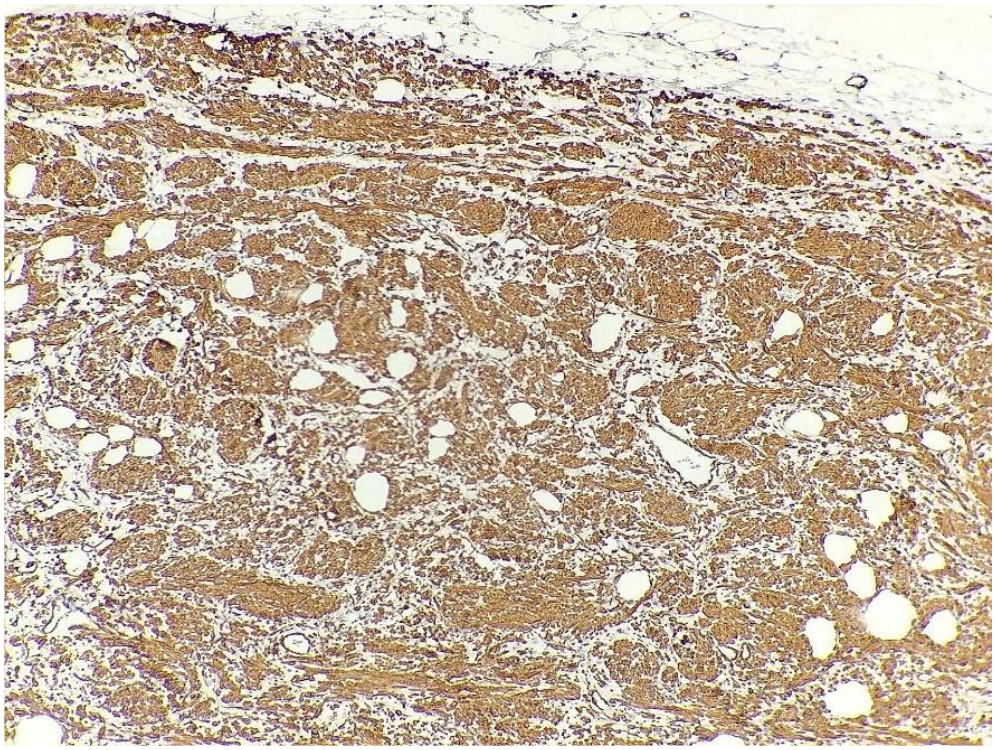
reze bolo tkanivo výrazne edematózne presiaknuté, šedohnedastej a slabo nazelanavej farby, menej presiaknuté úseky mali homogénnu tuhšiu konzistenciu (Obr. 2). V histologickom obraze dominovala proliferovaná hladká svalovina, ktorá ako minoritnú zložku obsahovala rôzne veľké agregáty zrelého tukového tkaniva (Obr. 3). Bez bunkových atypií, bez mitotickej aktivity, bez nekróz. Hladkosvalová zložka bola imunohistochemicky difúzne pozitívna na dezmín (Obr. 4), hladkosvalový aktín, estrogénové aj progesterónové receptory (Obr. 5), ale prekvapivo negatívna na vimentín (Obr. 6). Svalovina krvných ciev aj zrelé tukové tkanivo boli reaktívne na vimentín, čo vylučovalo chybu pri technickom spracovaní vzorky. Ostatné imunomarkery (S100, CD34, SOX10) boli v hladkosvalovej zložke negatívne. Proliferačná aktivita nádoru bola minimálna (Ki-67 index < 5 %). Nádor zodpovedal benígnemu lipoleiomyómu vyrastajúceho z peritonea. V nám dostupnej klinickej dokumentácii pacientky nebola zmienka o hysterektómii resp. o predchádzajúcej diagnóze leiomyómu maternice.

Obrázok 1 Operačný resekát (po fixácii vo formalíne)

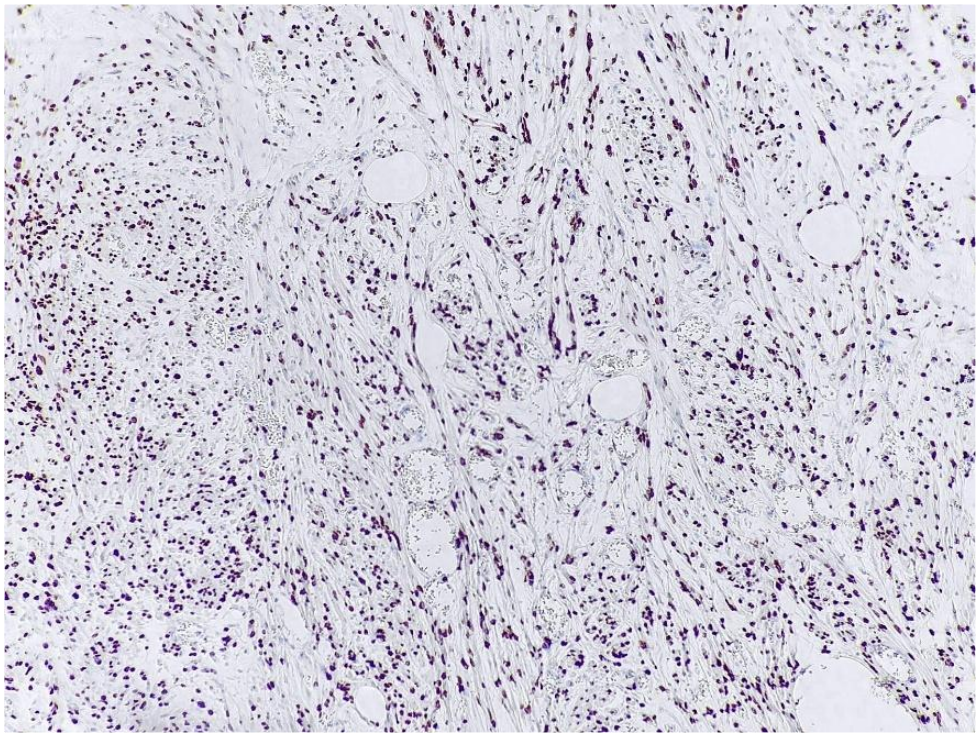
Obrázok 2 Prierez nádorovým tkanivom (po fixácii vo formalíne)



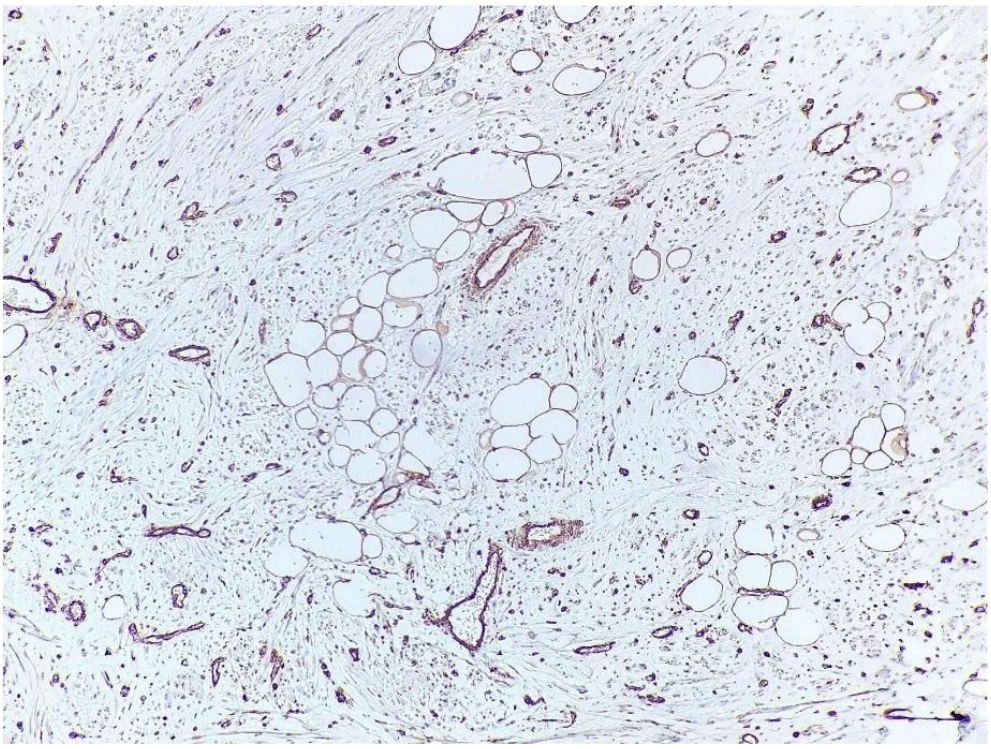
Obrázok 3 Nádor pozostávajúci z proliferovanej hladkej svaloviny obsahujúcej prímes zrelých tukových buniek (farbenie hematoxylínom a eozínom, zväčšenie objektívu 20x)



Obrázok 4 Difúzna imunohistochemická pozitivita hladkej svaloviny nádoru na dezmín (zväčšenie objektívu 20x)



Obrázok 5 Difúzna imunohistochemická pozitivita hladkej svaloviny nádoru na progesterónové receptory (zväčšenie objektívu 20x)



Obrázok 6 Imunohistochemická pozitivita krvných ciev a tukových buniek na vimentín, zatiaľ čo dominujúca hladkosvalová zložka je negatívna (zväčšenie objektívu 20x)

Diskusia

Lipoleiomyómy mäkkých tkanív (sof tissue leiomyomas) sú veľmi zriedkavé a do roku 2017 bolo v literatúre publikovaných približne 50 prípadov [1]. Tento nádor prvýkrát detailnejšie opísali Meis a Enzinger v roku 1991 [4], ktorí analyzovali sériu 9 pacientov (6 žien, 3 mužov) s lipoleiomyómami pochádzajúcimi z mäkkých tkanivových štruktúr. Najčastejšou lokalitou bola abdomino-pelvická oblasť. Najväčšiu súbornú prácu v tomto smere doteraz publikovali Fukushima et al. [3], na základe ktorej možno urobiť relevantné závery o tejto chorobnej jednotke. Hodnotili 34 konzultačných prípadov od 34 pacientov s výraznou predominanciou ženského pohlavia (32 žien, 2 muži) s priemerným vekom 55 rokov. Všetky nádory sa vyskytovali v „deep-seated" lokalitách, najčastejšie v retroperitoneu brušnej dutiny a panvy (47 %), ďalej v panvovej dutine a bližšie nešpecifikovej panvovej oblasti (15 %), brušnej stene (12 %) a vnútrobrušnej lokalite (9 %). Najväčší priemerný rozmer lézie bol 10,5 cm. V sledovanom „follow-up" období nemal žiadny pacient po operácii lokálnu recidívu ani metastázy, čo jasne dokumentuje benígny pôvod lézie. Histopatologická diagnostika „soft-tissue" leiomyolipómov väčšinou nie je obtiažna. V mikroskopickom obraze pozostávajú z dobre diferencovanej hladkej svaloviny a zrelého tukového tkaniva v rôznom pomere. Nádorové tkanivo nevykazuje bunkové atypie ani mitózy, môže však obsahovať nešpecifické degeneratívne zmeny podobné ako pri leiomyómoch maternice. O potenciálnej malignite treba uvažovať pri nasledovných histomorfologických znakoch: hypercelulárny fascikulárny rastový vzor vretenovitých buniek, signifikantné jadrové atypie, ložisková guľatobunková (round cell) morfológia, zvýšená mitotická aktivita a koagulačné nekrózy [3]. V prípade diagnostických pochybností o histogenetickom pôvode lézie zohráva kľúčovú úlohu imunohistochemické vyšetrenie. Svalová zložka nádoru je štandardne intenzívne pozitívna na dezmín, hladkosvalový aktín a h-caldesmon. Veľmi zaujímavé je, že bežne vykazuje aj jadrovú pozitivitu na estrogénové a progesterónové receptory. Vo vyššie zmieňovanej štúdii [3], v ktorej autori vyšetrili aj 15 nádorov na estrogénové receptory, až v 13 prípadov hladká svalovina a sčasti aj adipocyty vykazovali jadrovú expresiu receptorov, pričom dvaja pacienti boli muži.

Berúc do úvahy výraznú predilekciu retroperitoneálnej/intraabdominálnej lokality lipoleiomyómov s výraznou prevahou postihnutia žien a ich frekventovanú pozitivitu na estrogénové a progesterónové receptory, vzniká otázka o ich etiológii. Pravdepodobne ide o obdobu uterinných leiomyómov, ktorých rast a progresia je dependentná na hormonálnych stimuloch [1]. Problematiku intraabdominálnych/ retroperitoneálnych leiomyómov podrobne opísali americkí patológovia v dvoch prácach analyzujúcich súbor 56 a 23 pacientov [5,6]. V obidvoch štúdiách sa tieto nádory vyskytovali prevažne v strednom veku (priemerný vek 44 - 45 rokov) s výraznou predominanciou ženského pohlavia (89,5 - 95,6 % všetkých prípadov). V jednej práci malo 41,2 % postihnutých žien diagnostikovaný aj leiomyóm maternice, či už súbežne alebo v minulosti [5]. Obidve štúdie [5,6] poukázali, že intraabdominálne/retroperitoneálne leiomyómy histomorfologicky aj imunofenotypovo pripomínajú „klasické" leiomyómy maternice. Pôvod primárnych intraabdominálnych/ retroperitoneálnych leiomyómov je stále diskutovanou témou. V literatúre sa rozoberá najmä teória, že môže ísť o tzv. „parazitické" leiomyómy [5]. Tie pôvodne predstavovali subserózne leiomyómy maternice, ktoré sa časom odseparovali, získali vlastné krvné zásobenie a začali rásť samostatne. Uvedená hypotéza je čiastočne prijateľná, nakoľko prevažná väčšina intraabdominálnych/retroperitoneálnych leiomyómov sa vyskytuje u žien, z ktorých mnohé (> 40 %) majú, alebo mali diagnostikované aj leiomyómy maternice. Na druhej

strane „parazitický“ pôvod nemožno akceptovať univerzálne. Niektoré intraabdominálne/retroperitoneálne leiomyómy sú totiž od maternice príliš vzdialené na to, aby z nej mohli pochádzať. Pravdepodobnejšie teda je, že vznikajú z hormonálne senzitívnych hladkosvalových buniek (retro)peritoneálnych tkanivových štruktúr, napríklad krvných ciev alebo embryonálnych zvyškov Müllerových či Wollfových vývodov, a že niektoré ženy môžu mať predispozíciu vzniku leiomyómov aj z týchto buniek, nie len z buniek myometria [5].

Prezentovaná práca opisuje staršiu pacientku s lipoleiomyómom vyrastajúcim z peritonea brušnej steny. Pri prehľade internetovanej literatúry sme našli 8 podobných kazuistík [1,2,7-12], opisujúcich (retro)peritoneálne lipoleiomyómy, ktoré sú spolu s našim prípadom zhrnuté v Tabuľke 1. Všetci pacienti boli ženy, s výnimkou jednej v postmenopauzálnom veku, u ktorých nádory dosahovali väčšie rozmery (priemerná najväčšia veľkosť 20 cm).

Zaujímavosťou nášho prípadu je imunohistochemická negativita vimentínu v leiomyómovej zložke nádoru. Vimentín je dôležitý cytoskeletárny štrukturálny proteín vyskytujúci sa najmä v bunkách mezenchýmového alebo stromálneho origa. V patologickej praxi slúži ako univerzálny diagnostický marker buniek mezenchýmového pôvodu (spojivové tkanivo, chrupka, cievy, svalovina). V našom prípade vzhľadom na jednoznačnú intenzívnu pozitivitu na dezmín aj hladkosvalový aktín nebolo možné pochybovať o jeho hladkosvalovom pôvode, teda negativita na vimentín bola prekvapujúca. Pri dôkladnom prehľade internetovej literatúry sme však našli aj zmienku o negativite leiomyómov na dezmín, ktoré sa však týkajú hornej časti tráviacej trubice, najmä pažeráka. V starej štúdii z roku 1988 [13] zistili japonskí patológovia, že z 15 hladkosvalových nádorov pažeráka boli okrem jedného všetky negatívne na vimentín a z 15 hladkosvalových nádorov žalúdka boli 2 negatívne na vimentín. Sarlomo-Rikala [14] zasa uvádzajú, že z 28 leiomyómov pažeráka bolo 21 negatívnych na vimentín. Táto lokalita je pravdepodobne v tomto smere špecifická, pretože v inej lokalite sme sa s takýmto fenoménom už nestretli.

Tabuľka 1: Prehľad publikovaných kazuistík opisujúcich primárne (retro)peritoneálne lipoleiomyómy spolu s našim prípadom [1,2,7-12].

Ref.	Pohlavie	Vek	Lokalita	Veľkosť
[1]	žena	45 r.	intraabdominálne	27 x 20 x 13 cm
[2]	žena	60 r.	retroperitoneálne	13,9 x 5,4 x 13,4 cm
[7]	žena	67 r.	preperitoneálne pred močovým mechúrom	18 x 13,5 x 2 cm
[8]	žena	60 r.	preperitoneálne predná brušná stena v pooperačnej jazve	6 cm
[9]	žena	48 r.	parietálne peritoneum abdominopelvickej dutiny	35 x 30 x 15 cm
[10]	žena	56 r.	retroperitoneálne	23 x 21 x 12 cm
[11]	žena	51 r.	parietálne peritoneum prednej brušnej steny	20 x 15 x 15 cm
[12]	žena	51 r.	peritoneum prednej brušnej steny	23 cm
náš prípad	žena	70 r.	parietálne peritoneum prednej brušnej steny	19 x 13 x 8 cm

Záver

Prezentovaná práca je zaujímavá z dvoch aspektov. Z klinického hľadiska v tom, že extrauteriné (lipo)leiomyómy sa vyskytujú najmä v brušnej a panvovej dutine u žien v postmenopauzálnom veku a sú zvyčajne pozitívne na estrogénové a progesterónové receptory, takže ich etiológia sa zdá byť podobná ako pri leiomyómoch maternice. U starších žien by mali byť zahrnuté v diferenciálnej diagnostike solídnych nádorových útvarov vyrastajúcich z (retro)peritonea. Z patologického hľadiska poukazuje na to, že leiomyóm môže byť negatívny na vimentín, na čo treba myslieť najmä pri bioptickom vyšetrení malých probatórnych vzoriek.

Literatúra

[1] Schaefer, *World Journal of Surgical Oncology.* **2021**, 19(1):144.
[2] Garg, *Egypt J Radiol Nucl Med.* **2025**, 56:43.
[3] Fukushima, *Am J Surg Pathol.* **2017**, 41(2):153-160.
[4] Meis, *Am J Surg Pathol.* **1991***,* 15(2):121-125.
[5] Paal, *Am J Surg Pathol.* **2001**, 25(11):1355-1363.
[6] Billings**,** *Am J Surg Pathol.* **2001**, 25(9):1134-1142.
[7] Lalor, *Gynecologic Oncology.* **2005**, 97(2):719-721.
[8] Schindl, *Maturitas.* **2000**, 37(1):33-36.
[9] Vasconcelos, *Acta Radiologica.* **2007**, 48(1):10-12.
[10] Oh, *J Korean Med Sci.* **2001**, 16(2): 250-252.
[11] Feng, *J Obst Gynaecol.* **2011**, 31:556-557.
[12] Braganza, *Cureus.* **2023**, 15(8):e43193.
[13] Tsutsumi, *Acta Pathol Jpn.* **1988**, 38(4):4550-469.
[14] Sarlomo-Rikala, *APMIS.* **2002**, 110(6):499-507.

Prežívanie pacientov so sval neinfiltrujúcim nádorom močového mechúra

Blaha, T.[1,2], Kuffa, V.[1,2], Dušenka, R.[1,2]

[1] Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Urologická klinika; [2] Univerzitná nemocnica Martin, Urologická klinika
dusenka1@uniba.sk

Abstract

Bladder cancer is the 10th most frequently diagnosed malignancy worldwide. The main risk factor is smoking. The primary treatment is transurethral resection of the bladder tumor (TURB), often supplemented with intravesical chemotherapy using Mitomycin/Epirubicin or BCG immunotherapy. The study was conducted at the Department of Urology of the University Hospital in Martin. We analyzed a group of patients (n=99) who underwent TURB in 2024 with a positive histological finding. The patients were initially divided into two groups, with muscle-invasive (MIBC) and non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC). MIBC (n=18) is ≥ pT2 according to the TNM classification. NMIBC (n=81) is pTa / pT1 according to the TNM classification and this group was the focus of our study. Of the 81 patients, 23 were female and 58 were male, with a mean age of 73 years. Histologically, pTa LG was confirmed 19 times, 7 patients were diagnosed with a tumor with a pTa HG result. Stage pT1 LG was present in 11 patients, pT1 HG was present in the most, with a total of 31. One patient was diagnosed with CIS, PUNLMP occurred only once and in two cases the sample with HG cells could not be evaluated. The most severe histological finding was pT1 HG + CIS in 9 patients. The patients were subsequently stratified into risk groups - 64 patients were classified as high-risk group, 9 patients to the intermediate and 8 patients to the lowest risk group. All patients were treated with TURB, intravesical immunotherapy with BCG vaccine was applied 24 times, intravesical chemotherapy with Mitomycin was administered to 11 patients and intravesical chemotherapy with Epirubicin was used in one case. Our study confirmed a high risk of recurrence, which was observed in 40 patients (49.4%).

Keywords: Non-muscle invasive bladder cancer, recurrence-free survival, smoking, Kaplan-Meier analysis

Úvod

Karcinóm močového mechúra patrí medzi najčastejšie malignity močového traktu a predstavuje významný zdravotnícky problém vzhľadom na svoju incidenciu, vysokú mieru recidív a potrebu dlhodobého dispenzárneho sledovania pacientov [1]. Celosvetovo ide o desiate najčastejšie diagnostikované zhubné ochorenie, pričom vyšší výskyt sa pozoruje najmä u mužov a vo vyšších vekových skupinách. Najvýznamnejším rizikovým faktorom vzniku karcinómu močového mechúra je fajčenie, ktoré sa podieľa na vzniku ochorenia u významného percenta pacientov. Medzi ďalšie rizikové faktory patria profesionálna expozícia aromatickým amínom,

chronické močové infekcie či urolitiáza. Približne 70-75 % novodiagnostikovaných nádorov močového mechúra predstavuje sval neinfiltrujúci karcinóm močového mechúra (NMIBC) [1]. Napriek relatívne priaznivejšej prognóze v porovnaní so sval infiltrujúcim karcinómom močového mechúra je NMIBC charakteristický vysokou tendenciou k recidívam a potenciálom progresie ochorenia do invazívnej formy. Recidíva ochorenia sa podľa literatúry objavuje u 30-70 % pacientov počas sledovania [2]. Diagnostika NMIBC je založená na cystoskopickom vyšetrení a histopatologickom potvrdení diagnózy po transuretrálnej resekcii tumoru močového mechúra (TURB). TURB predstavuje základný diagnostický aj terapeutický výkon pri NMIBC a umožňuje určenie histologického typu, gradingu a štádia nádoru. Následný manažment pacientov závisí od rizika recidívy a progresie ochorenia. Na odhad prognózy a stratifikáciu pacientov sa využívajú odporúčania Európskej urologickej asociácie (EAU) a prognostické modely, medzi ktoré patria najmä EORTC risk tables. Medzi hlavné prognostické faktory patrí histologický grading, štádium nádoru, multifokalita, veľkosť tumoru a prítomnosť carcinoma in situ [3]. Na základe týchto parametrov sú pacienti rozdelení do nízko-, stredne- a vysokorizikových skupín, čo významne ovplyvňuje ďalší terapeutický postup, intenzitu dispenzárnych kontrol a indikáciu intravezikálnej liečby. Významnú úlohu v liečbe NMIBC zohráva intravezikálna terapia. U pacientov so stredným a vysokým rizikom recidívy alebo progresie sa využíva najmä intravezikálna imunoterapia Bacillus Calmette-Guérin (BCG), ktorá znižuje riziko recidívy a progresie ochorenia [4]. Alternatívou alebo doplnkom liečby je intravezikálna chemoterapia, najčastejšie mitomycínom alebo epirubicínom. Napriek pokroku v liečebných možnostiach však NMIBC zostáva ochorením s vysokou mierou recidív, čo si vyžaduje pravidelné a dlhodobé sledovanie pacientov. Fajčenie predstavuje najvýznamnejší rizikový faktor vzniku karcinómu močového mechúra [5]. Fajčenie je asociované so zvýšeným rizikom recidívy a progresie sval neinfiltrujúceho karcinómu močového mechúra [6]. V posledných rokoch sa preto zvyšuje význam hodnotenia fajčiarskej anamnézy ako prognostického faktora u pacientov s NMIBC. Na hodnotenie recurrence-free survival sa v klinickej praxi a vedeckých štúdiách štandardne využíva Kaplan-Meierova krivka, ktorá umožňuje znázornenie pravdepodobnosti prežívania bez recidívy v čase. Táto metóda umožňuje porovnanie jednotlivých skupín pacientov podľa klinických a patologických charakteristík. Cieľom tejto práce bolo analyzovať výskyt recidív u pacientov so sval neinfiltrujúcim karcinómom močového mechúra so zameraním na recurrence-free survival a zhodnotiť vplyv rizikových skupín, pohlavia a fajčenia na priebeh ochorenia.

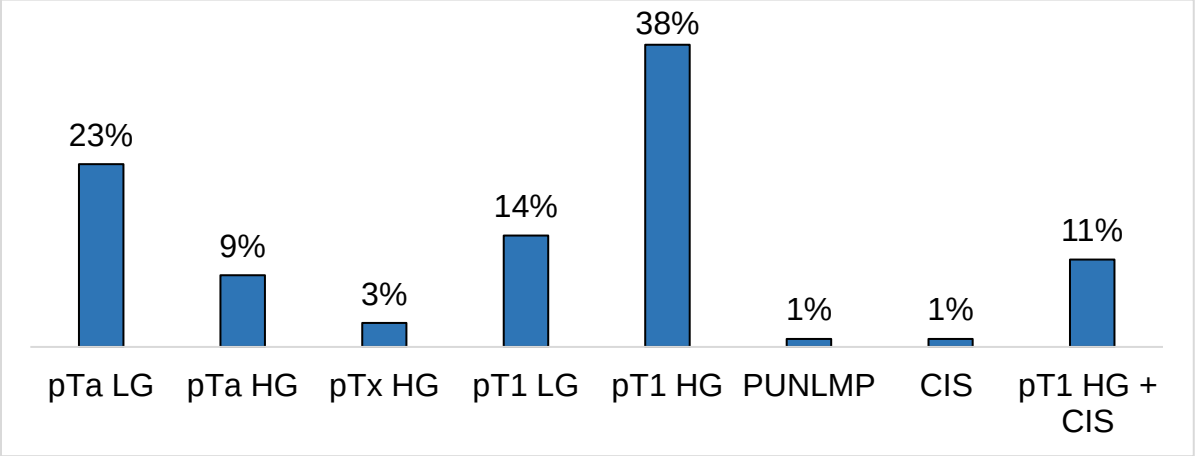
Materiál a metodika

Do retrospektívnej analýzy boli zaradení pacienti so sval neinfiltrujúcim karcinómom močového mechúra liečení na Urologickej klinike v Univerzitnej nemocnici v Martine, ktorí mali v roku 2024 pozitívny histologický výsledok TURB. Diagnóza NMIBC bola stanovená na základe histopatologického vyšetrenia. U všetkých pacientov boli analyzované základné demografické údaje vrátane veku a pohlavia. Súčasťou hodnotenia bola aj fajčiarska anamnéza. Ďalej sa sledovala lokalizácia nádoru, histopatologický nález, prítomnosť recidívy a typ aplikovanej intravezikálnej liečby. Histopatologické vzorky boli klasifikované podľa TNM klasifikácie a histologického

gradingu nádoru. Na základe klinicko-patologických charakteristík boli pacienti rozdelení do nízko-, stredne- a vysokorizikovej skupiny podľa odporúčaní Európskej urologickej asociácie (EAU). Do nízkorizikovej skupiny boli zaradení pacienti s primárnym solitárnym pTa low-grade tumorom menším ako 3 cm bez prítomnosti carcinoma in situ (CIS). Strednú rizikovú skupinu tvorili pacienti s multifokálnym alebo recidivujúcim pTa low-grade tumorom, prípadne tumorom väčším ako 3 cm. Vysokorizikovú skupinu predstavovali pacienti s high-grade nádorom, štádiom pT1, prítomnosťou CIS alebo viacpočetnými recidívami. Všetci pacienti podstúpili chirurgickú liečbu metódou TURB. Na základe individuálneho rizika bola následne indikovaná adjuvantná intravezikálna imunoterapia BCG vakcínou alebo intravezikálna chemoterapia mitomycínom, respektíve epirubicínom. Primárnym sledovaným parametrom bol výskyt recidívy ochorenia. Na analýzu recurrence-free survival bola použitá Kaplan-Meierova metóda.

Výsledky

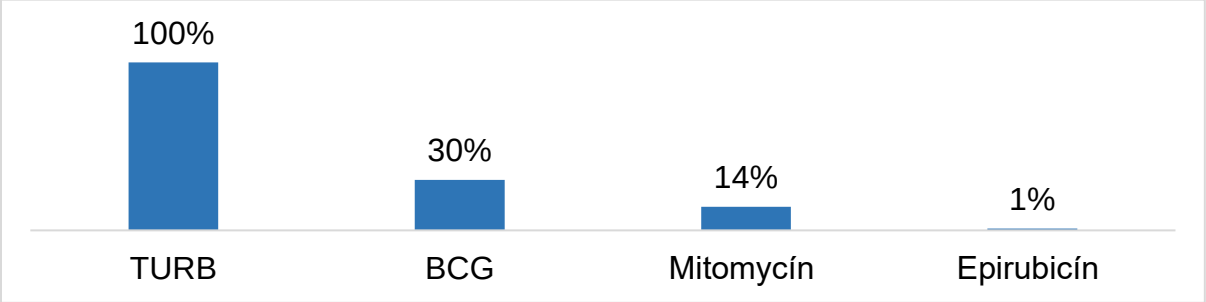
Z 81 pacientov so sval neinfiltrujúcim karcinómom močového mechúra bolo 23 žien (28 %) a 58 mužov (72 %) s priemerným vekom 73 rokov. Fajčenie v anamnéze sa zistilo u 22 pacientov (27 %). Zo všetkých nádorov sa 26 (32 %) nachádzalo v trigonu, 18 (22 %) sa nachádzalo v bočnej stene, 18 (22 %) sa nachádzalo vo viacerých oblastiach a 19 (23 %) na iných miestach. Stupeň nádoru a štádium T boli nasledovné: Histologicky bolo potvrdené pTa LG 19 - krát (23 %), 7 pacientom (9 %) bol diagnostikovaný nádor s pTa HG výsledkom. Štádium pT1 LG malo 11 pacientov (14 %), pT1 HG bol prítomný najviac, s celkovým počtom 31 (38 %). Jeden pacient (1 %) mal diagnostikovaný CIS, PUNLMP sa vyskytol iba raz (1 %) a dvakrát (3 %) sa odobratá vzorka s HG bunkami nedala hodnotiť. Najzávažnejšia histológia bola pT1 HG + CIS u 9 pacientov (11 %) (Obr. 1).



Obrázok 1 Štádiá hodnotených lézií: LG = low grade; HG = high grade; PUNLMP = papilárny uroteliálny karcinóm s nízkym malígnym potenciálom; CIS = carcinoma in situ; pTa = nádor infiltroval sliznicu; pT1 = nádor infiltroval sliznicu aj submukózu; pTx = odobratá vzorka sa nedala hodnotiť

Následne sme pacientov roztriedili do rizikových skupín na nízku, strednú a vysokú. Do vysokorizikovej skupiny patrilo 64 pacientov (79 %), do strednej 9 pacientov (11 %) a v najmenej rizikovej skupine bolo 8 pacientov (10 %). Všetci pacienti (100 %) boli

liečený metódou TURB, intravezikálna imunoterapia BCG vakcínou bola aplikovaná 24 - krát (30 %), intravezikálna chemoterapia Mitomycínom bola podaná 11-tim pacientom (14 %) a intravezikálna chemoterapia Epirubicínom bola použitá raz (1 %) (Obr. 2). Recidívy boli prítomné u 40-tich (49 %) pacientoch.



Obrázok 2 Terapeutické prístupy: TURB = transuretrálna resekcia nádoru močového mechúra; BCG = Bacillus Calmette –Guérin, imunoterapia; Mitomycín = chemoterapeutikum; Epirubicín = chemoterapeutikum

Diskusia

Sval neinfiltrujúci karcinóm močového mechúra predstavuje heterogénnu skupinu ochorení charakteristickú vysokou mierou recidív a rizikom progresie do sval infiltrujúceho karcinómu. Napriek pokroku v diagnostike a intravezikálnej liečbe zostáva NMIBC ochorením vyžadujúcim dlhodobé dispenzárne sledovanie. Výsledky našej práce potvrdili vysoký výskyt recidív u pacientov s NMIBC, pričom recidíva bola zaznamenaná takmer u polovice sledovaných pacientov. V analyzovanom súbore dominovali pacienti vo vysokorizikovej skupine podľa EAU klasifikácie. Tento fakt pravdepodobne významne ovplyvnil celkovú mieru recidív v našom súbore. Najvyššie riziko recidívy býva popisované práve u high-grade nádorov, štádia pT1 a pri prítomnosti CIS, ktoré boli vo významnej miere zastúpené aj v našom súbore pacientov. Najčastejším histopatologickým nálezom v našom súbore bolo štádium pT1 high-grade. Pacienti s high-grade nádormi a štádiom pT1 majú vyššie riziko recidívy a progresie ochorenia [7]. Vyžadujú preto intenzívnejší dispenzárny program a častejšie využitie adjuvantnej intravezikálnej liečby. Dôležitým aspektom našej práce bolo hodnotenie recurrence-free survival pomocou Kaplan-Meierovej analýzy. Recurrence-free survival predstavuje významný parameter pri hodnotení dlhodobých výsledkov liečby pacientov s NMIBC [2]. Kaplan-Meierova krivka v našom súbore poukázala na postupný pokles pravdepodobnosti prežívania bez recidívy počas sledovania. Najvýraznejší pokles recurrence-free survival bol pozorovaný najmä v skoršom období po primárnej liečbe. Vzhľadom na vysokú mieru recidív je u pacientov s NMIBC nevyhnutné dlhodobé dispenzárne sledovanie [1]. V našej práci bola analyzovaná aj fajčiarska anamnéza pacientov. Fajčenie je považované za najvýznamnejší rizikový faktor vzniku karcinómu močového mechúra a podľa viacerých autorov sa podieľa aj na vyššom riziku recidívy a progresie NMIBC. Tabakový dym obsahuje množstvo karcinogénnych látok vylučovaných močom, ktoré dlhodobo pôsobia na urotel močového mechúra. Viaceré práce potvrdili kratší recurrence-free survival u aktívnych fajčiarov v porovnaní s nefajčiarmi. Hodnotenie fajčiarskej anamnézy preto môže mať význam nielen pri prevencii, ale aj pri prognostickom hodnotení pacientov s NMIBC.

Významnú úlohu v manažmente pacientov so stredným a vysokým rizikom recidívy zohráva intravezikálna liečba. V našom súbore bola časť pacientov liečená intravezikálnou imunoterapiou BCG vakcínou a menšia časť intravezikálnou chemoterapiou. BCG imunoterapia je podľa odporúčaní EAU štandardnou súčasťou liečby vysokorizikového NMIBC, pričom jej cieľom je redukcia rizika recidívy a progresie ochorenia. Napriek aplikovanej adjuvantnej liečbe však recidívy zostávajú častým problémom, čo potvrdzujú aj naše výsledky. Naša práca má viaceré limitácie. Ide o retrospektívnu analýzu pacientov z jedného pracoviska s relatívne limitovaným počtom pacientov. Ďalším limitujúcim faktorom je heterogenita sledovaného súboru a rozdiely v aplikovanej intravezikálnej liečbe. Napriek tomu však výsledky našej práce korelujú s publikovanými údajmi a poukazujú na význam rizikovej stratifikácie, fajčenia a dlhodobého sledovania pacientov so sval neinfiltrujúcim karcinómom močového mechúra. Na základe našich výsledkov možno konštatovať, že NMIBC zostáva ochorením s vysokou tendenciou k recidívam aj napriek dostupným terapeutickým možnostiam. Identifikácia rizikových faktorov recidívy a správna stratifikácia pacientov majú zásadný význam pre optimalizáciu liečby a dispenzárneho sledovania.

Záver

Sval neinfiltrujúci karcinóm močového mechúra predstavuje ochorenie s vysokou tendenciou k recidívam aj napriek dostupným diagnostickým a terapeutickým možnostiam. Výsledky našej práce potvrdili vysoký výskyt recidív u pacientov s NMIBC, pričom významnú časť súboru tvorili pacienti vo vysokorizikovej skupine podľa EAU klasifikácie. Kaplan-Meierova analýza recurrence-free survival poukázala na postupný pokles pravdepodobnosti prežívania bez recidívy počas sledovania, najmä v skoršom období po primárnej liečbe. Naše výsledky zároveň potvrdzujú význam rizikovej stratifikácie pacientov a potrebu pravidelného dlhodobého dispenzárneho sledovania. Fajčenie predstavuje významný rizikový faktor nielen pri vzniku karcinómu močového mechúra, ale pravdepodobne ovplyvňuje aj priebeh ochorenia a výskyt recidív. Dôležitú úlohu v manažmente pacientov zohráva adjuvantná intravezikálna liečba, najmä imunoterapia BCG vakcínou u pacientov so stredným a vysokým rizikom recidívy alebo progresie. Správna identifikácia rizikových faktorov, adekvátna stratifikácia pacientov a individualizovaný terapeutický prístup môžu prispieť k zníženiu rizika recidívy a zlepšeniu dlhodobej prognózy pacientov so sval neinfiltrujúcim karcinómom močového mechúra.

Literatúra

[1] Babjuk, *Eur Urol*. **2022**, 81(1):75-94.
[2] Sylvester, *Eur Urol*. **2006**, 49(3):466-477.
[3] Millán-Rodríguez, *J Urol*. **2000**, 163(1):73-78.
[4] Kamat AM, *Nat Rev Urol*. **2017**, 14(4):244-255.
[5] Crivelli, *Eur Urol*. **2014**, 65(4):742-754.
[6] Rink, *Eur Urol*. **2013**, 64(3):456-464.
[7] Cambier, *Eur Urol*. **2016**, 69(1):60-69.

ICC and IHC Detection of hVEGF in rAAV-hVEGF-Transduced *In Vitro* and *In Vivo* Models

Hurníková, J.[1], Demčišáková, Z.[1], Cucchiarini, M.[2], Petrovová, E.[1]

[1] Department of Morphological Disciplines, UVMP, Kosice, Slovakia; [2] Center of Experimental Orthopaedics, Saarland University Medical Center, Homburg, Germany
julia.hurnikova@student.uvlf.sk

Abstract

Recombinant adeno-associated viruses (rAAVs) represent one of the leading platforms for gene delivery in regenerative medicine and gene therapy. This study evaluated vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression after rAAV-hVEGF transduction in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and in the chicken chorioallantoic membrane (CAM) model using immunocytochemical (ICC) and immunohistochemical (IHC) methods. HUVEC cells were transduced with rAAV-hVEGF vectors and analysed seven days later by ICC using anti-hVEGF antibodies and DAB visualization. Positive cytoplasmic VEGF staining was detected in transduced HUVEC cells, confirming successful rAAV-mediated VEGF transgene expression *in vitro*. In contrast, no specific hVEGF immunopositivity was detected in CAM tissue following IHC analysis. The absence of detectable signal in the CAM model may be associated with limitations related to antibody specificity, cross-species reactivity, and the limited availability of validated reagents for avian tissue models. These findings demonstrate the suitability of ICC for VEGF detection in HUVEC cells while highlighting methodological limitations associated with hVEGF detection in the CAM model.

Keywords: rAAV, HUVEC, CAM, VEGF

Introduction

The chorioallantoic membrane (CAM) is a highly vascularized avian extraembryonic membrane that is used as an *in vivo* model in the study of angiogenesis in relation to cells or tissues [1]. CAM serves as a respiratory and excretory organ, and although it is very thin and its matrix is transparent, a very well-formed arteriovenous system is easily accessible and visible [2]. Gene therapy is the treatment of a genetic disease by introducing specific genetic materials in a patient to modify the cell functions using gene delivery vehicles called vectors [3]. Gene transfer that involves the delivery of foreign genetic material into target cells via nonviral or viral vectors aims at treating specific disorders by altering gene expression, offering potential therapeutic solutions for diseases with well-characterized genetic causes [4]. Viral vectors serve as delivery systems of genetic information [5]. These are derived from pathogenic viruses from which infectious genes are encoded, removed, and replaced with therapeutic genetic sequences. Nowadays represent recombinant adeno-associated viruses (rAAV) the leading platform for *in vivo* gene therapy [6]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important proangiogenic factor that plays a key role in blood vessel formation, tissue regeneration, and wound healing, making it a promising therapeutic target in

regenerative medicine and gene therapy. This study focuses on the visualization of VEGF protein expression after rAAV-VEGF transduction in HUVEC cells and CAM tissue using immunocytochemical (ICC) and immunohistochemical (IHC) methods.

Material and methods

To test gene transfer using rAAV vectors under *in vitro* conditions, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used. The cells were seeded at a density of 5×10^5 cells in T75 culture flasks containing 15 mL of complete endothelial cell growth medium (ECG). They were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO_2 and passaged once they reached 80% confluence. The culture medium was replaced every two days. Experiments were performed using cells after 2–3 passages. Two days before the experiment, the cells were seeded into a 24-well plate at a density of 20,000 cells per well. Complete ECG medium was used with control group (without rAAV application) and ECG medium without VEGF for experimental group, which was transduced with 40 µl of rAAV-hVEGF. ICC analysis was performed seven days after transduction to detect VEGF protein expression in cultured HUVEC cells. A primary antibody against VEGF (mouse monoclonal Anti-VEGFA antibody, dilution 1:50) and a biotinylated goat anti-mouse IgG secondary antibody (dilution 1:200) were used. Visualization was carried out using DAB and stained cells were photographed using an Olympus CKX41 inverted light microscope with an Olympus DP22 digital camera at 10× magnification using Olympus cellSens Standard 1.18 software.

Fertilized chicken eggs (*Gallus gallus domesticus;* Lohmann brown breed) were delivered from the hatching farm Párovské Háje in a temperature-controlled manner to ensure egg viability and quality. The eggs were incubated horizontally in a forced-draft constant-humidity incubator at 37.5 ± 0.5 °C and 70 % relative humidity. At embryonic day (ED) 3, the eggshell was disinfected with 40 % ethanol, each egg was cracked, and the content with chicken embryo was carefully transferred into a plastic weighing boat. The embryos were incubated until ED7. The application on the CAM was made on ED7, where 40 µl of rAAV-hVEGF were applied within a silicone ring placed on a suitable CAM zone between two large vessels. The vectors used in this study were designed and constructed in collaboration with the Experimental Orthopaedic Centre, Saarland University, Germany. The vectors were applied on CAM of 6 chick embryos and 6 embryos served as physiological control. Samples were collected on ED14 - 7 days after the transduction. After fixation in Dent's solution, the samples were dehydrated through an ethanol series and embedded in paraffin. The specimens were serially sectioned into 4 µm slices using a rotary microtome. These sections were then deparaffinized and hydrated with distilled water before immunohistochemical staining. The primary antibody anti-VEGF-A (Rabbit Monoclonal Antibody, dilution 1:1000) was applied overnight at + 4 °C. The next day, the samples were washed three times with PBS and then incubated with a secondary antibody (Goat anti-Rabbit HRP, dilution 1:200) at room temperature for 60 minutes. After incubation, the samples were washed again with PBS and stained with DAB chromogen for 5 minutes in the dark at room temperature. They were then rinsed with distilled water, counterstained with Mayer's hemalum, and dehydrated using increasing concentrations of ethanol. Finally, the samples were mounted and analysed under an Olympus CX43 light microscope with

a digital camera at 20× magnification.

Results

Immunocytochemical staining using an anti-VEGF antibody and DAB visualization was performed to detect the presence of VEGF protein in HUVEC cells on day 7 after transduction with rAAV vectors. No specific brown staining was observed in the control group (Fig. 1A). In contrast, HUVEC cells transduced with rAAV-VEGF (Fig. 1B) showed distinct brown cytoplasmic staining, confirming the presence of VEGF protein. The positive signal detected in the cytoplasm of multiple cells in the rAAV-VEGF-transduced group confirmed successful translation of the VEGF transgene and production of VEGF protein.

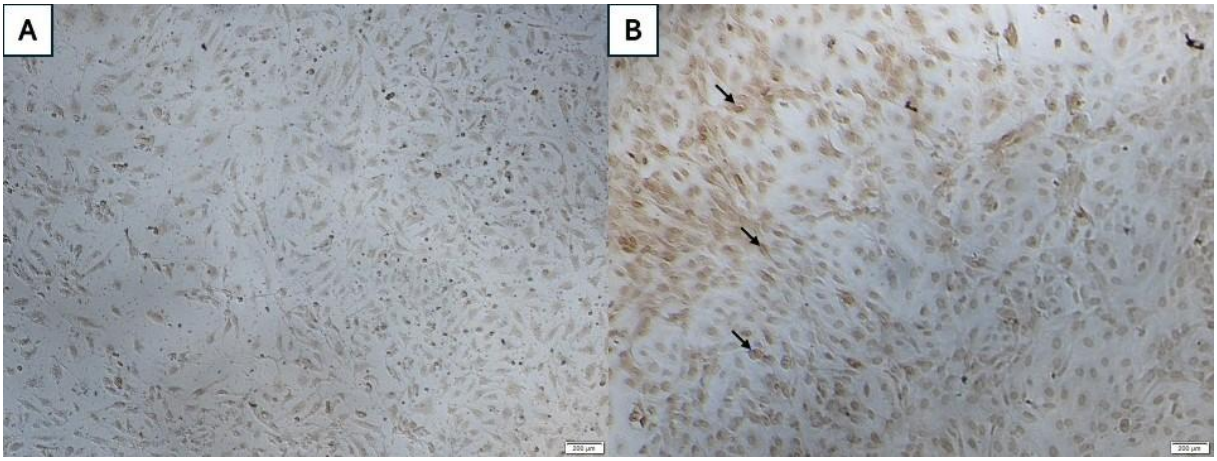


Figure 1 Immunocytochemical detection of VEGF protein in HUVEC cells on day 7 after rAAV-VEGF transduction using an anti-hVEGF antibody and DAB visualization method. The positive signal was evaluated qualitatively based on the presence and intensity of brown staining in the cells (indicated by arrows). A – control, B – HUVECs transduced with rAAV-VEGF. Scale bars: 200 µm

Immunohistochemical staining using an anti-hVEGF antibody and DAB visualization was performed to detect rAAV-mediated hVEGF protein expression in CAM tissue on day 7 after treatment with rAAV-hVEGF. No specific positive brown staining was observed in either the control (Fig. 2-C) or rAAV-hVEGF-treated group (Fig. 2-D). Furthermore, no visible differences in staining intensity or distribution were detected between the positive and negative control samples (Fig. 2-A, B) after staining. These findings indicate that hVEGF protein expression could not be confirmed in CAM tissue under the given experimental conditions.

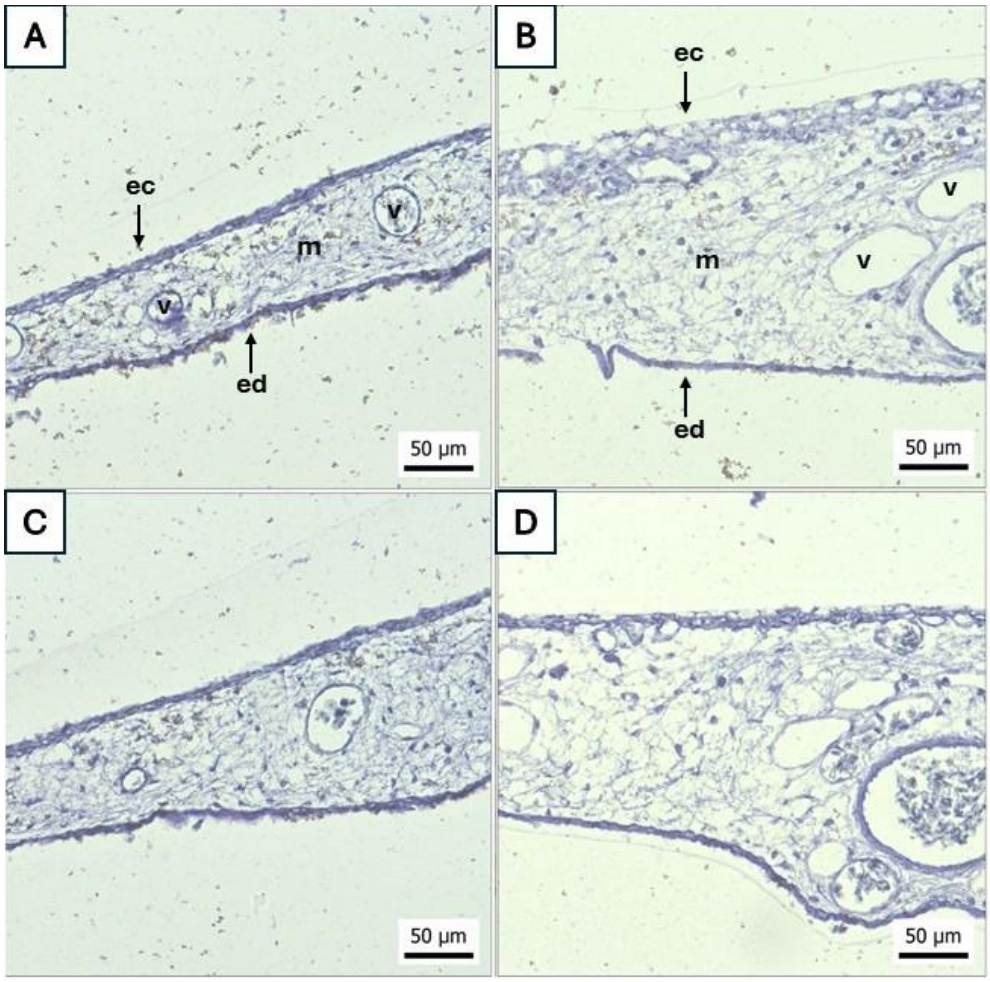


Figure 2 Immunohistochemical analysis of hVEGF expression in the CAM 7 days after topical application (ED14) using an anti-hVEGF antibody and DAB visualization method. No specific hVEGF immunopositivity was detected in the analysed CAM sections A, C – CAM; B, D – CAM with rAAV-hVEGF. A and B are negative controls. ec – ectoderm, ed – endoderm, m – mesoderm, v – blood vessel. Scale bars: 50 µm

Discussion

The absence of detectable positive signal in CAM tissue after rAAV-VEGF treatment may be associated with several methodological and biological factors. Although the anti-hVEGF antibody successfully detected VEGF protein in transduced HUVEC cells under *in vitro* conditions, no specific staining was observed in CAM tissue. One possible explanation may involve limitations associated with the use of human-specific antibodies in avian tissue models, where differences in tissue composition, antigen accessibility, and protein epitope structure may influence antibody binding and detection efficiency. Similar methodological considerations were discussed by Nap *et al*. (2004) [7], who used an anti-human VEGF antibody in the CAM model and highlighted potential species-related limitations of VEGF-targeted approaches in chicken tissue. In addition, Liang *et al*. (2006) [8] emphasized that VEGF-targeting antibodies may exhibit species-dependent reactivity and therefore require validation for cross-species applications. The CAM model itself is also associated with certain experimental limitations, including the limited availability of validated species-specific

reagents [9]. Another possible explanation may involve technical aspects of the staining procedure, including fixation conditions, antigen accessibility, or insufficient sensitivity of the DAB-based visualization method. Despite the negative IHC findings in CAM tissue, the positive ICC staining observed in HUVEC cells confirmed successful rAAV-mediated VEGF transgene expression under *in vitro* conditions.

Conclusion

This study demonstrated successful detection of hVEGF protein expression in rAAV-hVEGF-transduced HUVEC cells using ICC analysis, confirming effective *in vitro* transgene expression. In contrast, hVEGF protein expression could not be confirmed in CAM tissue using IHC under the given experimental conditions. The negative findings observed in the CAM model may be associated with methodological limitations related to antibody specificity and the use of human-specific antibodies in avian tissue models. These results highlight the importance of validating antibodies and immunohistochemical protocols for cross-species applications and suggest that further optimization of IHC detection methods may be required for reliable hVEGF protein visualization in CAM tissue.

This research was funded by VEGA 1/0074/24 and VEGA 1/0373/24.

Literature

[1] Demcisakova, *Cancers.* **2022**, 14(17):4149
[2] Merck, *Tissue Eng Part B Rev.* **2020**, 26(6):519-539.
[3] Bulcha, *Signal Transduct Target Ther*. **2021**, 6(1):53.
[4] Chancellor, *Mol Ther.* **2023**, 31(12), 3376-3388.
[5] Shaabani, *Mol Ther Nucleic Acids.* **2022,** 29:871-899.
[6] Wang, *Nat Rev Drug Disco.* **2019**, 18(5):358-378.
[7] Nap, *Fertil Steril.* **2004**, 83(3):793-795.
[8] Liang, *J Biol Chem*. **2006**, 281(2):951-61.
[9] Ribatti, *Mech Dev*. **2016**, 141:70-77.

Vzťah PI-RADS skóre k výskytu klinicky signifikantného karcinómu prostaty

Kuffa, V.[1,2], Blaha, T.[1,2], Dušenka, R.[1,2]

[1] Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Urologická klinika; [2] Univerzitná nemocnica Martin, Urologická klinika
dusenka1@uniba.sk

Abstract

In the present study, we investigated the association between multiparametric magnetic resonance imaging (mpMRI) findings of the prostate, classified according to the PI-RADS version 2 system, and the presence of clinically significant prostate cancer (csPCa) defined by histopathology. Patients from the Department of Urology, University Hospital Martin and Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University (UNM & JLF UK) were retrospectively analyzed. A total of 106 patients who underwent mpMRI followed by fusion prostate biopsy in 2025 were included in the study. Lesions identified on mpMRI were categorized as PI-RADS 3, 4, or 5. Histopathological evaluation of biopsy specimens was performed using Gleason scoring, and csPCa was defined as Gleason score ≥7 (3+4). We analyzed the detection rates of csPCa across PI-RADS categories and performed statistical evaluation using the chi-square test.
In our cohort, the overall detection rate of csPCa was 33.6 %. We found that 14.7 % of PI-RADS 3 lesions, 41.18 % of PI-RADS 4 lesions, and 40.0 % of PI-RADS 5 lesions were associated with csPCa. Statistical analysis demonstrated a significant association between PI-RADS score and the presence of csPCa ($p = 0.034$). The study showed that higher PI-RADS categories are associated with an increased probability of clinically significant prostate cancer, confirming the diagnostic value of mpMRI in patient stratification and biopsy decision-making.

Keywords: prostate cancer, PI-RADS, multiparametric MRI, Gleason score

Úvod

Karcinóm prostaty patrí medzi najčastejšie malignity mužskej populácie a predstavuje významný medicínsky aj spoločenský problém [1]. V mnohých krajinách je najčastejšie diagnostikovaným nádorovým ochorením mužov a zároveň patrí medzi hlavné príčiny úmrtí na onkologické ochorenia [1]. Vzhľadom na vysokú incidenciu ochorenia a starnutie populácie narastá význam presnej a včasnej diagnostiky, ktorá umožňuje identifikovať pacientov s klinicky významným ochorením a zároveň minimalizovať nadmernú diagnostiku biologicky menej agresívnych nádorov [2]. Tradičný diagnostický postup založený na stanovení hladiny prostatického špecifického antigénu (PSA), digitálnom rektálnom vyšetrení a systematickej biopsii prostaty má svoje limitácie. Systematická biopsia môže viesť k poddiagnostikovaniu niektorých klinicky signifikantných nádorov, ale aj k záchytu klinicky nevýznamných karcinómov, ktoré nemusia vyžadovať okamžitú liečbu [2,5]. V posledných rokoch preto dochádza k výraznému rozvoju zobrazovacích metód, pričom multiparametrická magnetická

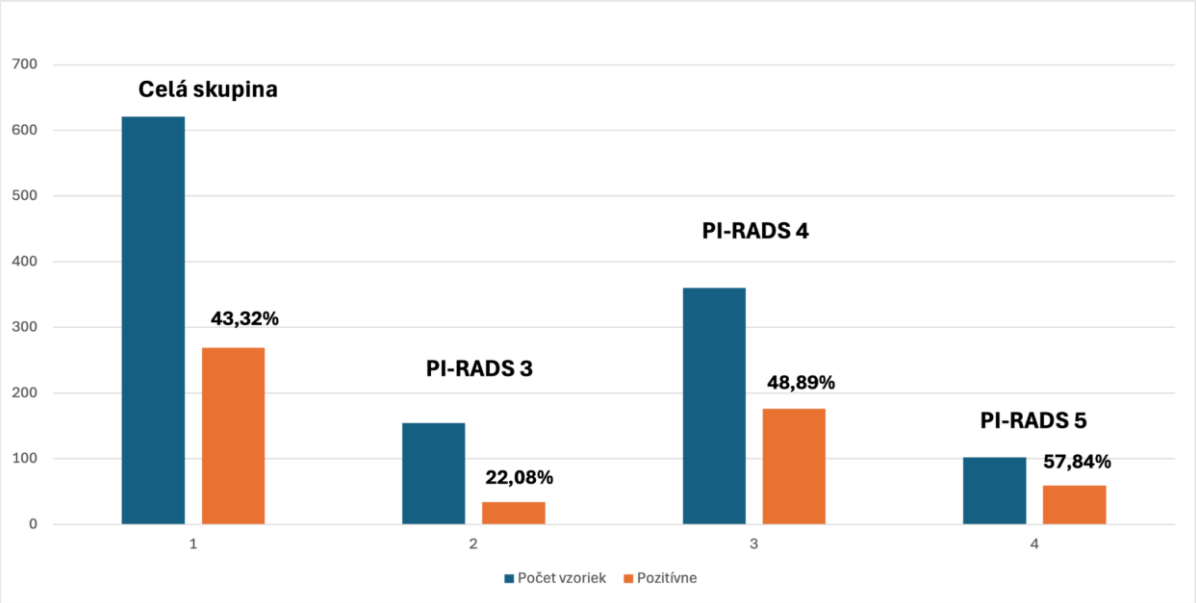
rezonancia (mpMRI) sa stala významnou súčasťou diagnostického algoritmu karcinómu prostaty [2,6]. Význam mpMRI spočíva najmä v možnosti identifikácie klinicky signifikantného karcinómu prostaty (csPCa), ktorý je definovaný ako nádor s vyšším rizikom progresie, metastázovania a potreby aktívnej liečby [3]. Viaceré štúdie preukázali, že využitie mpMRI pred biopsiou zvyšuje detekciu klinicky signifikantných nádorov a súčasne znižuje počet zbytočných biopsií [2,8]. Na štandardizáciu hodnotenia mpMRI bol vytvorený systém PI-RADS (Prostate Imaging Reporting and Data System), ktorý klasifikuje suspektné lézie podľa pravdepodobnosti prítomnosti klinicky signifikantného karcinómu prostaty [4]. Vyššie PI-RADS skóre je asociované s vyšším rizikom prítomnosti csPCa [5,8]. Histopatologická agresivita nádoru sa hodnotí pomocou Gleason skóre, ktoré patrí medzi najvýznamnejšie prognostické faktory karcinómu prostaty [3]. Za klinicky signifikantný karcinóm sa najčastejšie považuje nádor s Gleason skóre ≥7 (3+4), ktorý je spojený s vyšším rizikom progresie ochorenia a vyžaduje aktívny terapeutický prístup [3,6]. Cieľom tejto práce bolo analyzovať koreláciu medzi PI-RADS skóre na mpMRI prostaty a histopatologickým výsledkom biopsie prostaty so zameraním na výskyt klinicky signifikantného karcinómu prostaty. Tento vzťah môže prispieť k lepšiemu pochopeniu diagnostickej hodnoty mpMRI a významu systému PI-RADS pri rozhodovaní o indikácii biopsie prostaty.

Materiál a metodika

Do retrospektívnej analýzy boli zaradení pacienti z Urologickej kliniky Univerzitnej nemocnice Martin (UNM) a Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Martine (JLF UK), u ktorých bolo v priebehu roka 2025 realizované multiparametrické MRI prostaty (mpMRI) a následne fúzna biopsia prostaty pre podozrenie na karcinóm prostaty. Údaje boli získané z dostupnej zdravotnej dokumentácie a výsledkov zobrazovacích a histopatologických vyšetrení. U všetkých pacientov bolo pred vykonaním biopsie realizované mpMRI prostaty. Na základe nálezu boli identifikované suspektné lézie, ktoré boli klasifikované podľa systému PI-RADS verzie 2. Do analýzy boli zaradené lézie kategórie PI-RADS 3, PI-RADS 4 a PI-RADS 5. Hodnotenie mpMRI bolo vykonané rádiológmi so skúsenosťami v oblasti diagnostiky ochorení prostaty podľa štandardizovaných kritérií systému PI-RADS [4]. Po realizácii mpMRI bola u pacientov vykonaná fúzna biopsia prostaty zameraná na suspektné ložiská. Získané tkanivové vzorky boli spracované a histopatologicky vyhodnotené. Histopatologická agresivita nádoru bola hodnotená pomocou Gleasonovho skóre. Za klinicky signifikantný karcinóm prostaty bol považovaný nález s Gleason skóre ≥7 (3+4) [3,6]. Sledovanými premennými boli PI-RADS skóre, výsledok biopsie a prítomnosť klinicky signifikantného karcinómu prostaty. Následne bol analyzovaný vzťah medzi jednotlivými kategóriami PI-RADS a výskytom klinicky signifikantného karcinómu prostaty. Štatistická analýza bola vykonaná s cieľom posúdiť asociáciu medzi PI-RADS skóre a výskytom klinicky signifikantného karcinómu prostaty. Na porovnanie kategorizovaných premenných bol použitý chí-kvadrát test (χ^2 test). Štatistická významnosť bola stanovená na hladine $p < 0,05$. Hodnota p nižšia ako 0,05 bola interpretovaná ako dôkaz štatisticky významnej asociácie medzi hodnotenými premennými [7].

Výsledky

Celková pozitivita biopsií vo všetkých PI-RADS kategóriách dosahovala 43,32 %. Pri PI-RADS 3 bol histopatologický výsledok pozitívny v 22,08 % prípadov. Gleason skóre ≥7 bolo prítomné v 6,57 % analyzovaných vzoriek. Klinicky signifikantný karcinóm prostaty bol potvrdený u 14,7 % pacientov. Pri PI-RADS 4 bola pozitivita biopsie zaznamenaná v 48,89 % prípadov. Gleason skóre ≥7 bolo prítomné v 23,18 % vzoriek. Klinicky signifikantný karcinóm prostaty bol diagnostikovaný u 41,18 % pacientov. Najvyššia pozitivita biopsie bola zaznamenaná pri PI-RADS 5, kde pozitívny histopatologický nález dosahoval 57,84 %. Gleason skóre ≥7 bolo prítomné v 23,36 % vzoriek a u 40 % pacientov bol potvrdený klinicky signifikantný karcinóm prostaty.
Výsledky preukázali trend rastúcej pozitivity biopsií so zvyšujúcim sa PI-RADS skóre. Súčasne bol pri vyšších PI-RADS kategóriách pozorovaný vyšší výskyt klinicky signifikantného karcinómu prostaty. Rastúca pozitivita biopsií so zvyšujúcim sa PI-RADS skóre je v súlade s publikovanými dátami [5]. Vyššie PI-RADS kategórie sú spojené s vyššou pravdepodobnosťou klinicky signifikantného karcinómu prostaty [5,8].



Obrázok 1 Výsledky porovnania PI-RADS skóre s výsledkom pozitivity histológie fúznej biopsie prostaty

Diskusia

Multiparametrická MRI prostaty predstavuje v súčasnosti významnú zobrazovaciu metódu pri diagnostike karcinómu prostaty. Jej hlavným cieľom nie je detekcia všetkých karcinómov prostaty, ale predovšetkým identifikácia klinicky signifikantných nádorov, ktoré majú potenciál progresie a vyžadujú aktívnu liečbu [2]. Zavedenie systému PI-RADS prinieslo štandardizovaný spôsob hodnotenia mpMRI nálezov a umožnilo efektívnejšiu stratifikáciu pacientov podľa rizika prítomnosti klinicky signifikantného karcinómu prostaty [4]. V našom súbore bola preukázaná rastúca pozitivita biopsií so stúpajúcim PI-RADS skóre. Pri PI-RADS 3 bola pozitivita relatívne nízka, zatiaľ čo pri PI-RADS 4 a PI-RADS 5 dosahovala výrazne vyššie hodnoty. Tento trend bol potvrdený aj štatistickou analýzou, ktorá preukázala signifikantnú asociáciu

medzi PI-RADS skóre a výskytom klinicky signifikantného karcinómu prostaty. Naše výsledky sú v súlade s publikovanými štúdiami, ktoré uvádzajú vyššiu pravdepodobnosť detekcie klinicky signifikantného karcinómu prostaty pri vyšších PI-RADS kategóriách [5,8]. Metaanalýza *Schootsa et. al.* potvrdila, že mpMRI významne zlepšuje detekciu klinicky signifikantných nádorov v porovnaní so samotnou systematickou biopsiou [8]. Významným zistením bol aj rastúci výskyt Gleason skóre ≥ 7 pri vyšších PI-RADS kategóriách. Pri PI-RADS 3 bol výskyt klinicky signifikantného karcinómu relatívne nízky, zatiaľ čo pri PI-RADS 4 a PI-RADS 5 bol výrazne vyšší. Tento nález podporuje predpoklad, že vyššie PI-RADS skóre koreluje s vyššou pravdepodobnosťou biologicky agresívnejšieho nádoru [4,9]. Z klinického hľadiska je táto skutočnosť mimoriadne dôležitá, pretože práve identifikácia nádorov s vyšším Gleasonovým skóre predstavuje hlavný prínos mpMRI v predbioptickom vyšetrení pacientov [2,3]. Napriek tomu nebola v našom súbore pri PI-RADS 5 zaznamenaná výrazne vyššia incidencia klinicky signifikantného karcinómu prostaty v porovnaní s PI-RADS 4. Tento výsledok môže byť ovplyvnený limitovaným počtom pacientov v jednotlivých skupinách, heterogenitou nádorových lézií alebo samotnými limitáciami bioptického odberu. Je známe, že histopatologický výsledok biopsie nemusí vždy plne odrážať rozsah a biologickú agresivitu nádoru, pričom ku zmene Gleasonovho skóre môže dôjsť až po vyšetrení celej prostaty po radikálnej prostatektómii [3]. Možno uviesť, že korelácia medzi PI-RADS skóre a presným Gleason gradingom nie je vždy jednoznačná ani lineárna. Viacerí autori poukazujú na skutočnosť, že aj vysoko suspektné lézie na mpMRI môžu vykazovať rozdielnu histopatologickú agresivitu a naopak, niektoré klinicky signifikantné nádory nemusia dosahovať najvyššie PI-RADS kategórie [9]. Z tohto dôvodu nemožno PI-RADS skóre považovať za náhradu histopatologického vyšetrenia, ale skôr za nástroj na odhad pravdepodobnosti prítomnosti klinicky významného ochorenia [4]. Limitáciou našej práce je retrospektívny charakter analýzy a hodnotenie výsledkov na základe bioptických vzoriek, ktoré nemusia vždy reprezentovať celý nádorový proces. Ďalším limitujúcim faktorom môže byť veľkosť súboru, ktorá mohla ovplyvniť výsledky v jednotlivých PI-RADS kategóriách. Napriek týmto obmedzeniam však získané výsledky korešpondujú s publikovanými údajmi a podporujú klinický význam mpMRI v diagnostike karcinómu prostaty [5,8]. Výsledky tejto práce podporujú využitie mpMRI prostaty pri selekcii pacientov indikovaných k biopsii a pri identifikácii pacientov s vyšším rizikom klinicky signifikantného karcinómu prostaty. Súčasne potvrdzujú význam systému PI-RADS ako praktického nástroja na stratifikáciu rizika a optimalizáciu diagnostického postupu u pacientov s podozrením na karcinóm prostaty [4,6].

Záver

Multiparametrická magnetická rezonancia prostaty (mpMRI) a systém PI-RADS predstavujú významné nástroje v diagnostike karcinómu prostaty a zohrávajú dôležitú úlohu pri identifikácii pacientov s vyšším rizikom klinicky signifikantného ochorenia [6]. V našom súbore bola preukázaná štatisticky významná asociácia medzi PI-RADS skóre a výskytom klinicky signifikantného karcinómu prostaty ($p = 0,034$). Tento výsledok potvrdzuje, že pravdepodobnosť prítomnosti klinicky signifikantného karcinómu narastá so zvyšujúcim sa PI-RADS skóre. Najvyšší výskyt klinicky

signifikantného karcinómu prostaty bol zaznamenaný v kategóriách PI-RADS 4 a PI-RADS 5, zatiaľ čo pacienti s nálezom PI-RADS 3 vykazovali nižšiu incidenciu klinicky významného ochorenia. Naše výsledky korešpondujú s publikovanými údajmi, ktoré poukazujú na významnú schopnosť mpMRI predikovať prítomnosť klinicky signifikantného karcinómu prostaty a podporujú využitie systému PI-RADS pri stratifikácii rizika pacientov indikovaných na biopsiu prostaty [9]. Presnejšia identifikácia rizikových pacientov môže prispieť k efektívnejšiemu využívaniu bioptických vyšetrení a k zlepšeniu diagnostiky nádorov s potenciálom klinickej progresie [2,8]. Napriek priaznivým výsledkom je potrebné mať na pamäti, že mpMRI nie je bez limitácií a jej diagnostická presnosť môže byť ovplyvnená viacerými faktormi vrátane kvality vyšetrenia, interpretácie nálezov a histopatologickej korelácie [4]. Histopatologické vyšetrenie preto naďalej zostáva rozhodujúcou metódou na potvrdenie diagnózy a stanovenie biologickej agresivity nádoru [3]. Získané výsledky podporujú význam mpMRI a systému PI-RADS ako dôležitej súčasti moderného diagnostického algoritmu karcinómu prostaty [6].

Literatúra

[1] Siegel, *CA Cancer J Clin*. **2024**, 74(3):12-49.
[2] Ahmed, *Lance*t. **2017**, 389(10071):815-822.
[3] Epstein, *Eur Urol*. **2012**, 61(5):1017-1040.
[4] Weinreb, *Eur Urol.* **2016**, 69(1):16-40.
[5] Pokorny, *BJU Int.* **2014**, 114(5):661-670.
[6] EAU Guidelines Prostate Cancer, *Eur Urol*. **2024**, 85(1):1-88.
[7] McHugh, *Biochem Med (Zagreb).* **2013**, 23(2):143-149.
[8] Schoots, *Eur Urol.* **2015**, 68(2):219-234.
[9] Slaoui, *Radiology*. **2017**, 285(2):450-458.

Ossa suturarum: observačná štúdia morfologických nálezov a prehľad literatúry

Mazuráková, A., Hešková, G., Samec, I., Výbohová, D.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin
alena.mazurakova@uniba.sk

Abstract

Ossa suturarum (OS) are small irregularly shaped bones occurring within cranial sutures and fontanelles, most frequently in the lambdoid suture. The aim of this study was to morphologically document the occurrence of OS in an osteological collection from the Department of Anatomy, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University, and to summarize current knowledge on their incidence across different populations. Ossa suturarum were identified in 11 out of 38 evaluated human skull specimens (28.9 %), with the most frequent occurrence being unilateral localization in the left or right lambdoid suture region (7.9 % each), while bilateral occurrence in the lambdoid suture was observed in 2.6 % of specimens and, in four cases (10.5 %), the ossa suturarum were present in lambdoid suture in combination with other localizations or outside the lambdoid suture region only. The literature review confirmed considerable interpopulation variability in OS frequency. The clinical relevance of OS lies mainly in the differential diagnosis of skull fractures in radiological imaging.

Keywords: ossa suturarum, ossa Wormiana, sutures, skull, morphology

Úvod

Ossa suturarum (OS), tiež známe ako intrasuturálne kosti, predstavujú nepravidelne tvarované kostné útvary vyskytujúce sa v oblastiach fontanel a lebečných švov (suturae), najčastejšie sutura lambdoidea. V literatúre sú známe aj pod názvom ossa Wormiana, podľa dánskeho anatóma a teológa Ole Worma [1,2,3,4]. Frekvencia výskytu OS sa medzi populáciami môže líšiť [1,5,6], pričom sa všeobecne považujú za relatívne časté anatomické varianty a často sú náhodným nálezom [5,6]. Cieľom štúdie je zdokumentovať morfologické pozorovanie preparátov lebky s prítomnými OS nachádzajúce sa v osteologickej zbierke Ústavu anatómie JLF UK, zhrnúť aktuálne poznatky o frekvencii ich výskytu v rámci rôznych populácií a zdôrazniť klinický význam pri rádiologickej interpretácii lebky.

Materiál a metódy

Morfologické pozorovanie bolo realizované s využitím suchých preparátov ľudskej lebky, bez údajov o veku a pohlaví v rámci osteologickej zbierky Ústavu anatómie Jesseniovej lekárskej fakulty UK v Martine. Preparáty s prítomnými OS boli fotograficky zdokumentované.

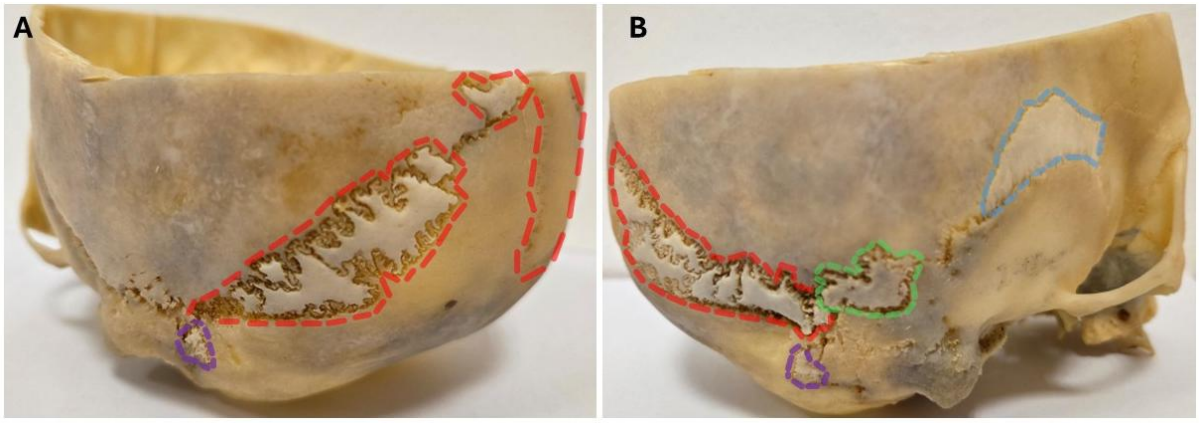
Prehľad literatúry bol spracovaný na základe článkov, ktoré boli identifikované prostredníctvom vyhľadávania v databáze PubMed s použitím kľúčových slov „ossa suturarum“ alebo „intrasutural bones“ alebo „ossa wormiana“ alebo „wormian bones“.

Výsledky

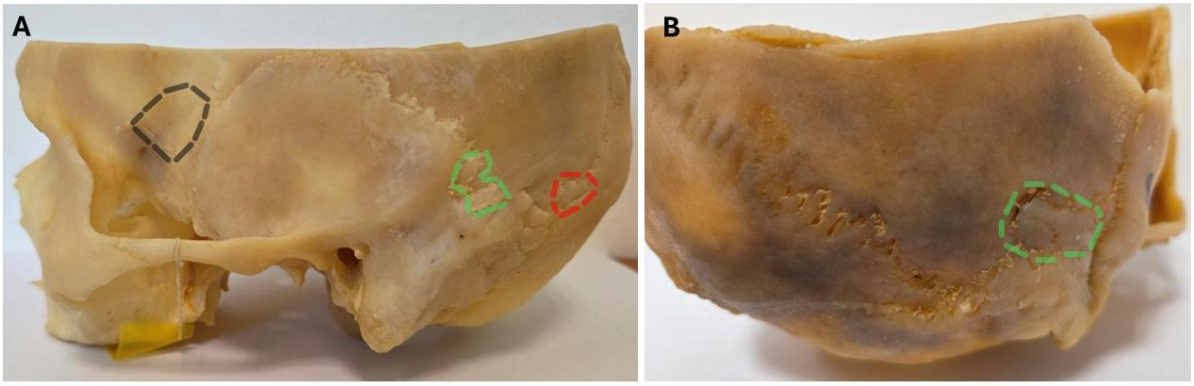
Morfologické pozorovanie

Z celkového počtu 38 hodnotených osteologických preparátov ľudskej lebky bol zaznamenaný výskyt OS v prípade 11 lebiek (28,9 %).

- Preparáty č. 1, 2, 3 a 4: OS v oblasti sutura lambdoidea v kombinácii s ďalšími lokalizáciami (Preparát č. 1 - Obr. 1A, 1B, Preparát č. 2 - Obr. 2A), Preparát č. 4 - Obr. 3A, 3B) alebo výlučne v iných oblastiach mimo sutura lambdoidea (Preparát č. 3 - Obrázok 2B) (v štyroch preparátoch z 38; 10,5 %).
- Preparát č. 5, 6, 7: unilaterálny výskyt OS v oblasti sutura lambdoidea sinistra (v troch preparátoch z 38; 7,9 %).
- Preparát č. 8, 9, 10: unilaterálny výskyt OS v oblasti sutura lambdoidea dextra (v troch preparátoch z 38; 7,9 %).
- Preparát č. 11: bilaterálny výskyt OS v oblasti sutura lambdoidea (v jednom preparáte z 38; 2,6 %).

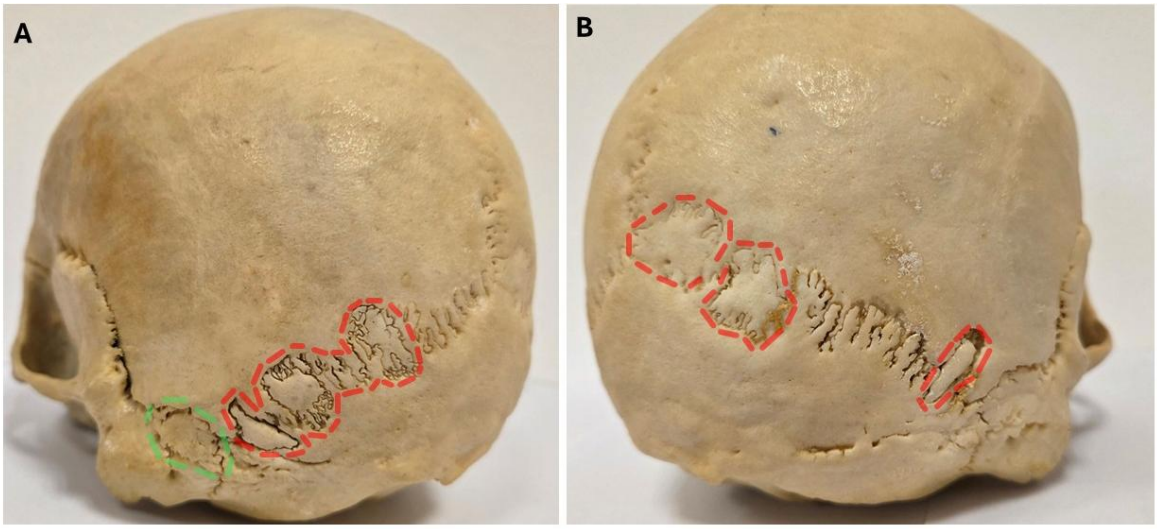


Obrázok 1 *Ossa suturarum* identifikované v preparáte 1; Obrázok 1A (Preparát č. 1, hemicranium sinistrum, dorzolaterálny pohľad): OS v oblasti sutura occipitomastoidea (zvýraznené fialovou farbou) a sutura lambdoidea (zvýraznené červenou farbou). Obrázok 1B (Preparát č. 1, hemicranium dextrum, dorzolaterálny pohľad): OS v oblasti sutura parietomastoidea (zvýraznené zelenou farbou), sutura occipitomastoidea (zvýraznené fialovou farbou), sutura squamosa (zvýraznené modrou farbou) a sutura lambdoidea (zvýraznené červenou farbou)



Obrázok 2 *Ossa suturarum* identifikované v preparáte 2 a Preparáte 3; Obrázok 2A (Preparát č. 2, hemicranium sinistrum, laterálny pohľad): OS v oblasti sutura lambdoidea (zvýraznené červenou farbou), sutura parietomastoidea (zvýraznené zelenou farbou) a sutura sphenoparietalis (zvýraznené

čiernou farbou). Obrázok 2B (Preparát č. 3, hemicranium dextrum, dorzolaterálny pohľad): OS v oblasti sutura parietomastoidea (zvýraznené zelenou farbou)

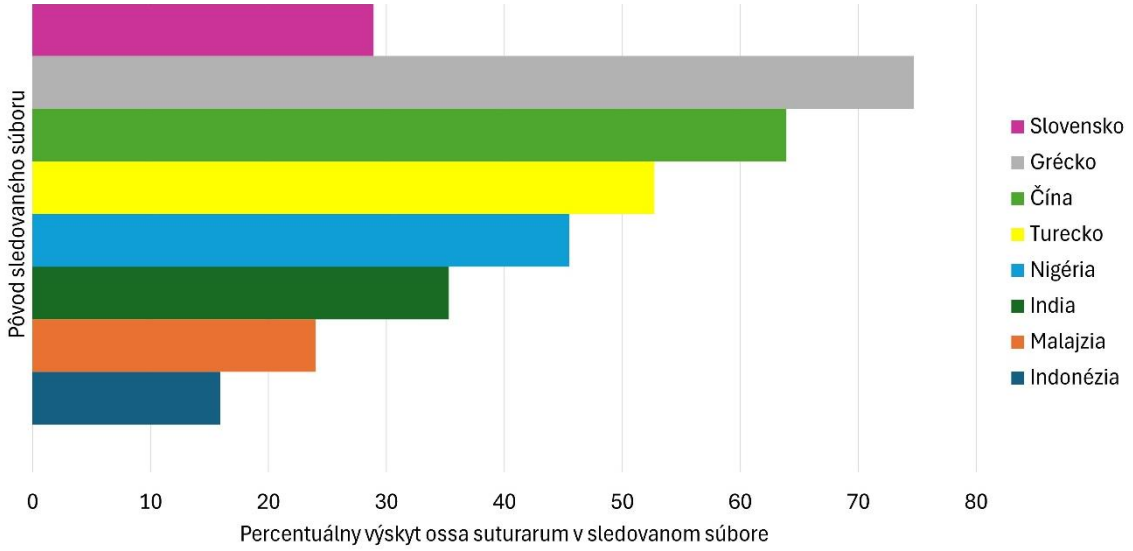


Obrázok 3 *Ossa suturarum* identifikované v preparáte 4; Obrázok 3A (Preparát č. 4, hemicranium sinistrum, dorzolaterálny pohľad): OS v oblasti sutura parietomastoidea (zvýraznené zelenou farbou) a sutura lambdoidea (zvýraznené červenou farbou). Obrázok 3B (Preparát č. 4, hemicranium dextrum, dorzolaterálny pohľad): OS v oblasti sutura lambdoidea (zvýraznené červenou farbou)

Prehľad literatúry

OS predstavujú kostné útvary nepravidelného tvaru a počtu, vyskytujúce sa v oblasti lebečných švov alebo fontanel [7]. V roku 2008, Barberini a kol. opísali prípad šesťdesiatšesť ročnej ženy „kaukazského pôvodu“ s os suturale, ktorá úplne vypĺňala priestor bregmatickej fontanely [8]. OS sa teda môžu vyskytovať v oblasti bregmy, pterion, sutura sagittalis, sutura occipitomastoidea, sutura coronalis a iné [9]. Najčastejšie sa však OS nachádzajú v oblasti sutura lambdoidea [9]. Zároveň sa OS môžu nachádzať v rámci jednej lebky viacpočetne, či už v rámci jednej sutúry alebo vo viacerých oblastiach zároveň [10]. Vznik OS sa najčastejšie popisuje ako dôsledok nadpočetných osifikačných centier [3]. V oblasti squama ossis occipitalis môže variabilná osifikácia viesť k prítomnosti transverzálnych sutúr približne na úrovni linea nuchalis superior. Kraniálne od tejto transverzálnej sutúry sa môžu v rámci suturálnych spojení alebo ich okolia vyskytovať drobné samostatné kostné elementy (OS) [9]. V súvislosti s OS sa popisuje pomerne široké rozpätie variability tvaru, počtu a lokalizácie. OS sa môžu vyskytovať izolovane alebo v skupinách a ich výskyt môže byť bilaterálny alebo unilaterálny [9]. Interpopulačné rozdiely vo frekvencii výskytu a anatomickej distribúcii OS naznačujú účasť genetických determinantov a faktorov prostredia na ich etiológii [5,6]. Na základe dostupnej literatúry a štúdií realizovaných prevažne na osteologických preparátoch bola frekvencia výskytu OS vo vzorkách jednotlivých populácií nasledovná: Turecko 52,7 % [9] a západná Anatólia 59,3 % [11], India 35,3 % [7], Afrika - Nigéria 45,5 % [12], Čína 63,9 % [13], pričom v každej z uvedených štúdií sa OS najčastejšie vyskytovali v oblasti sutura lambdoidea a niektoré štúdie poukazujú na vyšší výskyt u mužov [6,7,9,11–15]. Pomerne vysoká frekvencia OS bola popísaná aj vo vzorke populácie Grécka (74,7 %), taktiež

najčastejšie v sutura lambdoidea, bez rozdielu v pohlaví a veku [14]. Percentuálne nižší výskyt OS sa popisuje v štúdiách uskutočnených na vzorke populácie Malajzie (24 %) s majoritným výskytom v oblasti sutura lambdoidea [6] a Indonézie (15,9 %) s výskytom v sutura coronalis, sutura squamosa a sutura sagittalis [15]. Výskyt OS v našom súbore dosiahol 28,9 %, pričom táto hodnota sa pohybuje v rámci pomerne širokého rozpätia uvádzaného v literatúre, kde sú opisované tak nižšie, ako aj vyššie frekvencie v rôznych populáciách. Obrázok 4 zobrazuje grafické porovnanie percentuálneho výskytu OS v rámci populácií (vytvorený na základe [6,7,9,11-15]).



Obrázok 4 Porovnanie výskytu *ossa suturarum* medzi populáciami

Interpopulačná analýza poukazuje na výraznú variabilitu vo frekvencii výskytu OS [6,7,9,11-15]. Na základe dostupných údajov avšak nie je etiológia OS jednoznačne objasnená. V literatúre sa opisuje genetický vplyv a faktory prostredia [5,6], ale taktiež boli opísané viaceré potencionálne asociácie medzi prítomnosťou OS a rôznymi patologickými stavmi. Niektoré práce naopak podobnú súvislosť nepreukázali. Celkovo sú teda OS v literatúre vnímané ambivalentne, ako možný variant normy alebo ako sprievodný znak vývinových alebo systémových porúch, napr. v súvislosti s ich zvýšeným počtom [5,7,16-19]. Nedávne práce navyše naznačujú, že časť nálezov označovaných ako OS môže odrážať remodelačné zmeny v oblasti lebečných švov, najmä sutura lambdoidea, ktorá je mechanicky zaťažovanou zónou lebky [19]. Zároveň, štúdia uskutočnená na konských lebkách preukázala súvislosť OS s nižšou tuhosťou kosti, pričom doplnené počítačové simulácie poukazujú na ich možnú úlohu pri zvýšenej poddajnosti kostí a potencionálne nižšom riziku fraktúr lebky [20].

Záver

V analyzovanom osteologickom súbore bola zistená prítomnosť OS v 28,9 % preparátov lebky. Zistená frekvencia výskytu OS sa pohybuje v rozmedzí hodnôt uvádzaných v zahraničných štúdiách [6,7,9,11-15]. Rozdiely vo frekvencii výskytu OS medzi jednotlivými štúdiami môžu súvisieť s interpopulačnou variabilitou, ale aj s metodickými rozdielmi, ako sú veľkosť skúmaného súboru, veková a pohlavná

distribúcia alebo kritériá identifikácie OS. V súlade s väčšinou publikovaných prác bola aj v našom súbore najčastejšou lokalizáciou OS oblasť sutura lambdoidea [6,7,9,11-15]. V našom súbore sme pozorovali aj mnohopočetný výskyt OS v sutura lambdoidea a zároveň tri z našich preparátov vykazovali výskyt OS v rámci jednej lebky vo viacerých oblastiach (sutúrach), čo korešponduje s literárnymi údajmi opisujúcimi variabilitu ich počtu a distribúcie [10]. Klinický význam OS spočíva predovšetkým v interpretácii pri rádiologickom vyšetrení lebky, keďže môžu byť zamieňané za fraktúry. Z tohto dôvodu je znalosť OS dôležitá pre správnu diagnostiku a klinickú prax [2,18,21].

Literatúra

[1] Movsesian, *Egypt J Forensic Sci.* **2024**, *14(1)*:33.
[2] Čihák, *Grada Publishing, a.s.,* **2011**, 552 s., ISBN 978-80-247-3817-8.
[3] Bellary, *Clin Anat.* **2013**, 26(8): 922-927.
[4] Singh, *J Craniofac Surg.* **2024**, *35(1)*: 247-250.
[5] Alter, *Childs Nerv Syst.* **2026**, *42*(3): 2026.
[6] Khan, *Folia Morphol (Warsz).* **2011**, *70(4)*: 291-294.
[7] Goyal, *Int J Appl Basic Med Res.* **2019**, 9(3): 165-168.
[8] Barberini, *Surg Radiol Anat.* **2008**, *30*: 683-687.
[9] Ogut, *Egypt J Forensic Sci.* **2023**, *13*(19): 1-12.
[10] Ghosh, *Anat Sci Int*. **2017**, *92*:373-382.
[11] Cirpan, *Craniofac Surg.* **2015**, *26*:1687-1690.
[12] Uchewa, *Int J Anat Var*. **2011**, *11*.
[13] Li, *Folia Morphol (Warsz)*. **2023**, *82*.
[14] Natsis, *Folia Morphol (Warsz).* **2019**, *78*:359-370.
[15] Ratnaningrum, *Transl Res Anat*. **2020**, *18*:100061.
[16] Pryles, *Am J Dis Child*. **1979**, *133*:380-382.
[17] Jeanty, *J Ultrasound Med*. **2000**, *19*:863-869.
[18] Shrestha, *Kathmandu Univ Med J (KUMJ).* **2023**, *21*:372-375.
[19] Al Kaissi, *Diagnostics (Basel)*. **2023**, *13*:874.
[20] Zambrano, *PLoS One.* **2021**, *16*:e0249451.
[21] Govsa, *Turk Neurosurg.* **2014**, *24*:357-362.

Hodnotenie edému a apoptózy epitelových buniek pľúc králikov s modelom akútneho poškodenia pľúc – porovnanie dvoch typov CMV ventilátorov

Mokrá, D.[1], Bálentová, S.[2], Košútová, P.[3], Mikolka, P.[1], Adamkov, M.[2], Čalkovská, A.[1]

[1] Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav fyziológie; [2] Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie; [3] Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu, Martin
daniela.mokra@uniba.sk

Abstract

In acute lung injury (ALI), conventional mechanical ventilation (CMV) remains a therapeutic method of choice. As various ventilation devices can be used for this purpose, aim of this study was to compare changes in the lungs of rabbits with ALI induced by repetitive saline lavage that were ventilated with CMV by means of ventilators SLE5000 or Aura V. Anesthesized and oxygen-ventilated New Zealand rabbits were saline lung-lavaged until the respiratory insufficiency was reached. Subsequently, the animals were ventilated with CMV settings using ventilators SLE5000 (ALI+SLE, n=7) or Aura V (ALI+Aura, n=7) for additional 4 hours. Other animals served as non-ventilated controls (Control, n=6). At the end of experiment, left lung was saline-lavaged and total cell count, cell viability and protein content in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined by Bradford´s method. Right lung was used for determination of wet/dry lung weight ratio and immunohistochemical analyses of apoptosis of lung epithelial cells by TUNEL methods and detection of caspase-3. Repetitive saline lung lavage caused significant increase in total cell count in the BALF ($p<0.01$ for both ALI groups vs Control), and increased lung edema formation as demonstrated by elevated protein concentration in the BALF ($p<0.001$ for both ALI groups vs Control) and higher wet-dry lung ratio in both ALI groups compared to healthy controls (ALI+SLE vs Control: $p<0.01$, ALI+Aura vs Control: $p<0.05$). In both ALI groups, increased lung cell apoptosis was found compared to controls as indicated by increased apoptotic index (ALI+SLE vs Control: $p=0.06$, ALI+Aura vs Control: $p<0.05$), elevated number of caspase-3 immunoreactive cells ($p<0.01$ for both ALI groups vs Control), and viability% (ALI+SLE vs Control: $p=0.06$, ALI+Aura vs Control: $p<0.01$). However, no differences in the evaluated parameters were found between the ALI groups ($p>0.05$). In conclusion, both ventilators using lung-protective CMV ventilation settings exerted comparable impact on the lung, with no clear preference for any of the ventilators in this model of ALI.

Keywords: saline lung lavage, rabbit model, conventional mechanical ventilation

Úvod

Akútne poškodenie pľúc je závažným, často až život ohrozujúcim stavom, ktorý môže vzniknúť z priamych (pľúcnych), ale aj nepriamych (mimopľúcnych) príčin. Základom liečby pacienta s respiračným zlyhávaním je neinvazívna ventilačná podpora a inhalácia vyšších koncentrácií kyslíka. V závažnejších prípadoch je nutné pristúpiť

k intubácii a invazívnej ventilácii pacienta pomocou ventilátora [1]. Cieľom umelej pľúcnej ventilácie je zabezpečiť dostatočnú výmenu dýchacích plynov v pľúcach, teda primeranú oxygenáciu a elimináciu oxidu uhličitého. Najpoužívanejším typom konvenčnej mechanickej ventilácie (CMV) je tzv. pľúca-šetriaca ventilácia (lung-protective ventilation), ktorá chráni pľúca pred ďalším poškodením použitím nízkych dychových objemov (V_T, <6 ml/kg), kontrolovaných hodnôt vrcholového inspiračného tlaku (PIP, <3 kPa) a primeranej hodnoty tlaku v dýchacích cestách na konci výdychu (PEEP, 0,4 - 0,7 kPa) [2]. Na ventilovanie pacienta podľa vyššie uvedených odporúčaní je možné použiť viaceré pacientske ventilátory, ktoré sú dostupné na zdravotníckom trhu. Cieľom našej štúdie bolo porovnať účinky dvoch rôznych ventilátorov na niektoré markery poškodenia pľúc (tvorbu pľúcneho edému a apoptózu epitelových buniek), a to s použitím králikov, u ktorých sme opakovanou lavážou pľúc fyziologickým roztokom vytvorili model respiračného zlyhávania.

Materiál a metodika

V experimentoch sme použili novozélandské biele králiky s hmotnosťou 2,5±0,3 kg (dodávateľ: Velaz, ČR). Experimenty spĺňali platné etické normy a ich protokol bol odsúhlasený Etickou komisiou JLF UK a ŠVPS. Zvieratá boli počas experimentu v celkovej anestéze. Skupina zdravých neventilovaných zvierat (Kontrola) bola v tejto fáze experimentu usmrtená predávkovaním anestetika. Ostatné zvieratá sme ventilovali konvenčne ventilátorom SLE5000 (SLE Limited, Veľká Británia) alebo Aura V (Chirana, Stará Turá) s nasledovnými nastaveniami parametrov: frekvencia 40/min, FiO_2 100 %, Ti 50 %, PEEP 0,5 kPa, stredný tlak v dýchacích cestách (MAP) 0,7 - 0,8 kPa a V_T <6 ml/kg. Model ALI sme vytvorili opakovaným i.t. podávaním fyziologického roztoku (0,9% NaCl, 37°C, objem 30 ml/kg), ktorý sme následne odsali odsávačkou. Vytvorenie modelu ALI sme určili na základe poklesu PaO_2 na hodnoty <26,7 kPa pri FiO_2 100% v dvoch po sebe nasledujúcich meraniach 5 a 15 minút od ukončenia laváží [3]. Zvieratá s modelom ALI boli naďalej ventilované pomocou ventilátora SLE5000 (ALI+SLE, n=7) alebo Aura V (ALI+Aura, n=7) počas nasledujúcich 4 hodín. Na konci experimentu sme zvieratá usmrtili predávkovaním anestetika. Vybrali sme pľúca a tracheu. Po podviazaní pravého bronchu sme ľavé pľúca lavážovali fyziologickým roztokom (3x10 ml/kg). V získanej bronchoalveolárnej lavážnej tekutine (BALF) sme pomocou analyzátora Countess (Invitrogen) ofarbením buniek trypánovou modrou stanovili počet buniek v BALF, ako aj ich viabilitu (%). Po centrifugácii sme v BALF určili aj obsah proteínov metódou podľa Bradforda [4]. Časť tkaniva pravých pľúc sme odvážili, sušili 24 h pri 60ºC a stanovili pomer vlhkej a suchej hmotnosti pľúc (wet-dry lung weight ratio). Apoptózu pľúcnych epitelových buniek sme určili pomocou TUNEL metódy a na základe detekcie kaspáza-3 imunoreaktívnych buniek [3]. Na štatistické spracovanie výsledkov sme použili SYSTAT for Windows. Rozdiely medzi skupinami sme analyzovali pomocou one-way ANOVA testu s post-hoc Fisher's LSD testom. Hodnotu $p<0,05$ sme považovali za štatisticky významnú. Výsledky sme vyjadrili ako aritmetické priemery±SEM.

Výsledky

Následkom lavážovania pľúc sa signifikantne zvýšili celkové počty buniek v BALF, a to

porovnateľne v oboch ALI skupinách v porovnaní s Kontrolou ($p<0,01$ pre obe ALI skupiny vs Kontrola). Po vytvorení modelu ALI sa zvýšili aj hodnoty oboch markerov tvorby pľúcneho edému: pomeru vlhkej a suchej hmotnosti pľúc (ALI+SLE vs Kontrola: $p<0,01$, ALI+Aura vs Kontrola: $p<0,05$) a celkovej koncentrácie proteínov v BALF ($p<0,001$ pre obe ALI skupiny vs Kontrola). V skupinách s ALI sme pozorovali aj zvýšenie markerov apoptózy pľúcnych epitelových buniek, a to zvýšenie apoptotického indexu v alveolách a bronchoch (ALI+SLE vs Kontrola: obe $p=0,06$, ALI+Aura vs Kontrola: obe $p<0,05$) a zvýšenie počtu kaspáza-3 imunoreaktívnych buniek v alveolách a bronchoch ($p<0,01$ pre obe ALI skupiny vs Kontrola). Zvýraznenie apoptózy pľúcnych buniek pri ALI sa potvrdilo aj nálezom zníženej viability buniek BALF (ALI+SLE vs Kontrola: $p=0,06$, ALI+Aura vs Kontrola: $p<0,01$). Ani v jednom z hodnotených parametrov sme nezaznamenali signifikantné rozdiely medzi ALI skupinami (Tab. 1).

Tabuľka 1: Markery poškodenia pľúc a apoptózy v kontrolnej skupine (Kontrola) a v skupinách s ALI ventiláciou ventilátorom SLE5000 (ALI+SLE) a ventilátorom Aura V (ALI+Aura). Dáta sú vyjadrené ako priemery±SD. Štatistické porovnanie: ALI skupiny vs Kontrola: *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001; medzi ALI skupinami: p>0,05.

	Kontrola	**ALI+SLE**	**ALI+Aura**
Počet buniek v BALF	124±66	733±585**	891±771**
Viabilita buniek BALF (%)	64±14	45±24	38±12**
Pomer vlhkej a suchej hmotnosti pľúc	4,9±0,6	6,1±0,6**	6,2±1,1*
Proteíny v BALF (mg/ml)	0,73±0,02	0,85±0,06	0,91±0,07
Apoptotický index – alveoly	1,3±1,3	2,8±1,7	3,0±1,7*
Apoptotický index – bronchy	0,2±0,4	8,6±12,0	8,9±12,3*
Kaspáza-3 pozitívne bunky – alveoly	16,7±10,5	51,5±32,2***	49,0±21,1***
Kaspáza-3 pozitívne bunky – bronchy	10,0±2,3	21,4±16,3**	14,6±12,4**

Diskusia

Na hodnotenie účinnosti pacientskych ventilátorov SLE5000 a AuraV sme použili jeden zo všeobecne akceptovaných modelov ALI, a to model vytvorený opakovaným lavážovaním pľúc fyziologickým roztokom [5].Táto procedúra spôsobuje depléciu surfaktantu v alveolárnych priestoroch, čo následne vedie k poklesu poddajnosti pľúc, zhoršeniu výmeny dýchacích plynov, predovšetkým k hypoxii, a respiračnej acidóze. Hoci je v porovnaní s inými, agresívnejšími modelmi ALI, napr. modelom syndrómu aspirácie mekónia [6,7], lavážový model miernejší, dochádza aj pri ňom k zvýšeniu permeability alveolo-kapilárnej membrány a prenikaniu polymorfonukleárov do alveolárneho priestoru [5]. V našej štúdii sme v oboch skupinách zvierat s ALI v porovnaní so zdravými kontrolami pozorovali signifikantné zvýšenie celkového počtu buniek v BALF, čo potvrdzuje významnú infiltráciu poškodených pľúc zápalovými bunkami, najmä neutrofilmi. Okrem toho sme v oboch skupinách s ALI zaznamenali signifikantné zvýšenie tvorby pľúcneho edému v porovnaní so zdravými kontrolami, čo sa potvrdilo nálezom zvýšeného pomeru vlhkej a suchej hmotnosti pľúc (wet-dry ratio),

ako aj nálezom zvýšenej koncentrácie proteínov v BALF. Priepustnosť alveolo-kapilárnej membrány a prenikanie tekutiny bohatej na bielkoviny z kapilár do alveolárneho priestoru sa zvyšuje aj v dôsledku zvýšenej apoptózy epitelových buniek alveol a bronchov [8]. K iniciácii apoptózy dochádza dvomi alternatívnymi cestami: externou, ktorú spúšťa väzba ligandu smrti (napr. TNFα) na špecifické receptory na povrchu bunky, alebo internou, ktorá je aktivovaná cytokínmi, hypoxiou alebo oxidantami. Obe cesty konvergujú a aktivujú kaspázy-3, -6 alebo -7, zodpovedné za vykonanie bunkovej smrti [9]. Naše výsledky ukázali, že k významnej aktivácii pro-apoptotických procesov v pľúcach králikov dochádza už v priebehu niekoľkých hodín od poškodenia pľúc lavážami. Lavážovanie pľúc viedlo ku zvýšeniu apoptotického indexu v epiteli alveol aj bronchov, ako aj ku zvýšeniu počtu kaspáza-3 pozitívnych buniek v alveolách a bronchoch, a to bez signifikantných rozdielov medzi ALI skupinami. Zvýšenie apoptózy buniek v pľúcach pri ALI potvrdila aj ďalšia orientačná analýza viability buniek pomocou značenia trypánovou modrou, ktorá ukázala pokles viability buniek po vytvorení modelu ALI v porovnaní s kontrolami.

Záver

Opakovaná laváž pľúc králikov fyziologickým roztokom zvýšila počet buniek v BALF, tvorbu pľúcneho edému a apoptózu pľúcnych epitelových buniek. Tvorba edému a apoptóza pľúcnych buniek boli v oboch ALI skupinách napriek rozdielnym typom použitých ventilátorov veľmi podobné. Tieto výsledky naznačujú, že v prípade, že na ventiláciu poškodených pľúc použijeme pľúca-šetriacu CMV ventiláciu, výber konkrétneho ventilátora závisí najmä od dostupnosti prístrojov na danom pracovisku.

Táto publikácia vznikla vďaka spolufinancovaniu Európskou úniou v rámci Programu Slovensko pre projekt s názvom *Inovatívne postupy v liečbe respiračných ochorení*, kód ITMS21+: 401101C648, ako aj projektu APVV-15-0075.

Literatúra

[1] Mokrá, *Physiol Res*. **2020**, 69(Suppl 3):S353-S366.
[2] Young, *Crit Care Nurs Q*. **2019**, 42(4):392-399.
[3] Mokrá, *J Physiol Pharmacol*. **2016**, 67:919-932.
[4] Bradford, *Anal Biochem*. **1976**, 72:248-254.
[5] Matute-Bello, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2008**, 295(3):L379-99.
[6] Mokrá, *Respir Physiol Neurobiol*. **2013**, 187(1):52-7.
[7] Košútová, *Antioxidants (Basel)*. **2022**, 12(1):37.
[8] Galani, *Pathol Res Pract*. **2010**, 206:145-150.
[9] Chopra, *Exp Biol Med (Maywood)*. **2009**, 234:361-371.

FeNO a periférna eozinofília ako biomarkery zápalu typu 2 u detí s astmou

Neuschlová, M.[1], Kunč, P. [1,2], Grendár, M.[3], Péčová, R.[1]

[1] Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej fyziológie; [2] Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika detskej tuberkulózy a respiračných chorôb Dolný Smokovec; [3] Martinské centrum pre biomedicínu
martina.neuschlova@uniba.sk

Abstract

The predominant endotype of asthma in the pediatric population is type 2 inflammation (T2-high), characterized by eosinophilic infiltration of the airways. Both fractional exhaled nitric oxide (FeNO) and eosinophil levels reflect type 2 inflammation, but their formation and activation are regulated by different inflammatory cascades. FeNO reflects the activation of the airway epithelium induced by the cytokines IL-4 and IL-13, while IL-5 is crucial for the proliferation, maturation, and migration of eosinophils to the site of inflammation. Therefore, FeNO and eosinophils should be considered independent but complementary biomarkers that provide a more comprehensive view of the disease's pathophysiology. The goal of this study was to analyze the relationship between peripheral blood eosinophil counts and FeNO values in children with asthma and to assess the impact of different anti-asthma treatment strategies on this relationship. Our results support the conclusion that increased FeNO is associated with hightened activity of eosinophilic inflammation in bronchial asthma, even during ongoing anti-asthma treatment.

Keywords: pediatric asthma, type 2 inflammation, eosinophils, FeNO

Úvod

Bronchiálna astma predstavuje heterogénne ochorenie charakterizované rozdielmi v patofyziologických mechanizmoch na bunkovej a molekulárnej úrovni, variabilitou klinickej manifestácie, ako aj odlišnou odpoveďou na liečbu, a to aj v prípade podobnosti klinických prejavov. To zdôrazňuje význam presnej endotypizácie astmy z hľadiska optimalizácie terapeutických postupov a prognostického hodnotenia ochorenia [1]. Súčasný výskum sa zameriava na identifikáciu molekulárnych dráh podieľajúcich sa na patogenéze astmy a na využitie biomarkerov pri stratifikácii pacientov do jednotlivých endotypov s cieľom prepojiť molekulárne mechanizmy s klinickým fenotypom ochorenia. Na základe v súčasnosti dostupných biomarkerov možno pacientov s astmou rozdeliť do skupín s vysokou úrovňou zápalu 2. typu (T2-high) a skupín s nízkou úrovňou tohto zápalu (non-T2) [1]. Dominantným endotypom astmy v pediatrickej populácii je zápal typu 2 (T2-high), charakterizovaný eozinofilnou infiltráciou dýchacích ciest (DC) [2,3].

V patogenéze T2-high endotypu astmy zohrávajú kľúčovú úlohu Th2 subpopulácie T-lymfocytov, vrodené lymfoidné bunky typu 2 (ILC2), zvýšené uvoľňovanie interleukínov (IL) IL-4, IL-5 a IL-13 a je charakterizovaný zápalom s prevahou eozinofilov [2,4,5]. Eozinofily pedstavujú kľúčový typ buniek spojený so zápalom typu 2. Vykazujú pleiotropné účinky na rôzne typy zápalových buniek [5]. Pri hodnotení eozinofílie sa

využíva stanovenie ich počtu v periférnej krvi, v indukovanom spúte a v tekutine bronchoalveolárnej laváže. V pediatrickej populácii však majú tieto metódy viaceré obmedzenia [6]. Vyšetrenie indukovaného spúta je semi-invazívna metóda, vyžaduje si aktívnu spoluprácu pacienta, ktorá je u malých detí problematická. Spojená je navyše s inhaláciou hypertonického roztoku s rizikom vyvolania bronchospazmu [7,8]. Bronchoalveolárna laváž je invazívne vyšetrenie vyžadujúce flexibilnú bronchoskopiu v celkovej anestézii, preto je vyhradená najmä pre závažné a diagnosticky nejasné prípady [9]. Stanovenie počtu eozinofilov v periférnej krvi predstavuje široko dostupnú diagnostickú metódu v klinickej praxi, avšak tieto hodnoty nemusia vždy korelovať s eozinofilovým zápalom v bronchiálnom tkanive, keďže periférna eozinofília môže byť ovplyvnená ďalšími faktormi ako expozícia alergénom alebo parazitárne ochorenia [10,11]. Meranie frakcie oxidu dusnatého vo vydychovanom vzduchu (FeNO) je jedným z mála biomarkerov, ktoré boli implementované do rutinnej klinickej praxe, predovšetkým vďaka svojej neinvazívnosti, jednoduchej realizácii a nákladovej efektívnosti. Zvýšené hodnoty FeNO sa považujú za nepriamy marker zápalu DC typu 2. Napriek tomu súčasné vedecké dôkazy u detskej populácie zatiaľ nie sú dostatočné na to, aby sa odporučilo jeho univerzálne využitie v diagnostike a manažmente všetkých pacientov. Hoci FeNO aj eozinofily odrážajú zápal typu 2, ich tvorba a aktivácia sú regulované odlišnými zápalovými kaskádami [8]. FeNO odráža aktiváciu epitelu DC indukovanú cytokínmi IL-4 a IL-13, zatiaľ čo zásadnú úlohu v proliferácii, dozrievaní a migrácii eozinofilov do miesta zápalu zohráva IL-5 [12-14]. Z uvedeného dôvodu je potrebné vnímať FeNO a eozinofily ako nezávislé, avšak vzájomne sa dopĺňajúce biomarkery, ktoré poskytujú komplexnejší pohľad na patofyziológiu ochorenia. Cieľom tejto práce bolo analyzovať vzťah medzi počtom eozinofílov v periférnej krvi a hodnotami FeNO u detí s astmou a posúdiť vplyv rôznych antiastmatických terapeutických stratégií na tento vzťah.

Materiál a metódy

Do štúdie bolo zaradených 104 detí s astmou vo veku 9 až 15 rokov liečených antagonistami leukotriénových receptorov (LTRA) alebo inhalačnými kortikosteroidmi (IKS). Diagnóza astmy bola potvrdená špecialistami v klinickej imunológii, alergológii a detskej pneumológii. Pacienti boli pravidelne monitorovaní v špecializovaných ambulanciách s opakovanými vyšetreniami každých 3-6 mesiacov. Štúdia bola vykonaná v súlade s Helsinskou deklaráciou. Informovaný súhlas bol získaný písomnou formou od rodičov alebo zákonných zástupcov detských pacientov. Štúdia bola uskutočnená so súhlasom Etickej komisie Národného ústav detskej tuberkulózy a respiračných chorôb v Dolnom Smokovci (ID 2021005). FeNO (ppb – parts per bilion) bolo merané v súlade s odbornými odporúčaniami American Thoracic Society a European Respiratory Society pomocou chemiluminiscenčného analyzátora NIOX VERO® (Circassia Limited co., UK) [ATS/ERS 2005]. Za klinicky signifikantnú hladinu FeNO v pediatrickej populácii sme považovali ≥25 ppb, čo zodpovedá strednej hodnote tzv. „šedej zóny“ (20-30 ppb), ktorá predstavuje hranicu medzi validovanými pozitívnymi a negatívnymi referenčnými hodnotami [15]. Eozinofily v periférnej krvi boli vyšetrené v absolútnych číslach (počet buniek/µl periférnej krvi) v rámci parametrov krvného obrazu na populačnom hematologickom analyzátore (MINDRAY BC-5120-Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co, China).

Dáta boli vyhodnotené štatistickým softvérom R Core Team: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (URL https://www.R-project.org/). Na štatistickú analýzu bol použitý

Wilcoxonov test (Wilcoxon rank-sum test) a chí-kvadrát test nezávislosti. Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota p<0,05.

Výsledky

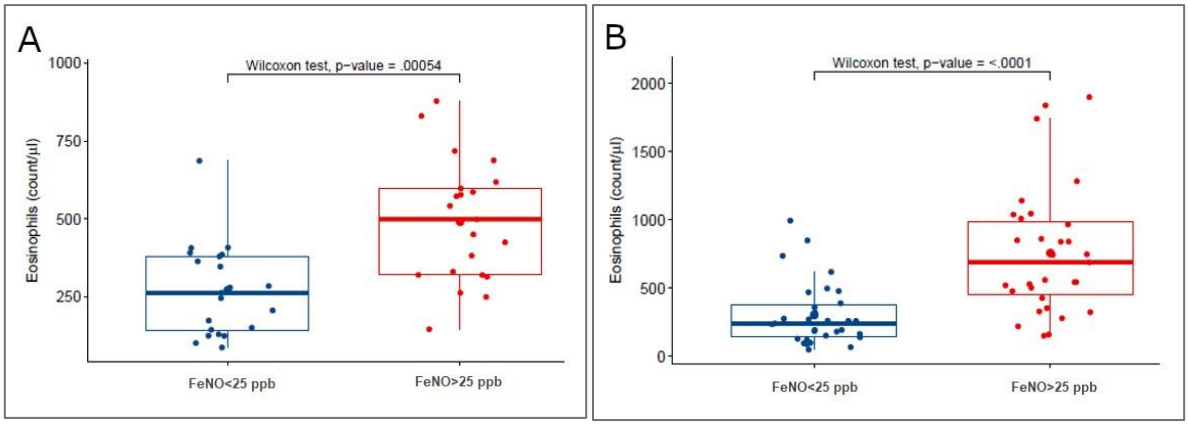
Základné demografické údaje a klinické charakteristiky detských pacientov s astmou sú prezentované v tabuľke 1. Do prvej skupiny bolo zaradených 42 probandov liečených LTRA. Druhú skupinu tvorilo 62 probandov liečených IKS. Na účely ďalšej analýzy boli obidve skupiny rozdelené na podskupiny podľa hladiny FeNO, pričom za hraničnú hodnotu bolo stanovených 25 ppb.

Tabuľka 1: Demografické údaje a klinické charakteristiky probandov.

Typ antiastmatickej liečby	Liečba LTRA N=42		Liečba IKS N=62	
	FeNO<25 ppb	FeNO>25 ppb	FeNO<25 ppb	FeNO>25 ppb
počet probandov	21	21	31	31
vek (roky)	13 (9, 15)	13 (9, 15)	11 (9,14)	13 (9,15)
pohlavie: chlapci dievčatá	15 (71 %) 6 (29 %)	17 (81 %) 4 (19 %)	19 (61 %) 12 (39 %)	22 (71 %) 9 (29 %)
eoz v krvi (počet/µl)	263 (144, 380)	499 (320, 598)	242 (146, 375)	689 (454, 988)
FeNO (ppb)	13 (8, 17)	56 (38, 64)	11 (8, 16)	45 (34, 68)

Poznámka: Hodnoty sú uvádzané ako medián a interkvartilové rozpätie.

U detí s astmou liečených LTRA (N=42) sme zistili signifikantne vyššie absolútne počty eozinofilov v periférnej krvi u pacientov s FeNO>25 ppb v porovnaní s pacientmi s FeNO<25 ppb, p<0,001 (Obr. 1A). U detí s astmou liečených IKS (N=62) sme zistili signifikantne vyššie absolútne počty eozinofilov v periférnej krvi u pacientov s FeNO>25 ppb v porovnaní s pacientmi s FeNO<25 ppb, p<0,0001 (Obr. 1B).



Obrázok 1 Absolútne počty eozinofilov v periférnej krvi u detí s astmou: (A) liečba LTRA – podskupina s FeNO<25 ppb vs. podskupina FeNO>25 ppb, p<0,001; (B) liečba IKS – podskupina FeNO<25 ppb vs. podskupina FeNO>25 ppb, p<0,0001

Diskusia

V predloženej štúdii sme u detských pacientov liečených LTRA aj IKS zaznamenali signifikantne vyššie absolútne počty eozinofilov v periférnej krvi u pacientov s FeNO>25 ppb v porovnaní s pacientmi, u ktorých boli hodnoty FeNO<25 ppb. Tieto výsledky podporujú predpoklad, že zvýšené FeNO je spojené s vyššou aktivitou eozinofilového zápalu pri bronchiálnej astme, čo podporuje koncept, že FeNO ako nepriamy biomarker eozinofilného zápalu DC koreluje so systémovou eozinofilovou aktiváciou. Keďže podobný vzťah bol prítomný v oboch liečebných skupinách, výsledky naznačujú, že pozitívna asociácia medzi FeNO a eozinofilovým zápalom pretrváva aj počas prebiehajúcej protizápalovej terapii. Túto koreláciu je však potrebné posudzovať opatrne, pretože periférna eozinofília môže byť ovplyvnená nielen aktivitou zápalu typu 2, ale aj prítomnosťou ďalších komorbidít a systémových faktorov [8,10,11]. Naše výsledky zároveň podporujú hypotézu, že FeNO a periférna eozinofília reprezentujú komplementárne biomarkery eozinofilného zápalu pri bronchiálnej astme. Kým FeNO primárne odráža lokálnu zápalovú aktivitu v bronchiálnom epiteli, periférne eozinofily poukazujú na systémovú aktiváciu imunitnej odpovede. Ich vzájomná asociácia naznačuje biologickú prepojenosť medzi systémovým a bronchiálnym komponentom eozinofilného zápalu. Limitáciou práce je charakter štúdie, ktorý neumožňuje posúdiť kauzálne vzťahy ani dynamiku zmien biomarkerov v čase. Budúce longitudinálne štúdie by mohli lepšie objasniť vzťah medzi FeNO, systémovou eozinofíliou a odpoveďou na jednotlivé typy protizápalovej liečby u detskej astmy. Napriek tomu naše výsledky poukazujú na význam FeNO a periférnej eozinofílie ako vzájomne prepojených markerov eozinofilného zápalu pri bronchiálnej astme.

Zápal typu 2 predstavuje dominantný patofyziologický mechanizmus u významnej časti pacientov s astmou. Jeho iniciácia je podmienená aktiváciou bronchiálneho epitelu, ktorý po poškodení exogénnymi podnetmi, ako sú alergény, vírusové infekcie alebo znečisťujúce látky ovzdušia, produkuje skupinu cytokínov označovaných ako alarmíny [2,14], vrátane tymického stromálneho lymfopoetínu (TSLP), interleukínu (IL)-25 a IL-33 [8,16]. Alarmíny následne aktivujú vrodené ILC2 a Th2 lymfocyty [4]. Zatiaľ čo IL-25 a IL-33 aktivujú hlavne ILC2 bunky, TSLP podporuje polarizáciu naivných T-lymfocytov smerom k Th2 fenotypu, ktoré produkujú charakteristické cytokíny IL-4, IL-5 a IL-13. IL-4 predstavuje predominantný regulačný cytokín zápalu typu 2. Podporuje diferenciáciu Th2 buniek, indukuje produkciu IL-5 a IL-13 a zároveň sprostredkuje aktiváciu B-lymfocytov, ich diferenciáciu na plazmatické bunky a izotypový prešmyk smerom k produkcii IgE [1]. Po aktivácii eozinofilov dochádza k ich degranulácii a uvoľňovaniu zápalových mediátorov vrátane cytokínov, chemokínov, leukotriénov, prostaglandínov a rastových faktorov. Súčasťou degranulácie je aj uvoľnenie hlavných cytotoxických proteínov [1,12]. Výsledkom dlhodobej aktivácie uvedených zápalových mechanizmov sú štrukturálne a funkčné zmeny DC, označované ako remodelácia DC. Medzi najvýznamnejšie patria hyperplázia pohárikovitých buniek, hypertrofia hladkej svaloviny, neovaskularizácia, subepiteliálna fibróza a pretrvávajúca bronchiálna hyperreaktivita [8].

V súčasnosti sa eozinofily nepovažujú výlučne za efektorové bunky zápalu. Okrem prozápalových účinkov sa podieľajú aj na oprave a remodelácii tkanív prostredníctvom stimulácie fibroblastov, epitelových buniek a buniek hladkej svaloviny. Novšie

koncepcie preto rozlišujú tzv. homeostatické a zápalové eozinofily. Homeostatické eozinofily sa nachádzajú v tkanivách za fyziologických podmienok a prispievajú k udržiavaniu tkanivovej integrity, zatiaľ čo zápalové eozinofily sa aktivujú počas exacerbácií ochorenia a produkujú zvýšené množstvo prozápalových mediátorov [12]. Rozvoj transkriptomických analytických metód odhalil existenciu viacerých subpopulácií eozinofilov s odlišnými funkčnými charakteristikami. Ukazuje sa, že fenotyp eozinofilov závisí od závažnosti ochorenia, anatomickej lokalizácie a lokálneho cytokínového a chemokínového mikroprostredia. Rastúci počet dôkazov z humánnych štúdií naznačuje značnú heterogenitu eozinofilov pri astme, chronickej rinosinusitíde aj eozinofilnej ezofagitíde [12,17-19]. Dôležitým aspektom eozinofilného zápalu je ich tkanivová distribúcia. Lokalizácia eozinofilov môže mať rovnaký alebo dokonca väčší význam ako ich absolútny počet. U časti pacientov s astmou typu 2 sa eozinofily a Th2 bunky akumulujú prednostne v malých DC alebo alveolárnom parenchýme. V takýchto prípadoch môže byť účinnosť IKS nižšia v dôsledku nedostatočnej depozície liečiva v periférnych oblastiach pľúc [20]. Eozinofily sú schopné migrovať aj do regionálnych lymfatických uzlín, kde môžu modulovať získanú imunitnú odpoveď prostredníctvom prezentácie antigénu, regulácie proliferácie T-lymfocytov a ovplyvňovania izotypového prešmyku B-lymfocytov. Význam týchto rezidentných populácií eozinofilov u človeka však zostáva nedostatočne objasnený a predstavuje významnú výskumnú výzvu [12]. Eozinofily v periférnej krvi sa fenotypovo aj funkčne odlišujú od eozinofilov prítomných v DC, pričom vzťah medzi periférnou eozinofíliou a aktivitou zápalu v DC zostáva predmetom diskusie. Viaceré štúdie poukázali na to, že počet eozinofilov v periférnej krvi nemusí vždy spoľahlivo odrážať mieru lokálneho eozinofilného zápalu v DC [1,21]. Z tohto dôvodu je dôležitý vývoj neinvazívnych biomarkerov umožňujúcich hodnotenie lokálneho zápalu v tkanivách najmä v pediatrickej populácii. V posledných rokoch viacerí autori v tejto súvislosti poukazujú na potenciálny význam nosovej cytológie ako nepriameho ukazovateľa tkanivovej eozinofílie [22-25]. V klinickej praxi sa využívajú ako doplnkové biomarkery najmä počet eozinofilov v periférnej krvi a FeNO, čo potvrdili aj výsledky štúdie ORACLE2 [26].

Záver

Súčasné poznatky poukazujú na to, že eozinofily predstavujú vysoko heterogénnu populáciu imunitných buniek, ktorej funkčné vlastnosti sú determinované lokálnym tkanivovým mikroprostredím, charakterom ochorenia a interakciami s ďalšími zložkami imunitného systému. FeNO aj eozinofily odrážajú zápal typu 2, ale ich tvorba a aktivácia sú regulované rôznymi zápalovými kaskádami, preto by sa mali považovať za nezávislé, ale komplementárne biomarkery, ktoré poskytujú komplexnejší pohľad na patofyziológiu ochorenia. Naše výsledky podporujú záver, že zvýšené FeNO je spojené so zvýšenou aktivitou eozinofilného zápalu pri bronchiálnej astme, a to aj počas prebiehajúcej liečby astmy. Prispôsobenie terapeutických stratégií špecifickým fenotypom eozinofilov predstavuje perspektívny smer výskumu.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0024/23.

Literatúra

[1] Kuruvilla, *Clin Rev Allergy Immunol*. **2019**, 56(2):219-233.
[2] Diamant, *Allergy*. **2019**, 74(10):1835-1851.

[3] Gaillard, *Eur Respir J*. **2021**, 58:2004173
[4] Pavord, *Lancet*. **2018**, 391(10118):350-400.
[5] Gans, *Paediatr Respir Rev*. **2020**, 36:118-127.
[6] Petsky, *Thorax*. **2012**, 67(3):199-208.
[7] Zhao, *Respir Med*. **2025**, 250:108528.
[8] Kunč, *Allergol Immunopathol (Madr).* **2026**, 54(3):206-221.
[9] Yavuz, *Cureus*. **2023**, 15(6):e40888.
[10] Jesenak, *Front Pediatr.* **2017**, 5:162.
[11] Licari, *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*. **2018**, 31(2):44-55.
[12] Erjefält, *Cells*. **2025**, 14(11):847.
[13] Maniscalco, *Respir Med*. **2026**, 252:108647.
[14] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK487497/. Updated Januar 11. **2026**.
[15] Reza, *Biomedicines*. **2025**, 13(6):1342.
[16] Moreno-Jiménez, *Int J Mol Sci*. **2025**, 26(3):1227.
[17] Rodrigo-Munoz, *Allergy*. **2025**, 80:570-574.
[18] Iwasaki, *Allergy Clin Immunol*. **2024**, 154:952-964.
[19] Ding, *Nat Commun*. **2024**, 15:3344.
[20] Erjefalt, *Respir Med*. **2023**, 210:107168.
[21] Hastie, *J Allergy Clin Immunol*. **2013**, 132(1):72-80.
[22] Amorim, *Clin Exp Allergy*. **2010**, 40(11):1711.
[23] Heffler, *Clin Exp Allergy*. **2018**, 48(9):1092-1106.
[24] Pipolo, *Rhinology.* **2017**, 55(3):242-250.
[25] Myszkowska, *Sci Rep*. **2022**, 12(1):14492.
[26] Meulmeester, *Lancet Respir Med*. **2025**, 13:P505-P516.

Účinok SGLT2 inhibítorov na klonogénny potenciál metastatickej línie kolorektálneho karcinómu

Samec, M.[1], Baranová, I.[2], Strnádel, J.[3], Lučanský, V.[2], Samec, I.[4], Péčová, R.[2], Péč, M.[1]

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

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) increases the risk of colorectal cancer (CRC) through insulin resistance and chronic hyperglycemia. Antidiabetic drugs, including metformin, GLP-1 receptor agonists, and SGLT2 inhibitors, may reduce the risk of CRC development and progression. In this study, we investigated the effect of SGLT2 inhibitors, empagliflozin and dapagliflozin, on the clonogenic potential of a cell line derived from a colorectal cancer liver metastasis. Cells were treated with two drug concentrations, with the lower dose (1 μM) approximating clinically relevant plasma levels. SGLT2 inhibitors did not significantly affect colony formation, which may be due to low cell-line sensitivity, lack of SGLT2 expression, or the dominance of GLUT1 transporters. Despite these negative results, the study of SGLT2 inhibitors as modulators of tumor progression represents an innovative area of medical biology.

Keywords: empagliflozin, dapagliflozin, colorectal cancer, metabolism

Úvod

Rakovina hrubého čreva a konečníka (kolorektálny karcinóm, KRK) je zhubné ochorenie postihujúce posledné dve časti hrubého čreva. Celosvetovo predstavuje druhú najčastejšiu príčinu úmrtí súvisiacich s rakovinou a zároveň tretiu najčastejšie diagnostikovanú malignitu [1]. V posledných rokoch boli zaznamenané významné zmeny vo vekovom rozložení KRK, pričom narastá jeho výskyt u mladších vekových skupín, najmä v rozvinutých krajinách. Tento trend pravdepodobne odráža rozdielnu mieru expozície rizikovým faktorom, vrátane faktorov životného štýlu a environmentálnych vplyvov. Identifikácia a eliminácia modifikovateľných rizikových faktorov, ako sú konzumácia alkoholu, fajčenie, obezita a nezdravé stravovacie návyky, spolu s posilňovaním ochranných faktorov, medzi ktoré patrí pravidelná fyzická aktivita, užívanie niektorých liekov (napr. aspirínu) a zdravá strava, zohrávajú kľúčovú úlohu v primárnej prevencii KRK [2]. Na molekulárnej úrovni vzniká rakovina hrubého čreva a konečníka KRK v dôsledku postupnej akumulácie získaných genetických a epigenetických zmien, ktoré vedú k transformácii normálnych glandulárnych epitelových buniek na invazívne adenokarcinómy [3]. Tieto zmeny však

neprebiehajú jednotne vo všetkých nádorových bunkách, čo vytvára značnú variabilitu medzi jednotlivými nádorovými populáciami. Táto biologická heterogenita sa následne odráža v značnej molekulárnej komplexnosti KRK, ktorá je charakterizovaná tromi hlavnými dráhami karcinogenézy: chromozomálnou nestabilitou (CIN), mikrosatelitnou nestabilitou (MSI) a metylačným fenotypom CpG ostrovčekov [4]. Tieto dráhy sú úzko spojené s kľúčovými vlastnosťami nádorových buniek, ako sú klonogenicita, invazivita a migrácia, ktoré zohrávajú rozhodujúcu úlohu v nádorovej transformácii, progresii ochorenia a tvorbe metastáz. Takéto vlastnosti umožňujú rakovinovým bunkám prežívať, šíriť sa a invadovať okolité tkanivá [5]. Tieto fenotypy sú úzko späté s metabolickým preprogramovaním, ktoré umožňuje nádorovým bunkám prispôsobiť svoj energetický metabolizmus a biosyntetické dráhy tak, aby podporili rýchly rast, prežitie v stresových podmienkach a zvýšenú pohyblivosť [6].
Inhibítory sodíkovo-glukózového kotransportéra 2 (SGLT2), medzi ktoré patria kanagliflozín, dapagliflozín, empagliflozín a ertugliflozín, významne zmenili liečbu diabetu mellitus 2. typu (T2DM) tým, že kombinujú účinné znižovanie hladiny glukózy s kardiovaskulárnou a renálnou ochranou. Pôvodne boli SGLT2 inhibítory schválené ako doplnok diéty a fyzickej aktivity na zlepšenie glykemickej kontroly pri T2DM. Následne viaceré klinické štúdie preukázali ich priaznivé kardiovaskulárne a renálne účinky vrátane zníženia rizika hospitalizácie pre srdcové zlyhanie a spomalenia progresie chronického ochorenia obličiek, čo viedlo k rozšíreniu ich terapeutických indikácií aj u niektorých pacientov bez diabetu [7]. Okrem toho bola u rôznych typov rakoviny potvrdená protirakovinová aktivita inhibítorov SGLT2, vrátane rakoviny pečene, prostaty, obličiek, čriev, pľúc, prsníka, pankreasu a močového mechúra, hoci presný mechanizmus ich účinku zostáva nejasný [8]. V rámci našej práce sme analyzovali účinok dvoch liečiv zo skupiny gliflozínov, konkrétne empagliflozínu a dapagliflozínu, so zameraním na ich potenciálny modulačný účinok súvisiaci s reguláciou klonogenicity v modeli metastatického ochorenia odvodeného z KRK.

Materiál a metódy

Bunková línia

Bunková línia kolorektálneho karcinómu Coala, izolovaná z pečeňovej metastázy, bola kultivovaná v médiu Dulbecco's Modified Eagle Medium GlutaMAX Supplement (kat. č. 10566016) doplnenom o 10 % fetálneho bovinného séra (FBS; kat. č. F2442), 1 % roztoku neesenciálnych aminokyselín (NEAA; kat. č. 11140050) a 1 % roztoku Antibiotic–Antimycotic (Anti-Anti; kat. č. A5955). Bunky boli inkubované pri 37 °C v atmosfére obsahujúcej 5 % CO_2.

Klonogénna analýza

Suspenzia buniek Coala bola naočkovaná do šesťjamkových platní v koncentrácii 1 × 10^3 buniek na jamku a bunky boli ponechané cez noc na adherovanie. Po ich adherencii bolo kultivačné médium vymenené (1 ml/jamka) za médium s obsahom 1 µM a 10 µM empagliflozínu, resp. 1 µM a 10 µM dapagliflozínu. Následne boli bunky inkubované v atmosfére s 5 % CO_2 pri 37 °C po dobu 14 dní, pričom rast vo všetkých šesťjamkových platniach danej bunkovej línie bol ukončený súčasne. Fixácia sa uskutočnila pomocou 70 % etanolu a farbenie prostredníctvom 0,5 % kryštálovej violeti

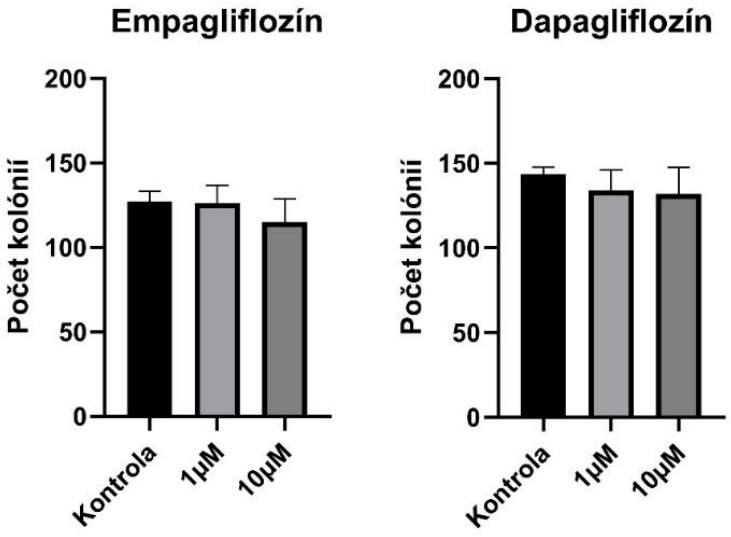
(Sigma Aldrich, Taufkirchen, Nemecko). Kolónie s počtom ≥ 50 buniek boli analyzované pomocou softvéru ImageJ.

Štatistická analýza

Porovnania medzi jednotlivými skupinami boli vykonané pomocou analýzy rozptylu (ANOVA), po ktorej nasledovalo viacnásobné porovnanie s využitím Dunnettovho testu. Vyhodnocovali sa tri súbory údajov, pričom ako kontrola slúžili bunky ošetrené DMSO. Údaje sú prezentované ako priemer ± štandardná odchýlka (SD) a hodnota P < 0,05 bola považovaná za štatisticky významnú. Grafy a štatistické analýzy boli spracované pomocou softvéru GraphPad Prism, verzia 5.0 (San Diego, CA, USA).

Výsledky

V experimentálnej časti sme hodnotili schopnosť nádorových buniek vytvárať kolónie, teda súbory buniek pochádzajúcich z jednej pôvodnej bunky. Na kvantifikáciu tohto javu sme použili klonogénnu esej, ktorá umožňuje vizualizáciu a následné spočítanie jednotlivých kolónií. V našom experimente sme sledovali regulačný účinok empagliflozínu a dapagliflozínu v koncentráciách 1 µM a 10 µM na schopnosť buniek Coala vytvárať kolónie s veľkosťou ≥ 50 buniek. V skupine liečenej nižšou dávkou empagliflozínu bol počet kolónií (priemer 126 ± 18,33) približne rovnaký ako v kontrolnej skupine, ktorá bola kultivovaná bez prítomnosti inhibítora SGLT2 (priemer 127 ± 10,58; p = 0,939). Pri vyššej dávke empagliflozínu sme zaznamenali nižší počet kolónií (priemer 115 ± 23,39) v porovnaní s kontrolnou skupinou, avšak rozdiel nebol štatisticky významný (p = 0,46). V skupine liečenej nižšou dávkou dapagliflozínu bol počet kolónií mierne nižší (priemer 134 ± 20,95) v porovnaní s kontrolnou skupinou bez pridania inhibítora SGLT2 (priemer 143 ± 7,64; p = 0,509). Pri vyššej dávke dapagliflozínu sme tiež zaznamenali nižší počet kolónií (priemer 132 ± 27,47), avšak rozdiel nebol štatisticky významný (p = 0,52) (Obr. 1).



Obrázok 1 Klonogénny test znázorňujúci dlhodobý účinok (10 dní) empagliflozínu a dapagliflozínu v koncentráciách 1 µM a 10 µM v porovnaní s neliečenou kontrolnou skupinou

Diskusia a záver

T2DM predstavuje významný rizikový faktor vzniku KRK. Inzulínová rezistencia a chronická hyperglykémia môžu podporovať proliferáciu nádorových buniek a progresiu ochorenia. Antidiabetiká, ako metformín, agonisty receptora GLP-1 (napr. tirzepatid) alebo lieky zo skupiny gliflozínov, preto vykazujú potenciál znižovať riziko vzniku aj progresie KRK [9].

Dapagliflozín (Farxiga) a empagliflozín (Jardiance) patria medzi vysoko účinné inhibítory SGLT2. Používajú sa najmä pri liečbe T2DM, srdcového zlyhania a chronického ochorenia obličiek [10]. Okrem svojich metabolických účinkov vykazujú dapagliflozín aj empagliflozín sľubné protinádorové vlastnosti, najmä pri nádoroch pečene, prsníka, pľúc a prostaty. Predpokladá sa, že tieto účinky sú sprostredkované inhibíciou proliferácie nádorových buniek, indukciou apoptózy a znížením vychytávania glukózy nádorovým tkanivom [11].

V rámci našej štúdie sme analyzovali účinok empagliflozínu a dapagliflozínu na schopnosť nádorových buniek vytvárať klony, teda na ich klonogénny potenciál. V experimente sme použili bunkovú líniu odvodenú z metastázy kolorektálneho karcinómu v pečeni [12]. Na kvantifikáciu počtu klonov sme využili farbenie kryštálovou violeťou, pričom sme hodnotili kolónie pozostávajúce z viac ako 50 buniek. Testované bunky boli vystavené dvom koncentráciám empagliflozínu, resp. dapagliflozínu. Nižšia dávka (1 μM) sa približuje klinicky relevantnej koncentrácii liečiv, ktorá v plazme dosahuje približne 0,6 μM [13]. Naše výsledky nepreukázali signifikantný vplyv gliflozínov na zníženie klonogénneho potenciálu nádorových buniek. Získané dáta sú preto v nesúlade s niektorými publikovanými štúdiami, v ktorých bol preukázaný protinádorový potenciál empagliflozínu a dapagliflozínu [14,15]. Tento nesúlad môže byť spôsobený nižšou senzitivitou nami testovanej nádorovej línie na aplikované liečivá, keďže ide o novo charakterizovanú bunkovú líniu, pri ktorej zatiaľ nie sú dostupné informácie o expresii SGLT2 receptora na povrchu buniek. Zároveň je potrebné zdôrazniť, že SGLT2 vo väčšine nádorových buniek nepredstavuje hlavný transportný systém pre príjem glukózy; dominantnú úlohu spravidla zohrávajú facilitatívne transportéry rodiny GLUT, najmä GLUT1 [16]. Inhibícia SGLT2 preto pravdepodobne nemala zásadný vplyv na glukózový metabolizmus testovaných buniek. Okrem toho môže byť samotný modulačný účinok gliflozínov čiastočne nezávislý od regulácie metabolizmu glukózy. Niektoré štúdie poukazujú na alternatívne mechanizmy, prostredníctvom ktorých môžu gliflozíny ovplyvňovať bunkové funkcie. Medzi potenciálne zapojené dráhy patrí napríklad inhibícia NHE1/NCX systému, aktivácia signalizačnej dráhy AMPK alebo interakcie s génom PIK3CA [17-20]. Okrem toho mnohé štúdie využívali vyššie koncentrácie empagliflozínu a dapagliflozínu, ako boli použité v našom experimente. V *in vitro* štúdiách sa empagliflozín a dapagliflozín zvyčajne testujú v mikromolárnych koncentráciách, najčastejšie v rozsahu približne 10-600 μM. Antiproliferatívne účinky boli v rôznych nádorových bunkových líniách pozorované najmä pri koncentráciách nad 50 μM, pričom IC50 hodnoty sa často pohybujú medzi 50 a 300 μM. Tieto koncentrácie však výrazne presahujú terapeutické plazmatické hladiny dosahované u pacientov, ktoré sú približne v nízkom mikromolárnom až submikromolárnom rozmedzí [15, 21-23]. Z uvedených dôvodov je pravdepodobné, že protinádorový efekt gliflozínov pozorovaný v niektorých *in vitro*

štúdiách môže byť dôsledkom off-target účinkov liečiva, pričom jeho klinická translácia zostáva otázna. V našej práci sme použili optimálne, resp. suboptimálne koncentrácie liečiv, ktoré približne zodpovedajú terapeutickým hladinám dosahovaným v klinickej praxi.

Napriek absencii signifikantných výsledkov v našej štúdii však liečba T2DM a kardiovaskulárnych ochorení liekmi zo skupiny gliflozínov predstavuje významnú a dynamicky sa rozvíjajúcu oblasť modernej medicíny. Pacienti s týmito ochoreniami často trpia viacerými komorbiditami, medzi ktoré patria aj nádorové ochorenia, pre ktoré sú charakteristické výrazné zmeny v metabolizme a utilizácii glukózy. Štúdium liečiv ovplyvňujúcich metabolizmus glukózy preto predstavuje dôležitú oblasť klinického výskumu, keďže ich účinok na primárne ochorenie môže priamo alebo nepriamo ovplyvňovať aj priebeh pridružených nádorových ochorení.

Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V03-00217.

Literatúra

[1] Fadlallah, *World J Clin Oncol*. **2024**, 15(9):1136-1156.
[2] Roshandel, *Cancers*. **2024**, 16(8):1530.
[3] Pritchard, *Gut*. **2011**, 60(1):116-129.
[4] Yang, *Cancer Manag Res*. **2024**, 16:1389-1403.
[5] Karakuş, *Afr Health Sci*. **2018**, 18(4):1303-1310.
[6] Shuvalov, *Cancers*. **2021**, 13(4):762.
[7] Flausino, *BMC Cancer*. **2025**, 25(1):542.
[8] Miao, *Drug Des Devel Ther*. **2025**, 19:505-514.
[9] Luo, *Sci Rep*. **2025**, 15(1):4086.
[10] Tanashat, *Eur J Clin Pharmacol.* **2024**, 80(7):951-963.
[11] Dutka, *Cancers*. **2022**, 14(23):5811.
[12] S M, *Hum Cell*. **2025**, 38(5).
[13] Samec, *Physiol Rep*. **2025**, 13(23).
[14] Sun, *Front Pharmacol*. **2024**, 15.
[15] Wu, *Discov Oncol*. **2023**, 14:127.
[16] Zambrano, *Int J Mol Sci*. **2019**, 20(13):3374.
[17] Cai, *Cell Mol Life Sci*. **2025**, 82(1):159.
[18] Iborra-Egea, *JACC Basic Transl Sci*. **2019**, 4(7):831-840.
[19] Li, *Biomed Pharmacother*. **2025**, 192:118670.
[20] Zhou, *Redox Biol*. **2018**, 15:335-346.
[21] Cumaoğlu, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. **2025**, 398(10):13819-13831.
[22] Karzoon, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. **2025**, 398(1):781-798.
[23] Zhou, *Biomed Pharmacother*. **2020**, 132:110821.

Neobvyklý prípad mačky infikovanej felínnym leukemickým vírusom

Ševčíková, Z. [1], Hudec, E. [1], Karaffová, V. [1], Levkut, M [1], Szabóová, R [2]

[1] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfologických disciplín, Košice; [2] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice
zuzana.sevcikova@uvlf.sk

Abstract

A 1.5-year-old cat was confirmed to be infected with feline leukemia virus (FeLV). Due to the deterioration of the general health condition and the currently non-existent curative therapy against retroviral infection [1], the owner decided to euthanize the cat. No significant pathological changes were observed during the necropsy. Histopathological examination revealed numerous mononuclear infiltrates of various sizes in the liver, spleen and bone marrow. Immunohistochemistry did not confirm the T lymphocyte origin of the detected infiltrates. This case thus demonstrates an order of magnitude less frequently occurring B cell neoplasia in cats infected with feline leukemia virus.

Keywords: cat, FeLV, virus induced neoplasia

Úvod

Vírusová leukémia mačiek (FeLV) je choroba vyvolaná vírusom zo skupiny retrovírusov a spôsobuje u mačiek poruchu obranyschopnosti a nádorové bujnenie. Napriek celosvetovému používaniu vakcín ostáva toto ochorenie jednou z najvýznamnejších morbidít a mortalít mačiek. Nákaza sa prenáša vertikálne aj horizontálne (mliekom, uhryznutím, poškriabaním, močom, priamym kontaktom). Po oronazálnej expozícii sa vírus replikuje v lymfatickom tkanive dutiny ústnej a krku a potom cirkuluje v monocytoch a lymfocytoch periférnej krvi. Pri zníženej obranyschopnosti dochádza k virémii. [1]. V práci prezentujeme prípad 1,5 ročnej mačky s diagnostikovaným vírusom felínnej leukémie, ktorý sa okrem charakteristických klinických a hematologických príznakov (apatia, nechutenstvo, anémia a lymfocytóza), manifestoval aj výraznou proliferáciou mononukleárnych buniek v niektorých parenchymatóznych orgánoch. Výsledok imunohistochemického vyšetrenia z parenchýmu pečene nepotvrdil T lymfocytárny charakter tohto procesu.

Materiál a metódy

Na veterinárnu ambulanciu bola prijatá 1,5 r. mačka, ktorá bola apatická, trpela nechutenstvom a mala zvýšenú telesnú teplotu 39,8°C. Bol realizovaný Rapid test FIV/FeLV (Bionote, a.s. Kórejská republika), ako aj odbery na hematologické a biochemické vyšetrenia.

Rapid test FIV/FeLV potvrdil pozitívny výsledok pre FeLV. Nakoľko aktuálne nie je známa kuratívna liečba proti retrovírusovej infekcii [1] majiteľ sa rozhodol pre eutanáziu. Následne bola realizovaná pitva a odber vzoriek na histopatologické vyšetrenie; tieto boli spracované metódou zaliatia do parafínu. V rámci imunohistochemického vyšetrenia bola na rezy z parenchýmu pečene aplikovaná protilátka proti CD3 T lymfocytom (Laboklin s.r.o. Bratislava, SR).

Výsledky

Hematologickými a biochemickými vyšetreniami (Unilabs Slovensko s.r.o.) bolo zistené nasledovné (Tab. 1):

Tabuľka 1: Výsledky hematologických a biochemických vyšetrení (Unilabs Slovensko s.r.o.).

Parameter	Výsledok	Referenčné hodnoty	Jednotky
Hematológia			
Leukocyty	8,61	6,00-11,00	10^9/l
RBC	2,13	6,00-10,00	10^12/l
HGB	33,00	95,00 -150,00	g/l
HCT	0,14	0,25 – 0,45	pomer
MCV	64,10	40,00-65	fl
MCHC	241,0	310-350	g/l
Ne	40,00	60-75	%
Ly	60,00	12,00-40,00	%
Metabolity			
Močovina	22,55	5,00 – 11,00	mmol/l
Bilirubín celkový	5,34	0,00-3,40	µmol/l
Enzýmy			
AST	0,80	0,00 – 0,56	µkat/l
Laktátdehydrogenéza	6,52	0,00 – 1,68	µkat/l
Minerály a stopové prvky			
Vápnik	2,22	2,30-3,00	mmol/l
Fosfor	2,37	0,80 – 2,08	mmol/l

Počas pitevného vyšetrenia neboli pozorované výrazné patologické zmeny. Pri vonkajšej obhliadke boli detegované: kachexia, anémia na sliznici dutiny ústnej a ikterus na sklére. Pri vnútornej obhliadke boli zistené generalizovaná anémia, ikterické zafarbenie viscerálneho abdominálneho tuku, hepato a splenomegália, hyperémia pankreasu a dilatácia pravej srdcovej komory.

Histopatologickým vyšetrením boli zistené početné, rôzne veľké mononukleárne infiltráty v pečeni (Obr. 1), v slezine (Obr. 2) a v kostnej dreni, kde bola pozorovaná aj metaplazia drene na tukové tkanivo. Z hľadiska bunkovej morfológie boli pozorované pomerne veľké bunky okrúhleho až mierne vretenovitého tvaru s periférne uloženým jadrom. Početné boli aj mitózy. V pečeni, boli bunky pozorované v cievach, v Disseho priestoroch ako aj infiltratívne až invazívne prestupujúce do parenchýmu. V slezine boli okrem infiltrátov pozorované nekrózy a fenomén infiltrácie trabekulárneho aparátu. Taktiež bol pozorovaný zvýšený výskyt megakaryocytov. V rámci IHC vyšetrenia nebol potvrdený T lymfocytárny pôvod bunkových infiltrátov.

Diskusia

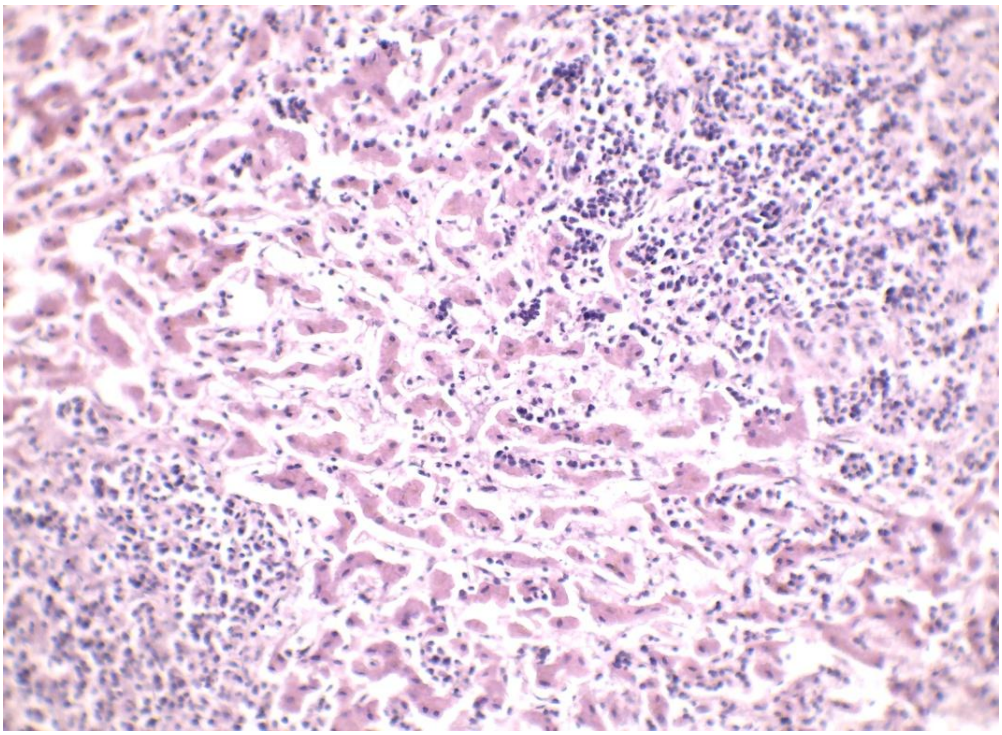
FeLV je obalený RNA vírus, ktorý patrí do rodu *Gammaretrovirus* a čeľade *Retroviridae*. Stále predstavuje značné riziko pre domáce aj divo žijúce mačky, v dôsledku jeho schopnosti spôsobiť imunosupresiu, poškodenie kostnej drene a iniciovať hematopoetické neoplazie [2].

Po oronazálnej inokulácii a primárnej replikácii sa vírus pomocou krvných mononukleárov dostáva do sleziny, lymfatických uzlín, epitelových buniek čreva a močového mechúra, slinných žliaz a do kostnej drene. Vírus sa taktiež nachádza v sekrétoch a exkrétoch týchto orgánov, ako aj v leukocytoch a krvných doštičkách

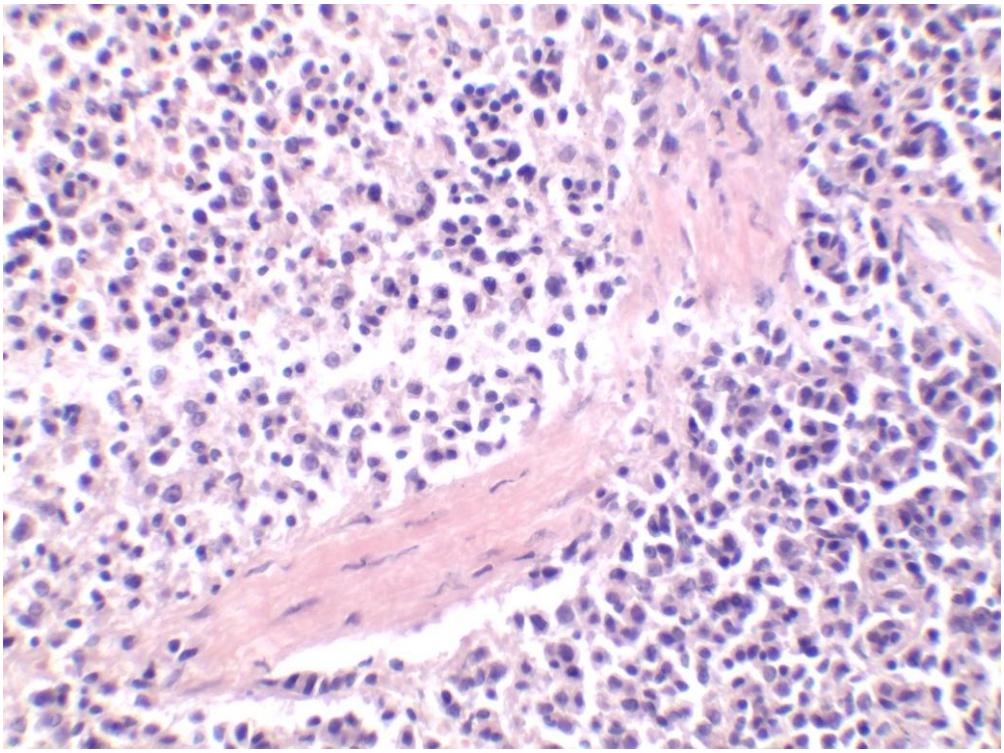
periférnej krve. Virémia vzniká 2-4 týždne po infekcii. Akútne štádiu infekcie (2-6 týždňov po infikovaní) je obyčajne pozorovateľné miernym zvýšením teploty, lymfadenopatiou a krvnou cytopéniou a ikterom. Tieto zmeny boli detegované aj v našom prípade, kedy výsledky hematologického vyšetrenia poukázali na anémiu, znížené percentuálne zastúpenie neutrofilných granulocytov a zvýšenie hladiny bilirubínu. Anémia je v prípade infekcie FeLV typicky non-regeneratívna. Jej príčinou je supresia kostnej drene v dôsledku vírusovej infekcie hemopoetických kmeňových buniek a podporných stromálnych buniek [1]. Mačky sa stávajú perzistente viremické, často nie sú schopné adekvátnej imunologickej odpovede a vznikajú sekundárne progresívne infekcie, ktoré končia často fatálne. Oportunistické infekcie zahŕňajú bakteriálne infekcie močového aparátu, hemoplazmózy (felínne mykoplazmózy), infekcie horného dýchacieho aparátu, felínnu infekčnú peritonitídu, chronickú stomatitídu, toxoplazmózu, dermatofytózu a krytokokózu [2]. Tieto infekcie v našom prípade pozorované neboli.

Laktátdehydrogenáza je enzým energetického metabolizmu, ktorý sa podieľa na reverzibilnej premene laktátu na pyruvát. Je prítomný prakticky vo všetkých tkanivách tela, takže zvýšené hladiny v krvi nie sú špecifické pre žiadny orgán. Keď sú bunky poškodené, alebo podliehajú intenzívnej obnove, laktátdegrogenáza, ktorú obsahujú, sa uvoľňuje do krvi. Vysoká hladina, ktorá bola pozorovaná aj v našom prípade, preto neodráža konkrétne ochorenie. Medzi procesy, ktoré sú zodpovedné za zvýšenie koncentrácie LDH v krvi patria aj tie, ktoré sú charakteristické pre infekciu FeLV. Sú to hemopoetická neoplazia, anémia rôznej etiológie a vírusové infekcie lymfatického tkaniva [3].

Pri infekcii FeLV vírusom sa vyvíja onkogenéza, keď sa vírus dostane do „blízkosti“ genómu hostiteľskej bunky s následnou aktiváciou onkogénov alebo priamo preniká do onkogénov. To vedie k formovaniu rekombinantného podtypu vírusu známeho ako FeLV-B, ktorý indukuje neoplastickú aktivitu buniek [1]. V našej práci sme hematologickým vyšetrením pozorovali výraznú lymfocytózu a súčasne histopatológia potvrdila prítomnosť početných a rozsiahlych monukleárnych infiltrátov v parenchýme pečene, sleziny a kostnej drene. Prezentácia týchto infiltrátov z hľadiska bunkovej morfológie, ako aj forma ich prítomnosti v orgánoch (infiltratívny až invazívny rasta infiltrácia trabekulárneho aparátu sleziny) potencuje teóriu nádorovej proliferácie. FeLV indukované neoplazie sú vo väčšine prípadov T bunkové lymfómy a leukémie [2]. Cieľom IHC vyšetrenia bolo potvrdiť presný pôvod nami pozorovanej bunkovej populácie. Skutočnosť, že výsledok použitia CD3 protilátky proti T lymfocytom bol negatívny, poukazuje na prítomnosť rádovo menej často sa vyskytujúcej B formy FeLV indukovaného nádoru. Ďalej je potrebné uviesť, že nakoľko sme pri pitve nepozorovali žiadne solídne (lymfómom zodpovedajúce) nádorové ložiská, ide v našom prípade o leukemickú formu ochorenia.



Obrázok 1 Výskyt mononukleárnej bunkovej infiltrácie v cievach a infiltratívne až invazívne sa prezentujúcej v parenchýme pečene. Zdroj: vlastný obrázok, HE 20x



Obrázok 2 Infiltrácia trabekulárneho aparátu sleziny mononukleárnymi bunkami. Zdroj: vlastný obrázok, HE 40x.

Záver

Táto práca popisuje prípad 1,5 r. mačky, u ktorej bol Rapid testom FIV/FeLV zistený pozitívny výsledok na FeLV. Nakoľko aktuálne nie je známa kuratívna liečba proti retrovírusovej infekcii [1] majiteľ sa rozhodol pre eutanáziu. Počas pitevného vyšetrenia neboli pozorované výrazné patologické zmeny. Histopatologickým vyšetrením boli zistené početné, rôzne veľké mononukleárne infiltráty v pečeni, slezine a v kostnej dreni. Prezentácia týchto infiltrátov z hľadiska bunkovej morfológie, ako aj forma ich prítomnosti v orgánoch (infiltratívny až invazívny rast a infiltrácia trabekulárneho aparátu sleziny) potencuje teóriu nádorovej proliferácie. FeLV indukované neoplazie sú vo väčšine prípadov T bunkové lymfómy a leukémie [2]. Cieľom IHC vyšetrenia bolo potvrdiť presný pôvod nami pozorovanej bunkovej populácie. Skutočnosť, že výsledok použitia CD3 protilátky proti T lymfocytom bol negatívny, poukazuje, na prítomnosť rádovo menej často sa vyskytujúcej B formy FeLV indukovaného nádoru. Ďalej je potrebné uviesť, že nakoľko sme pri pitve nepozorovali žiadne solídne (lymfómom zodpovedajúce) nádorové ložiská, ide v našom prípade o leukemickú formu ochorenia.

Literatúra

[1] Merck, *Merck,* **2016**, 3325 s., ISBN-13:978-0911910612
[2] Sykes, **2013**: DOI: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7152252/pdf/main.pdf. Updated **2026**
[3] Teke, *Turk J Hematol.* **2014**, 31:84-87.

Vplyv prenatálnej expozície mikrovlnného žiarenia na semenníky peripubertálnych samcov potkanov

Andrašková, S., Almášiová, V., Hudáková, P., Holovská, K.

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

Abstract

Many environmental factors influence the development of organs in utero. This study examined the effect of microwave radiation (MR) on the intrauterine development of the rat testicles. Pregnant albino rats were exposed to whole-body MR for 2 hours per day throughout the pregnancy. Male offspring (n=12, age 35 days) were not further exposed to MR after birth. The study found that MR applied in utero induced apparent germ cell degeneration in experimental animals compared to the control group detected using the Fluoro Jade C method. Our results showed that prenatal MR exposure adversely affected testicular development and the spermatogenic cycle in the postnatal period of life.

Keywords: microwave radiation, rat testes, cell death, in utero

Úvod

Rádiofrekvenčné polia (100 kHz - 300 GHz) ako súčasť „neionizujúceho“ elektromagnetického spektra predstavujú potenciálne environmentálne riziko pre ľudské zdravie [1]. Existuje veľký počet štúdií, ktoré poukazujú na skutočnosť, že vystavenie rádiofrekvenčnému elektromagnetickému žiareniu (RF-EMR) môže ovplyvniť bunkovú homeostázu, endokrinné, hemato-imunologické, reprodukčné a iné funkcie a rovnako môže vplývať na vývoj plodu [2].

V kontexte rastúceho počtu prípadov čiastočnej alebo úplnej neplodnosti u mužov v reprodukčnom veku sa čoraz väčšia pozornosť venuje reprodukčnému zdraviu [3]. Vysoká proliferačná aktivita robí testikulárne tkanivo značne náchylným na rôzne faktory prostredia. Dnes už takmer neobmedzené používanie bezdrôtovej technológie pracujúcej na frekvencii 2,45 GHz, môže spustiť morfologické a funkčné zmeny v reprodukčnom systéme a narušiť samčiu zárodočnú líniu [4]. Obzvlášť prenatálny život je kritickým obdobím z hľadiska vplyvu rôznych škodlivých faktorov prostredia. Akýkoľvek zásah v tomto ranom štádiu života môže nepriaznivo ovplyvniť vývoj semenníkov a následne budúcu schopnosť produkcie životaschopných spermií [5].

Apoptóza (regulovaná smrť) buniek je normálnou súčasťou vývoja ako v prenatálnom, tak aj v postnatálnom období vývoja jedinca. Za fyziologických podmienok je udržanie úspešnej spermatogenézy značne závislé od kontrolných mechanizmov, ktoré zabezpečujú rovnováhu medzi proliferáciou a apoptózou zárodočných buniek [6]. Hoci farbiaca metóda Fluoro-Jade C (FJ-C) bola primárne vyvinutá na detekciu degenerujúcich neurónov v centrálnom nervovom systéme, v histologickom výskume sa s ňou môžeme stretnúť pri identifikácii odumierajúcich buniek aj v iných orgánoch.

Hlavným cieľom tejto štúdie bolo preskúmať potenciálny vplyv pulzného mikrovlnného žiarenia s frekvenciou 2,45 GHz na semenníky peripubertálnych potkanov. Za pomoci vysoko citlivej fluorescenčnej metódy FJ-C sme sa zamerali na odhalenie

degeneratívnych zmien v semenotvornom epiteli a to práve v období, ktoré je charakteristické dozrievaním a nadobúdaním funkčnosti gamét.

Materiál a metodika

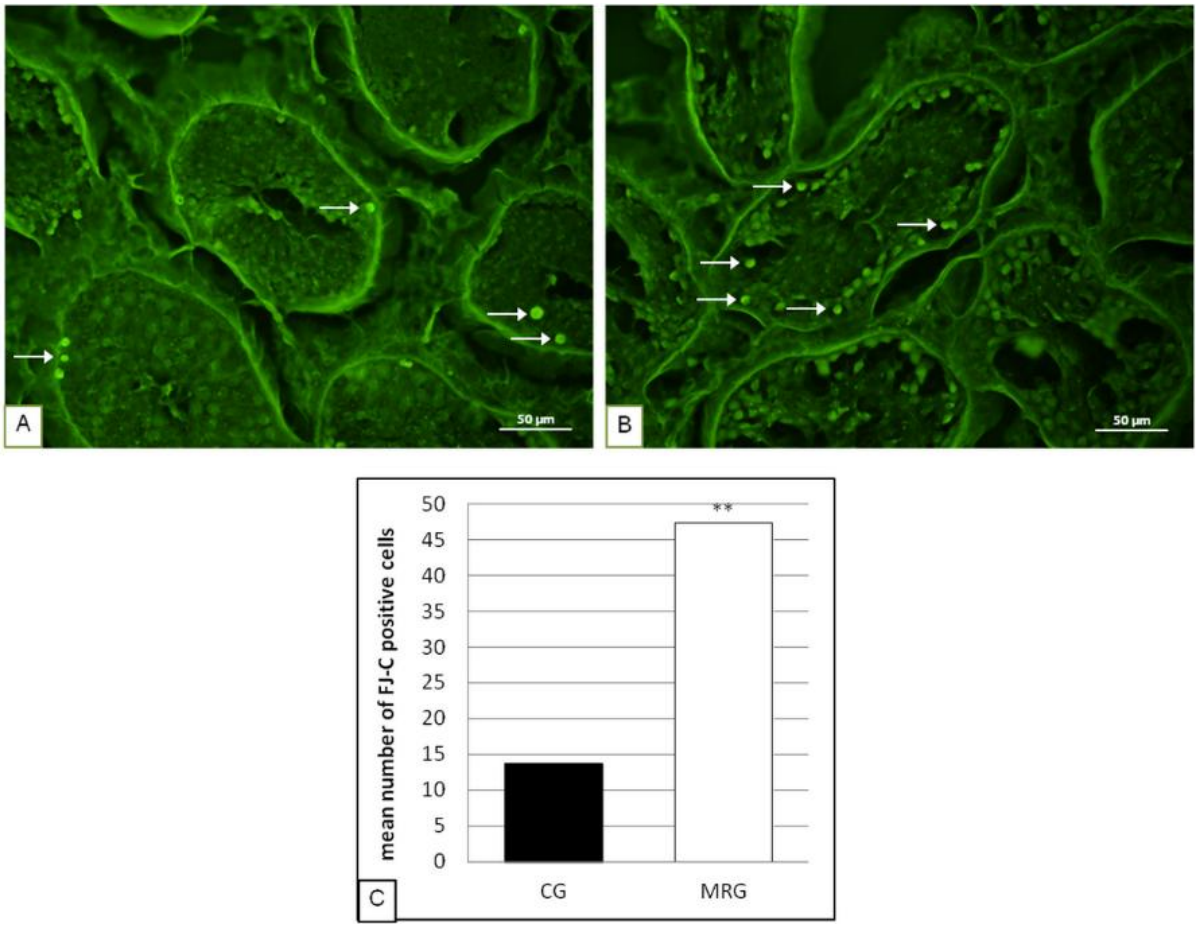
Do štúdie boli zaradené gravidné trojmesačné, klinicky zdravé dospelé samice potkanov kmeňa Wistar albino (n=6) s priemernou telesnou hmotnosťou 280±10 g (Velaz, s.r.o., Praha, Česká republika). Následne boli náhodne rozdelené do kontrolnej a experimentálnej skupiny (3 potkany na skupinu) a chované v štandardných laboratórnych podmienkach.

Experimentálna skupina gravidných potkanov (n=3) bola počas celého obdobia gravidity vystavená 2 hodiny denne pulznému mikrovlnnému žiareniu s frekvenciou 2,45 GHz. Použila sa expozícia so vzdialenosťou zvierat 70 cm od zdroja žiarenia. Kontrolná skupina zvierat bola chovaná v rovnakých podmienkach, avšak bez vystavenia žiareniu. Po pôrode boli mláďatá (2 samce na matku) z experimentálnej aj kontrolnej skupiny chované v štandardných podmienkach bez vystavenia žiareniu. Vo veku 35 dní boli zvieratá v hlbokej anestézii usmrtené transkardiálnou perfúziou 4 % paraformaldehydom v 0,1 M fosfátovom pufri. Následne bol odobratý biologický materiál.

Vzorky testikulárneho tkaniva (0,5 cm^3) z ľavostranných semenníkov každého samca potkana sa fixovali cez noc v 4 % paraformaldehyde. Vzorky sa potom preniesli do kryoprotektívneho roztoku obsahujúceho 30 % sacharózy v 0,1 M fosfátovom pufri. Po 24 hodinách sa tkanivo zmrazilo a narezalo na rezy s hrúbkou 30 µm. Rezy sa umiestnili na podložné sklíčka potiahnuté 2 % želatínou. Po vysušení (50 °C počas 30 minút) sa sklíčka najprv ponorili na 3 minúty do absolútneho alkoholu, potom na 2 minúty do 70 % alkoholu. Po opláchnutí destilovanou vodou sa rezy inkubovali v 0,06 % roztoku manganistanu draselného počas 15 minút. Po opláchnutí vodou boli sklíčka prenesené do farbiaceho roztoku FJ-C (1 µg/ml) rozpusteného v 0,1 % kyseline octovej. Po 30 minútach farbenia boli sklíčka opláchnuté destilovanou vodou a sušené cez noc. Po vyčistení v xyléne boli sklíčka prikryté montážnym médiom DPX (FlukaChemie AG, Švajčiarsko). Tkanivo bolo vyhodnotené pomocou fluorescenčného mikroskopu (Olympus BX51). FJ-C pozitívne bunky boli spočítané manuálne na základe sily fluorescenčného signálu pomocou podporného softvéru Image Tool (softvér Image J1, USA) a to v 20 náhodne vybraných zorných poliach na 1 vzorku (zviera). Hodnoty boli vyjadrené ako priemerný počet FJ-C pozitívnych buniek na zorné pole.

Výsledky

FJ-C pozitívne bunky prejavujúce sa výraznou zelenou fluorescenciou pri excitácii modrým svetlom boli pozorované v semenotvorných kanálikoch ako kontrolnej tak aj experimentálnej skupiny potkanov. Zatiaľ čo sa v semenotvorných kanálikoch kontrolných potkanov vyskytovali FJ-C pozitívne zárodočné bunky iba sporadicky (Obr. 1A), v skupine prenatálne MR exponovaných zvierat (Obr. 1B) počet odumierajúcich FJ-C pozitívnych buniek významne vzrástol (**$p<0,01$)(Obr. 1C). Odumierajúce bunky, najmä spermatogónie a spermatocyty, boli v semenotvornom epiteli rozložené heterogénne. Odumieranie spermatíd bolo menej časté. Intersticiálne väzivo nepreukázalo žiadnu FJ-C pozitivitu.



Obrázok 1 Mikrofotografie FJ-C pozitívnych buniek v semenníku 35- dňového potkana (200x). (A) FJ-C pozitívne bunky v semenníkoch kontrolných potkanov;(B) FJ-C pozitívne bunky v semenníkoch exponovaných potkanov;(C)Kvantitatívna analýza počtu FJ-C pozitívnych buniek v semenníkoch potkanov;CG – kontrolná skupina, MRG – skupina prenatálne vystavená MR žiareniu (**p < 0,01)

Diskusia

Mnohé faktory prostredia vrátane RF-EMR môžu nepriaznivo ovplyvniť rôzne vyvíjajúce sa tkanivá a orgány, ktoré sú obzvlášť citlivé a zraniteľné v dôsledku ich intenzívnych proliferačných a diferenciačných aktivít [7].

Semenník je komplexný orgán s viacerými typmi buniek, z ktorých všetky sú koordinované tak, aby produkovali životaschopné spermie. Mnoho štúdií naznačuje možnú súvislosť medzi rozšíreným používaním bezdrôtových zariadení a poruchami mužskej plodnosti [3]. V našom experimente sme sa zamerali na extrémne citlivé prenatálne obdobie a celotelovo vystavili gravidné samice potkanov mikrovlnnému žiareniu 2 hodiny denne, kontinuálne počas celej gravidity. Zvolená frekvencia 2,45 GHz zodpovedala dlhodobej expozícii nízkym dávkam RF-EMR bežne vyžarovaným konvenčnými Wi-Fi zariadeniami. 35 dní po pôrode sme u samčích potomkov, prenatálne vystavených RF-EMR, kvantitatívne hodnotili počet odumierajúcich buniek v epiteli semenotvorných kanálikov.

Rozsiahla strata zárodočných buniek počas skorého vývoja semenníkov je často pozorovaný fyziologický jav. Až 75 % vyvíjajúcich sa spermatogénnych elementov podlieha apoptóze u rôznych druhov cicavcov vrátane potkanov [8]. Zvýšená apoptóza počas prvej vlny spermatogenézy hrá dôležitú regulačnú úlohu pri nastolení

spermatogenézy v zrelých semenníkoch [9]. Apoptóza prebieha počas spermatogenézy aj v zrelých semenníkoch a je nevyhnutná pre elimináciu prebytku zárodočných buniek. Zvýšenie degeneratívnych procesov v testikulárnom tkanive je často spojené s následnou nekrotizáciou vyvíjajúcich sa zárodočných buniek. Práve takúto odchýlku sme zaznamenali v skupine potkanov prenatálne exponovaných mikrovlnným žiarením (2,45 GHz). V porovnaní s kontrolnou skupinou zvierat sme pomocou fluorescenčnej metódy FJ-C v skupine MR exponovaných zvierat zistili významný (**p<0,01) nárast FJ-C pozitivity zárodočných buniek, ktoré prechádzali apoptózou a nekrózou. Tieto zistenia sú v úzkom súlade s našou predchádzajúcou štúdiou vykonanou na dospelých potkanoch, ktoré boli prenatálne vystavené RF-EMR [10], ako aj s výsledkami autorov, ktorí hodnotili RF-EMR a jeho vplyv na apoptózu testikulárnych zárodočných buniek u prenatálne exponovaných juvenilných potkanov [5], in utero exponovaných dospelých potkanov [11], alebo dospelých potkanov exponovaných postnatálne [4].

Záver

Elektromagnetické znečistenie je jedným z potenciálnych faktorov, ktoré môžu prispievať k zvýšeniu mužskej neplodnosti. Presné bunkové dráhy sprostredkujúce nepriaznivý účinok RF-EMR na vývoj semenníkov a budúcu spermatogenézu sú stále nejednoznačné a sú predmetom skúmania.

Naše zistenia potvrdzujú nepriaznivý účinok mikrovlnného žiarenia s frekvenciou 2,45 GHz na vývoj semenníkov počas prenatálneho obdobia, čo následne ohrozuje spermatogénny cyklus a reprodukčnú funkciu v postnatálnom období života. Pre zachovanie stabilného reprodukčného zdravia ľudí a zvierat je potrebné minimalizovať vystavenie RF-MR najmä v najzraniteľnejšom období akým je vnútromaternicový vývoj jedinca.

Literatúra

[1] Markov, *Environmental.* **2007**, 27:385.
[2] Ebrahim, *Inter. Res. J. Natur. Appl. Sci*. **2016**, 3:106-121.
[3] Yahyazadeh, *Environ. Res.* **2018**, 167:684-693.
[4] Shokri, *Cell J.* **2015**, 17:322-331.
[5] Hanci, *Reprod. Toxicol.* **2013**, *42*:203-209.
[6] Rajčáni a Adamkov, *Vydavateľstvo P+M,* **2019**, 132 s., ISBN 978-80-89694-55-6
[7] Sly, *Rev. Environ. Health.* **2012**, 27:151-157.
[8] Maheshwari, *Apoptosis.* **2012**, 17:551-565.
[9] Shaha, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2010***, 365:1501-1515.*
[10] Almašiová, *Histol. Histopathol*. **2021**, 36:685-696.
[11] Odaci, *Biotechnic & Histochemistry.* **2016**, 91:9-19.

Imunohistochemická analýza HSP 70 u výkrmových ošípaných po aplikácii ľanového semena do krmiva

Andrejčáková, Z., Vlčková, R., Šmajda Rodáková, K., Petrilla, V., Sopková, D.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice
zuzana.andrejcakova@uvlf.sk

Abstract

HSP70 is a significant marker of cellular stress in various animal species. The direct relationship between increased HSP70 expression and flaxseed feeding in fattening pigs has not yet been studied. In our study, we found a significant difference in HSP70 expression in the group of animals that received flaxseed mixed in the feed for 6 weeks compared to the control, while 3 weeks of supplementation had no significant effect on this protein. The obtained results need to be supplemented with further analyses, such as gene expression, and the number of animals studied needs to be increased.

Keywords: fattening pigs, flaxseed, immunohistochemistry, HSP70

Úvod

HSP70 (Heat Shock Protein 70, proteín teplotného šoku s molekulovou hmotnosťou 70 kDa) je skupina vysoko konzervovaných proteínov, ktoré fungujú ako molekulárne chaperóny. Ich hlavnou úlohou je chrániť bunky pred stresom, napomáhať správnemu skladaniu (tzv. „foldingu“) nových proteínov a opravovať alebo odstraňovať poškodené proteíny. Expresia HSP70 sa významne zvyšuje pri bunkovom strese, vysokej teplote, oxidačnom strese, infekciách alebo zápale [1]. Tento proteín pomáha udržiavať homeostázu a zlepšuje adaptáciu na horúce prostredie tým, že chráni bunky pred denaturáciou proteínov. Vyššia hladina HSP70 koreluje s lepšou reprodukciou a vyššou produkciou mlieka/mäsa u tepelne stresovaných zvierat [2]. U brojlerov HSP70 znižuje poškodenie črevnej sliznice pri tepelnom strese a znižuje oxidačný stres [3]. V štúdii na výkrmových ošípaných [4], autori zistili že HSP 70 negatívne vplýva na hrúbku chrbtovej slaniny a hmotnosť jatočného tela. Črevný endotel predstavuje vysoko citlivé miesto, ktorého zdravie je potrebné podporovať pridávaním zdraviu prospešných nutraceutík ako je napríklad ľan. Ľanové semienka sú bohaté na rozpustnú aj nerozpustnú vlákninu, n-3 polynenasýtené mastné kyseliny, lignany a iné. V štúdiách na animálnych modeloch ľan preukázal protizápalové, protinádorové a ďalšie benefičné účinky [5,6] medzi ktoré patrí aj ovplyvnenie kvality bravčového mäsa [7] ako výstupnej suroviny pre výživu ľudí. V našej štúdii sme pozorovali expresiu HSP 70 v čreve výkrmových ošípaných, ktorým bol podávaný ľan namiešaný v krmive (dávka 10%) po dobu 3 a 6 týždňov.

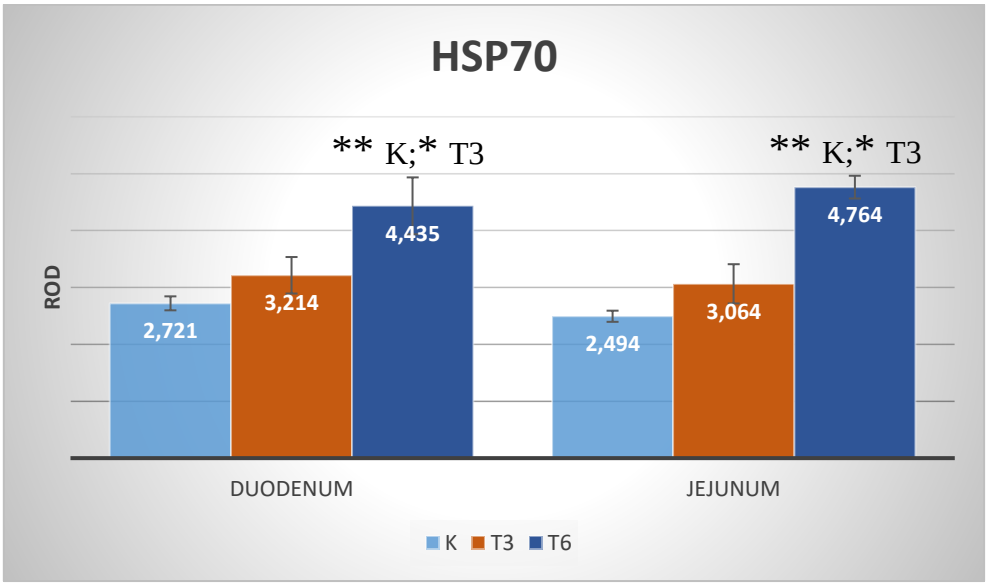
Materiál a metódy

V experimente bolo použitých 18 výkrmových ošípaných plemena Landras, ktoré boli zaradené do pokusu 3 a 6 týždňov pred porážkou na bitúnku (Stanici výkrmnosti a jatočnej hodnoty ošípaných, s.r.o., Spišské Vlachy, SR). Počas experimentu bol pokusným ošípaným primiešavaný do krmiva ľan (odrody Libra; obsah kyseliny alfa-

linolénovej = 57%) po dobu 3 (skupina T3; n=6) alebo 6 týždňov (skupina T6; n=6) pred porážkou. Kontrolná skupina (K; n=6) bola kŕmená výlučne štandardným krmivom pre výkrmové ošípané OŠ-06 (Dom krmív, Spišské Vlachy, SR) v dávke 3kg/kus/deň. Ľanové semeno bolo šrotované a podávané v 10% koncentrácii kontinuálne namiešané v krmive. Po dosiahnutí jatočnej hmotnosti (±120 kg) boli zvieratá odporazené na bitúnku a boli im odobraté vzorky duodena a jejuna na imunohistochemickú analýzu HSP70. Vzorky boli fixované v 4% paraformaldehyde, dehydratované a zaliate do parafínu. Rezy s hrúbkou 5 µm boli deparafinizované, rehydratované, nasledovalo odkrytie väzobných miest, blokovanie aktivity endogénnej peroxidázy a nešpecifického viazania, aplikácia primárnych protilátok anti-HSP70 (Santa Cruz Biotechnology, USA) s riedením 1:200 a inkubovali cez noc pri 4°C. Ďalej aplikácia značených sekundárnych protilátok (Dako, Denmark). Farebná reakcia bola navodená diaminobenzidínom, rezy boli kontrastne podfarbené hematoxylínom a zaliate do DPX. Po odfotografovaní kamerou s mikroskopom sme intenzitu reakcia kvantitatívne zhodnotili v programe ImageJ software. Intenzita reakcie bola vyjadrená indexom ROD (relative optical density) diaminobenzidínovej (hnedej) reakcie a bola prepočítaná pomocou vzorca [8]. Výsledky boli štatisticky spracované v programe Graph Pad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Na zistenie rozdielov medzi skupinami sme použili Unpaired T-test. Sledované diferencie (Mean ± SEM) boli považované za štatisticky významné pri $p < 0,05$ a označené indexom *,**, kde * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

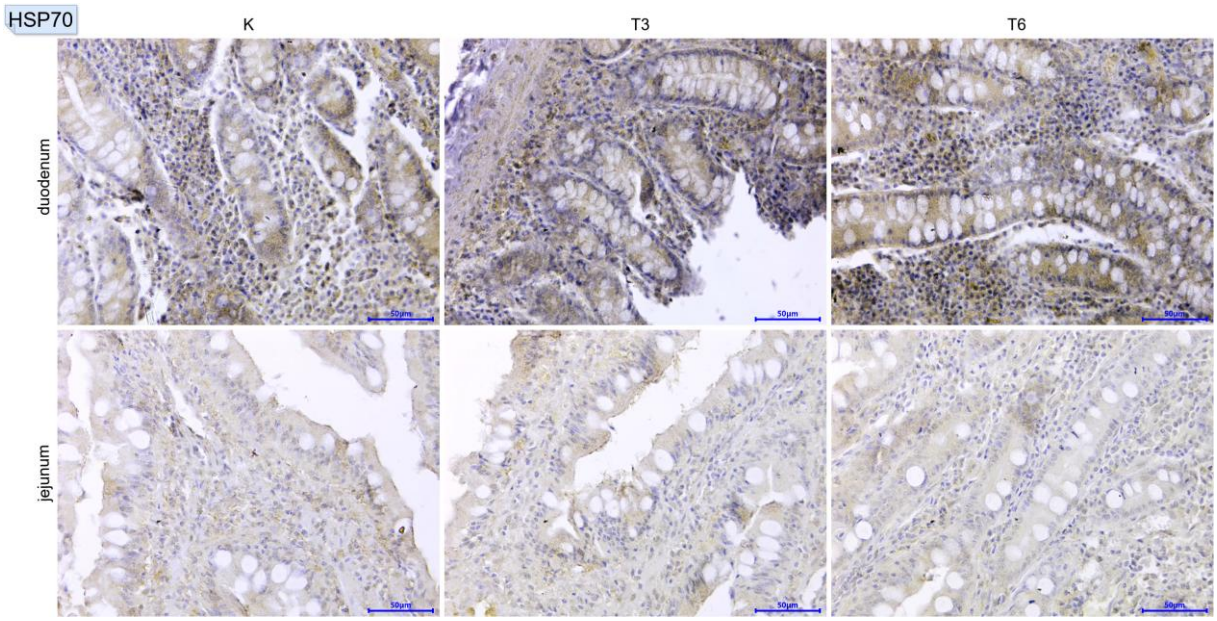
Výsledky

Imunohistochemická analýza HSP70 poukázala na významné zvýšenie jeho expresie v skupine T6 oproti kontrole (** = $p < 0,01$), ale aj oproti skupine T3 (* = $p < 0,05$), čo je zobrazené na Grafe 1.



Graf 1 Intenzita imunohistochemickej reakcie HSP70 v duodene a jejune výkrmových ošípaných po aplikácii ľanu. (ROD – relative optical density; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

Vybrané fotografie rezov sú zobrazené na Obrázku 1. Hnedá alebo bronzová reakcia je znakom pozitivity farbenia. Reakcia bola sústredená v žľazových bunkách epitelu sliznice čreva.



Obrázok 1 Vybrané fotografie imunohistochemického farbenia HSP70 v duodene a jejune výkrmových ošípaných. (zväčšenie 400x)

Diskusia

Ľanové semeno má blahodarné účinky na zdravie zvierat a ľudí, čo bolo dokázané v mnohých štúdiách [5,6]. Jeho biologické účinky a mechanizmus akým pôsobí na črevo zvierat je stále aktuálnou otázkou, ktorú sme sa pokúšali zodpovedať alebo doplniť aj v našej štúdii. Pozorovali sme marker bunkového/oxidačného stresu HSP70 buniek duodena a jejuna ošípaných, ktorým bol podávaný ľan v 10% koncentrácii po dobu 3 a 6 týždňov. Z nameraných výsledkov vyplýva, že aplikácia ľanu po dobu 6 týždňov mala výraznejší vplyv na zvýšenie expresie HSP70 oproti 3-týždňovej skupine ošípaných (Graf 1). Zvýšenie expresie HSP70 sa všeobecne považuje za pozitívny vplyv, pretože tento proteín pôsobí protektívne na bunkovú membránu, čo bolo dokázané v mnohých štúdiách na farmových zvieratách [1,9] alebo myšiach [10]. V niektorých štúdiách [11] nadmerná expresia Hsp70 špeciálne v malígnych nádoroch, ako je melanóm a leukémia, často zohráva úlohu podporujúcu prežitie a pôsobiacu proti apoptóze. Pri skúmaní súvislostí výskytu PSS mäsa a génov podporujúcich stresové reakcie u ošípaných, vedci zistili že genotyp HSP70 súvisiaci so stresom má potenciálnu súvislosť s hrúbkou chrbtovej slaniny a hmotnosťou jatočného tela výkrmových ošípaných [4].

Záver

HSP70 je významný marker bunkového stresu u rôznych druhov zvierat. Priama súvislosť medzi zvýšenou expresiou HSP70 a skrmovaním ľanu u výkrmových ošípaných zatiaľ nebola študovaná. V našej štúdii sme zistili výrazný rozdiel v expresii HSP70 v skupine zvierat, ktorá dostávala ľan namiešaný v krmive po dobu 6 týždňov oproti kontrole, kým 3-týždňová suplementácia nemala významný vplyv na tento proteín. Získané výsledky je potrebné doplniť ďalšími analýzami, napríklad génovou expresiou, a zvýšiť počet skúmaných zvierat.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0414/23.

Literatúra

[1] AL-Jebory, *Reviews in Agricultural Science*. **2023**, 11:234-242.
[2] Gupta, *Int J Livest Res*. **2013**, 3(2):27-38.
[3] Shehata, *Animals*. **2020**, 10(12):2407.
[4] Jin, *J Anim Sci*. **2005**, 19(2):280-285.
[5] Babu, *Molecules*. **2025**, 30(13):2738.
[6] Andrejčáková, *SJBS*. **2021**, 28(7):3789-3798.
[7] Bartkovský, *Animals*. **2022**, 12:1087.
[8] Smolen, *Methods in Neurosciences*, **1990**, 229 s. ISBN 10:0121852571
[9] Kong, *Microorganisms*. **2025**, 13:1755.
[10] Adachi, *J Neurosci*. **2003**, 23(6):2203-2211.
[11] Linder, *Cancers (Basel)*. **2021**, 13(18):4721.

Vplyv suplementácie n-3 PNMK (DHA, EPA) a enterolaktónu na expresiu oxytocínových receptorov v maternici myší

Babjáková, D.[1], Šefčíková, Z.[2], Babeľová, J.[2], Andrejčáková, Z.[1], Sopková, D.[1], Fabian, D.[2], Vlčková, R.[1]

[1] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice; [2] Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Centrum Biovied SAV, v.v.i., Košice
dianastefancova@gmail.com

Abstract

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), particularly docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), are widely recognised for their health-promoting properties, primarily due to their anti-inflammatory effects. Additionally, enterolactone (EL) has been shown to offer protective benefits against specific types of cancer, particularly hormone-sensitive cancers such as breast, endometrial, and prostate cancer. This study aimed to determine the potential protective effects of DHA, EPA, and EL on the uterus. Twenty-four uterine horns, obtained from 12 female mice, were used in this study. The collected tissues were transported and subsequently cultured. Following an initial 24-hour incubation at 37°C, the medium was replaced with fresh medium supplemented with the tested compounds: DHA (10 mg/ml), EPA (10 mg/ml) or EL (1 IU/ml). Cultivation with no additive served as the control. After 24 hours, the uterine horns were removed and prepared for immunohistochemistry (IHC). The expression of oxytocin receptors (OTR) was analysed, and the relative optical density (ROD) was calculated. The expression of OTR in the surface epithelium and stroma of the uterus after DHA, EPA, or EL supplementation was non-significant compared to the control group. However, the ROD of OTR in the endometrial glands was lower for DHA ($P<0.01$) and EPA ($P<0.05$), whereas higher for EL ($P<0.001$) compared to the control. In the myometrial region, immunoreactivity was lower in the DHA group ($P<0.05$), stronger in the EL group ($P<0.01$), and non-significant in the EPA group compared to the control mice. The practical significance of these findings lies in the potential to target and manage uterine oxytocin sensitivity through dietary adjustments and supplementation in pregnant women. While DHA supplementation represents a promising strategy for preventing preterm labour due to its inhibitory effect on the myometrium, enterolactone conversely increases tissue sensitivity and induces its readiness for labour contractions.

Keywords: immunohistochemistry, flaxseed metabolites, oxytocin receptor, uterus

Úvod

Kyselina α-linolénová je primárnym zástupcom n-3 polynenasýtených mastných kyselín (PNMK), z ktorej sú endogénne syntetizované jej deriváty, a to kyselina dokozahexaénová (DHA) a kyselina eikozapentaénová (EPA) [1]. Suplementácia DHA a EPA zohráva dôležitú úlohu v prenatálnom vývine plodu. Vďaka ich protizápalovému účinku prispievajú k redukcii výskytu gestačných komplikácií, akými sú preeklampsia či predčasný pôrod [2]. Podporujú taktiež hormonálnu reguláciu a vytvárajú optimálne podmienky pre dozrievanie vajíčok a následné uhniezdenie embrya v maternici [3].

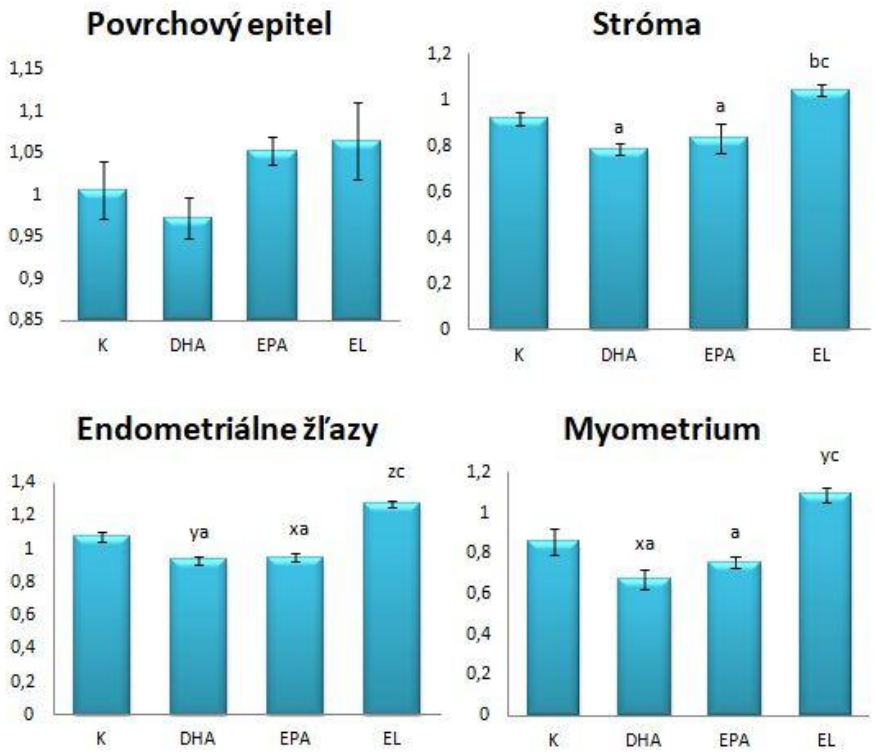
Zápalový proces predstavuje kľúčový faktor pri vzniku endometriálneho karcinómu. Omega-3 PNMK disponujú schopnosťou potláčať zápalovú reakciu, čím potenciálne znižujú onkologické riziko [4]. Enterolaktón (EL) zaraďujeme medzi enterolignany, ktoré vznikajú bakteriálnym spracovaním rastlinných lignanov v čreve. Rôzne štúdie naznačujú, že EL môže znižovať riziko rakoviny prsníka či prostaty, a to vďaka mechanizmu účinku, ktorý spočíva v modulácii estrogénových receptorov [5]. Enterolaktón má zároveň aj antioxidačný účinok a bráni poškodeniu DNA a peroxidácii lipidov pri rakovine [6]. Hormón oxytocín je zapojený do mnohých fyziologických procesov, pričom hlavnú úlohu zohráva pri pôrode a laktácii. Jeho účinok v myometriu je sprostredkovaný väzbou na oxytocínové receptory (OTR), čo vyvolá zvýšenie hladiny intracelulárneho vápnika Ca^{2+} a stimuláciu syntézy prostaglandínov následne vyúsťujúcej do svalovej kontrakcie [7]. Cieľom tejto štúdie je stanovenie účinku DHA, EPA a EL na oxytocínové receptory v maternici myší.

Materiál a metódy

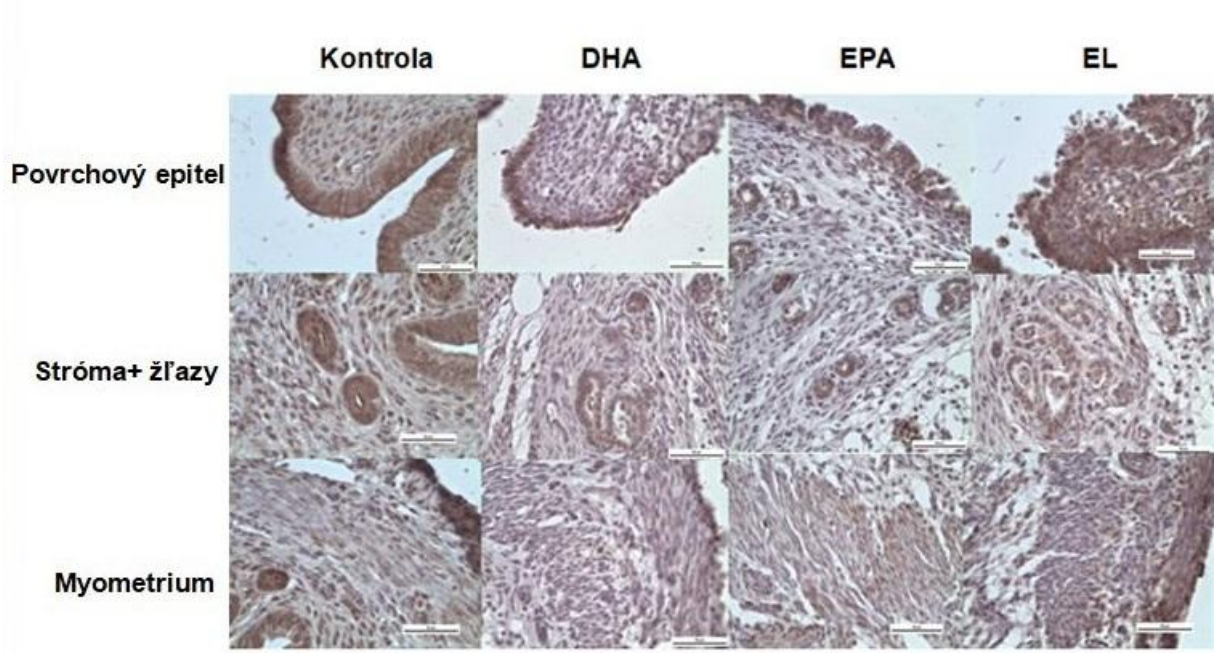
Do štúdie bolo zaradených 12 samíc myší (BALB/c, Velaz s.r.o., ČR, 6 – 8 týždňov), od ktorých bolo získaných 24 maternicových rohov (1- cm kúsky). Odobraté tkanivá boli do 30 minút transportované vo fosfátovom pufrovanom roztoku (PBS; 4°C) a následne kultivované v 24-jamkových platničkách (1 roh na jamku) s kultivačným médiom (DMEM/F12 1:1, Sigma-Aldrich; 1 ml). Použité médium bolo doplnené o 10 % fetálneho bovinného séra (FBS; Sigma) a 1 % antibioticko-antimykotického roztoku (ATB-ATM; Sigma). Po úvodnej 24-hodinovej inkubácii pri 37 °C bolo médium vymenené za čerstvé (DMEM + 10 % FBS + 1 % ATB-ATM) s prídavkom testovaných látok: DHA (10 mg/ml), EPA (10 mg/ml) alebo EL (1 IU/ml). Kultivácia bez akéhokoľvek aditíva slúžila ako kontrola. Po ďalších 24 hodinách kultivácie nasledovala fixácia v 4 % paraformaldehyde a zalievanie do paraplastu. Z tkanív boli sánkovým mikrotómom (Reichert, Rakúsko) pripravené polotenké rezy (3 – 5 µm). Imunohistochemická analýza zahŕňala deparafinizáciu, rehydratáciu s následným odkrytím väzbových miest, blokovaním aktivity endogénnej peroxidázy a nešpecifického viazania a inkubáciu s primárnou protilátkou anti-OTR (1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) počas noci pri 4 °C. Po uplynutí inkubácie boli maternicové rohy premyté s následnou aplikáciou sekundárnych protilátok (goat anti-mouse secondary antibodies; Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV), ready-to-use, Dánsko). Farebná reakcia bola navodená diaminobenzidínom (Dako REAL™ DAB+ Chromogen, Dako). Rezy boli kontrastne podfarbené hematoxylínom, dehydratované radou alkoholov a xylénov, následne zaliate do Pertexu (Histolab Products AB, Švédsko). Po dôkladnom vysušení preparátov sme pristúpili k zhotoveniu mikrofotografií prostredníctvom zobrazovacej techniky (NIS Elements Br k mikroskopu Nikon Eclipse E200 s digitálnou kamerou ProgResCapture Pro 2.7.7) a intenzitu imunoreakcie sme následne kvantifikovali v softvéri ImageJ (National Institutes of Health, USA). Pozitívna reakcia, prejavujúca sa hnedým sfarbením chromogénu DAB+, bola analyzovaná prostredníctvom sivej škály (grey level, GL) a vyjadrená indexom relatívnej optickej denzity (ROD) podľa Smolena [8]. Štatistické spracovanie získaných dát prebehlo v programe GraphPad Prism 3 (USA), pričom výsledné hodnoty sú prezentované ako priemer so štandardnou chybou (Mean ± SEM). Na posúdenie štatistickej významnosti rozdielov medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami bol aplikovaný Tukeyho *post hoc* test. Výsledky sú interpretované na hladinách významnosti $P<0,05$, $P<0,01$, $P<0,001$.

Výsledky

Vplyv aditív DHA, EPA a EL na prítomnosť OTR v bunkách materníc myší bol kvantitatívne vyjadrený prostredníctvom relatívnej optickej denzity (ROD) a je znázornený na Obrázku 1. Pozitívna imunohistochemická (IHC) reakcia sa prejavila tmavohnedým sfarbením v cytoplazme. Intenzita reakcie OTR medzi kontrolou a skupinami DHA, EPA a EL v jednotlivých oblastiach maternice je zobrazená na Obrázku 2. Prítomnosť OTR v oblasti povrchového epitelu maternice myší po pridaní aditív DHA, EPA a EL bola nesignifikantná v porovnaní s kontrolnou skupinou. Zároveň neboli zaznamenané žiadne výrazné zmeny medzi skupinami. V oblasti strómy maternice vo všetkých skupinách (DHA, EPA, EL) neboli zaznamenané signifikantné zmeny expresie OTR v porovnaní s kontrolnými myšami. EL v porovnaní s DHA ($P<0,001$) a EPA ($P<0,01$) zvýšil ROD OTR. Naopak, expresia OTR v oblasti endometriálnych žliaz bola nižšia pre DHA ($P<0,01$) aj EPA ($P<0,05$), ale zároveň vyššia pre EL ($P<0,001$) v porovnaní s kontrolou. Efekt EL bol zvýšený v porovnaní s DHA aj EPA (obidva $P<0,001$). Rozdiel medzi DHA a EPA nebol štatisticky významný. V oblasti myometria samíc myší bola IHC reakcia nižšia v DHA skupine ($P<0,05$), silnejšia v EL skupine ($P<0,01$) a nesignifikantná v EPA skupine oproti kontrole. Vzájomný efekt PNMK (DHA vs. EPA) nebol štatisticky významný. Rozdiel medzi skupinami (DHA, EPA) a EL bol na úrovni ($P<0,001$).



Obrázok 1 Vplyv DHA, EPA a EL na expresiu OTR (vyjadrené v ROD) v bunkách maternice; xyz – porovnanie s kontrolou, abc – porovnanie medzi experimentálnymi skupinami, kde x,a - $P<0,05$; y,b - $P<0,01$; z,c - $P<0,001$



Obrázok 2 Porovnanie intenzity reakcie OTR medzi kontrolou a skupinami DHA, EPA a EL v oblasti povrchového epitelu, strómy, endometriálnych žliaz a myometria. Hnedé sfarbenie predstavuje pozitívnu reakciu na prítomnosť OTR

Diskusia

Oxytocín je kľúčový reprodukčný hormón, ktorý sa podieľa na procese pôrodu. Jeho väzba na špecifické oxytocínové receptory v myometriu spúšťa kontraktilnú činnosť maternice. Citlivosť týchto receptorov je pred pôrodom umocnená vysokou koncentráciou cirkulujúcich estrogénov. Okrem toho oxytocín stimuluje syntézu a uvoľňovanie prostaglandínov v decidue a chorioamniotických membránach, a to aktiváciou špecifického typu oxytocínového receptora. Prostaglandíny prispievajú k dozrievaniu krčka maternice a kontraktilite maternice pri pôrode [9]. Okrem kľúčovej úlohy oxytocínu pri pôrode (kontrakcie maternice) a laktácii stimuluje dozrievanie vajíčok vo folikuloch, ich transport do vajíčkovodu, oplodnenie, implantáciu zárodku a stimuláciu rastu plodu [10]. V reakcii na vysoké hladiny estrogénov sa počet oxytocínových receptorov v myometriu počas gravidity postupne zvyšuje. Na jej konci ich koncentrácia stúpne až 100-násobne, čo jasne svedčí o tom, že dochádza k masívnemu zvýšeniu ich celkovej syntézy [11].

Zaujímavým zistením je, že v oblasti povrchového epitelu a strómy maternice neboli v našej štúdii zaznamenané žiadne signifikantné zmeny v expresii OTR medzi testovanými skupinami a kontrolou. To naznačuje, že vplyv n-3 PNMK a EL je lokalizovaný primárne v endometriálnych žľazách a v myometriu. Práve v týchto častiach maternice dochádza k sekrécii látok a k kontrakciám myometria vyvolaným oxytocínom. EL dramaticky zvýšil ROD OTR v oblasti endometriálnych žliaz, ako aj v myometriu v porovnaní s kontrolnou skupinou. EL je látka s pro-estrogénnou aktivitou a stimuluje syntézu OTR v maternici. V ostrom kontraste voči potenciujúcemu účinku EL sú účinky n-3 PNMK. Expresia OTR bola potláčaná v endometriálnych žľazách po suplementácii DHA aj EPA, pričom v oblasti myometria bol tento efekt významný iba po prídavku DHA. Tento nález naznačuje, že hoci obe n-3 PNMK vykazujú tlmivý účinok v žľazovom tkanive, DHA môže disponovať vyššou selektivitou alebo efektivitou

vo svalovej vrstve maternice. Tieto závery sú v súlade so štúdiou Kim et al., ktorí preukázali, že suplementácia DHA významne inhibovala mobilizáciu Ca^{2+} stimulovanú oxytocínom a signifikantne znížila koncentráciu OTR na bunkovej membráne v myometriu bez zmeny ich väzbovej afinity [12]. Vzájomné porovnanie priameho efektu (DHA, EPA vs. EL) na myometrium jasne demonštruje protichodný charakter účinku týchto látok. Zatiaľ čo EL indukuje receptorovú expresiu a pripravuje tkanivo na oxytocínovú stimuláciu, DHA tento proces efektívne blokuje a znižuje počet receptorov.

Záver

Výsledky našej štúdie preukázali protichodný účinok n-3 PNMK (DHA, EPA) a EL na expresiu OTR v maternici. Zatiaľ čo v povrchovom epiteli a stróme maternice sa vplyv týchto látok neprejavil, naša práca potvrdila vysoko lokalizovaný účinok v dvoch oblastiach maternice: v endometriálnych žľazách a v myometriu. EL vzhľadom na svoju pro-estrogénnu aktivitu výrazne zvyšuje expresiu OTR v žľazách aj v myometriu. Na druhej strane pôsobenie DHA a EPA vykazuje inhibičný efekt. V žľazovom tkanive znižujú expresiu OTR obe kyseliny, avšak v samotnej svalovej vrstve maternice preukázala významný tlmiaci účinok výhradne DHA. To naznačuje jej vyššiu efektivitu a selektivitu v myometriu. Praktický význam týchto zistení spočíva v možnosti cielene manažovať citlivosť maternice na oxytocín prostredníctvom úpravy stravy a suplementácie u gravidných žien. Zatiaľ čo suplementácia DHA predstavuje vďaka svojmu inhibičnému účinku na myometrium sľubnú stratégiu v prevencii predčasného pôrodu, enterolaktón naopak zvyšuje senzitivitu tkaniva a indukuje jeho pripravenosť na pôrodné kontrakcie.

Táto práca vznikla za podpory projektov APVV-22-0071 a VEGA 1/0414/23.

Literatúra

[1] https://ods.od.nih.gov/factsheets/Omega3FattyAcids-HealthProfessional/; Updated August 22.**2025**
[2] Amza, *Biomedicines*. **2024**, 12(7):1471.
[3] Hammiche, *Fertil. Steril.* **2011**, 95(5):1820-1823.
[4] Brasky, *The American Journal of Clinical Nutrition*. **2015**, 101(4):824-834.
[5] Damdimopoulou, *J Nutr*. **2011**, 141(9):1583-1589.
[6] Prasad*, Int J Angiol*. **2000**, 9:220-225.
[7] Vrachnis, *Int J Endocrinol*. **2011**, 2011:350546.
[8] Smolen, *Methods in Neurosciences*.**1990**, 208-229.
[9] Uvnäs-Moberg, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **2024**, 230(3):740-758.
[10] Beretsos, *Ann N Y Acad Sci*. **2006**, 1092:466-479.
[11] Burbach, *Elsevier*. **2006**, 3055-3128.
[12] Kim, *Plos One*. **2012**, 7(7).

Vplyv ionizujúceho žiarenia na populáciu Kupferových buniek v pečeni za experimentálnych podmienok

Bálentová, S[1]., Barboráková, J.[1], Kalenská, D.[2], Muríň, P.[3], Kecskés, I[3].

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

Abstract

In our study, we investigated how fractionated whole-brain irradiation (fWBI) and subsequent survival six months after exposure affected visceral organs, such as the liver. Adult male Wistar rats, four months old, received fWBI with a total dose of 32 Gy administered in 4 fractions (8 Gy dose per fraction) once a week on the same day for four consecutive weeks. Based on immunofluorescence staining and image analysis of liver slides, we found an increase in Kupffer cells in the irradiated group. When evaluating the results, we also took into account the role of older age at the end of the experiment, which may modify the radiation response in the rat liver.

Keywords: rat liver, Kupffer cell, fractionated irradiation, aging

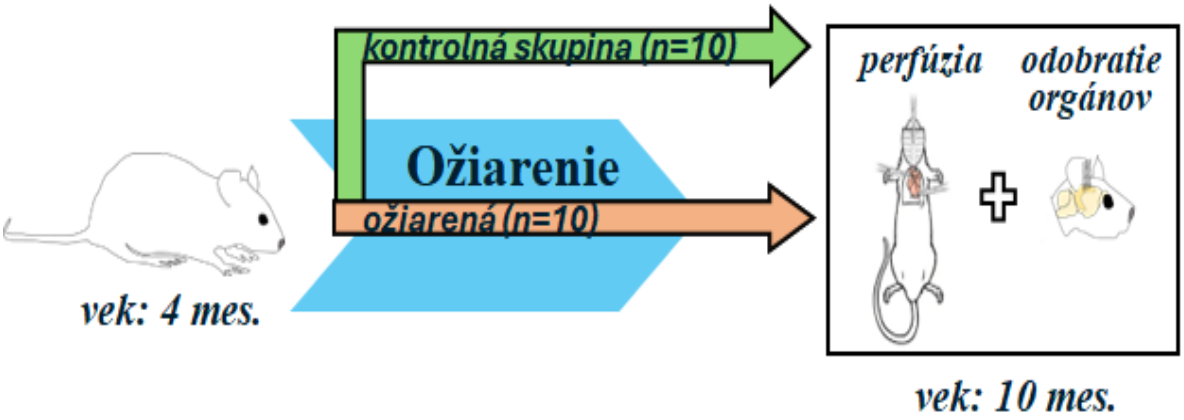
Úvod

V klinickej rádioterapii sa u pacientov s metastázujúcimi nádormi mozgu a nádormi hlavy a krku najviac používa kraniálne frakcionované ožiarenie. Vedľajšie účinky žiarenia sú zmiernené alebo eliminované technikou tvarovania ožarovacieho poľa pomocou tieniacich blokov okolo zdravých tkanív a orgánov. V experimentálnych štúdiách na animálnych modeloch sa uvedená technika často nepoužíva, preto sú zdravé orgány nechránené a exponované voči žiareniu. Hoci absorbovaná dávka žiarenia je nižšia, vyvoláva široké spektrum odpovedí aj vo vzdialenejších orgánoch, napr. v pečeni [1,2]. Po ožiarení dochádza v pečeni k rýchlejšiemu starnutiu a apoptóze alebo nekróze hepatocytov, Kupferových a Itoových buniek, zmenám endotelových buniek (napr. edém, zúženie lúmenu, kongescia a hemorágia sínusoidalnych kapilár) a ukladaním kolagénu v Disseho priestore vedúce k zvýšenej fibrotizácii a následne cirhóze pečene [1,2,3]. V klinických a predklinických štúdiach bola po expozícii terapeutickými dávkami ionizujúceho žiarenia popísaná zvýšená regeneračná schopnosť vedúca ku kompenzačnej hypertrofii pečeňového parenchýmu [4,5]. Jedným z faktorov, ktorý ovplyvňuje odpoveď organizmu je aj vyšší vek v čase ožiarenia [6]. Cieľom našej štúdie bolo vyšetriť ako dlhodobejšie prežívanie potkanov po kraniálnom frakcionovanom ožiarení ovplyvní pečeňový parenchým, najmä z hľadiska prejavov zápalu.

Materiál a metódy

V experimente sme použili staršie dospelé, biele samce potkanov, kmeň Wistar (n=20), ktoré mali na začiatku experimentu vek štyri mesiace (Obr. 1). Potkany sme rozdelili na kontrolnú skupinu (n=10) a druhú skupinu (n=10) sme ožarovali frakcionovanou dávkou (cD=32 Gy, rozdelenou na 4 frakcie, 1 frakcia=8 Gy), 1-krát za

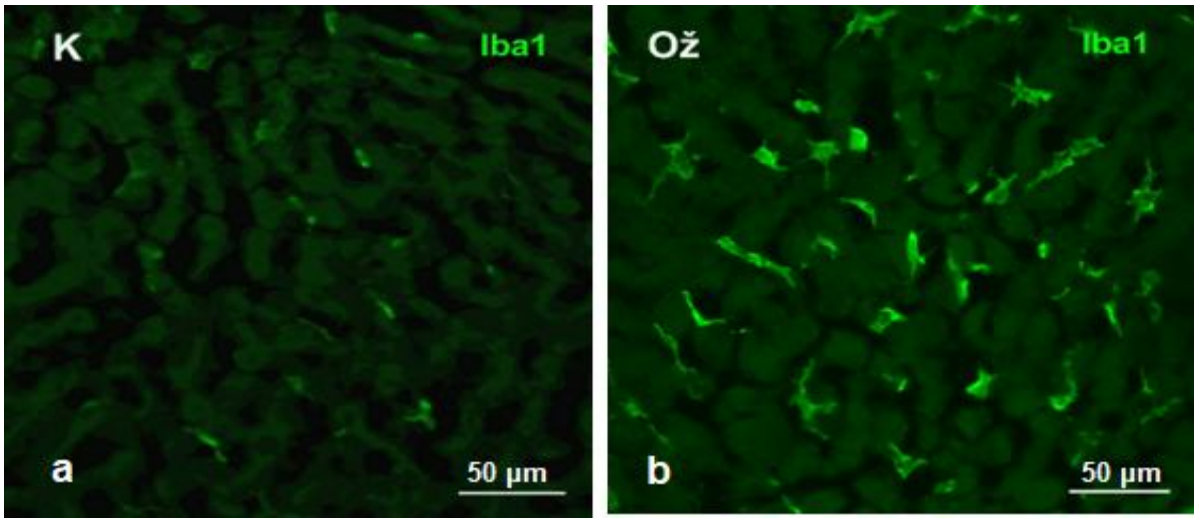
týždeň. Na ožarovanie sme použili lineárny urýchľovač Clinac iX (Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, USA) s energiou 6 MeV. Po šiestich mesiacoch sme u oboch skupín vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu pomocou fyziologického roztoku a následne 4 % paraformaldehydu. Po dekapitácii a vybratí pečení sme narezali sériové, sagitálne kryorezy, ktoré sme farbili imunofluorescenčne. V preparátoch sme identifikovali marker Kupferových buniek-ionized calcium-binding adaptor molecule (Iba1) a fotili na fluorescenčnom konfokálnom mikroskope Olympus Fluoview FV10i (Olympus, Japonsko). Pomocou obrazovej analýzy (program Image J; Bethesda, MD, USA) sme hodnotili počet Iba1-imunoreaktívnych (Iba1-IR) (celkový počet Iba1-IR-buniek/cm^2). Keďže analýza preparátov ešte nie je ukončená, vo výsledkovej časti uvádzame len orientačné nálezy.



Obrázok 1 Schéma experimentálneho dizajnu

Výsledky a diskusia

Kupferove bunky sú veľmi citlivé na ožarenie a po expozícii dochádza k ich aktivácii, ktorá vedie k uvoľneniu mediátorov zápalu, napr. interleukínu-6 (IL-6) a tumor necrosis factor-alpha (TNF-α). Produkujú aj growth factor-beta 1 (TGF-β1) aktivujúci Itoove bunky, ktoré začnú nadmerne tvoriť zložky extracelulárnej matrix, resp. dochádza ku zvýšenej fibrotizácii vedúcej napr. k radiačne indukovanému ochoreniu pečene [7]. Vplyvom ožiarenia Kupferove bunky taktiež pozitívne regulujú proapoptotické gény, ako napr. Bax a tým zvyšujú apoptózu. V našom experimente sme predbežne zistili nárast Kupferových buniek po ožiarení, ktorý môžeme interpretovať ako zvýšenú zápalovú odpoveď [8,9]. (Obr. 2). Výsledky vyšetrenia krvnej plazmy ukázali, že po ožiarení došlo k zmenám parametrov oxidačného stresu, napr. poškodeniu mitochondrií, zvýšenej potrebe energie a poklesom proteosyntézy. Podobne aj výsledky in vivo vyšetrenia pečení magnetickou rezonančnou spektroskopiou ukázali u ožiarenej skupiny pokles celkového objemu a zvýšené ukladanie lipidov v hepatocytoch. Keďže potkany mali v čase ukončenia experimentu desať mesiacov, možno predpokladať, že zmeny v pečeňovom parenchýme boli ovplyvnené starnutím aj vplyvom žiarenia. Predpokladáme, že po ožiarení došlo k poklesu proliferačnej a následne regeneračnej schopnosti pečeňového parenchýmu. Na konkrétnejšie závery je potrebné vykonať detailnejšiu morfometrickú analýzu preparátov, napr. hodnotiť proliferačný a/alebo apoptotický index v pečeňovom parenchýme.



Obrázok 2 Mikrofotogafie kryorezov z pečení kontrolných (K; a) a ožiarených (Ož; b) potkanov vyšetrovaných šesť mesiacov po frakcionovanom ožiarení celkovou dávkou cD=32 Gy. Pečene boli farbené imunofluorescenčne na identifikovanie markera Kupferových buniek - ionized calcium-binding adaptor molecule (Iba1). Po ožiarení došlo k zvýšeniu počtu Iba1-IR Kupferových buniek

Záver

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

Literatúra

[1] Nakajima, *Int J Mol Sci*. **2018**, 19(12):3855.
[2] Yakubu, *Radiation* **2025**, 5(4):27.
[3] Zhu, *Cell Death Discov*. **2021**, 7(1):244.
[4] Coskun, *Nucl Med Mol Imaging* **2022**, 6(6):291-298.
[5] Páramo, *Sci Rep*. **2022**, 12(1):1777.
[6] O'Donovan, *Ageing Cancer Res Treat*. **2025**, 2:202508.
[7] Sun, *Hepatocell Carcinoma* **2025**, 12:2045-2054.
[8] Tello, *Radiat Environ Biophys*. **2008**, 47(3):389-397.
[9] Bálentová, *Neurochem Int.* **2024**, 105726.

Fosfohistón H3 ako marker bunkovej proliferácie pri hodnotení biokompatibility v CAM modeli

Demčišáková, Z.[1], Luptáková, L.[2], Petrovová, E.[1]

[1] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfologických disciplín, Košice; [2] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice
zuzana.demcisakova@uvlf.sk

Abstract

The evaluation of cell proliferation is a key parameter in the investigation of biomaterial biocompatibility and tissue regeneration processes. Phosphorylated histone H3 (PHH3) is a highly specific marker of mitotic activity, enabling a more precise identification of proliferating cells than commonly used proliferation markers. The chorioallantoic membrane (CAM) of the avian embryo represents a suitable *in vivo* model for the preclinical evaluation of the biological response of tissues to implanted materials. The aim of this study was to analyse cellular proliferation using immunohistochemical detection of PHH3 in a quail embryo CAM model following the implantation of a polyhydroxybutyrate/chitosan-based (PHB/CHIT) biomaterial. The PHB/CHIT composite was implanted onto the CAM of quail embryos using the *ex ovo* method across four experimental groups: untreated PHB/CHIT, PHB/CHIT treated with saline solution, PHB/CHIT supplemented with VEGF-A, and PHB/CHIT with angiostatin. On embryonic day 9, paraffin sections were prepared, immunofluorescently stained with an anti-PHH3 antibody, and analysed via fluorescence microscopy. PHH3-positive cells were detected in all experimental groups, both on the surface and within the pores of the implanted biomaterial. The highest proliferative activity was observed in the untreated PHB/CHIT group, whereas the lowest was recorded in the saline-treated group. No areas of complete absence of proliferation or signs of extensive tissue destruction were observed in the samples. Immunohistochemical detection of PHH3 confirmed the preservation of mitotic cell activity at the site of biomaterial implantation, indicating favorable biocompatibility in the quail embryo CAM model. These results suggest that PHH3 is a suitable and highly specific marker for assessing mitotic activity and may complement the immunohistochemical evaluation of biomaterial biocompatibility and tissue integration in the CAM model.

Keywords: biocompatibility, cell proliferation, chorioallantoic membrane, phospho-histone H3

Úvod

Proliferačná aktivita buniek predstavuje kľúčový parameter pri hodnotení biologického správania tkanív a je dôležitým ukazovateľom v štúdiách biokompatibility biomateriálov. Jej sledovanie umožňuje odlíšiť fyziologickú regeneráciu od patologickej odpovede, akou je cytotoxicita alebo nadmerná tkanivová reakcia. Presná detekcia mitoticky aktívnych buniek je preto zásadná najmä v modelových systémoch, ktoré simulujú podmienky *in vivo*, akým je napríklad chorioalantoická membrána (CAM) vtáčieho embrya [1-2]. Jedným z najšpecifickejších markerov mitotickej aktivity

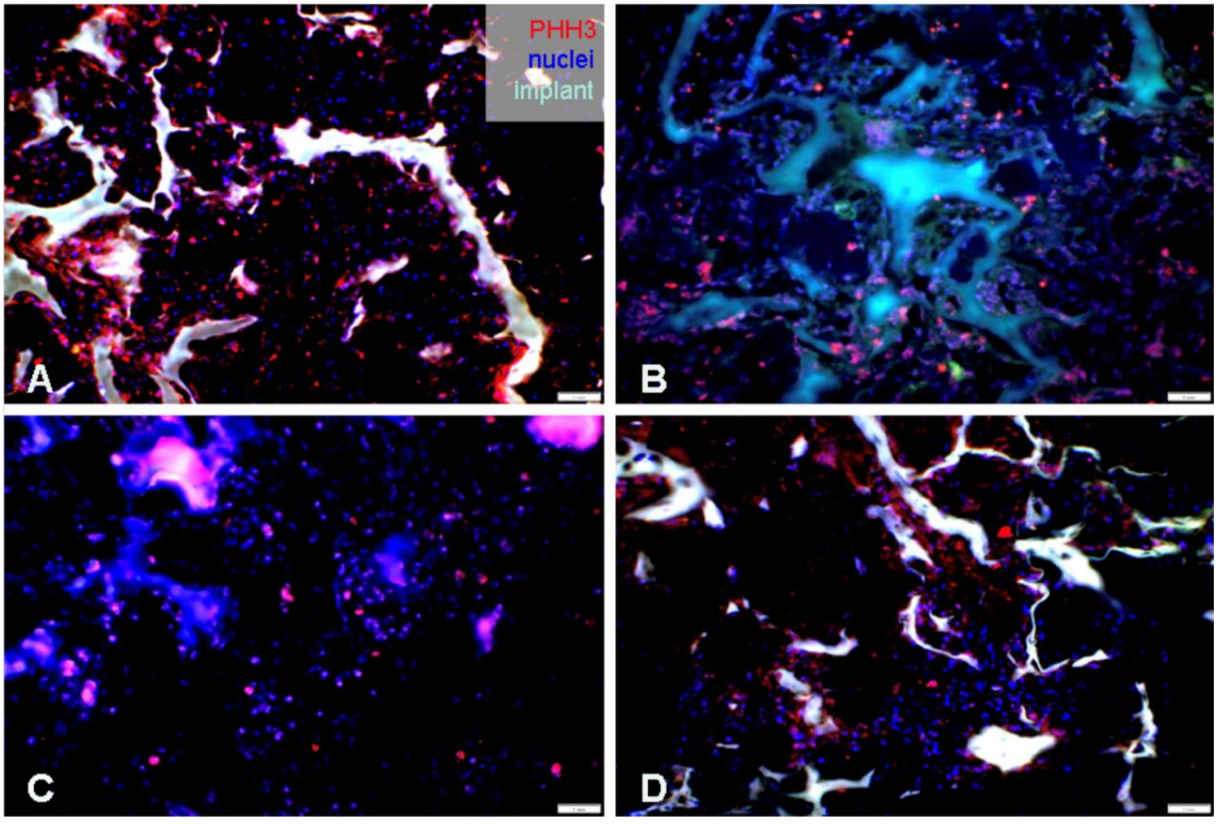
je fosforylovaný histón H3 (PHH3), ktorý vzniká fosforyláciou histónu H3 počas neskorej G2 fázy a mitózy. Na rozdiel od bežne používaných markerov proliferácie, ako je Ki67, PHH3 selektívne označuje bunky v aktívnej mitóze, čím zvyšuje presnosť hodnotenia bunkového delenia. Vďaka tejto vlastnosti sa PHH3 uplatňuje ako spoľahlivý nástroj pri hodnotení mitotickej aktivity a biologickej odpovede tkanív na rôzne stimuly vrátane biomateriálov [3]. CAM vtáčieho embrya predstavuje medzistupeň medzi jednoduchými *in vitro* a komplexnými *in vivo* modelovými systémami [4]. Uplatnenie nachádza najmä v oblasti bioinžinierstva, výskumu tkanivových transplantátov, nádorovej biológie a genomiky [5]. CAM model je vhodný na hodnotenie angiogénneho potenciálu a biokompatibility materiálov, pričom kľúčovým aspektom hodnotenia je identifikácia bunkových procesov prebiehajúcich na rozhraní materiálu a hostiteľského tkaniva [6]. Imunohistochemická analýza pomocou špecifických markerov umožňuje detailne sledovať procesy bunkovej proliferácie, migrácie a tkanivovej remodelácie, čím poskytuje komplexný pohľad na biologickú odpoveď hostiteľského tkaniva na implantovaný materiál [6-7]. Cieľom štúdie bolo pomocou imunohistochemickej detekcie PHH3 analyzovať proliferačnú aktivitu buniek v CAM modeli prepeličieho embrya po implantácii biomateriálu na báze polyhydroxybutyrátu a chitosanu (PHB/CHIT).

Materiál a metodika

Polyhydroxybutyrát-chitosanový kompozit (PHB/CHIT) bol pripravený podľa metódy Medveckého a kol. [8]. Oplodnené vajcia prepelice japonskej (*Coturnix coturnix japonica*, n = 158) boli získané z farmy Malá Ida (Košice, Slovensko). Následne boli inkubované za štandardných podmienok (38,2 ± 0,5 °C, 58 % relatívna vlhkosť) v liahni s núteným obehom vzduchu. Po 56 hodinách inkubácie boli embryá pomocou techniky *ex ovo* prenesené do sterilných 6-jamkových kultivačných platní (TPP, Švajčiarsko) a ďalej inkubované pri teplote 38,2 ± 0,5 °C a 60 % relatívnej vlhkosti až do implantácie. Na embryonálny deň 6 (ED6) bol testovaný materiál implantovaný na povrch CAM v nasledujúcich experimentálnych skupinách: (i) bez úpravy (PHB/CHIT), (ii) ošetrený fyziologickým roztokom (PHB/CHIT+PHY; 0,9 % NaCl), (iii) s prídavkom rastového faktora VEGF-A (PHB/CHIT+VEGF-A; 25 ng/mL PBS; Sigma-Aldrich, USA) a (iv) s inhibítorom angiogenézy angiostatínom (PHB/CHIT+ANGIOSTATIN; 47 µg/mL PBS; Human Angiostatin, Prolytix, USA). Testované materiály boli analyzované s cieľom zhodnotiť ich biokompatibilitu a proliferačnú aktivitu buniek v mieste implantácie na ED9. Na detekciu proliferujúcich buniek boli zhotovené parafínové rezy podrobené demaskovaniu antigénov v citrátovom pufri (pH 6,0) a následne inkubované cez noc pri 4 °C s primárnou protilátkou proti PHH3 (1:100, Millipore, USA). Na fluorescenčnú detekciu bola použitá sekundárna protilátka Goat anti-Rabbit IgG konjugovaná s TRITC (1:200, JIRL, West Grove, PA, USA). Jadrá buniek boli kontrastne dofarbené farbivom HOECHST (1:100 000; Sigma-Aldrich, USA) počas 10 minút. Po následnom premývaní v PBS boli rezy dehydrované v alkoholovom rade a uzavreté do média Vectashield (Vector Laboratories Inc., USA). Fluorescenčne značené rezy boli analyzované a dokumentované pomocou fluorescenčného mikroskopu Olympus BX53 (Olympus, Tokio, Japonsko) a digitálnej kamery Olympus DP74 (softvér cellSense).

Výsledky

Makroskopické pozorovanie CAM na ED9 poukázalo na dobrú integráciu implantovaného biomateriálu bez známok rozsiahlej tkanivovej alterácie. Imunofluorescenčná analýza s použitím protilátky proti fosforylovanému histónu H3 (PHH3) potvrdila prítomnosť mitoticky aktívnych buniek vo všetkých experimentálnych skupinách (Obr. 1). PHH3-pozitívne bunky boli prítomné na povrchu aj vo vnútri pórov všetkých vzoriek. Na základe kvalitatívneho hodnotenia imunofluorescenčných preparátov sa najvyššia intenzita PHH3-pozitivity pozorovala v skupine s neošetreným PHB/CHIT, zatiaľ čo najnižšia bola zaznamenaná v skupine PHB/CHIT+PHY. Vo všetkých sledovaných skupinách (PHB/CHIT, PHB/CHIT+PHY, PHB/CHIT+VEGF-A a PHB/CHIT+ANGIOSTATIN) bola v mieste implantácie zachovaná proliferačná aktivita buniek, pričom neboli pozorované oblasti úplnej absencie PHH3-pozitivity ani známky rozsiahlej tkanivovej deštrukcie. Distribúcia proliferujúcich buniek v okolí implantátu poukazuje na prebiehajúce procesy tkanivovej remodelácie a regenerácie. Kvalitatívne hodnotenie imunofluorescenčného farbenia naznačuje, že implantácia PHB/CHIT biomateriálu ani jeho modifikácia jednotlivými experimentálnymi podmienkami neviedli k potlačeniu bunkovej proliferácie v CAM modeli, čo podporuje predpoklad dobrej biologickej znášanlivosti testovaného materiálu.



Obrázok 1 Imunofluorescenčná detekcia proliferujúcich buniek v CAM modeli prepeličieho embrya po implantácii PHB/CHIT. Reprezentatívne mikroskopické snímky zobrazujú expresiu PHH3 ako markera mitoticky aktívnych buniek. (A) PHB/CHIT, (B) PHB/CHIT+PHY, (C) PHB/CHIT+VEGF-A a (D) PHB/CHIT+ANGIOSTATIN; mierka: 1 mm

Diskusia

CAM vyvíjajúceho sa vtáčieho embrya predstavuje v súčasnosti ľahko dostupný a ekonomicky efektívny modelový systém, ktorý je vďaka svojej rozsiahlej vaskularizácii vhodný na štúdium angiogenézy a predklinické testovanie biokompatibility a funkčnosti biomateriálov [9-10]. Umožňuje rýchlu verifikáciu prerastania krvných ciev do implantovaného materiálu ešte pred jeho testovaním v podmienkach *in vivo*, čím poskytuje dôležité informácie o jeho regeneračnom potenciáli z hľadiska angiogenézy a biokompatibility [6]. V štúdii sme biokompatibilitu acelulárneho kompozitu PHB/CHIT hodnotili prostredníctvom analýzy proliferačnej aktivity buniek v CAM modeli prepeličieho embrya, pričom sme sledovali vplyv rôznych úprav materiálu (fyziologický roztok, VEGF-A a angiostatín). Výsledky naznačili dobrú integráciu implantovaného biomateriálu do tkaniva CAM bez známok inhibície bunkovej proliferácie. Zachovaná mitotická aktivita buniek v okolí implantátu poukazuje na prebiehajúce procesy tkanivovej remodelácie a regenerácie. Proliferačná aktivita buniek, hodnotená pomocou markera PHH3, bola výrazná vo všetkých experimentálnych skupinách, pričom najvyššia bola pozorovaná pri neošetrenom PHB/CHIT. Prítomnosť PHH3-pozitívnych buniek na povrchu aj vo vnútri pórov biomateriálu poukazuje na aktívnu bunkovú proliferáciu sprevádzajúcu proces integrácie materiálu. Úloha PHH3 ako spoľahlivého markera mitotickej aktivity bola potvrdená viacerými štúdiami, ktoré sú v súlade s našimi zisteniami [11].

Záver

Imunohistochemická detekcia fosforylovaného histónu H3 potvrdila prítomnosť mitoticky aktívnych buniek v mieste implantácie PHB/CHIT biomateriálu vo všetkých experimentálnych skupinách CAM modelu prepeličieho embrya. Zachovaná proliferačná aktivita na rozhraní materiálu a hostiteľského tkaniva naznačuje, že skúmaný kompozit nevykazuje inhibičný účinok na bunkové delenie a vykazuje priaznivú biologickú znášanlivosť. Získané výsledky zároveň potvrdzujú, že PHH3 predstavuje vhodný a vysoko špecifický marker mitotickej aktivity, ktorý môže slúžiť ako doplnok štandardných imunohistochemických metód pri predklinickom hodnotení biokompatibility biomateriálov v CAM modeli.

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0074/24 a APVV-23-0372.

Literatúra

[1] Gomes, *Journal of Medical and Biological Research.* **2025**, 58:e14599.
[2] Demcisakova, *Cancers*. **2022**, 14(17):4194.
[3] Kim, *Oncotarget.* **2017**, 8(39):65064-65076.
[4] Chen, *Cells*. **2021**, 10(2):463.
[5] Liu, *Experimental Animals*. **2017**, 67(1):1-6.
[6] Mangir, *ASC Biomaterials Science & Engineering*. **2019**, 5(7):3190-3200.
[7] Makanya, *Plos One*. **2016**, 11(4):e0152821.
[8] Medvecky, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **2013**, 25(3):777-789.
[9] Baiguera, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* **2012**, 100(5):1425-1434.
[10] Maina, *Springer*, **2017**, 250 s., ISBN 978-3-319-44153-5.
[11] Zhu, *Oncotarget.* **2016**, 7(29):45005-45014.

Štrukturálne zmeny na orgánoch modelového organizmu *Neocaridina davidi* po expozícii acetamipridom

Galajda, R.[1], Almášiová, V.[2]

[1] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice; [2] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfologických disciplín, Košice
richard.galajda@uvlf.sk

Abstract

The current study evaluates the potential of the freshwater shrimp Neocaridina davidi as a model organism in scientific research, focusing on its use in aquatic toxicity bioassays. The experimental section involved a 5-day test conducted according to EPA guidelines, examining the effects of the neonicotinoid acetamiprid at concentrations of 0.2 mg/L and 0.5 mg/L. The histological structure of the hepatopancreas and gut was monitored in both control and exposed shrimps. Histological analysis revealed concentration-dependent damage to the main digestive organs, such as the hepatopancreas and gut. This study confirms that Neocaridina davidi is a suitable model organism for detecting the sublethal and lethal effects of pesticides. It fully complies with the 3Rs principles and provides relevant data for environmental risk assessment in aquatic environments.

Keywords: Neocaridina davidi, acetamiprid, histological evaluation, digestive organs

Úvod

Znečistenie vodného prostredia chemickými polutantmi ako sú pesticídy, farmaceutické reziduá, ťažké kovy, mikroplasty a ďalšie látky predstavuje jeden z najzávažnejších environmentálnych problémov súčasnosti [1]**.** Spomínané substancie negatívne ovplyvňujú fyziológiu, reprodukciu a prežitie vodných organizmov a prostredníctvom potravinového reťazca nepriamo ohrozujú aj ľudské zdravie [1,2]**.** Hodnotenie environmentálnych rizík a toxických účinkov rôznych kontaminantov na organizmus vyžaduje spoľahlivé, citlivé a eticky akceptovateľné modelové systémy, ktoré umožňujú detekciu nielen letálnych ale aj subletálnych efektov týchto intoxikantov [2,3]**.**

V súčasnosti je vo výskume vysoko akceptovaný koncept 3R princípov: Replacement – nahradenie zvierat alternatívnymi metódami, Reduction – zníženie počtu zvierat, Refinement – zlepšenie postupov na minimalizáciu utrpenia [3,4]**.** Prostredníctvom Smernice Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ o ochrane zvierat používaných na vedecké účely je sústavne vytváraný výrazný tlak na minimalizáciu používania stavovcov vo výskume [5]**.** Z etického hľadiska sú teda alternatívne modelové organizmy menej problematické, nakoľko verejná aj legislatívna citlivosť voči ich využívaniu je podstatne nižšia ako v prípade stavovcov [2,6]**.**

Ako mimoriadne perspektívny alternatívny modelový organizmus sa javí aj sladkovodná krevetka *Neocaridina davidi*. Tento drobný kôrovec z čeľade *Atyidae* vyniká nenáročným chovom v laboratórnych podmienkach, vysokou odolnosťou, priamym vývinom bez planktonických larválnych štádií a relatívne krátkym životným

cyklom (1,5 – 2 roky). Tieto vlastnosti spolu s komplexným správaním ju predurčujú na akútne, chronické aj multigeneračné toxikologické štúdie [7]**.**

Materiál a metodika

V experimente boli použité dospelé jedince sladkovodnej krevetky *Neocaridina davidi*, ktoré boli v súlade so smernicou EPA vystavené dvom rôznym koncentráciám prípravku Mospilan® 20 SP, a to v priebehu 5 dní. Prvá skupina krevetiek (n = 20) bola exponovaná koncentrácii 0,2 mg/l acetamipridu (12 mg prípravku Mospilan® 20 SP), druhá skupina krevetiek (n = 20) bola exponovaná koncentrácii 0,5 mg/l acetamipridu (30 mg prípravku Mospilan® 20 SP). Tretia skupina bez vystavenia pesticídu slúžila ako negatívna kontrola (n = 20). Na piaty deň boli všetky jedince usmrtené ponorením do 10% fixačného roztoku formalínu a následne spracované rutinným spôsobom pre účely svetelnej mikroskopie. Preparáty ofarbené hematoxylín-eozínom boli vyhodnocované a fotodokumentované svetelným mikroskopom Zeiss Axio Lab A1 s kamerou Axio Cam ERc 5.

Výsledky a diskusia

V kontrolnej skupine vykazovali vnútorné orgány *Neocaridina davidi* intaktnú histologickú štruktúru bez prítomnosti akýchkoľvek štrukturálnych zmien. Tráviaca rúra pozostávala z troch charakteristických úsekov – predného, stredného a zadného čreva. V oblasti cephalothoraxu bol zreteľne viditeľný aj hepatopankreas tvorený početnými, slepo zakončenými tubulmi, ktoré sa otvárali do lumenu stredného čreva. Stena tráviacej rúry pozostávala z epitelovej výstelky – jednovrstvového cylindrického epitelu nasadajúceho na tenkú bazálnu membránu. Pod bazálnou membránou bola len tenká vrstvička väziva. Ďalej nasledovali dve podvrstvy viscerálnej svaloviny a väzivo s mezotelovou pokrývkou. V epiteli boli prítomné D-bunky s početnými mikroklkmi (resorpčné) a ojedinele aj regeneračné E-bunky. Hepatopankreas pozostával zo systému slepo zakončených tubulov vystlaných jednovrstvovým cylindrickým epitelom diferencovaným na tri hlavné typy bunky: regeneračné E-bunky (v distálnej časti tubulov), fibrilárne F-bunky (syntéza a sekrécia tráviacich enzýmov) v mediálnej časti tubulov a zásobné B-bunky (akumulácia lipidov a polysacharidov) v proximálnej časti tubulov. Pod epitelovou výstelkou bola nenápadná vrstvička väziva a viscerálnej svaloviny. Tubuly boli obklopené voľným priestorom s tekutinou – hemocel (Obr. 1).

V stene tráviacej rúry jedincov exponovaných 0,2 mg/l acetamipridu sme pozorovali výrazné štrukturálne odlišnosti oproti kontrolnej skupine. Všetky úseky čreva ako aj proximálne úseky tubulov hepatopankreasu mali výrazne zredukovanú stenu a kompletne dezintegrovanú epitelovú výstelku (Obr. 2).

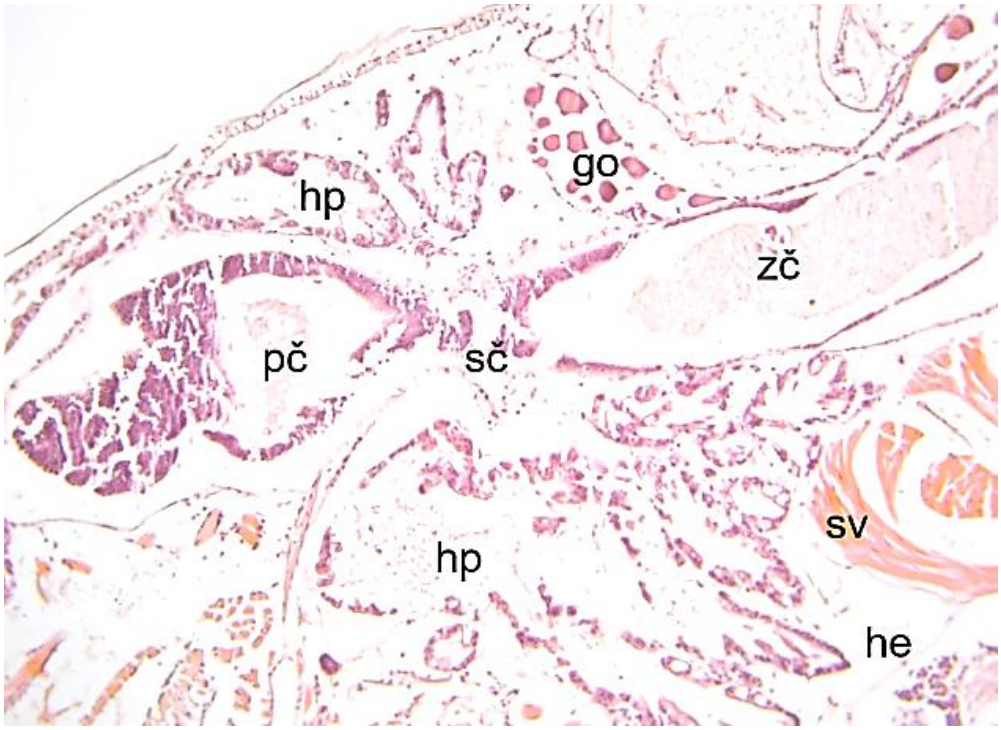
Pri expozícii acetamipridu s koncentráciou 0,5 mg/l bola mortalita exponovaných kreviet vysoká a preživšie jedince mali omnoho výraznejšie poškodenú štruktúru všetkých úsekov čreva a hepatopankreasu oproti skupine exopnovanej koncentrácii 0,2 mg/l acetamipridu. Okrem úplnej dezintegrácie epitelovej výstelky a narušenej štruktúry ostatných vrstiev steny čreva sme pozorovali aj výraznú dilatáciu lúmenu všetkých úsekov čreva. Tubuly hepatopankreasu boli vo všetkých troch častiach – proximálnej, mediálnej aj distálnej tvarovo deformované a ich epitelová výstelka bola nesúvislá (Obr. 3).

Veľmi podobné štrukturálne zmeny na čreve, hepatopankrease ako aj ďalších orgánoch *Neocaridina davidi* boli pozorované aj pri podávaní niklu, bisfenolu

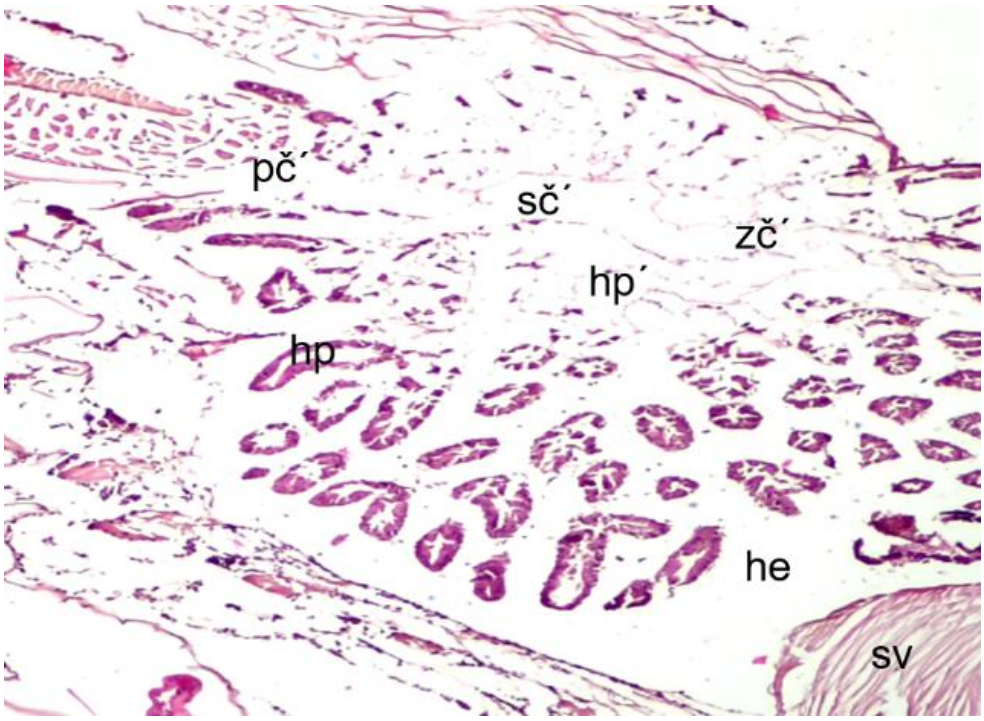
a rozličných pesticídov. V rámci týchto štúdií bol odhalený ako hlavný mechanimus poškodenia tkanív oxidačný stres [8,9].

Záver

Naše pozorovania jednoznačne potvrdzujú potenciál *Neocaridina davidi* ako perspektívneho modelového organizmu pre hodnotenie environmentálnych rizík neonikotinoidov. Tento druh sladkovodnej krevetky umožňuje detekciu nielen letálnych, ale aj subletálnych efektov na štrukturálnej úrovni, čo je kľúčové pre skorú identifikáciu kontaminácie vodného prostredia. Zároveň otvára cestu k ďalším štúdiám – chronickým expozíciám, multigeneračným testom alebo hodnoteniu rehabilitačnej kapacity po odstránení toxínu. V kontexte narastajúceho používania acetamipridu v poľnohospodárstve a rizika pôsobenia na necieľové organizmy má táto práca aj praktický prínos pre ochranu akvatických ekosystémov a udržateľnú akvakultúru.



Obrázok 1 Normálna histologická štruktúra vnútorných orgánov *Neocaridina davidi* kontrolnej skupiny; pč – predné črevo, sč – stredné črevo, zč – zadné črevo, hp – hepatopankreas, go – gonáda, sv – kostrová svalovina (orig. zv. 200x, HE)



Obrázok 2 Zmenená histologická štruktúra vnútorných orgánov *Neocaridina davidi* skupiny exponovanej 0,2 mg/l acetamipridu; pč´ – predné črevo s poškodenou stenou, sč´ – stredné črevo s poškodenou stenou, zč´ – zadné črevo s poškodenou stenou, hp´ – hepatopankreas s poškodenými proximálnymi úsekmi tubulov, sv – kostrová svalovina (orig. zv. 200x, HE)

Obrázok 3 Výrazne zmenená histologická štruktúra vnútorných orgánov *Neocaridina davidi* skupiny exponovanej 0,5 mg/l acetamipridu; pč´ – predné črevo s poškodenou stenou, sč´ – stredné črevo s poškodenou stenou, zč´ – zadné črevo s poškodenou stenou, hp´ – hepatopankreas s výrazne poškodenými tubulmi, sv – kostrová svalovina (orig. zv. 200x, HE)

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0240/25

Literatúra

[1] Impelliteri, *Int. J Environ. Res. Pub. Health.* **2022**,19(24):16830.
[2] Lagadic, *Health Persp.* **1998**,106(2):593-611.
[3] Doke, *Saudi Pharm. J.* **2015**, 23:223-229.
[4] Balls, *Laboratory Animals*, **1994**, 28:193-211.
[5] https://eur-lex.europa.eu/legal content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:02010L0063-20190626; Updated June 14. **2023**.
[6] Wilson – Sanders*, ILAR J.* **2011**, 52(2):126-152.
[7] Rodriguez, *Sci. rep.* **2024**, 14:9356.
[8] Gorol, *Europ. Zool. J.* **2025**, 92(1):390-409.
[9] Ostrozka, *Micron*. **2022**,155:103162.

Štruktúra prídavných lalokov v lumbosakrálnej oblasti u kuracieho embrya na 14. embryonálny deň

Holovská, K., Andrašková, S., Hudáková P., Almášiová, V.

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

Abstract

The aim of the study was to observe the structure of the accessory lobes in the lumbosacral region of the chick embryo on embryonic day 14. Using various staining methods, we identified different structures in this region. At this stage of development, the spinal cord had clearly defined white and grey matter. The meninges covered its surface. On the dorsal side, a well-developed glycogen body was observed. Laterally, accessory lobes were formed, consisting of intensely staining neurons and neuroglial cells. Glycogen has not yet been observed in neuroglial cells.

Keywords: chick embryo, structure, accessory lobes

Úvod

Vtáky vykonávajú dva takmer nezávislé druhy pohybu, a to je lietanie a chôdzu po zemi. Predpokladá sa, že v ich koordinácii zohrávajú dôležitú úlohu dva rôzne zmyslové orgány. Ide o vestibulárny systém, ktorý je súčasťou vnútorného ucha a ovplyvňuje let, kým lumbosakrálny systém sa podieľa na riadení chôdze [1]. Miecha u vtákov prebieha v celom stavcovom kanáli. Je v nej lokalizovaných viac koordinačných a reflexných funkcií než u cicavcov. Môžeme v nej pozorovať zhrubnutie v dvoch oblastiach. Jedno sa nachádza v oblasti krku a u lietavých vtákov je výrazné, druhé v bedrovokrížovej - lumbosakrálnej oblasti [2]. V tejto oblasti sa vyskytuje aj glykogénové teliesko *(corpus gelatinosum)*. V tejto časti je stavcový kanál značne rozšírený [1]. Dorzálne od *ligamentum denticulatum* sa po stranách miechy vyskytuje 7-10 útvarov označených ako prídavné laloky *(lobi acessorii)*. Ide o nahromadenú bielu hmotu, v ktorej centre sa vyskytuje sivá hmota *(nuc. marginales)* [2].

Aj keď štruktúra lumbosakrálnej oblasti bola sledovaná u mnohých druhov domácich a voľne žijúcich vtákov [3-7], o jej ontogenetickom vývoji je stále len málo údajov. Cieľom našej práce bolo sledovať štruktúru prídavných lalokov, ktoré sú súčasťou lumbosakrálnej oblasti u kuracieho embrya na 14. embryonálny deň.

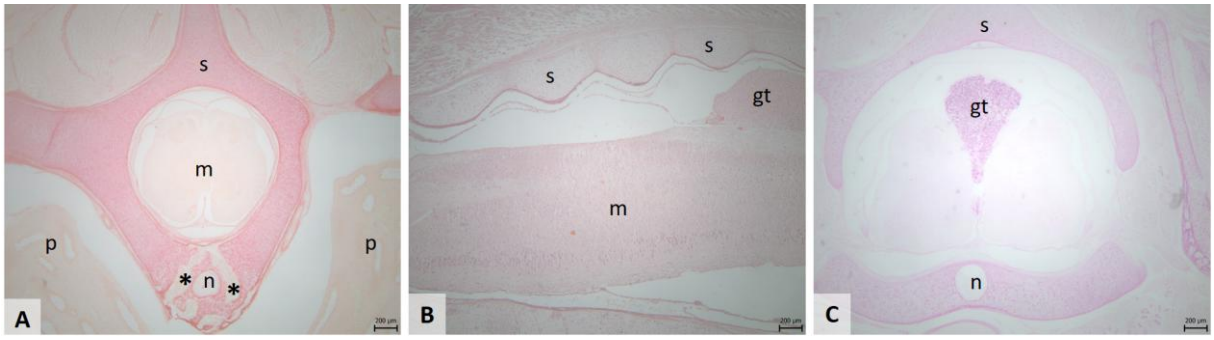
Materiál a metódy

V pokuse boli použité oplodnené kuracie vajcia z certifikovaného chovu Párovské Háje (Nitra). Vajcia boli inkubované v inkubátore (ET 49 automatic, River Systems, Campodarsego, Italy) pri štandardných inkubačných podmienkach (37,5 °C a vlhkosti vzduchu 60 %) po dobu 14. dní. Na 14. embryonálny deň boli vzorky odobrané a fixované v mDF (Modified Davidson´s fluid) a zaliate do parafínu. Následne 5-10 µm rezy boli ofarbené metódami hematoxylín-eozínom (HE), Massonov trichróm (MT), pikrosíriusovou červeňou (PR) na detekciu kolagénu a na dôkaz glykogénu bola použitá histochemická metóda PAS. Vzorky boli následne fotodokumentované

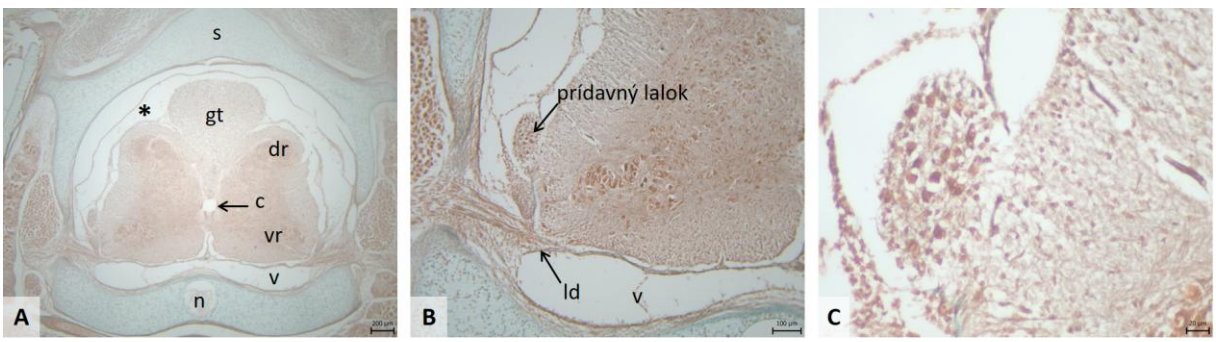
pomocou mikroskopu Olympus CX 43 (Olympus, Japonsko) a kamery Promicra (Česká republika).

Výsledky

Na 14. ED sme v lumbosakrálnej oblasti kuracieho embrya pozorovali dobre vyvinutý chrupkový model stavcov. Chondrocyty mali oválny tvar a ich cytoplazma bola bohatá na glykogén (Obr. 1C). V tele vyvíjajúcich sa stavcov bola zachovaná notochorda. V tejto časti chrbtice sme nepozorovali žiadne známky osifikácie (Obr. 1,2). Osifikácia bola zaznamenaná na stavcoch vyskytujúcich sa kraniálne, kde primárne osifikačné centrá boli pozorované v blízkosti notochordy – budúce hrudné stavce (Obr. 1A).
Stavcový kanál v lumbosakrálnej oblasti bol výrazne rozšírený (Obr. 1B). Vyvíjajúca sa miecha mala dobre definovanú bielu a sivú hmotu. Sivá hmota bola organizovaná do dorzálnych a ventrálnych rohov. V centrálnej časti miechy bol jasne definovaný centrálny kanál - *canalis centralis* (Obr. 2A). Na dorzálnej časti miechy sme pozorovali dobre vyvinuté glykogénové teliesko *(corpus gelatinosum)*. Teliesko pozostávalo z veľkých, intenzívne sa farbiacich PAS-pozitívnych buniek (Obr. 1C). Povrch miechy bol pokrytý väzivovou vrstvou *pia mater*. *Dura mater* spolu s arachnoideou, oddeľovali epidurálny priestor od subarachnoidálneho priestoru (Obr. 2).
V tomto štádiu vývoja sme v mieche pozorovali prídavné laloky - *lobi accessorii*. Tie sa nachádzali laterálne, na úrovni výbežkov *ligamentum denticulatum*, odkiaľ vyčnievali do veľkého subarachnoidálneho priestoru. Laloky obsahovali intenzívne sa farbiace neuróny a neurogliové bunky (Obr. 2). Cytoplazma gliových buniek v tomto štádiu ešte neobsahovala glykogén (Obr. 2C).



Obrázok 1 Mikrofotografie miechy kuracieho embrya na 14. embryonálny deň. A: Priečny rez hrudnými stavcami, s primárnym osifikačným centrom (PR). B: Pozdĺžny rez synsakrálnou oblasťou s výrazne rozšíreným stavcovým kanálom (HE). C: Glykogénové teliesko (PAS). gt - glykogénové teliesko, n - notochorda, s - stavec, p - pľúca. Mierky A, B, C – 200 µm



Obrázok 2 Mikrofotografie miechy kuracieho embrya na 14. ED. A: Priečny rez chrbticou v lumbosakrálnej oblasti, stavce sú bez známok osifikácie (MT). B: Detail miechy v mieste výskytu

prídavného laloka. C: Detail prídavného laloka. gt - glykogénové teliesko, c - centrálny kanál, s - stavec, ld - *ligamentum denticulatum*, v - ventrálny priestor, * - subarachnoidálny priestor. Mierky A - 200 µm, B - 100, C - 20 µm

Diskusia

Vtáky vykonávajú dva rôzne druhy pohybu, chôdzu a let. Vzhľadom na takmer horizontálnu orientáciu tela a umiestnenie zadných končatín kaudálne k ťažisku tela si ich chôdza vyžaduje špeciálnu kontrolu rovnováhy. Predpokladá sa, že špecializácia v lumbosakrálnej oblasti funguje ako zmyslový orgán rovnováhy, ktorý sa podieľa na riadení chôdze [1]. V strede tejto oblasti sa v dorzálnej časti miechy vyskytuje veľké glykogénové teliesko [1,4,5] a ventrolaterálne, segmentálne výbežky tzv. prídavné laloky [8-10]. U holubov bolo pozorovaných 10 párov prídavných lalokov, ktoré sa nachádzali v blízkosti nervových povrazcov. Laloky pozostávali z množstva stredne veľkých multipolárnych neurónov, myelinizovaných a nemyelinizovaných axónov, neurogliových buniek a buniek obsahujúcich glykogén (glykogénové bunky). Väčšinu buniek v laloku tvorili práve vyššie spomenuté bunky [9]. Transmisná elektrónová mikroskopia lalokov odhalila prítomnosť multipolárnych neurónov, ktoré mali charakteristické krátke výbežky, riasinky. Každý neurón obsahoval niekoľko dendritov s pomerne širokým priemerom. Axóny boli pokryté myelínom a prechádzali ventrálnymi rohmi ako hrubé myelinizované vlákna. Súčasťou lalokov boli aj dva typy neurogliových buniek, oligodendrocyty a astrocyty. Astrocyty mali množstvo výbežkov, avšak v prídavných lalokoch nevytvárali *membrana limitans gliae superficialis*, ktorá je charakteristická pre CNS [9].

Bunky obsahujúce glykogén boli u dospelých jedincov pozorované nielen v prídavných lalokoch, ale aj v prechodnej zóne medzi lalokmi a miechou. Bunky boli rôznej veľkosti, mali okrúhly až polygonálny tvar s jadrom na periférii. Vytvárali charakteristické cytoplazmatické výbežky, ktorých cytoplazma neobsahovala organely [9]. Bolo zistené, že tieto bunky majú dva typy výbežkov, ktoré sa od seba líšia štrukturálne aj funkčne. Elektrón-denzné výbežky sa nachádzali na okraji lalokov v blízkosti *pia mater*, kým elektrón-lucidné výbežky obklopovali susedné glykogén obsahujúce bunky v tvare závitu [9,11,12]. Podobné bunky boli u vtákov pozorované aj v iných častiach miechy, a to vo ventrálnych okrajoch miechy v lumbosakrálnej oblasti [11,13], v blízkosti centrálneho kanála v krčnej, hrudnej a kostrčovej oblasti miechy [11], ako aj v glykogénovom teliesku. Všetky tieto bunky sa považujú za špecializované astrocyty [9,11,13], čo bolo potvrdené aj imunohistochemicky [14].

Lumbosakrálna oblasť je pomerne dobre preštudovaná u dospelých jedincov. Je však len málo údajov o jej ontogenetickom vývoj. Embryonálny vývoj v tejto oblasti boli študovaný u holubov (10. ED, 12. ED, 14. ED, 15. ED, 16. ED, 17. ED a 18. ED, 1-týždňového a 3-týždňového holuba) a u kurčiat (15. ED, 18. ED a 1. dňových kurčiat) [8]. Autori uvádzajú, že prídavné laloky sa objavili v skorých štádiách vývoja, kým glykogénové teliesko o niečo neskôr, no obidva útvary boli v čase vyliahnutia už dobre vyvinuté [8]. U embryí holubov sa laloky objavili už na 10. embryonálny deň (ED). Na 12. ED boli výrazne oddelené od miechy a od 18. ED sa ich vzhľad už výrazne nemenil. V tomto období boli v lalokoch dobre viditeľné glykogénové bunky, ktoré sa postupne zväčšovali. Ich rast pokračoval do 3. týždňa po vyliahnutí. V tomto období mali útvary v lumbosakrálnej oblasti štruktúru porovnateľnú so štruktúrou u dospelých jedincov. U kuracích embryí bol vývoj lumbosakrálnej oblasti podobný, prebiehal však rýchlejšie [8]. V našom pokuse sme sa zamerali na 14. ED. V tomto štádiu vývoja sme v danej oblasti pozorovali dobre sa vyvíjajúcu miechu s výrazným glykogénovým telieskom. To

sa nachádzalo na dorzálnej časti miechy. Na laterálnej strane miechy boli dobre viditeľné pomerne malé prídavné laloky. Laloky vyčnievali do veľkého subarachnoidálneho priestoru. Boli tvorené výrazne sa farbiacimi neurónmi a neurogliovými bunkami. Bunky obsahujúce glykogén sme na 14. ED ešte nepozorovali.

Záver

Aj keď štruktúra lumbosakrálnej oblasti bola sledovaná u mnohých druhov vtákov, o jej ontogenetickom vývoji je stále málo údajov. Cieľom našej práce bolo priblížiť štruktúru prídavných lalokov, ktoré sú súčasťou miechy v lumbosakrálnej oblasti. Zamerali sme sa na 14. ED, kedy už boli laloky u kuracieho embrya vyvinuté, avšak bunky obsahujúce glykogén ešte nebolo možné identifikovať.

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

Literatúra:

[1] Necker, *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* **2006**, 192(5):439-448.
[2] Černý, Brno, *Metoda*, **2005**, 25-36 s., ISBN 802-39-49-667
[3] Schroeder, *J Morphol* **1987**, 194:41-53.
[4] De Gennaro, *Academic Press*, **1982**, 341-371 s., ISBN 978-0-12-249406-2
[5] De Gennaro, *J Morphol.* **1987**, 194:209-217.
[6] Raja, *JEZS.* **2019**, 7(1):1567-1570.
[7] Vukovic, *Veterinarski Arhiv*. **2005**, 75:101-110.
[8] Necker, *Anat Embryol (Berl).* **2005,** 210(1):59-74.
[9] Rosenberg, *J Comp Neurol*. **2002**, 447:274-285.
[10] Stanchak, *Integr Comp Biol*. **2023**, 63(2):474-483.
[11] Uehara, *Jpn J Vet Sci.* **1982**, 44:31-38.
[12] Schroeder, *Anat Rec*. **1987**, 218:121.
[13] Lyser, *Acta Anat (Basel).* **1973**, 85:533-549.
[14] Jankásková, *Physiol Bohem*. **1988**, 37:131-134.

Makroskopické a histopatologické hodnotenie pokročilých ulcerácií *pars oesophagea* u výkrmových ošípaných

Krepelková, Z.[1], Novotný, J.[1], Andrašková, S.[2], Bárdová, K.[1], Almášiová, V.[2], Čulka, Ľ.[1]

[1] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Klinika ošípaných, Košice; [2] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfologických disciplín, Košice
zuzana.krepelkova@uvlf.sk

Abstract

Histopathological changes of the *pars oesophagea* in pigs involve progressive lesion development from parakeratosis to deep ulcerations extending into the submucosa and muscular layer of the stomach. The aim of this study was the macroscopic and histopathological evaluation of advanced *pars oesophagea* ulcerations (score 3) in finishing pigs obtained at slaughter. A total of 86 stomachs were examined. Parakeratosis (score 1) was the predominant lesion (52.3%), followed by erosions (score 2; 22.1%) and deep ulcerations (score 3; 7.0%). Histologically, advanced ulcerations were characterized by extensive loss of the stratified squamous epithelium, erosions progressing to deep ulcerative defects, and multifocal necrosis. The ulcerated areas showed diffuse inflammatory infiltration composed predominantly of neutrophils, lymphocytes, and macrophages. Granulation tissue with marked neovascularization was frequently observed within the ulcer bed, indicating ongoing tissue repair, while fibrin thrombi were present in some blood vessels. Ulcerative lesions extended through the full thickness of the mucosa and submucosa, reaching the *tunica muscularis*. These findings demonstrate that advanced *pars oesophagea* ulcerations represent chronic progressive lesions characterized by concurrent inflammatory and reparative processes.

Keywords: pigs, *pars oesophagea*, histopathology, gastric ulcer

Úvod

Ulcerácie *pars oesophagea* predstavujú najzávažnejšie štádium žalúdočných lézií ošípaných a sú spojené s významnými zdravotnými a produkčnými stratami v intenzívnych chovoch [1,2]. Lézie vznikajú progresiou od parakeratózy a erózií krycieho epitelu až po hlboké ulceratívne defekty prenikajúce cez submukózu až do vlastnej svalovej vrstvy žalúdka [3].

Pars oesophagea je bezžľazová oblasť žalúdka pokrytá viacvrstvovým dlaždicovým epitelom bez ochrannej mucinóznej vrstvy. Vzhľadom k tomu je obzvlášť náchylná na vznik žalúdočných vredov pôsobením kyseliny chlorovodíkovej a pepsinogénu, ktoré sú produkované parietálnymi a hlavnými bunkami žalúdkových žliaz [4,5].

Patogenéza ulcerácií je multifaktoriálna a zahŕňa interakciu nutričných, environmentálnych a manažmentových faktorov [6,7]. Medzi najvýznamnejšie predispozičné faktory patrí jemne mleté alebo granulované krmivo, ktoré mení fyzikálne vlastnosti žalúdočného obsahu a podporuje kontakt kyslého obsahu so sliznicou *pars oesophagea* [8,9]. K rozvoju lézií môžu prispievať aj stres, vysoká koncentrácia zvierat a nepravidelný príjem krmiva [7].

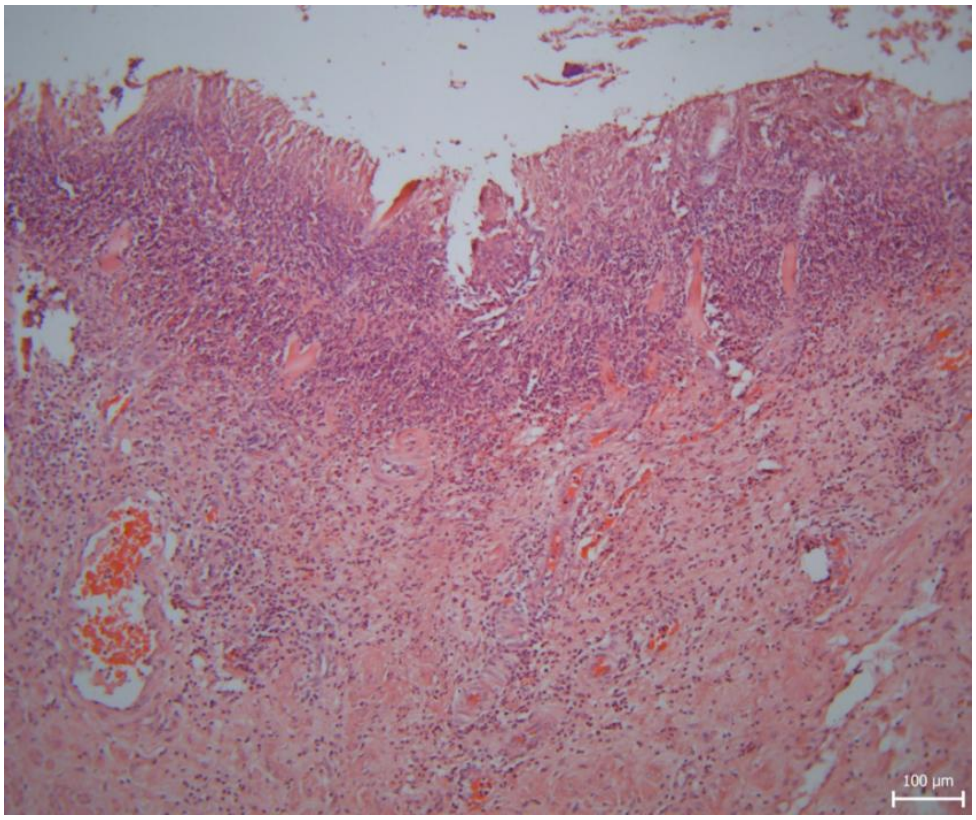
Ulcerácie klasifikované ako skóre 3 sú charakterizované deštrukciou siahajúcou hlboko do steny žalúdka, často až do podslizničného väziva alebo svaloviny. Histopatologické hodnotenie pokročilých ulcerácií poskytuje dôležité informácie o rozsahu poškodenia tkaniva, o zápalovej odpovedi a o reparačných procesoch [3].
Cieľom práce bolo makroskopicky a mikroskopicky charakterizovať ulcerácie *pars oesophagea* skóre 3 u výkrmových ošípaných.

Materiál a metodika

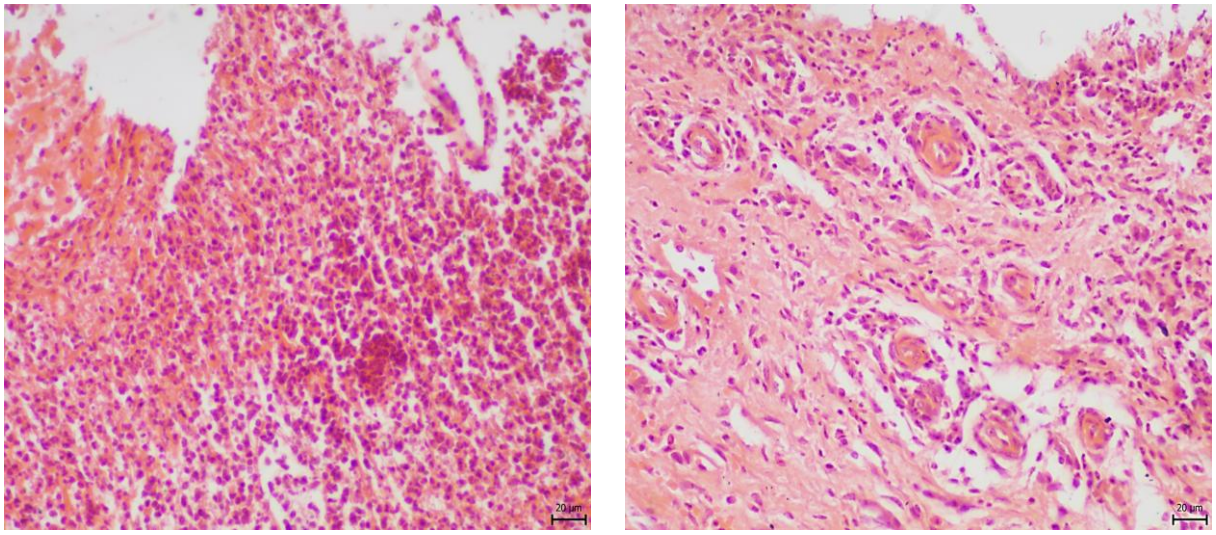
Do štúdie bolo zaradených 86 žalúdkov výkrmových ošípaných získaných pri porážke počas zimy 2025 a jari 2026.
Po otvorení žalúdkov pozdĺž veľkého zakrivenia bolo vykonané makroskopické hodnotenie *pars oesophagea*. Lézie boli hodnotené podľa skórovacieho systému Robertsona [10], pričom skóre 0 predstavoval fyziologický nález bez zmien sliznice, skóre 1 parakeratózu, skóre 2 eróziu a skóre 3 žalúdočný vred.
Z oblastí ulcerácií (skóre 3) boli odobraté vzorky tkaniva fixované v 10 % neutrálnom formalíne a následne spracované štandardnou histologickou technikou pre účely svetelnej mikroskopie. Tkanivové rezy hrubé 5 µm boli farbené hematoxylínom a eozínom (H&E). Histologické hodnotenie vzoriek bolo realizované pri zväčšeniach ×100 a ×400 pomocou svetelného mikroskopu PrimoStar (Zeiss).

Výsledky

Z 86 vyšetrených žalúdkov bola fyziologická sliznica *pars oesophagea* (skóre 0) prítomná u 16 ošípaných (18,6 %), parakeratóza (skóre 1) u 45 zvierat (52,3 %), erózie (skóre 2) u 19 zvierat (22,1 %). Žalúdočné ulcerácie (skóre 3) boli zistené u 6 ošípaných (7,0 %).
Makroskopicky sa ulcerácie prejavovali ako hlboké kráterovité defekty oválneho tvaru s nepravidelnými vyvýšenými okrajmi. V okrajových oblastiach niektorých ulcerácií boli na sliznici viditeľné erózie predstavujúce prechod medzi intaktnou sliznicou a hlbokým ulceratívnym defektom.
Mikroskopickým pozorovaním histologických vzoriek z postihnutých oblastí *pars oesophagea* bola v tesnej blízkosti vredu často prítomná parakeratóza prechádzajúca na hranici vredu do erózií, typických čiastočnou až úplnou stratou skvamózneho epitelu. Erózie často zasahujúce až k *lamina propria mucosae,* boli charkteristické prítomnosťou zhlukov exfoliovaných epiteliálnych buniek a výraznou zápalovou infiltráciou vo väzive sliznice. Na erózie naväzujúce hlboké ulcerácie často prenikali celou hrúbkou sliznice a podslizničného väziva až k *tunica muscularis*. Povrch ulcerácií bol vyplnený nekrotickým detritom tvoreným zvyškami odumretých buniek, fibrínom a zápalovými bunkami. Pod zónou homogénneho odumretého tkaniva sme nachádzali novovytvorené granulačné tkanivo s výraznou neovaskularizáciou a zmiešanou zápalovou infiltráciou tvorenou prevažne lymfocytmi, makrofágmi, plazmatickými bunkami a ojedinele neutrofilnými granulocytmi. Spodina defektu bola tvorená väzivom. V niektorých cievach boli prítomné fibrínové tromby poukazujúce na vaskulárne poškodenie a lokálnu ischémiu tkaniva (Obr. 1,2).



Obrázok 1 Mikrofotografia žalúdočného vredu – pars oesophagea (H&E; x100); Strata krycieho epitelu, úplná strata typickej štruktúry tkaniva a difúzna zápalová infiltrácia. Vred preniká celou hrúbkou sliznice a submukózy až k tunica muscularis. Granulačné tkanivo na báze defektu s dilatovanými krvnými cievami a zápalovými bunkami



Obrázok 2 Dno hlbokého žalúdočného vredu – pars oesophagea (H&E, 400x); Úplná strata epitelu a typickej tkanivovej architektúry s prítomnosťou bunkového detritu, zápalového infiltrátu a fibrinoidnej nekrózy. V spodine defektu je prítomné granulačné tkanivo s novovzniknutými krvnými cievami a zápalovými bunkami

Diskusia

Zistené výsledky potvrdzujú, že ulcerácie *pars oesophagea* skóre 3 predstavujú pokročilé chronické lézie sprevádzané rozsiahlym poškodením tkaniva a výraznou

zápalovou odpoveďou, čo je v súlade s predchádzajúcimi štúdiami [3,11]. Makroskopický obraz hlbokých kráterovitých defektov koreloval s histologickým nálezom úplnej straty viacvrstvového dlaždicového epitelu, deštrukcie typickej štruktúry tkaniva s penetráciou lézií do hlbších vrstiev žalúdočnej steny. Podobné morfologické zmeny opisuje aj Embaye et al. [3], ktorí zaznamenali výrazné poškodenie epitelu a hlboké ulceratívne zmeny pri léziách *pars oesophagea*. Krepelková et al. [12] uvádzajú, že progresia lézií od parakeratózy cez erózie až po hlboké ulcerácie je sprevádzaná postupnou stratou integrity sliznice a narušením hlbších vrstiev steny žalúdka. Náhly prechod normálnej sliznice do hlbokého vredu bez zhrubnutia ciev a zjazvenia a výrazná neutrofilná infiltrácia poukazujú na prebiehajúci akútny proces. Prítomnosť granulačného tkaniva, neovaskularizácie, makrofágov, lymfocytov a plazmatických buniek svedčí o chronickom charaktere lézií a prebiehajúcich reparačných procesoch. Prítomnosť granulačného tkaniva v spodine ulcerácií dokumentuje aktívnu snahu organizmu o reparáciu poškodených tkanív. Častá kombinácia akútnych a chronických zápalových zmien naznačuje kontinuálnu progresiu ulcerácií od povrchových erózií až po hlboké ulceratívne defekty, ako uvádza aj Embaye et al. [3]. Prítomnosť fibrínových trombov v niektorých cievach poukazuje na vaskulárne poškodenie a lokálne poruchy perfúzie, ktoré môžu prispievať k progresii ulcerácií a obmedzovať regeneráciu tkaniva. Podobné vaskulárne zmeny a reparačné procesy sprevádzajúce chronické žalúdočné lézie boli opísané aj v predchádzajúcich štúdiách a sú považované za významné faktory ovplyvňujúce hojenie tkaniva [3,13].

V analyzovanom súbore boli najčastejšie zastúpené mierne lézie skóre 1, zatiaľ čo hlboké ulcerácie skóre 3 boli zaznamenané len u malého počtu zvierat. Tento nález korešponduje s literárnymi údajmi, podľa ktorých sú pokročilé ulcerácie menej časté, avšak predstavujú najzávažnejšie štádium ochorenia s významnými dôsledkami na zdravotný stav a produkčné ukazovatele zvierat [1,7].

Napriek multifaktoriálnej etiológii ulcerácií *pars oesophagea* zostáva nevhodná fyzikálna forma krmiva jedným z najvýznamnejších predispozičných faktorov. Jemne mleté a granulované krmivá podporujú zvýšenú tekutosť žalúdočného obsahu a uľahčujú kontakt kyslého obsahu so sliznicou *pars oesophagea*, čím vytvárajú podmienky pre vznik a progresiu žalúdočných lézií [8,9].

Záver

V predloženej práci boli makroskopicky a histopatologicky opísané ulcerácie *pars oesophagea* skóre 3 u výkrmových ošípaných. Tieto lézie predstavovali hlboké deštruktívne defekty prenikajúce cez celú hrúbku sliznice a submukózy až *k tunica muscularis*. Histologicky boli charakterizované stratou viacvrstvového dlaždicového epitelu, výraznou zápalovou infiltráciou na okraji defektu, fibrinoidnou nekrózou a tvorbou granulačného tkaniva s neovaskularizáciou.

Zistené nálezy potvrdzujú, že ulcerácie *pars oesophagea* (skóre 3) predstavujú pokročilé chronické lézie, sprevádzané súčasne prebiehajúcimi zápalovými a reparačnými procesmi. Histopatologické vyšetrenie predstavuje významnú diagnostickú metódu na hodnotenie rozsahu poškodenia tkaniva a štádia progresie žalúdočných lézií u ošípaných. Výsledky zároveň poukazujú na význam preventívnych opatrení zameraných na elimináciu rizikových faktorov, predovšetkým optimalizáciu výživy a manažmentu kŕmenia v intenzívnych chovoch.

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0040/24: Výskum prevalencie,etiologických a predispozičných faktorov žalúdočných lézií u ošípaných.

Literatúra

[1] https://www.msdvetmanual.com/digestive-system/gastrointestinal- ulcers-in-large-animals/gastric-ulcers-in-pigsf; Modified Sept. **2024.**
[2] Thomson, *Diseases of Swine,* **2012**,199-226.
[3] Embaye, *J Comp Pathol*. **1990**, 103:253-264.
[4] Yao, *Annu Rev Physiol.* **2003**, 65:103-131.
[5] Roels, *Res Vet Sci*. **1997**, 62(2):165-169.
[6] Canibe, *Aarhus University*. **2016**, 89.
[7] Cybulski, *Porcine Health Management*. **2024**, 10:11.
[8] Grosse Liesner, *J Anim Physiol Anim Nutr.* **2009**, 93(3):373-380.
[9] Lauridsen, *Nutrinews*. **2020**, 123.
[10] Robertson, *Prev Vet Med*. **2002**, 53(4):293-303.
[11] Zhang, *Dig Med Res***. 2023**, 6:9.
[12] Krepelková, *Folia Vet.* **2025**, 69(3):21-27.
[13] De Witte, *Vet J*. **2018**, 236:56-61.

Histologická analýza zmien zásob glykogénu v pečeni kuracích embryí po expozícii etanolu

Pokorná, B.[1], Štefancová, S.[1], Demčišáková, Z.[2], Holovská, K.[2], Petrovová, E.[2], Luptáková, L.[1]

[1] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice; [2] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfologických disciplín, Košice
bronislava.pokorna@student.uvlf.sk

Abstract

The study investigates the impact of different ethanol concentrations (5%, 10%, 15%, 20%) on the liver parenchyma of chicken embryos following 24- and 48-hour exposure. The chicken embryo model was utilised to observe the prenatal consequences of toxic substances. The PAS reaction method was utilised to conduct a histological evaluation of alterations in glycogen reserves. The results demonstrated that decreased concentrations of ethanol (5% and 10%) resulted in elevated glycogen accumulation, particularly in perivascular regions. Conversely, higher concentrations (15% and 20%) resulted in a decline in its reserves, indicating metabolic stress and disruption of anabolic processes in the developing liver. The findings suggest that ethanol exerts a significant impact on the energy metabolism of embryos, and how much it affects them depends on the dosage and how long they're exposed to it.

Keywords: avian embryo, ethanol, glycogen, liver

Úvod

Etanol je súčasťou každodennej konzumácie mnohých kultúr už po stáročia, no jeho nadmerná konzumácia vedie k vážnym zdravotným problémom, najmä k poškodeniu pečene. Keďže sa nedá vylúčiť, musí sa metabolizovať, a to predovšetkým v pečeni [1]. Zvýšený pomer NADH/NAD^+ pri metabolizme etanolu inhibuje glukoneogenézu presunom pyruvátu a oxalacetátu na tvorbu laktátu a malátu, čo môže viesť k hypoglykémii nalačno a ovplyvniť zásoby glykogénu v pečeňovom parenchýme [2]. Glykogén je zásobná forma glukózy ukladaná najmä v pečeni a svaloch, ktorá slúži ako zdroj energie pre organizmus. V hepatocytoch zohráva významnú úlohu pri udržiavaní glukózovej homeostázy v tom, že pri zvýšenej hladine glukózy podporuje jej premenu na glykogén a pri poklese hladiny glukózy umožňuje jej uvoľňovanie do krvného obehu [3]. Prenatálna expozícia etanolu môže nepriaznivo ovplyvniť vývin pečene plodu a metabolické funkcie narušením metabolizmu glykogénu, oxidačným stresom a zmenami aktivity enzýmov. U potkanov bol chronický príjem etanolu počas gravidity spojený s hypoglykémiou, spomalením rastu plodu a výrazným znížením zásob glykogénu v pečeni, spolu so zníženou aktivitou enzýmov dôležitých pre metabolizmus glykogénu [4]. Histopatologické zmeny zodpovedajúce alkoholickému ochoreniu pečene boli pozorované aj u detí s fetálnym alkoholovým syndrómom. Analýza biopsie pečene u 17-mesačného dieťaťa odhalila parenchýmovú steatózu, portálnu a perisinusoidálnu fibrózu, pričom ultraštrukturálne vyšetrenie preukázalo prítomnosť kolagénových vlákien, myofibroblastov a zmien v perisinusoidálnych priestoroch [5]. Cieľom práce bolo sledovať vplyv rôznych koncentrácií etanolu po 24-

a 48-hodinovej expozícii na pečeň kuracích embryí, pričom model kuracieho embrya predstavuje významný experimentálny model vo výskume embryonálneho vývinu a prenatálneho pôsobenia toxických látok.

Materiál a metódy

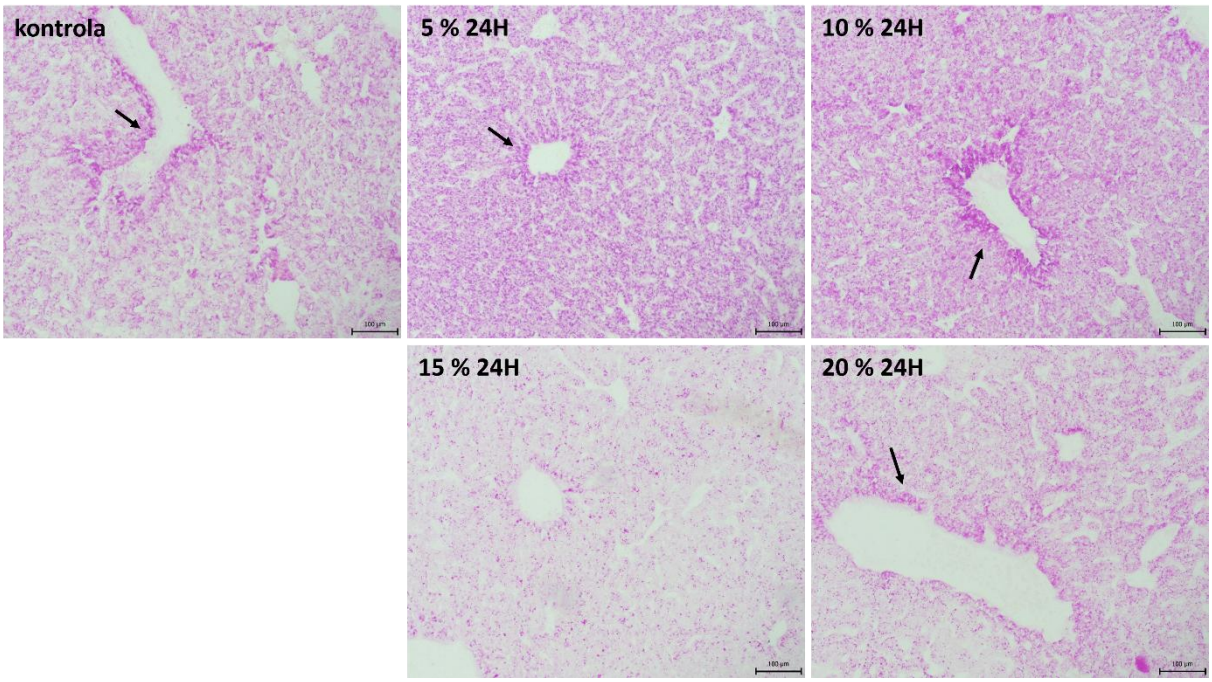
V experimentálnej práci bolo použitých 144 kuracích vajec, ktoré boli inkubované za štandardných podmienok pri teplote 37,5 °C ± 0,5 °C a 60 % relatívnej vlhkosti v automatickej liahni (COVINA ET 49, Taliansko). Vajcia boli označené, očíslované a rozdelené podľa koncentrácie aplikovaného etanolu (5 %, 10 %, 15 % a 20 %). Na 8. embryonálny deň (24H skupiny) a 7. embryonálny deň (48H skupiny) bola aplikovaná dávka 100 µL etanolu na podškrupinovú membránu (*membrana papyracea*). Odber vzoriek bol vykonaný na 9. embryonálny deň. Odobraté vzorky pečene boli prenesené do mikroskúmavky s fixačným roztokom (Dent´s).

Vzorky embryonálnej pečene boli spracované štandardným postupom pre prípravu histologických preparátov farbených hematoxilín-eozínom o hrúbke rezov 7 µm. Na hodnotenie štruktúry pečeňového parenchýmu u kontrolných a experimentálnych skupín bola použitá PAS reakcia (Periodic Acid–Schiff; Bio-Optika, Miláno, Taliansko), určená na detekciu glykogénu. Rezy sme najskôr hydratovali v destilovanej vode, následne sme aplikovali reagent A na 10 minút, opláchli destilovanou vodou (30 s), potom sme naniesli reagent B na 20 minút a opäť opláchli vodou (30 s). Ďalej nasledovala aplikácia reagentu C na 2 minúty s kvapkaním 15 s, reagentu D na 2 minúty a oplach destilovanou vodou (30 s). Nakoniec sme použili reagent E na 3 minúty a rezy opláchli pod tečúcou vodou počas 5 minút. Farbenie glykogénu bolo vykonané podľa protokolu výrobcu s použitím kyseliny jodičnej a Schiffovho činidla. Mikroskopické vyhodnotenie bolo vykonané pomocou svetelného mikroskopu Olympus CX43 s integrovanou digitálnou kamerou PROMICAM 3-3CP (softvér QuickPHOTO MICRO 3.2, Praha, Česká republika).

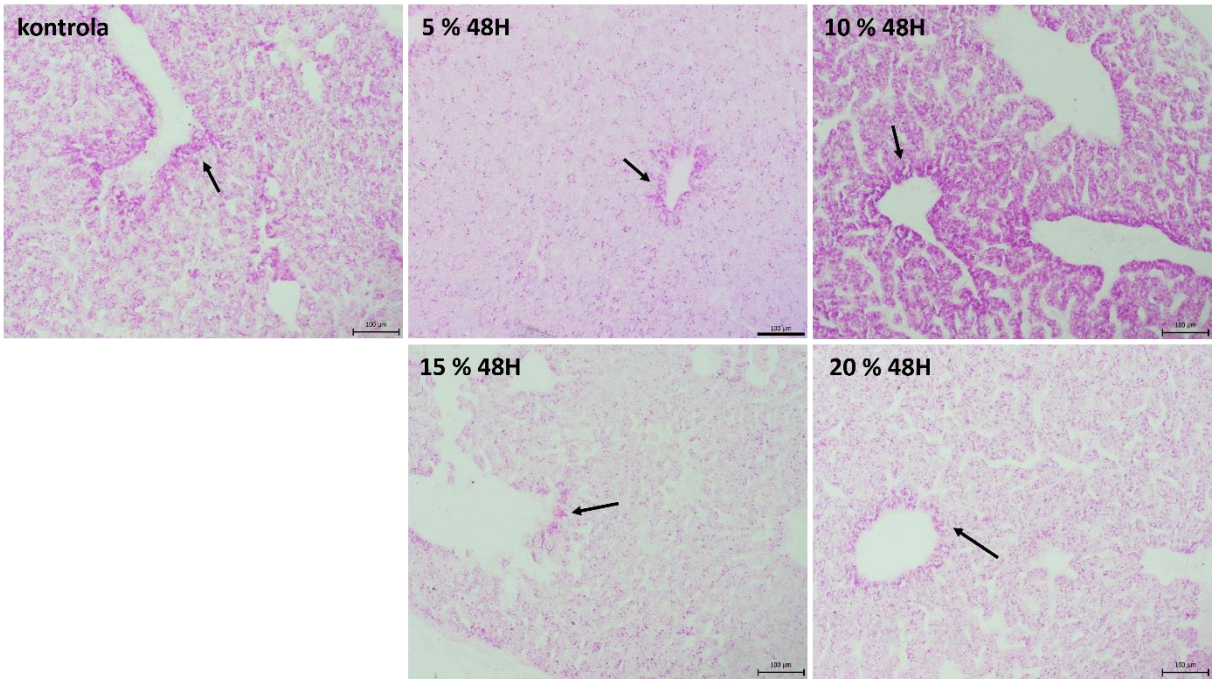
Výsledky

Glukóza predstavuje najdôležitejší zdroj energie pre procesy prebiehajúce vo vyvíjajúcom sa organizme. Ukladá sa v hepatocytoch vo forme glykogénu, ktorý je možné vizualizovať pomocou PAS (Periodic-Acid-Schiff) reakcie [6]. V PAS-pozitívnych bunkách sa glykogén farbí do purpurova.

V kontrolnej skupine boli všetky hepatocyty mierne PAS-pozitívne. Intenzívnejšie sa farbili bunky v okolí *v. centralis*. V experimentálnej skupine 5 % 24H došlo k výraznému zvýšeniu množstva glykogénu, čo sa prejavilo intenzívnym zafarbením celého parenchýmu pečene. Najintenzívnejšie sa farbili hepatocyty v okolí centrálnych žíl. V experimentálnej skupine 10 % 24H bola intenzita zafarbenia glykogénu podobná ako v predchádzajúcej skupine. K výraznému poklesu intenzity farbenia glykogénu došlo v experimentálnej skupine 15 % 24H. V experimentálnej skupine 20 % 24H sa glykogén opäť mierne zvýšil, pričom jeho distribúcia v pečeňovom parenchýme bola rovnaká ako v predchádzajúcich skupinách.



Obrázok 1 Experimentálne 24h skupiny; Na obrázku je zobrazené PAS farbenie 24H skupín a šípkou je označené miesto s najvýraznejším zafarbením v oblasti okolo krvných ciev. Mierka 100 µm



Obrázok 2 Experimentálne 48h skupiny; Na obrázku je zobrazené PAS farbenie 48H skupín a šípkou je označené miesto s najvýraznejším zafarbením v oblasti okolo krvných ciev. Mierka 100 µm

V experimentálnej skupine 5 % 48H bola intenzita farbenia glykogénu mierne zvýšená v porovnaní s kontrolnou skupinou. K ďalšiemu miernemu zvýšeniu glykogénu došlo aj v experimentálnej skupine 10 % 48H. Následne množstvo glykogénu kleslo v experimentálnych skupinách 15 % 48H a 20 % 48H.

Diskusia

Vzhľadom na zdravotné riziká spojené s konzumáciou etanolu sme sa zamerali na skúmanie jeho histologických účinkov na pečeň kuracích embryí. U vtákov sa glykogén ukladá hlavne v pečeni, v prípade potreby sa rozkladá na glukózu a uvoľňuje sa do krvného obehu, aby poskytol telu energiu [7]. Histologické štúdie ukazujú, že akumulácia glykogénu v pečeni sa výrazne líši v závislosti od vývinového štádia a živočíšneho druhu. V prenatálnom období bolo pozorované vyššie množstvo glykogénu v hepatocytoch kuracích embryí v porovnaní s inými modelmi (napr. potkanov), čo poukazuje na významné rozdiely v metabolizme sacharidov počas vývinu pečene [8]. Histologické hodnotenie glykogénu v pečeni, ktoré sme vizualizovali pomocou PAS reakcie, ukázalo v 24H skupinách (5 % 24H a 10 % 24H) zvýšenie glykogénu, najmä v okolí centrálnych vén, zatiaľ čo vyššie koncentrácie (15 % 24H a 20 % 24H) spôsobili jeho pokles alebo len mierny nárast oproti kontrolným skupinám. Po 48H expozícii sme zaznamenali podobný trend, mierne zvýšenie glykogénu pri nižších koncentráciách (10 % 48H) a pokles pri vyšších (15 % 48H a 20 % 48H). Tieto výsledky naznačujú, že krátkodobá expozícia nízkym dávkam etanolu môže stimulovať zásoby glykogénu, zatiaľ čo vyššie dávky viedli k ich redukcii, čo môže odrážať metabolický stres pečene. Literatúra uvádza, že fetálna pečeň cicavcov vykazuje špecifický metabolický profil, kde je glukoneogenéza potlačená a pečeň sa sústredí primárne na akumuláciu glykogénu a lipidov ako energetických rezerv pre postnatálne obdobie [9]. Hoci je metabolizmus vtáčieho embrya v mnohom špecifický (napríklad vysokou závislosťou od žĺtkových lipidov; [10] dynamika zmien v zásobnom glykogéne, ktorú sme pozorovali, naznačuje, že etanol môže zasahovať do týchto základných anabolických procesov spoločných pre vyvíjajúce sa embryá stavovcov. Podobné experimentálne štúdie sa zameriavajú aj na účinky rôznych xenobiotík a toxických látok na metabolizmus glykogénu v pečeni, pričom preukazujú, že hepatotoxické faktory môžu významne ovplyvniť jeho syntézu, akumuláciu aj mobilizáciu, čím dochádza k narušeniu energetickej homeostázy hepatocytov [11].

Záver

Naša práca potvrdila, že expozícia rôznym koncentráciám etanolu významne ovplyvňuje metabolizmus glykogénu v pečeni kuracích embryí, čo sa prejavilo zmenami v intenzite PAS reakcie. Zatiaľ čo nižšie koncentrácie etanolu (5 % a 10 %) viedli k počiatočnej akumulácii glykogénu najmä v okolí centrálnych vén, vyššie dávky (15 % a 20 %) spôsobili jeho následný pokles. Pozorované zmeny naznačujú, že etanol zasahuje do anabolických procesov a energetickej homeostázy vyvíjajúcich sa hepatocytov v závislosti od dávky a času pôsobenia. Výsledky u kuracích embryí korelujú s poznatkami o prenatálnej toxicite alkoholu, ktorá u stavovcov vedie k narušeniu metabolických funkcií a zásobovania energiou. Model kuracieho embrya sa tak opäť ukázal ako efektívny nástroj na sledovanie hepatotoxických účinkov xenobiotík počas kritických fáz embryonálneho vývinu.

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0373/24.

Literatúra

[1] Aldahmash, *J of Society for Development in New Net Environment in B & H*. **2013***,* 7(8): 2445-52.
[2] LeClair, *Virginia Tech Press*, **2022**. ISBN 978-1-949373-84-4.
[3] Wazir, *Annals of Punjab Medical College*. **2024**, 18(2):85-88.
[4] Gursu, *Congenital Anomalies*. **2026**, 66(1):e70047.
[5] Lefkowitch, *Gastroenterology* 85. **1983**, 4:951-957.

[6] Dera, *Cellular and Molecular Biology*. **2025**, 71(11):8-19.
[7] Wang, *Poultry Science*. **2024**, 103(1):103193.
[8] Baycumendur, *Kocatepe Veterinary Journal*. **2022**, 15(1):15-28.
[9] Saini, *Nutrients*. **2022**, 14(5):1096.
[10] De Oliveira, *World's Poultry Science Journal*. **2008**, 64(4):488-499.
[11] Zhu, *Comparative Biochemistry and Physiology Part-C: Toxicology & Pharmacology*. **2023**, 263:109489.

Histologické hodnotenie vaskulárnych zmien indukovaných jedom africkej „pľuvajúcej kobry“ druhu *Naja nigricincta woodi* na modeli kuracej chorioalantoickej membrány

Polláková, M.[1], Dzuro, S.[1], Demčišáková, Z.[2], Krúpa, A.[1], Petrilla, V.[1,3], Petrillová, M.[4], Petrovová, E.[2], Sopková, D.[1], Legáth, J.[5,6]

[1] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice [2] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfologických disciplín, Košice; [3] Zoologické oddelenie, Zoologická záhrada, Široká 31, 040 06 KE-Kavečany, SR; [4] Katedra všeobecných kompetencií, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, SR; [5] Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, SR; [6] Katedra biotechnológie a bioinformatiky, Fakulta chémie, Technická univerzita v Rzeszówe, Powstańców Warszawy 6, 35-959, Rzeszów, Poľsko.
magdalena.pollakova@uvlf.sk

Abstract

The present study provides the first detailed histological analysis of vascular and tissue alterations induced by the venom of the African „spitting cobra“ *Naja nigricincta woodi* in the chicken chorioallantoic membrane (CAM) model. Venoms of „spitting cobras“ are capable of causing severe local tissue damage and ocular injury following contact with the ocular surface. The aim of this pilot study was to investigate and characterize the vasoactive and haemotoxic effects of native *N. nigricincta woodi* venom, and to further clarify the mechanism underlying venom-induced vascular injury. Application of 5 µl native venom onto CAM vasculature induced rapid hyperaemia and vasodilatation, followed by a progressive loss of erythrocytes from the vascular lumen, ultimately resulting in translucent “ghost vessels.” Diffuse haemorrhagic changes and haemocoagulation were also observed. Histological examination confirmed endothelial damage, increased vascular permeability, tissue degeneration, and erythrocyte extravasation. The calculated cumulative score (14.75) indicates a strong irritant potential according to the Luepke grading system. These findings demonstrate the presence of venom components affecting vascular integrity and haemostasis. Photos obtained during the HET-CAM test document a unique mechanism of vascular injury characteristic for „spitting cobra“ venoms. As native venom was used, the observed effects likely reflect pathophysiological processes occurring during envenomation and may contribute to the development of snake venom ophthalmia in the affected eye.

Keywords: Naja, African „spitting cobras“, vasoactivity, haemotoxicity, chorioallantoic membrane

Úvod

„Pľuvajúce kobry“ rodu *Naja*, predstavujú jedinečnú skupinu jedovatých hadov s charakteristickou schopnosťou aktívne vypudzovať jed z jedových zubov, smerujúc na oblasť tváre a oči potenciálneho predátora. Po kontakte s povrchom oka spôsobuje jed týchto hadov výrazné lokálne poškodenie sprevádzané bolesťou, zápalovou reakciou a narušením integrity rohovky, pričom v závažných prípadoch môže dôjsť až k trvalému poškodeniu zraku [1].

Naša experimentálna štúdia nadväzuje na predošlý výskum zameraný na sledovanie vazoaktívnych a hemotoxických účinkov jedov afrických a ázijských druhov „pľuvajúcich kobier“. Po aplikácii na cievy chorioalantoickej membrány vykazovali tieto jedy veľmi špecifický účinok, charakterizovaný prvotnou výraznou hyperémiou ciev, po ktorej následne dochádzalo k ich postupnému odkrveniu a vybieleniu [1]. Rozhodli sme sa preto preskúmať účinky jedu ďalšej „pľuvajúcej kobry“ druhu *Naja nigricincta woodi* a doplniť experiment o podrobnejšiu histologickú analýzu, ktorá by umožnila detailnejšie zhodnotenie pozorovaných zmien. Hadie jedy predstavujú významný zdroj biologicky aktívnych molekúl s potenciálnym farmakologickým a terapeutickým využitím, preto je detailná analýza ich účinkov a mechanizmov pôsobenia nevyhnutná pre ďalší biomedicínsky výskum.

Materiál a metodika

Pre potreby experimentálneho výskumu bol použitý model kuracej chorioalantoickej membrány (CAM) (*Gallus gallus domesticus*, Lohmann Brown). Oplodnené vajcia z certifikovaného chovu (Párovské Háje, Nitra, Slovensko) boli 240 hodín inkubované (ET 49, ART 549) za štandardných podmienok (37,5 °C, relatívna vlhkosť 60 %; automatické otáčanie), pričom deň začiatku inkubácie je označený ako 0. embryonálny deň (0. ED). Na 3. ED boli z každého vajca asepticky odobraté 2 ml bielka a inkubácia ďalej pokračovala pri nezmenených podmienkach. Zmrazený natívny jed pripravený zmiešaním vzoriek od viacerých jedincov druhu *Naja nigricincta woodi* pochádzal z chovného zariadenia spoločnosti VIPERAFARM (zmluva o spolupráci č. 241/2017/UVLF). Samotné testovanie prebiehalo na 9. ED, kedy bolo na odhalené cievy štyroch samostatných CAM aplikovaných 5 µl rozmrazeného natívneho jedu. V kontrolnej skupine bolo namiesto jedu aplikovaných 5 µl *aqua pro injectione*. V okamihu aplikácie začína plynúť päťminútový hodnotiaci interval, počas ktorého prebieha kontinuálne sledovanie a fotografická dokumentácia (Olympus SZ61; Quick Photo Micro) vaskulárnych reakcií (hyperémia, hemorágia, hemokoagulácia) na CAM. Pozorované účinky boli následne vyhodnotené pomocou bodovacieho systému podľa Luepkeho, na základe čoho bolo vypočítané kumulatívne skóre a stanovený iritačný potenciál testovaného jedu [2].

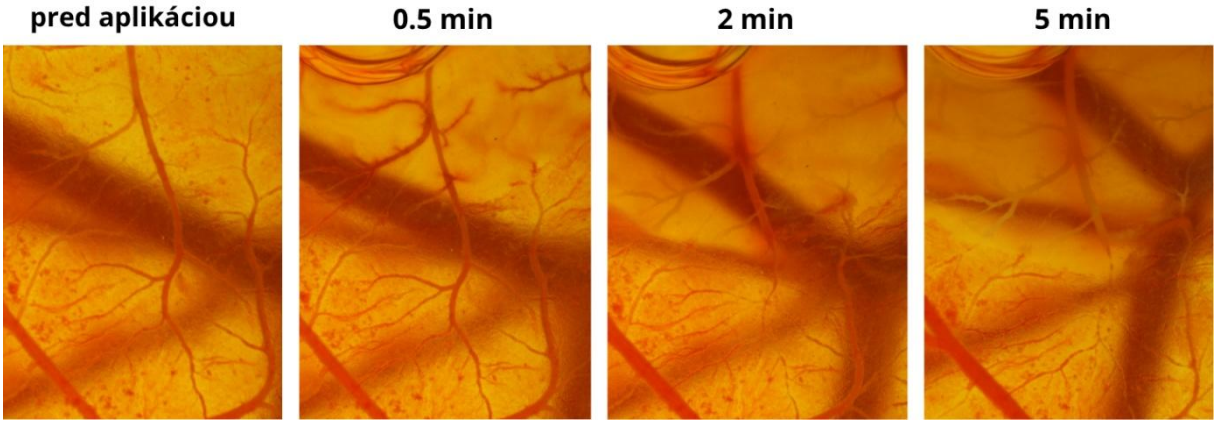
Vzorky CAM s najvýraznejšími vaskulárnymi zmenami, ako aj vzorky z kontrolnej skupiny, boli ďalej spracované na histologickú analýzu za účelom detailného posúdenia jedom indukovaných patologických zmien. Tkanivá boli fixované v Dentsovom roztoku, zaliate do parafínu a krájané na 7 µm rezy pomocou mikrotómu. Preparáty boli farbené hematoxylínom a eozínom (H&E), montované do trvalého média a analyzované svetelným mikroskopom Olympus CX43 vybaveným digitálnou kamerou PROMICAM 3-5CP+ [3].

Výsledky

Po aplikácii sa jed postupne šíril po CAM a v okolí miesta dopadu kvapky jedu vznikala zreteľná kruhovitá zóna odlišného sfarbenia, pričom na rozhraní medzi jedom zasiahnutou a jedom nezasiahnutou časťou membrány bolo možné pozorovať jemnú hemoragickú líniu a miestami drobné krvné zrazeniny.

V prvých 30 sekundách po aplikácii sme v mieste kontaktu CAM s jedom pozorovali

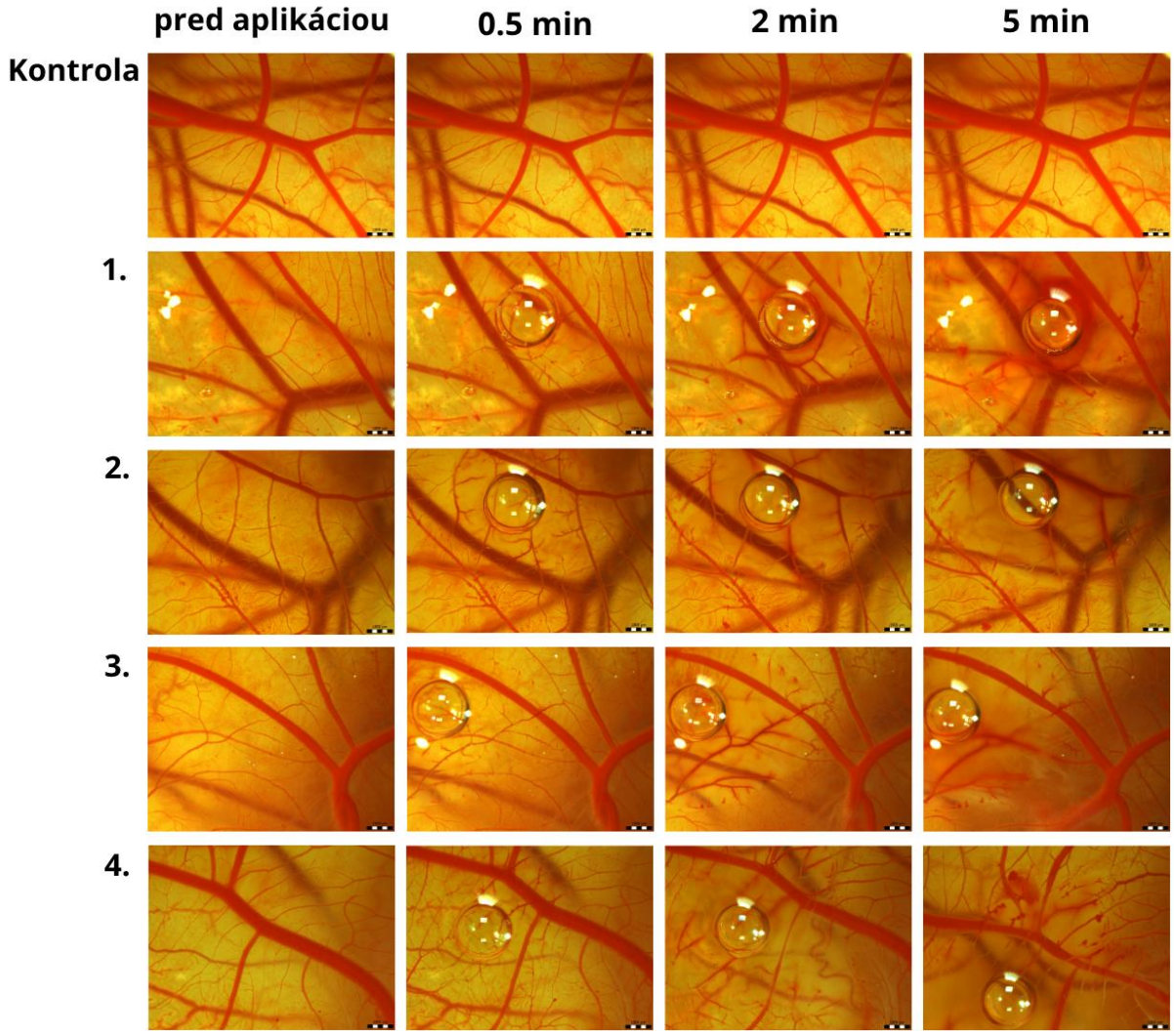
vznik výraznej hyperémie, najmä menších ciev. V tesnom okolí koncového vetvenia drobných kapilár a menších ciev vznikali červeno sfarbené oblasti s difúznym charakterom, pravdepodobne v dôsledku začínajúceho krvácania. Tento obraz naznačuje narušenie integrity cievnej steny s následným únikom erytrocytov. Červené sfarbenie v bezprostrednej blízkosti cievy pôsobí ako fokálna oblasť hemoragickej infiltrácie asociovanej s lokálnym vaskulárnym poškodením.
V druhej minúte po aplikácii pretrváva hyperémia a vazodilatácia jedom zasiahnutých ciev, avšak v niektorých úsekoch týchto ciev nastala viditeľná vazokonstrikcia. Kapiláry a menšie cievy, okolo ktorých boli predtým pozorované difúzne červeno sfarbené oblasti sú už bezfarebné až biele, pravdepodobne v dôsledku absencie erytrocytov v daných častiach ciev. Na základe vizuálneho hodnotenia predpokladáme, že k tomuto javu dochádza pravdepodobne kvôli ruptúre ciev alebo zvýšenej permeabilite cievnych stien. Tento jav prvotného difúzneho sfarbenia okolia ciev a následnej úplnej straty sfarbenia a vybielenia týchto ciev postupuje od najdrobnejších kapilárnych zakončení, cez menšie bočné vetvenia až smerom k väčším cievam, čo možno v niektorých častiach pozorovať ako farebný gradient pozdĺž cievy, od najsvetlejších vybielených koncových častí až po hyperemické prekrvenie najväčších ciev (Obr. 1). Na 2 zo 4 CAM bol pozorovaný vznik krvných zrazenín už počas prvých dvoch minút od aplikácie jedu.



Obrázok 1 Detailný záber cievy, na ktorej pozorujeme postupné vymiznutie erytrocytov z lúmenu v priebehu 5 minútového hodnotiaceho intervalu, po aplikácii 5 µl jedu hada druhu *Naja nigricincta woodi*

Po 5 minútach od aplikácie bolo možné pozorovať výrazné vymiznutie ciev v oblasti aplikácie jedu. Cievy, v okolí ktorých bolo predtým pozorované difúzne červené sfarbenie boli „vyprázdnené“ a priesvitné, zatiaľ čo difúzne červené sfarbenie ďalej postupovalo a objavilo sa v okolí najväčších a najhrubších ciev, na ktorých bola v predošlých minútach pozorovaná iba hyperémia a vazodilatácia.
Na všetkých štyroch testovaných CAM bol teda pozorovaný ten istý fenomén – v mieste aplikácie jedu vznikla okamžitá hyperemická reakcia jedom zasiahnutých ciev a v okolí týchto hyperemických ciev sa postupne objavovalo difúzne červené sfarbenie nasledované vymiznutím krvi z cievneho lúmenu, pričom tieto cievy nadobudli priesvitný vzhľad. „Vybielenie“ ciev malo postupný, plynulý a progresívny charakter z čoho predpokladáme, že ak by test prebiehal dlhšie než 5 minút, oblasť poškodenia by sa ďalej rozšírila a postupne by sa odkrvili a vymizli aj ďalšie cievy.

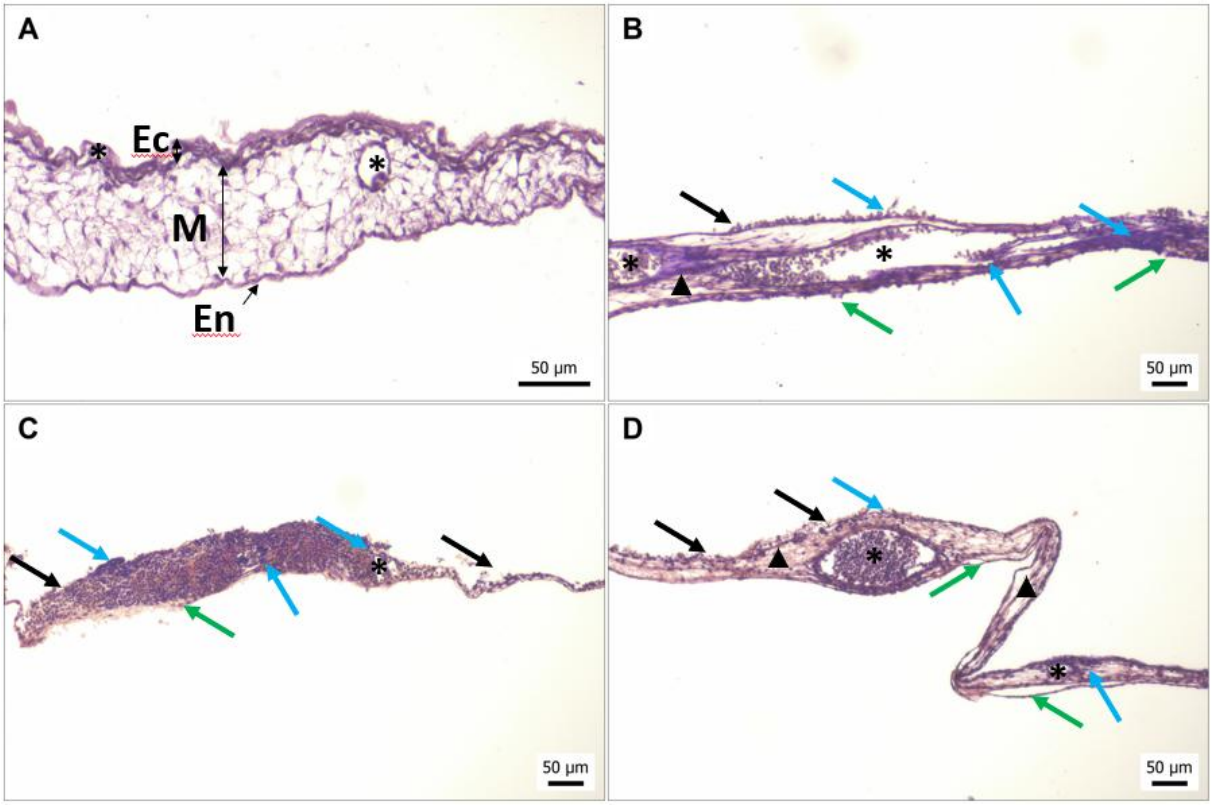
Podľa Luepkeho hodnotiaceho systému bolo pozorovaným reakciám priradené bodové hodnotenie a z neho vypočítané kumulatívne skóre 14.75. Táto hodnota spadá do rozsahu pre silný iritačný potenciál (9.0 - 21.0) t. j. výsledný iritačný potenciál pre dávku jedu hada druhu *N. nigricincta woodi* 5 µl bol vyhodnotený ako silný.



Obrázok 2 Mikroskopické zmeny na CAM pozorované po aplikácii 5 µl natívneho jedu hada druhu *Naja nigricincta woodi* (1.-4.) v porovnaní s kontrolou; mierka: 1 mm

V porovnaní s kontrolnou skupinou (Obr. 3A), v ktorej bola zachovaná fyziologická architektúra CAM bez degeneratívnych alebo hemoragických zmien, experimentálne vzorky exponované hadiemu jedu (Obr. 3B-D) vykazovali výrazné štrukturálne alterácie postihujúce všetky vrstvy CAM. Ektodermálna vrstva bola miestami výrazne poškodená až fokálne absentovala, pričom v zachovaných oblastiach bola prítomná výrazná hemorágia. Subektodermálne kapiláry vykazovali degeneratívne zmeny endotelu, porušenie integrity cievnej steny a zvýšenú vaskulárnu permeabilitu s výraznou extravazáciou erytrocytov. Mezoderm bol charakterizovaný stromálnou rarefakciou, stratou vláknitých komponentov a prítomnosťou početných dutín, reflektujúcich deštrukciu mezenchymálneho stromatu. Endodermálna vrstva bola

diskontinuálna a fokálne separovaná od mezodermu. Súčasne bola prítomná difúzna hemorágia a lokálna infiltrácia zápalovými bunkami. Morfologické zmeny korelujú s výrazným cytotoxickým účinkom hadieho jedu, manifestovaným vaskulárnym poškodením, hemorágiou a deštrukciou architektúry CAM.



Obrázok 3 Histologická analýza chorioalantoickej membrány po expozícii jedu hada druhu Naja nigricincta woodi: kontrolná vzorka (A) a experimentálne vzorky (B–D). Farbenie hematoxylín-eozín (H&E), mierka 50 µm; Ec – ektoderm; M – mezoderm; En – endoderm; * – krvné cievy; ↓ – deštrukcia ektodermu; ↓ – hemoragické zmeny s extravazáciou erytrocytov a poškodením cievnej steny; ↓ – poškodenie a separácia endodermu; ▲ – redukcia mezenchymálneho spojivového tkaniva

Diskusia

Historicky boli všetky africké „pľuvajúce kobry“ považované za jeden druh *Naja nigricollis*. Druh *Naja nigricincta woodi* bol dlho pokladaný za poddruh *Naja nigricollis* a až neskoršie analýzy viedli k postupnému vyčleneniu viacerých samostatných taxónov, vrátane *Naja nigricincta woodi* a *Naja ashei*. Fylogenetické štúdie zároveň poukázali na to, že pôvodne širšie chápaný druh *N. nigricollis* predstavoval polyfyletickú skupinu a druh *N. nigricincta woodi* vykazuje bližšiu evolučnú príbuznosť k druhom *N. ashei* a *N. mossambica* než k druhu *N. nigricollis* [4].

Naša predchádzajúca štúdia bola zameraná na sledovanie embryotoxických, vazotoxických a hemotoxických účinkov jedov afrických druhov „pľuvajúcich kobier“ *N. nigricollis* a *N. ashei*. Testy s využitím modelu kuracieho embrya a kuracej CAM poukázali na vysokú embryonálnu mortalitu po aplikácii jedu hadov druhu *N. nigricollis* a výrazný iritačný efekt na cievach CAM po aplikácii oboch jedov *N. nigricollis* a *N. ashei* [1].

Vzhľadom na naše predchádzajúce skúsenosti a skutočnosť, že pôvodný druh

N. nigricollis prešiel v priebehu rokov viacerými taxonomickými zmenami, sme sa rozhodli pokračovať s testovaním ďalších jedov tejto skupiny afrických „pľuvajúcich kobier“. V nadväznosti na predchádzajúcu prácu sme náš výskum rozšírili o ďalší príbuzný taxón *N. nigricincta woodi*, pričom sme našu mikroskopickú analýzu doplnili histologickým hodnotením jedom poškodeného tkaniva. Účinok jedov „pľuvajúcich kobier“ sa v našich pozorovaniach ukázal ako komplexný a v kontexte hadích jedov do určitej miery unikátny vzhľadom na charakter sledovaných vaskulárnych zmien. Opakovane sme zdokumentovali fenomén postupného „vyprázdňovania“ ciev, sprevádzaný ich vyblednutím a stratou viditeľnej perfúzie. Tento jav sme zatiaľ nezaznamenali pri žiadnej inej skupine hadích jedov. Histologicky sme pozorovali sploštenie a stenčenie CAM sprevádzané degeneratívnymi zmenami endotelu a známkami zvýšenej vaskulárnej permeability. Tieto alterácie v mikrocirkulácii sú pravdepodobne spojené s poruchou perfúzie a kolapsom ciev. Možno tak predpokladať, že práve v dôsledku týchto zmien dochádza k vzniku odkrvených tzv. „ghost vessels“, ktoré predstavujú cievy so zachovanou štruktúrou, avšak bez prítomnosti erytrocytov v lúmene.

Limitáciou Luepkeho metodiky je, že tento bodovací systém hodnotí prítomnosť hyperémie, hemorágií a hemokoagulácie v závislosti od času ich nástupu po aplikácii jedu. Naše výsledky naznačujú, že tieto prejavy môžu byť dynamické a reverzibilné, pričom po počiatočnej hyperémii ciev môže následne dôjsť k jej ústupu a prechodu do stavu zníženej krvnej perfúzie ciev („ghost vessels“). Súčasne sa pozorované hemorágie javia prevažne ako mierne a difúzne, čo však neumožňuje ich jednoznačnú bodovú odlíšiteľnosť v rámci Luepkeho hodnotenia od výraznejších krvácavých prejavov pozorovaných pri iných typoch hadích jedov. Vzhľadom na tieto zistenia sme sa rozhodli rozšíriť metodický prístup aj o histologickú analýzu jedom poškodených CAM, z ktorých boli odobrané vzorky tkaniva na záver 5 minútového hodnotiaceho intervalu po aplikácii jedu. Cieľom bolo detailnejšie charakterizovať a ozrejmiť patologické zmeny na cievach vyvolané pôsobením jedu hadov druhu *N. nigricincta woodi*. Predpokladáme, že pozorované účinky sú súčasťou komplexného pôsobenia hadieho jedu, ktoré je výsledkom interakcie viacerých molekulových komponentov s rôznymi cieľovými štruktúrami cievnej steny a okolitých tkanív. Histologická analýza potvrdila poškodenie cievnych štruktúr sprevádzané hemorágiou, čo potvrdzuje správnosť nášho hodnotenia a stanoveného kumulatívneho skóre, keďže krvácavé prejavy neboli počas samotného testu dostatočne opticky výrazné na jednoznačné posúdenie rozsahu vaskulárneho poškodenia.

Pre potreby výskumu bol použitý natívny jed, ktorý prešiel iba procesom zmrazenia a následného rozmrazenia, preto predpokladáme, že účinky pozorované na cievach CAM spoľahlivo reflektujú biologickú aktivitu jedu v envenomovanom organizme. Vzhľadom na špecifickú schopnosť „pľuvajúcich kobier“ cielene vypudzovať jed smerom na oči predátora, získané výsledky prispievajú k detailnejšiemu pochopeniu mechanizmu účinku jedu v zasiahnutom oku. Kuracia CAM predstavuje jedinú organotypickú kultivačnú metódu, ktorá priamo modeluje konjunktiválne účinky a ide tak o jedinečný systém napodobňujúci spojivku oka, ktorý poskytuje informácie o prebiehajúcich vaskulárnych dejoch [5]. Takýto prístup prináša eticky prijateľnú alternatívu k tradičnému Draizeho očnému testu na králikoch a umožňuje detailné

hodnotenie okulotoxického účinku hadích jedov. Z hľadiska medicínskej praxe by bolo vhodné otestovať aj biologickú aktivitu jedu po neutralizácii špecifickým protijedom, s cieľom overiť účinnosť jeho inhibície.

Záver

Testovaný jed hadov druhu *Naja nigricincta woodi* vyvolal patologické zmeny ciev podobného charakteru ako jedy ostatných afrických „pľuvajúcich kobier“ v našich predchádzajúcich experimentoch. Histologická analýza potvrdila poškodenie cievnych štruktúr sprevádzané hemorágiou, čo potvrdzuje správnosť nášho hodnotenia a stanoveného kumulatívneho skóre. Získané výsledky dokazujú, že v testovanom jede sú prítomné zložky s účinkom na cievy a hemostázu. V ďalšej fáze výskumu bude táto pilotná štúdia doplnená testom embryotoxicity, ktorý umožní sledovať vplyv jedu hadov druhu *N. nigricincta woodi* na embryonálnu mortalitu a vybrané orgánové sústavy. Súčasne je potrebné vykonať komplexnú proteomickú analýzu jedu, izoláciu jednotlivých frakcií a následne testovať ich samostatné aj kombinované účinky s cieľom identifikovať zložky zodpovedné za pozorované vaskulárne zmeny. Identifikácia bioaktívnych látok s účinkom na cievny systém môže v budúcnosti predstavovať významný základ pre vývoj nových terapeutických prístupov a farmakologicky využiteľných molekúl.

Výskum bol realizovaný ako súčasť grantových úloh APVV-22- 0101, VEGA 1/0074/24 a VEGA 1/0373/24 riešených na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

Literatúra

[1] Polláková, *Toxicon*. **2021**, 189:79-90.
[2] Knight, *Toxicon*. **2019**, 158:69-76.
[3] Demčišáková, *Cancers (Basel).* **2022**, 14(17):4194.
[4] Wüster, *Mol. Phylogenet. Evol*. **2007**, 45(2):437-453.
[5] De Araujo Lowndes Viera, *Toxicol. In Vitro*. **2022**, 78:105255.

Analysis of the genotoxic and cytotoxic effect of a mixture of miconazole-nitrate and acetamiprid in bovine lymphocytes *in vitro* after prolonged exposure

Schwarzbacherová, V.[1,2], Fromenteau, R.[1], Halušková, J.[1], Galdíková, M.[1]

[1] University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Department of biology and physiology, Košice; [2] University of Rzeszow, Collegium Medicum, Faculty of Biotechnology, Rzeszow, Poland
viera.schwarzbacherova@uvlf.sk

Abstract

The aim of our work was to evaluate the genotoxic and cytotoxic effect of combined exposure to miconazole-nitrate and acetamiprid for 48 h in bovine lymphocytes *in vitro*. Neonicotinoid insecticide acetamiprid is often used against sucking-type insecticide on fruit and vegetables. Its mode of action is inhibition acetylcholinesterase causing overexcitation in the nervous system and death. Miconazole nitrate in common azole antifungal drug used in veterinary medicine. It acts as an inhibitor of ergosterol synthesis and reactive oxygen species inductor. To assess this effects, micronucleus (MN) test, cytokinesis-block proliferation index (CBPI) and TUNEL assay were done on cells exposed at concentrations ranging from 0,625 to 25 µg. mL^{-1} on two patients. The results showed a dose-dependent increase in formation of micronucleus and subsequently DNA fragmentation visible by TUNEL assay, linked with a decrease in CBPI meaning decrease cell proliferation and increase cytotoxic effect. These results suggest that the mixture induce dose-dependent genotoxic and cytotoxic effect on bovine lymphocytes and encourages continued efforts on toxicological experiments in the future.

Keywords: acetamiprid, apoptosis, genotoxicity, miconazole-nitrate

Introduction

The use of pesticides has risen sharply over recent decades. There are widely used in agriculture to protect crops from a variety of pests, including insects, fungi, and other harmful organisms, while also contributing to increased agricultural productivity [1]. In addition to their agricultural applications, certain pesticides are also used in veterinary and human medicine for the prevention or treatment of specific diseases.

The intensive use of pesticides in recent years has prompted scientists to study the effects these various compounds may have on the environment, non-target species and, consequently, biodiversity, as well as on human and animal health [2]. Animals and humans are chronically exposed to pesticide residues, particularly through food consumption, contaminated water or environmental conditions [3].

Neonicotinoids is one of the most use class of insecticides worldwide due to their high efficacy and systemic mode of action [4]. They have an agonist effect on insect nicotinic acetyl-choline receptors (nAChRs) and act likes acetylcholine on the synapse without the degradation by anticholinesterase inducing an overexcitability of the central nervous system of the insect and leading to death [5]. Acetamiprid is the latest neonicotinoids authorized in European market. Another commonly used compound is the fungicide of azole family such as miconazole nitrate mainly used in agricultural but

also in human and veterinary medicine. They exert their primary activity through inhibition of the fungal cytochrome P450-dependent enzyme lanosterol 14α-demethylase (CYP51), a key enzyme in the ergosterol biosynthetic pathway [6].
Their effects alone are documented but not studied as a combination as it is possible to find in the environment due to their bioaccumulation. The aim of this study is to evaluate the potential cytotoxic and genotoxic effect of a mixture of miconazole-nitrate and acetamiprid on bovine peripheral lymphocytes in *in vitro* conditions after prolonged exposure using the detection of micronuclei, apoptotic changes and cell proliferation changes.

Material and methods

Peripheral bloods from two healthy calves (patients) were collected and lymphocytes were extracted, cultured and exposed during 48h with different concentrations of the mixture of Mospilan® 20SP and miconazole nitrate (0.625; 1.25; 2.5; 5; 12.5; and 25 µg. mL^{-1}) and a control condition with DMSO [7]. The genotoxicity effect was studied with a cytokinesis-block micronucleus (CBMN) test assessed to determine the number of micronuclei in binucleated cells, sign of chromosomal damage [8]. The cytotoxicity effect is also studied with the same experiment by using the cytokinesis-block proliferation index (CBPI) determining the cell proliferation following the different mixture concentrations. DNA fragmentation was assessed using the TUNEL assay, which detects DNA strand breaks associated with programmed cell death [7]. Statistical analysis was performed to determine the significance of observed differences between control and treated groups. The results present as follow: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Results

Micronuclei induction in bovine lymphocytes after prolonged (48 h) exposure is shown in Figure 1.

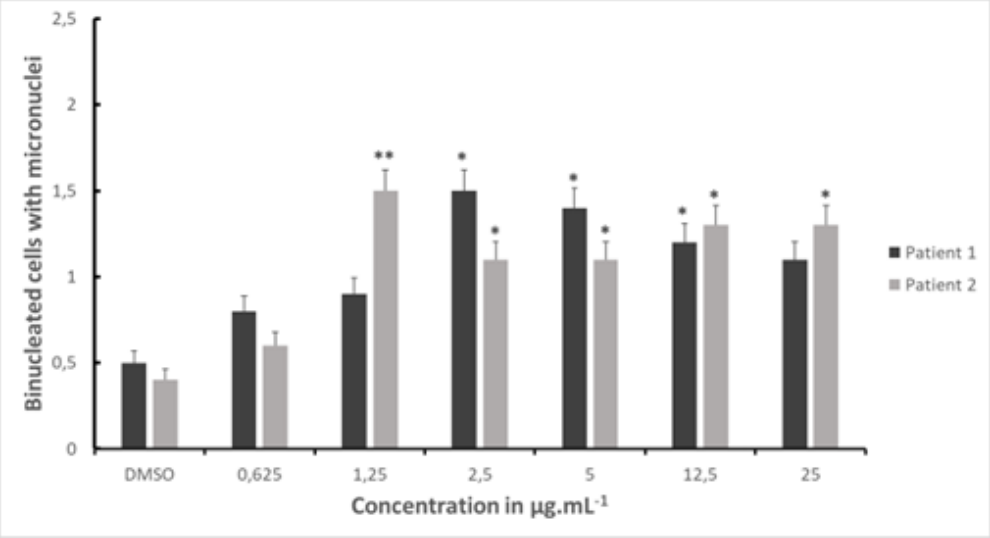


Figure 1 Micronuclei induction after acetamiprid and miconazole-nitrate exposure for 48 h

In patient 1, we observed statistically significant increase in MN induction at concentrations of 2.5 - 12.5 µg. mL^{-1} ($p < 0.05$). At the highest tested concentration, we also observed an increase in MN induction without significance probably due to higher cytotoxic effect tested chemicals. In patient 2, we found out statistically significant increase in micronuclei production for the concentration 1.25 µg. mL^{-1} ($p < 0.01$) to 25 µg. mL^{-1} ($p < 0.05$) (Fig. 1).
For CBPI analysis, we observed statistically significant dose-dependent decrease of CBPI value in all the concentrations tested from the lowest concentration; for patient 1 ($p < 0.05$) and for patient 2 ($p < 0.01$) (Fig. 2).

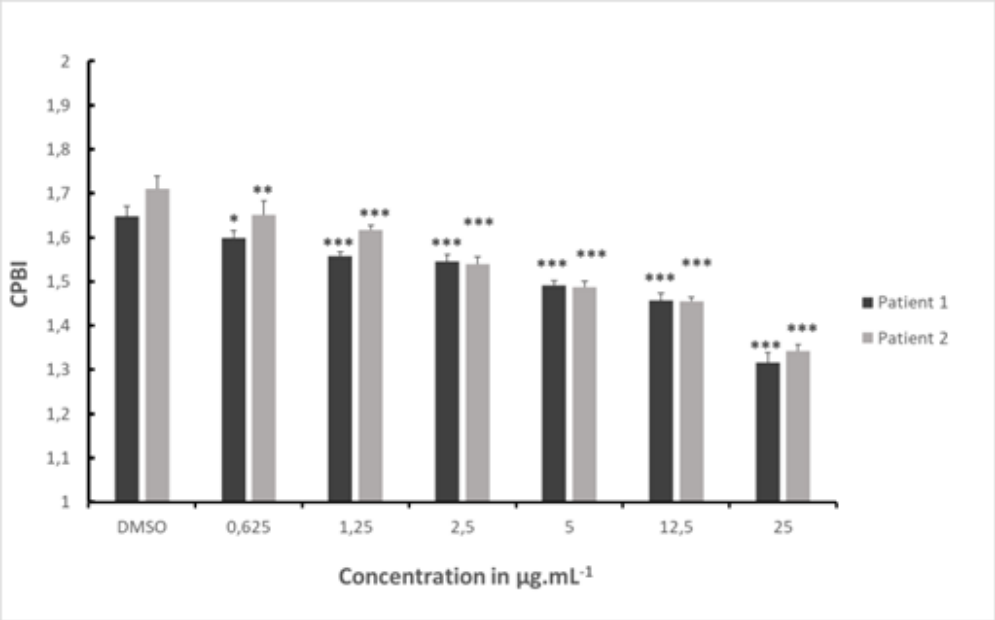


Figure 2 Changes in CBPI index after induction after acetamiprid and miconazole-nitrate exposure for 48 h

In patient 1, we observed a statistically increase of TUNEL positive cells at 5 µg. mL^{-1} ($p < 0.05$), 12,5 µg. mL^{-1} ($p < 0.01$) and at the highest concentration 25 µg. mL^{-1} ($p < 0.001$). At lower concentrations (0,625 µg. mL^{-1} to 2,5 µg. mL^{-1}), the increase of positive cells was observed, but without statistical significance. For the patient 2, we saw also a statistically increase of positive cells between 2,5 µg. mL^{-1} ($p < 0.01$) to 25 µg. mL^{-1} ($p < 0.001$). Same than the first patient, at lower concentrations 0,625 and 1,25 µg. mL^{-1}, the increase is present but with no statistical significance (Fig. 3).

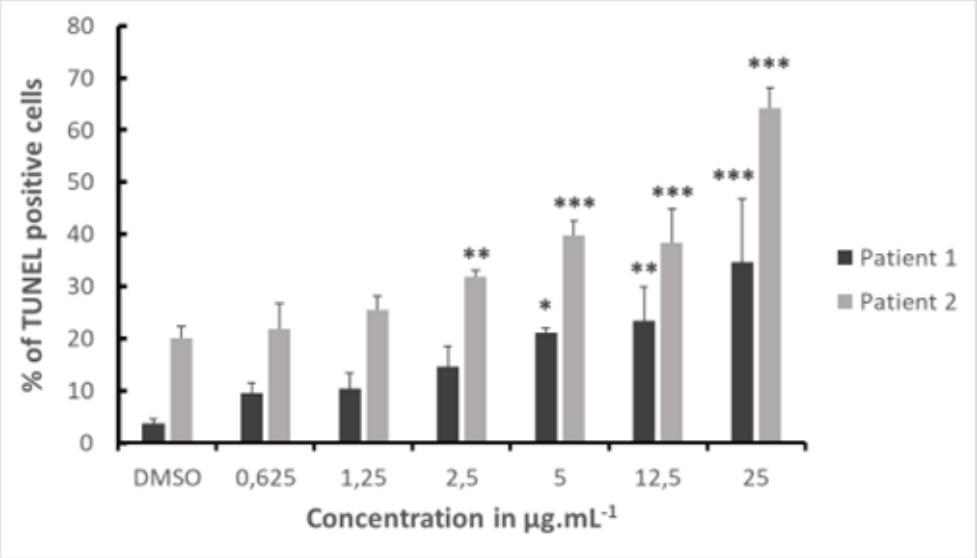


Figure 3 Detection of apoptotic-like changes (DNA fragmentation) after acetamiprid and miconazole-nitrate exposure for 48h

Discussion

The present study demonstrates that the combination of miconazole and acetamiprid induces significant genotoxic and cytotoxic effects in bovine lymphocytes. Our results for the CBMN assay show a dose-dependent genotoxic effect of this mixture by an increase in visible chromosomal damage for both patients. However, the CPBI shown also a dose-dependent cytotoxic effect for both patients. Additionally, the elevated level of DNA fragmentation observed in the TUNEL assay suggests activation of apoptosis as a response to DNA damage. These findings are consistent with previous studies reporting genotoxic effects of neonicotinoids [9,10], and azole compounds individually [7]. However, the present results highlight the potential for enhanced toxicity when these compounds are combined. The importance of the combined action of chemical substances is also indicated by experimental studies, which demonstrated higher genotoxicity and cytotoxicity of pesticide mixtures compared to individual substances, which suggests a possible synergistic effect [11]. This study supports the need for further research on mixture toxicity and its implications for animal and human health.

Conclusion

Through a series of experiments, including the MN test, the proliferation index CBPI, and the TUNEL assay, our results clearly demonstrated a dose-dependent genotoxic and cytotoxic effect induced by this mixture at concentrations ranging from 2.5 µg. mL^{-1} to 25 µg. mL^{-1} on bovine lymphocytes *in vitro*. These complementary assays demonstrate that the tested mixture induces chromosomal damage and impairs cell proliferation, likely through mechanisms involving apoptosis and/or oxidative stress in lymphocytes. Finally, this work highlights the need to further investigate the toxicity of pesticide mixtures commonly used in agriculture or medicine and is particularly important given that real life exposure often involves complex mixtures rather than single compounds.

The work was supported by the project VEGA no. 1/0240/25.

References
[1] Tudi, *Internat J Environ Res Public Health*. **2021**,18(3):1112.
[2] Bonmatin, *Environ Sci Pol Res*. **2015**, 22(1):35-67.
[3] Zhang, *Environ Res*. **2023**, 218:114953.
[4] Jeschke, *J Agricul Food Chem*. **2010**, 59(7):2897-2908.
[5] Ihara– Matsuda, *Curr Opin Insect Sci*. **2018**, 30:86-92.
[6] Georgopapadakou, *Curr Opin Microbiol*. **1998**, 1(5):547-557.
[7] Schwarzbacherová, *Environ Poll*. **2017**, 220:255-263.
[8] Fenech, *Nature Prot*. **2007**, 2(5):1084-1104.
[9] Kocaman – Topaktaş, *Environ Mol Mutagen*. **2007**, 48(6):483-490.
[10] Bagri – Jain, *Drug Chem Toxicol*. **2019**, 42(4):357-363.
[11] Kocaman, *Environ Toxicol*. **2009**, 24(4):389-395.

Morfologické a degeneratívne zmeny epitelu *ventrikula* u *Apis mellifera* spôsobené infekciou *Nosema* spp.

Szabó, I.[1], Demčišáková, Z.[4], Sabo, R.[2], Staroň, M.[3], Sabová L.[2], Sučik, M.[1]

[1] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice; [2] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra farmakológie a toxikológie, Košice; [3] Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum (NPPC), Odbor živočíšnej výroby, Divízia včelárstva, Liptovský Hrádok, Slovensko; [4] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfologických disciplín, Košice
imrich.szabo@student.uvlf.sk

Abstract

The ventriculus of the honey bee (*Apis mellifera*) represents the main site of digestion and absorption of nutrients, while the integrity of its epithelium is essential for the proper function of the digestive tract. The aim of the work was to evaluate morphological and degenerative changes in the ventriculus epithelium in healthy and pathologically altered honey bee individuals. Histological sections were examined by light microscopy after staining with hematoxylin-eosin. In healthy individuals, the normal architecture of the columnar epithelium was preserved with a compact arrangement of cells and an intact apical surface. Pathologically altered samples showed epithelial disorganisation, vacuolization of the cytoplasm, cell degeneration and disruption of the continuity of the epithelial layer. In some areas, intracellular accumulation of microsporidial stages and desquamation of cells into the lumen were observed. The results point to the importance of the integrity of the ventricular epithelium for maintaining the physiological function of the digestive tract and confirm that degenerative changes in the epithelium can significantly affect the metabolic state of the bee.

Keywords: *Apis mellifera*, ventriculus, histology, degeneration, *Nosema* spp.

Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patrí medzi významné modelové organizmy využívané pri štúdiu ochorení tráviaceho traktu. Infekcia mikrosporídiami rodu *Nosema* spp. spôsobuje výrazné morfologické a funkčné zmeny čreva, predovšetkým v oblasti stredného čreva (ventrikulus). Histologické pozorovania poukazujú najmä na intracelulárnu proliferáciu parazita v epitelových bunkách, sprevádzanú degeneráciou buniek a narušením štruktúry epitelovej vrstvy [1,2].

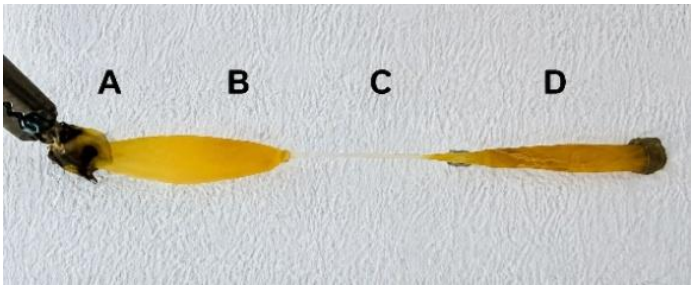
Ventrikulus včely medonosnej je histologicky tvorený tromi základnými vrstvami: svalovou vrstvou, sliznicou a peritrofickou membránou [3]. Vonkajšiu časť tvoria vrstvy priečne pruhovaného svalstva usporiadané v pozdĺžnom, šikmom a prstencovom smere. Sliznica pozostáva z jednoduchého kubického až cylindrického epitelu, v ktorom sa nachádzajú sekrečné, regeneračné, pohárikovité a neuroendokrinné bunky [4]. Regeneračné bunky sú uložené bazálne a predstavujú populáciu kmeňových buniek zabezpečujúcich obnovu epitelu. Peritrofická membrána, tvorená chitínom a proteínmi, vytvára ochrannú bariéru okolo tráveného obsahu čreva. Pri infekcii mikrosporidiami rodu *Nosema* spp. dochádza k výrazným degeneratívnym zmenám

epitelu ventrikula. Infikované bunky sú zväčšené v dôsledku intracelulárneho edému a akumulácie početných spór [3]. Postupná degenerácia a nepravidelná deskvamácia sekrečných buniek spôsobujú narušenie kontinuity črevnej steny. V bunkách sa môžu objavovať aj známky nekrózy, napríklad hyperchromatické alebo pyknotické jadrá. Znížená sekrečná aktivita vedie k redukcii alebo strate peritrofickej membrány, čo negatívne ovplyvňuje trávenie a absorpciu živín [3,5]. V dôsledku týchto zmien dochádza k oslabeniu metabolizmu a energetickému deficitu včely. Histologické vyšetrenie umožňuje detailné hodnotenie architektúry epitelu, lokalizácie degeneratívnych zmien a rozsahu poškodenia tkaniva. V porovnaní s rutinnými diagnostickými metódami poskytuje presnejšie informácie o morfologickom stave ventrikula a jeho funkčnej integrite. Cieľom práce bolo porovnať morfológiu ventrikulárneho epitelu zdravých a patologicky zmenených jedincov včely medonosnej a charakterizovať hlavné degeneratívne zmeny pozorované v epiteli stredného čreva.

Materiál a metodika

Odber materiálu

Vzorky pozostávali z dospelých robotníc včely medonosnej (*Apis mellifera*), ktoré boli rozdelené do kontrolnej skupiny (zdravé jedince) a experimentálnej skupiny (uhynuté jedince s potvrdenou infekciou *Nosema spp.*). U všetkých jedincov bol následne preparovaný tráviaci trakt so zameraním na stredné črevo (ventrikulus) (Obr. 1).



Obrázok 1 Zadná časť tráviaceho traktu a bodacieho ústrojenstva včely medonosnej; Legenda: A = bodacie ústrojenstvo; B = konečník; C = tenké črevo; a D = stredná časť čreva (ventrikulus)

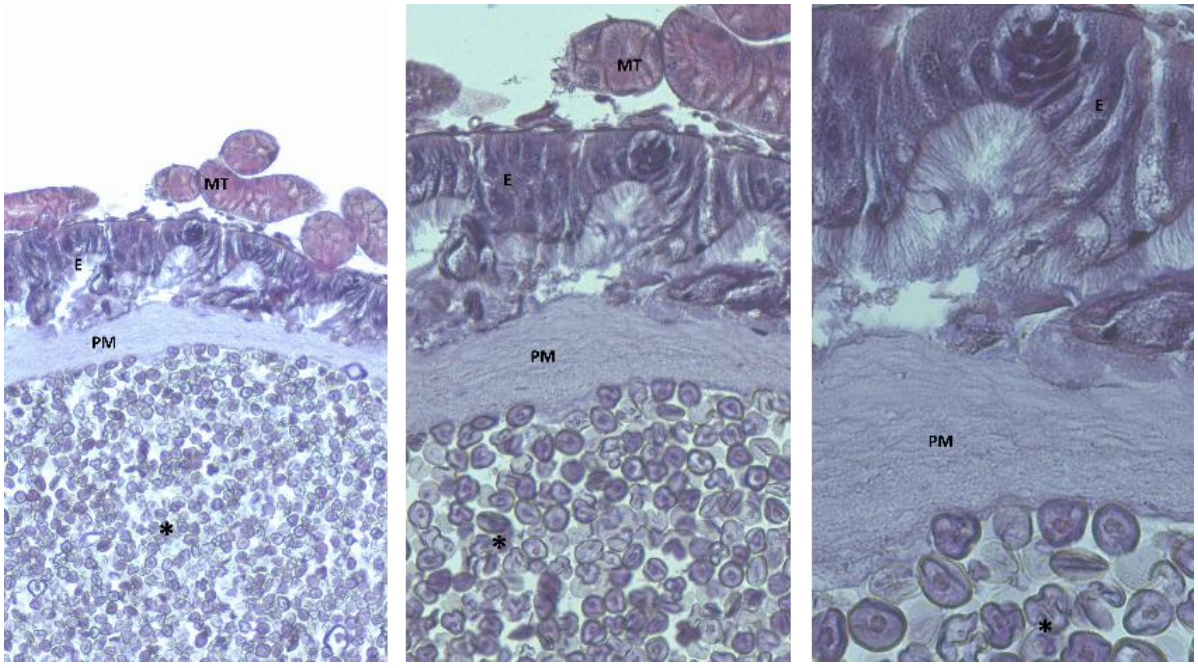
Histologické spracovanie

Vzorky odobratých tkanív určené pre mikroskopické hodnotenie boli fixované v Dentsovom fixačnom médiu (roztok metanolu a dimetylsulfoxidu v pomere 4:1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) minimálne 24 hodín po odbere. Následne boli vzorky dehydratované v etanolovej rade, prejasnené a zaliate do parafínu. Pomocou rotačného mikrotómu (Leica RM2244, Leica Microsystems) boli pripravené sériové rezy s hrúbkou 7 µm, ktoré boli farbené rutinnou histologickou metódou hematoxylín-eozín (H&E). V prípade Obrázku 3 a Obrázku 4 bol pred farbením hematoxylínom použitý roztok Alcianovej modrej – Alcian blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Jadrá buniek boli dofarbené Mayerovým hematoxylínom (Millipore Sigma, St. Louis, MO, USA) a cytoplazma 1 % eozínom (Eosin G o Y, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Takto spracované histologické rezy boli následne montované do permanentného média (Entellan, Millipore Sigma, St. Louis, MO, USA) za účelom vytvorenia trvalých preparátov. Všetky zafarbené preparáty boli hodnotené pomocou svetelného mikroskopu Olympus CX43 (Olympus, Tokio, Japonsko) s integrovanou digitálnou kamerou PROMICAM 3-5CP+ (Promicra, Praha, Česká republika).

Výsledky

Morfológia zdravého ventrikula

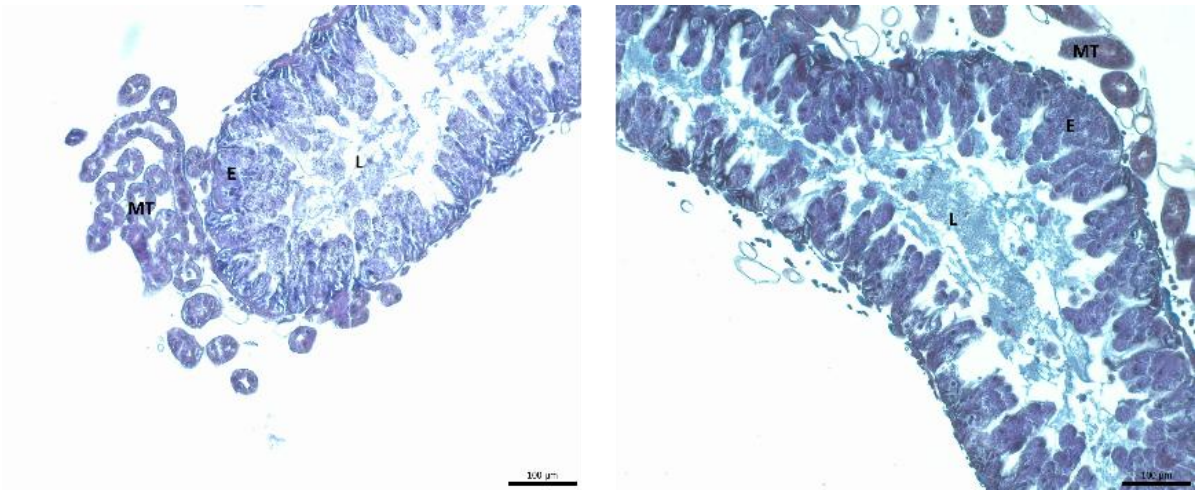
Histologické rezy zdravého ventrikula vykazovali zachovanú architektúru črevnej steny s pravidelne usporiadaným epitelom bez známok degeneratívnych zmien. Bunky epitelu mali homogénnu cytoplazmu a zachovanú integritu apikálneho povrchu. Peritrofická membrána tvorila súvislú vrstvu oddeľujúcu epitel od lúmenu čreva s tráviacim obsahom. V okolí ventrikula boli prítomné aj Malpighiho kanáliky bez patologických zmien. Pri rôznych zväčšeniach bola zachovaná fyziologická organizácia jednotlivých štruktúr bez prítomnosti spór alebo deskvamácie buniek (Obr. 2).



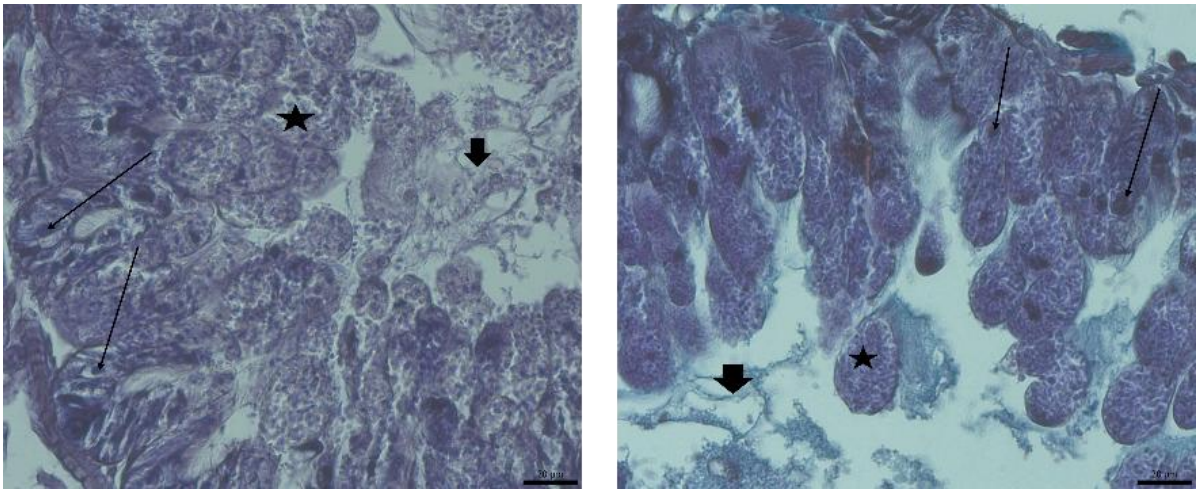
Obrázok 2 Histologický obraz ventrikula zdravej včely; Legenda: E – bunky svalovej vrstvy, PM – peritrofická membrána a MT – Malpighiho kanálik, * – lúmen s tráviacim obsahom

Degeneratívne zmeny epitelu

V histologických rezoch infikovaných jedincov boli pozorované výrazné degeneratívne zmeny epitelu ventrikula. Epitelové bunky vykazovali hypertrofiu, vakuolizáciu cytoplazmy a narušenie pravidelnej architektúry epitelovej vrstvy. V cytoplazme enterocytov sa nachádzali početné intracelulárne vývojové štádiá a spóry *Nosema* spp., pričom v niektorých bunkách dochádzalo k posunu alebo pyknóze jadier. V pokročilejších úsekoch bola pozorovaná dezorganizácia epitelu sprevádzaná narušením kontinuity apikálneho povrchu a deskvamáciou degenerovaných buniek do lúmenu čreva. Voľné spóry, bunkový detritus a degenerovaný materiál prítomný v lúmene poukazovali na aktívne uvoľňovanie parazita z poškodených enterocytov. Črevná stena pôsobila nepravidelne a celková integrita tkaniva bola výrazne narušená v porovnaní so zdravými jedincami. Pri vyšších zväčšeniach boli zreteľné detailné morfologické zmeny enterocytov, strata organizácie epitelu a progresívna degenerácia ventrikulárnej sliznice, zodpovedajúca typickému histopatologickému obrazu nozematózy popisovanému v literatúre (Obr. 3,4).



Obrázok 3 Celková dezorganizácia epitelu ventrikula pri nižšom zväčšení (objektív 10x); Legenda: E – epitel, L – lúmen, MT – Malpighiov kanálik



Obrázok 4 Detail degenerovaných buniek s intracelulárnym obsahom zodpovedajúcim vývojovým štádiám Nosema spp. (objektív 40x); Legenda: hrubá šípka – absencia peritrofickej membrány, tenká dlhá šípka – hyperchrómne a pyknotické jadrá epitelových buniek a zväčšený objem epitelových buniek sliznice so svetlou granulovanou cytoplazmou, hviezdička – epitelové bunky so svetlou cytoplazmou obsahujúcou spóry *Nosema* spp

Diskusia

Výsledky práce poukazujú na výrazné histopatologické rozdiely medzi zdravými a infikovanými včelami, najmä v oblasti epitelu ventrikula. Pozorovaná intracelulárna akumulácia spór, dezorganizácia epitelu a vakuolizácia buniek potvrdzujú, že ventrikulus predstavuje hlavné cieľové tkanivo infekcie *Nosema* spp.

Získané nálezy sú v súlade s predchádzajúcimi štúdiami, ktoré opisujú výrazný tropizmus *Nosema* spp. pre epitel stredného čreva [2,5]. Podobné práce uvádzajú zväčšenie infikovaných buniek, posun jadier a progresívnu degeneráciu epitelu spojenú s intracelulárnym množením spór [5,6].

Degeneratívne zmeny pozorované v tejto práci pravdepodobne významne ovplyvňujú tráviacu a absorpčnú funkciu ventrikula. Poškodenie epitelu a narušenie peritrofickej membrány znižujú absorpciu živín a vedú k energetickému stresu infikovaných

jedincov [5,6]. Tieto zmeny môžu následne prispievať k oslabeniu včiel a destabilizácii včelstva.
Prítomnosť početných spór v lúmene potvrdzuje aktívne uvoľňovanie parazita z infikovaných buniek a podporuje význam ventrikula ako hlavného miesta replikácie *Nosema* spp. Histologické vyšetrenie preto predstavuje cennú diagnostickú metódu, ktorá umožňuje hodnotenie lokalizácie infekcie aj rozsahu poškodenia tkaniva.
Aj keď mohli byť niektoré zmeny ovplyvnené postmortálnou degradáciou tkaniva, charakter a lokalizácia lézií zodpovedajú typickému obrazu nozematózy popisovanému v odbornej literatúre.

Záver

Histologické vyšetrenie preukázalo výrazné rozdiely medzi zdravým a patologicky zmeneným epitelom ventrikula u *Apis mellifera*. Patologické vzorky vykazovali dezorganizáciu epitelu, vakuolizáciu buniek, degeneratívne zmeny jadier a narušenie integrity črevnej steny.
Pozorované zmeny poukazujú na význam zachovania štruktúry ventrikulárneho epitelu pre správnu funkciu tráviaceho traktu a potvrdzujú, že infekcia *Nosema* spp. vedie k degeneratívnym procesom, ktoré môžu významne ovplyvniť fyziologický stav včely.

Publikácia vznikla za finančnej podpory projektov APVV-21-0185; GP MŠVVaŠ SR VEGA 1/0161/23; VEGA 1/0074/24. Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu 09I03-03-V05-00017.

Literatúra

[1] Fries, *Apidologie*. **1988**, 19(3):319-328.
[2] Higes, *J Invertebr Pathol*. **2007**, 94(3):211-217.
[3] Eskov, *Cell Tissue Biol*. **2022**, 16(1):92-96.
[4] LaDouceur, *Lippincott Williams & Wilkins*, **2021**, 301-317 s.
[5] Higes, *Vet Pathol*. **2020**, 57(1):132-138.
[6] Dussaubat, *PLoS ONE*. **2012**, 7(5):e37017.

Účinky čerstvých a sušených plodov rakytníka rešetliakového na hustotu osteocytov a lakún u ZDF potkanov

Šarocká, A.[1], Bíro, R.[2], Pénzes, N.[1], Kováčová, V.[2], Mondočková, V.[1], Mešťanová, V.[3], Capcarová, M.[4], Omelka, R.[1], Martiniaková, M.[2]

[1] Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied a informatiky Katedra botaniky a genetiky, Nitra; [2] Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied a informatiky, Katedra zoológie a antropológie, Nitra; [3] Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; [4] Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra fyziológie živočíchov, Nitra; *asarocka@ukf.sk*

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) severely impairs bone metabolism, induces osteocyte apoptosis, and disrupts skeletal homeostasis. This study investigated the effects of fresh and dried sea buckthorn (HR, *Hippophae rhamnoides* L.) fruit administration on glycemia and histomorphometric parameters of osteocytes in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. Untreated ZDF rats showed severe hyperglycemia accompanied by impaired osteocyte function in both cortical and trabecular bone compartments. Administration of fresh SB fruit significantly lowered blood glucose levels, increased osteocyte proportion in both cortical and trabecular bone tissues, and reduced proportion of empty lacunae in cortical bone. In contrast, application of dried HR fruit had a weaker effect, reducing hyperglycemia and improving osteocyte proportion only in trabecular bone. These results point to the fact that technological processing may cause partial degradation of thermolabile antioxidants in HR. Consequently, preserving the natural profile of HR is crucial for maximizing its hypoglycemic and osteoprotective bioactivity.

Keywords: Osteocytes, Type 2 diabetes mellitus, Sea buckthorn, Bone histomorphometry.

Úvod

Skeletálnu homeostázu koordinuje funkčné syncýtium osteocytov, ktoré tvoria viac ako 90 % kostných buniek. Ich vývoj, osteocytogenéza, je prísne programovaný a prepojený s mechanizmami autofágie [1]. Osteocyty sú integrované v lakunokanalikulárnom systéme (LCS), kde ich výbežky tvoria komplexnú 3D sieť [2]. Medzibunkovú komunikáciu a transport živín zabezpečujú spojenia z konexínu 43 (Cx43) [3]. Funkčná zrelosť buniek je zavŕšená sekréciou sklerostínu a receptora aktivátora nukleárneho faktora κB ligand (RANKL), ktorými osteocyty regulujú aktivitu osteoblastov a osteoklastov [4]. Dominantnou úlohou osteocytov je mechanotransdukcia. Fyzické zaťaženie aktivuje signalizáciu Wnt/β-katenín a znižuje hladinu sklerostínu, čím stimuluje tvorbu kosti. Naopak, odľahčenie vedie k strate kostnej hmoty [4,5]. Okrem lokálneho pôsobenia plnia osteocyty aj endokrinnú funkciu produkciou fibroblastového rastového faktora 23 (FGF23), čím prepájajú fyziológiu skeletu s metabolizmom fosfátov a patológiou diabetes mellitus 2. typu (T2DM) [3,5].

Pri T2DM chronická hyperglykémia a akumulácia produktov pokročilej glykácie (AGEs) kriticky znižujú mechanickú odolnosť kosti [6,7]. Hyperglykémia spôsobuje deformáciu osteocytov a prostredníctvom signálnych dráh p38 a ERK redukuje expresiu Cx43, čím sieť stráca citlivosť na záťaž [8]. AGEs navyše indukujú apoptózu osteocytov, čo je asociované s výskytom prázdnych lakún. Tento stav zvyšuje produkciu sklerostínu a pomer RANKL/OPG, čo vyúsťuje do nežiaducej resorpcie kosti [9]. Čerstvé plody rakytníka rešetliakového (HR, *Hippophae rhamnoides* L.) sú bohaté na flavonoidy a vitamíny (C a E), pričom efektívne neutralizujú ROS [10]. Lyofilizácia plodov navyše zachováva vyššiu koncentráciu stabilných polyfenolov, ktoré v porovnaní so sušením teplom poskytujú stabilnejšiu ochranu kostnému tkanivu [11]. Cieľom našej práce bolo sledovať účinok čerstvých a sušených plodov rakytníka rešetliakového na hustotu osteocytov a lakún u ZDF potkanov, ktoré predstavujú vhodný animálny model T2DM.

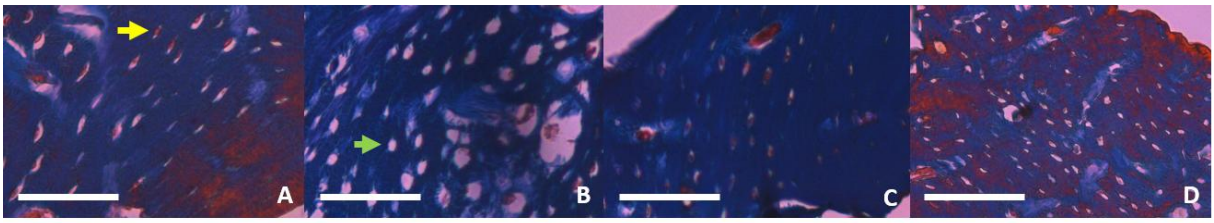
Materiál a metódy

Samce ZDF potkanov (obézne diabetické fa/fa) boli chované na SPU v Nitre za štandardných podmienok (12:12 h cyklus svetlo/tma, teplota 22 ± 2 °C) s *ad libitum* prístupom k vode a krmivu. Na konci 3. mesiaca boli zvieratá náhodne rozdelené do štyroch skupín po šesť jedincov: nediabetické kontrolné jedince (skupina N), neliečené diabetické ZDF potkany (skupina D), ZDF potkany liečené čerstvými plodmi HR v dávke 500 mg/kg/deň (skupina CR) a ZDF potkany liečené sušenými plodmi HR v dávke 500 mg/kg/deň (skupina SR). Plody HR sa podávali 14 týždňov intragastrickou sondou. Dávky a chemický profil plodov vychádzali z predchádzajúcich štúdií [12]. Výskum schválila etická komisia NPPC a Štátna veterinárna a potravinová správa SR (č. 2674-3/2021–220). Na konci experimentu boli zvieratá humánne usmrtené. Hladiny glukózy v krvi boli stanovené pomocou Glucose Colorimetric Assay Kit (#E-BC-K234-S; Elabscience, USA). Odobrané femury boli fixované v 4% pufrovanom formaldehyde, odvápňované 25 dní v Decalcifier I (Leica Biosystems, Nussloch, Nemecko), premyté vodou (24 h) a re-fixované (24 h). Následne boli odobraté priečne 5 mm fragmenty z diafýzy a sagitálne 1 mm rezy z distálnej epifýzy. Vzorky boli dehydratované, zaliate do parafínu (HistoCore Arcadia, Leica Biosystems) a rezané mikrotómom (Microm HM-430, ThermoFisher Scientific) na 6 µm. Deparafinizované rezy kompaktnej a špongióznej kosti boli farbené Massonovým trichrómom. Merali sme hustotu osteocytov, hustotu prázdnych lakún a celkovú hustotu lakún v kompaktnom a špongióznom kostnom tkanive. Štatistickú analýzu sme realizovali pomocou softvéru IBM SPSS Statistics 26.0. Dáta (priemer ± SD) sa vyhodnotili pomocou jednofaktorovej ANOVA s post hoc testami (Tukey alebo Games-Howell) na základe overenia normality (Shapiro-Wilk) a homogenity variancie (Levene). Signifikancia bola stanovená na $p < 0,05$.

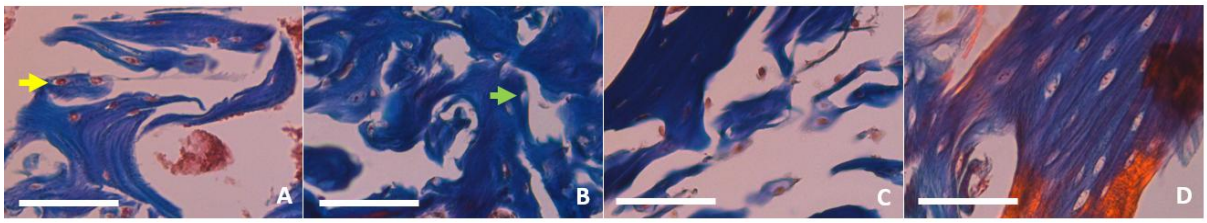
Výsledky

Najvyššia glykémia bola zistená v skupine D, najnižšia v skupine N ($p < 0,05$). Liečba plodmi HR glykémiu signifikantne znížila oproti skupine D ($p < 0,05$), pričom čerstvé plody HR boli účinnejšie ako sušené plody HR ($p < 0,05$). Potkany zo skupiny N mali signifikantne vyššie hodnoty hustoty osteocytov v kompaktnom aj špongióznom kostnom tkanive v porovnaní s D skupinou ($p < 0,05$). Na druhej strane hustota prázdnych lakún bola signifikantne vyššia pri D skupine v porovnaní s N skupinou ($p < 0,05$). Pozitívny efekt aplikácie čerstvých plodov HR sme zaznamenali v kompaktnom aj špongióznom kostnom tkanive, pričom hustota osteocytov bola vyššia v skupine CR v porovnaní s D skupinou ($p < 0,05$). Zároveň sme v skupine CR identifikovali

signifikantne nižšiu hustotu prázdnych lakún v kompaktnom kostnom tkanive ako v skupine D ($p < 0,05$). Aplikácia sušených plodov HR mala menej pozitívny efekt na kostné tkanivo. Zaznamenali sme len signifikantne vyššiu hustotu osteocytov v špongióznom kostnom tkanive v skupine SR v porovnaní so skupinou D ($p < 0,05$). Celková hustota lakún nevykazovala signifikantné zmeny v kompaktnom ani špongióznom kostnom tkanive po aplikácii čerstvých aj sušených plodov HR. Uvedené výsledky sú demonštrované na reprezentatívnych mikrofotografiách kompaktného a špongiózneho kostného tkaniva (Obr. 1, 2), ako aj v Tabuľke 1.



Obrázok 1 Reprezentatívne mikrofotografie kompaktného kostného tkaniva všetkých experimentálnych skupín (A - skupina N, B - skupina D, C - skupina CR, D - skupina SR). Osteocyty v lakúnach - žltá šípka, prázdne lakúny - zelená šípka. Mierka predstavuje 100 μm.



Obrázok 2 Reprezentatívne mikrofotografie špongiózneho kostného tkaniva všetkých experimentálnych skupín (A - skupina N, B - skupina D, C - skupina CR, D - skupina SR). Osteocyty v lakúnach - žltá šípka, prázdne lakúny - zelená šípka. Mierka predstavuje 100 μm

Tabuľka 1: Hladina glukózy a histomorfometrické parametre lakunárneho systému kompaktného a špongiózneho kostného tkaniva ZDF potkanov.

Merané parametre	N skupina	D skupina	CR skupina	SR skupina	p < 0,05
Glukóza (mmol/L)	4,9± 0,2	16,4± 1,9	7,9± 0,9	11,2± 1,2	D > N D > CR D > SR CR < SR
Kompaktné kostné tkanivo					
Hustota osteocytov (N/mm² plochy kosti)	659,7± 183,1	276,7± 81,7	413,2± 236,0	668,1± 141,3	N > D CR > D
Hustota prázdnych lakún (N/mm² plochy kosti)	350,8± 55,5	700,0± 158,9	508,3± 214,8	277,8± 79,0	D > N D > CR
Celková hustota lakún (N/mm² plochy kosti)	1010,6± 152,2	976,7± 127,9	921,5± 314,9	945,8± 182,6	-
Špongiózne kostné tkanivo					
Hustota osteocytov (N/mm² plochy kosti)	323,1± 43,5	179,3± 72,2	426,3± 89,4	439,8± 114,9	N > D CR > D SR > D
Hustota prázdnych lakún (N/mm² plochy kosti)	47,6± 22,5	125,8± 49,9	101,2± 31,7	82,6± 14,6	D > N
Celková hustota lakún (N/mm² plochy kosti)	370,7± 32,9	355,1± 99,3	460,8± 88,2	455,7± 91,0	-

Diskusia

Významným faktorom prispievajúcim k poškodeniu kostného tkaniva u ZDF potkanov zo skupiny D bola výrazná hyperglykémia. Vysoká koncentrácia glukózy v organizme stimuluje nadmernú produkciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) v mitochondriách a vedie k tvorbe AGEs [6,7]. Tieto produkty následne modifikujú kolagénovú matrix a väzbou na receptor RAGE na povrchu osteocytov spúšťajú intracelulárnu kaskádu, vedúcu k ich apoptóze [9]. Tento proces priamo korešponduje so zvýšenou hustotou prázdnych lakún v skupine D v porovnaní s ostatnými skupinami. V dôsledku oxidačného stresu je inhibovaná expresia konexínu 43 (Cx43), čo vedie k zlyhaniu medzibunkovej komunikácie [8]. Aplikácia plodov HR viedla k signifikantnému zníženiu hladiny glukózy, pričom v skupine CR boli hodnoty glykémie ešte nižšie ako v skupine SR. Tento hypoglykemický efekt HR potvrdzujú aj predchádzajúce štúdie na rôznych diabetických modeloch, ktoré ho pripisujú obnove inzulínovej senzitivity [13]. Zároveň sme zistili, že chronická hyperglykémia u ZDF potkanov zo skupiny D viedla okrem zvýšenej apoptózy osteocytov (nárast prázdnych lakún) aj k signifikantnej redukcii ich hustoty, čo potvrdzuje negatívny vplyv T2DM na stabilitu kostného syncýtia [14]. Suplementácia plodmi HR tento stav čiastočne zmiernila, pričom priaznivejší účinok sme zaznamenali pri aplikácii čerstvých plodov HR. Vyššia účinnosť čerstvých plodov HR pri znižovaní hyperglykémie aj pri obnove funkcie osteocytov môže byť asociovaná so synergickým pôsobením bioaktívnych flavonoidov (najmä izorhamnetín, kvercetín, kaempferol) a vitamínov (predovšetkým C a E), ktoré sa nachádzajú v HR [15,10]. Izorhamnetín, dominantný flavonoid v HR, inhibuje osteoklastogenézu indukovanú RANKL prostredníctvom modulácie signalizačných dráh MAPK a NF-κB/PI3K-AKT, čím znižuje fosforyláciu kľúčových proteínov, napr. p38 a p65 [16]. Podobne aj kvercetín pôsobí pleiotropne na kostný metabolizmus. Podporuje osteogenézu a antioxidačnú ochranu prostredníctvom regulácie dráh Wnt/β-katenín a Nrf2 a súčasne inhibuje apoptózu osteoblastov a oxidačný stres vyvolaný hyperglykémiou [17]. Kaempferol obsiahnutý v plodoch HR ďalej dopĺňa tento ochranný účinok reguláciou signalizácie cez dráhu mTOR, čím podporuje kostnú homeostázu [18]. Významným zistením našej práce je rozdielna účinnosť čerstvých a sušených plodov HR, najmä v prípade kompaktného kostného tkaniva. Skupina liečená čerstvými plodmi HR vykazovala výraznejší protektívny účinok na skelet, čo môže súvisieť s vyšším obsahom termolabilných antioxidantov (predovšetkým vitamínu C) v plodoch. Vitamín C je nevyhnutným kofaktorom syntézy kolagénu a podporuje diferenciáciu osteoblastov zvýšením expresie génov Runx2 a BMP-2. Zároveň inhibuje osteoklastogenézu prostredníctvom aktivácie signalizačnej dráhy Wnt/β-katenín/ATF4 [19]. Absencia účinnosti sušených plodov HR na hustotu osteocytov a prázdnych lakún v kompaktnom kostnom tkanive môže súvisieť so stratou časti termolabilných bioaktívnych látok počas procesu sušenia horúcim vzduchom, čo sa mohlo prejaviť redukciou biologickej aktivity týchto plodov [11].

Záver

Suplementácia plodmi HR pozitívne ovplyvnila stabilitu kostného syncýtia, a to zvýšením hustoty osteocytov v špongióznom kostnom tkanive. Zaznamenali sme rozdielnu účinnosť jednotlivých foriem HR, pričom čerstvé plody HR, na rozdiel od sušených plodov HR, mali benefičný efekt aj na hustotu osteocytov a prázdnych lakún v kompaktnom kostnom tkanive. Táto skutočnosť môže súvisieť s parciálnou stratou termolabilných antioxidantov počas technologického spracovania plodov, čo

zdôrazňuje význam zachovania ich fytochemického profilu pre dosiahnutie maximálnej bioaktivity.

Práca bola podporená projektmi VEGA č. 1/0328/24 a KEGA 027UKF-4/2026.

Literatúra

[1] Piemontese*, Sci Rep*. **2016**, 6:24262.
[2] Buenzli, *Bone*. **2015**, 75:144-50.
[3] Tresguerres, *Ann Anat*. **2020**, 227:151422.
[4] Delgado-Calle J, *Physiol Rev*. **2022**, 102(1):379-410.
[5] Robling, *Annu Rev Physiol*. **2020**, 82:485-506.
[6] Brun, *Diabetes.* **2017**, 66(10):2541-2554.
[7] Gortázar, *Curr Osteoporos Rep*. **2020**, 18(6):796-802.
[8] Yang, *Diabetes Metab Syndr Obes*. **2020**, 13:545-557.
[9] Ru, *Cell Death Dis*. **2020**, 11(10):846.
[10] Sytařová, *Food Chem*. **2020**, 310:125784.
[11] Martiniakova, *Front Pharmacol*. **2024**, 15:1462823.
[12] Dupak, *Res Vet Sci*. **2022**, 152:261-269.
[13] Zhang, *Phytother Res*. **2010,** Feb;24(2):228-232.
[14] Gortázar, *Curr Osteoporos Rep*. **2020**, 18(6):796-802.
[15] Dobre, *Vitamins and Human Health*. **2025**, 95.
[16] Zhou, *Front Pharmacol*. **2025**, 16:1551257.
[17] Hu, *Exp Cell Res*. **2025**, 444(2):114386.
[18] Salehi Namini, *J Biol Eng*. **2025**, 19(1):74.
[19] Choi, *Nutrients*. **2019**, 11(3):506.

Vplyv preinkubácie na moduláciu embryonálneho vývinu a expresiu adiponektínu v prsnom svale kurčaťa

Štefancová, S.[1], Pokorná, B.[1], Petrovová, E.[2], Demčišáková, Z.[2], Luptáková, L.[1]

[1] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a fyziológie, Košice; [2] Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra morfologických disciplín, Košice
slavomira.stefancova@student.uvlf.sk

Abstract

Storage of hatching eggs prior to incubation represents a common practice in poultry production; however, prolonged storage negatively affects embryonic development and hatchability. The present study aimed to evaluate the effects of egg storage duration and preincubation on embryonic development and adiponectin expression in the breast muscle of chicken embryos. A total of 60 fertilized eggs (*Gallus gallus domesticus*) were divided according to storage duration (0, 3, 9, and 14 days) and further subdivided into groups with preincubation (PI) and without preincubation (BPI). Eggs were stored at 16 °C, while PI groups were exposed to 30 ± 0.5 °C for 12 h prior to incubation. All eggs were subsequently incubated until embryonic day 9 (ED9). Histological examination revealed preserved muscle tissue architecture in all experimental groups without apparent morphological abnormalities. Preincubation significantly affected embryonic growth, as embryos from PI groups exhibited higher body weight compared to BPI groups. Immunohistochemical analysis confirmed adiponectin immunoreactivity in all examined samples, predominantly localized in muscle fibers and surrounding connective tissue. Quantitative evaluation demonstrated significant differences in adiponectin expression among experimental groups ($p < 0.05$). The highest immunoreactivity was observed in the PI group after 3 days of storage, whereas prolonged storage (9 and 14 days) resulted in a gradual decrease of adiponectin expression in both PI and BPI groups. The lowest adiponectin expression was detected after 14 days of storage. These findings suggest that prolonged egg storage influences adiponectin expression during embryonic myogenesis, while preincubation may partially alleviate the adverse effects associated with extended storage. Adiponectin appears to be involved in metabolic regulation during early embryonic development and may represent a sensitive marker of storage-induced metabolic alterations in poultry embryos.

Keywords: adiponectin, embryo, muscle, preincubation

Úvod

Skladovanie násadových vajec pred inkubáciou predstavuje bežnú súčasť produkcie brojlerových kurčiat [1]. Ak doba skladovania nepresiahne približne 7 dní, spravidla nedochádza k výraznému ovplyvneniu liahnivosti. Predĺžené skladovanie však negatívne ovplyvňuje embryonálny vývin, čo sa prejavuje zvýšenou embryonálnou mortalitou, častejším výskytom vývinových abnormalít, oneskoreným liahnutím, nižšou liahnivosťou a zhoršenou kvalitou jednodňových kurčiat [1,7,9]. Predpokladá sa, že tieto negatívne účinky súvisia so zmenami morfologického štádia embrya a biochemickými procesmi prebiehajúcimi vo vajci počas skladovania [1,9]. Jednou z

možností eliminácie negatívnych dôsledkov dlhodobého skladovania vajec je preinkubácia, teda krátkodobé zvýšenie teploty vajec pred samotnou inkubáciou. Tento postup podporuje synchronizáciu embryonálneho vývinu a napomáha embryám lepšie sa adaptovať na následnú inkubačnú teplotu, čím môže prispieť k zlepšeniu liahnivosti a kvality vyliahnutých kurčiat [8]. Adiponektín (ADPN) patrí medzi adipokíny, biologicky aktívne molekuly, produkované predovšetkým adipocytmi a uvoľňované do krvného obehu. Tukové tkanivo pritom neplní iba funkciu zásobárne lipidov, ale predstavuje aj významné endokrinné tkanivo podieľajúce sa na regulácii metabolických procesov a adipogenézy [6]. U hydiny sa adiponektín vyskytuje prevažne vo forme multimérov s vysokou molekulovou hmotnosťou, čo predstavuje významný rozdiel v porovnaní s cicavcami [3]. Okrem regulácie energetického metabolizmu sa predpokladá aj jeho úloha vo vývine svalového tkaniva a embryonálnom raste [6].Táto štúdia je zameraná na hodnotenie vplyvu dĺžky skladovania vajec a preinkubácie na vývin embryí a expresiu adiponektínu v prsnom svale kuracích embryí. Získané výsledky môžu prispieť k lepšiemu pochopeniu metabolických a vývinových procesov počas embryogenézy hydiny, ako aj k optimalizácii podmienok skladovania a inkubácie násadových vajec.

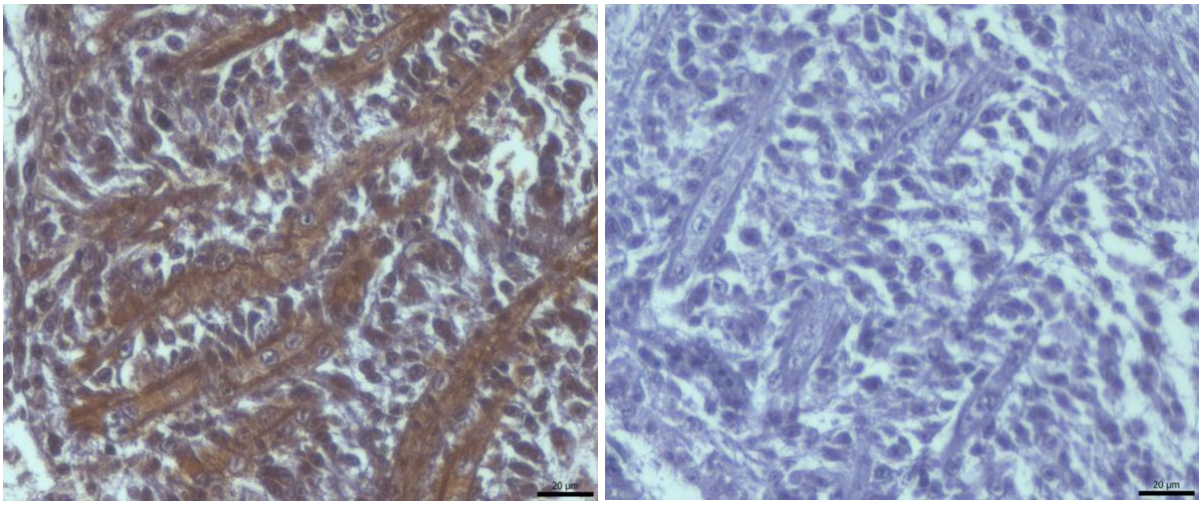
Materiál a metódy

Oplodnené slepačie vajcia (*Gallus gallus domesticus*; n=60) pochádzali z certifikovaného liaharenského zariadenia (EN ISO 22000; Liaharenský podnik Nitra, a.s., Párovské Háje, Slovensko). Vajcia boli rozdelené do štyroch experimentálnych skupín podľa dĺžky skladovania pred inkubáciou (0, 3, 9 a 14 dní), a následne na podskupiny s preinkubáciou a bez preinkubácie. Vajcia boli počas skladovania uchovávané pri teplote 16 °C. V PI skupinách boli vajcia pred začiatkom inkubácie vystavené teplote 30 ± 0,5 °C pri relatívnej vlhkosti 60 % počas 12 hodín. Následne boli všetky vajcia inkubované pri 37,5 ± 0,5 °C do 9. dňa embryonálneho vývinu (ED9) pričom kontrolná skupina nebola skladovaná. Na ED9 boli embryá odobraté a hodnotila sa embryonálna mortalita a morfologické abnormality. Po dekapitácii bol prsný sval z každej vzorky fixovaný v Dentsovom roztoku, spracovaný štandardnou histologickou technikou, zaliaty do parafínu a narezaný na 4 µm rezy. Preparáty boli farbené hematoxylínom-eozínom a analyzované svetelnou mikroskopu pri zväčšení 20× a 40×. Imunohistochemická detekcia adiponektínu bola vykonaná po antigénovom demaskovaní a blokovaní endogénnej peroxidázy. Rezy boli následne inkubované s primárnou protilátkou proti adiponektínu (1:100) a sekundárnou protilátkou (1:200). Vizualizácia imunoreaktivity bola uskutočnená pomocou ABC/DAB systému. Negatívna kontrola bola pripravená vynechaním primárnej protilátky. Intenzita imunoreaktivity bola kvantifikovaná v programe ImageJ ako priemerná hodnota z piatich mikroskopických snímok po odpočítaní pozadia. Štatistická analýza bola vykonané v programe GraphPad Prism pomocou analýzy (ANOVA) so Šídákovým a Tukeyho testom, pričom za štatisticky významné boli považované hodnoty $p < 0,05$.

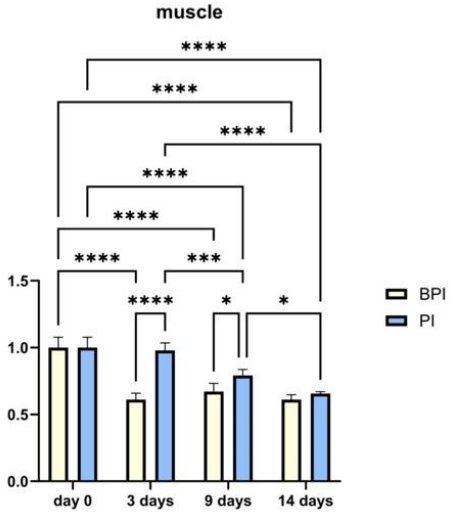
Výsledky

Histologický rozbor svalového tkaniva pri rôznych dĺžkach skladovania (0, 3, 9 a 14 dní) preukázal zachovanú normálnu štruktúru tkaniva vo všetkých experimentálnych skupinách (PI aj BPI). Neboli pozorované žiadne zjavné morfologické abnormality ani štrukturálne zmeny súvisiace s dĺžkou skladovania. Preinkubácia mala signifikantný vplyv na rast embryí, pričom jedince zo všetkých PI skupín vykazovali vyššiu telesnú hmotnosť v porovnaní so skupinami BPI. Dve vajcia boli mŕtve a 8 bolo neoplodnených.

Imunohistochemická analýza potvrdila prítomnosť adiponektínovej imunoreaktivity v prsnom svalovom tkanive vo všetkých sledovaných vzorkách (Obr. 1). Adiponektín bol detegovaný v skupinách PI aj BPI počas celého experimentu, čo poukazuje na jeho konzistentnú expresiu počas embryonálneho vývinu. Lokalizácia imunoreaktivity bola pozorovaná najmä v svalových vláknach a v okolitej spojivovej zložke tkaniva. Kvantitatívna analýza intenzity farbenia preukázala štatisticky významné rozdiely medzi experimentálnymi skupinami ($p < 0,05$). V skupine s PI bola zaznamenaná výrazne zvýšená expresia adiponektínu po 3 dňoch skladovania v porovnaní so skupinou BPI. Následne došlo k poklesu intenzity expresie po 9 a 14 dňoch skladovania, pričom hodnoty zostali mierne vyššie v skupinách s PI v porovnaní s BPI. V skupinách BPI bola expresia adiponektínu počas skladovania nižšia a relatívne stabilná, bez výrazných zmien medzi jednotlivými experimentálnymi dňami. Najnižšie hodnoty imunoreaktivity boli pozorované po 14 dňoch skladovania v oboch experimentálnych skupinách. Celkovo výsledky naznačujú, že adiponektín je prítomný v prsnom svalovom tkanive počas celého embryonálneho vývinu, pričom jeho expresia je výrazne ovplyvnená dĺžkou skladovania (Obr. 2).



Obrázok 1 Imunohistochemické porovnanie expresie adiponektínu u pozitívnej a negatívnej vzorky



Obrázok 2 Vplyv dĺžky skladovania vajec a preinkubácie na imunoreaktivitu adiponektínu v prsnom svale kuracích embryí

Diskusia

Predĺžené skladovanie násadových vajec je spojené so zhoršením kvality vajec, zníženou liahnivosťou a negatívnym ovplyvnením embryonálneho vývinu. V našej štúdii preinkubácia čiastočne zmiernila nepriaznivé účinky dlhodobého skladovania, čo sa prejavilo vyššou telesnou hmotnosťou embryí a stabilnejším vývinom tkanív v skupinách PI v porovnaní s BPI. Krátkodobé skladovanie môže mať na embryo priaznivý účinok, pravdepodobne v dôsledku postupnej optimalizácie podmienok pre embryogenézu, zatiaľ čo predĺžené skladovanie vedie k metabolickému útlmu, spomaleniu rastu a aktivácii stresových mechanizmov [1,2]. Preinkubácia môže podporovať obnovenie metabolickej aktivity a synchronizáciu embryonálneho vývinu po období skladovania [5,10]. Naše výsledky zároveň potvrdili prítomnosť adiponektínu v prsnom svale počas celého embryonálneho vývinu, pričom jeho expresia bola ovplyvnená dĺžkou skladovania vajec aj preinkubáciou. Najvyššia imunoreaktivita bola zaznamenaná v skupine PI po 3 dňoch skladovania, zatiaľ čo po 9 a 14 dňoch došlo k jej postupnému poklesu. Tento trend korešponduje s vyššou telesnou hmotnosťou embryí v skupinách PI a naznačuje, že adiponektín môže byť zapojený do regulácie metabolických procesov počas skorého embryonálneho vývinu. Adiponektín je významným regulátorom metabolizmu glukózy a lipidov, pričom zvýšená expresia v skupine PI po 3 dňoch skladovania môže predstavovať adaptačnú odpoveď embrya na zvýšené energetické požiadavky počas skorého vývinu. Pokles expresie adiponektínu pri dlhšom skladovaní môže súvisieť so zníženou metabolickou aktivitou embrya a narušením energetickej homeostázy [6]. Gan et al. (2015) preukázali, že adiponektín reguluje mitochondriálnu biogenézu a inhibuje akumuláciu lipidov v adipocytoch kurčiat, čím sa podieľa na udržiavaní energetickej rovnováhy [4]. Naše výsledky preto naznačujú, že adiponektín môže predstavovať citlivý marker metabolických zmien počas embryonálneho vývinu a jeho expresia je modulovaná podmienkami skladovania vajec a preinkubáciou.

Záver

Skladovanie násadových vajec významne ovplyvňuje embryonálny vývin, liahnivosť a kvalitu vyliahnutých kurčiat. Predĺžené skladovanie znižuje životaschopnosť embryí a zvyšuje ich mortalitu, čo vedie k narušeniu fyziologických procesov počas inkubácie. Tieto zmeny môžu negatívne ovplyvniť aj postnatálny rast jedincov prostredníctvom alterácie metabolických a bunkových mechanizmov počas vývinu tkanív vrátane svalového aparátu. Optimalizácia podmienok skladovania je preto kľúčová pre zabezpečenie správneho embryonálneho vývinu a vysokej liahnivosti. Ďalší výskum môže prispieť k detailnejšiemu objasneniu mechanizmov ovplyvňujúcich embryonálny vývin a svalovú diferenciáciu u hydiny, ako aj k optimalizácii technologických postupov v liahárenskej praxi.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0373/24.

Literatúra

[1] Adriaensen, *Frontiers in Physiology*. **2022**, 13:902154.
[2] Andri, *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production.* **2024**, 25:59-64.
[3] Cai, *Poultry Science*. **2021**, 100(12):101480.
[4] Gan, *J. Cell. Biochem*. **2015**, 116:1090-1100.
[5] Ko, *The FASEB Journal.* **2017**, 31(1):3240-3250.
[6] Mellouk, *General and Comparative Endocrinology.* **2018**, 267:146-156.
[7] Nasri, *J Anim Physiol Anim Nutr.* **2020**, 104(1):257-268.

[8] Özlü, *Poult Sci.* **2021**, 100(3):100918.
[9] Pennings, *Poult Sci.* **2025**, 104(9):105451.
[10] Pokhrel, *Poult Sci.* **2018**, 97(4):1429-1440.
.

Biotin-Dependent Carboxylases in Brain Tumor Metabolism: Pyruvate Anaplerosis, BCAA Catabolism, Lipogenesis and Candidate Metabolic Vulnerabilities

Dobšovičová, M., Murín, R.

Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin,
Department of Medical Biochemistry, Martin
murin@jfmed.uniba.sk

Abstract

Malignant brain tumors, particularly glioblastomas, exhibit extensive metabolic reprogramming to support proliferation, survival, and adaptation to a dynamic microenvironment. Biotin-dependent carboxylases — including pyruvate carboxylase (PC), propionyl-CoA carboxylase (PCC), 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC), and acetyl-CoA carboxylases 1 and 2 (ACC1/ACC2) — contribute to this landscape by catalyzing ATP-dependent bicarbonate fixation reactions. These enzymes connect carbohydrate metabolism, amino acid catabolism, tricarboxylic acid (TCA) cycle replenishment, and lipid biosynthesis. This review integrates findings on PC and MCC from studies by our group with a broader conceptual framework that includes PCC and ACC1/ACC2. PC provides canonical anaplerosis from pyruvate to oxaloacetate. PCC links valine and isoleucine catabolism to succinyl-CoA formation, representing a mechanistically distinct anaplerotic route. MCC enables the irreversible, purely ketogenic catabolism of leucine, contributing acetyl-CoA and acetoacetate but no net anaplerosis. ACC1 and ACC2 determine the metabolic fate of acetyl-CoA, committing carbon to malonyl-CoA-dependent de novo lipogenesis or regulating fatty acid oxidation. An integrated model of branched-chain amino acid (BCAA) catabolism is presented, distinguishing the metabolic fates of leucine, valine, and isoleucine. Key evidence gaps are identified, emphasizing the need for quantitative isotope-resolved flux analyses in patient-derived models. While these carboxylases represent candidate metabolic vulnerabilities, their therapeutic exploitation requires further validation.

Keywords: biotin-dependent carboxylases, brain tumor metabolism, anaplerosis, BCAA catabolism, lipogenesis

Introduction

Malignant brain tumors, particularly glioblastomas, exhibit extensive metabolic reprogramming to support proliferation, survival, and adaptation to a dynamic microenvironment. Although the shift toward aerobic glycolysis is well characterized, mitochondrial metabolism remains essential for tumor growth, biosynthesis, and stress adaptation. Brain tumor cells do not rely solely on glucose-derived carbon but can integrate multiple nutrient sources — including pyruvate, glutamine, fatty acids, and amino acids — into mitochondrial metabolism [1].

Biotin-dependent carboxylases (Fig. 1) contribute to this metabolic landscape by catalyzing ATP-dependent bicarbonate fixation reactions [2]. In mammalian cells, the principal biotin-dependent carboxylases include pyruvate carboxylase (PC), propionyl-CoA carboxylase (PCC), 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC), and acetyl-CoA

carboxylases 1 and 2 (ACC1/ACC2; Fig. 1). A series of studies at our department has systematically examined the expression and potential metabolic roles of PC and MCC in human neural cells and brain tumors [3-7]. A broader interpretation, however, requires integration of additional carboxylases — especially PCC and ACC1/ACC2 — because branched-chain amino acid (BCAA) catabolism can generate both acetyl-CoA and succinyl-CoA, while acetyl-CoA carboxylation controls the entry of carbon into lipid biosynthesis [8-10].

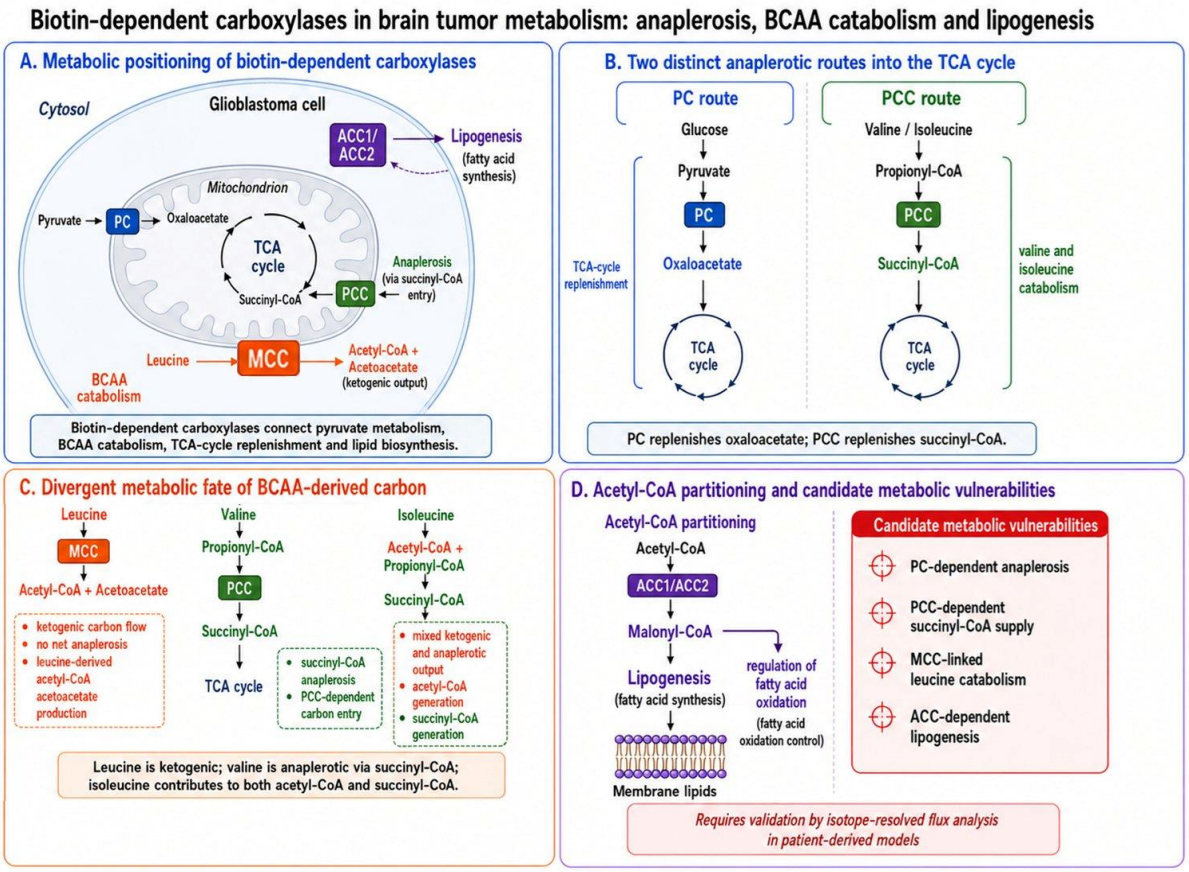


Figure 1 Biotin-dependent carboxylases as metabolic nodes linking anaplerosis, branched-chain amino acid (BCAA) catabolism and lipogenesis in brain tumor cells; (A) Schematic overview of the metabolic positioning of pyruvate carboxylase (PC), propionyl-CoA carboxylase (PCC), 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) and acetyl-CoA carboxylases (ACC1/ACC2). These enzymes connect pyruvate utilization, BCAA degradation, TCA-cycle replenishment and de novo fatty acid synthesis; (B) Distinct anaplerotic entry points into the TCA cycle. PC replenishes oxaloacetate from pyruvate, whereas PCC generates succinyl-CoA from propionyl-CoA derived from valine and isoleucine catabolism; (C) Metabolic fate of BCAA-derived carbon. Leucine contributes exclusively to ketogenic metabolism, valine serves as an anaplerotic precursor of succinyl-CoA, and isoleucine provides both ketogenic and anaplerotic carbon sources; (D) Acetyl-CoA partitioning through ACC1/ACC2 and proposed metabolic vulnerabilities associated with PC-dependent anaplerosis, PCC-dependent succinyl-CoA production, MCC-mediated leucine catabolism and ACC-dependent lipogenesis

Conceptual distinction between PC, MCC, PCC, and ACC

PC, MCC, PCC, and ACC support tumor-cell metabolism through different mechanisms and should not be functionally conflated (Fig. 1). PC directly replenishes oxaloacetate from pyruvate and therefore represents a canonical anaplerotic enzyme

[2,3]. PCC also supports anaplerosis, but through a mechanistically distinct route: it converts propionyl-CoA to methylmalonyl-CoA, which is subsequently converted to succinyl-CoA. This pathway is especially relevant to the catabolism of valine, isoleucine, and odd-chain fatty acids [9,10]. MCC, by contrast, does not mediate net anaplerosis. It catalyzes a biotin-dependent reaction within the irreversible part of the leucine catabolic pathway, which is purely ketogenic [6,7]. ACC1 and ACC2 also do not mediate anaplerosis. Instead, they catalyze the carboxylation of acetyl-CoA to malonyl-CoA, determining whether acetyl-CoA-derived carbon is committed to lipid biosynthesis or whether oxidative metabolism is favored [2,11].

Pyruvate carboxylase: canonical anaplerosis from pyruvate to oxaloacetate

PC expression was demonstrated in cultured oligodendroglial, microglial, and ependymal cells, suggesting a broader glial role in metabolic homeostasis [3]. In the neoplastic context, PC expression was subsequently detected in cultured human astrocytoma, glioblastoma, and neuroblastoma-derived neural tumor cell models [4]. Pharmacological inhibition of PC compromised the viability of astrocytoma cells, and partial rescue by citrate, 2-oxoglutarate, and malate supported the functional relevance of TCA-cycle replenishment in this setting. PC was also shown to be present in cultured human astrocytes and to contribute to their survival [5]. Immunohistochemical analyses revealed PC expression across the examined tumor types, including glioblastomas, astrocytomas, oligodendrogliomas, and meningiomas [6].

3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase: leucine catabolism and ketogenic carbon flow

The expression of functional MCC has been demonstrated in human brain tumors and cultured neural cancer cells, which actively catabolize leucine and incorporate leucine-derived carbon into TCA-cycle-related metabolites [7]. A subsequent study mapped MCC expression in both astrocytes and neurons of the human brain and examined the metabolic fate of leucine under hyperglycemic conditions using isotopologue tracing [8]. The results showed that hyperglycemic conditions intensified the irreversible catabolic flux of leucine in cultured human astrocytes, indicating that MCC-linked leucine metabolism is responsive to the prevailing nutrient environment.

Propionyl-CoA carboxylase: valine/isoleucine catabolism and succinyl-CoA anaplerosis

PCC links propionyl-CoA-generating substrates to the TCA cycle at the level of succinyl-CoA. This pathway is particularly important for the catabolism of valine and isoleucine [9,10]. In cancer biology, propionate metabolism and succinyl-CoA availability are increasingly recognized as functionally important. Dysregulation of propionate metabolism has been associated with aggressive phenotypes in breast and lung cancer cells [13]. In prostate cancer models, valine degradation has been linked to anaplerotic refueling of the mitochondrial succinate pool [14]. In brain tumors, PCC has been less directly characterized than PC or MCC, representing an underexplored mitochondrial carboxylase.

Acetyl-CoA carboxylases: acetyl-CoA partitioning, lipogenesis, and fatty acid oxidation

In human glioblastoma cells, inhibition of ACC1/2 reduced *de novo* lipogenesis and suppressed proliferation [11]. In hepatocellular carcinoma models, inhibition of ACC

by phosphorylation or by the liver-directed ACC inhibitor ND-654 suppressed *de novo* lipogenesis and tumor development [12], which provides clues about the significant role of ACCs isoforms for cancer cells.

Discussion

The integrated model places PC and PCC as true anaplerotic carboxylases, MCC as a leucine-linked ketogenic carboxylase, and ACC1/2 as acetyl-CoA-partitioning carboxylases. Together, these enzymes define how tumor cells distribute carbon between TCA-cycle maintenance, respiration, acetyl-CoA production, succinyl-CoA formation, and lipid biosynthesis.

BCAA catabolism begins with the reversible transamination of leucine, isoleucine, and valine by branched-chain aminotransferases (BCAT1/2). Downstream of BCAT/BCKDH, mitochondrial carboxylases help define the metabolic fate of BCAA-derived carbon: leucine is converted via MCC to acetyl-CoA and acetoacetate; valine is converted via PCC to succinyl-CoA; isoleucine catabolism generates both acetyl-CoA and propionyl-CoA (and thus succinyl-CoA). Glucose-derived pyruvate can be carboxylated by PC to oxaloacetate, and ACC1 converts cytosolic acetyl-CoA to malonyl-CoA for fatty acid synthesis [2, 8-11].

Despite increasing evidence, several key questions remain unresolved. Expression data should be complemented by quantitative isotope-resolved flux analyses in patient-derived glioblastoma cells, glioma stem-like cells, and organoid models under physiologically relevant nutrient conditions, including hypoxia and nutrient limitation. Tumor selectivity must be carefully evaluated, as PC, MCC, and PCC have important roles in non-malignant metabolism [3,5,8]. Finally, BCAA-specific tracing experiments using [^{13}C]-leucine, [^{13}C]-valine, and [^{13}C]-isoleucine should be prioritized to define the specific metabolic fates of these amino acids in brain tumors.

Conclusion

Biotin-dependent carboxylases form an interconnected metabolic network that links pyruvate metabolism, BCAA catabolism, TCA-cycle maintenance, and lipid biosynthesis in tumor cells. PC connects glucose-derived pyruvate to oxaloacetate replenishment. MCC links leucine catabolism to acetyl-CoA and acetoacetate. PCC provides a distinct anaplerotic route, converting propionyl-CoA (from valine and isoleucine) to succinyl-CoA. ACC1 and ACC2 determine whether acetyl-CoA is committed to malonyl-CoA-dependent lipid synthesis. In brain tumors, this network may be particularly important because of the heterogeneous tumor microenvironment. These enzymes could currently be regarded as putative candidate for therapeutic vulnerabilities. Their potential exploitation will require direct flux measurements, genetic validation, patient-derived tumor models, *in vivo* studies, and careful assessment of toxicity in normal neural cells.

This work was supported by the Scientific Grant Agency VEGA No. 1/0146/25 and by Comenius University through the Internal Grant Scheme (Grant No. UK/1142/2026).

References

[1] Sivanand, *Cancer Cell*. **2020**, 37(2):147-156.
[2] Tong, *Cell Mol Life Sci*. **2013**, 70(5):863-891.

[3] Murín, *Neurochem Res*. **2009**, 34(3):480-489.
[4] Gondáš, *Gen Physiol Biophys*. **2021**, 40(2):127-135.
[5] Gondáš, *Physiol Res*. **2023**, 72:403-414.
[6] Gondáš, *Neurochem Res*. **2023**, 48(6):1728-1736.
[7] Gondáš, *Cancers*. **2022**, 14(3):585.
[8] Murín, *Neurochem Res*. **2026**, 51:113.
[9] Wongkittichote, *Mol Genet Metab*. **2017**, 122(4):145-152.
[10] Bidgood, *Cell Death Dis*. **2024**, 15:382.
[11] Jones, *PLoS ONE*. **2017**, 12:e0169566.
[12] Lally, *Cell Metab*. **2019**, 29(1):174-182.e5.
[13] Gomes, *Nat Metab*. **2022**, 4:435-443.
[14] Morelli, *Clin Cancer Res*. **2025**, 31(10):1975-1987.

Molecular biomarkers and histological progression in IgA nephropathy: the role of galactose-deficient IgA1 and microRNA

Kapinová, A.[1], Kašubová, I.[1], Graňák, K.[2,3], Vnučák, M.[2,3], Kleinová, P.[2,3], Blichová, T.[2,3], Ševčíková, K.[3], Kollár, A.[2,3], Štanclová, A.[1], Šarlinová, M.[1], Dedinská, I.[2,3]

[1] Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, BioMed, Martin; [2] Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, University Hospital in Martin, 1st Internal Department, Martin; [3] University Hospital in Martin, Transplant-Nephrology Department, Martin
andrea.kapinova@uniba.sk

Abstract

IgA nephropathy (IgAN) is the most common primary glomerulonephritis worldwide. It is characterized by a highly variable clinical course, ranging from stable kidney function to progressive chronic kidney disease (CKD). Renal biopsy and histological evaluation remain essential for the diagnosis and prognosis of IgAN, but histological markers alone are often insufficient to reliably predict disease progression. Because of these limitations, attention has recently shifted toward molecular biomarkers that may better reflect ongoing disease activity. Among the promising biomarkers currently under investigation are galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1) and specific microRNAs (miRNAs), which are involved in multiple pathways of IgAN pathogenesis. This review focuses on how the combination of histological findings, and the above-mentioned biomarkers could improve risk stratification and support more individualized management of patients with IgAN.

Keywords: IgA nephropathy, galactose-deficient IgA1, miRNA, biomarker

Introduction

IgA nephropathy (IgAN), the most common form of primary glomerulonephritis worldwide, is characterized by the deposition of IgA-containing immune complexes in the glomeruli, leading to progressive renal injury [1]. Despite extensive research, the clinical course of IgAN remains highly variable. Some patients maintain stable renal function for many years, whereas others gradually progress to chronic kidney disease (CKD) and ultimately to end-stage kidney disease (ESKD) [2,3]. This heterogeneity makes early risk stratification and prediction of disease progression particularly challenging in routine clinical practice [4-6].

Renal biopsy remains the gold standard for the diagnosis of IgAN. Histological evaluation, including the Oxford Classification (MEST-C score), helps estimate prognosis and guide treatment decisions [6,7]. However, histological findings alone do not always accurately predict disease progression because biopsy interpretation may be subjective, may not fully capture the heterogenity and overall extent of kidney injury, and is prone to interobserver variability. Consequently, patients with similar biopsy results may experience markedly different clinical outcomes. In addition, renal biopsy is invasive and unsuitable for repeated long-term monitoring [8,9].

Therefore, increasing attention has been focused on other reliable biomarkers, including non-invasive liquid biopsy approaches, that may improve prognostic

assessment and better reflect ongoing pathogenic processes [10,11]. One of the most promising candidates is the nephritogenic autoantigen galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1), which plays a central role in the pathogenesis of IgAN and has been associated with disease severity and clinical progression [12]. Moreover, in recent years, microRNAs (miRNAs) have emerged as additional potential biomarkers because of their regulatory roles in inflammation, fibrosis, and immune responses. Their stability in biological samples and potential association with histological changes make them attractive tools for non-invasive monitoring [13,14]. The combination of traditional histological assessment with novel non-invasive molecular biomarkers may improve the accuracy of disease progression assessment and help improve individualized management of patients with IgAN [15,16].

Pathogenesis and molecular mechanisms of IgA nephropathy

IgAN is driven by a multistep immunopathogenic process. The first step involves overproduction of Gd-IgA1 by mucosal B cells, particularly in the respiratory and gastrointestinal tract. The abnormal glycosylation of IgA1 triggers the formation of IgG and IgA autoantibodies directed against Gd-IgA1, leading to the development of circulating immune complexes. These complexes are insufficiently cleared from the circulation and subsequently deposit within the glomerular mesangium, where they activate mesangial cells, stimulate proliferation, and induce the release of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF-α, and TGF-β. The resulting inflammatory response promotes glomerular injury, progressive renal fibrosis, and ultimately deterioration of renal function [17-19].

Histological evaluation of IgA nephropathy

Renal biopsy typically shows mesangial IgA-dominant or co-dominant immune complex deposits with associated histopathological changes, including mesangial proliferation and variable degrees of glomerular and tubulointerstitial injury [6]. Histopathological severity is routinely assessed using the Oxford Classification (MEST-C score), a validated scoring system that evaluates mesangial hypercellularity (M), endocapillary hypercellularity (E), segmental sclerosis (S), tubular atrophy/interstitial fibrosis (T), and crescents (C). Individual MEST-C lesions have been associated with renal outcomes and may provide additional prognostic information when interpreted alongside clinical parameters [6,7].

Gd-IgA1 and microRNAs as molecular biomarkers of disease activity and progression

Gd-IgA1 is considered a key pathogenic biomarker in IgAN. Several studies have shown that elevated serum levels of Gd-IgA1 correlate with increased disease activity, higher proteinuria, faster decline in eGFR (estimated glomerular filtration rate), and increased risk of progression to CKD and ESKD [20-23]. Histologically, higher Gd-IgA1 concentrations are linked to mesangial proliferation and immune complex deposition within glomeruli [24]. In addition to its pathogenic role, circulating Gd-IgA1 has been investigated as a potential non-invasive diagnostic biomarker that may help distinguish patients with IgAN from healthy individuals as well as from patients with other kidney diseases [12,25]. Recent systematic reviews and meta-analyses also support the prognostic value of Gd-IgA1 in predicting IgAN progression [12,15,25].

MiRNAs are small non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level and play an important role in immune responses. Owing to their

stability in biological fluids and involvement in key pathogenic processes, miRNAs are increasingly being investigated as potential biomarkers for the early diagnosis and prognosis of IgAN, as well as possible targets for novel therapeutic approaches [26]. Altered expression profiles of specific circulating and urinary miRNAs, including miR-148b, miR-21, miR-29c, miR-155, miR-146a, miR-192, miR-200 family members, and let-7b, have been associated with aberrant IgA1 glycosylation, mesangial proliferation, renal fibrosis, inflammatory signaling, proteinuria, and progressive renal dysfunction in IgAN [26-35]. In a study by Wu et al., plasma miRNAs including miR-148a-3p, miR-150-5p, miR-20a-5p, and miR-425-3p correlated with histological severity according to Lee's grading system. Notably, these miRNAs were more elevated in early-stage IgAN (grades I–II) than in advanced disease (grades III–V), suggesting their potential utility as biomarkers of early pathological changes [36]. A recent study by Yoon investigating urinary exosomal miRNAs suggests that exosome-derived miRNAs may serve as non-invasive biomarkers reflecting renal histopathological damage and disease progression in IgAN [37]. A growing number of studies further suggest that circulating and urinary miRNA profiles may serve as non-invasive indicators of disease severity, histological injury, and progression in IgAN [13,14]. In addition to findings in biological fluids, altered miRNA expression has been identified directly in renal tissue samples from patients with IgAN, further supporting the involvement of these molecules in disease pathogenesis and progression. Changes in intrarenal expression of miR-21, miR-29c, miR-192, and the miR-200 family members have been linked to mesangial cell activation, tubular atrophy, interstitial fibrosis, and chronic inflammatory responses, with several studies reporting correlations between these alterations and both histopathological severity and declining renal function [30,31,38-41]. These findings indicate that tissue-specific miRNA profiles could complement circulating and urinary biomarkers and provide further insight into the molecular mechanisms underlying renal injury in IgAN.

Correlation between molecular biomarkers and histological findings

Collectively, these studies suggest that molecular biomarkers such as Gd-IgA1 and specific miRNAs may reflect histopathological severity in IgAN and could complement conventional biopsy-based assessment. Emerging evidence indicates that abnormalities in Gd-IgA1, together with miRNA dysregulation, are involved in the molecular pathways associated with renal injury. Integrating circulating or urinary miRNA profiles with Gd-IgA1 measurements may therefore improve early diagnosis, enable more accurate assessment of disease severity, and enhance prediction of disease progression.

Conclusion

Overall, the available evidence supports a close association between molecular alterations and histopathological injury in IgAN. In particular, combined biomarker approaches may serve as a non-invasive adjunct to renal biopsy, with potential to improve disease stratification, monitoring, and prognostic evaluation. Despite these promising findings, several important limitations must be considered. For Gd-IgA1, although it shows potential as a disease-associated biomarker, its diagnostic specificity is limited by overlap with other glomerular and inflammatory conditions, as well as persistent assay variability between laboratories and the absence of standardized clinical cutoff values [12,42]. Similarly, evidence for miRNAs remains preliminary, with

inconsistent findings across studies likely driven by limited reproducibility, small sample sizes, and methodological heterogeneity, including differences in normalization strategies for urine and plasma [43,44]. In addition, the lack of validated clinical thresholds continues to limit their immediate translational applicability. Therefore, further large-scale, longitudinal studies are needed to validate these findings and establish their clinical utility in routine practice.

This work was supported by grant VV-MVP-24-0252 entitled „Modifikácia črevného mikrobiómu u pacientov s primárnou IgA nefropatiou“.

References

[1] Jakubowska, *J Clin Med.* **2026**, 15(5):2046.
[2] Rajasekaran, *Am J Med Sci*. **2021**, 361(2):176-194.
[3] Xu, *Immun Inflamm Dis.* **2026**, 14(2):e70393.
[4] KDIGO Glomerular Diseases Work Group, *Kidney Int.* **2021**, 100:S1-S276.
[5] KDIGO CKD Work Group, *Kidney Int.* **2024**, 105(4S):S117-S314.
[6] KDIGO IgAN and IgAV Work Group, *Kidney Int.* **2025**, 108(4S):S1-S71.
[7] Howie, *Kidney360* **2023**, 4(8):1103-1111.
[8] Hull, *Clin Med (Lond).* **2022**, 22(1):34-40.
[9] Schnuelle, *Clin Med.* **2023**, 12:6424.
[10] Klinkhammer, *Nat Rev Nephrol.* **2021**, 17(10):688-703.
[11] Dybiec, Genes (Basel) **2024**, 15(1):78.
[12] Zeng, *Front Immunol*. **2023**, 14:1209394.
[13] Xu, *Clin Immunol.* **2025**, 274:110468.
[14] Zhang, *BMC Nephrol*. **2025**, 27(1):78.
[15] Duan, *Biomark Res.* **2024**, 12(1):72.
[16] Kamal, *Semin Nephrol.* **2024**, 44(5):151572.
[17] Zhou, *MedComm. (2020)* **2025**, 6(9):e70382.
[18] Dreher, *Clin Kidney J*. **2025**, 18(6):sfaf152.
[19] Knoppova, *J Clin Med*. **2021**, 10(19):4501.
[20] Maixnerova, *PLoS One.* **2019**, 14(2):e0212254.
[21] Suzuki, *Clin Exp Nephrol*. **2014**, 18(5):770-7.
[22] Kim, *J Clin Med.* **2020**, 9(11):3549.
[23] Bagchi, *PLoS One*. **2019**, 14(3):e0214256.
[24] Knoppova, *Front Immunol*. **2016**, 7:117.
[25] Vaz de Castro PAS, *J Nephrol*. **2024**, 37(8):2099-2112.
[26] Apetrii, *Cells*. **2026**, 15(2):94.
[27] Szeto, *Nat Rev Nephrol*. **2014**, 10(5):249-56.
[28] Kumar, *Kidney Dial.* **2023**, 3(1):84-94.
[29] Liang, *BMC Nephrol*. **2017**, 18(1):63.
[30] Szeto, *Kidney Med*. **2021**, 3(1):76-82.e1.
[31] Serino, *Kidney Int.* **2016**, 89(3):683-92.
[32] Kouri, *J Clin Med.* **2021**, 10(9):1987.
[33] Wang, *Dis Markers*. **2011**, 30(4):171-9.
[34] Przybyciński, *Genes (Basel)*. **2025**, 16(2):125.
[35] Shankar, *Sci Rep*. **2023**, 13(1):21400.
[36] Wu, *Gene*. **2018**, 649:80-86.
[37] Yoon, *Sci Rep*. **2023**, 13(1):17201.
[38] Wang, *Lab Invest*. **2010**, 90(1):98-103.
[39] Hennino, *Sci Rep*. **2016**, 6:27209.
[40] Baker, *J Am Soc Nephrol*. **2017**, 28(10):2985–2992.
[41] Fang, *Am J Physiol Renal Physiol.* **2013**, 304(10):F1274–F1282.
[42] Suzuki, *Clin Exp Nephrol.* **2019**, 23(1):26-31.
[43] Franczyk, *Int Urol Nephrol*. **2022**, 54(3):575-588.
[44] Rice, *PLoS One*. **2015**, 10(4):e0121948.

Potransplantačný diabetes mellitus: úloha β-bunkovej dysfunkcie, imunosupresie a mikroRNA v patogenéze a diagnostike

Kašubová, I.[1], Kapinová, A.[1], Štanclová, A.[1], Kollár, A.[2,3], Graňák, K.[2,3], Šarlinová, M.[1], Dedinská I.[2,3]

[1] Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu, Martin; [2] Univerzitná nemocnica Martin, I. interná klinika; [3] Univerzitná nemocnica Martin, Transplantačno-nefrologické oddelenie
ivana.kasubova@uniba.sk

Abstract

Post-transplant diabetes mellitus (PTDM) is a serious metabolic complication after kidney transplantation that adversely affects patient survival and graft function. Its development is multifactorial and involves insulin resistance, β-cell dysfunction, and the diabetogenic effects of immunosuppressive therapy. β-cell dysfunction is characterized by impaired insulin secretion and gradual loss of β-cell mass as a result of oxidative and endoplasmic reticulum stress. Calcineurin inhibitors and corticosteroids play a particularly important role in these processes. MicroRNAs represent important regulatory molecules involved in the pathogenesis of PTDM and also appear to be promising non-invasive biomarkers. The aim of this work is to summarize current knowledge regarding the pathophysiology of PTDM, with a particular focus on the role of β-cell dysfunction, immunosuppression, and microRNAs.

Keywords: post-transplant diabetes mellitus; kidney transplantation; β-cell dysfunction; microRNA

Úvod

PTDM je definovaný ako perzistentná hyperglykémia diagnostikovaná po transplantácii u pacientov bez predchádzajúceho diabetu, pričom diagnóza sa stanovuje až po stabilizácii imunosupresívnej liečby, spravidla po 3 mesiacoch od výkonu [1]. V posledných desaťročiach sa PTDM etabloval ako jedna z najčastejších a klinicky najzávažnejších metabolických komplikácií po transplantácii solídnych orgánov. Po transplantácii obličky postihuje významnú časť pacientov a nepriaznivo ovplyvňuje funkciu štepu aj dlhodobé prežívanie príjemcov. Etiopatogenéza PTDM je multifaktoriálna a zahŕňa interakciu genetickej predispozície, inzulínovej rezistencie a diabetogénnych účinkov imunosupresív. Kľúčovú úlohu zohráva inzulínová rezistencia prítomná už pred transplantáciou, ako aj priame poškodenie β-buniek vplyvom takrolimu a glukokortikoidov [2,3].

PTDM je asociovaný so zvýšeným rizikom kardiovaskulárnych komplikácií, chronickej dysfunkcie štepu a vyššou mortalitou pacientov po transplantácii [4]. Včasná identifikácia rizikových pacientov a pochopenie molekulárnych mechanizmov podieľajúcich sa na rozvoji PTDM sú preto nevyhnutné pre optimalizáciu imunosupresívnej liečby a zlepšenie dlhodobých transplantačných výsledkov [2]. V súčasnosti narastá záujem o využitie mikroRNA ako potenciálnych biomarkerov β-bunkového poškodenia a skorých porúch glukózového metabolizmu [3]. Napriek riziku metabolických komplikácií zostáva transplantácia obličky najefektívnejšou liečbou

terminálneho zlyhania obličiek, spojenou s lepším prežívaním pacientov v porovnaní s dialyzačnou liečbou [5].

Patofyziológia a histologické súvislosti PTDM

PTDM predstavuje komplexnú metabolickú poruchu, charakterizovanú kombináciou inzulínovej rezistencie a poruchy inzulínovej sekrécie. Patogenéza zahŕňa genetické faktory, metabolické prostredie a najmä diabetogénny účinok imunosupresív [2]. Kľúčovú úlohu v tomto procese zohrávajú pankreatické β-bunky, ktoré zabezpečujú produkciu a sekréciu inzulínu a sú primárnym cieľom diabetogénnych mechanizmov spojených s PTDM. Ich dysfunkcia a poškodenie, často indukované imunosupresívami, najmä kalcineurínovými inhibítormi, vedú k narušeniu glukózovej homeostázy [3].

Pankreatické Langerhansove ostrovčeky

Langerhansove ostrovčeky predstavujú endokrinnú časť pankreasu tvorenú β-, α- a δ-bunkami, ktoré zabezpečujú reguláciu glukózovej homeostázy. Z hľadiska rozvoja PTDM majú najväčší význam β-bunky, ktoré reagujú na zvýšenú hladinu glukózy uvoľňovaním inzulínu. Tento proces umožňuje vstup glukózy do buniek a jej následné využitie ako zdroja energie. Správna funkcia β-buniek je preto nevyhnutná pre udržanie normálnej glykemickej kontroly [2]. β-bunky sú však zároveň veľmi citlivé na oxidačný stres a metabolické zmeny, čo súvisí s ich nízkou antioxidačnou kapacitou [6]. Ich poškodenie vedie k zníženej sekrécii inzulínu a poruche glukózovej homeostázy.

Mechanizmy inzulínovej sekrécie

Inzulínová sekrécia je stimulovaná zvýšenou hladinou glukózy v krvi. Po vstupe glukózy do β-buniek dochádza k jej metabolizmu, zvýšeniu pomeru ATP/ADP a uzáveru ATP-dependentných draslíkových kanálov, čo vedie k depolarizácii membrány a influxu Ca^{2+} iónov. Zvýšená intracelulárna koncentrácia Ca^{2+} následne spúšťa exocytózu inzulínových granúl [7].

Funkcia β-buniek je závislá od integrity mitochondriálneho metabolizmu. Mitochondriálna dysfunkcia a oxidačný stres narúšajú tvorbu ATP, čím znižujú schopnosť β-buniek reagovať na glukózový stimul a prispievajú k rozvoju hyperglykémie charakteristickej pre PTDM [8].

Histologické zmeny pri diabetogénnom strese

Dlhodobé pôsobenie diabetogénnych faktorov vedie k redukcii β-bunkovej masy, zmenám v architektúre pankreatických ostrovčekov a narušeniu ich bunkovej kompozície [9]. β-bunková dysfunkcia predstavuje skorú fázu poškodenia, pri ktorej dochádza k zníženej schopnosti buniek reagovať na glukózový stimul a produkovať inzulín. Imunosupresíva, najmä takrolimus, indukujú apoptózu β-buniek a znižujú ich proliferáciu [10]. V niektorých prípadoch sú pozorované aj známky fibrózy a zápalu pankreatického tkaniva. Histologické zmeny ostrovčekov môžu byť hodnotené imunohistochemicky pomocou markerov inzulínu, glukagónu a apoptotických markerov, čo umožňuje detailnejšiu charakterizáciu poškodenia β-buniek. Okrem apoptózy môže chronický metabolický stres viesť aj k dediferenciácii β-buniek a strate ich funkčného fenotypu. Významnú úlohu zohráva aj endoplazmatický stres, ktorý prispieva k aktivácii proapoptotických signálnych dráh [11].

Metabolické zmeny po transplantácii

Po transplantácii obličky dochádza k výrazným zmenám metabolizmu glukózy, lipidov a energetickej rovnováhy organizmu. Takrolimus inhibuje inzulínovú sekréciu prostredníctvom kalcineurín–NFAT dráhy a zvyšuje apoptózu β-buniek [2].

Okrem kalcineurínových inhibítorov aj kortikosteroidy indukujú inzulínovú rezistenciu prostredníctvom zvýšenia hepatálnej glukoneogenézy, zníženia periférneho vychytávania glukózy a stimulácie lipolýzy. Tieto mechanizmy vedú k hyperglykémii a sekundárne zvyšujú nároky na inzulínovú sekréciu [3]. Na rozvoji PTDM sa podieľajú aj neimunologické faktory, ako sú vyšší vek, obezita, genetická predispozícia, infekcie a chronický zápal, ktoré môžu zhoršovať inzulínovú senzitivitu a prispievať k progresii metabolických porúch [2].

Vzhľadom ku komplexnosti procesov vedúcich k dysfunkcii β-buniek a inzulínovej rezistencii narastá záujem o identifikáciu skorých molekulárnych markerov, ktoré by umožnili predikciu rozvoja PTDM ešte pred manifestáciou klinických príznakov. V tomto kontexte sa do popredia dostávajú mikroRNA ako významné regulátory génovej expresie podieľajúce sa na riadení kľúčových metabolických procesov.

MikroRNA ako regulátory metabolizmu glukózy a ich potenciál ako biomarkery PTDM

MikroRNA sú krátke nekódujúce RNA molekuly regulujúce génovú expresiu na posttranskripčnej úrovni [12]. V β-bunkách ovplyvňujú inzulínovú sekréciu, proliferáciu a apoptózu. Vďaka stabilite v biologických tekutinách predstavujú perspektívne neinvazívne biomarkery PTDM, ktoré môžu umožniť skorú identifikáciu rizikových pacientov a personalizáciu imunosupresívnej liečby [2,13]. Ich klinické využitie však zatiaľ vyžaduje ďalšiu validáciu.

MikroRNA sú stabilné v extracelulárnom prostredí vďaka väzbe na proteíny alebo transportu v extracelulárnych vezikulách. Ich expresia môže byť analyzovaná pomocou kvantitatívnej PCR, čo umožňuje detekciu aj malých zmien v expresných profiloch. V kontexte PTDM sa skúma ich potenciál pri včasnej identifikácii pacientov so zvýšeným rizikom rozvoja poruchy glukózového metabolizmu po transplantácii [14].

V posledných rokoch sa mikroRNA dostávajú do popredia záujmu ako potenciálne biomarkery včasnej diagnostiky PTDM. Expresné profily jednotlivých miRNA môžu odrážať rozsah β-bunkového poškodenia, mieru inzulínovej rezistencie a intenzitu metabolického stresu po transplantácii [13,14]. Viaceré štúdie poukazujú na asociáciu medzi zmenenou expresiou miR-375, miR-29 a rozvojom porúch glukózového metabolizmu ešte pred manifestáciou klinicky evidentného diabetu [13,17].

Jednou z najviac študovaných mikroRNA v pankreatických β-bunkách je miR-375, ktorá zohráva zásadnú úlohu v regulácii inzulínovej sekrécie. Experimentálne štúdie ukázali, že miR-375 reguluje exocytózu inzulínových granúl a jej nadmerná expresia vedie k inhibícii inzulínovej sekrécie, zatiaľ čo jej deficit je spojený s poruchou glukózovej homeostázy [15,16]. Ďalšou významnou skupinou sú členovia rodiny miR-29 (miR-29a, miR-29b, miR-29c), ktoré sa podieľajú najmä na regulácii inzulínovej signalizácie a inzulínovej rezistencie. Zvýšená expresia miR-29 bola asociovaná so zníženou expresiou inzulínových receptorových substrátov a poruchou inzulínovej signalizácie v periférnych tkanivách, čo prispieva k rozvoju inzulínovej rezistencie [17].

Okrem toho sa na regulácii metabolizmu glukózy podieľajú aj ďalšie miRNA, ako miR-9, miR-124, miR-34a, ktoré ovplyvňujú diferenciáciu β-buniek, ich proliferáciu a apoptózu [13]. V kontexte PTDM nadobúdajú mikroRNA osobitný význam, keďže reflektujú kombinovaný efekt metabolického stresu, imunosupresívnej liečby a

individuálnej genetickej predispozície pacienta. Zmeny v ich expresii boli pozorované už v skorých štádiách poruchy glukózovej tolerancie, čo naznačuje ich potenciál ako skorých diagnostických markerov ešte pred rozvojom manifestného diabetu.
Napriek sľubným výsledkom však zatiaľ neexistujú štandardizované diagnostické protokoly pre rutinné klinické využitie mikroRNA. Limitáciou zostáva heterogenita štúdií, rozdielne metodiky izolácie a kvantifikácie miRNA, ako aj nedostatočná validácia vo veľkých transplantačných kohortách [2,13].

Záver

PTDM je komplexná metabolická komplikácia charakterizovaná interakciou inzulínovej rezistencie, β-bunkovej dysfunkcie a účinkov imunosupresív. Z histologického hľadiska sa tieto procesy prejavujú progresívnymi zmenami v štruktúre Langerhansových ostrovčekov, vrátane redukcie β-bunkovej masy a zvýšenej apoptózy buniek.
Perspektívnym smerom ďalšieho výskumu je identifikácia spoľahlivých molekulárnych biomarkerov umožňujúcich skorú predikciu PTDM a individualizáciu imunosupresívnej liečby. Implementácia mikroRNA do klinickej praxe by v budúcnosti mohla prispieť k včasnej diagnostike metabolických komplikácií a k zlepšeniu dlhodobého prežívania pacientov aj funkcie transplantovaného orgánu. Budúci výskum by sa mal zamerať na validáciu špecifických expresných profilov mikroRNA vo veľkých transplantačných kohortách a na ich integráciu do klinických diagnostických algoritmov. Kombinácia molekulárnych biomarkerov s klinickými rizikovými faktormi by mohla zlepšiť predikciu PTDM a umožniť cielenejšiu individualizáciu liečby.

Práca bola podporená grantom UK/3034/2025 – MicroRNA a potransplantačný diabetes mellitus, a tiež grantom VEGA 1/0051/26 – Prediktory potransplantačného diabetes mellitus (PTDM) pomocou microRNA po transplantácii obličky – PREDICT-PTDM.

Literatúra:

[1] Lin, *Diabetol Metab Syndr*. **2021**, 13(1):126.
[2] Sharif, *Nephrol Dial Transplant*. **2024**, 39(3):531-549.
[3] Pham, *J Clin Med.* **2024**, *13*:793.
[4] Valderhaug, *Diabetologia*. **2011**, 54(6):1341-1349.
[5] Wolfe, *N Engl J Med*. **1999**, 341(23):1725-1730.
[6] Robertson, *J Biol Chem.* **2004**, 279(41):42351-42354.
[7] Rutter, *Biochem J*. **2015**, 466(2):203-18.
[8] Campbell**,** *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2021**, 22(2):142-158.
[9] Weir, *Diabetes*. **2004**, 53(3):16-21.
[10] Hecking, *Nephrol Dial Transplant*. **2013**, 28(3):550-66.
[11] Cnop, *Trends Mol Med*. **2012**, 18(1):59-68.
[12] Bartel, *Cell*. **2004**, 116(2):281-297.
[13] LaPierre, *Mol Metab.* **2017**, 6(9):1010-1023.
[14] Mitchell, *Proc Natl Acad Sci*. **2008**, 105(30):10513-10518.
[15] Poy, *Nature*. **2004,** 432(7014):226-30.
[16] Poy, *Proc Natl Acad Sci*. **2009**, 106(14):5813-8.
[17] He, *FEBS Lett.* **2007**, 581(15):2785-2789.

Pokroky v imunohistochémii a ich význam pre personalizovanú medicínu a digitálnu patológiu

Krajňáková, B.

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

Abstract

Immunohistochemistry (IHC) is a key tool in oncological diagnostics and biomedical research, particularly in the era of personalized medicine. Unlike other molecular methods, IHC enables the visualization of specific antibody–antigen interactions directly within tissue sections while preserving cellular and histological architecture. In practice, two main approaches are used depending on the detection strategy and signal amplification requirements: the rapid direct method and the more sensitive indirect method. Currently, IHC allows clinicians to determine tumor origin, assess biological aggressiveness, and evaluate predictive and prognostic markers such as Ki-67, HER2, PD-L1, and mismatch repair proteins. Recent developments, including multiplex IHC and recombinant antibodies, are expanding the potential applications of IHC in forensic medicine, particularly in the assessment of post-mortem marker degradation. In addition, digital pathology and artificial intelligence (AI) help overcome the limitations of subjective visual assessment by enabling objective quantitative analysis. The integration of digital technologies with human expertise improves the reproducibility and efficiency of IHC in both clinical and forensic settings.

Keywords: IHC, oncology, diagnostics, forensic medicine, AI

Princíp IHC

Imunohistochémia (IHC) patrí medzi základné metódy využívané v súčasnej onkologickej diagnostike. Umožňuje presnú subtypizáciu nádorov a rutinné hodnotenie dôležitých markerov [1]. Diagnostická presnosť IHC markerov sa môže líšiť v závislosti od typu nádoru, použitého markera a metodických faktorov [2]. Princípom tejto metódy je vysoko špecifická väzba medzi aplikovanou protilátkou a konkrétnym antigénom priamo v tkanivovom reze. Výsledný imunokomplex sa zviditeľní chemickou reakciou, pri ktorej enzým premieňa chromogén na farebný produkt pozorovateľný pod mikroskopom. Na rozdiel od metód, ktoré vyžadujú narušenie bunkových štruktúr a tkaniva, sa IHC analýza vykonáva priamo na tenkých histologických rezoch. Vďaka tomu zostáva cytologická a histologická štruktúra vzorky zachovaná [3]. V porovnaní s molekulárnymi technikami, ako sú Western blot alebo ELISA, poskytuje IHC informáciu nielen o prítomnosti sledovaného proteínu, ale aj o jeho lokalizácii v rámci tkaniva. Hoci uvedené techniky umožňujú presnú kvantifikáciu proteínu, neumožňujú určiť, ktoré konkrétne bunky sú zdrojom jeho expresie [1].

Základné metódy IHC

Výber konkrétnej IHC metódy závisí od účelu vyšetrenia, požadovanej citlivosti a vlastností analyzovanej vzorky. Rozlišujeme priamu a nepriamu IHC metódu [3, 4]. Priama metóda je založená na väzbe primárnej protilátky označenej fluorochrómom

alebo enzýmom na fixovaný antigén. Výhodou priamej metódy je najmä rýchlosť, jednoduchosť a minimálne riziko skrížených reakcií tzv. cross-linkingu. Na druhej strane na jedno cieľové miesto pripadá len obmedzený počet značiek, preto táto metóda nedosahuje takú vysokú citlivosť. Nepriama metóda využíva dve protilátky. Najskôr sa aplikuje neoznačená primárna protilátka, ktorá sa špecificky viaže na antigén. Následne sa na ňu naviaže značená sekundárna protilátka zabezpečujúca detekciu vzniknutého imunokomplexu. Tá je namierená proti imunoglobulínom živočíšneho druhu, v ktorom bola primárna protilátka pripravená. Keďže sa na jednu primárnu protilátku môže naviazať viacero sekundárnych protilátok, dochádza k výraznému zosilneniu signálu. Vďaka tomu je možné detegovať aj slabo exprimované markery [5].

Význam IHC

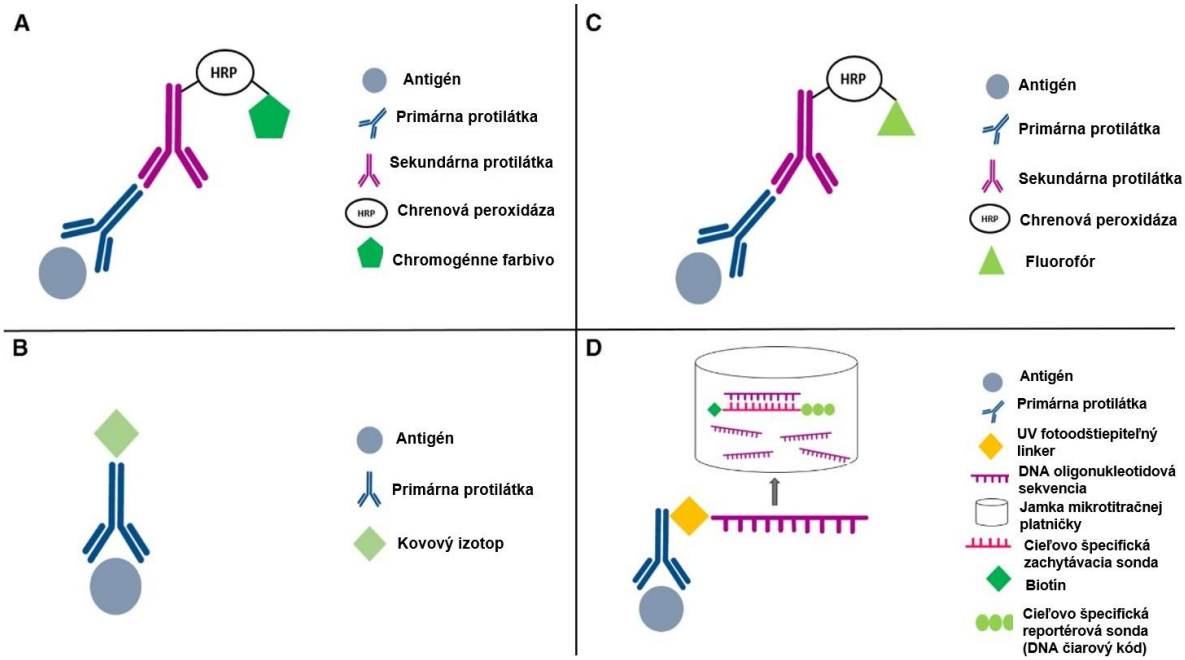
IHC už v onkológii neslúži len na základné overenie histologického typu tkaniva. Vzhľadom na vývoj nových diferenciálno-diagnostických, prediktívnych a prognostických markerov dnes tvorí neodmysliteľnú súčasť manažmentu pacientov s malignitami prsníka, pľúc či gastrointestinálneho traktu. Výsledok IHC analýzy poskytuje informácie o histogenetickom pôvode tumoru, jeho biologickej agresivite a predpokladanej odpovedi na liečbu [3]. Typickým príkladom z klinickej praxe je stanovovanie expresie mismatch repair proteínov (MMR) alebo PD-L1, ktoré poskytuje dôležité informácie pre výber personalizovanej imunoterapie a odhalenie dedičných genetických predispozícií [2]. Nádorové bunky využívajú proteín PD-L1 na to, aby unikli imunitnému dozoru. Väzbou na receptor PD-1 T-lymfocytov utlmujú ich obrannú reakciu. Vyššia expresia tohto proteínu by mohla súvisieť s vyššou pravdepodobnosťou odpovede na liečbu inhibítormi ako pembrolizumab a nivolumab, avšak sama osebe nezaručuje terapeutický úspech. Naopak, nízka alebo nulová prítomnosť tohto markeru signalizuje minimálny terapeutický prínos. Keďže je však expresia PD-L1 v tkanive rozložená nerovnomerne v závislosti od histologickej štruktúry tumoru, pri malých biopsiách hrozí riziko falošne negatívneho výsledku. Precízny výber reprezentatívnej vzorky na IHC analýzu je preto pre úspech celej liečby dôležitý [6].

Perspektívy ďalšieho rozvoja IHC

IHC zaznamenala za posledné desaťročie významný pokrok. Dnes patrí medzi najdôležitejšie nástroje patologickej diagnostiky a biomedicínskeho výskumu [3]. Jej prínos je významný najmä v onkológii, neurológii a diagnostike infekčných ochorení. Klasické farbenie s jedným markerom zostáva v laboratóriách široko využívané pre svoju jednoduchosť a finančnú dostupnosť [5]. V praxi sa však čoraz častejšie poukazuje na limity tejto metodiky, medzi ktoré patrí obmedzená možnosť súčasného hodnotenia viacerých markerov, horšia reprodukovateľnosť výsledkov a určitá miera subjektivity pri interpretácii nálezov. To komplikuje situáciu najmä vtedy, keď treba od seba odlíšiť morfologicky podobné tumory alebo presne vyhodnotiť expresiu dôležitých prognostických markerov, ako sú Ki-67 a HER2 [2,7]. Súčasný výskum sa preto orientuje na technologické inovácie, ako je multiplexná IHC (mIHC), vývoj stabilnejších rekombinantných protilátok a prechod na automatizované, digitálne spracovanie vzoriek [7,8].

Multiplexná imunohistochémia/imunofluorescencia (mIHC/ IF)

Táto metóda umožňuje súčasnú analýzu viacerých markerov v jednom tkanivovom reze, čím rozširuje možnosti konvenčnej IHC. Poskytuje tak podrobnejšie informácie o bunkovom zložení tkaniva, funkčnom stave buniek a ich vzájomných interakciách. Z tohto dôvodu sa metóda široko využíva najmä v onkologickej imunoterapii a pri výskume nádorového mikroprostredia, kde umožňuje hodnotenie infiltrácie tkaniva imunitnými bunkami. Súčasná detekcia viacerých markerov poskytuje možnosť analyzovať ich vzájomnú lokalizáciu a koexpresiu v rámci jedného tkanivového rezu, čím poskytuje komplexnejší pohľad na biologické procesy prebiehajúce v tkanivách. Medzi najčastejšie využívané pokročilé platformy mIHC/IF patrí Vectra, DISCOVERY ULTRA, IMC, MIBI, CODEX, DSP, ktoré umožňujú detekciu viacerých biomarkerov v jednom tkanivovom reze (Obr. 1) [7,9].



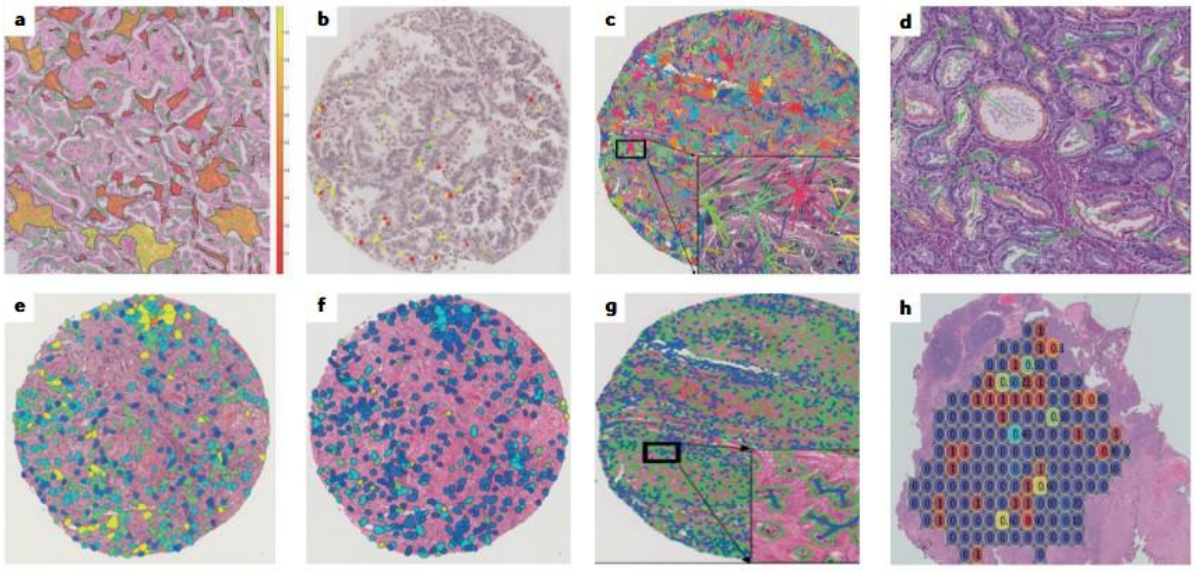
Obrázok 1 Schéma znázorňujúca mechanizmy jednotlivých platforiem mIHC/ IF. A – Systém DISCOVERY ULTRA: po inkubácii s primárnou protilátkou sa pridá sekundárna protilátka značená HRP. HRP reaguje s vhodným substrátom naviazaným na chromogénne farbivo, čo vedie k tvorbe nerozpustných farebných precipitátov v mieste výskytu antigénu. B – Techniky IHC na báze kovov (IMC, MIBI): primárna protilátka naviazaná na cieľový antigén je označená kovovým izotopom so známou molekulovou hmotnosťou. C – Vectra: po inkubácii s primárnou protilátkou sa pridá sekundárna protilátka značená HRP. Ako substrát pre HRP slúži molekula tyramidu konjugovaná s fluorofórom, čo vedie k vzniku fluorescenčného signálu asociovaného s antigénom. D – Digital Spatial Profiling (DSP), (CODEX): cieľový antigén sa naviaže na protilátku označenú DNA barkódom (upravené podľa Tan et al., 2020)

Využitie IHC pri odhade postmortálneho intervalu (PMI)

Jedným z hlavných problémov pri forenznom využití IHC je nedostatočná štandardizácia metodík, ktorá komplikuje reprodukovateľnosť výsledkov pri určovaní postmortálneho intervalu (PMI). Aktuálny výskum sa venuje využitiu rekombinantných monoklonálnych protilátok, ktoré vykazujú vysokú reprodukovateľnosť a minimálnu variabilitu medzi jednotlivými šaržami. Vďaka nízkej skríženej reaktivite poskytujú stabilnejší a reprodukovateľnejší signál. To môže prispieť k presnejšiemu hodnoteniu postmortálnej degradácie antigénov a zvýšiť spoľahlivosť odhadu PMI [8,10].

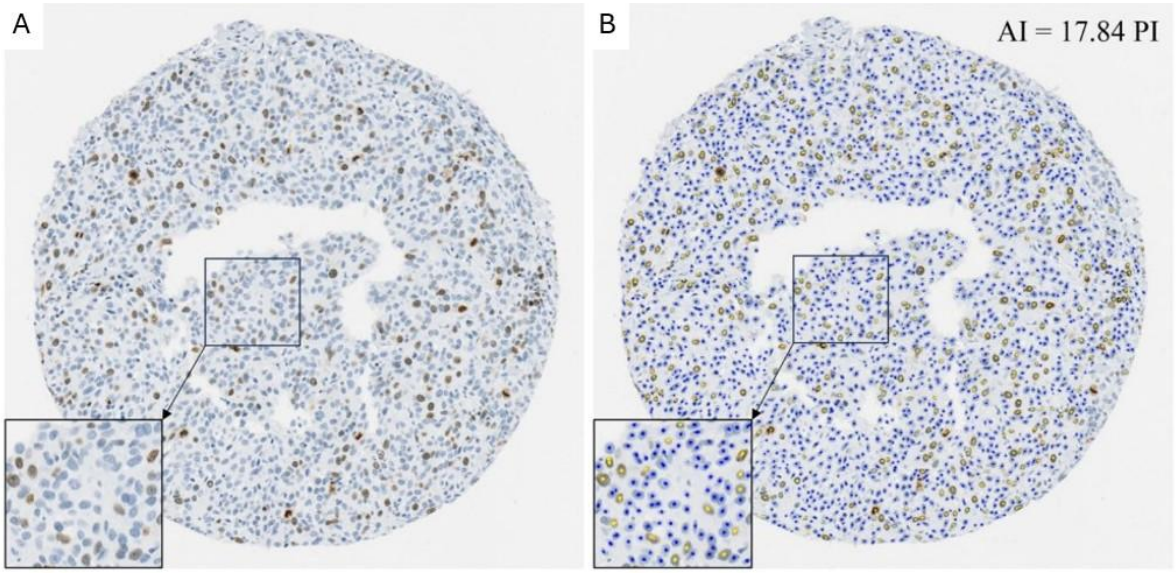
Digitalizácia a automatizácia v patológii

Podobne ako iné medicínske odbory, aj patológia v súčasnosti prechádza procesom digitalizácie a zavádzania pokročilých výpočtových technológií. Významnú úlohu pritom zohráva umelá inteligencia (AI), ktorá nachádza uplatnenie najmä v oblasti automatizovanej analýzy histologických obrazov a morfometrie. Cieľom je ukázať, aké vlastnosti tkaniva alebo buniek dokáže počítač kvantifikovať a následne využiť na diagnostiku alebo predikciu priebehu rôznych nádorových ochorení (Obr. 2).



Obrázok 2 Digitálne histopatologické snímky a príklady ručne navrhnutých morfologických charakteristík využívaných pri analýze nádorových tkanív pomocou AI. a - priestorové usporiadanie lymfocytov v NSCLC; b - zastúpenie rôznych typov imunitných buniek v NSCLC; c - rozloženie bunkových zhlukov v NSCLC; d - orientácia žliaz v rakovine prostaty; e - textúra jadier nádorových buniek pri OSCC; f - tvar jadier nádorových buniek pri HPV-pozitívnom OPSCC; g - priestorové vzťahy medzi nádorovými bunkami pri OSCC; h - bunková heterogenita pri karcinóme prsníka (upravené podľa Bera et al., 2019)

V onkologickej diagnostike sa algoritmy AI využívajú na hodnotenie expresie markerov a podporu rozhodovania pri výbere cielenej liečby. Celému procesu však predchádza štandardná laboratórna príprava. Vzorka tkaniva získaná biopsiou alebo chirurgickou excíziou sa fixuje vo formalíne a následne sa zaleje do parafínu. Parafínový blok sa nareže na tenké rezy s hrúbkou 3-4 µm, ktoré sa prenesú na podložné sklíčka. Po zhotovení preparátu sa tkanivový rez digitalizuje pomocou skenera vybaveného objektívom s 20-násobným alebo 40-násobným zväčšením. Skener sníma preparát po jednotlivých poliach, ktoré následne spája do celoplošného digitálneho obrazu. V klinickej praxi sa digitálne nástroje využívajú napríklad pri hodnotení markerov Ki-67, HER2, estrogénového a progesterónového receptora. Tieto systémy umožňujú objektívnejšiu a reprodukovateľnejšiu kvantifikáciu expresie markerov v porovnaní s tradičným semikvantitatívnym hodnotením (Obr. 3). Zároveň poskytujú patológovi možnosť overiť správnosť identifikácie buniek, odhaliť potenciálne chyby algoritmu a posúdiť spoľahlivosť získaných výsledkov. Využitie automatizovanej analýzy môže prispieť k zníženiu variability medzi hodnotiteľmi, zvýšeniu konzistentnosti hodnotenia a zefektívneniu diagnostického procesu [11,12,13].



Obrázok 3 Porovnanie tradičného hodnotenia expresie Ki-67 a hodnotenia pomocou AI. A – IHC preparát karcinómu prsníka hodnotený konvenčným spôsobom, pri ktorom patológ vizuálne identifikuje Ki-67 pozitívne nádorové bunky a stanovuje proliferačný index (PI). B – Hodnotenie pomocou AI, ktorá automaticky deteguje jadrá nádorových buniek, klasifikuje ich na Ki-67 pozitívne/ negatívne a zároveň vypočíta hodnotu PI. AI označuje Ki-67 pozitívne a negatívne nádorové jadrá priamo v obraze preparátu, čím umožňuje vizuálnu kontrolu výsledku patológom (upravené podľa Dy et al., 2024)

Záver

IHC patrí medzi základné metódy modernej patologickej diagnostiky a zohráva významnú úlohu najmä v onkológii. Umožňuje identifikáciu a lokalizáciu markerov priamo v tkanive, čím poskytuje cenné informácie pre diagnostiku, stanovenie prognózy aj výber vhodnej liečby. Vďaka schopnosti zachovať morfologickú štruktúru tkaniva dopĺňa molekulárne diagnostické metódy a poskytuje informácie, ktoré by inými postupmi nebolo možné získať. Napriek širokému využitiu má konvenčná IHC určité obmedzenia, medzi ktoré patrí najmä hodnotenie obmedzeného počtu markerov a variabilita interpretácie výsledkov. Súčasný vývoj preto smeruje k zavádzaniu mIHC/IF, rekombinantných protilátok a digitálnej patológie podporenej algoritmami AI. Tieto prístupy rozširujú diagnostické možnosti IHC, zvyšujú reprodukovateľnosť výsledkov a prispievajú k presnejšiemu hodnoteniu tkanív. Digitálna patológia a AI prinášajú nové možnosti v hodnotení histologických preparátov. Ich úlohou nie je nahradiť patológa, ale doplniť jeho odborný úsudok o objektívne kvantitatívne údaje a podporiť rozhodovací proces. Ďalší rozvoj týchto technológií by mohol prispieť k presnejšej diagnostike, efektívnejšiemu využívaniu personalizovanej liečby a širšiemu uplatneniu IHC v klinickej aj forenznej praxi.

Literatúra

[1] Mebratie, *Seminars in Diagnostic Pathology*. **2024**, 41(3):154-160.
[2] Hazra, *J Contemp Clin Pract*. **2026**, 12(1):538-548.
[3] Magaki, *Methods Mol Biol*. **2019**, 1897:289-298.
[4] Park, *Mol. Cells.* **2025**, 48(1):100157.
[5] Kaine, *Asian Journal of Medical Principles and Clinical Practice*. **2025**, 8(2):980-989.
[6] Bulutay, *Turk J Med Sci*. **2021**, 51(1): 204-213.
[7] Tan, *Cancer Commun (Lond).* **2020**, 40(4):135-153.
[8] Peltomaa, *Anal Bioanal Chem*. **2022**, 414(1):193-217.
[9] Joe, *Journal of Clinical Pathology and Laboratory Medicine*. **2023**, 5(4):156.
[10] Salermo, *Diagnostics (Basel).* **2022***,* 12(9):2114.

[11] Go, *Brain Tumor Res Treat*. **2022**, 10(2):76-82.
[12] Bera, *Nat Rev Clin Oncol*. **2019**, 16(11):703-715.
[13] Dy, *Sci Rep.* **2024**, 14(1):1283.

Morfologické kritériá viability blastocýst po devitrifikácii

Podhradská, Z.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
kocianova12@uniba.sk

Abstract

Vitrification and subsequent warming are integral components of contemporary assisted reproductive technology (ART) and are routinely used in frozen embryo transfer cycles. The survival of vitrified blastocysts depends largely on successful rehydration during warming, which is influenced by the composition and osmolarity of the warming media. Gradual removal of intracellular cryoprotective agents and controlled restoration of water balance minimize osmotic injury and help preserve cellular integrity. Following warming, embryo viability is assessed using several morphological criteria, including blastocoel re-expansion, preservation of the inner cell mass (ICM), and the structural integrity of the trophectoderm (TE). Among these parameters, the degree of blastocyst re-expansion is considered one of the most informative indicators of post-warming viability and developmental potential. Evaluation of these morphological characteristics provides a valuable non-invasive approach for estimating implantation potential prior to embryo transfer.

Keywords: warming media, osmotic stress, blastocyst re-expansion, morphological characteristics, embryo transfer.

Úvod

Vitrifikácia v súčasnosti predstavuje jeden z najvýznamnejších pilierov modernej asistovanej reprodukcie, čo sa odzrkadľuje v prudkom náraste počtu cyklov realizovaných stratégiou *freeze-all* v posledných rokoch. Umožňuje bezpečné vykonávanie selektívneho transferu jedného embrya, čím sa výrazne znižuje riziko viacpočetnej gravidity. Zároveň poskytuje nevyhnutný časový rámec pre realizáciu preimplantačného genetického testovania (PGT) či manažmentu syndrómu ovariálnej hyperstimulácie (OHSS) práve prostredníctvom tohto prístupu [1,2]. Podstatou spomínanej stratégie (kumulatívna kryokonzervácia všetkých viabilných embryí) je zámerný odklad embryotransferu z čerstvého stimulačného cyklu do nasledujúcich, spravidla natívnych alebo hormonálne substituovaných cyklov. Kryokonzervácia všetkých životaschopných embryí umožňuje regeneráciu endometria po ovariálnej stimulácii pacientky, a následný kryoembryotransfer v optimálnom implantačnom okne, čo môže viesť k zlepšeniu implantačných výsledkov u vybraných skupín pacientok [3]. Za posledných 20 rokov sa frekvencia kryoembryotransferov v porovnaní s čerstvými transfermi výrazne zvýšila [4]. Tento trend bol umožnený predovšetkým prechodom od tradičného pomalého zmrazovania k vitrifikácii. Kým staršie protokoly pomalého mrazenia vykazovali pri blastocystách obmedzenú efektivitu s mierou prežívania embryí okolo 60 %, zavedenie vitrifikácie viedlo k zásadnému zvýšeniu úspešnosti prežívania na 78 % až 100 % [5]. Vitrifikácia sa tak stala štandardnou metódou

kryokonzervácie v modernej klinickej embryológii. Podľa súčasných noriem ESHRE (Európska spoločnosť pre ľudskú reprodukciu a embryológiu) by miera prežívania blastocýst po warmingu mala v bežnej laboratórnej praxi dosahovať minimálne 90 %, pričom špičkové, referenčné pracoviská vykazujú úspešnosť presahujúcu 99 % [6].

Princíp metódy vitrifikácie embryí využíva vysokú koncentráciu kryoprotektantov (CPA), najčastejšie etylénglykol, dimetylsulfoxid (DMSO) a rýchle ochladzovanie, keďže embryá sa ponárajú do tekutého dusíka s teplotou -196 ºC. Vďaka tomu sa bunky vyhnú tvorbe intracelulárnych a extracelulárnych ľadových kryštálov a prechádzajú priamo do amorfného stavu (sklovatenia) [7]. Hoci tento proces účinne bráni štrukturálnemu poškodeniu buniek ľadom, kritickým momentom zostáva spätné zahrievanie, kedy môže dôjsť k devitrifikácii (nežiadúcej kryštalizácii) [5]. V procese zahrievania embryo čelí prudkým fyzikálnym a osmotickým zmenám. Bunky sú totiž po predchádzajúcej vitrifikácií dehydrované a nasýtené penetrujúcimi kryoprotektívnymi látkami. Pri prechode embrya späť do fyziologického prostredia môže náhly pokles extracelulárnej osmolality vyvolať nekontrolovaný influx vody do buniek. Výsledkom môže byť narušenie bunkovej integrity alebo ireverzibilná lýza blastomér. Úspešné prežitie a zachovanie bunkovej integrity embrya v tejto kritickej fáze závisí od maximalizácie rýchlosti zahrievania, optimálneho zloženia médií a striktného dodržania expozičných časov v jednotlivých fázach protokolu [5,8,9].

Mechanizmus účinku devitrifikačných roztokov

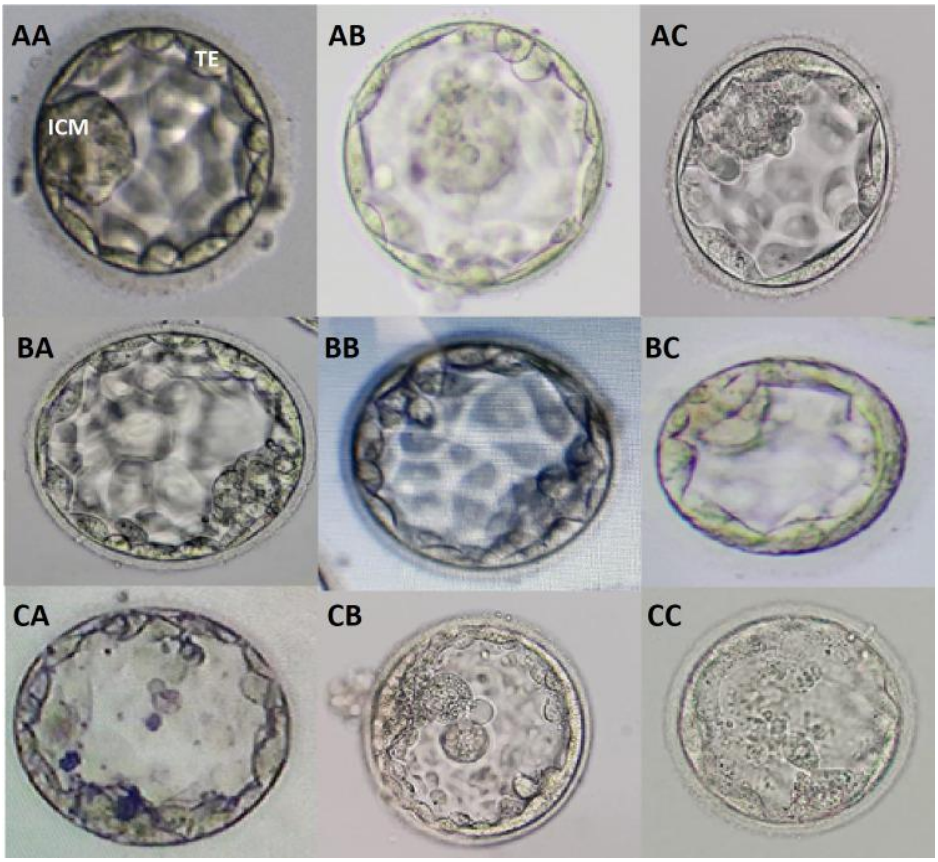
Komerčne dostupné devitrifikačné protokoly štandardne využívajú viacstupňový, najčastejšie trojkrokový systém. Jeho cieľom je postupné znižovanie koncentrácie kryoprotektantov prítomných vo vnútri blastocysty, čo zabraňuje vzniku osmotického šoku a následnej lýze buniek. Túto plynulú osmotickú stabilizáciu zabezpečujú nepenetrujúce sacharidy, prítomné v zahrievacom roztoku - najčastejšie sacharóza alebo trehalóza. Keďže tieto disacharidy nedokážu prestúpiť cez intaktnú plazmatickú membránu blastomér, udržiavajú vysokú extracelulárnu osmolalitu. Vytvorený transmembránový gradient umožňuje intracelulárnym kryoprotektantom bezpečne a kontrolovane difundovať von z bunky. Celý mechanizmus zároveň reguluje rýchlosť rehydratácie blastocysty a bráni náhlemu, deštruktívnemu influxu vody do vnútrobunkového priestoru [8,9]. V praxi tento trojstupňový proces prebieha postupným prenosom embrya do troch roztokov s klesajúcou koncentráciou sacharózy. V úvodnom zahrievacom médiu (Thawing Solution; 1,0 M sacharóza) vedie vysoká koncentrácia extracelulárnej sacharózy k rýchlej difúzii intracelulárnych kryoprotektantov do extracelulárneho priestoru. To vedie k výraznej dehydratácii a dočasnému scvrknutiu blastomér. Následný prenos embrya do druhého roztoku (Dilution Solution; 0,5 M sacharóza) znižuje vonkajší osmotický tlak, čím iniciuje kontrolovaný vstup vody do vnútrobunkového priestoru. Paralelne s týmto procesom pokračuje vyplavovanie zvyškových kryoprotektantov. Proces je ukončený v premývacom roztoku (Washing Solution; 0 M sacharóza), kde v čistom kultivačnom médiu prebieha finálna rehydratácia buniek a obnova ich pôvodného fyziologického objemu [10]. Súčasným trendom v klinickej praxi je však snaha o zjednodušenie tohto postupu. Najnovšie dáta ukazujú, že prechod na jednokrokové otepľovanie (*single-step warming*) predstavuje plnohodnotnú a klinicky validovanú alternatívu k týmto

viacstupňovým protokolom. Výskumy naznačujú, že eliminácia jednotlivých premývacích medzikrokov môže znížiť manipulačné riziko pri zachovaní porovnateľných klinických výsledkov v porovnaní s viacstupňovými protokolmi [8,10].

Morfologické markery viability embryí po devitrifikácii

Pri hodnotení viability embryí po warmingu sa využíva súbor morfologických kritérií, ktoré umožňujú posúdiť stav bunkovej integrity a štrukturálnej organizácie blastocysty po kryokonzervácii. Medzi základné parametre patrí stupeň re-expanzie blastocelu, podiel prežívajúcich buniek a morfologická kvalita trofektodermu (TE) a vnútornej bunkovej masy (ICM) [11,12,13]. Hodnotenie po devitrifikácii nadväzuje na morfologickú klasifikáciu embryí pred vitrifikáciou a poskytuje informáciu o rozsahu kryopoškodenia a zachovaní vývojového potenciálu embrya.

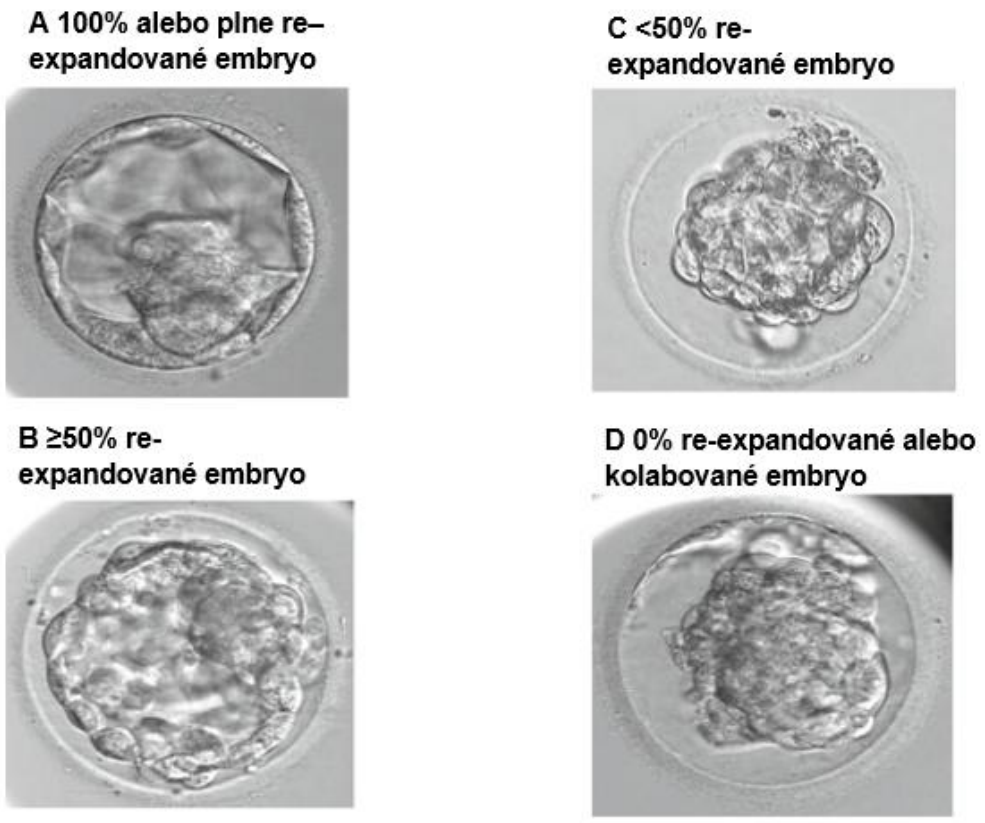
Pred vitrifikáciou sa blastocysty štandardne hodnotia podľa Gardnerovej klasifikácie (Obr. 1) [14]. Tá zahŕňa stupeň expanzie blastocysty na škále 1 – 6 podľa veľkosti blastocelovej dutiny a miery hatchingu zo zona pellucida, ako aj hodnotenie kvality vnútornej bunkovej masy (ICM) a trofektodermu (TE) v stupňoch A – C na základe počtu buniek, ich usporiadania a morfologického vzhľadu. Viaceré práce preukázali, že morfologická kvalita ICM a TE spolu so stupňom expanzie blastocysty pred vitrifikáciou patria medzi dôležité faktory súvisiace s prežívaním embryí po warmingu a úspešnosťou implantácie, pričom tieto parametre vykazujú aj asociáciu s klinickými výsledkami vrátane živonarodených detí [12,13,14].



Obrázok 1 Príklady blastocýst s rôznou kvalitou vnútornej bunkovej masy (ICM) a trofektodermu (TE) podľa Gardnerovej klasifikácie. Označenia AA, AB a AC predstavujú blastocysty s kvalitnou ICM a

dobrou, priemernou alebo nízkou kvalitou TE. Kategórie BA, BB a BC zahŕňajú blastocysty s priemernou kvalitou ICM a dobrou, priemernou alebo nízkou kvalitou TE. Kategórie CA, CB a CC predstavujú blastocysty s nízkou kvalitou ICM a dobrou, priemernou alebo nízkou kvalitou TE. Hodnotenie kvality ICM a TE vychádza z počtu buniek, ich kompaktnosti, usporiadania a morfologického vzhľadu [14]

Po devitrifikácii sa životaschopnosť embryí hodnotí predovšetkým podľa stupňa re-expanzie blastocelu, podielu prežívajúcich buniek a zachovania morfologickej integrity oboch bunkových línií (ICM, TE) [11,12,13]. Morfologické hodnotenie sa najčastejšie vykonáva po krátkej kultivácii po warmingu, zvyčajne v intervale 2 – 6 hodín, keď je možné spoľahlivejšie posúdiť schopnosť blastocysty obnoviť svoju štruktúru a objem. Na základe týchto znakov sa blastocysty po warmingu klasifikujú podľa stupňa re-expanzie blastocelovej dutiny na plne re - expandované, čiastočne re - expandované a kolabované formy (Obr. 2).



Obrázok 2 Klasifikácia blastocýst po warmingu podľa stupňa re-expanzie blastocelu a percenta prežívajúcich buniek (upravené podľa Allen, 2022). Schéma znázorňuje základné morfologické kategórie blastocýst hodnotených po devitrifikácii: (A) plne re-expandovaná blastocysta s obnovou blastocelovej dutiny a >90 % prežívajúcich buniek, (B) čiastočne re-expandovaná blastocysta s čiastočnou obnovou objemu a 50–90 % prežívajúcich buniek a (C) kolabovaná blastocysta s minimálnou alebo absentnou re-expanziou a <50 % prežívajúcich buniek. Stupeň re-expanzie odráža schopnosť trofektodermu obnoviť transport iónov a tekutín potrebný na opätovné vytvorenie blastocelu, zatiaľ čo percento prežívajúcich buniek predstavuje ukazovateľ rozsahu kryopoškodenia vzniknutého počas vitrifikácie a warmingu. Kombinované hodnotenie týchto parametrov poskytuje významnú informáciu o post-devitrifikačnej viabilite embrya a jeho implantačnom potenciáli

Re - expanzia blastocysty po warmingu reflektuje najmä funkčnú aktivitu trofektodermu potrebnú na obnovu blastocelovej dutiny. Podiel prežívajúcich buniek zároveň ukazuje

rozsah bunkového poškodenia vzniknutého v dôsledku kryokonzervácie. Tieto parametre spolu pomerne dobre korelujú s celkovou morfologickou integritou embrya po rozmrazení [11].

Celkové zhodnotenie viability embryí po devitrifikácii stojí na kombinácii predvitrifikačných morfologických charakteristík (najmä kvality ICM, TE a stupňa expanzie) a post-warmingových parametroch ako je stupeň re - expanzie a podiel prežívajúcich buniek. Ich spoločné hodnotenie poskytuje prakticky využiteľnú informáciu o implantačnom potenciáli embrya a jeho ďalšom vývojovom potenciáli [12].

Záver

Zhodnotenie viability blastocýst po devitrifikácii je dôležitou súčasťou rozhodovania o ich vhodnosti na embryotransfer. Medzi najvýznamnejšie morfologické ukazovatele patrí stupeň re-expanzie blastocelu, zachovanie integrity trofektodermu a vnútornej bunkovej masy, ako aj podiel prežívajúcich buniek. Tieto parametre poskytujú cennú neinvazívnu informáciu o stave embrya po warmingu a jeho ďalšom vývojovom potenciáli. Ich kombinované hodnotenie umožňuje presnejšie odhadnúť implantačný potenciál blastocysty a predstavuje významný nástroj pri výbere embryí určených na transfer v klinickej praxi asistovanej reprodukcie.

Literatúra

[1] Rienzi**,** *Hum Reprod*. **2020**, 35:2640-2656.
[2] Nagy, *Fertil Steril.* **2020**, 113:241-247.
[3] Sciorio, *Cryobiology.* **2020**, 92:9-14.
[4] Amin, *JIVFww.* **2026**, 4:1-14.
[5] Sciorio, *Front Cell Dev Bio*. **2024**, 12:1358942.
[6] Coticchio, *Hum Reprod*. **2025**, 40:989-1035.
[7] Loutradi, *Fertil Steril.* **2008,** 90:186-193.
[8] Licata, *J Assist Reprod Genet.* **2025**, 42:1101-1107.
[9] Hwang, *Clin Exp Reprod Med.* **2020,** 47:312-318.
[10] Gheselle, *Hum Reprod*. **2026**, 41:531-540.
[11] Allen, *J Assist Reprod Genet*. **2022**, 39:417-425.
[12] Coello, *Reprod Biomed Online.* **2021**, 42:881-891.
[13] Gabrielsen, *J Clin Med.* **2023**, 12:6389.
[14] Sivanantham, *PeerJ.* **2022**, 10:4717.

Implementácia softvéru ZEISS LabScope Teacher do výučby histológie: cesta k vytvoreniu digitálnej triedy

Mešťanová, V.[1], Bálentová, S. [1], Kovalská, M. [1], Krajňáková, B. [1], Podhradská, Z. [1], Hrabovský, M.[2], Akusevich, A.[3]

[1] Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; [2] Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav informačných technológií, Martin; [3] Lambda Life a.s., Bratislava

veronika.mestanova@uniba.sk

Abstract

Histology is a fundamental component of undergraduate medical education, requiring effective visualization of microscopic structures and active student engagement. This study presents the implementation of the ZEISS Labscope Teacher system in histology teaching at the Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University, with the aim of establishing a digital classroom environment. At the current stage, the system enables one-way transmission of the teacher's microscopic image to students' smart devices, improving access to high-quality digital visualization during practical classes. To evaluate student perceptions, a questionnaire survey was conducted among 78 of 141 students enrolled in the course (response rate 55.3%). Students rated the system positively, particularly in terms of image quality, orientation in histological specimens, and overall contribution to teaching quality. Most respondents also supported further development of the digital classroom by equipping student microscopes with cameras to enable mutual interaction. The findings suggest that digital microscopy represents a promising tool for innovation in histology education.

Keywords: undergraduate study, digitalisation, histology, microscopy

Úvod

Výučba histológie tvorí jeden zo základných pilierov pregraduálneho medicínskeho vzdelávania. Študenti prvých ročníkov počas nej získavajú podrobné poznatky o mikroskopickej štruktúre, forme a funkcií buniek spájajúcich sa do tkanív, ktoré vo vzájomnej súhre tvoria orgány a orgánové systémy ľudského tela. Tieto vedomosti predstavujú nevyhnutný predpoklad pre pochopenie fyziologických procesov, rozpoznanie patologických zmien súvisiacich s rozvívajúcim sa ochorením a následné klinické rozhodovanie vrátane diagnostiky a manažmentu liečby. Tradičná výučba histológie je založená na práci so svetelným mikroskopom a histologickými preparátmi. Vzhľadom k nezastaviteľnému pokroku vo svete technológií sa v posledných rokoch čoraz viac objavuje implementácia digitálnych nástrojov nielen do klinickej praxe a diagnostiky [1], ale rovnako sa objavujú možnosti na zvýšenie interaktivity výučby, efektivity komunikácie medzi vyučujúcim a študentmi, či podpory aktívneho učenia [2]. S cieľom modernizovať praktickú výučbu predmetu Histológia a embryológia na Jesseniovej lekárskej fakulte UK v Martine bol na pracovisku zatiaľ čiastočne implementovaný systém ZEISS Labscope Teacher. Ide o softvérové riešenie určené pre digitálne prepojené mikroskopické zázemie, ktoré umožňuje zobrazenie živého obrazu z mikroskopu na rôznych smart zariadeniach, správu výučby a zlepšuje

komunikáciu medzi vyučujúcim a študentmi. Softvér umožňuje jednoduché zdieľanie obrazu, dokumentov a ďalších vzdelávacích materiálov [3].
V súčasnej fáze implementácie je digitálna trieda na Ústave histológie a embryológie JLF UK v Martine využívaná predovšetkým na jednosmerný tok digitálneho obrazu z mikroskopu vyučujúceho do zariadení študentov. Takýto spôsob výučby umožňuje všetkým študentom súčasne sledovať identické zorné pole, orientovať sa v histologickom preparáte a lepšie porozumieť vysvetľovaným štruktúram. Pozorované štruktúry si študenti v danom čase môžu odfotiť a uložiť do priečinku svojho zariadenia, čo zabezpečuje homogenitu študijných materiálov a zaručuje požadovanú kvalitu histologických mikrofotografií pre ich následné štúdium v domácom prostredí. Vyučujúci môže počas výučby využívať funkcie zvýrazňovania záujmových oblastí, anotácie a merania objektov, čím sa zvyšuje názornosť a efektivita prezentovaných informácií [4].

Materiál a metodika

Dôležitou súčasťou hodnotenia implementácie digitálnej triedy je spätná väzba od študentov. Na tento účel bol realizovaný anonymný dotazníkový prieskum prostredníctvom Google Forms zameraný na celkové hodnotenie prínosu digitálneho zobrazenia histologických preparátov, prehľadnosti výučby (otázky A1-A10), vplyvu na vzdelávací proces (otázky B1-B5) a budúceho rozvoja digitálnej triedy (otázky C1-C4). Do dotazníkového prieskumu sa zapojilo 78 študentov z celkového počtu 141 študentov zapísaných na predmet Histológia a embryológia, čo predstavuje návratnosť 55,3 %. Spoľahlivosť použitého dotazníka bola overená výpočtom Cronbachovho koeficientu α. Celková hodnota pre všetky položky Likertovej škály (1-úplne nesúhlasím ... 5-úplne súhlasím) dosiahla α = 0,886, čo potvrdzuje dobrú vnútornú konzistenciu použitého nástroja. Pri jednotlivých položkách sa štatisticky vyhodnotili údaje ako aritmetický priemer (Mean), štatistická odchýlka (SD), medián a percento súhlasu (pomer odpovedí 4 a 5 Likertovej škály voči celkovému počtu odpovedí).

Výsledky

Hodnotenie systému ZEISS Labscope Teacher

Výsledky ukázali vysokú mieru akceptácie systému ZEISS Labscope Teacher zo strany študentov (Tabuľka 1: A1-A10). Najvyššie hodnotenou položkou bolo tvrdenie, že digitálny prenos obrazu umožňuje lepšie sledovanie vysvetľovaných histologických štruktúr (M = 4,62; SD = 0,69), pričom súhlas vyjadrilo 93,6 % respondentov. Rovnako pozitívne bola hodnotená kvalita digitálnych preparátov (M = 4,50; SD = 0,66) a kvalita zobrazovaného obrazu na študentských zariadeniach (M = 4,45; SD = 0,70).
Študenti zároveň uviedli, že systém im pomáha lepšie sa orientovať v preparátoch (M = 4,37; SD = 0,82) a uľahčuje pochopenie preberaného učiva (M = 4,35; SD = 0,92). Výučba realizovaná prostredníctvom digitálneho prenosu obrazu bola vnímaná ako efektívnejšia v porovnaní s klasickou demonštráciou preparátov (M = 4,44; SD = 0,89). Najnižšie hodnotenou položkou v tejto oblasti bolo tvrdenie o zvýšení aktivity študentov počas praktických cvičení (M = 3,55; SD = 1,23), pričom súhlas vyjadrilo 53,8 % respondentov. Tento výsledok naznačuje, že implementácia systému mala výraznejší vplyv na kvalitu vizualizácie a pochopenie učiva než na samotnú aktivizáciu študentov počas výučby.

Vplyv na vzdelávací proces

Výsledky druhej časti dotazníka potvrdili pozitívny vplyv digitálnej triedy na vzdelávací proces (Tabuľka 1: B1-B5). Až 96,2 % respondentov súhlasilo s tvrdením, že digitálna trieda zvyšuje kvalitu výučby histológie (M = 4,58; SD = 0,57). Rovnaký podiel študentov odporučil ďalšie využívanie systému ZEISS Labscope Teacher vo výučbe (M = 4,68; SD = 0,63).

Pozitívne boli hodnotené aj možnosti implementácie digitálnych preparátov do ďalších predmetov medicínskeho kurikula (M = 4,40; SD = 0,84). Študenti zároveň uviedli, že digitálna výučba podporuje lepšie pochopenie vzťahov medzi štruktúrou a funkciou tkanív (M = 4,14; SD = 0,91).

Najnižšie hodnotenie v tejto oblasti dosiahla položka zameraná na motiváciu k štúdiu histológie (M = 3,69; SD = 0,98), čo naznačuje, že technologické inovácie síce zlepšujú organizáciu a efektivitu výučby, avšak ich vplyv na vnútornú motiváciu študentov je menej výrazný.

Tabuľka 1: Hodnotenie implementácie systému ZEISS Labscope Teacher študentmi (n = 78).

Otázka	Mean	SD	Medián	Súhlas (%)
A1. Digitálny prenos obrazu mi umožnil lepšie sledovať vysvetľovanú histologickú štruktúru.	4,62	0,69	5	93,6
A2. Obraz zobrazovaný na mojom zariadení bol dostatočne kvalitný na identifikáciu histologických štruktúr.	4,45	0,70	5	93,6
A3. Používanie systému mi pomohlo lepšie sa orientovať v preparátoch.	4,37	0,82	5	88,5
A4. Digitálny obraz uľahčil pochopenie preberaného učiva.	4,35	0,92	5	82,1
A5. Vďaka systému som sa mohol viac sústrediť na odborný obsah.	4,29	1,07	5	82,1
A6. Výučba bola s využitím systému efektívnejšia než klasická demonštrácia preparátov.	4,44	0,89	5	87,2
A7. Systém zvýšil moju aktivitu počas praktických cvičení.	3,55	1,23	4	53,8
A8. Ovládanie systému bolo jednoduché a intuitívne.	4,19	0,94	4	76,9
A9. Technické fungovanie systému bolo spoľahlivé.	4,24	0,84	4	84,6
A10. Kvalita digitálnych preparátov bola dostatočná pre výučbu.	4,50	0,66	5	93,6
B1. Digitálna trieda zvyšuje kvalitu výučby histológie.	4,58	0,57	5	96,2
B2. Digitálne preparáty by mali byť využívané aj v ďalších predmetoch.	4,40	0,84	5	84,6
B3. Systém zvyšuje moju motiváciu k štúdiu histológie.	3,69	0,98	4	60,3
B4. Digitálna výučba podporuje lepšie pochopenie vzťahu medzi štruktúrou a funkciou tkanív.	4,14	0,91	4	79,5
B5. Odporučil/-a by som ďalšie využívanie systému Labscope Teacher vo výučbe.	4,68	0,63	5	96,2
C1. Privítal/-a by som možnosť zdieľať obraz z vlastného mikroskopu s vyučujúcim.	4,24	0,91	4,5	79,5
C2. Možnosť okamžitej kontroly preparátu vyučujúcim by zlepšila moje učenie.	4,33	0,86	5	83,3
C3. Plnohodnotná digitálna trieda by bola prínosom pre praktickú výučbu histológie.	4,41	0,87	5	85,9
C4. Investícia do rozšírenia systému o kamery pre študentské mikroskopy je opodstatnená.	4,40	0,97	5	83,3

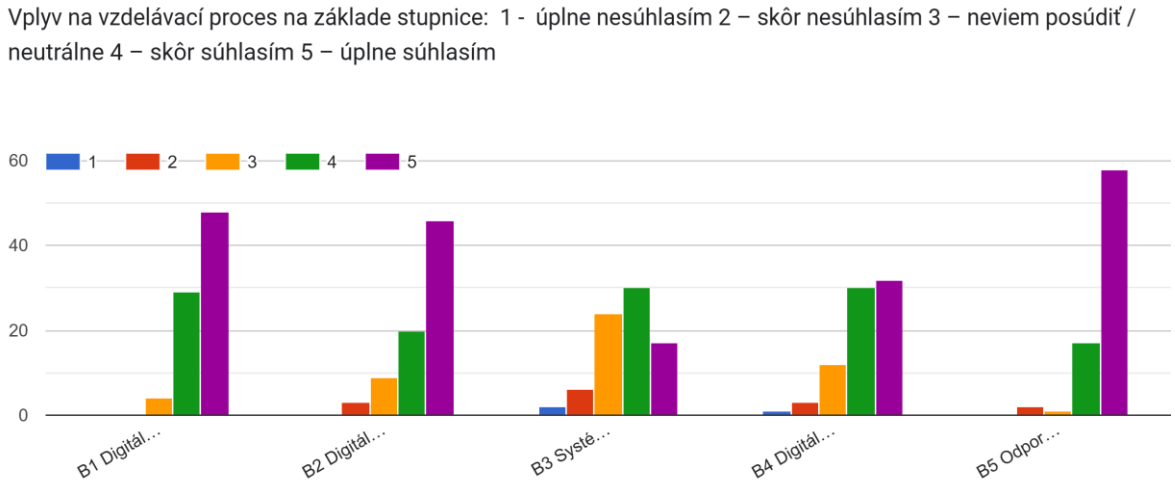
Vysvetlivky: Mean – aritmetický priemer; SD – smerodajná odchýlka; Súhlas (%) – podiel respondentov, ktorí označili odpoveď 4 („skôr súhlasím“) alebo 5 („úplne súhlasím“) na päťbodovej Likertovej škále.

Hodnotenie ďalšieho rozvoja digitálnej triedy

Pozitívne boli hodnotené aj možnosti ďalšieho rozvoja digitálnej triedy (Tabuľka 1: C1-C4, Graf 1). Respondenti podporili rozšírenie systému o kamery na študentských mikroskopoch a vytvorenie plnohodnotného obojsmerného systému komunikácie medzi študentom a vyučujúcim.

Najvyššie hodnotenie získalo tvrdenie, že plnohodnotná digitálna trieda by predstavovala prínos pre praktickú výučbu histológie (M = 4,41; SD = 0,87), pričom súhlas vyjadrilo 85,9 % respondentov. Podobne vysokú podporu získala aj investícia do rozšírenia systému o kamery pre študentské mikroskopy (M = 4,40; SD = 0,97).

Možnosť okamžitej kontroly preparátu vyučujúcim bola hodnotená priemerom 4,33 (SD = 0,86) a možnosť zdieľania obrazu z vlastného mikroskopu s vyučujúcim priemerom 4,24 (SD = 0,91). Výsledky naznačujú vysokú mieru podpory ďalšej digitalizácie praktickej výučby zo strany študentov.



Graf 1 Vizualizácia vnímania vplyvu ZEISS Labscope Teacher na vzdelávací proces

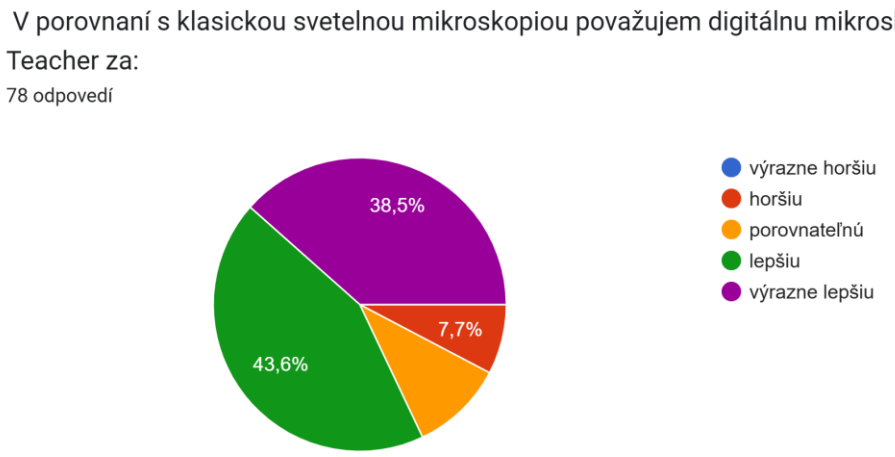
Celkové hodnotenie systému

Pri porovnaní digitálnej mikroskopie so štandardnou svetelnou mikroskopiou označilo 82,1 % respondentov digitálnu mikroskopiu za lepšiu alebo výrazne lepšiu. Iba 7,7 % študentov ju hodnotilo negatívne.

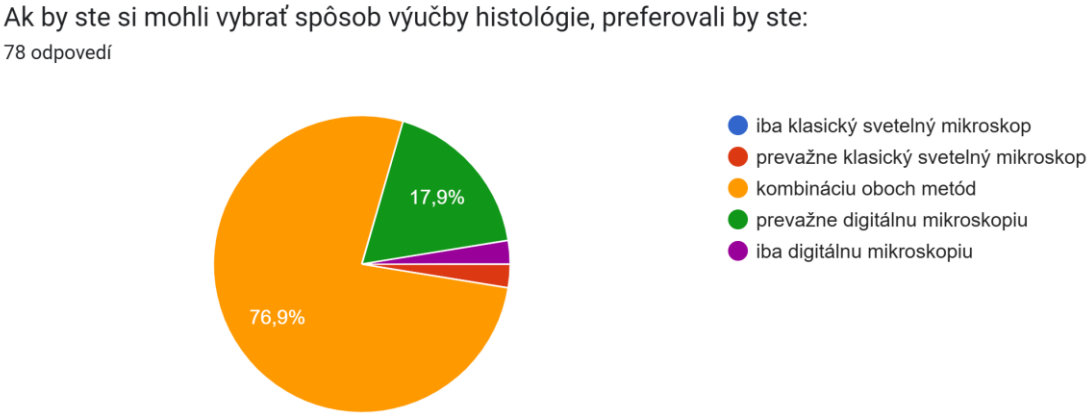
Na otázku týkajúcu sa preferovaného spôsobu výučby odpovedalo 76,9 % respondentov, že by uprednostnili kombináciu klasickej a digitálnej mikroskopie. Prevažne digitálnu alebo výlučne digitálnu formu výučby by si zvolilo 20,5 % študentov, zatiaľ čo prevažne klasický mikroskop preferovalo iba 2,6 % respondentov.

Celkové hodnotenie systému ZEISS Labscope Teacher bolo veľmi priaznivé. Za výborné alebo veľmi dobré ho označilo 83,3 % respondentov, pričom žiadny študent nehodnotil systém ako nedostatočný.

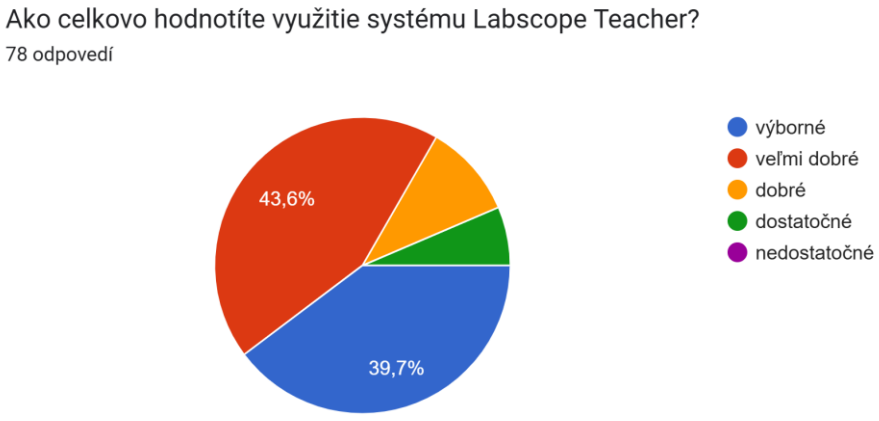
Výsledky prieskumu jednoznačne poukazujú na pozitívne prijatie systému ZEISS Labscope Teacher študentmi a podporujú ďalší rozvoj konceptu digitálnej triedy v rámci výučby histológie.



Graf 2 Porovnanie svetelnej mikroskopie s digitálnou mikroskopiou v ZEISS Labscope Teacher



Graf 3 Vizualizácia preferencií spôsobu výučby histológie



Graf 4 Vizualizácia celkového hodnotenia využitia systému ZEISS Labscope Teacher

Tabuľka 2: Súhrnné indexy vnútornej konzistencie dotazníka (Cronbachovo α). V pedagogickom a sociálno-vedeckom výskume sa najčastejšie interpretuje spoľahlivosť intervalu 0,8 – 0,89 ako dobrá.

Škála	Počet položiek	Cronbachovo α
Hodnotenie systému (A1 – A10)	10	**0,865**
Vplyv na vzdelávací proces (B1 – B5)	5	**0,843**
Budúci rozvoj digitálnej triedy (D1 – D4)	4	**0,890**
Všetky Likertove položky spolu	19	**0,886**

Spoľahlivosť použitého dotazníka bola overená výpočtom Cronbachovho koeficientu alfa (Tabuľka 2). Celková hodnota pre všetkých 19 položiek Likertovej škály dosiahla α = 0,886, čo predstavuje dobrú vnútornú konzistenciu dotazníka. Pre jednotlivé oblasti boli zistené hodnoty α = 0,865 pre hodnotenie systému ZEISS Labscope Teacher, α = 0,843 pre oblasť vplyvu na vzdelávací proces a α = 0,890 pre oblasť budúceho rozvoja digitálnej triedy. Získané výsledky potvrdzujú vysokú spoľahlivosť použitého meracieho nástroja a umožňujú považovať získané údaje za vhodné na ďalšie štatistické spracovanie a interpretáciu.

Diskusia

Výsledky realizovaného prieskumu poukazujú na pozitívne prijatie systému ZEISS Labscope Teacher študentmi medicíny a potvrdzujú potenciál digitálnych technológií pri modernizácii výučby histológie. Najvyššie hodnotené boli aspekty súvisiace s kvalitou vizualizácie preparátov, orientáciou v mikroskopickom obraze a celkovým zlepšením kvality výučby. Tieto zistenia sú v súlade s filozofiou digitálnej triedy ZEISS, ktorej cieľom je umožniť študentom sledovať identický mikroskopický obraz v reálnom čase, zlepšiť interakciu medzi vyučujúcim a študentmi a zvýšiť efektivitu praktickej výučby [3].

Zaujímavým zistením je, že napriek veľmi pozitívnemu hodnoteniu systému bol jeho vplyv na aktivitu študentov počas cvičení a na motiváciu k štúdiu hodnotený priemerne. Tento výsledok naznačuje, že samotná digitalizácia výučby automaticky nevedie k vyššej angažovanosti študentov. Aktivizácia študentov si pravdepodobne vyžaduje aj využívanie ďalších pedagogických stratégií, ako sú tímová práca, riešenie problémových úloh alebo aktívne zapájanie študentov do interpretácie mikroskopických nálezov ako uvádza Farah et al. [5].

Významným zistením je vysoká podpora ďalšieho rozvoja digitálnej triedy. Viac ako štyri pätiny respondentov podporili myšlienku vybavenia študentských mikroskopov kamerami a vytvorenia plnohodnotného obojsmerného systému komunikácie. Takéto riešenie predstavuje aj pôvodný komplexný koncept ZEISS Labscope Teacher, ktorý umožňuje vyučujúcemu sledovať obraz zo všetkých pripojených mikroskopov, poskytovať okamžitú spätnú väzbu, vytvárať pracovné skupiny a zdieľať výučbové materiály v reálnom čase.

Za významné možno považovať aj zistenie, že väčšina študentov nepreferuje úplné nahradenie klasickej mikroskopie digitálnou formou výučby, ale uprednostňuje kombináciu oboch prístupov podobne ako to uvádza vo svojej práci Kuo et al. [6]. Tento výsledok naznačuje, že študenti vnímajú digitálnu mikroskopiu ako vhodný doplnok tradičnej práce so svetelným mikroskopom, nie ako jej úplnú náhradu. Hybridný model výučby môže predstavovať optimálny kompromis medzi rozvojom praktických mikroskopických zručností a využívaním výhod digitálnych technológií.

Limitujúcim faktorom predloženej práce je fakt, že prieskumu sa zúčastnilo 78 z 141 študentov (55,3 %). Napriek tomu ide o uspokojivú návratnosť dotazníka, ktorá umožňuje považovať získané výsledky za relevantný obraz názorov študentov zapojených do výučby. Ďalším obmedzením je skutočnosť, že v čase realizácie prieskumu bola digitálna trieda využívaná iba v režime jednosmerného prenosu obrazu z mikroskopu vyučujúceho do zariadení študentov. Nebolo preto možné hodnotiť všetky funkcionality systému ZEISS Labscope Teacher, ktoré sú dostupné pri plne prepojenej sieti mikroskopov vybavených kamerami.

Napriek uvedeným obmedzeniam výsledky naznačujú, že implementácia systému ZEISS Labscope Teacher predstavuje perspektívny krok smerom nielen k digitalizácii výučby histológie, ale najmä k zvyýšeniu atraktivity tohto predmetu pre samotných študentov medicíny. Perspektívne by sa mohol výskum zamerať na hodnotenie plnohodnotnej digitálnej triedy po vybavení študentských mikroskopov kamerami, ako aj na objektívne meranie jej vplyvu na študijné výsledky, retenciu nových poznatkov, diferenviálno-diagnostické schopnosti a praktické mikroskopické zručnosti študentov.

Napriek úspešnému zavedeniu čiastočnej fázy digitálnej triedy zatiaľ nie je plne využitý potenciál systému ZEISS Labscope Teacher. Hlavným obmedzením je absencia kamier na jednotlivých študentských mikroskopoch. Z tohto dôvodu nie je v súčasnosti možné obojsmerné zdieľanie obrazu ani priebežné monitorovanie práce študentov priamo z pracoviska vyučujúceho, čo by podľa nadobudnutých výsledkov uvítali aj samotní študenti. Systém by v ďalšej fáze implementácie umožnil distribúciu študijných materiálov aj v smere študent - vyučujúci, čím by zvýšil aktívne zapojenie študenta do praktických cvičení vo forme vypracovaného protokolu, čo priamo podporí interaktívnu komunikáciu v digitálnom prostredí [4].

Plnohodnotná implementácia digitálnej triedy by si následne vyžadovala odborné zapojenie študentských mikroskopov do spoločnej siete, ktorá je v spolupráci s pracoviskom IKT už v tejto fáze projektu pripravená v plnom rozsahu pokryť nároky systému. Takéto riešenie by umožnilo vyučujúcemu sledovať obraz zo všetkých mikroskopov v reálnom čase, poskytovať okamžitú spätnú väzbu, identifikovať chyby pri práci s preparátmi a efektívnejšie usmerňovať študentov počas praktických cvičení. Realizácia tejto fázy projektu je podmienená získaním finančných prostriedkov na technické vybavenie študentských mikroskopov vo všetkých troch praktikárňach ústavu.

Záver

Implementácia systému ZEISS Labscope Teacher predstavuje významný krok smerom k digitalizácii výučby predmetu Histológia a embryológia na Jesseniovej lekárskej fakulte UK v Martine. Už súčasná forma digitálnej triedy založená na prenose obrazu z mikroskopu vyučujúceho do smart zariadení študentov zvyšuje názornosť výučby a podporuje aktívne osvojovanie vedomostí. Ďalší rozvoj projektu bude smerovať k vybaveniu študentských mikroskopov digitálnymi kamerami a vytvoreniu plnohodnotného obojsmerného systému digitálnej mikroskopie, ktorý umožní efektívnejšiu interakciu medzi vyučujúcim a študentmi a prispeje k ďalšiemu skvalitneniu medicínskeho vzdelávania.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore projektu: „Simulačné centrum Jesseniovej lekárskej fakulty UK v Martine“, kód projektu: 401101B754. Tento projekt je spolufinancovaný Európskou úniou v rámci Programu Slovensko. Technické

zabezpečenie projektu bolo možné s podporou projektu VEGA 1/0045/23 a v spolupráci s Lambda Life a.s.

Literatúra:

[1] Aeffner, *ILAR J*. **2018**, 1;59(1):66-79.
[2] Rodriques-Fernandes, *Virchows Arch*. **2020**, 477(4):475-486.
[3] ZEISS. ZEISS Labscope Teacher – Manage and Organize Your Digital Classroom. Carl Zeiss Microscopy GmbH. Dostupné na: https://www.zeiss.com/microscopy/en/products/software/zeiss-labscope/zeiss-labscope-classroom.html. Updated 25.5.**2026**
[4] ZEISS. ZEISS Digital Classroom – Teaching Microscopy with Connected Microscopes. Carl Zeiss Microscopy GmbH. Dostupné na: https://www.zeiss.com/microscopy/en/c/edr/24/education/digital-classroom.html. Updated 25.5.**2026**
[5] Farah, *Eur J Dent Educ*. **2009**, 13(3):172-8.
[6] Kuo, *Anat Sci Educ*. **2019**, 12(6):678-685.

Učebné preferencie verzus akademická úspešnosť v anatómii: mýtus alebo realita?

Výbohová, D., Mazuráková, A., Hešková, G., Kalenská, D., Kunertová, L., Mellová, Y.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin
desanka.vybohova@uniba.sk

Abstract

Anatomy is a fundamental theoretical discipline and its successful mastery requires not only memorization of anatomical terminology, but also spatial orientation, practical identification and integration of knowledge across the organ systems. The Anatomy combines the face to face teaching in lectures and practicals, visual materials, written texts, models, cadaveric specimens and digital visualization tools. Therefore it represents suitable subject for the investigation of the preferred learning styles and their relation to the academic achievement.

The aim of this study was to analyse learning preferences of anatomy students using VARK questionnaire and to evaluate their relation with academic performance. The study included 411 second year students at the JFM in Martin CU in Bratislava (214 studens in Slovak programme and 197 in English programme). Learning preferences were assessed using Fleming´s VARK questionnaire. Academic performance was evaluated using the results (percentual scores) of the midsemester tests in Anatomy 1 and 2, and practical and final oral examination results in Anatomy 3.

Students in Slovak programme achieved significantly better results than the students in English programme in all evaluated parameters of academic achievement. Differences in VARK scores were also observed. Slovak programme students achieved significantly higher scores in visual, aural and kinesthetic modalities, whereas english programme students showed higher scores in the read/write modality. Female students showed slightly higher scores in all modalities of VARK, althought significant difference was found only in visual modality. Spearman´s correlation analysis did not reveal consistent relation between VARK scores and academic achievement.

The results do not support the hypothesis that preferred learning styles, as measured by VARK, are reliable predictors of academic success in anatomy. VARK preferences may reflect mainly individual study habits, previous educational experiences and language conditions rather than factors directly determining academic performance.

Keywords: anatomy, learning styles, learning preferences, academic performance

Úvod

Anatómia patrí k základným teoretickým disciplínam medicínskeho vzdelávania a je často označovaná pojmom „základný kameň medicíny“. Jej úspešné zvládnutie si vyžaduje nielen osvojenie si odbornej latinskej terminológie, ale aj priestorovú orientáciu a funkčné súvislosti medzi jednotlivými orgánovými sústavami ľudského tela. Informácie získané na prednáškach a praktických cvičeniach musia študenti

doplniť samoštúdiom. Pri štúdiu anatómie majú teda k dispozícii ústny výklad, vždy s obrazovým materiálom, s modelmi a kadaverickými preparátmi a samozrejme učebné texty, a často moderné softvéry pracujúce s digitálnymi vizualizáciami. Táto komplexnosť pri štúdiu anatómie vedie k otázke, či individuálne preferencie resp. učebné štýly pri štúdiu môžu súvisieť s akademickou úspešnosťou. Učebný štýl je definovaný ako súhrn postupov, ktorí študenti preferujú pri učení sa. Vyvíja sa z vrodeného základu, ale v priebehu štúdia či života sa môže meniť a optimalizovať. Študenti si používanie určitého im vlastného učebného štýlu len zriedkavo uvedomujú, systematicky analyzujú či cieľavedome upravujú [1].
Jedným z najznámejších a najpoužívanejších dotazníkov pre hodnotenie učebných preferencií je VARK model rozlišujúci vizuálnu, auditívnu, verbálnu a kinestetickú modalitu učenia. Fleming a Mills [2] predstavujú dotazník ako nástroj na sebareflexiu či zamyslenie sa nad tým, aké zmyslové modality študenti pri učení preferujú a následne im môže pomôcť optimalizovať ich študijné stratégie.
Problematika učebných štýlov je v pedagogickom výskume často diskutovaná avšak stále je považovaná za nedostatočne prebádaný fenomén. Cieľom predkladanej štúdie bolo analyzovať preferované učebné štýly u študentov a zistiť prípadný vzťah s ich akademickou úspešnosťou v anatómii.

Materiál a metódy

Štúdie sa zúčastnilo 411 participantov, študentov 2. ročníka JLF UK v Martine. Do súboru bolo zaradených: 214 študujúcich v slovenskom jazyku (82 mužov, 132 žien) a 197 študujúcich v anglickom jazyku (69 mužov, 128 žien) z Nórska a Islandu.
Participantom bol predložený Flemingov VARK dotazník obsahujúci 13 otázok opisujúcich bežné životné situácie. Dotazník hodnotí 4 modality učebných štýlov (modalít):

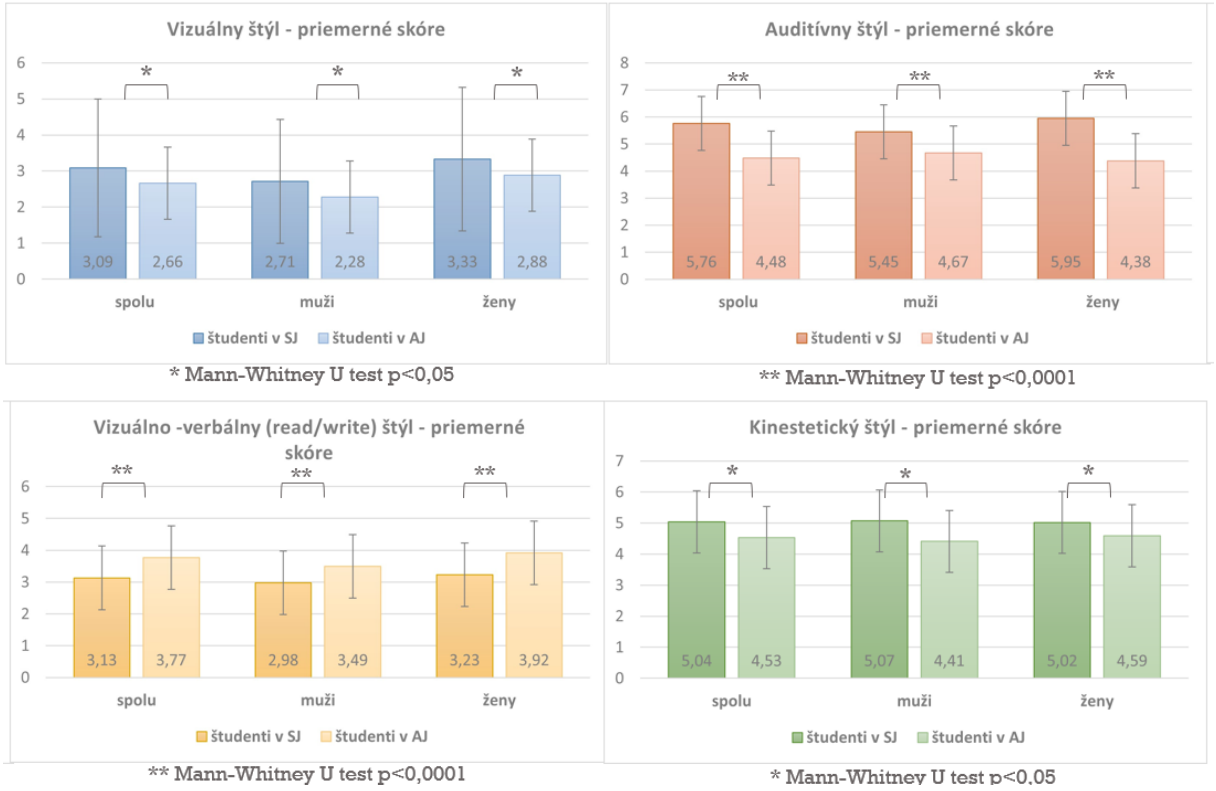
- V - vizuálny/zrakový (visual) štýl – predstavuje preferenciu vizuálnych materiálov pre učenie
- A - auditívny/sluchový (aural) štýl – predstavuje preferenciu zvukových materiálov pri učení
- R - vizuálno – verbálny (read/write) štýl – predstavuje preferenciu písaného slova ako učebného materiálu
- K - kinestetický – pohybový (kinesthetic) štýl – predstavuje preferenciu učebných materiálov, s ktorými sa dá manipulovať.

Akademická úspešnosť bola hodnotená na základe výsledkov priebežného hodnotenia zo semestrálnych testov v predmete Anatómia 1 a Anatómia 2 a na základe výsledkov záverečnej skúšky z predmetu Anatómia 3. Výsledky semestrálnych testov boli vyjadrené ako percentuálna úspešnosť, výsledky ústnej a praktickej skúšky stupnicou A-Fx (pričom pre štatistické vyhodnotenie sa stanovilo A=5, B=4, C=3, D=2, E=1, Fx=0).
Skóre pre jednotlivé V A R K štýly sme štatisticky vyhodnotili v zmysle rozdielov medzi mužmi a ženami, študentami študujúcimi v slovenskom jazyku a študentami študujúcimi v anglickom jazyku. VARK skóre sme následne korelovali s výsledkom v priebežnom hodnotení semestrálnych testov v Anatómia 1 a Anatómia 2 a s výsledkom praktickej a záverečnej ústnej skúšky z anatómie. Štatistickú analýzu

sme robili v programe PSPP a použili sme Mann-Whitneyho U test a Spearmanovu korelačnú analýzu, pričom hladinu štatistickej významnosti sme stanovili na p<0,05.

Výsledky

Analýza priemerných skóre jednotlivých modalít – štýlov podľa dotazníka VARK ukázala rozdiely medzi študentami študujúcimi v slovenskom a anglickom programe (Obr. 1). Študenti v slovenskom programe dosiahli signifikantne vyššie skóre vo vizuálnom, auditívnom aj kinestetickom štýle. Študenti v anglickom programe dosiahli zasa signifikantne vyššie skóre vo vizuálno – verbálnom štýle (modalita read/write). Rozdiely v auditívnom a vizuálno – verbálnom štýle boli výraznejšie ako vo vizuálnom a kinestetickom štýle.



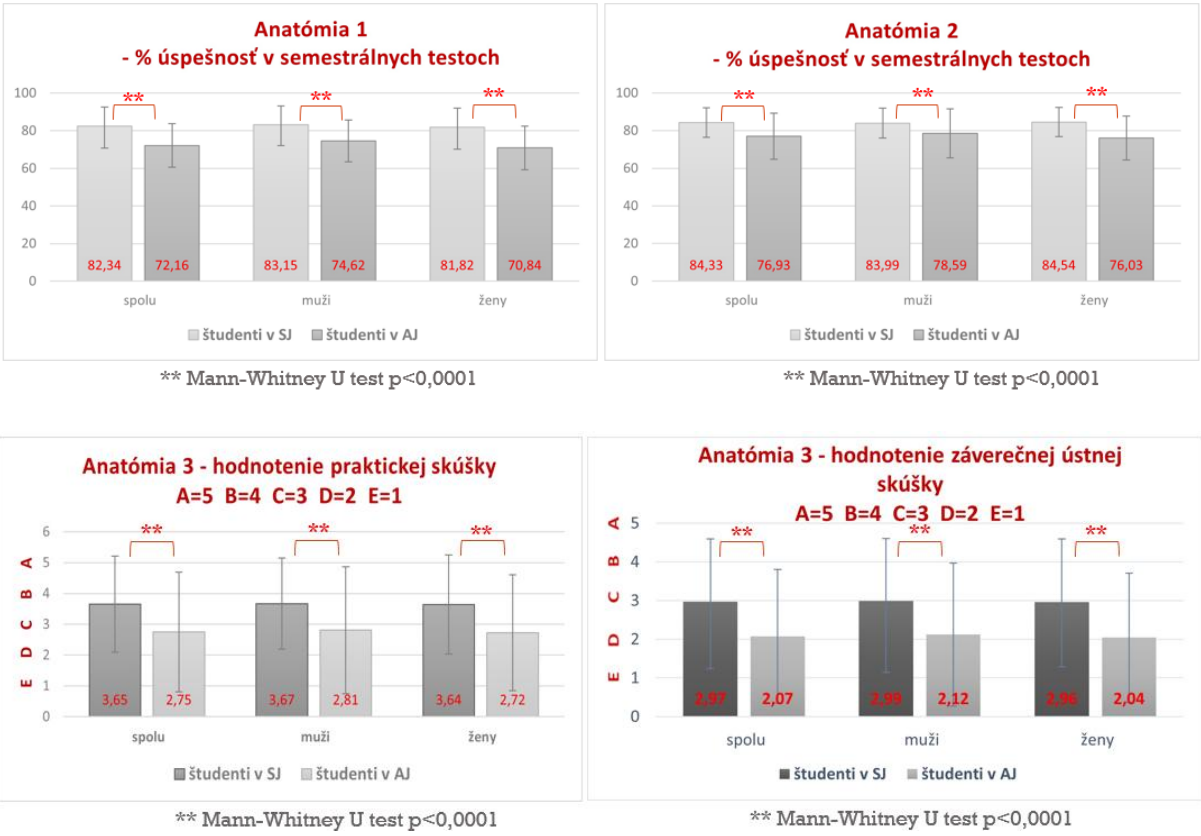
Obrázok 1 Priemerné skóre pre jednotlivé modality dotazníka VARK

Pri deskriptívnej analýze skóre modalít VARK podľa pohlavia dosiahli ženy vo všetkých modalitách vyššie skóre ako muži, pričom vo vizuálnom štýle bol rozdiel skóre dokonca štatisticky signifikantný (Tab. 1).

Tabuľka 1: Deskriptívna analýza modalít VARK medzi mužmi a ženami.

skóre modalít VARK podľa pohlavia	vizuálny štýl priemer ±SD medián	auditívny štýl priemer ±SD medián	vizuálno – verbálny štýl priemer ±SD medián	kinestetický štýl priemer ±SD medián
muži (n=151)	2,51 ± 1,72 2,00	5,09 ± 2,22 5,00	3,21 ± 1,79 3,00	4,77 ± 2,06 5,00
ženy (n=260)	3,10 ± 1,98 3,00	5,17 ± 2,34 5,00	3,57 ± 2,16 3,00	4,81 ± 2,13 5,00
p - podľa Mannovho-Whitneyho U testu	0,006	0,758	0,145	0,570

Pri porovnaní akademickej úspešnosti dosiahli študenti študujúci v slovenskom programe signifikantne lepšie výsledky ako študenti študujúci v anglickom programe a to vo všetkých sledovaných parametroch (Obr. 2).



Obrázok 2 Akademická úspešnosť študentov študujúcich v slovenskom a anglickom programe v sledovaných parametroch

V predmete Anatómia 1 bola priemerná percentuálna úspešnosť v semestrálnych testoch v slovenskom programe 82 %, zatiaľ čo v anglickom programe to bolo 72 %. Obdobný trend bol zaznamenaný aj v predmete Anatómia 2, kde študenti v slovenskom programe dosiahli priemer 84 %, v anglickom programe 76 %.
Rozdiely medzi skupinami boli štatisticky významné aj po rozdelení podľa pohlavia.

Pri hodnotení praktickej skúšky dosiahli študenti v slovenskom programe priemernú známku B, zatiaľ čo študenti v anglickom programe C. Pri záverečnej skúške bolo priemerné hodnotenie v slovenskom programe C a v anglickom D. Korelačná analýza medzi skóre modalít VARK a akademickou úspešnosťou nepreukázala konzistentný vzťah medzi preferovaným učebným štýlom a dosiahnutými študijnými výsledkami (Tab. 2). Korelačné koeficienty boli veľmi nízke a korelácie nevykazovali žiadnu tendenciu, ktorú by bolo možné interpretovať ako vzťah medzi učebným štýlom a akademickou úspešnosťou. Výsledky korelačnej analýzy nepotvrdili, že by vyššie skóre určitého preferovaného učebného štýlu podľa dotazníka VARK súviselo s lepšími študijnými výsledkami.

Tabuľka 2: Korelačná analýza medzi skóre modalít VARK a parametrami akademickej úspešnosti.

parameter akademickej úspešnosti	vizuálny štýl r_s p	auditívny štýl r_s p	vizuálno – verbálny štýl r_s p	kinestetický štýl r_s p
Anatómia 1 v SJ	r_s = - 0,16 p = 0,024	r_s = - 0,01 p = 0,894	r_s = - 0,02 p = 0,816	r_s = 0,09 p = 0,203
Anatómia 1 v AJ	r_s = - 0,01 p = 0,942	r_s = - 0,04 p = 0,544	r_s = - 0,15 p = 0,033	r_s = - 0,09 p = 0,211
Anatómia 2 v SJ	r_s = - 0,12 p = 0,080	r_s = - 0,07 p = 0,305	r_s = 0,08 p = 0,260	r_s = 0,04 p = 0,519
Anatómia 2 v AJ	r_s = 0,05 p = 0,502	r_s = - 0,13 p = 0,074	r_s = - 0,13 p = 0,075	r_s = - 0,01 p = 0,908
Anatómia 3 – praktická skúška v SJ	r_s = - 0,05 p = 0,457	r_s = 0,06 p = 0,366	r_s = - 0,03 p = 0,669	r_s = 0,08 p = 0,204
Anatómia 3 – praktická skúška v AJ	r_s = 0,06 p = 0,442	r_s = - 0,04 p = 0,562	r_s = 0,01 p = 0,912	r_s = - 0,12 p = 0,082
Anatómia 3 – záverečná skúška v SJ	r_s = - 0,05 p = 0,460	r_s = - 0,02 p = 0,798	r_s = - 0,04 p = 0,582	r_s = 0,06 p = 0,356
Anatómia 3 – záverečná skúška v AJ	r_s = - 0,09 p = 0,223	r_s = - 0,12 p = 0,107	r_s = - 0,10 p = 0,178	r_s = - 0,06 p = 0,386

Diskusia a záver

Možno konštatovať, že výsledky štúdie nepotvrdili platnosť stanovenej hypotézy, že vyššie skóre určitého preferovaného učebného štýlu podľa VARK dotazníka súvisí s lepšími študijnými výsledkami. Naše výsledky sú v súlade s prácami, ktoré spochybňujú význam učebných štýlov ako prediktora akademickej úspešnosti. Husmann et al. [3] vo svojej štúdii, rovnako ako my, sledovali koreláciu učebných štýlov podľa VARK s akademickou úspešnosťou v anatómii. Na základe výsledkov konštatovali, že výkon študentov v anatómii nekoreloval so skóre v žiadnej kategórii VARK. Martinez et Tusca [4] zasa potvrdili negatívnu signifikantnú koreláciu medzi auditívnym a kinestetickým štýlom a výsledkom priebežného elektronického testu z muskuloskeletálneho systému. Naopak O'Mahony et al. [5] vo svojej štúdii potvrdili signifikantne lepšie študijné výsledky u študentov s vysokým skóre auditívneho štýlu VARK. Výsledky dostupných štúdií teda prinášajú nejednoznačné závery čo sa týka vzťahu medzi preferovanými učebnými štýlmi a akademickou úspešnosťou.

Pashler et al. [6] vo svojej štúdii uvádzajú, že napriek popularite koncepcie učebných štýlov, stále je nedostatok metodologicky kvalitných štúdií, ktoré by poskytli empirický dôkaz, že prispôsobenie sa preferovaným učebným štýlom vedie automaticky k lepším študijným výsledkom. An et Carr [7] sumarizujú najmä tri kritické oblasti: chýbajúci jasný teoretický rámec – mechanizmus, problémy merania – nakoľko dotazníky často hodnotia subjektívne preferencie a nedostatočné prepojenie učebných štýlov so študijnou úspešnosťou. Preto odporúčajú skúmať iné rozdiely medzi študentami ako napríklad verbálne a vizuálne schopnosti, predchádzajúce vedomosti alebo aj schopnosť sebaregulácie. Napriek tomu, že medzi študentmi študujúcimi v slovenskom a anglickom študijnom programe sme v našej štúdii zaznamenali signifikantné rozdiely vo všetkých sledovaných parametroch akademickej úspešnosti, nie je možné pripísať to na vrub preferovaným učebným štýlom a ani priebehu samotnej výučby. Z nášho pohľadu ide skôr o rozdielnu vstupnú pripravenosť študentov, nakoľko je známe, že prijímacie konanie do anglického študijného programu je menej selektívne a študenti tak tvoria výrazne heterogénnejšiu skupinu ako študenti v slovenskom programe. Vzhľadom k tomu, že anatómia patrí k náročnejším predmetom obsahovo, terminologicky, s výraznou potrebou priestorovej predstavivosti a prepájania vedomostí, je možné, že práve nižšia vstupná pripravenosť je jedným z faktorov ovplyvňujúcich slabší akademický výkon v anglickom programe.
Rozdiely v skóre jednotlivých modalít VARK medzi študentami študujúcimi v anglickom a slovenskom programe pravdepodobne vychádzajú z rozdielneho predchádzajúceho vzdelávacieho systému. Zahraniční študenti, teda študenti v anglickom programe, dosiahli signifikantne vyššie skóre v read/write štýle. Možným vysvetlením je, že nakoľko neštudujú vo svojom materinskom jazyku, práve preto im tento štýl prináša väčší benefit. Študenti študujúci v slovenskom programe pravdepodobne viac profitujú z prezenčnej výučby a auditívneho a vizuálneho štýlu, nakoľko študujú v materinskom jazyku. Kinestetický štýl má v štúdiu anatómie nezastupiteľnú úlohu, pretože práca s modelmi a preparátmi umožňuje okamžitú realistickú trojrozmernú predstavivosť a práca s kadávermi navyše aj tzv. psychologickú istotu. Tieto tvrdenie sú však iba našou hypotézou a nie je možné ich interpretovať ako dôkaz. Najpravdepodobnejším vysvetlením je, že rozdielne skóre modalít VARK odráža najmä osobné študijné preferencie, spôsob predchádzajúceho vzdelávania, jazykové podmienky a nie sú pre výkon determinujúce.

Literatúra

[1] Turek, *Wolters Kluwer*, **2014**, 620 s., ISBN 978-80-8168-004-5
[2] Fleming, *To Improve the Academy*. **1992**, 11:137-155.
[3] Husmann, *Anat Sci Educ*. **2019**, 12(1):6-19.
[4] Martinez, *Educ Med*. **2019**, 20(2):79-83.
[5] O'Mahony, *Anat Sci Educ*. **2016**, 9(4):391-399.
[6] Pashler, *Psychol Sci Public Interest*. **2008**, 9(3):105-119.
[7] An, *Pers Individ Dif*. **2017**, 116:410-416.

XII | Martin | 2026