



UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA V MARTINE

Ústav histológie a embryológie



NOVÉ TRENDY A PERSPEKTÍVY V HISTOLÓGII

Marian Adamkov
Mária Kovalská
Martina Furjelová
Veronika Mešťanová

Neperiodická publikácia

Editoriál: doc. MUDr. Marian Adamkov, CSc.
RNDr. Mária Kovalská, PhD.
Ing. Martina Furjelová
RNDr. Veronika Mešťanová

Recenzenti: MUDr. Eva Ochodnická, CSc.
doc. MVDr. Silvia Rybárová, PhD.
doc. RNDr. Ivan Varga, PhD.

Za jazykovú úpravu príspevkov zodpovedajú autori.

ISBN 978-80-89544-28-8
EAN 9788089544288

Editoriál ďakuje Mgr. K. Jurkovej, Ing. M. Petrášovi a Ing. P. Hnilicovej za technickú spoluprácu.

OBSAH

Báľentová, S.: Ionizujúcim žiarením indukované zmeny v hipokampe za experimentálnych podmienok.....	1
Bošellová, L.: Patomorfologické mechanizmy podieľajúce sa na morfológických zmenách Ranvierovho zárezu po ischémií.....	4
Furjelová, M.: Karboanhydráza IX ako možný prognostický marker pri karcinóme mliečnej žľazy.....	7
Fuseková, E.: Použitie izolovaných nervových vlákien pri sledovaní rôznych parametrov v kontrolnej a experimentálnej skupine.....	10
Hnilicová, P.: Aplikácia DCE MRI pri diferencovaní malígnych a benígnych lézií prsníka	15
Jurková, K.: Štúdium vývinu týmusu v embryonálnom období klasickými histologickými metódami	18
Kapinová, A.: Histopatologická analýza mamárnych nádorov u samíc potkanov liečených fluvastatínom	24
Kovalská, M.: Indukovaná hyperhomocysteinémia a riziko vzniku infarktu myokardu	28
Mahmoodová, S.: Regulácia nukleárneho transportu transkripčného faktora BR-C Z1 cytoskeletálnymi proteínmi v čase histolýzy slinných žliaz u <i>Drosophila melanogaster</i>	31
Miko, M.: Intersticiálne, Cajalovým bunkám podobné bunky vo vajčkovode	34
Pavlíková, M.: Faktory vplývajúce na expresiu vápnikovej pumpy (SPCA1) sekrečných ciest v nervovom tkanive potkana	37
Petráš, M.: Hyperhomocysteinémia a jej vplyv na antioxidačné enzýmy	40
Polák, Š.: Chlamýdiová infekcia a jej vzťah k reprodukčným funkciám vajčkovodov	43
Polák, Š.: Optimalizovaný protokol izolácie a in vitro kultivácie ľudských mezenchýmových kmeňových buniek z tukového väziva.....	47
Tatarková, Z.: NADH:ubichinon oxidoreduktáza a starnutie mozgu potkanov.....	51
Tatarková, Z.: Poškodenie lipidov počas ischémie-reperfúzie myokardu potkanov.....	55

Ionizujúcim žiarením indukované zmeny v hipokampe za experimentálnych podmienok

Báľentová, S.¹, Hajtmanová, E.², Trylčová, R.³, Lehotský, J.,⁴ Dobrota, D.⁴, Adamkov, M.¹

¹Ústav histológie a embryológie JLF UK Martin, ²Onkologické centrum UNM Martin, ³JLF UK Martin, ⁴Ústav lekárskej biochémie JLF UK Martin
balentova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

The aim of the present study was to investigate the effect of ionizing radiation on the cell population which resides rat hippocampal formation. Adult male Wistar rats were exposed to whole-body irradiation with fractionated doses of gamma rays (the total dose of 4 Gy). Thirty, 60 and 90 days after irradiation the cell-specific types housed the layers in CA1, CA3 were labeled using the immunohistochemistry for specific cell phenotypes, either for Ki-67 protein, proliferative marker or GFAP, for detection of astrocytes. Considerable increase was seen in the numbers of Ki-67-positive cells during the 30th day after exposure. On the 60th day was observed expressive decline in density of neurons, mostly in CA1 subregion. Slight overaccumulation of Ki-67-positive cells was seen in CA1 area 90 days after radiation treatment. Thirty days after irradiation was seen temporary decrease of GFAP-positive astrocytes replaced by their subsequent enhancement 60 days after exposure. In the following group, survived 90 days post-irradiation there was found secondary decrease of GFAP-positive cells in both of regions. Results showed that radiation response of neurons and astrocytes resides the adult hippocampus may play contributory role in development of more adverse radiation-induced late effects.

Úvod

Hipokampus patrí k limbickému systému a je umiestnený mediálne v temporálnych rohoch bočných mozgových komôr. Spoločne so susediacimi štruktúrami, t.j. *gyrus dentatus*, *subiculum* a entorinálnou oblasťou sa súhrnne označuje ako hikokampálna formácia. Úloha hipokampu je kľúčová pre učenie a vytváranie nových pamäťových stôp. Obojstranné poškodenie hipokampálnej formácie vedie k anterogradnej amnézii, t.j. strate schopnosti ukladania nových spomienok, hoci staršie spomienky ostávajú zachované. Ionizujúce žiarenie môže ovplyvniť zloženie bunkovej populácie hipokampálnej formácie s dopadom na kognitívne funkcie. Všeobecne platí, že miera poškodenia nervového tkaniva je priamo úmerná druhu ionizujúceho žiarenia, ožarovnému objemu, veľkosti a časovému rozloženiu dávky, spôsobu ožiarovania a ďalšími parametrami. Na experimentálnej úrovni viedol vplyv jednorazovej expozície rôznymi dávkami žiarenia (2-10Gy) k dramatickému zvýšeniu počtu apoptotických buniek niekoľko hodín po ožiarení. Neskôr nasledoval dočasný pokles apoptózy, ktorý však pretrval 1 až 9 mesiacov po expozícii [1, 2, 3, 4, 5]. Model frakcionovanej expozície, použitý na experimentálnych zvieracích modeloch viedol k porušeniu hemato-encefalickej bariéry, tkanivovej hypoxii, ischemickému alebo traumatickému poškodeniu, zvýšenej expresii VEGF (vascular endothelial growth factor), ktorý zvyšuje cievnu permeabilitu a následnou demyelinizáciou a radiačnou nekrózou [6]. Podobne aj v humánnej medicíne sa neurotoxický účinok ionizujúceho žiarenia prejavuje v podobe postradiačných komplikácií pri rádioterapii nádorov CNS. Tieto

prejavy zahŕňajú najmä akútne poškodenie CNS, ktoré je zvyčajne prechodné a reverzibilné a neskoré ireverzibilné zmeny, ktoré sú medicínsky najzávažnejšie. V experimente sme študovali zmeny v zložení bunkovej populácie osídľujúcej vybrané oblasti v hipokampe potkanov po expozícii štyrmi frakciami celkovej dávky 4 Gy gama žiarenia v troch rôznych časových intervaloch po expozícii.

Materiál a metódy

V experimente sme použili biele samce potkanov kmeňa Wistar, vo veku 7–8 mesiacov. Zvieratá sme ožiarili celotelovou dávkou žiarenia cTD 4,0Gy aplikovanú v štyroch frakciách s dávkou na frakciu TD 1,0Gy v týždňových intervaloch, zdrojom žiarenia bol ^{60}Co (prístroj TERAGAM ÚJP Praha) s prežívaním 30, 60 a 90 dní po ožiarení. Po celkovej inhalačnej anestéze, celotelovej transkardiálnej perfúzii fyziologickým roztokom, následne 4% paraformaldehydom a dekapitáciou sme zvieratám vybrali mozgy a postfixovali ich do ďalšieho dňa. Po presýtení tkaniva v kryoprotektívnom roztoku 30% sacharózy sme na kryostate narezali sériové sagitálne 30 μm rezy a následne sme postupovali podľa štandardného protokolu pre imunofluorescenčné farbenie pre jadrový proteín Ki-67, ktorý sa používa ako proliferčný marker a glial fibrillary acid protein; GFAP, marker astrocytov. Preparáty sme hodnotili a fotografovali pomocou laserového konfokálneho skenovacieho mikroskopu Olympus **FluoView FV10i** (Olympus, Japonsko). Kvantitatívnu analýzu, t.j. počet značených buniek vo vrstvách *cornu ammonis* 1 (CA1) a *cornu ammonis* 3 (CA3), t.j. *stratum oriens*, *str. pyramidale*, *str. lucidum*, *str. radiatum*, *str. lacunosum* a *str. moleculare* sme uskutočnili pomocou programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

Výsledky a diskusia

V porovnaní s kontrolnou skupinou sme u zvierat, prežívajúcich nami zvolené intervaly (30, 60 a 90 dní po ožiarení) zistili zmeny v distribúcii špecifických typov buniek, ktoré osídľujú jednotlivé vrstvy oblastí CA1 a CA3. Výrazné zvýšenie počtu proliferujúcich Ki-67-pozitívnych buniek (Ki-67⁺) sme zistili tridsať dní po ožiarení v oboch oblastiach (CA1: 2134 \pm 420,26 versus 547 \pm 190/cm² v kontrolnej skupine; $P \leq 0,01$; CA3: 2168 \pm 234,86 vs. 1031 \pm 157,97 v kontrolnej skupine). Naopak, v skupine, prežívajúcej šesťdesiat dní po expozícii sme zaznamenali prudký pokles proliferácie, najviac v oblasti CA1 (378 \pm 99,59 vs. Ož-30: 2134 \pm 420,26; $P \leq 0,01$). U zvierat s najdlhším prežívaním sme zistili opätovný nárast proliferácie aktivity v regióne CA1 (Ož-90: 836 \pm 309,72), hoci oblasť CA3 zostala bez zmien. Počet astrocytov mierne poklesol u zvierat, ktoré prežívali tridsať dní po expozícii a to najmä v oblasti CA1 (3997 \pm 917,78), ďalšia oblasť zostala bez zmien. Čiastočný nárast počtu GFAP-pozitívnych buniek sme zistili šesťdesiat dní po ožiarení a to viac v oblasti CA3 (5155 \pm 456,3) ako v CA1 (3931 \pm 650,61). Tento nárast bol vystriedaný úbytkom astrocytov v skupine, prežívajúcej deväťdesiat dní po frakcionovanej expozícii najmä v oblasti CA1 (2658 \pm 463,96). V priebehu experimentu sme zistili výraznejšiu dynamiku zmien v populácii proliferujúcich buniek ako v distribúcii astrocytov. Potvrdzuje to známy poznatok o vyššej rádiorezistencii postmitotickej populácie po ožiarení. Niektorí autori poukazujú na úbytok postmitotických neurónov v oboch oblastiach dva mesiace po expozícii, avšak tieto zmeny sa ukazujú ako reverzibilné [7]. Frakcionovaná expozícia starnúcich potkanov nevedla k úbytku postmitotických neurónov ani jeden rok po ožiarení [8]. Pre porovnanie, jednorazová dávka žiarenia mala za následok prudký pokles počtu Ki-67⁺ buniek v *gyrus dentatus* hipokampu zvierat, prežívajúcich niekoľko hodín až mesiacov po expozícii [3, 4]. V našom experimente sme nehodnotili zmeny

v proliferačne aktívnej subgranulárnej zóne štruktúry *gyrus dentatus*, ktorá je jedným z dvoch zdrojov neurogenézy v dospelosti. Získané výsledky však môžeme porovnať s ďalším zdrojom neurogenézy, a to subventrikulárnou zónou (SVZ) nachádzajúcou sa v stene bočných mozgových komôr. Predchádzajúce štúdie potvrdili, že oblasť CA1 vysiela svoje axóny do oblasti *rhinencephalon*, a to čuchového bulbu (*bulbus olfactorius*), *nucleus olfactorius anterior* a *cortex pyriformis* [9]. Zároveň pokračuje výskum týkajúci sa úlohy hipokampu pri tvorbe čuchových pamäťových stôp. Vzhľadom na tento fakt je potrebné sa v budúcnosti zamerať na skúmanie mechanizmov synaptickej plasticity pri tvorbe pamäti, resp. imunohistochemicky detekovať možné kvalitatívne zmeny. Žiarením indukovaná strata alebo zvýšené zastúpenie astrocytov, resp. oligodendrocytov boli publikované v mnohých prácach [6, 10]. V našej predchádzajúcej štúdii sme skúmali žiarením indukované dočasné zvýšenie počtu astrocytov v oblasti SVZ (zatiaľ nepublikované výsledky). Klinické aj experimentálne štúdie na zvieratách potvrdzujú výskyt reaktívnej astrogliózy (hypertrofia výbežkov astrocytov, zvýšená tvorba intermediárnych filamentov, konkrétne GFAP) ako reakcie astrocytov na posttraumatické alebo zápalové zmeny v CNS [6, 10]. Všeobecne je známe, že reakcia tkaniva na jednorazovú dávku je rapidná, na rozdiel od frakcionovanej expozície, kde dochádza k oneskoreným prejavom, pretrvávajúcim niekoľko mesiacov až rokov po ožiarení [6]. Predpokladáme, že nami zistené zmeny v zastúpení astrocytov počas troch mesiacov po expozícii predstavujú skôr neuroprotektívnu odpoveď gliových buniek na ožiarenie ako prejav reaktívnej astrogliózy. Štúdium týchto závažných oneskorených následkov na experimentálnej úrovni je dôležité pre ich možné využitie v klinickej rádioterapii.

Záver

Vzhľadom na fakt, že najvýznamnejším limitujúcim faktorom v radiačnej onkológii sú tolerančné dávky zdravých tkanív v okolí nádoru, poznatky získané štúdiom postradiačných zmien na zvieracích modeloch sú dôležitými informáciami pre vývoj nových liečebných postupov.

PodĎakovanie

Práca bola podporená projektami ITMS: 26220120053 „Centrum excelentnosti pre výskum v personalizovanej terapii“ a „Vytvorenie nového diagnostického panelu pre ochorenia CNS“ spolufinancované zo zdrojov ES – Európskeho fondu sociálneho rozvoja a projektom VEGA 1/0050/11.

Literatúra

- [1] Fan et al. Eur. J. Neurosci. **2007**, 25(1), 38–46.
- [2] Mizumatsu et al. Cancer Res. **2003**, 63(14), 4021–4027.
- [3] Peissner et al. Brain Res. Mol. Brain Res. **1999**, 71(1), 61–68.
- [4] Raber et al. Radiat. Res. **2004**, 162(1), 39–41.
- [5] Tada et al. Exp. Neurol. **1999**, 160(1), 66–77.
- [6] Wong et al. Mol. Interv. **2004**, 4(5), 273–284.
- [7] Wu et al. J. Neuropathol. Exp. Neurol. **2010**, 69(3), 272–280.
- [8] Shi et al. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **2008**, 71(2), 526–532.
- [9] Vanderwolf et al. Behav. Brain Res. **2001**, 127(1-2), 25–47.
- [10] Yuan et al. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **2006**, 66(3), 860–866.

Patomorfológické mechanizmy podielajúce sa na morfológických zmenách Ranvierovho zárezu po ischémií

Bošelová, L., Adamkov, M., Ochodnická E., Fuseková E., Báľentová, S.

Ústav histológie a embryológie JLF UK Martin
hemb@jfm.ed.uniba.sk

Abstract

Ultrastructural changes in the nodal and paranodal regions of myelinated nerve fibres of sciatic nerve were studied during partial ischemia in the guinea pig. The ischemia was induced by ligation of the abdominal aorta. The changes were examined at sequential times (1, 2 and 4 days) after partial ischemia. The distal parts of the sciatic nerves were fixed in situ, with 3% glutaraldehyde, postfixation was done with Millonigs fixative. Sections were stain with uranylacetate and lead citrate. Morphological study of the sciatic nerves showed structural abnormalities at nodes of Ranvier and mild axonal atrophy. Neither segmental demyelination nor axonal degeneration were evident. The changes in the axon including segregation microtubules from microfilaments. Microtubules form distinct longitudinal strands arranged into the middle of axon. The some organelles (mitochondria) in the axon were abnormal and accumulated in the paranodal regions. The axoplasmic changes became apparent on 1st day and accumulations of abnormal organelles was observed on days 2 and 4. The earliest changes of the myelin sheath seen 2nd days include retraction of paranodal loops. These paranodal changes are asymmetric around the node and may be more advanced on either the proximal or distal side.

Úvod

Každý myelinizovaný axón má dve morfológicky a funkčne odlišné časti, ktoré sa v priebehu celej dĺžky axónu striedajú. Časť zahrňujúca cca 1 µm dĺžky axónu je nódium – je to miesto excitácie, ktoré je proximálne aj distálne obklopené paranodálnou oblasťou. Druhá časť zahrňujúca 99 % axonálnej dĺžky je pokrytá myelínovým obalom, nazývaná internódium (Terzis and Smith 1990, Waxman 2002). V oblasti nódia je axolemma relatívne nekrytá, tu vzniká elektrický potenciál. Nodálna oblasť má vysokú denzitu Na⁺ kanálov, zatiaľ čo internodálny úsek axónu, má vysokú koncentráciu K⁺ kanálov, s najväčšou denzitou v paranodálnej oblasti (Arroyo and Scherer 2000, Peles and Salzer 2000). Takéto usporiadanie axónu (obalenej a neobalenej časti) umožňuje saltatórne vedenie vzruchu. Interakcia medzi axónom a myelinotvornou Schwannovou bunkou sa najmarkantnejšie prejavuje v oblasti Ranvierovho zárezu, čo je primárne funkčné miesto zodpovedné za vznik potenciálu. Táto oblasť je aj z morfológického hľadiska špecifická. Na oboch stranách nódia je cytoplazma Schwannovej bunky v paranodálnych slučkách, kde je najväčšia denzita K⁺ kanálov. Takáto organizácia umožňuje rôznorodosť kontaktu medzi axónom a membránou myelinizujúcej Schwannovej bunky- vytvára sa tu axogliaľne spojenie. Ischemia zohráva dôležitú úlohu v mnohých periférnych neuropatiách. Štúdie zaoberajúce sa vplyvom ischémiie na periférne nervy opísali rôznu vulnabilitu axónu a Schwannových buniek na ischémiu (Ferčáková et al. 1995., Hara et al. 1993). Rôzne patologické situácie týkajúce sa Ranvierovho zárezu spôsobia zmeny, ktoré vyvolajú prerozdelenie Na⁺ a K⁺ kanálov v teto oblasti (Kazarinova-Noes and Shrager, 2002). Myšlienkou tejto práce bolo, sledovať ako sa

mení ultraštruktúra nódia a paranódia myelinizovaných axónov v n. ischiadicus morčat'a po ischemickom poškodení.

Materiál a metódy

V experimente sme použili dospelé morčatá bez rozdielu pohlavia, o hmotnosti 300-500g. Ischémia n. ischiadicus bola navodená ligáciou abdominálnej aorty, tesne pod odstupom a. renalis sinistra. Všetky zákroky sme robili v celkovej thiopentálovej anestéze. Čas prežívania zvierat bol: 1, 2 a 4 dni od navodenej ischémie. Po uplynutí udaného časového intervalu sme distálny úsek n. ischiadicus fixovali in situ 10 min. 3% glutaraldehydom pri extendovanej končatine. Po fixácii in situ sme nervy vybrali a dofixovali ešte 3 hod. v 3% GA. Postfixáciu sme robili fixačným činidlom podľa Millioniga. Ultratenké rezy sme farbili podľa Reinoldsa a pozorovali elektrónovým mikroskopom.

Výsledky

Ultraštrukturálne zmeny myelinizovaných axónov v n. ischiadicus ischemických zvierat sme vždy porovnávali s kontrolnou skupinou. Štrukturálne zmeny, ktoré sme pozorovali na úrovni Ranvierovho zárezu sme rozdelili na zmeny pozorované v axóne a zmeny laterálnych slučiek v paranodálnej oblasti. Zmeny v axóne zahrňovali dilatované a vakuolizované mitochondrie, endoplazmatické retikulum. Takéto zmeny v oblasti nódia sme pozorovali u skupiny zvierat 1. deň po navodenej ischémii. U skupiny zvierat prežívajúce 2 dni alterované axonálne organely tvorili akumulácie na úrovni paranódia. Zmeny v axóne zahrňovali aj segregáciu neurotubulov od neurofilament, tubuly vytvárali paralelne prebiehajúce nakopenia sústredené v strede axónu. Uvedené zmeny v nodálnom a paranodálnom úseku boli najvýraznejšie u skupiny zvierat, ktorá prežila 4 dni. Prvé zmeny na myelínovej pošve sme zaznamenali na 2. deň po ischémii, zahrňovali retrakciu laterálnych slučiek, čím došlo k demyelinizácii paranodálnej oblasti a tým k predĺženiu nódia. Zmeny v paranódii boli asymetrické, v niektorých axónoch boli výraznejšie v proximálnom, inde v distálnom paranódii. Retrakcia laterálnych slučiek a paranodálna demyelinizácia bola najvýraznejšia u skupiny, ktorá prežila 4 dni. Segmentálnu demyelinizáciu na úrovni internódia sme nepozorovali.

Diskusia

Ischémia môže zapríčiniť poškodenie myelínu na celulárnej úrovni, čo sa prejavilo poškodením axogliálneho spojenia v paranodálnej oblasti a retrakciou laterálnych slučiek dochádza k demyelinizácii tejto časti. Ako uvádza Peles and Salzer (2000) demyelinizácia axónu vyvolaná rôznymi patologickými situáciami vedie k redistribúcií Na^+ a K^+ kanálov pozdĺž axónu. Tieto zmeny sa môžu kompenzovať zväčšením mitochondrií, ktoré hrajú dôležitú úlohu pri demyelinizácii a ich akumuláciou v demyelinizačných oblastiach, pričom funkcia axónu nemusí byť prerušená (Andrews et al. 2005). Nakopenie neurotubulov a neurofilament v nodo-paranodálnej oblasti vysvetľujeme nedostatkom energie potrebnej na axonálny transport.

Záver

Naše pozorovania ukázali, že parciálna ischémia spôsobila výskyt abnormálnych axonálnych organel, najmä mitochondrií, ktoré vytvárali akumulácie v paranodálnej oblasti. Pozorovali sme zvýšenú denzitu neurotubulov a neurofilament, pričom tieto vytvárali akumulácie v nodálnej oblasti, sústredené do stredu axónu. Zmeny na

myelínovej pošve zahrňovali retrakciu laterálnych slučiek, čím došlo k demyelinizácii paranodálnej oblasti. Zmeny v paranódiu boli asymetrické.

Literatúra

- [1] Andrews, H.E., Nichols, P.P., Bates, D., Turnbull, D.M.: Mitochondrial dysfunction plays a key role in progressive axonal loss in Multiple Sclerosis. *Med Hypotheses*. **2005**, 64(4), 669-77.
- [2] Arroyo E.J., and Scherer S.S.: On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem. Cell Biol.* **2000**, 113, 1-18.
- [3] Ferčáková, A., Lukán, N., Jalč, P.: Effects of global brain ischemia on neurons in cranial ganglia of the rat. *Multinational congress on electron microscopy*. **1995**, 178-179.
- [4] Hara H., Sukamoto T., Kogare K.: *Progress Neurobiol.* **1993**, 40, 645-670.
- [5] Ishise, J., Rosenbluth J.: Nodal and paranodal structural changes in frog optic nerve during early Wallerian degeneration. *J. Neurocytol.* **1986**, 15, 657 -670.
- [6] Kazarinova-Noes K. and Shrager P.: Molecular constituents of the node of Ranvier. *Mol. Neurobiol.* **2002**, 26, 167-182.
- [7] Peles, E., Salzer J. R.: Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol.* **2000**, 10, 5, 558-565.
- [8] Ritchie J.M., and Rogart R.B.: Density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibers and nature of the axonal membrane under the myelin sheath. *PNAS*. **1977**, 74, 1, 211-215.
- [9] Stys, P.K., Ransom B.R., Waxman, S.G., Davis, P.K.: Role of extracellular calcium in anoxic injury of mammalian central white matter. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1990**, 87, 4212-4216.
- [10] Terzis J.K., Smith K.L.: *The peripheral nerve*, Raven Press, New York. **1990**, 1-173.
- [11] Waxman S.G.: *The axon: Structure, function and pathophysiology.*, edited by Waxman S.G., Kocsis, J.D., and Stys P.K. New York: Oxford. **2002**, 218-243.

Karboanhydráza IX ako možný prognostický marker pri karcinóme mliečnej žľazy

Furjelová, M.^{1,2}, Kovalská, M.², Tatarková, Z.¹, Mešťanová, V.^{1,2}, Jurková, K.^{1,2}
Adamkov, M.²

¹Ústav lekárskej biochémie JLF UK Martin, ²Ústav histológie a embryológie JLF UK Martin
martina.furjelova@gmail.com

Abstract

Carbonic anhydrase IX (CA IX) is one of the recently emerged targets with distribution and molecular attributes offering various opportunities for clinical utilization. This enzyme belongs to the zinc metalloenzymes that catalyze the reversible conversion of carbon dioxide to bicarbonate and proton. Expression of CA IX is normally restricted to the mucosa of alimentary tract, but on the other hand, it takes place in a high percentage of human cancers derived from tissue which are normally CA IX-negative. It is a transmembrane protein with two extracellular domains: carbonic anhydrase (CA) with high catalytic activity and a proteoglycan-like segment (PG), mediating cell-cell adhesion. Both CA and PG domains interact with the microenvironment and they could play a role in tumorigenesis, but their roles are poorly understood. CA IX belongs to the most strongly induced proteins in response to hypoxia suggesting its potential to serve as an intrinsic hypoxic marker with possible diagnostic, prognostic and therapeutic value [5,6.] In this study we summarize a current knowledge on CA IX and discuss possibilities of their exploitation for breast cancer detection. We examined the expression of this enzyme in malignant breast tissues by immunohistochemical staining in the panel of 40 samples of malignant lesions. Staining was confined to plasma membranes of cells in 9 cases, but in 16 cases was found in plasma membranes and also in cell cytoplasm and 15 cases was without positivity.

Key words: carbonic anhydrase IX, hypoxic marker, prognostic value, immunohistochemical staining.

Úvod

Karbonická anhydráza IX patrí medzi zinkové metaloenzýmy, ktoré katalyzujú reverzibilnú premenu vody a oxidu uhličitého na kyselinu uhličitú, ktorá spontánne disociuje na bikarbonátový anión a protón [1]. Táto bielkovina bola pôvodne detekovaná v ľudskej bunkovej línii HeLa derivovanej z karcinómu krčka maternice pomocou monoklonálnej protilátky M75 ako transmembránový antigén. Povrchový bunkový proteín CA IX sa za fyziologických okolností exprimuje v rámci úzkeho spektra tkanív, ktoré patria hlavne k tráviacemu traktu. Medzi nádory obsahujúce CA IX patria najrôznejšie typy benígnych a malígnych tkanív derivovaných z prsníka, obličiek, pažeráka, hrubého čreva, pľúc, pankreasu, pečene, maternice a vaječníkov [2]. Karbonická anhydráza IX je hypoxiou-indukovaný proteín s úlohou v regulácii pH a bunkovej adhézii [3]. Hypoxia je prognostický a klinický významný nádorový parameter so signifikantným vplyvom na výsledok liečby a progresiu ochorenia [2]. Expresia CA IX je intenzívne študovaná v domnienke, že tento proteín môže slúžiť ako prirodzený marker hypoxie s možným diagnostickým, prognostickým a terapeutickým významom. Z tohto dôvodu boli realizované početné štúdie, založené

na imunohistochemickej detekcii CA IX v rôznych typoch nádorov s cieľom objasniť jej potenciálny význam a uplatnenie tohto proteínu aj v klinickej praxi [2,4].

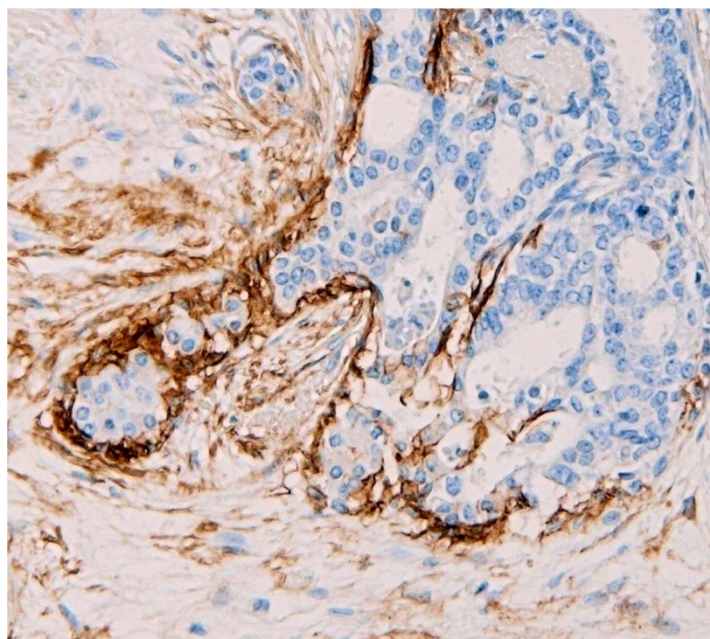
Materiál a metodika

Imunohistochemicky sme vyšetrili parafrínový materiál zo 40 vzoriek karcinómov mliečnej žľazy. Z každej vzorky boli pripravené 4 µm hrubé rezy na imunohistochemické reakcie na dôkaz CA IX s použitím dobre známej a široko dostupnej peroxidázovej techniky. Monoklonálna protilátka proti CA IX (M75, Virologický ústav SAV v Bratislave) bola riedená 1:50. Reakcia bola vizualizovaná DAB chromogénom (DAKO). Pri interpretácii získaných imunohistochemických vyšetrení sme semikvantitatívne hodnotili celulárnu lokalizáciu imunohistochemickej reakcie a to:

- a) na membráne bunky,
- b) v cytoplazme a na membráne bunky,
- c) bunky bez reakcie.

Výsledky a diskusia

Najnovšie štúdie poukazujú na pozitívnu koreláciu medzi expresiou CA IX a zlou prognózou nádorového ochorenia. Silná asociácia s malígnym fenotypom ako aj funkčné prejavy proteínu CA IX dávajú nádej na jeho využitie v klinickej praxi. Imunohistochemická detekcia CA IX v širokom spektre nádorov môže poskytnúť hodnotné informácie napr. o prognóze nádorového ochorenia, o prítomnosti intratumorovej hypoxie ako aj o predpokladanej účinnosti protinádorovej terapie. Expresia CA IX môže byť perspektívnym ukazovateľom pri výbere optimálnych terapeutických modalít. V tejto aplikácii je neoceniteľnou špecifickou reagensiou monoklonálna protilátka M75. Okrem iného je CA IX faktorom prežívania, ktorý ochraňuje nádorové bunky pred fyziologickými stresmi. V prípade karcinómov prsníka je expresia proteínu CA IX signifikantne asociovaná s nekrózou a vysokým štádiom ochorenia ako aj so skrátenou dobou relapsu, zvýšeným počtom recidív a zhoršeným celkovým prežívaním pacientov s invazívnymi nádormi [2, 5, 6]. Predkladaná práca opisuje expresiu CA IX v malígnych léziách mliečnej žľazy. Sledovali sme celulárnu lokalizáciu CA IX v 40 karcinómoch mliečnej žľazy. Celkovo sme zistili 2 druhy imunohistochemickej pozitivity. V 9 vzorkách sme pozorovali výlučne silnú membránovú pozitivitu, v 16 vzorkách dominovala kombinovaná (silná membránová a slabá cytoplazmatická) pozitivita (obr. 1). Zvyšných 15 vzoriek nevykazovalo žiadnu pozitivitu.



Obr. 1 Imunohistochemická reakcia na dôkaz CA IX v karcinóme prsníka – hnedé sfarbenie (zväčšenie 200x).

Záver

Súčasná onkologická patológia je charakterizovaná hľadaním nových diagnostických, prognostických a prediktívnych parametrov. V poslednej dobe je v centre medicínskeho výskumu hypoxiou indukovaný proteín CA IX, pričom výskum tejto bielkoviny sa orientuje najmä na jej úlohu v nádoroch, študuje sa jej prognostický význam a možnosti využitia aj v samotnom liečebnom procese. Overenie diagnostickej, prognostickej a terapeutической hodnoty CA IX si vyžiada ešte mnohé analýzy veľkých súborov ochorení s cieľom využitia a uplatnenia tohto proteínu ako nádorového markera aj v praktickej medicíne.

PodĎakovanie

Práca bola financovaná z grantu VEGA 1/0050/11.

Literatúra

- [1] Pastoreková, Zaťovičová, Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition. Current Pharmaceutical Design, **2008**, p. 685, ISSN 1873-4286.
- [2] Pastoreková, Molekulárna biológia rakoviny, **2009**, p. 30-66, ISBN 978-80-224-1114-1.
- [3] Pastoreková, Targeting newly discovered oxygen-sensing cascades for novel cancer treatments. Biology, equipment, drug candidates, **2009**, p. 11.
- [4] CHIA, Prognostic significance of novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. Journal of Clinical Oncology. **2001**, vol. 19, no. 16, p. 3664-3666.
- [5] Pastoreková, Závada, Carbonic anhydrase IX (CAIX) as a potential target for cancer therapy, **2004**, p. 251.
- [6] Pastoreková, Targeting newly discovered oxygen-sensing cascades for novel cancer treatments, **2005**, p. 8.

Použitie izolovaných nervových vlákien pri sledovaní rôznych parametrov v kontrolnej a experimentálnej skupine

Fuseková, E. , Adamkov, M., Ochodnická, E., Bošelová, Ľ., Báľentová, S.

Ústav histológie a embryológie JLF UK Martin
e.fusekova@szm.sk

Abstract

On the isolated nerve fibres we measured the length of the segment, the thickness of the myelinated fibres and the length of the internodes. The number of the Schmidt-Lanterman clefts and their distribution were studied at 200 days after mechanical injury. Our findings support importance Schmidt-Lanterman incisures in processes of remyelination.

Úvod

Myelinizácia nervových vlákien periférneho nervového systému predchádza myelinizáciu v centrálnom nervovom systéme. Nervové vlákna sa tak stávajú funkčne plnohodnotné až po ukončení tohto procesu. Myelínová pošva pôsobí ako izolátor axónu a urýchľuje vedenie vzruchov – saltatórne vedenie vzruchu. Myelinizácia môže byť rôznym spôsobom narušená, výsledkom sú vrodené a získané chyby. Napr. pri sclerosis multiplex demyelinizované axóny môžu fungovať skratovo a tak prenos je spomalený alebo zablokovaný. Rozhodujúcu úlohu pri udržiavaní a tvorbe myelínovej pošvy v PNS zohrávajú Schwannove bunky. Udržiavanie a tvorbu myelínovej pošvy v jednom internódiu zabezpečuje jedna Schwannova bunka [5]. V priebehu internódii sa vyskytujú Schmidtove-Lantermanove štrbiny, ktoré predstavujú kanál, cez ktorý prúdi cytoplazma Schwannovej bunky k axónu. Ako uvádza [2,3] táto tzv. radiálna cesta je milión krát rýchlejšia ako obvodová cesta. Pri remyelinizačnom procese práve Schmidtove-Lantermanove štrbiny zohrávajú nezastupiteľnú úlohu pri transporte rôznych látok a tak zabezpečujú zvýšené nároky v procese obnovy myelínovej pošvy. Remyelinizácia prebieha podľa podobného stavebného plánu ako myelinogéniza [4].

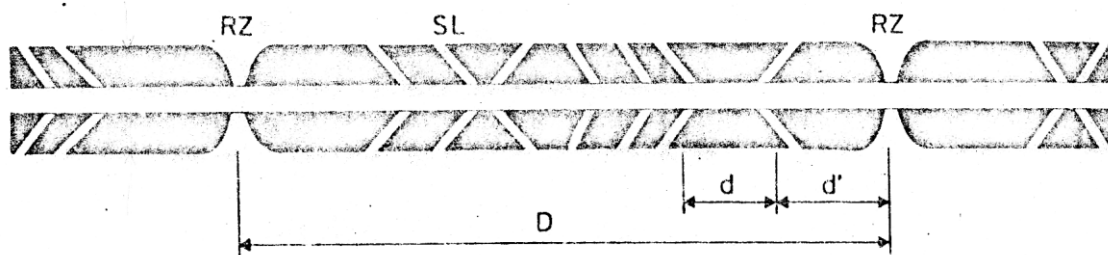
Materiál a metodika

V našom experimente sme použili n. ischiadicus morčiat (*Cavia porcellus*). Zvieratám sme navodili mechanické poškodenie nervu a po určitom čase prežitia (200dní) sme hodnotili dané parametre na izolovaných nervových vláknach.

Odobraté a spracované nervy sme rozvlákňovali pod stereoskopickým mikroskopom v kvapke glycerínu jemnými preparačnými ihlami. Rozvláknené nervy sme ihneď montovali do glycerínu a hodnotili v svetelnom mikroskope.

Na izolovaných nervových vláknach sme merali a hodnotili (obr.1):

1. hrúbku myelinizovaných nervových vlákien
2. dĺžku internódií (D)
3. vzdialenosť medzi dvoma susednými Schmidtovými-Lantermanovými štrbinami (d)
4. vzdialenosť medzi prvou Schmidtovou-Lantermanovou štrbinou a Ranvierovým zárezom (d')
5. celkový počet Schmidtových-Lantermanových štrbín v priebehu internódií (SL)



Obr.1 Znáozornenie merania jednotlivých parametrov

Výsledky a diskusia

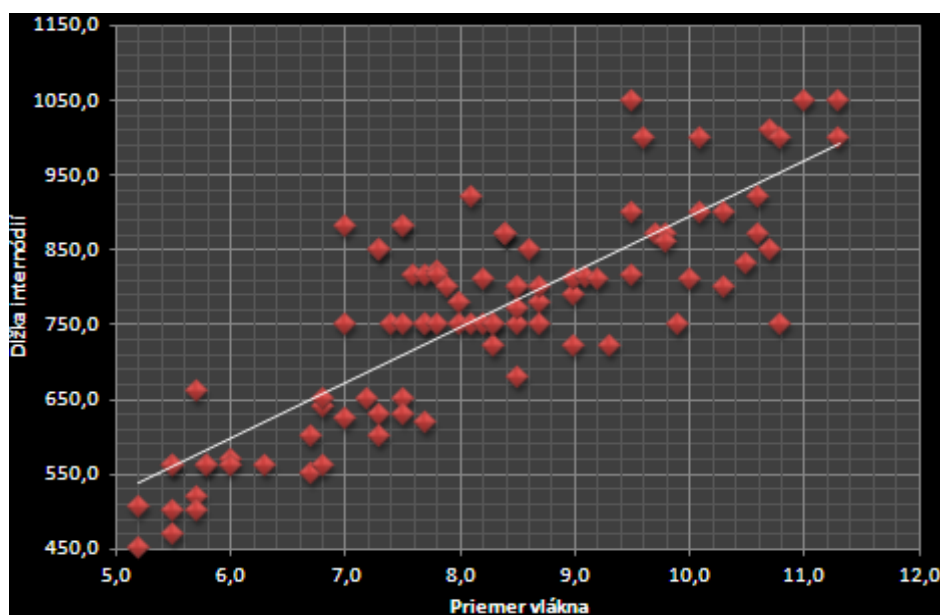
1. Hrúbka myelinizovaných nervových vlákien (zdravé morčatá)

Získané vzorky izolovaných nervových vlákien n. ischiadicus morčat'a obsahovali myelinizované nervové vlákna hrúbky v rozpätí od 5,2 do 11,5 μm .

V skupine zvierat, ktoré sme nechali prežívať 200 dní sme namerali nervové vlákna hrúbky od 2,6 μm do 5,6 μm .

2. Dĺžka internódií sa pohybovala v rozpätí 450-1050 μm . Porovnali sme závislosť dĺžky internódia od hrúbky nervového vlákna (obr.2).

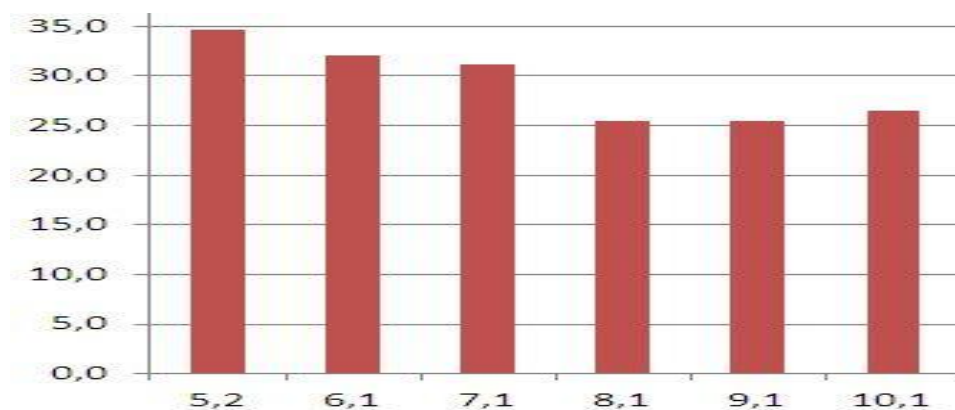
V skupine zvierat, ktoré sme nechali prežívať 200 dní sme namerali internódiá dĺžky 190 μm až 720 μm .



Obr. 2 Závislosť dĺžky internódia od hrúbky nervového vlákna (zdravé morčatá)

3. Dĺžka segmentu

Dĺžka segmentu je vzdialenosť medzi susediacimi Schmidtovými-Lantermánovými štrbinami. Táto vzdialenosť bola v rozpätí 15-80 μm . Z nameraných hodnôt sme vypočítali priemernú dĺžku segmentu pre rôzne hrúbky nervových vlákien (obr.3).



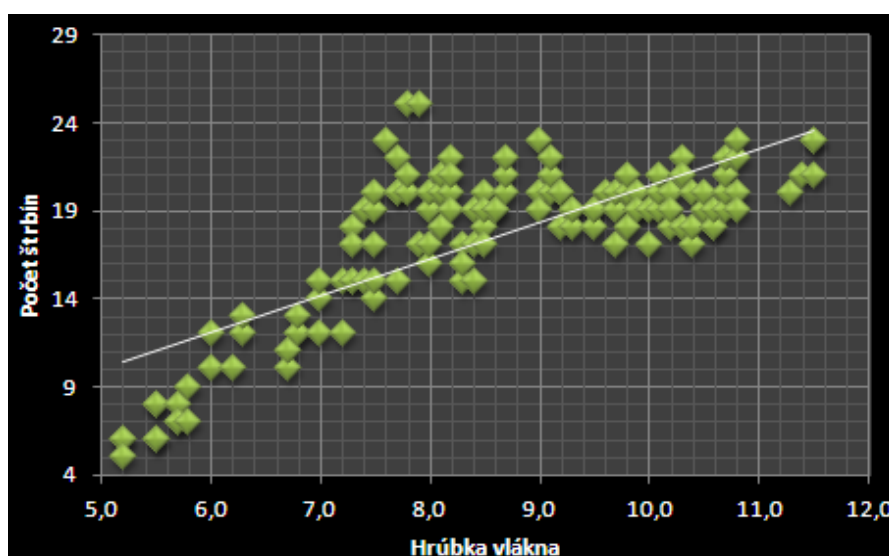
Obr.3 Histogram – závislosť priemernej dĺžky segmentu od hrúbky nervového vlákna

4. Vzďialenosť medzi prvou Schmidtovou-Lantermanou štrbinou a Ranvierovým zárezom

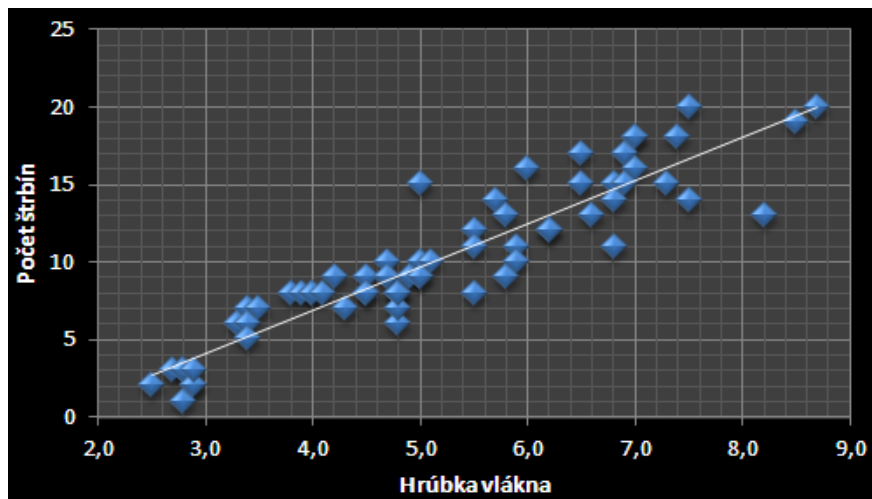
Meraním vzdialenosti prvej Schmidtovej-Lantermanovej štrbiny od Ranvierového zárezu sme zistili, že táto vzdialenosť je vždy väčšia ako priemerná dĺžka segmentu. Väčšia vzdialenosť prvej Schmidtovej-Lantermanovej štrbiny od Ranvierového zárezu je spôsobená laterálnymi slučkami myelínovej pošvy, ktoré pripájajú myelínovú pošvu k axónu v oblasti paranódia.

5. Počet Schmidtových-Lantermanových štrbín v internódiu

V internódiách myelinizovaných nervových vlákien rôznej hrúbky sme zistili variabilný počet Schmidtových-Lantermanových štrbín. Existuje priama závislosť počtu štrbín od hrúbky nervového vlákna (obr.4, obr.5).



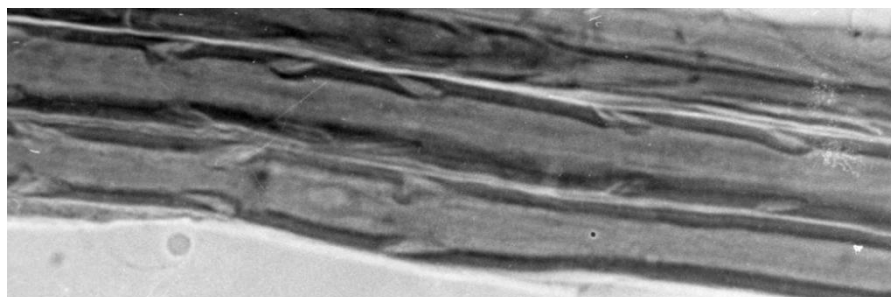
Obr.4 Závislosť počtu Schmidtových-Lantermanových štrbín v internódiu od hrúbky nervového vlákna (zdravé morčatá)



Obr.5 Počet Schmidtových-Lantermánových štrbín v internódiu (zvieratá prežívajúce 200dní)



Obr.6 Izolované nervové vlákna so Schmidtovými-Lantermánovými štrbinami



Obr.7 Detail izolovaných nervových vlákien s početnými Schmidtovými-Lantermánovými štrbinami

Schmidtove-Lantermánove štrbiny zohrávajú dôležitú úlohu pri obnove myelínovej pošvy. Sledovali sme ich počet v priebehu internódií remyelinizovaných nervových vlákien. Remyelinizované nervové vlákna boli s tenšou myelínovou pošvou. Ich internódiá boli v porovnaní s kontrolnou skupinou kratšie, ale s početnými Schmidtovými-Lantermánovými štrbinami. Podobný nález zvýšenia počtu Schmidtových-Lantermánových štrbín opísali vo svojich experimentoch aj iní autori [1]. Tieto nasledovali tesne za sebou so skrátenými segmentmi (obr.6, obr.7).

Záver

Zistili sme zvýšený počet Schmidtových-Lantermannových štrbín v remyelinizovaných internódiách a usudzujeme, že Schmidtove-Lantermannove štrbiny zohrávajú nezastupiteľnú úlohu pri obnove myelínovej pošvy v procese remyelinizácie nervových vlákien. Predstavujú rýchlu cestu pre transport dôležitých látok potrebných pri tvorbe myelínovej pošvy.

Literatúra

- [1] Berger, B.L., Gupta, R., Journal of neurotrauma **2006**, 23, 2, 216-226.
- [2] Bruzzone, R. While, T.W., Paul, D.L., Eur. J. Biochem. **1996**, 238 (1), 1-27.
- [3] Meier, C., Dermietzel, R., J. Neuroscience, **2004**, 24, 3186-3198.
- [4] Mellová, Y., Mello, M., Hešková, G., et al., Sborník lékařský, **2001**, 102, 2, 167-172.
- [5] Poliak, S., Peles, E., Nature Reviews Neuroscience. **2003**, 4, 968-980.

Aplikácia DCE MRI pri diferencovaní malígnych a benígnych lézií prsníka

Hnilicová, Z., Bittšanský, M., Dobrota, D.

Ústav lekárskej biochémie JLF UK Martin
pet.hnilicova@gmail.com

Abstract

According to recent statistics, the mortality and morbidity rates of breast cancer are the highest of all cancers in women in the Slovak republic [1,2]. Therefore, early detection and treatment of breast cancer is necessary to rescue the patients. The goal of this study is to investigate the use of DCE MRI (dynamic contrast enhanced MRI) to differentiate between benign and malignant breast lesions. DCE MRI characteristics are believed to reflect differences in vascularity, vessel permeability, and extracellular diffusion space between these two types of lesions [3,4,5,6,7]. Out of the patient database, we have randomly chosen five patients with a malignant and five with a benign lesion. Patients had previously undergone MRI for breast examination followed by biopsy and histological confirmation. All DCE MRI data were evaluated in the JIM image analysis package (Version 5.0, Xinapse Systems Ltd., Northants, UK). In the determined regions of interest, changes of signal intensity were observed over the acquisition time. We also acquired curves of dynamic contrast enhancement. The largest increase of relative signal intensity took place in the first 3 minutes after contrast administration; this is known as a wash-in rate. We then compared the parts of the curves with the largest increase of signal intensity during the timeframe. Malignant lesions tended to have higher maximum signal intensity increases per timeframe than benign ones.

This work was supported by the grant of the Slovak Ministry of Health, No. 2007/57-UK-17.

Key words: Breast cancer, Benign lesion, Malignant lesion, Dynamic contrast enhanced MRI

Úvod

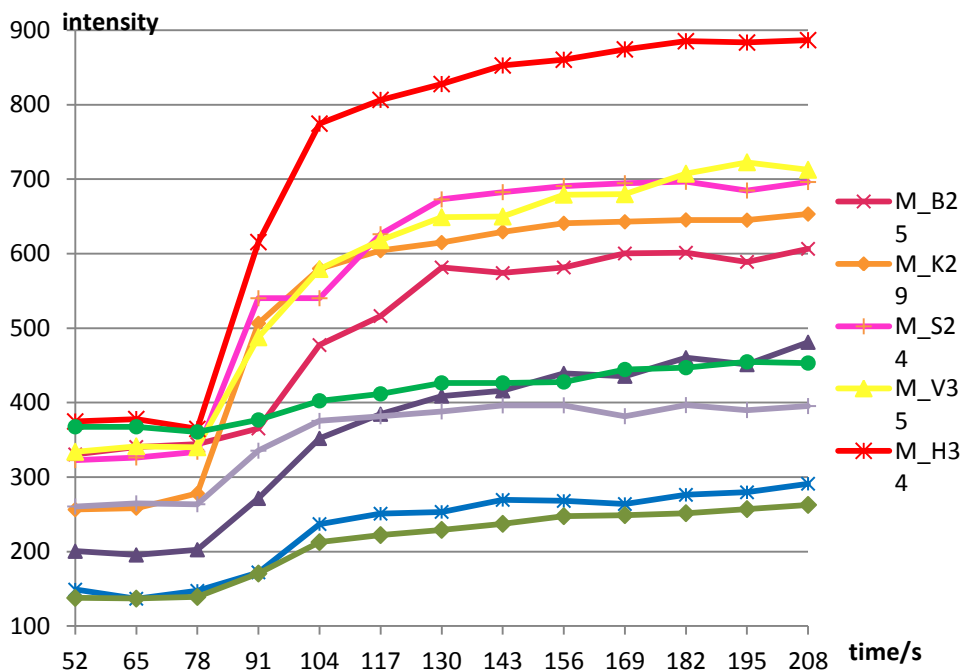
Význam MRI (magnetic resonance imaging) pri diagnostike karcinómu prsníka začal až v 70- tých rokoch 20. storočia. MRI prsníkov poskytuje vysokú senzitivitu (94 % - 99 %) pre detekciu tumoru [3,4,8]. Nápomocnou modalitou MRI je predovšetkým dynamické sledovanie kinetiky intenzity signálu, DCE MRI (dynamic contrast-enhanced MRI), umožňujúce rozlíšenie malígnej od benígnej lézie na základe analýzy kinetických a dynamických zmien. Jedná sa o technologický postup získavania sérií T_1 -vážených 3D MR obrazov prsníkov pred, počas a po aplikovaní kontrastnej látky [9,10,11]. Kontrastná látka je paramagnetická substancia vytvárajúca vlastné magnetické pole, čím skracuje relaxačné časy a umožňuje kontrastne odlíšiť tkanivá podľa obsahu kontrastnej látky. V DCE MRI prsníkov sa využíva vzácna zemina gadolínium ako súčasť kontrastnej látky Gd-DTPA ("diethylenetriamine penta-acetic acid/gadopentetát dimeglumínu") [9,11]. Dynamické krivky DCE MRI sú získavané z nárastu intenzity signálu tej oblasti lézie, ktorá bola označená ako oblasť záujmu ("ROI" region of interest). Intenzita signálu sa zaznamenáva ako funkcia meracieho času po podaní kontrastnej látky [4,9,12].

Materiál a metodika

Pre účely štúdie sa analyzovalo 5 benígnych a 5 malígnych nálezov, ktoré boli histologicky potvrdené. Snímky predstavovali dynamické T₁-vážené 3D snímky s nasledujúcimi parametrami: opakovací čas "TR"(repetition time) = 3,61 ms, echo čas "TE" (echo time) = 1,21 ms; uhol "flip angle" = 6°, bez potlačenia tuku ("no fat suppression"). Meranie bolo vykonávané pomocou štandardných prsníkových cievok na 3T celotelovom MRI systéme Siemens (MAGNETOM Trio a Tim System, Erlangen, Nemecko). Pre účely merania boli podstatné MRI snímky prsníkov s aplikáciou kontrastnej látky. Po 30 sekundách merania sérií obrazov sa preto intravenózne aplikoval Gd-DTPA (multihance v pomere 0,2 ml/kg) [9,12]. Následne bolo zmeraných 17 sérií 72 rezov tkanivom prsníkov (hrúbka rezov 2 mm). Série boli zosnímané v 13 sekundových intervaloch. Vyhodnocovanie dát prebiehalo na medicínskom softvérovom balíku JIM (verzia 5.0, Xinapse Systems Ltd., Northants, UK) [13].

Výsledky a diskusia

Štúdia bola venovaná analýze intenzity signálu počas prvých 2 až 3 minút od aplikácie kontrastnej látky. Spomínaná časť záznamu sa v literatúre uvádza ako oblasť najprudšieho nárastu intenzity signálu - nárastová krivka ("wash-in rate") v DCE MRI meraní. Pre desať vzorových dát sa pomocou obrazového analyzačného balíka JIM vygenerovali nárastové krivky. Na základe pozorovania sa podstatným javil časový interval od 52 sekundy, čo koreluje aj s literatúrou [4,6,8,9,12]. Na vzorke 10 analyzovaných dát je badateľný vysoký nárast intenzity signálu u malígnych vzoriek (odtíene červenej farby v grafe) v porovnaní s benígnymi (odtíene zelenej farby v grafe) (Obr.1). Tumor narastá v závislosti od jeho vyživovania, ktoré zabezpečujú novovytvárané vyživovacie cievy (angiogenéza). Malígne lézie majú rýchlejší vzostup a aj vyššie hodnoty intenzít signálu ako benígne lézie, čo koreluje so stupňom neoangiogenézy [4,9,10].



Obr. 1 Graf hodnôt intenzít signálu v jednotlivých meracích časoch nárastových kriviek všetkých DCE MRI meraní. Odtíene červenej farby v grafe predstavujú malígne vzorky, odtíene zelenej farby v grafe benígne vzorky.

Záver

Vo vyznačených ROI prsníkových lézií, sa pozorovali zmeny intenzity signálu v priebehu meracieho času. Získali sme dynamické, kontrastne zvýraznené krivky. Najväčší nárast relatívnej intenzity signálu je v prvých 3 minútach po aplikácii kontrastnej látky, v úseku nazývanom nárastová krivka. Porovnávali sme časti kriviek s najväčšou zmenou v náraste intenzity signálu v priebehu meracieho času. U malígnych lézií sa javili väčšie zmeny nárastu intenzity signálu než u benígnych. Priebeh štúdie by nebol možný bez histologickej analýzy tkanív, pomocou ktorej boli výsledky štúdie potvrdené.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantom MZ SR 2007/57-UK-17 „Neinvazívne priestorové mapovanie významných metabolitov v mozgu a prostate pri nádorových, neurologických a psychiatrických ochoreniach“, spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Bella, Onkológia. **2006**, 1, 26-28.
- [2] Hlava, Obšitníková, Pleško, et al, Národné centrum zdravotníckych informácií. **2010**.
- [3] Gilhujs, Gigeret, Bick, Med.Phys. **1998**, 25, 1647-1654.
- [4] Tozaki, Magnetic resonance in Medical Sciences. **2004**, 3, 189-197.
- [5] Yankeelov, Lepage, Chakravarthy, et al, Magnetic Resonance Imaging. **2007**, 25, 1-13.
- [6] Sinha, Lucas-Quesada, Sinha, et al, Journal of MRI. **2002**, 15, 693-704.
- [7] Galiè, Farace, Merigo, et al, Microvascular Research. **2009**, 78, 370-378.
- [8] Orel, Schnall, LiVolsi, Troupin, Radiology. **1994**, 190, 485-493.
- [9] Chen, Medical Physics. **2006**, 33, 2878 – 2887.
- [10] Castellani, et al, Methods Inf Med. **2009**, 3, 248-253.
- [11] Kurz, et al, European Journal of Radiology. **2010**, 76,195-210.
- [12] Kuhl, Mielcareck, Klaschik, et al. Radiology. **1999**, 211, 101-110.
- [13] Xinapse Systems Ltd.: online manual JIM. available: <http://www.xinapse.com/>

Štúdium vývinu týmusu v embryonálnom období klasickými histologickými metódami

Jurková K.^{1,2}, Varga, I.³, Polák Š.³, Kovalská M.², Furjelová M.^{1,2}, Adamkov M.²

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Malá Hora 4, 03601, Martin, ²Ústav histológie a embryológie Jesseniova lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Malá Hora 4, 03601, Martin, ³Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Sasinkova 4, 81108, Bratislava
katka.jurkova@gmail.com

Abstract

The thymus is the central organ of the immune system important for the development and maintenance of cellular immunity. Thymus develops from the third pharyngeal pouch and descends from neck into the anterior- superior mediastinum. Epithelial-mesenchymal interaction between the third pharyngeal pouch endoderm and surrounding neural crest derived- cells mesenchyme is necessary for the proliferation and differentiation of thymic epithelial cells. In this article we photographically present the development of thymus from 5th up to the 8th week. The microphotographs of the light microscopy in those weeks capture the rapid prenatal development of these organ.

Úvod

Týmus patrí medzi centrálne (primárne) lymfatické orgány. Zabezpečuje diferenciáciu, selekciu ako aj získavanie imunokompetencie T- lymfocytov. Tie sú zodpovedné za bunkovú imunitu. Týmus človeka vzniká v žiabrovej (faryngovej) oblasti, z ktorej sa vo fylogénéze u nižších vodných stavovcov vyvinuli žiabre (Varga et al. 2008). Medzi lymfatickými orgánmi má zvláštne postavenie, pretože jeho strómu tvoria retikulo-epitelové bunky (nie bunky väziva), vznikajúce z endodermu tretieho faryngového vaku (Gordon et al. 2004). Týmus je pre T- lymfocyty akousi „univerzitou“, pretože počas ich pobytu v tomto orgáne sa naučia rozlišovať vlastné štruktúry od nevlastných, vlastné tolerovať a na nevlastné reagovať a eliminovať (Buc 2001). Zrelé a imunokompetentné T- lymfocyty opúšťajú týmus a presúvajú sa do sekundárnych lymfatických orgánov. Klasickou histológiou a dostupnými metódami je možné podať prehľad dynamických zmien tohto orgánu lymfatického systému počas jednotlivých týždňov embryonálneho vývinu, prispieť k poznaniu normogenézy a v neposlednom rade k správne pochopeniu vzniku vrodených vývinových chýb a anomálií. V tomto článku je fotograficky zdokumentovaný vývoj týmusu od šiesteho do ôsmeho týždňa embryonálneho vývinu.

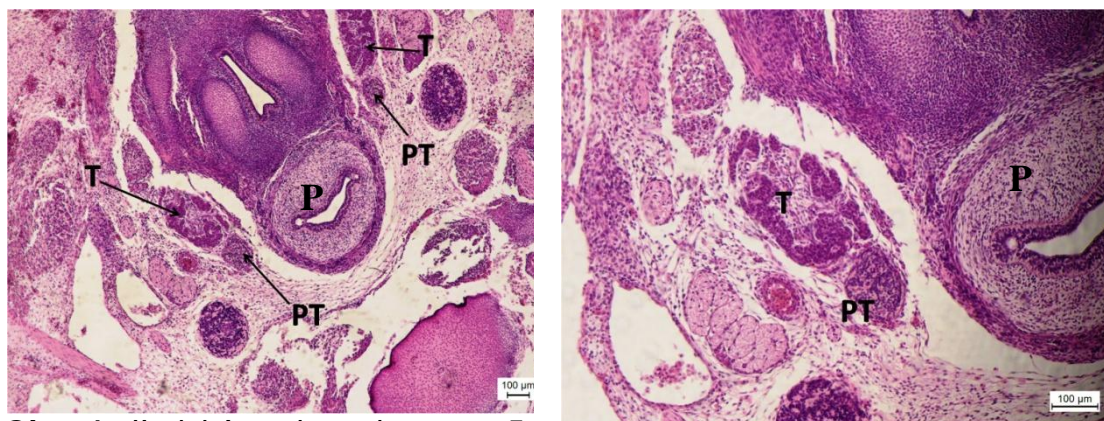
Materiál a metódy

Náš súbor pozostával z 18 ľudských embryí (od 5. do 8. týždňa vývinu). Embryá tvoria súčasť zbierky Ústavu histológie a embryológie Lekárskej fakulty UK v Bratislave. Embryá boli odobraté po spontánných a indukovaných potratoch v rôznych okresoch Slovenska ešte začiatkom 80. rokov minulého storočia. Po fixácii vo formalíne a následnom odvodnení vo vzostupnom rade alkoholu a prejasnení boli zaliaté do parafínu. Takto zafixované embryá boli uskladnené v embryologickom laboratóriu ústavu. Z parafínových bločkov sme pomocou mikrotómu značky LEICA zhotovili 7 µm hrubé sériové rezy. Časť embryí sme zrezali transverzálne (priečne), ďalšie sagitálne (pozdĺžne). Pri štúdiu rezov tkanív sme použili metódy klasickej histológie. Parafínové rezy sme vždy zafarbili kombináciou základného hematoxylínu a kyslého eozínu. Na zvýraznenie glykogénu bola použitá kombinácia histochemickej

PAS reakcie (Periodic Acid Schiff), bázeickej celestínovej modrej a kyslej oranž G. Rezy sme následne pozorovali svetelným mikroskopom značky LEICA DM 2500, mikrofotografie sme zhotovili digitálnou kamerou LEICA DFC290HD (Heerbrugg, Germany).

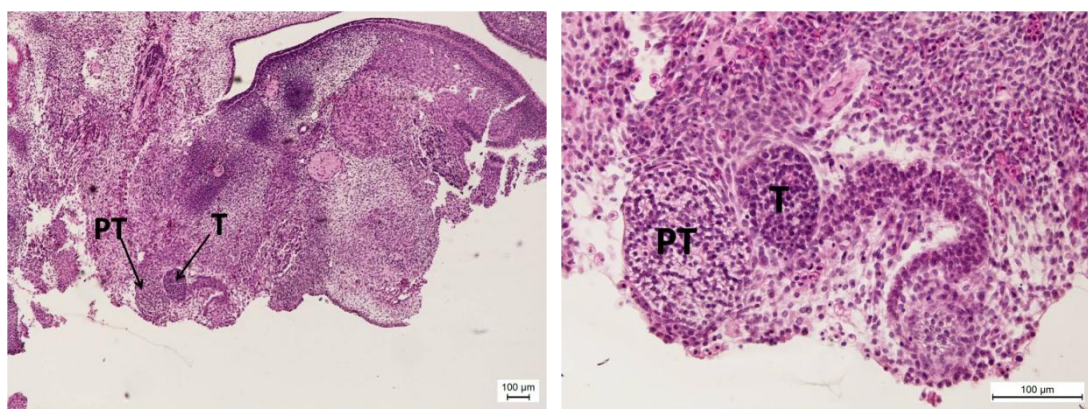
Výsledky

Prvé základy týmusu a prištítnych teliesok možno prvýkrát pozorovať koncom piateho a začiatkom šiesteho týždňa (obr. 1).



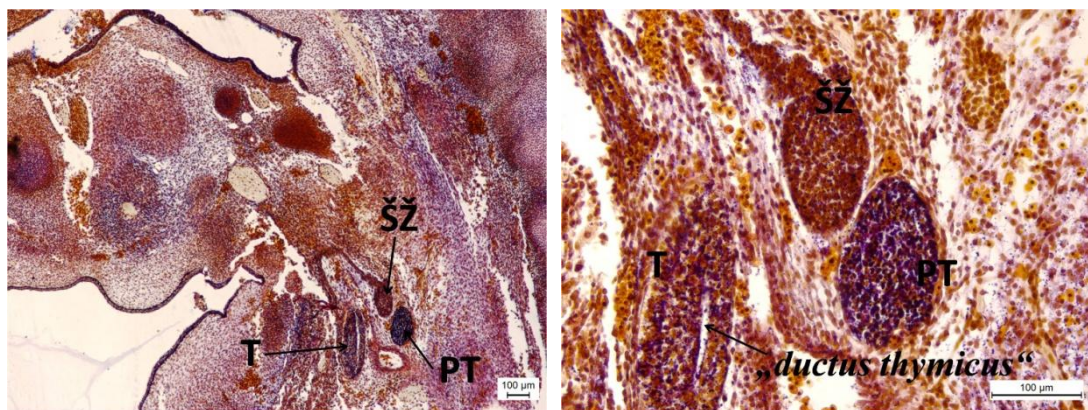
Obr. 1. Ľudské embryo koncom 5. a začiatkom 6. týždňa embryonálneho vývinu. Priečny rez. Proliferácia buniek budúceho T- týmusu, PT- základ prištítnych teliesok, P- pažerák (hematoxylín a eozín, zväčšenie 50x a 100x).

Proliferácia epitelových buniek z tretieho faryngového vaku začína na začiatku šiesteho týždňa. Faryngová oblasť je z hľadiska ontogenézy dôležitá nielen pre vývin týmusu, ale aj mnohých ďalších orgánov, vrátane štítnej žľazy, prištítnych teliesok a neskôr aj podnebných mandlí. Najvýraznejšiu proliferáciu epitelových buniek pozorujeme v oblasti tretieho faryngového vaku. Kranio- dorzálna časť dáva vznik dolným prištítnym telieskam, pričom z kaudálno- ventrálnej časti vznikajú základy budúceho týmusu. Tieto dve oblasti sú ľahko rozlíšiteľné, bunky budúcich prištítnych teliesok sú dlhšie a svetlejšie (obr. 2), obsahujú viac glykogénu než epitelové bunky vyvíjajúceho sa týmusu (obr. 3).



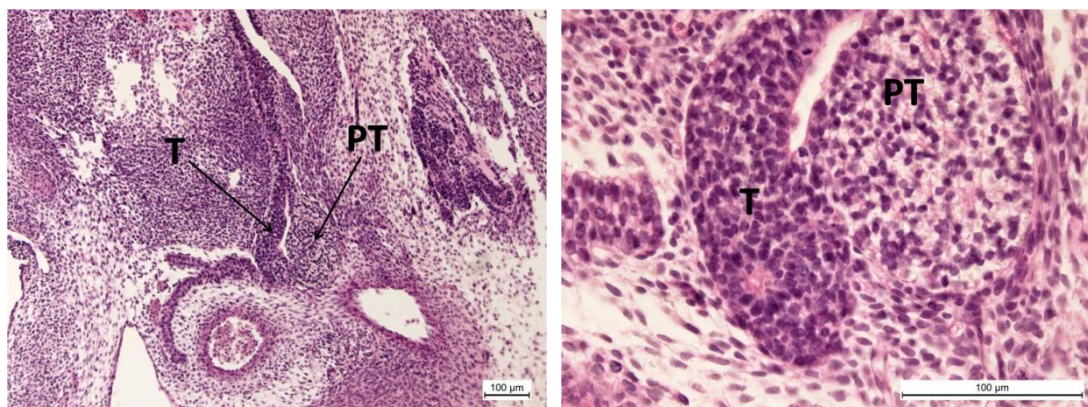
Obr. 2. Ľudské embryo v 6. týždni embryonálneho vývinu. Pozdĺžny rez. PT- základ prištítnych teliesok, T- týmus (hematoxylín a eozín, zväčšenie 50x a 200x).

Párové základy týmusu, spolu so základmi budúcich prištítnych teliesok, postupne zostupujú (*descensus thymi*). V siedmom týždni embryonálneho vývoja sa zostupujúce epitelové základy odpoja od steny faryngu, pričom v centre vyvíjajúceho sa lymfatického orgánu sa môže vytvoriť kanálik (*ductus medullaris thymi*) (obr. 3). Bunky budúceho týmusu sú jasne odlišiteľné od základov prištítnych teliesok a štítnej žľazy a obsahujú značné množstvo glykogénu. Prítomnosť červených krviniek v okolitom embryonálnom väzive dokazuje prítomnosť krvných ciev v blízkosti vyvíjajúceho sa týmusu.



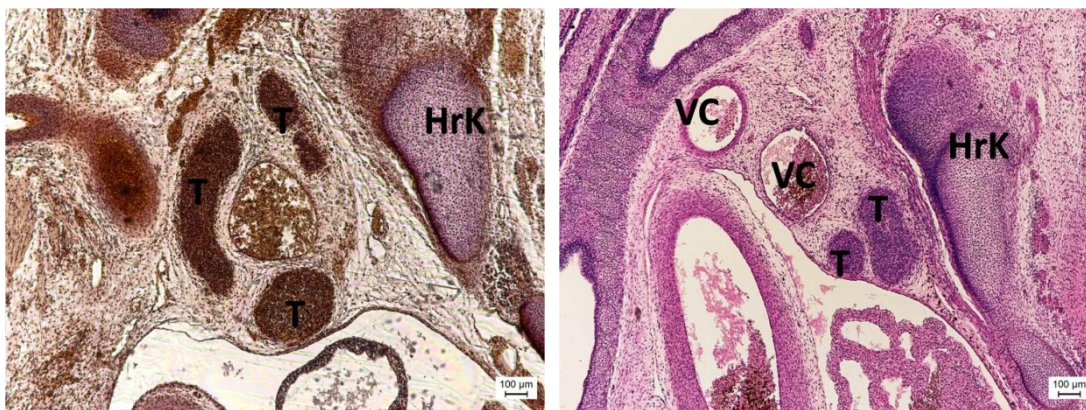
Obr. 3. Ľudské embryo v 7. týždni embryonálneho vývinu. Pozdĺžny rez. T- týmus s centrálnym kanálikom (*ductus medullaris thymi*), ŠŽ- základ budúcej štítnej žľazy, PT- základ prištítnych teliesok (PAS+ oranž G+ celestínova modrá, zväčšenie 50x a 200x).

Základ týmusu v siedmom týždni tvoria cylindrické epitelové bunky (*thymus epithelialis*) uložené tesne vedľa seba. Od okolitých buniek mezenchýmu ich oddeľuje bazálna lamina jasne viditeľná po znázornení retikulárnych vlákien.



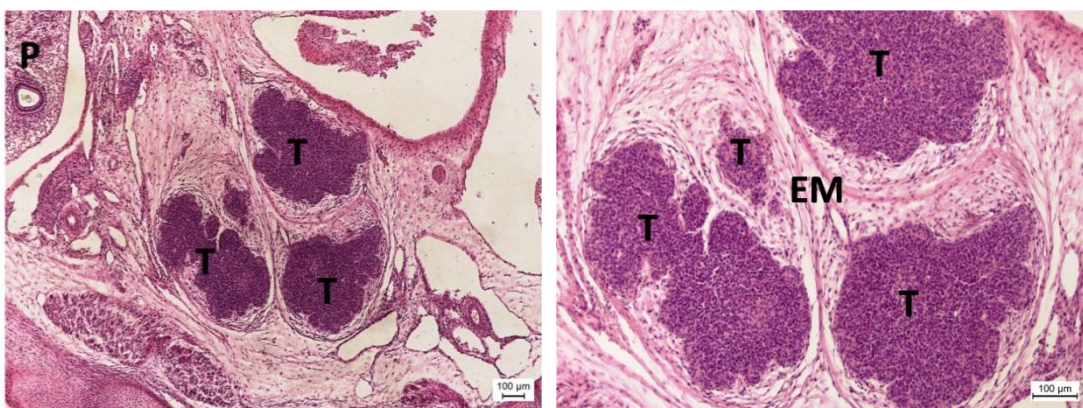
Obr. 4. Ľudské embryo v 7. týždni embryonálneho vývinu. Pozdĺžny rez. T- týmus, PT- prištítne telieska (hematoxylín a eozín, zväčšenie 200x a 400x).

V ôsmom týždni sú základy týmusu lokalizované za vyvíjajúcou sa hrudnou kosťou (Obr. 5).



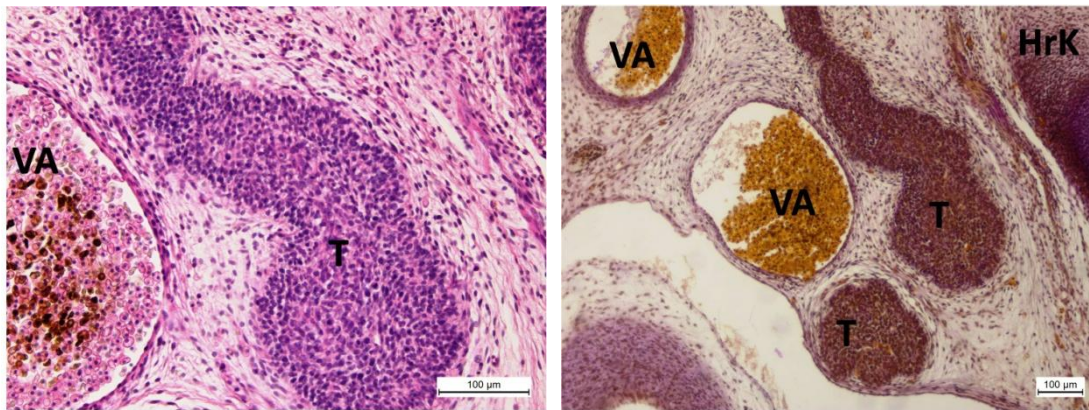
Obr. 5. Ľudské embryo v 8. týždni embryonálneho vývinu. Pozdĺžny rez. T- týmus, HrK-vyvíjajúca sa hrudná kosť, VC- veľká cieva srdca (PAS+ oranž G+ celestínova modrá, hematoxylín a eozín; zväčšenie 50x a 50x).

Embryo sa rýchlo vyvíja a rastie, jednotlivé základy sa čím ďalej tým viac približujú, avšak zostávajú oddelené vrstvou spojivového tkaniva. Okolité bunky ektomezenchýmu sa začínajú vnárať do epitelu týmusu (budúce interlobulárne septá). Ich súčasťou je množstvo krvných ciev, ktoré prinášajú pro T- lymfocyty (obr. 6).



Obr. 6. Ľudské embryo v 8. týždni embryonálneho vývinu. Pozdĺžny rez. T- týmus, P- pľúca, EM- ektomezenchým (spojivové tkanivo pôvodom z neurálnej lišty) (hematoxylín a eozín, zväčšenie 50x a 100x).

Epitelové bunky základov týmusu možno morfológicky diferencovať na cylindrické bunky v periférnej oblasti, usporiadané v radoch a na bunky nepravidelného usporiadania lokalizované v centrálnej časti týmusu (obr. 7). Primitívny lymfatický orgán naďalej zostupuje kranio- kaudálnym smerom, v ôsmom týždni sa *thymus epithelialis* začína vyvíjať na *thymus lymphaticus*.



Obr. 7. Ľudské embryo v 8. týždni embryonálneho vývinu (52 dní). Pozdĺžny rez. VA- veľká artéria, T- týmus, HrK- vyvíjajúca sa hrudná kosť (hematoxylín a eozín, PAS+ oranž G+ celestínova modrá; zväčšenie 200x a 100x).

Diskusia

Faryngová (žiabrová) oblasť sa stala klasickou oblasťou, na ktorej bol dokázaný vzťah medzi ontogenézou a fylogenézou. Je to oblasť, v ktorej sa pomerne konzervatívne rekapituluje vývoj žiabrá (branchiae) v ontogenéze všetkých chordát. Žiabrová oblasť bola exponovaná priamo kontaktom s vonkajším prostredím a preto musela reagovať na zmenu prostredia pri prechode stavovcov z vodného na suchozemské prostredie. Tak sa žiabrové vačky začali postupne meniť na imunitné a endokrinné orgány a ich epitel sa stal okrem iných aj zdrojom pre týmus, ktorý sa spočiatku vyvíjal vo všetkých faryngových vačkách. Týmus a nové štruktúry v branchiálnej oblasti sa objavujú v súvislosti s vývinom štítnej žľazy. Počas evolúcie sa počet základov týmusu redukoval a z rovnakých základov sa vyvinuli prístítne a ultimobranchiálne telieska (Slípka 1986). Proliferácia epitelových buniek distálnej časti druhého, tretieho a štvrtého faryngového vačku začína začiatkom piateho týždňa kranio- kaudálnym smerom. Prvé štádia základov týmusu môžeme pozorovať v šiestom týždni embryonálneho vývinu. Vývin týmusu z druhého a štvrtého faryngového vačku je evolučne podmienený, u žralokov sa týmus vyvíja vo všetkých žiabrových štrbinách (Pospíšilová et al. 1999). U ľudí je vývin týmusu redukovaný len na tretí faryngový vaček. Niektorí autori popisujú proliferáciu endodermálnych buniek aj v druhom (*thymus secundus*) (Varga et al. 2011) a v štvrtom (*thymus IV*) faryngovom vačku (Gasser 1975, Van Dyke 1941). V našom súbore sme proliferáciu buniek v druhom a štvrtom faryngovom vačku nepozorovali. Podľa Pospíšilovej et al. (1999) sa v skoršom období zastavuje diferenciácia základov týmusu z buniek druhého a štvrtého vačku, pretože tieto bunky nie sú schopné spojiť sa s proliferujúcimi bunkami ektodermu. Táto hypotéza podporuje dvojaký, endo-ektodermálny pôvod epitelu týmusu (Rezzani et al. 2008). Základy týmusu v siedmom a ôsmom týždni prenatalného vývinu tvoria prevažne epitelové bunky špecifického usporiadania. V základoch týmusu sú ultraštruktúrárne rozdielne bunky v periférii a v centrálnej časti (von Gaudecker 1986). Toto tvrdenie podporujú aj naše pozorovania, v periférnej oblasti sú bunky cylindrické a usporiadané do radu, pričom v centrálnej časti sú bunky polygonálne a neusporiadané. Bazálnou laminou (*lamina basalis*) sú tieto epitelové bunky oddelené od okolitého mezenchýmu. Ten sa vyvíja z buniek neurálnej lišty (Bockman and Kirby 1984, 1989). Párové základy týmusu spolu so základmi dolných prístítnych teliesok zostupujú kranio- kaudálnym smerom až sa v siedmom týždni odpoja od steny faryngu. Následne sa počas ôsmeho týždňa

embryonálneho vývoja presúvajú do oblasti horného a predného mediastína, za vyvíjajúcu sa hrudnú kosť.

Záver

Využitím klasických a špeciálnych metód farbenia a zobrazovania sme pozorovali rýchly priebeh zmien vo vývine týmusu v embryonálnom období. Sledovali sme zmeny prebiehajúce v rámci vnútornej štruktúry a zmenu lokalizácie orgánu počas vývinu v organizme. Fotograficky sme zdokumentovali morfológické zmeny týmusu viditeľné svetelným mikroskopom. Na základe morfológických pozorovaní sme konštatovali počas embryonálneho vývinu dynamické zmeny v oblasti tretieho faryngového vaku, opísali sme vývin prvých základov týmusu a postupnú proliferáciu a rast buniek. V rámci týchto pozorovaní bolo možné sledovať postupný presun základov týmusu z oblastí faryngových oblúkov, kranio- kaudálnym smerom. Týmus sa v procese vývinu postupne premiestňoval z oblasti faryngových vakov, do oblasti definitívneho uloženia, pred srdcom a za hrudnou kosťou.

Podakovanie

Predložená práca bola riešená ako súčasť grantovej úlohy VEGA 1/0902/11 „Týmus v ontogenéze človeka“.

Literatúra

- [1] BUC, M., **2001**: Imunológia. Bratislava, Vydavateľstvo Veda, s.464. ISBN 80-224-0667-8.
- [2] BOCKMAN, D. E., KIRBY, M. L., **1984**: Dependence of thymus development on derivatives of neural crest. *Science*; 223: 498-500.
- [3] BOCKMAN, D. E., KIRBY, M. L., **1989**: Neural crest function in thymus development. *Immunol Ser* 1989; 45: 451-467.
- [4] GASSER, R. F., **1975**: Atlas of Human Embryos. Hagerstown. Harper and Row, S. 374.
- [5] GORDON, J., WILSON, V.A., BLAIR, N. F., SHERIDAN, J., FARLEY, A., WILSON, L., MANLEY, N. R., BLACKBURN, C. C., **2004**: Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nature Immunol* ; 5: 546-53.
- [6] POSPÍŠILOVÁ, V., SLÍPKA, J., ZLATOŠ, J., KOČOVÁ, J., **1999**: Contribution to the thymus evolutionary morphology. *Plzen. Lek. Sbor.*, 72: 205- 207.
- [7] REZZANI, R., BONOMINI, F., RODELLA, L. F., **2008**: Histochemical and molecular overview of thymus as site for T- cells development. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 43: 73- 120.
- [8] SLÍPKA, J., **1986**: Evolutionary morphology of the branchial region as the reflection of environmental changes. In: NOVÁK V. J. A, VANČATA V., VANČATOVÁ M. A., 1986: Behaviour, Adaptation and Evolution, Praha. ČSAV pp. 203-211.
- [9] VAN DYKE, J. H., **1941**: On the origin of accessory thymic tissue, thymus IV: occurrence in man. *Anat. Rec.*, 79: 179- 209.
- [10] VARGA, I., POSPÍŠILOVÁ, V., JABLONSKÁ, V., GÁLFIOVÁ, P., POLÁK, S.,: The thymus: Picture review of human thymus prenatal development. *Bratisl Lek Listy* **2011**; 112(7): 368-372.
- [11] VARGA, I., POSPÍŠILOVÁ, V., GMITTEROVÁ, K., GÁLFIOVÁ, P., POLÁK, Š., GALBAVÝ, Š., **2008**: The phylogenesis and ontogenesis of the human pharyngeal region focused on the thymus, parathyroid, and thyroid glands. *Neuroendocrinol Lett* ; 29(6): 837-845.
- [12] VON GAUDECKER, B., **1986**: The Development of the Human Thymus Microenvironment. In MÜLLER- HERMELINK, H. K., 1986: The Human Thymus. Histophysiology and Pathology. Berlin. Springer- Verlag, s. 267.

Histopatologická analýza mamárnych nádorov u samíc potkanov liečených fluvastatínom

Kapinová, A.^{1,2}, Kajo, K.³, Kubatka, P.^{1,2}, Žihlavičková, K.², Péč, M.²

¹Ústav lekárskej biochémie JLF UK v Martine, ²Ústav lekárskej biológie JLF UK v Martine, ³Ústav patológie SZU a Onkologický ústav Sv. Alžbety v Bratislave, BB Biocyt diagnostické centrum s.r.o. v Banskej Bystrici
andreakapinova@gmail.com

Abstract

The results of preclinical research have indicated anticarcinogenic effects of statins in diverse tumors including breast cancer. Lipophilic atorvastatin and simvastatin have demonstrated high anticarcinogenic effects in experimental breast cancer in our previous experiments. In this study, the chemopreventive potential of another lipophilic statin - fluvastatin in N-methyl-N-nitrosourea induced mammary carcinogenesis in female rats was evaluated. Chemoprevention with fluvastatin lasted the entire experiment (18 weeks). Dietary administered fluvastatin (200mg/kg of diet) has revealed high antineoplastic effects compared to the control group. The differences between the control group and the group with administered fluvastatin at a concentration of 20 mg/kg of diet in the representation of carcinomas (with exception of fewer comedo lesions in treated group) were not found. In the group with administered fluvastatin at a concentration of 200 mg/kg of diet compared to the control group, an apparent decrease in the number of malignant lesions was observed. A histopathological analysis of mammary tumors has not shown a shift in the rate of poorly differentiated and well differentiated invasive mammary carcinomas after fluvastatin treatment. Pleiotropic attributes of statins including anticarcinogenic effects may open new possibilities in clinical medicine.

Key words: chemoprevention, mammary carcinogenesis, rat, histopathological analysis, fluvastatin

Úvod

Statíny, inhibítory 3-hydroxy-3-metylglutaryl koenzýmu A reduktázy, predstavujú látky s dobre dokumentovanými terapeutickými a preventívnymi účinkami u kardiovaskulárnych ochorení. Tieto najčastejšie používané hypolipidemiká vykazujú multiplicitné pôsobenie aj mimo primárnej a sekundárnej prevencie kardiovaskulárnych chorôb [1]. V epidemiologických štúdiách preukázali statíny tumorsupresívne účinky u viacerých typov neoplázií, vrátane rakoviny prsníka [2]. Úloha statínov v karcinogéze je napriek početným experimentom kontroverzná a stále neobjasnená. Klinickí a experimentálni onkológovia diskutujú o ich pleiotropných účinkoch, zahŕňajúcich protizápalové, imunomodulačné a antiproliferačné vlastnosti [3]. Výsledky našich predchádzajúcich štúdií s atorvastatínom a simvastatínom demonštrujú vysoký antineoplastický efekt statínov v experimentálnej mamárnej karcinogéze [4, 5]. V našej štúdii sme sledovali antineoplastické účinky lipofilného statínu - fluvastatínu v modeli prevencie chemicky indukovanej experimentálnej mamárnej karcinogézy u samíc potkanov, nakoľko v takomto modeli doposiaľ ešte examinované neboli. Jeden z cieľov našej štúdie – histomorfologická analýza – môže viesť k logickým záverom pri posudzovaní efektívnosti farmaka a jeho vplyvu na diferenciáciu a prognózu nádorov počas dlhodobej liečby.

Materiál a Metódy

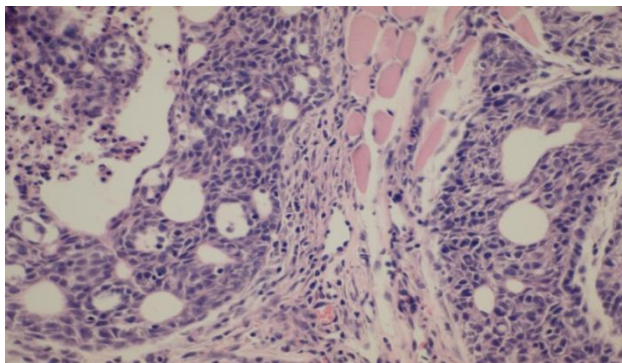
Experimentálnu vzorku zvierat tvorilo 60 samíc potkana kmeňa Sprague-Dawley vo veku 32-36 dní, ktoré boli rozdelené do troch experimentálnych skupín (20 zvierat na skupinu). Chemoprevencia začala týždeň pred aplikovaním karcinogénu. Fluvastatín bol zvieratám aplikovaný v potrave v dvoch koncentráciách: 20 mg/kg potravy (FLUVA 20) a 200 mg/kg potravy (FLUVA 200), počas celej dĺžky experimentu. Tretia skupina bola kontrolná (KONT), bez chemoprevencie. Karcinogén N-metyl-N-nitrozourea podaný zvieratám intraperitoneálne v priemere na 40. postnatálny deň slúžil pre indukciu mamárnej karcinogenézy v jednorázovej dávke 50 mg/kg hmotnosti zvieraťa. Od 6. týždňa experimentu boli zvieratá palpované s cieľom zistiť výskyt, lokalizáciu a veľkosť mamárnych nálezov. K usmrteniu zvierat došlo rýchlou dekapitáciou v 18. týždni experimentu. Počas pitvy bola uskutočnená excízia mamárnych nádorov. Konvenčnou metodikou boli vzorky tkaniva zafixované do parafínu a odoslané na histologické vyšetrenie. Nádory boli klasifikované podľa medzinárodných kritérií pre klasifikáciu nádorov u potkanov [6]. Sledované boli aj makroskopické zmeny na vybraných orgánoch. V jednotlivých skupinách sme štatisticky vyhodnotili parametre mamárnej karcinogenézy: incidenciu, frekvenciu, latenciu, objem nádorov a určili sme topografiu mamárnych tumorov. Vyhodnotili sme zmeny v histologickej typizácii a grading nádorov po aplikácii fluvastatínu. Vzorky tkaniva mamárnych nádorov boli rozdelené do dvoch skupín - dobre diferencované (low grade, LG) a slabo diferencované (high grade, HG). Kritéria pre kategorizáciu – solidizácia, bunková atypia, mitotický index, nekróza, boli zvolené na základe štandardných diagnostických metód klasifikácie. Za HG karcinómy boli považované nádory s ≥ 2 pozitívnymi kritériami a za LG s ≤ 1 pozitívnym kritériom. Ak vzorky tkaniva preukazovali $> 30\%$ solidný rast, bolo možné hovoriť o solidizácii. Za vysoký mitotický index bola považovaná hodnota ≥ 10 pozorovaných mitóz v 10-tich zorných poliach.

Výsledky

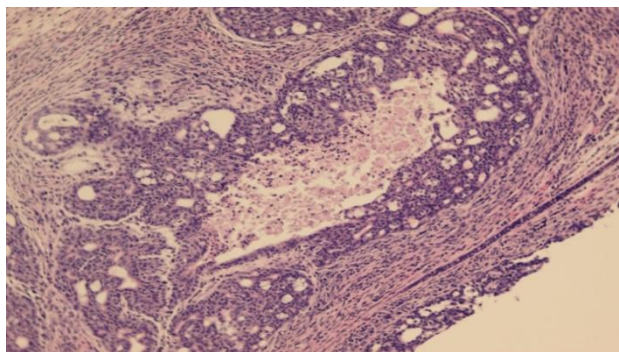
Fluvastatín aplikovaný v skupine s vyššou koncentráciou výrazne potlačil frekvenciu mamárnych nádorov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Fluvastatín aplikovaný v nižšej koncentrácii signifikantne neznížil parametre mamárnej karcinogenézy. Medzi skupinami KONT a FLUVA 20 sme nezistili významnejšie rozdiely v zastúpení karcinómov, s výnimkou zastúpenia nižšieho počtu komedónových lézií v liečenej skupine. V skupine FLUVA 200 bol zistený výrazný pokles počtu malígnych lézií v porovnaní s kontrolnou skupinou. Zaujímavosťou v tejto skupine zostáva vysoké percentuálne zastúpenie inak zriedkavých sarkómov. Vysoká dávka fluvastatínu pravdepodobne pôsobí preventívne na karcinómy, nie však na malignity vznikajúce z mezenchýmových buniek. Histopatologická analýza mamárnych nádorov nepreukázala posun v pomere slabo diferencovaných a dobre diferencovaných nádorov po aplikácii fluvastatínu. Histopatologickú klasifikáciu

Zviera (číslo)	Typ nádoru	Grading	Poznámka
KONTROLA - 29 lézií u 14 nádorových zvierat			
2	K	LG	
4	K	LG	
4	K	HG	S,M,A
4	K-P	LG	
4	K	LG	
5	K-KO	HG	S,M,A,N
5	P-K	LG	
5	K-P	LG	
6	K	LG	
6	K	HG	S,M,A
7	K-KO	HG	M,A,N
7	K-P	LG	
8	K-P	LG	
8	K	LG	
9	P-K	LG	
9	P-K	LG	
11	P-K	LG	
12	P-K	LG	
13	K	HG	S,M,A
13	IDP		
14	K	LG	
15	K	HG	S,M,A
15	K-P-KO	HG	M,A,N (Obr. 1)
16	K-P-KO	HG	S,M,A,N (Obr. 2)
16	K-P	LG	
18	K-P-KO	HG	S,M,A,N
18	P-K	LG	
18	P-K	LG	
18	K-P	HG	S,M,A
FLUVA 20 - 28 lézií u 10 nádorových zvierat			
21	K-P	LG	
21	P-K	LG	
22	K-P	LG	
25	K-P	LG	
25	K	HG	S,M,A
25	K	LG	
25	K-KO	HG	S,M,A,N
25	K	LG	
25	K-P-KO	HG	S,M,A,N (Obr. 3)
25	P-K	HG	S,M,A
25	P-K	LG	
25	K-P	LG	
25	P	HG	S,M,A
25	P	LG	
27	P-K	LG	
27	P-K	HG	S,M,A
28	K	HG	S,M,A
29	P-K	HG	S,M,A
29	P-K	LG	
29	P-K	LG	
33	K-P	LG	
36	K	HG	S,M,A
39	P	HG	S,M,A
39	P	LG	
39	K-P	HG	S,M,A
39	K-P	HG	S,M,A
39	K-P-KO	HG	S,M,A,N
40	P	LG	
FLUVA 200 - 8 lézií u 7 nádorových zvierat			
42	K-KO	HG	S,M,A,N
44	SA	HG	N (Obr. 4)
44	K-P	LG	
45	SA	HG	MFH
51	SA	HG	
54	K	LG	
58	K-P	LG	
59	K	LG	

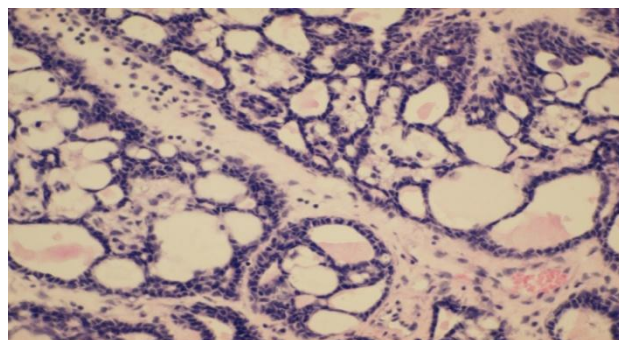
Tabuľka 1. Histopatologická klasifikácia a grading mamárnych nádorov:
 Invazívny karcinóm (K – kribiformný, P – papilárny, KO – komedózný)
 IDP – intraduktálna proliferácia
 MFH – malígny fibrózny histiocytóm
 S – solidizácia, M – mitotický index, A – bunková atypia, N – nekróza.



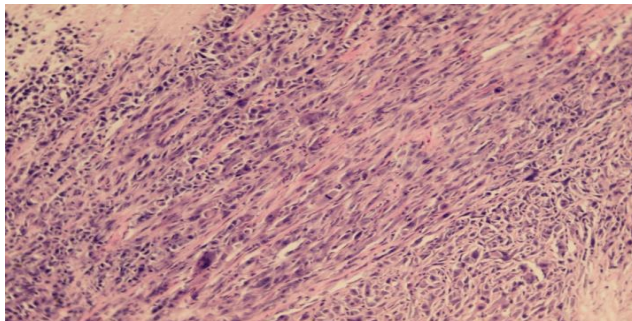
Obr. 1 Kribiformný karcinóm s vysokým stupňom malignity a s infiltráciou priečne pruhovalého svalu (farbenie H&E, zväčšenie 400x).



Obr. 2 Karcinóm s vysokým stupňom malignity. Naznačená solidizácia a prítomná centrálna nekróza (farbenie H&E, zväčšenie 100x).



Obr. 3 Kribiformný karcinóm s nízkym stupňom malignity. Prítomná tvorba kribiformných formácií a chýbanie solidizácie Bunky vykazujú nízky stupeň atypie a sú bez zreteľnej mitotickej aktivity (H&E, zväčšenie 400x).



Obr. 4 Sarkóm s vysokým stupňom malignity. Prevažujúca vretenobunková populácia so zreteľnou mitotickou aktivitou a s nekrotickými okrskami - v ľavom hornom a pravom dolnom rohu (H&E, zväčšenie 200x).

a grading všetkých mamárnych nádorov popisuje tabuľka 1. Reprezentatívne charakteristiky vybraných mamárnych lézií predstavujú obrázky 1 - 4. Farmakum bolo u zvierat dobre tolerované. Počas pitvy neboli pozorované žiadne makroskopické zmeny na vybraných orgánoch zvierat.

Diskusia a záver

Experimentálne štúdie poukazujú na to, že statíny by mohli byť potencionálne efektívne v liečbe melanómu, leukémie, rakoviny mozgu či hepatocelulárnych nádorov [7]. Výsledky našich štúdií naznačujú silnejší účinok lipofilných statínov (atorvastatín, simvastatín, fluvastatín) v porovnaní s hydrofilným rosuvastatínom v nami zvolenom experimentálnom modeli rakoviny prsníka [8]. Sú však potrebné ďalšie klinické a predklinické štúdie, ktoré stanovia presnú úlohu statínov v procese karcinogenézy, ich dávkovanie a výber vhodných pacientov. V našich predchádzajúcich štúdiách s lipofilnými statínmi nádory v neliečených skupinách vykazovali vyšší bunkový pleiomorfizmus a nižší stupeň diferenciácie. Na strane druhej, nádory v efektívne liečených skupinách ukazovali slabšiu bunkovú atypiu a vyšší stupeň diferenciácie. Výsledky histopatologickej analýzy nádorov preukázali posun v pomere slabo diferencovaných (HG) a dobre diferencovaných (LG) nádorov. V prípade experimentu s atorvastatínom, rosuvastatínom aj simvastatínom bol vplyvom liečby pozorovaný posun v pomere HG/LG invazívnych karcinómov k vyššiemu zastúpeniu LG tumorov v porovnaní s kontrolnou skupinou [5, 8, 9]. Histologická analýza nádorov umožňuje zhodnotiť riziká dlhodobej aplikácie nových chemopreventívnych látok u žien. Poskytuje tiež informáciu o stupni diferenciácie, prognóze mamárneho nádoru a účinnosti liečby. Z tohto pohľadu sa nám na základe našich výsledkov statíny javia ako perspektívne farmaká pre využitie v klinickej praxi.

PodĎakovanie

Práca bola finančne podporovaná z Grantu VEGA (č.1/0029/08.) Povolenie k experimentu bolo udelené ŠVPS (č.RO-2061/08-221) a Etickou komisiou JLF UK (č. 320/2007).

Literatúra

- [1] Vrečer M., Turk S. et al. Use of statins in primary and secondary prevention of coronary heart disease and ischemic stroke. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2003**, 41(12), 567-577.
- [2] Cauley J.A., Simon J.A. et al. Effect of estrogen plus progestin on risk for biliary tract surgery in postmenopausal women with coronary artery disease. *Ann. Intern. Med.* **2001**, 135(7), 493-501.
- [3] Chan, Kelvin K.W. et al. The statins as anticancer agents. *Clinical Cancer Res.* **2003**, 9, 10-19.
- [4] Kubatka P., Kajo K. et al. Antitumor effects of atorvastatin in the chemoprevention of rat mammary carcinogenesis. *Biológia* **2011**, 66(4), 727-734.
- [5] Kubatka P., Kajo K. et al. Antineoplastic effects of simvastatin in experimental breast cancer. *Klinická onkologie* **2011**, 24(1), 41-45.
- [6] Russo J., Russo I.H. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2000**, 5.
- [7] Hindler K. et al. The role of statins in cancer therapy. *Oncologist* **2006**, 11(3), 306-15.
- [8] Kubatka P., Kajo K. et al. Rosuvastatin in the chemoprevention of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in female rats. *Acta Veterinaria (Beograd)* **2011**, 61(5-6), 445-460.
- [9] Kubatka P., Kajo K. et al. Immunohistochemical and histomorphological analysis of rat mammary tumors after simvastatin treatment. *Neoplasma* **2012** (in press), 59, 516-523.

Indukovaná hyperhomocysteinémia a riziko vzniku infarktu myokardu

Kovalská, M.¹, Kovalská, L.², Pavlíková, M.³, Tatarková, Z.³, Furjelová, M.³,
Mešťanová, V.³, Jurková, K.³, Adamkov, M.¹, Lehotský, J.³

¹ Ústav histológie a embryológie, UK, JLF, Martin ² Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, UNM Martin ³ Ústav lekárskej biochémie, UK, JLF, Martin,
kovalskaM@post.sk

Abstract

Numerous clinical and experimental study have notice correlation between the occurrence of clinical effects on vascular genesis and plasma level of homocysteine (Hcy; vein thrombosis and embolic manifestations of arteriosclerosis). The process of cell death depends on the severity of cell insult. On the other hand, hyperhomocysteinemia (hHcy) is one of the risk factors that may adversely affect the conduct of the injury. In general we can say that the elevation of circulating plasma homocysteine is considered an independent risk factor of vascular pathology. Risk-free value of homocysteine was set at less than 10 -12 μmol in one liter of blood. The excess of this value has dangerous consequences, because an increased risk of myocardial infarction up to three times. In this work we devote changes in MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) pathways and their associated enzymes in homogenates as well as the histological preparations of rat heart. We investigated the effect of hHcy on associated changes in MAPK protein / ERK (extracellular signal-regulated kinases) pathways in cardiomyocytes.

Key words: hyperhomocysteinemia, heart stroke, MAPK

Úvod

Homocysteín zohráva dôležitú úlohu v patogenéze mnohých civilizačných chorôb ako sú nádorové ochorenia, predčasné starnutie, zápalové reumatické ochorenie kĺbov, predčasné pôrody a potraty, niektoré vrodené vývinové poruchy nervového systému, depresie, demencie vrátane Alzheimerovej choroby atď. [1, 2]. V ostatných rokoch je Hcy intenzívne študovaným rizikovým faktorom kardiovaskulárnych chorôb. Početné štúdie dokázali vzťah medzi miernou hyperhomocysteinémiou (hHcy), dysfunkciou endotelu a vzniku predčasnej aterosklerózy. Hlavnou príčinou vzniku hHcy je deficit kyseliny listovej, vitamínu B12 a B6, homozygotná forma mutácie metyltetrahydrofolát reduktázy (MTHFR) a porucha renálnych funkcií [1-5]. Toxický účinok homocysteínu sa vysvetľuje jeho priamym a/alebo nepriamym vplyvom na cievnu stenu, oxidačným stresom a poruchou koagulačnej rovnováhy [5]. Práce z posledných 10-tich rokov poukázali na skutočnosť, že aj mierne zvýšená hladina Hcy (15-30 $\mu\text{mol/l}$) zvyšuje riziko vzniku aterosklerózy [2-3]. Podľa najnovších údajov je bezriziková hodnota Hcy do 10 $\mu\text{mol/l}$. Výsledky prospektívnych štúdií pre rekurentné kardiovaskulárne príhody zaznamenali významné zvýšenie sérovej koncentrácie Hcy o 5 $\mu\text{mol/l}$, ktorý následne viedol k nárastu rizika rekurencii kardiovaskulárnej príhody o 16% [3]. Výrazné poškodenie endotelových buniek sa doteraz dokázalo na mozgových, periférnych, srdcových a placentárnych cievach [1, 6-7] ako aj na samotnom neuronálnom tkanive [8]. Dokáže však indukovaná hHcy ovplyvniť aj cardiomyocyty u laboratórnych zvierat? Doteraz nie je presne známe ako signálna transdukčná MAPK/ERK (mitogénom aktivované

proteínkinázy/extracelulárnym signálom regulovaná kináza) dráha a pERK proteíny, ako súčasť tejto signalizačnej kaskády, môže viesť k prežívaniu buniek po inzulte. Štúdie potvrdili, že aktivovaná ERK zohráva dôležitú protektívnu úlohu pri poškodení kardiomyocytov [9].

Materiál a metódy

Pre naše experimenty sme použili dospelé laboratórne potkany (samce) kmeňa Wistar vo veku 6-8 mesiacov s hmotnosťou 300-400g v celkovom počte 16. Experimentálne zvieratá boli rozdelené do dvoch skupín po 8 kusov. Prvá skupina zvierat bola anestetizovaná, následne boli zvieratá usmrtené dekapitáciou. V sterilných podmienkach im bolo vyoperované srdce. Tkanivo bolo použité na prípravu homogenátov pre izoláciu bielkovín na Western blot analýzu alebo imunohistologickú analýzu. Druhej skupine zvierat bol počas 14-tich dní pred experimentom subkutánne podávaný Hcy v množstve 0,45 μ mol/g zvieratá dva-krát denne podľa Mattého a kol., [10]. Po 14-tich dňoch boli zvieratá anestetizované, pričom celý postup, všetky podmienky pokusu ako aj podmienky odobratia tkanív boli totožné s predchádzajúcou skupinou zvierat.

Výsledky a diskusia

U pacientov s hHcy, ktorí prekonali infarkt myokardu [1] je zvýšená výskyt rekurencie kardiovaskulárnych ochorení. V súčasnosti mechanizmus poškodenia srdcového svalu pri hHcy nie je dostatočne objasnený [4]. V našej práci sme študovali jednu z MAPK dráh v srdcovom svale potkanov, u ktorých bola umelo vyvolaná hHcy, kde plazmatická hladina Hcy zodpovedala hladine, ktorá bola nameraná pacientom s hyperhomocysteinúriou [2-3]. V našich experimentoch sme zaznamenali významné zmeny medzi kontrolou a Hcy skupinou a to nárast hladiny pERK proteínu o 143 % ($p < 0.05$) v Hcy skupine. Rovnako sme sledovali štatisticky významný nárast tak v cytoplazmatickej ako aj v jadrovej lokalizácii pERK proteínu v srdcových bunkách Hcy skupiny v porovnaní s kontrolou. Zistili sme nárast počtu pERK+ buniek s cytoplazmatickou lokalizáciou o 266 % ($p < 0.001$) a s jadrovou lokalizáciou o 600% ($p < 0.001$) v Hcy skupine v porovnaní s kontrolou. Naše výsledky naznačujú protektívny efekt aktivácie MAPK/ERK dráhy v kardiomyocytoch, kedy zohráva dôležitú úlohu sila a dĺžka inzultu, čo je v zhode s literárnymi údajmi [9]. Zistili sme, že došlo k aktivácii MAPK/ERK dráhy a z imunohistochemickej analýzy tkaniva rovnako vyplýva, že sa aktivovaný proteín translokuje do jadra, kde aktivuje transkripčné faktory, ktoré zabránia nástupu bunkovej smrti [9]. Získané výsledky naznačujú, že umelo indukovaná hHcy aktivuje adaptačný mechanizmus kardiomyocytov, kedy paradoxne dochádza k prežívaniu buniek. Naše zistenia nezodpovedali výsledkom niektorých experimentálnych štúdií. Vizzardi a kol., [2] vo svojej práci uvádzajú, že pri hHcy potkanov zaznamenali zvýšenú srdcovú fibrózu a aktivitu matrixových metaloproteináz, ktoré v zápätí podporovali remodeláciu svaloviny ľavej komory. Na druhej strane, štúdia Balakumara a kol., [11], v ktorej sledovali vplyv ischemickej prekondície na umelo indukovanú hHcy potkanov, dospeli k podobným výsledkom ako sme opísali my. Po indukovaní hHcy u potkanov a následnou prekondíciou zaznamenali paradoxne horšie výsledky, ako po samotnom ischemickom inzulte. V neposlednom rade musíme uvažovať aj o možnom protektívnom vplyve kyseliny listovej, ktorá je zložkou potravy laboratórnych zvierat, aj keď sa zatiaľ nepodarilo dokázať pozitívnu koreláciu hHcy a dlhodobého užívania kyseliny listovej ako prevencie vzniku, či rekurencie napr.: žilovej trombózy, embolických prejavov arteriosklerózy, a pod. [2-3, 5]. Z pohľadu

patogenézy je nutné v budúcnosti detailne objasniť úlohu hHcy pri kardiovaskulárnych ochoreniach, možné terapeutické využitie a tiež vplyv znižovania hladiny Hcy pri pacientoch s vaskulárnym ochorením. U pacientov, ktorí prekonal kardiovaskulárne ochorenia by sa mala stať detekcia plazmatickej hladiny Hcy rutinným vyšetrením.

Záver

Naše výsledky rozširujú poznatky o mechanizmoch regulácie post-translačných zmien v intracelulárnych dráhach MAPK/ERK v odpovedi na hHcy. Týmto môžu mať experimentálne štúdie na potkanoch veľký význam a prínos aj pre humánnu medicínu. Uvedené výsledky v konečnom dôsledku môžu ovplyvniť terapeutický prístup k pacientom s kardiovaskulárnymi ochoreniami. Detailné objasnenie patogenézy poškodenia týchto buniek by mohlo v budúcnosti prispieť k zefektívneniu vhodnej terapie pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0050/11 a 213/2012 a "Vytvorenie nového diagnostického algoritmu pri vybraných nádorových ochoreniach" spolufinancovaným zo zdrojov ES a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Humphrey, Mayo Clin Proc., **2008**, 83, 1203-12.
- [2] Vizzardi, Recent Pat Cardiovasc Drug Discov., **2009**, 4, 15-21.
- [3] Čaprda, Interná medicína, **2006**, 6, 344-347.
- [4] Kolling, Cardiovasc Toxicol., **2011**; 11, 67-73.
- [5] Šamudovská, Interná med., **2009**, 9, 522-526.
- [6] Kénina, Neurologijos seminarai., **2009**, 13, 139–142.
- [7] Žák, Atherosklerosa, **2001**, H1-H8.
- [8] Pavlíková, Gen Physiol Biophys., **2011**, 30, S61-9.
- [9] Zhang, Mol Med., **2010**, 16, 307-315.
- [10] Matté, Int J Dev Neurosci., **2010**, 28, 183-7.
- [11] Balakumar, Pharmacological Research, **2009**, 60, 18-23.

Regulácia nukleárneho transportu transkripčného faktora BR-C Z1 cytoskeletálnymi proteínmi v čase histolýzy slinných žliaz u *Drosophila melanogaster*

Silvia Mahmoodová¹ a Róbert Farkaš²

¹Ústav Lekárskej Biochémie, UK Bratislava, Jesseniova lekárska fakulta, Martin, ²Ústav Experimentálnej Endokrinológie, SAV Bratislava
mahmood@jfmed.uniba.sk

Abstract

Cell death in *Drosophila* is a wide spread phenomenon which occurs in developing embryonic nervous system, retina, and during of metamorphosis when the larval tissues like salivary glands and midgut are programmed for cell death ending in tissue histolysis. The *Broad-Complex* locus (*BR-C*) encodes a family of ecdysone-regulated transcription factors sharing a common N terminal core region that contains the evolutionarily conserved BTB/POZ domain and different C terminal domains characterised by the presence of zinc finger DNA-binding motifs (designated Z1, Z2, Z3 and Z4). *BR-C* function is required for the induction of intermolt, early and late puffs as well as for the development of imaginal organs and programmed cell death (PCD) of obsolete larval tissues. Salivary gland histolysis is a portion of a complex ecdysone response requiring the presence of the *BR-C* and cytoskeletal associated tumour suppressor protein p127 encoded by *l(2)gl* gene. To unravel the mechanism of regulation of individual *BR-C* isoforms in PCD of salivary glands during metamorphosis we utilised *l(2)gl* mutant alleles. Here we have showed that p127 regulate the subcellular localization of *BR-C* Z1. In wild type larvae this transcription factor is present in the nucleus of salivary glands but it is localized to the cytoplasm and nuclear periphery in *l(2)gl* larvae. Thus, p127 acts in a common process that controls the nuclear uptake and chromatin accessibility of *BR-C* Z1 identified and its involvement in the subsequent transcriptional cascade that leads to cell death execution.

Key words: Broad-Complex, p127, *Drosophila melanogaster*, salivary glands, PCD

Úvod

Programovaná bunková smrť (PCD) predstavuje podstatný a všeobecný fenomén, ktorým sa bunka zbavuje prebytočných či nechcených buniek v rôznych štádiách vývoja. U *Drosophila* k nej dochádza vo vyvíjajúcom sa nervovom systéme, retine a počas metamorfózy, kedy larválne tkanivá ako sú slinné žľazy a črevo histolyzujú procesom PCD. Lokus *BR-C* kóduje rodinu ekdyzónom regulovaných transkripčných faktorov so spoločnou N terminálnou jadrovou doménou obsahujúcou evolučne konzervovanú BTB/POZ doménu a rozdielnymi C terminálnymi doménami charakteristickými prítomnosťou Zn prstových DNA väzbových motívov (označovaných Z1, Z2, Z3 a Z4). Funkcia *BR-C* je nepostrádateľná pre indukciu interekdyziálnych, skorých a neskorých pufov, pre vývoj imaginálnych orgánov a konečne pre PCD zastaralých larválnych tkanív. Histolýza slinných žliaz je súčasťou komplexnej ekdyzónovej odozvy zahrňujúcej prítomnosť *BR-C* a cytoskeletálneho tumor supresorového proteínu p127, kódovaného génom *l(2)gl*.

Cieľom našej práce bolo objasniť mechanizmus regulácie izoformy Z1 proteínu *BR-C* v procese PCD slinných žliaz v čase metamorfózy. Analyzovali sme expresiu *BR-C* Z1 izoformy u *l(2)gl* alely a sledovali sme subcelulárnu lokalizáciu *BR-C* proteínu.

Materiál a metodika

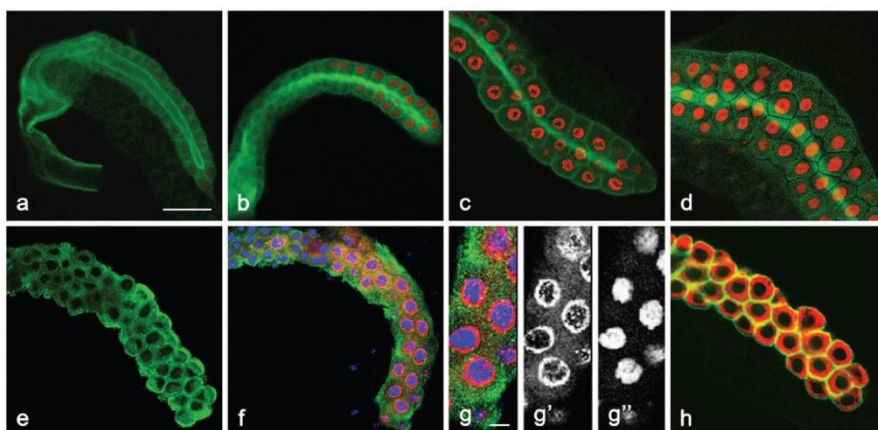
Experimenty sme uskutočnili na ovocnej muške *Drosophila melanogaster*. Okrem divého typu *Oregon R* so štandardným fenotypom sme pracovali s mutantnými líniami *lethal(2)giant larvae* [*l(2)gl^{U334}*, *l(2)gl¹*, *l(2)gl⁴*, *l(2)gl¹²⁴*, *P-4x[l(2)gl^{ps}]*] / SM1 alebo SM5 od B.M. Mechlera (DKFZ – Heidelberg) (SM1 a SM5 sú balancery s markerovými mutáciami) [4].

Imunocytochémia

Pre detekciu BR-C Z1 proteínu sme využili modifikovaný protokol podľa Boyda a kol. [1]. Izolované slinné žľazy boli fixované v 4% paraformaldehyde v Pipes pufri pH 7.2 a premyté v TN3 pufri [50 mM Tris-HCl (pH 7), 0,15 M NaCl, 0,5% Triton X-100, 2% normálne kozie sérum (Sigma)]. Primárna myšacia monoklonálne protilátky anti BRcore alebo anti Z1 (riedenie 1:20) [2] [3] od G. Guilda, príp. špecifické králičie polyklonálne anti BR-C protilátky od J.A. Lepesanta sa bez predchádzajúceho blokovania inkubovali so slinnými žľazami 3 hodiny pri izbovej teplote a po trojnásobnom premytí sa slinné žľazy ďalšie 2 hodiny inkubovali s Cy3-, Cy5-, FITC- alebo TRITC-konjugovanými kozími protimýšacimi, resp. protikráličími sekundárnymi protilátkami (Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove, PA, USA, riedenie 1:500) a fluoresceinom konjugovaným falloidínom (Sigma, St Louis, MO, USA, riedenie 1:200). Po trojnásobnom premytí v TN3 pufri a PBS (phosphate-buffered saline) sa zafarbené tkanivá uzavreli do elvanolu z Mowiolu (Calbiochem, LaJolla, CA, USA) a pozorovali pod Zeiss konfokálnym laserovým mikroskopom LSM-410.

Výsledky a Diskusia

Farbenie žliaz protilátkou proti BR-C Z1 ukázalo, že u veľmi mladých (2 až 12 dní starých) mutantných *l(2)gl* lariev sa BR-C Z1 neexprimoval (obr. 1e), ale jeho expresia bola indukovaná po kultivácii izolovaných slinných žliaz v médiu s obsahom 10^{-6} M ekdyzónu (obr. 1f-g). Pokým u mladých *l(2)gl* lariev bol BR-C Z1 akumulovaný do oblasti nukleárnej laminy, u starších (12 a viac dní staré) bol zadržiavaný v cytoplazme (obr. 1h). Signál BR-C pochádzajúci z oblasti nukleárnej lamíny vekovo najmladších až stredne starých *l(2)gl* slinných žliaz po expozícii ekdyzónu naznačil, že BR-C by mohlo kolokalizovať s nukleárnou lamínou. Lamín by sa tak mohol podieľať na zamedzení vstupu BR-C do jadra a k chromatinu u *l(2)gl* mutantov. Mutanti *l(2)gl* neexprimujúci žiaden BR-C nemali zmenenú lokalizáciu lamínu do nukleárnej periférie, hoci jemne zvýšený laminárny signál bol opakovane pozorovaný v cytoplazme. Opätovným pôsobením ekdyzónu na stredne staré *l(2)gl* slinné žľazy, sa zvýšila expresia BR-C ako aj cytoplazmatická akumulácia lamínu, ale intenzita subcelulárnych signálov BR-C a lamínu sa neprekrývala. Charakter expresie BR-C Z1 sme sledovali aj Western blotom u *l(2)gl* deficientných lariev (výsledky neukázané). Analýza na proteínovej úrovni potvrdila úbytok BR-C proteínu z jadra u *l(2)gl* lariev, čo zrejme súvisí s ich vekom, ako to ukázalo i farbenie. Načasovanie histolýzy slinných žliaz je podstatne záväzné na miere expresie p127, ktorý fyzicky interaguje s ťažkým reťazcom nesvalového myozínu II [4] [5]. Nedostatočne exprimovaný proteín p127 spôsobil oneskorenie dezintegrácie slinných žliaz, ale pri jeho nadexpresii bol tento proces akcelerovalý bez akéhokoľvek zásahu do dĺžky trvania larválneho a kuklového vývoja.



Obr.1 Asociácia BR-C Z1 (červená) s chromatínom v slinných žľazách zvierat divého typu (a) ranné larválne štádium (88 hodín od nakladenia vajíčok), (b) stredné (96 hodín), (c) neskoré (110 hodín), (d) prepupálne štádium (116 hodín). Zelená – intracelulárna distribúcia F-aktínu.

Slinné žľazy mutantných *l(2)gl*-lariev (e) bez kultivácie s ekdyzónom, (f) s ekdyzónom (7dní staré), BR-C Z1 (červená) (g') je akumulovaný do oblasti nukleárnej laminy zväčšených slinných žliaz (g'') DNA (modrá). (h) slinné žľazy 12 dní starých *l(2)gl* lariev, endogénna produkcia ekdyzónu indukuje dostatočne syntézu BR-C Z1 (červená), ktorý sa akumuluje v cytoplazme a nukleárnej lamíne.

Imunocytochemickým farbením sme zistili, že subcelulárna lokalizácia BR-C Z1 je regulovaná cytoskeletálnym proteínom p127. Larvy divého typu majú tento transkripčný faktor prítomný výlučne v jadrách slinných žliaz (obr.1b-d), no u *l(2)gl* lariev je lokalizovaný do cytoplazmy a nukleárnej periférie. Vzájomným pôsobením cytoskeletálnych proteínov p127 ako i myozínu II [5] dochádza zrejme ku kontrole jadrového obsahu a chromatinovej dostupnosti identifikovaného BR-C Z1, zúčastňujúceho sa v následnej transkripčnej kaskáde, ktorá vrcholí bunkovou smrťou.

Záver

Predkladaná práca ilustruje význam genetiky u *Drosophila* v pochopení mechanizmov a v identifikácii génov, ktoré následne modifikujú funkciu génov v príslušných chorobách. Niet pochyb, že i v najbližšej budúcnosti nám *Drosophila* prinesie ďalšie fundamentálne informácie o komplexných biologických dráhach, akou je napríklad spomínaná bunková smrť.

Literatúra

- [1] Boyd, L., O'Toole, E. and Thummel, C.S. (1991): Patterns of E74A and protein expression at the onset of metamorphosis in *Drosophila*. *Development* 112: 981-995.
- [2] Emery, I.F., Bedian, V., Guild, G.M. (1994): Differential expression of Broad-Complex transcription factors may forecast tissue - specific developmental fates during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 120: 3275-3287.
- [3] Mugat, B., Brodu, V., Lepesant, J.-K., Antoniewski, CH., Bayer, C.A., Fristrom, J.W., Lepesant, J.-A. (2000): Dynamic expression of Broad-Complex isoforms mediates temporal control of an ecdysteroid target gene at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.* 226, 1-14.
- [4] Kuchárová-Mahmood, S: Gény zahrnuté v hormonálne regulovanej PCD u *Drosophila melanogaster*. (2005) Dizertačná práca.
- [5] Farkaš, R., Kuchárová-Mahmood, S., Mentelová, L., Juda, P., Raška, I., Mechler, B.M. (2011). Cytoskeletal proteins regulate chromatin access of BR-C transcription factor and Rpd3-Sin3A histone deacetylase complex in *Drosophila* salivary glands. *Nucleus* 2(5): 489-499.

Intersticiálne, Cajalovým bunkám podobné bunky vo vajíčkovode

Miko, M., Varga, I., Polák, Š.

Ústav histológie a embryológie, Lekárska Fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave
michal.miko@fmed.uniba.sk

Abstract

We want to take a closer look onto a remarkable, few years old, discovery of interstitial Cajal-like cells (ICLC) in the wall of Fallopian tube. ICLC are unique cells, which during an ectopic pregnancy can differentiate into decidual cells. The origin of these cells is still not completely known, but they have ultrastructure features of myofibroblasts and express α -SMA (alfa-smooth-muscle actin), used as a marker to identify myofibroblasts. This, in addition to other specific epitopes of these cells would help us with immunohistochemical labeling of these cells. ICLC should serve as a sensor of hormone's blood levels, which, by their intercellular connections, or paracrine, controls the contraction of smooth muscle and oviduct cilia movement. It is important to emphasize that, as in the digestive tract (where the real cell of Cajal are responsible for this action), so in the muscle of the oviduct has been slow waves of electrical activity (depolarization), promoter of these waves are probably ICLC. ICLC may therefore act as sensors of hormone levels, controlling peristalsis of the oviduct, integrating its two main features - the pacemaker function with the signaling mechanisms.

Úvod

Prvý opis vajíčkovodu pochádza od Talianskeho anatóma Gabriela Fallopiu z roku 1561. Pomenoval ho ako "tuba uteri", nakoľko mu pripomínal tubu, hudobný nástroj zhotovený z mosadzného plechu. Podľa neho sa aj v súčasnosti v anglosaskej literatúre označuje vajíčkovod ako "Fallopian tube". Pôvodne sa predpokladalo, že vajíčkovod je len pasívnou trubicou slúžiacou na transport pohlavných buniek. Vajíčkovod (tuba uterina) ako súčasť ženského pohlavného systému je často objektom záujmu ako teoretických tak i klinických výskumníkov pre jej dôležitú úlohu v procesoch reprodukcie. Vajíčkovod je špecializovaný orgán slúžiaci na zachytenie sekundárneho oocyту, transport mužských i ženských gamét, zabezpečuje prostredie pre proces fertilizácie a obdobie raného vývinu embrya a jeho transport do maternice [1]. Transport smerom k vaječníkom aj smerom k maternici fungujúci vo vajíčkovode bol potvrdený viacerými štúdiami [2]. Vajíčkovod, resp. jeho sliznica hrá takisto dôležitú úlohu pri kapacitácii spermií [3]. My sme sa zamerali na hlavné funkčné črty tohto orgánu z histologického pohľadu a z teleologického a systematického dôvodu nám vyvstala potreba bližšie sa zaoberať objavom nedávno popísanej tajuplnej bunky – intersticiálnej, Cajalovej bunke podobnej bunke (ICLC – interstitial Cajal-like cells). Následným koncíznym, a profundným štúdiom odbornej literatúry v dostupných on-line databázach sme boli schopní vytvoriť a ponúknuť predkladaný kompaktný a didakticky zameraný text.

Metodika

Pracovali sme s on-line dostupnými odbornými databázami PubMed a SCOPUS. Po analýze problematiky sme vybrali niekoľko kľúčových slov (medzi inými Fallopian tube, Cajal cells, function of oviduct, depolarization of oviduct), so stoviek výsledkov

rešerše sme exkludovali neaktuálne a neakurátne texty, z ostatných sme vytvorili gro tejto krátkej prehľadovej práce.

Výsledky

Štruktúra vajíčovodu je naoko jednoduchá. Je to dutý, trubicový orgán, ktorého sliznica je zložená do rias, nazývaných aj rugae alebo plicae [4]. Sliznica je vystlaná jednovrstvovým cylindrickým epitelom zloženým z dvoch typov buniek: z buniek s pohyblivými riasinkami a zo sekrčných buniek (peg-cells). Pod epitelom sa nachádza väzivová lamina propria, nasleduje vrstva hladkej svaloviny a seróza [5]. Aj keď sa javí, že funkcia vajíčovodu je dokonale preskúmaná, opak je pravdou. Recentné štúdie opisujú, že transport gamét a embrya vajíčovodom je omnoho komplikovanejší proces ako sme si doposiaľ mysleli. Dochádza ku komplexnej súhre a komplikovanej regulácii troch dejov – sťahov hladkej svaloviny, pohybu riasiniek a toku tekutého produktu sekrčných buniek [6]. Tieto deje sú kontrolované meniacimi sa hladinami ovariálnych steroidných hormónov v krvi, pričom sa výrazne mení aj morfológia a aktivita buniek epitelu. Štruktúra epitelu je modifikovaná nie len počas fyziologického ovariálneho cyklu, ale i počas puerperia [7]. Vzhľadom na hladinu progesterónu a estrogénu sa mení frekvencia kmitov riasiniek (ciliárna aktivita), pri vysokých hladinách progesterónu môže dochádzať k dysfunkcii riasiniek, až k ich reverzibilnej paralýze [8, 9]. Zároveň treba spomenúť, že zmeny epitelu vajíčovodov nesúvisia len s ovariálnym cyklom, ale aj so starnutím. V postmenopauzálnom období života vznikajú špecifické morfológické zmeny, ktoré zahŕňajú postupné skracovanie mikrokľkov, stratu riasiniek a formáciu štruktúr pripomínajúcich drobné riasy [10]. Všetky vyššie spomínané deje majú spoločného jedného menovateľa – reguláciu pomocou hormónov, medzi najdôležitejšími sú estrogén, progesterón, prostaglandíny, oxytocín [11]. Vo svetle tejto informácie je pozoruhodný niekoľko rokov starý objav intersticiálnych, Cajalových buniek podobných buniek (ICLC: interstitial Cajal-like cells) v stene vajíčovodu [12]. Konkrétne sa tieto bunky našli v lamina propria sliznice aj v tunica muscularis vajíčovodov. Tuba uterina nie je jediný orgán, kde sa tento typ buniek nachádza; Cajalove bunky boli dokázané v stene močového mechúra [13], v myokarde [14], v prsnej žľaze [15], v pankrease [16]. Je však otázne, nakoľko sa v jednotlivých orgánoch jedná o identické bunky. ICLC sú jedinečné bunky, ktoré sa počas ektoptickej tehotnosti môžu diferencovať na deciduálne bunky. Pôvod týchto buniek je neznámy, majú ultraštruktúrne rysy myofibroblastov a exprimujú alfa-SMA (alfa-smooth-muscle actin), ktorý sa používa ako marker k identifikácii myofibroblastov [17]. Čo ale majú tieto bunky spoločné s homonálnou reguláciou a prečo sú také pozoruhodné? Tieto bunky exprimujú na svojom povrchu estrogénové a progesterónové receptory (dokázané ER –alfa a PR-A) [18]. Okrem toho, že exprimujú receptory pre steroidné hormóny, sú typické svojimi dlhými výbežkami cytoplazmy, ktoré sú po axónoch neurónov najdlhšími cytoplazmatickými výbežkami v ľudskom tele [19]. A konečne, ICLC sú v tesnom kontakte (pomocou gap junctions) nie len jedna s druhou, ale aj s bunkami hladkej svaloviny, nervovými vláknami a kapilármi [19]. Funkcie gap junctions sú v prevažnej miere regulované pohlavnými hormónmi [20].

Diskusia a záver

Všetky dosiaľ ponúknuté zistenia nám našepkávajú, že ICLC by mohli slúžiť ako senzor hladín hormónov, ktorý pomocou svojich medzibunkových spojov, prípadne parakrinne, kontroluje sťahy hladkej svaloviny vajíčovodu a pohyb riasiniek [18].

Zároveň je dôležité zdôrazniť, že tak ako v tráviacom trakte (kde sú za to zodpovedné pravé Cajalove bunky), aj vo svalovine vajíčovodu prebiehajú pomalé vlny elektrickej aktivity (depolarizácie) [21, 22], promótorom týchto vln sú zrejme ICLC. ICLC teda pravdepodobne fungujú ako senzory hladín hormónov, kontrolujúce peristaltiku vajíčovodu, integrujúc dve svoje hlavné vlastnosti – funkciu pacemakera so signálnymi mechanizmami [18]. Táto zaujímavá téma by mala byť predmetom ďalšieho, oveľa hlbšieho skúmania a výskumu. Aj z tohto článku vyvstávajú nové, dosiaľ nezodpovedané otázky: Sú vlastnosti a počet ICLC v anatomickom priebehu vajíčovodu konštantné? Spôsobujú starnutie (postmenopauza), zrasty, ligácie, hormonálne disbalancie (fyziologické, patologické) zmeny vo vlastnostiach, morfológii a počte ICLC?

Literatúra

- [1] TALBOT, *Reprod Biol Endocrinol*, **2005**, 3, 52.
- [2] ZERVOMANOLAKIS, *Ann NY Acad Sci*, **2007**, 1101, 1-20.
- [3] RODRIGUEZ-MARTINEZ, *Theriogenology*, **2007**, 68 Suppl 1, 138-46.
- [4] LEESE, *J Reprod Fert*, **1988**, 82, 843-56.
- [5] ADAMKOV, *Functional Histology*, **2011**, 343.
- [6] LYONS, *Hum Reprod Update*, **2006**, 12, 363-72.
- [7] CIGÁNKOVÁ, *Vet Med*, **1996**, 41, 339-46.
- [8] PALTIELI, *J Assist Reprod Genet*, **2000**, 17, 103-6.
- [9] MAHMOOD, *Hum Reprod*, **1998**, 13, 2991-4.
- [10] CORRER, *Histol Histopathol*, **2006**, 21, 219-26.
- [11] WÄNGGREN, *Hum Reprod*, **2008**, 23, 2359-68.
- [12] SHAFIK, *Mol Hum Reprod*, **2005**, 11, 503-5.
- [13] HINESCU, *J Mol Histol*, **2007**, 38, 275-84.
- [14] HINESCU, *J Cell Mol Med*, **2006**, 10, 243-57.
- [15] GHERGHICEANU, *J Cell Mol Med*, **2005**, 9, 893-910.
- [16] POPESCU, *J Cell Mol Med*, **2005**, 9, 169-90.
- [17] HAGIWARA, *Med Mol Morphol*, **2008**, 41, 221-6.
- [18] CRETOIU, *J Mol Hist*, **2009**, 40, 387-94.
- [19] POPESCU, *Ann NY Acad Sci*, **2007**, 1101, 139-65.
- [20] HERMOSO, *Eur J Cell Biol*, **1997**, 74, 1-9.
- [21] HIRST, *J Physiol*, **2006**, 576, 659-65.
- [22] DIXON, *Biol Reprod*, **2009**, 80, 665-73.

Faktory vplývajúce na expresiu vápnikovej pumpy (SPCA1) sekrečných ciest v nervovom tkanive potkana

Pavlíková, M., Kovalská, M., Straka, S., Petráš, M., Lehotský, J.

Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta, Martin
martina.pavlikova@jfmf.uniba.sk

Abstract

Ischemic-reperfusion injury (IRI) induces changes in the functional and biochemical parameters of brain cells. Cytoplasmic Ca^{2+} play an important role in the injurious process of brain cells induced by IRI. Tissue tolerance to a subsequent insult can be induced by ischemic preconditioning (IPC). Hyperhomocysteinemia (hHcy) is a risk factor for ischemic damage to CNS. Ca^{2+} -ATPase of secretory pathways (SPCA) localized in the Golgi complex, which is responsible for regulating Ca^{2+} levels in the cytoplasm. The aim of this study was to analyze gene expression at the transcription and translation level (SPCA1 isoform) in brain after IRI. We also monitored biochemical changes of SPCA1 after induction of IPC and chemically induced hHcy. Animals were induced with a short 15 minute lethal ischemia (4-vessel occlusion), followed by a reperfusion of 1, 3 and 24 hours. Another group of animals was induced with a 5-minute by sub-lethal ischemia - preconditioning (IPC). The second group of animals was subcutaneously administered with homocysteine (Hcy) for a period of two weeks, 15 min lethal ischemia was induced followed by reperfusion and induced IPC as described above. SPCA1 gene expression (RT-PCR) and protein levels (Western blot) were supplemented with immunohistochemical analysis of tissue. The levels of mRNA and protein were raised with increasing duration of reperfusion. The correlation between the expression of secretory SPCA1 pathways and IPC was confirmed. On the other hand, the impact of hHcy on the expression SPCA1 appeared as a factor that significantly reduces the levels of SPCA1. Our work allows a deeper understanding of the toxic effect of Hcy. IPC is showing as a perspective tool used in clinical practice and treatment of CNS disorders.

Úvod

Hoci sa v minulosti predpokladalo, že hlavnou príčinou poškodenia mozgu a miechy je samotná ischemia, mnohé štúdie z posledných desaťročí jednoznačne dokazujú súvis poškodenia s obnovením prítoku krvi v ischemizovanom mieste. Dôležitú úlohu v regulácii spôsobu smrti mozgových buniek po ischemicko-reperfúznom poškodení (IRP) má koncentrácia vápnika v cytoplazme. Na regulácii intracelulárnej cytoplazmatickej koncentrácie vápnika sa podieľa viacero transportných a vápnik viažúcich proteínov. Okrem neurónov a astroglálnych buniek bolo preukázané, že dochádza k uvoľneniu rôznych regulačných molekúl, neurotrofných faktorov a neuropeptidov vápnikom závislou exocytózou. Synaptický prenos, medzibunková komunikácia a ostatné funkcie nervových buniek sú tiež závislé na funkcii Golgiho komplexu, z čoho vyplýva význam SPCA1 v prenose signálu. A jedným z významov SPCA1 je práve vápniková signalizácia [1]. V experimentálnej ale aj klinickej praxi existuje určitý adaptačný mechanizmus, tzv. „preconditioning“ (IPC), ktorý môžeme považovať za nefarmakologické ovplyvnenie IRP. Ide o krátkotrvajúce opakujúce sa ischemické ataky, ktoré nespôsobujú ireverzibilné zmeny v tkanive, ale paradoxne adaptujú tkanivo voči následkom dlhšie trvajúcej ischemii, ktorá nastáva po reperfúzii. Pod vplyvom zvýšenej hladiny homocysteínu sa skrývajú mnohé procesy,

ktoré sú prípravou na vážnejšie poškodenie zdravia a môžu ohroziť aj život jedinca. Sú to jednak vnútrobunkové zmeny, ktoré môžu vyústiť do vzniku nádorového ochorenia, ale najmä rýchlo progredujúca ateroskleróza končiaca mozgovou príhodou alebo infarktom. Už aj mierne zvýšená hladina Hcy je u človeka faktor stimulujúci vývoj demencie a Alzheimerovej choroby [2], či výskytu cievnej mozgovej príhody [3]. Mnohé štúdie dokazujú spojitosť zvýšenej hladiny Hcy v súvislosti aj s inými poruchami CNS, ako je epilepsia, neurodegeneratívne a neuropsychiatrické ochorenia, rovnako ako aj vrodené poruchy metabolizmu. V našej práci sme sa zamerali na štúdium mechanizmov účinku IPC pri ochrane nervových buniek mozgu po IRP a na druhej strane sme chceli overiť vplyv hyperhomocysteinémie, ktorá je považovaná za jeden z faktorov, ktorý nepriaznivo vplýva na priebeh I/R poškodenia.

Materiál a metodika

Zvieratám (potkany kmeňa Wistar vo veku 3-6 mesiacov) v ischemicko – reperfúzne skupine bol vykonaný 4-cievny podváz podľa Pulsinelliho na čas 15 minút s následnou 1h, 3h a 24h reperfúziou ako model globálnej ischemie prednej časti mozgu. Skupine zvierat s IPC bola navodená krátka 5 minútová subletálna ischemia, o dva dni neskôr 15 minútová letálna ischemia s následnou reperfúziou v rovnakej dĺžke trvania ako u predchádzajúcej skupiny. Skupine zvierat s umelo vyvolanou hyperhomocysteinémiou bol počas dvoch týždňov pred experimentom subkutánne podávaný homocysteín v dávke 0,45 μ mol/g zvierat a dva-krát denne s 8 hodinovým intervalom. Po ischemii resp. po reperfúzii boli zvieratá humane usmrtené dekapitáciou a odobrali sa im tkanivá mozgu z oblastí kortexu a hipokampu, ktoré boli použité na prípravu homogenátov rozličnými postupmi, pre izoláciu RNA a bielkovín, resp. na histologickú analýzu.

Výsledky a Diskusia

Histologická analýza tkaniva mozgovej kôry reagovala na ischemický preconditioning nárastom intenzity fluorescenčného signálu SPCA1 so stúpajúcou dĺžkou reperfúzie. Ovplyvnenie selektívne vulnerabilnejšej oblasti CA1 hipokampu I/R inzultom sa prejavilo výraznejšími zmenami imunoreaktivity SPCA1. Detegovali sme nárast fluorescenčného signálu po 3h reperfúzii a následným výraznejším poklesom po 24h reperfúzii oproti kontrole v skupine neovplyvnených zvierat. Na druhej strane, protektívny účinok IPC sa prejavil zvýšenou imunoreaktivitou SPCA1 v reperfúzných skupinách s maximom po 24h reperfúzii, čo korelovalo s výsledkami na transkripčnej a translačnej úrovni. Dokázali sme, že hyperhomocysteinémia spôsobila výrazné zníženie génovej expresie mRNA SPCA1 v mozgovej kôre aj hipokampe potkana. Zároveň odpoveď SPCA1 na IPC v kombinácii s hyperhomocysteinémiou naznačuje koreláciu expresie SPCA1 a teda aj úlohu vápnikových zásobníkov, vrátane zásobníkov zo sekrečných dráh vo fenoméne ischemickej tolerance [4, 5]. Niektorí autori uvádzajú, že SPCA hrá významnú úlohu v normálnom vývoji buniek CNS, ich migrácii a morfogenéze [6]. Vyššia expresia hladiny SPCA1 v tkanive potkana sa zhoduje s pomerne vysokou celkovou aktivitou tejto pumpy medzi Ca^{2+} -ATPázami. To naznačuje jej významné postavenie v úlohe vápnikového zásobníka v nervovom tkanive potkana [7].

Záver

IPC iniciuje skoršiu bunkovú odpoveď na infarkt, čo poskytuje novší pohľad na pochopenie molekulárnych mechanizmov, ktoré sú súčasťou štrukturálnej integrity a funkcie Golgiho komplexu nielen v procese ischemie ale aj v odpovedi na preischemický podnet. V našich experimentoch sme zistili súvislosť medzi expresiou SPCA1 Golgiho komplexu a IPC. V korelácii s morfológicky zistiteľným počtom prežívajúcich neurónov a signifikantne zvýšenou hladinou proteínov a expresie génov na úrovni mRNA vápnikovej pumpy (SPCA1) so stúpajúcou dĺžkou reperfúzie v hipokampe potkana môžeme povedať, že preischemia navodzuje stav neuroprotektie-tolerance. Chemicky *in vivo* vyvolaná hyperhomocysteinémia počas dvoch týždňov vplyva výrazne na proces génovej expresie SPCA1.

Podakovanie

Práca je podporená projektom „ Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení“, ITMS: 26220220114, spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] van Baelen, K., Dode, L., Vanoevelen, J., Callewaert, G., De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J.B., Raeymaekers, L., Wuytack, F. a kol., *Biochem Biophys. Acta.* **2004**, 1742, 103-112.
- [2] Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W.F., Wolf, P.A., *N. Engl. J. Med.* **2002**, 346, 476–483.
- [3] Obeid, R., McCaddon, A., Herrmann, W. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2007**, 45, 1590-1606.
- [4] Dirnagl, U., Becker, K., Meisel, A. *Lancet Neurol.* **2009**, 8, 398-412.
- [5] Lehotský, J., Burda, J., Danielisová, V., Gottlieb, M., Kaplán, P., Saniová, B., *The Anatomical Record* **2009**, 292, 2002-2012.
- [6] Sepuľveda, M.R., Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Mata, A.M., Wuytack, F., *Neurosci.* **2008**, 29, 12174-12182.
- [7] Wootton, L.L., Argent, C.C., Wheatley, M., Michelangeli, F., *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1664, 189-197.

Hyperhomocysteinémia a jej vplyv na antioxidačné enzýmy

Petráš, M., Kovalská, M., Tatarková, Z., Pavlíková, M., Lehotský, J., Drgová, A.

Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta, Martin
mapet85@gmail.com

Abstract

Hyperhomocysteinemia is defined as an elevation of total plasma concentration of homocysteine. Homocysteine undergoes autooxidation induced by elevated plasma of this amino acid. During oxidation of sulphhydryl groups of homocysteine, reactive oxygen species, superoxide anion radicals, hydrogen peroxide and hydroxyl free radicals are generated, resulting in the endothelial cytotoxicity by oxidizing membrane lipids and proteins. Our study focuses on investigating the relationship between MnSOD activity and protein expression and the effect of induced hyperhomocysteinemia in male Wistar rats (6 months of age). The group with hyperhomocysteinemia showed a 42 % decrease of MnSOD activity, in comparison to a 15 % increase of MnSOD protein level in the control group. These results are in correlation with the histological analysis. We hypothesize that the observed inconsistency between the MnSOD expression and activity is due to tyrosine nitration of MnSOD and by protein thiolation and homocysteinylation leading to the loss of enzymatic activity and protein functional damage or to the generation of modified proteins. These processes are induced as a consequence of hyperhomocysteinemia resulting in the destruction of the endothelial cells and the formation of the atherosclerotic plaque.

Key words : homocysteine, reactive oxygen species, superoxide dismutase

Úvod

Homocysteín (Hcy) je excitačná aminokyselina generovaná v metabolizme metionínu, ktorá zvyšuje neuronálnu vulnerabilitu na excitačné a oxidačné poškodenie. Obsahuje tiolovú skupinu, ktorá ľahko podlieha oxidácii, pričom sa vytvárajú reaktívne kyslíkové radikály (ROS), ktoré vedú k oxidačnému rozpadu buniek. [1]. Hladina Hcy v plazme u zdravých jedincov sa pohybuje v rozmedzí 5-10 $\mu\text{mol/l}$. Zvýšenie hladiny Hcy v plazme sa označuje ako hyperhomocysteinémia (hHcy) a je dôsledkom interakcie exogénnych a endogénnych faktorov. Medzi exogénne príčiny patrí nadmerný prívod živočíšnych proteínov, stravy bohatej na metionín a nedostatok folátov, vitamínu B₆ a B₁₂, ktoré sú potrebné pre normálny metabolizmus Hcy. Medzi endogénnymi príčinami dominujú genetické odchýlky, vrodená nedostatočná aktivita enzýmov (napr. cystationín- β -syntáza). hHcy môže byť aj dôsledkom zvýšenej tvorby alebo spomaleného odbúravania Hcy v transsulfuračnej alebo remetylačnej ceste [2]. Hcy v plazme kontinuálne podlieha autooxidácii, ktorá vedie k tvorbe homocystínu, zmiešaného disulfidu Hcy a tiolovaných proteínov. Počas oxidácie SH skupín Hcy a iných zlúčenín obsahujúcich SH skupiny, ako cysteín sa tvoria ROS, ktoré oxidovaním membránových lipidov a proteínov spôsobujú cytotoxicitu endotelu. Autooxidácia Hcy podporuje nitráciu tiolov, znižuje hladinu NO a zvyšuje endoteliálnu produkciu superoxidových radikálov [3]. Hcy a produkty jeho oxidácie môžu vstúpiť do mozgového tkaniva. Neurotoxický účinok Hcy sa vyskytuje v dôsledku jeho schopnosti aktivovať NMDA receptory, čo vedie k zvýšeniu hladiny voľných radikálov

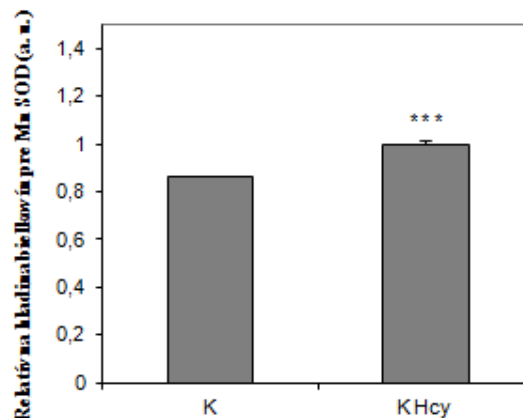
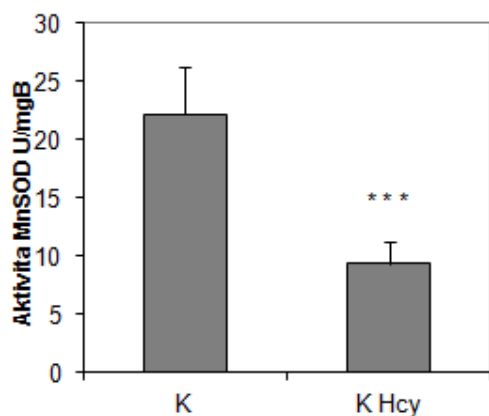
v neuronálnych bunkách a výsledkom toho je silný oxidačný stres. Produkty samovoľnej oxidácie Hcy majú vyššiu afinitu pre NMDA receptory ako Hcy a majú väčšiu kapacitu aktivovať mechanizmy bunkovej smrti [4]. Medzi jeden z hlavných mechanizmov kontrolujúcich hladinu ROS v organizme patrí antioxidačný enzým superoxiddizmutáza (SOD), ktorá existuje v troch izoformách. Kľúčovou je MnSOD lokalizovaná na mitochondriálnej membráne, ktorej úlohou je disociácia superoxidového radikálu na menej reaktívnejší peroxid vodíka [5]. Štúdie popisujú zvýšenú expresiu MnSOD pri hHcy. V našej práci sme sa zamerali na sledovanie vplyvu hHcy na hladinu MnSOD.

Materiál a metodika

Dospelé samce potkanov kmeňa Wistar (6 mesačné) boli rozdelené do dvoch skupín – kontrolná skupina (K) a skupina, ktorej bol po dobu dvoch týždňov subkutánne podávaný homocysteín v dávke 0,45 $\mu\text{mol/g}$ živej hmotnosti dvakrát denne s 8 hodinovým intervalom (K Hcy). Následne boli zvieratá humanne usmrtené, bol im odobraný mozog, ktorý bol použitý na prípravu homogenátov a na histologické vyšetrenie. Analyzovaná bola mitochondriálna frakcia spektrofotometrickými metódami. Na detekciu relatívneho množstva MnSOD sme využili metódu Western blotting. Výsledky boli korelované s fluorescenčnou imunohistochemickou analýzou tkaniva a štatisticky vyhodnotené v programe GraphPad Instat V3.01, pomocou Student-Neumann-Keulsovho testu, pričom ako štatisticky významné boli brané hodnoty $p < 0.05$.

Výsledky a diskusia

V našich experimentoch sme pozorovali pokles aktivity MnSOD o 42 % v skupine s indukovanou hHcy voči kontrolnej skupine ($p < 0.001$). Naopak, expresia MnSOD bola vyššia pri hHcy skupine v porovnaní s kontrolou o 15 % ($p < 0.001$) (obr. 1). To znamená, že celkové množstvo proteínu MnSOD sa zvýšilo, ale aktivita sa znížila. Tento jav je pozorovaný pri nitrácii tyrozínov MnSOD. Nitrozylovaná MnSOD bola nájdená pri viacerých ochoreniach spôsobených ischemicko-reperfúznym poškodením a zápalom a môže mať kľúčovú úlohu pri patológii niektorých ochorení [6], ktorých priebeh môže byť ešte viac zhoršený následkom hHcy. Naše výsledky korelujú aj s fluorescenčnou imunohistochemickou analýzou tkaniva, kde sme v skupine s hHcy detegovali zvýšený počet SOD pozitívnych neurónových buniek v kortexe laboratórnych zvierat. Najintenzívnejší fluorescenčný signál sme pozorovali v mieste odstupového kužela pyramidálnych neurónov tretej a piatej kôrovej vrstvy. Voľný Hcy neenzymaticky reaguje so sulfhydrylovými zvyškami proteínov a vytvára zlúčeniny s disulfidovými väzbami. Reakciu, ktorá sa nazýva tiolácia podlieha okolo 70 % celkového Hcy v krvi. Tá závisí od množstva Hcy v plazme a čím je viac Hcy, tým vyššia bude tiolácia, pričom vo veľkom rozsahu ovplyvňuje funkciu proteínov a enzýmov [7]. Ďalším nebezpečným účinkom Hcy je tvorba cyklického tioesteru Hcy-tiolaktónu. Táto zlúčenina je veľmi reaktívna a za fyziologických podmienok ľahko acyluje voľné aminoskupiny proteínov, hlavne $\epsilon\text{-NH}_2$ skupiny lyzínu a vytvára zlúčeninu -NH-CO- . Tento proces sa nazýva homocysteinyllácia a podporuje ho zvýšená hladina Hcy. Homocysteinyllácia vedie k funkčnému poškodeniu proteínov, inaktivácii enzýmov či tvorbe modifikovaných proteínov, ako hemoglobín, LDL a plazmatické proteíny, ktoré sú fyziologicky škodlivé [8].



Obr. 1 Celková aktivita MnSOD

Relatívna hladina bielkovín pre MnSOD

Záver

MnSOD sa významnou mierou zúčastňuje ochrany buniek a jeho zvýšená expresia redukuje hladiny intracelulárnych reaktívnych foriem, ktoré obzvlášť narastajú pri hyperhomocysteinémii. Zvýšený homocysteín v bunkách a jeho metabolity po homocysteinylácii a tiolácii spôsobujú posttranslačné modifikácie MnSOD, ktoré ovplyvňujú príslušnú antioxidačnú schopnosť, ako aj samotnú aktivitu. Zvýšená produkcia superoxidového radikálu, nárast peroxidu vodíka a peroxynitritového radikálu vedie k štrukturálnym zmenám proteínov a ďalších modifikovaných foriem, ktoré ovplyvňujú celkovú enzymatickú aktivitu antioxidačných enzýmov a súčasne vedú k nárastu neenzýmových endogénnych foriem, ktoré sa podieľajú na celkovej antioxidačnej hotovosti nervovej bunky.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0027/08 "Molekulové, neurologické a farmakologické korelácie neuroprotektie a ischemickej tolerancie", spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Streck, Matté, Vieira, Calcagnotto, Wannmacher, Wajner, Wyse. *Biochim Biophys Acta*. **2003**, 1637, 187-192.
- [2] Zhang, Jiang, Fang, Yan, Song, Gupta, Schafer, Durante, Kruger, Yang, Wang. *Circulation*. **2009**, 120, 1893-1902.
- [3] Cheng, Yang, Wang. *Curr Hypertens Rev*. **2009**, 5, 158-165.
- [4] Obeid, Herrmann. *FEBS Lett*. **2006**, 29, 2994-3005.
- [5] Jackson-Lewis. *Humana Press*. **2011**, 187-209.
- [6] Yakamura, Kawasaki. *Biochim Biophys Acta*. **2010**, 1804, 318-325.
- [7] Grant, Quinn, Dawes. *Mol Cell Biol*. **1999**, 19, 2650-2656.
- [8] Jakubowski. *Adv Exp Med Biol*. **2010**, 660, 113-27.

Chlamýdiová infekcia a jej vzťah k reprodukčným funkciám vajčkovodov

Polák, Š.¹, Kajanová, M.², Varga, I.¹, Miko, M.¹

¹Ústav histológie a embryológie, Lekárska Fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave,

²FORLIFE, n.o., Všeobecná nemocnica Komárno
michal.miko@fmed.uniba.sk

Infectious diseases of female genital tract are the main factors of impaired or disabled fertility in women. Main etiological agent of these diseases is Chlamydia trachomatis. Chlamydia trachomatis is a common sexually transmitted infection and are a significant health burden. Secondary infertility is mostly attributable to blockage of the fallopian tubes due to adhesions caused by reproductive tract infections. The discriminative capacity of Chlamydia antibody titers by means of ELISA, microimmunofluorescence, or immunofluorescence in the diagnosis of any tubal pathology is comparable to that of hysterosalpingography (HSG) in the diagnosis of tubal occlusion. Possible links between Chlamydia trachomatis in pelvic inflammatory disease and the subsequent CFTR-mediated (CFTR - cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) events in hydrosalpinx formation leading to infertility in hydrosalpinx are proposed.

Úvod

Základnou príčinou poškodenia vajčkovodov vyúsťujúcich do neplodnosti sú zápalové procesy, či už vo vnútri alebo v bezprostrednom okolí vajčkovodov. Pri týchto procesoch býva prevažnej miere alterovaná jedna z najdôležitejších funkcií vajčkovodov – funkcia transportná. Miera poškodenia transportnej funkcie závisí od kvality a trvania zápalového procesu. Spektrum poškodenia vajčkovodov siaha od ich úplného uzavretia s následným vznikom hydrosalpinx až po mierne zmeny ich povrchu spôsobujúcich intraluminálne zrasty sliznice (adhézie). Narušenie normálnej architektiky sliznice vajčkovodov potencionálne zvyšuje riziko neplodnosti a ektopickej tubárnej gravidity. Tá je typickým príkladom zlyhania transportnej funkcie vajčkovodu. Zrasty okolo vajčkovodov (peritubárne) môžu narušiť transport oocyty do vnútra vajčkovodu. Ďalej, zrasty vo vnútri vajčkovodov (intraluminálne) bránia normálnemu presunu embrya smerom k maternici, embryo je tak následne zadržané vo vajčkovode a implantuje sa v jeho stene. Pri tubárnej gravidite sú erodované cievy v stene vajčkovodu, dochádza k ruptúre ich steny s následným, život ohrozujúcim masívnym krvácaním – patrí k náhlým brušným príhodám [1]. Tieto zápalové procesy sú v prevažnej miere spôsobené pohlavne prenosnými chorobami (STD – sexual transmitted disease). Postrachom mladej generácie je aj Chlamydia trachomatis – vnútrobunkový parazit. Chlamýdiové infekcie sú v dnešnej dobe ohniskom záujmu mnohých odborníkov, ktorí sa zaoberajú pohlavne prenosnými chorobami aj ženskou sterilitou. Urogenitálna infekcia Chlamydia trachomatis je najčastejšia bakteriálna sexuálne prenosná choroba na svete. C. trachomatis je etiologickým agens niekoľkých bežných ochorení pohlavného systému ako uretritída, cervicitída a zápaly v malej panve u žien [2]. Podľa WHO sa ročne objaví až 90 miliónov nových prípadov nákazy [3]. Aj z týchto čiastkových informácií je po ich syntéze a analýze jasné, že by sme nemali bagatelizovať priamy vzťah chlamýdiových infekcií a reprodukčnú schopnosť ľudských jedincov a že tento problém je vysoko aktuálny a hodný ďalšej pozornosti.

Metodika

Ako cieľ sme si stanovili v prehľadnej, no kondenzovanej forme poskytnúť náhľad do problematiky chlamýdiovkej infekcie a jej vzťahu k reprodukčnej schopnosti žien, špeciálne preskúmať jej vzťah k funkciám vajíčkovodov. K prehľadu sme použili recentnú špecializovanú literatúru z odborných on-line databáz PUBMED a SCOPUS. Nevyhýbali sme sa však ani starším prácam, ktoré nestratili nič na svojej presnosti, a ktorých závery potvrdil čas a množstvo citácií.

Výsledky

Infekcia *C. trachomatis* predstavuje obrovský medicínsky, sociálny a ekonomický problém. Ako vyplýva z jednej austrálskej metaanalýzy na túto tému, infekcia *Chlamydia trachomatis* je významný zdravotnícky problém [4]. U žien je príčinou zápalov močovej rúry a krčku maternice, spôsobuje zápalové ochorenie malej panvy. Z pohľadu reprodukčnej medicíny je táto baktéria hlavným faktorom vyvolávajúcim tubárnu neplodnosť [5], ektopickú graviditu [6] a reprodukčné straty [7]. Až 70-75% infikovaných žien ostáva asymptomatických, prípadne sú symptómy len mierne a nešpecifické, kvôli čomu nakazené pacientky nevyhľadávajú lekársku pomoc. Súčasne však platí, že len u časti žien, ktoré sa nakazili, sa infekcia rozšíri aj na vnútorné pohlavné orgány, a len u časti z nich sa vyvinie tubárna sterilita [8]. Chlamýdie sú výnimočné gram-negatívne baktérie, charakteristické striktným intracelulárnym parazitizmom a unikátnym vývinovým cyklom. Sú metabolicky deficientné vo vzťahu k syntéze ATP. Preto sú závislé od exogénneho prísunu tejto zlúčeniny, ktorá je bezprostredným zdrojom energie [9]. Vzhľadom na svoju veľkosť a obligatórny parazitizmus (schopnosť rozmnožovať sa iba vo vnútri hostiteľských buniek), boli v minulosti zaraďované medzi tzv. „veľké vírusy“. Prítomnosť bunkovej steny, oboch typov nukleových kyselín DNA aj RNA, ribozómov a schopnosť syntetického metabolizmu ich však radí bližšie k baktériám, aj keď sa od nich inými charakteristikami odlišujú. Chlamýdie sú intracelulárne parazity, rozmnožujú sa len vo vnútri živých eukaryotických buniek. Po vniknutí do bunky nedochádza u nich k strate fyzickej integrity a k syntéze de novo ako u vírusov, ale k zvláštnemu vývinovému cyklu. Podobne ako typické baktérie sú schopné syntetického metabolizmu, nie však energetického metabolizmu. Preto sa považujú za energetické parazity eukaryotických buniek [10]. Chlamýdie sú úplne odkázané na svojho hostiteľa a v priebehu spolužitia sa preto vytvorili mechanizmy, ktoré umožňujú ich dlhodobé prežívanie, spravidla bez poškodenia vitálnych funkcií. Tubárna neplodnosť patrí medzi najlepšie prevenciou zvládnuteľné príčiny infertility žien. Je dôkazom, že porucha transportnej funkcie vajíčkovodov je priamym dôsledkom zápalových procesov malej panvy. Zápalové ochorenia malej panvy sú polymikrobiálne infekcie horného genitálneho traktu, týkajú sa predovšetkým mladých, sexuálne aktívnych žien. Diagnóza je klinická. *Chlamydia trachomatis* a *Neisseria gonorrhoeae* sú najčastejším etiologickým agensom, i keď, aj iné mikroorganizmy nie sú vzácnosťou [11]. Avšak práve *C. trachomatis* má najväčší sklon k šíreniu do vajíčkovodov [12]. Asociácia medzi prekonanou chlamýdiovou infekciou a tubárnou neplodnosťou je tak významná, že viaceré štúdie potvrdili prediktívnu hodnotu hladiny protilátok proti chlamýdiám v krvnom sére vo vzťahu k tubárnej nepriechodnosti [13]. Testovanie protilátok je lacnejšie a jednoduchšie vyšetrenie zamerané na patológiu vajíčkovodov ako invazívne metódy [14]. Po prvej epizóde výskytu zápalu panvy je riziko tubárnej neplodnosti priemerne 10%. Každý opakujúci sa zápal zdvojnásobuje riziko neplodnosti [19]. Epidemiologické štúdie aj výskumy uskutočnené na animálnych

modeloch dokázali, že tak symptomatická ako aj asymptomatická infekcia *C. trachomatis* znamená ohrozenie pre normálnu funkciu pohlavného systému ženy [7]. Post-infekčná hydrosalpingitída je spôsobená atrofiou sliznicových rias vajčkovodu a odlúpením epitelových buniek z výstelky vajčkovodu. Narušenie membránových iónových kanálov a púmp epitelových buniek vedie k abnormálnej sekrécii tubárnej tekutiny a k jej zníženej reabsorpcii. Dôležitú úlohu v procese formovania tekutiny pri hydrosalpingitíde zohráva najmä kanál chloridových iónov CFTR. Ten slúži zároveň aj ako regulátor ostatných iónových púmp a kanálov a je bránou vstupu elementárnych teliesok *C. trachomatis* do vnútra epitelových buniek [15]. Ďalším patomechanizmom vzniku hydrosalpingitídy je efekt mediátorov zápalu na sekréciu epitelových buniek. Prostaglandíny, histamín, serotonin, doštičky aktivujúci faktor (platelet activating factor – PAF) a ďalšie mediátory zápalu zvyšujú sekrečnú aktivitu epitelových buniek sliznice vajčkovodu. V in vitro podmienkach histamín ovplyvňuje transport iónov cez membránu epitelových buniek vajčkovodov, čím vplýva na sekréciu tubárnej tekutiny [16]. Chlamydia trachomatis je silný imunogén, ktorý stimuluje tak humorálnu, ako aj bunkovú imunitnú odpoveď. V procesoch imunopatogenézy vzniku zápalov ženského pohlavného systému zohráva dôležitú úlohu chlamýdiový proteín teplotného šoku (heat shock protein – HSP) – 60kDa. HSP sú esenciálne zložky všetkých živých organizmov, od baktérií až po človeka. Ich sekvencia aminokyselinového reťazca je v procese evolúcie prísne konzervovaná. Pri strese sa zvyšuje syntéza HSP v bunkách ako prevencia denaturácie bielkovín a na označovanie degradovaných polypeptidov určených na elimináciu z bunky. U žien existuje blízka korelácia medzi cirkulujúcimi anti-HSP 60 protilátkami a oklúziou vajčkovodov, nie však s akútnou chlamýdiovou infekciou [17, 18]. Protilátky proti HSP 60 teda poukazujú na dlhotrvajúcu infekciu s perzistujúcimi antigénmi chlamýdií. Neplodnosť spôsobená nepriechodnosťou vajčkovodov je najčastejšou indikáciou pre in vitro fertilizáciu (IVF) [20]. Sérologický dôkaz prekonanej infekcie však neovplyvňuje transfer a implantáciu embrya, ani priebeh tehotenstva po IVF [21]. Chlamýdiové infekcie vplývajú nielen na sterilitu, ale aj na prípadnú graviditu. Ektopická gravidita je najčastejšou príčinou mortality matiek v prvom trimestri vo vývojových krajinách. V USA tvorí 9% so všetkých úmrtí spojených s tehotenstvom. Ženy s prekonanou zápalovou chorobou panvy majú 7- až 10-násobne zvýšené riziko tubárnej gravidity [22]. Riziko opakovanej ektopickej gravidity alebo výskyt infertility po ektopickej gravidite je priemerne 20%. Chlamýdiové zápaly malej panvy spôsobujú aj iné, ďalšie problémy ako infertility a ektopická gravidita. U žien s prekonaným ochorením sa vyskytujú aj chronické bolesti v oblasti malej panvy spôsobené extraluminálnym zjazvením tkaniva. Chronické bolesti v oblasti panvy postihujú až 24 - 75% žien, ktoré prekonali zápalové ochorenie panvy. Ženy po prekonanom zápale panvy mali 10-krát častejšie bolesti v abdominálnej bolesti, 4-krát častejšie gynekologické bolesti, 6-krát častejší výskyt ektopickej gravidity a 8-krát častejšie u nich bola vykonaná hysterektómia [23]. Niektoré štúdie potvrdzujú vplyv infekcie *C. trachomatis* aj na priebeh gravidity. Zvyšuje riziko predčasnej ruptúry fetálnych membrán, predčasného pôrodu, pôrodu novorodenca s nízkou pôrodnou hmotnosťou alebo mŕtvorodenosť [24].

Diskusia

Infekcie *C. trachomatis* sú vážnym socioekonomickým a spoločenským zdravotníckym problémom kvôli potenciálnym dlhodobým konzekvenciám u žien zahŕňajúcich zvýšené riziko ektopického tehotenstva, tubárnej neplodnosti a chronickej pelvickej bolesti. Navyše, ak sa baktérie prenesú pri pôrode na

novorodenca, môže to u neho spôsobiť oftalmiu novorodencov a atypický zápal pľúc novorodencov. Vzhľadom k preukázaným zvýšeným rizikám morbidity, skriningové vyšetrenia u mladých, pohlavne aktívnych žien a skrining v tehotenstve sa odporúča už v niekoľkých krajinách [2]. Zaujímavá je aj otázka ďalšieho dlhodobého vývoja vzťahu ľudský jedinec – *C. trachomatis*. Ako máme dôkazy z iných príkladov v prírode, najvýhodnejšie pre samotnú baktériu je, keď sa dokáže natoľko adaptovať na svoje hostiteľské prostredie, že ho nijako nepoškodzuje. To jej zaručí nerušené prežívanie, bez snáh človeka zbaviť sa jej, zároveň neskrátené prežívanie jedinca a teda zabezpečenie aj jej životného prostredia. Môžeme predpokladať, že čoraz viac infikovaných žien zostane asymptomatických a neprejavia sa u nich problémy opisované v tomto článku? Bude sa vzťah chlamýdia – človek uberať ku komezalizmu?

Literatúra

- [1] MASTROIANNI, J *Pediatr Adolesc Gynecol*, 1999, 12, 121-6.
- [2] MYLONAS, *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 285, 1271-85.
- [3] GERBASE, *Lancet*, 1998, 351, suppl. III, S2-S4.
- [4] LEWIS, *BMC Infect Dis*, 2012, 12, 113.
- [5] CATES, *Am J Obstet Gynecol*, 1991, 164, 1771-81.
- [6] SZILLER, *Hum Reprod*, 1998, 13, 1088-93.
- [7] PAAVONEN, *Hum Reprod Update*, 1999, 5, 433-47.
- [8] COHEN, *Sex Transm Inf*, 1999, 75, 21-4.
- [9] BLACK, *Clin Microbiol Rev*, 1997, 10, 160-83.
- [10] BARTKOVÁ, *Biológia Ekológia Chémia*, 2006, 4, 15-9.
- [11] GRADISON, *Am Fam Physician*, 2012, 85, 791-6.
- [12] TAYLOR-ROBINSON, *Int J STD AIDS*, 2012, 23, 18-24.
- [13] MOL, *Fertil Steril*, 1997, 67, 1031-7.
- [14] LARDENOIJE, *Ned Tijdschr Genneskd*, 2007, 151, 1981-5.
- [15] AJONUMA, *Hum Rep Update*, 2002, 8, 255-64.
- [16] DOWNING, *Biol Reprod*, 1999, 61, 657-64.
- [17] ECKERT, *J Infect Dis*, 1997, 175, 1453-8.
- [18] AULT, *Infect Dis Obstet Gynecol*, 1998, 6, 163-7.
- [19] WESTROM, *Sex Transm Dis*, 1994, 21, S32-S37.
- [20] TEMPLETON, *Lancet*, 1996, 348, 1402-6.
- [21] CLAMEN, *Fertil Steril*, 1996, 65, 146-9.
- [22] WESTROM, *Br Med J*, 1981, 82, 15-8.
- [23] BUCHAN, *Br J Obstet Gynaecol*, 1993, 100, 1771-81.
- [24] GRAVETT, *JAMA*, 1986, 256, 1899-903.

Optimalizovaný protokol izolácie a *in vitro* kultivácie ľudských mezenchýmových kmeňových buniek z tukového väziva

Polák, Š.¹, Varchulová Nováková, Z.², Kuniaková, M.², Boháč, M.^{1,3},
Varga, I.¹, Vojtaššák, J.², Danišovič, Ľ.²

¹Ústav histológie a embryológie LF UK, ²Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK, Bratislava, Bratislava, ³Klinika plastickej chirurgie LF UK, Bratislava
lubos.danisovic@fmed.uniba.sk

Adipose tissue seems to be promising source of adult mesenchymal stem cells. The crucial condition of their potential clinical application is the isolation and multiplication to obtain sufficient number of cells. In this study we described the optimized protocol of isolation and *in vitro* expansion of adipose tissue derived stem cells.

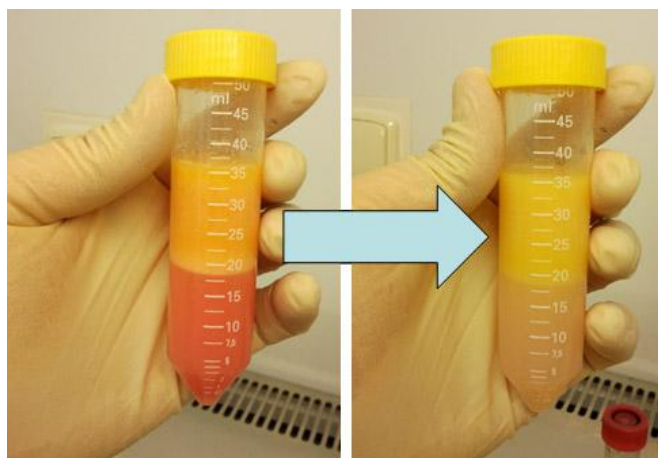
Úvod

Mezenchýmové kmeňové bunky (MKB) sú nediferencované bunky, ktoré sa nachádzajú v tkanivách mnohobunkových živočíchov počas všetkých štádií ontogenézy. Vyznačujú sa dlhodobou schopnosťou sebaobnovy a plasticitou [1]. V organizme plnia úlohy počas embryogenézy, nahrádzaní opotrebovaných buniek a regenerácii poškodených tkanív [2]. V súčasnosti je problém zadefinovať jednoznačný fenotyp MKB. Po izolácii a adaptácii na *in vitro* podmienky majú fibroblastom-podobnú morfológiu [3]. V pionierskych prácach sa vychádzalo zo schopnosti MKB izolovaných z kostnej drene hlodavcov adherovať na dno kultivačnej nádoby, kde začali vytvárať kolónie, tzv. CFU-F [4]. Podobné bunky sa podarilo izolovať aj z kostnej drene ľudí, opíc, psov, mačiek, oviec a zajacov [1]. Neskôr bol dokázaný ich multilíniový potenciál [5]. V dnešnej dobe sa pri fenotypových analýzach MKB hodnotí sa expresia povrchových markerov. Podľa Medzinárodnej spoločnosti pre bunkovú terapiu musia MKB exprimovať CD73, CD90 a CD105 a musia byť negatívne na CD14, CD34 a CD45, ktoré sú charakteristické pre hematopoetické a endotelové kmeňové bunky [6]. Okrem toho, niektoré MKB produkujú aj antigény CD13, CD29, CD44, CD59, CD106, CD133, CD140b, CD166 a CD271. Väčšina MKB je pozitívna na HLA-A,B,C ale na druhej strane vykazujú negativitu na HLA-DR [7,8]. Kostná dreň je najviac preskúmaný zdroj kmeňových buniek. Obsahuje hematopoetické a stromálne MKB [9]. MKB je možné pomerne ľahko izolovať centrifugáciou v hustotnom gradiente a expandovať v *in vitro* podmienkach [10]. Na druhej strane, odber kostnej drene je veľmi invazívny zákrok, ktorý predstavuje enormnú záťaž pre darcu. Navyše, kvalita a kvantita získaných MKB sa rapídne znižuje so stúpajúcim vekom jedinca [11]. Z tohto dôvodu sa hľadajú alternatívne zdroje, pričom veľmi sľubne sa javí tukové väzivo. V predloženej práci prezentujeme optimalizovaný protokol izolácie a *in vitro* kultivácie ľudských MKB z tukového väziva.

Pracovný postup

Tukové väzivo bolo získavané liposukciou od zdravých jedincov počas plánovaných zákrokov na Klinike plastickej chirurgie LFUK. Po odbere bolo transportované v odberových striekačkách do laboratória tkanivových kultúr. Na 24 h bolo uložené pri laboratórnej teplote v kolmej polohe. Počas tohto času došlo ku usadeniu časti krvi na dne striekačky (pri ústí). Po 24 h bola krv opatrne vypustená a tukové väzivo rozdelené do 50ml centrifugačných skúmaviek (TPP, Švajčiarsko) v objeme maximálne 20ml. Skúmavky boli doplnené fosfátovým tlmivým roztokom - FTR (PAA,

Rakúsko) v objeme 20ml, zavreté a celý obsah bol dôkladne premiešaný. Následne boli skúmavky vložené na 3 až 5 min do stojanov. Počas tohto času došlo ku oddeleniu tuku a FTR s obsahom erytrocytov, ktorý bol opatrne odsatý sterilnou 10ml pipetou (TPP, Švajčiarsko). Tento krok bol zopakovaný niekoľkokrát, kvôli maximálnej eliminácii erytrocytov – orientovať sa dá podľa zafarbenia FTR, keď má slabú ružovú farbu je možné pokračovať (obr. 1). Po opláchnutí bol ku tukovému väzivu pridaný predhriaty 0,1% roztok kolagenázy typ I (Invitrogen, USA). Skúmavka bola vložená na 60 min do inkubátora (37°C) s orbitálnou trepačkou. Potom nasledovala centrifugácia (1200 ot./min, 6 min). Plávajúci tuk, dospelé adipocyty a roztok kolagenázy bol opatrne odsatý (nad sedimentom sa ponechalo 5ml). Sediment obsahujúci kmeňové bunky bol resuspendovaný v kultivačnom médiu D-MEM (PAA, Rakúsko) s 10% fetálneho teľacieho séra – FTS (PAA, Rakúsko). Nasledovala centrifugácia (1200 ot./min, 10 min). Získaný supernatant bol odsatý a sediment resuspendovaný v kompletnom kultivačnom médiu – D-MEM + 10% FTS + penicilín/ streptomycín (PAA, Rakúsko) + amfotericín B (PAA, Rakúsko). Suspenzia buniek bola vysiatá na Petriho misky (TPP, Švajčiarsko) s priemerom 10cm cez bunkové sitká (Falcon, USA) a uložené do CO₂ inkubátoru (37°C, 5% CO₂ vo vzduchu). Po 24 h bola vykonaná výmena kultivačného média. Počas ďalšej kultivácie boli výmeny vykonávané v 48 h intervaloch. Po dorastení buniek do konfluencie, boli trypsinizované a subpasážované. MKB z tretej pasáže boli charakterizované mikroskopickými metódami, zostrojené boli rastové krivky a taktiež bola vykonaná prietoková cytometria.

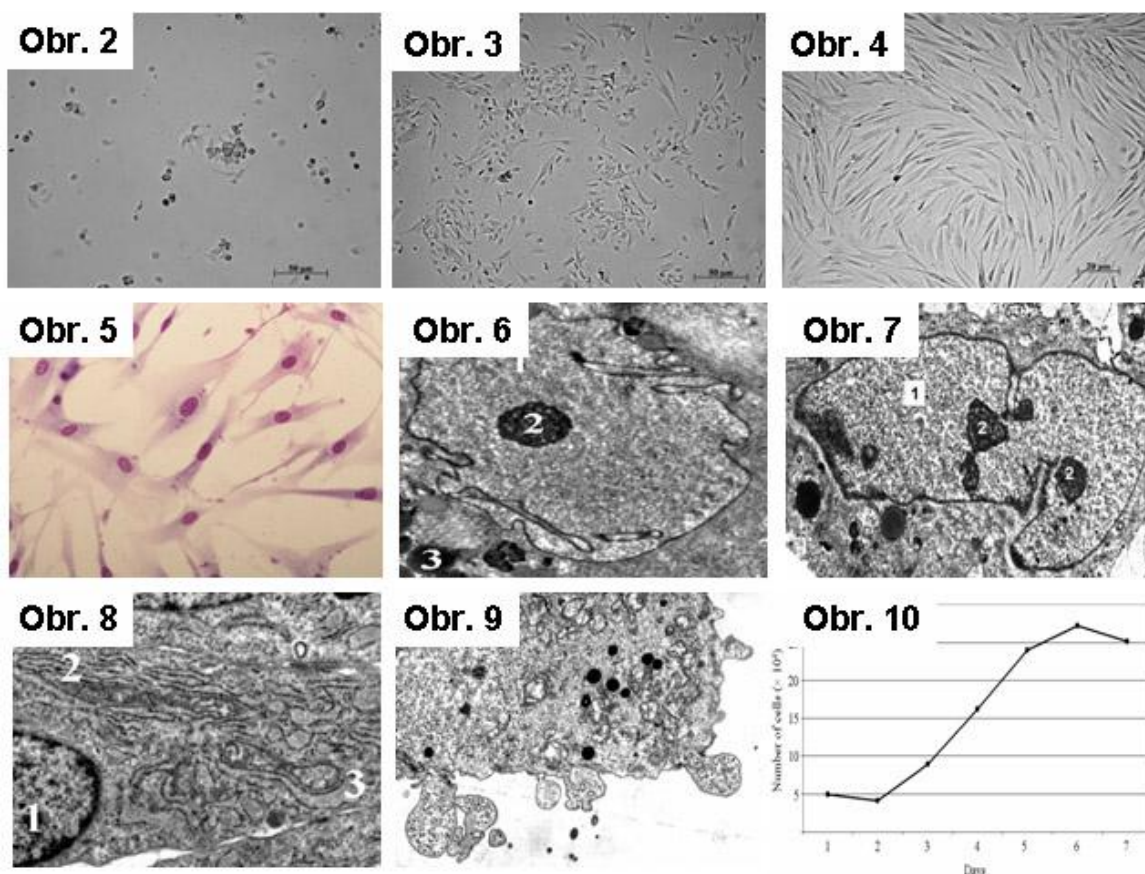


Obr. 1. Eliminácia erytrocytov opakovaným premývaním FTR.

Výsledky a diskusia

V štúdii sme opísali optimalizovaný protokol izolácie a kultivácie ľudskej MKB z tukového väziva dospelých jedincov, ktoré v súčasnosti mnoho autorov považuje za výdatný a bezpečný zdroj dospelých kmeňových buniek vhodných pre biomedicínske využitie [12,13]. MKB boli adherované na Petriho miskách a proliferovali v kolóniách už po 24h (obr. 2). Pri výmene média sa odsali zvyšné tukové a neadherované bunky. Po ďalších 5 až 7 dňoch kultivácie (obr. 3) boli subpasážované. Počas ďalšej kultivácie získali fibroblastom-podobnú morfológiu a tú vykazovali až po tretej pasáži (obr. 4). Podobné výsledky, nielen so MKB z tuku opísali aj iní autori [3,14]. Analýzy svetelným mikroskopom ukázali, že MKB farbené Giemsovým farbivom (Centralchem, SR) mali transparentnú cytoplazmu, bez známk patologických zmien. Jadrá mali prevažne oválny tvar a obsahovali 1 až 3 jadierka (obr. 5). TEM analýza ukázala normálnu ultraštruktúru buniek s vysokou

proteosyntetickou aktivitou bez patologických zmien. Bunky mali variabilný tvar (od oválneho až po predĺžený v jednom smere). Obsahovali nápadné polymorfné jadrá s prevahou euchromatínu. V ňom sa nachádzal variabilný počet jadriek (obr. 6, 7). Zaznamenané bolo dobre vyvinuté drsné endoplazmové retikulum a cisterny Golgiho aparátu (obr. 8). Taktiež boli pozorované tukové vakuoly ako aj odštiepujúce sa vezikuly s glykogénovými granulami a ďalším bližšie nešpecifikovaným obsahom (obr. 9). Podobné výsledky sme zaznamenali aj pri analýze SKB izolovaných z priečne pruhovaných svalov [15]. Prietoková cytometria potvrdila, že MKB izolované z tukového väziva boli pozitívne na CD29, CD73, CD90, CD105, CD106 a CD166. Na druhej strane boli negatívne na CD31, CD34 a CD45, ktoré sa považujú za antigény hematopoetických alebo endotelových progenitorových buniek [5]. Analýzou rastových kriviek bolo zistené, že MKB izolované z tukového tkaniva majú rastovú krivku typickú pre väčšinu MKB [18]. Naše bunky mali veľmi krátku Lag fázu. Potom sa začali rýchlo deliť, čo korešponduje s výraznou fázou logaritmickeho rastu. Medzi piatym a šiestym dňom kultivácie dosiahli stacionárnu fázu a postupne prešli do degradačnej fázy, čo morfológicky korešpondovalo s kontaktnou inhibíciou kultivovaných buniek (obr. 10). Čas zdvojnásobenia populácie bol 27,36 h.



Obr. 2 – 10. Morfológické a biologické vlastnosti MKB izolovaných z tukového väziva.

Pod'akovanie

Štúdia bola podporená grantom Ministerstva zdravotníctva SR č. 2007/36-UK-07 a grantom VEGA č. 1/0706/11.

Literatúra

- [1] Barry, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2004**, 36, 568–584.
- [2] Shanti, *Oral. Maxillofac. Surg.* **2007**, 65, 1640–1647.
- [3] Zhu, *Cell Biochem. Funct.* **2008**, 26, 664–675.
- [4] Caplan, *J. Orthop. Res.* **1991**, 9, 641–650.
- [5] Pittenger, *Science*. **1999**, 284, 143–147.
- [6] Dominici, *Cytotherapy*. **2006**, 6, 315–317.
- [7] Battula, *Haematologica*. **2009**, 94, 173–184.
- [8] Rojewski, *Transfus. Med. Hemother.* **2008**, 35, 168–184.
- [9] Charbord, *Hum. Gene Ther.* **2010**, 21, 1045–1056.
- [10] Haack-Sorensen, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **2008**, 68, 192–203.
- [11] Kern, *Scand. Stem Cells*. **2006**, 24, 1294–1301.
- [12] Abudusaimi, *J. Int. Med. Res.* **2011**, 39, 1852–1860.
- [13] Zhou, *Tissue Eng. Part A*. **2011**, 17, 2981–2997.
- [14] Lorenz, *Tissue Eng. Part A*. **2008**, 17, 925–932.
- [15] Danisovic, *Tsitologija*. **2011**, 53, 482–487.

NADH:ubichinon oxidoreduktáza a starnutie mozgu potkanov

Tatarková, Z., Kovalská, M., Petráš, M., Račay, P., Lehotský, J., Kaplán, P.

Ústav lekárskej biochémie JLF UK Martin
tatarkova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Neurological disorders affect millions of people worldwide. Many hypotheses have been developed to explain these neurodegenerative disorders, especially Alzheimer and Parkinson disease in which one of the most dominant risk factors is age. In the present investigation we focused our attention to changes on the level of mitochondria with age in brains from male Wistar rats (6-, 15- and 26-month old). Lower mitochondrial mass present in neurons and gradual decline in mitochondrial energetic capacity creates an important feature of age-related neurodegeneration, dysfunctional mitochondria. Therefore, we estimated activity of the first mitochondrial respiratory chain complex. The activity of complex I decreased progressively during aging with activity losses of 8.6% ($p < 0.05$) in the brain of senescent rats compared with adults. Age-related protein modification was demonstrated by decrease in the total sulfhydryl group content for 15 months old rats with no more changes for 26 months old rats. Relative amount of pro-apoptotic GRIM-19 protein, complex I subunit, was lower when compared to adult group. It does not suggest significant changes of complex I in relation to apoptosis. The present study suggests that decline in complex I activity is due, at least in part, to mitochondrial oxidative stress; however, thiol groups decline appear to have an impact on enzyme functions. No interaction was detected with apoptosis through GRIM-19 subunit protein level. Therefore loss of the enzyme activity during aging may be due in part to oxidative modifications of mitochondrial proteins and/or lipids. Understanding the role of this complex in mitochondria has direct clinical implications. It could help us with new therapeutically trends in disorders connected with aging.

Key words: Aging brain mitochondria, Complex I, GRIM-19

Úvod

Starnutie a s vekom-spojené neurodegeneratívne ochorenia majú spoločné niektoré patologické mechanizmy (prítomnosť energetického deficitu, znížené vychytávanie glukózy a zhoršenie funkcie mitochondrií), ktoré môžu viesť k dysfunkcii neurónov [1]. Okrem energetickej úlohy mitochondrií, zohráva kľúčovú úlohu v riadení nervovej homeostázy vápnik, bunková signalizácia a proces apoptózy [2]. V súčasnosti je neoddeliteľnou časťou s vekom spojenej neurodegenerácie nižší obsah mitochondrií v neurónoch a následný pokles ich energetickej kapacity. Súčasné poznatky ukazujú na to, že poškodenie funkcie mitochondrií v starnúcom mozgu nastáva v dôsledku spomaleného prenosu elektrónov v komplexe I a IV dýchacieho reťazca [3], hoci niektoré štúdie nezaznamenali výraznejšie zmeny na úrovni aktivít jednotlivých enzýmov mitochondrií tak u myší ako aj potkanov. Jednou z príčin rôznorodosti výsledkov môže byť využitie rozdielnych izolačných metodík, ako aj tkanivo/časť tkaniva v ktorom sú jednotlivé markery stanovované. Výraznejšie výsledky boli detegované v oblastiach mozgu potkana, ktoré sú najviac postihnuté počas starnutia, hipokampus a kortex [4].

Komplex I (NADH:ubichinon oxidoreduktáza, EC 1.6.5.3) je najväčším z piatich komplexov oxidačnej fosforylácie, pričom iba 7 zo 45 podjednotiek je kódovaných mitochondriovým genómom. Pokles aktivity komplexu I je prisudzovaný práve mutáciám v mitochondriovej DNA u starnúcich zvierat, ako aj obsahu tiolových skupín a nedávno definovanej 43. podjednotke GRIM-19 (Gene associated with Retinoid-IFN induced Mortality). Jednoznačná úloha primárne jadrového GRIM-19 je v mitochondriách stále nejasná. GRIM-19 je súčasťou membránového modulu komplexu I, ktorý sa zúčastňuje jeho finálnej zostavy [5]. Počas embryogenézy je nevyhnutný pre vápnikovú homeostázu [6], počas ischémie je stimulovaná jeho produkcia [2], ale v literatúre nie sú údaje v spojitosti s vekom v mozgu. Na rozdiel od väčšiny apoptózu-stimulujúcich bielkovín, GRIM-19 nie je fixovaný na určité funkčné miesto, ale je schopný pohybovať sa vo vnútri bunky, kde ovláda rôzne funkcie (apoptóza, bunkový cyklus, zostavu komplexu I) [7]. Je však možné, že funkcia GRIM-19 je navyše riadená na úrovni posttranslačných modifikácií. Genetická dysfunkcia komplexu I predstavuje najväčšiu skupinu z primárnych mitochondriových porúch, pričom jeho nefunkčnosť sa spája s familiárnou formou Parkinsonovej choroby, rakovinou. Pochopenie mechanizmov biogenézy, prenosu energie, produkcie reaktívnych foriem kyslíka a regulácie komplexu I je kľúčové pre objasnenie jeho patofyziologickej úlohy. Preto cieľom našej práce bolo sledovať možné interakcie medzi komplexom I, zmenami tiolových skupín a proapoptotickou bielkovinou GRIM-19.

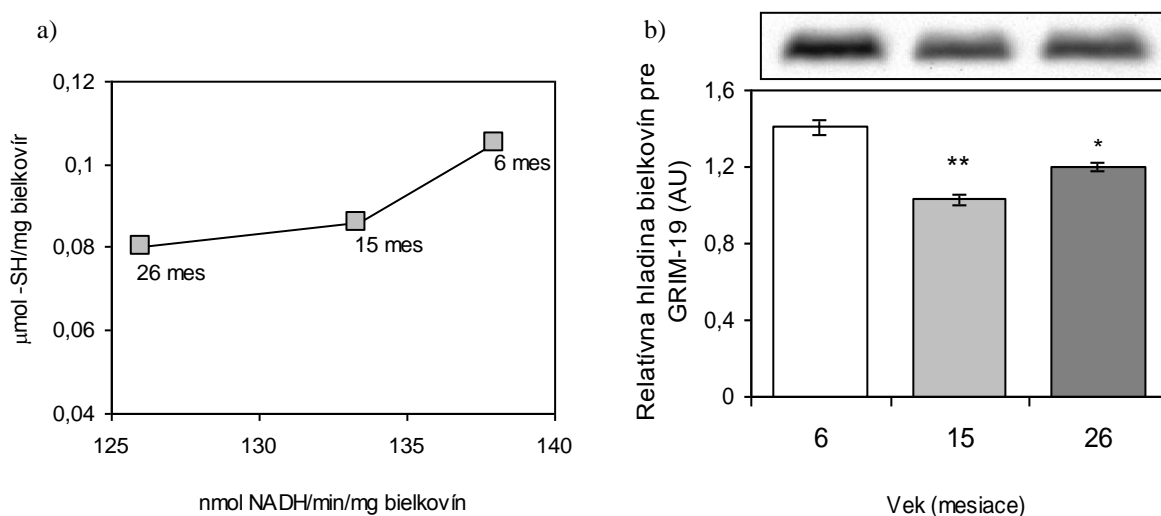
Materiál a metodika

Pre naše experimenty sme použili mozgy potkanov kmeňa Wistar dvoch vekových skupín, dospelé (6 mes), staré (15 mes) a senescentné (26 mes) jedince. Z tkaniva mozgu boli vyizolované mitochondrie a následne použité na spektrofotometrické stanovenie aktivity komplexu I, celkového obsahu tiolových skupín a na detekciu relatívneho množstva podjednotky komplexu I, GRIM-19, s využitím western blottingu s imunodetekciou. Výsledky sme vyhodnotili programom GrafPhad InStat V3.01 s využitím Student-Neuman-Keulsovhovho testu, kde hladina $p < 0.05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

Výsledky a diskusia

Za normálnych podmienok mitochondrie zabezpečujú kontinuálnu produkciu ATP potrebného pre správne fungovanie procesov v bunke. Nárast hladín reaktívnych foriem kyslíka a dusíka, či už v dôsledku akútneho stimulu alebo pomalším procesom starnutia, má negatívny dopad na správne fungovanie mitochondrií mozgu. Najväčší enzýmový komplex respiračného reťazca mitochondrií je komplex I. Mnoho autorov popisuje pokles jeho aktivity s vekom. V našich experimentoch sme zaznamenali mierny vekovo-závislý pokles aktivity komplexu I, najmä u 26 mes jedincov (o 8.6%, $p < 0.05$). Príčinou poklesu môžu byť mutácie v mitochondriovej DNA, strata lipidovej súčasti - kardiolipínu, ale aj obsahu tiolových skupín. Celkový obsah tiolových skupín v mitochondriovej frakcii pozitívne koreloval s poklesom aktivity komplexu I (Obr. a) v procese starnutia. Zistili sme o 18.1% nižší obsah celkových -SH skupín u starých oproti dospelým jedincom, pričom tento stav pretrvával aj u senescentných jedincov. Tieto zistenia poukazujú na to, že hoci poškodenie -SH skupín v komplexe I môže prispievať k celkovej tvorbe reaktívnych foriem, iba v určitej miere zohráva úlohu pri strate jeho vlastnej aktivity, najmä u senescentných jedincov. Nedávne štúdie poukázali na dôležitosť tohto enzýmového komplexu, a to nielen kvôli spojitosti s produkciou kyslíkových radikálov, ale aj jeho priame prepojenie s procesom

apoptózy [7]. Preto sme využili metódu western blotting a aplikovali sme protilátku GRIM-19. Avšak zistili sme signifikantný pokles hladiny pre bielkovinu GRIM-19 u starých o 27% aj v skupine senescentných o 21% oproti dospelým, 6 mes jedincom.



Obr. Grafické znázornenie a) korelácia aktivity komplexu I a obsahu tiolových (-SH) skupín, b) hladiny pre GRIM-19 v mitochondriách.

Hoci sa v poslednom období čoraz častejšie popisuje úloha GRIM-19 pri prežívaní nádorových buniek, čo má oveľa nebezpečnejší dopad na celé tkanivo/orgán. Naše zistenia nepotvrdili významnú pro-apoptotickú úlohu podjednotky GRIM-19 v procese fyziologického starnutia. Skôr sa zdá, že starnúce tkanivo je adaptovanejšie na oxidačný stres, čo dokazuje aj mierny pokles aktivity komplexu I. Preto je potrebné sledovať aj morfológické zmeny na úrovni rôznych častí mozgu ako to popisuje [4], najmä kortex a hipokampus.

Záver

Komplex I je najväčším multienzymovým komplexom mitochondriovej respirácie a jeho význam nie je uniformný. Najdôležitejším negatívnym účinkom s dopadom na funkčnosť celej bunky je priama tvorba reaktívnych foriem kyslíka, ktoré sú pravdepodobne hlavnou príčinou poklesu jeho aktivity. Pozitívna korelácia aktivity komplexu I so znížením obsahu -SH skupín poukazuje na vyššiu senzitivitu dospelých a starých jedincov voči oxidačnému stresu oproti senescentným. Pochopenie mechanizmov produkcie reaktívnych foriem kyslíka a regulácie komplexu I v rôznych častiach mozgu je kľúčové pre objasnenie jeho patofyziologickej úlohy pri vekovo-závislých neurodegeneratívnych ochoreniach.

Podakovanie

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0028/11, VEGA 1/0213/12 a projektom "Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení", ITMS 26220220114, spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Lam, Yin, Hamilton, Boveris, Cadenas. Free Rad. Res. **2009**, 43, 431-439.
- [2] Wegrzyn, Potla, Chwae, Sepuri, Zhang, Koeck a kol. Science **2009**, 323, 793–797.
- [3] Jones, Brewer. Exp. Neurol. **2009**, 215, 212–219.
- [4] Navarro, Boveris. Adv. Drug Deliv. Rev. **2008**, 60, 1534–1544.
- [5] Vogel, Dieteren, Van den Heuvel, Willems, Smeitink, Koopman. J. Biol. Chem. **2007**, 282, 7582–90.
- [6] Chen, Yuen, Fu, Huang, Melendez, Ibrahim. Mol. Cell Biol. **2007**, 27, 6420–6432.
- [7] Kalvakolanu, Nallar, Kalakonda. Cytokine **2010**, 52, 128–142.

Poškodenie lipidov počas ischémie-reperfúzie myokardu potkanov

Tatarková, Z., *Kovalská, M., Kuka, S., Lehotský, J., *Adamkov, M., Kaplán, P.

Ústav lekárskej biochémie JLF UK Martin, * Ústav histológie a embryológie JLF UK Martin
tatarkova@jfmed.uniba.sk

Abstract

Ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes involves membrane damage mediated by oxygen free radicals. Reactive oxygen species attack polyunsaturated fatty acids of the membrane and trigger lipid peroxidation, which results in the generation of unsaturated aldehydes, such as 4-hydroxynonenal (HNE). There is compelling evidence that high concentrations of aldehydes are responsible for much of the damage elicited by cardiac ischemia–reperfusion injury. Lipid peroxidation is considered a major mechanism of oxygen free radical toxicity in ischemia-reperfused heart. Therefore we have examined the effects of global 20-min ischemia and ischemia followed by 30-min reperfusion of rat hearts, on level of lipid peroxidation products, conjugated diene and 4-hydroxynonenal. In the present study ischemia resulted in increased lipid peroxidation, production of conjugated diene and HNE, as compared to control hearts in both age groups. HNE is highly reactive so that most of HNE may undergo addition reactions with electron-rich centers particularly non-protein and protein thiols, and amines. Production of lysine conjugates with HNE significantly increased by 36% ($p < 0,001$) after ischemia with recovery during reperfusion phase in adult hearts, but with no changes in 14-months old group. We used antibodies specific for HNE adduct proteins and our results showed that the HNE is during ischemic phase transported from intra- to extracellular space when compared to control and ischemia-reperfusion hearts. Our results suggest that 14-month old hearts have higher adaptability to IR-induced oxidative stress, when compared to 6-months old hearts.

Key words: IR injury, heart, lipid peroxidation

Úvod

Ischémia srdca a ischemicko-reperfúzne (IR) poškodenie prispievajú výraznou mierou k chorobnosti a úmrtnosti na celom svete [1]. Včasná diagnostika skorých markerov ischemickej choroby srdca, infarktu myokardu, ako aj farmakologický vplyv rôznych látok (napr. statínov) boli sledované vo vzťahu k možnej redukcii rozsahu infarktu myokardu a poklesu úmrtnosti po IR poškodení [2,3]. Narušenie homeostázy vápnika a lipidov, nárast reaktívnych foriem kyslíka, pokles vysokoenergetických fosfátov a akumulácia nebezpečných produktov metabolizmu zohrávajú kľúčové úlohy v patogenéze IR poškodenia. V súčasnosti je jasné, že mitochondrie majú významnú úlohu pri sprostredkovaní ochrany ako aj poškodenia počas myokardiálnej ischémie a reperfúzie [4]. Keďže reaktívne formy kyslíka sú produkované v tesnej blízkosti mitochondriovej membrány bohatej na polynenasýtené mastné kyseliny, výsledkom ich pôsobenia je vznik širokého spektra produktov peroxidácie lipidov. Tieto produkty lipoperoxidácie majú relatívne dlhú životnosť oproti reaktívnym formám kyslíka, čo im umožňuje difundovať z miesta vzniku a reagovať s proteínmi, alebo inými biomolekulami v matrix mitochondrie a/alebo medzimembránovom priestore. Najviac študovanými sú vysoko elektrofilné α,β -nenasýtené aldehydy, napr. 4-oxononenal, akroleín, malondialdehyd, 4-hydroxynonenal (HNE). Počas ischémie-

reperfúzie sa reaktívne aldehydy akumulujú [5] a sú schopné reakcií s nukleofilnými skupinami lokalizovanými na biomolekulách (napr. $-NH_2$ a $-SH$ skupiny proteínov) čím môžu vyvolať zmenu ich biologických vlastností, ako je zmena fluidity membrán, aktivity transmembránových transportných systémov. Výsledkom ich pôsobenia je dysfunkcia proteínov a následné poškodenie buniek [6], ktoré závisí na koncentrácii a type produkovaného aldehydu. Hoci v mnohých prácach bolo zdokumentované, že peroxidácia lipidov nemá rozhodujúcu úlohu pri modifikácii aminokyselín a inaktivácii proteínov, na druhej strane niektoré štúdie na rôznych membránových systémoch dokázali, že produkty lipoperoxidácie reagujú so zvyškami aminokyselín, ako histidín, cysteín, lyzín, pričom narúšajú funkciu proteínov. Avšak okrem patologických účinkov spojených s oxidačným stresom, HNE významnou mierou prispieva k vytváraniu antioxidačnej ochrany buniek. Zhang a kol. [7] zistili, že v kardiomyocytoch počas IR poškodenia a pri subletálnej koncentrácii $5 \mu\text{mol/l}$ HNE je stimulovaná biosyntéza redukovaného glutatiónu, GSH. Aktivátorom je kľúčový transkripčný faktor 4-hydroxynonenal, Nrf2 (NF E2-related factor), ktorý za stresových podmienok aktivuje HNE-sprostredkovanú antioxidačnú ochranu, ale za normálnych podmienok podlieha degradácii. Zaujímavým je fakt, že nielen samotný HNE, ale aj na HNE-viazané metabolity sú pri subletálnych koncentráciách schopné ochraňovať kardiomyocyty pred poškodením. Preto cieľom naše štúdie bolo sledovať mieru tvorby medzi/produktov peroxidácie lipidov a zistiť do akej miery HNE ovplyvňuje funkčnosť kardiomyocytov počas ischemicko-reperfúzneho poškodenia s vekom.

Materiál a metodika

Pre naše experimenty sme použili srdcia dospelých (6 mes.) a starých (14 mes.) potkanov kmeňa Wistar, $n=5$. Experimentálne zvieratá boli rozdelené do troch skupín. Kontrolnú skupinu (K) srdce sme perfundovali podľa Langendorffa nepretržite 65 minút, ischemickú skupinu (Isch) sme vystavili 20-min globálnej ischémii a ischemicko-reperfúziu (IR) skupinu sme po ischemickej perióde ešte vystavili 30-min reperfúzii.

Po ukončení perfúzie sme srdcia zafixovali:

- 1) v tekutom dusíku a po izolácii v homogenátoch sme sledovali markery peroxidácie lipidov (konjugované diény, 4-hydroxynonenal) s využitím spektrofotometrie a mieru poškodenia bielkovín s využitím Western blottingu a imunodetekcie.
- 2) v 4% paraformaldehyde (imunohistochemická analýza pre 4-hydroxynonenal na kryorezoch tkaniva srdca).

K štatistickému vyhodnocovaniu sme použili počítačový program GraphPad InStat a významnosť rozdielov priemerných hodnôt sme vyhodnocovali pomocou Student-Newman-Keulsovoho testu. Rozdiel medzi hodnotami v skúmaných súboroch sme považovali za štatisticky významný pri hodnotách $p<0,05$.

Výsledky a diskusia

Oxidačný stres je považovaný za významný etiologický faktor v patogenéze ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu. Vzájomná interakcia vznikajúcich reaktívnych foriem kyslíka s bunkovou membránou a s rôznymi kompartmentami bunky má nežiadúce účinky na funkciu a životnosť bunky. Existujú jednoznačné dôkazy, že pri vysokých koncentráciách vyprodukovaných aldehydov, tieto sú zodpovedné za väčšinu vyvolaného poškodenia počas IR poškodenia srdca. Nedostatok kyslíka (fáza ischémie) alebo naopak prudký prísun kyslíka (fáza reperfúzie) ovplyvňuje najmä dvojité väzby polynenasýtených mastných kyselín, ktoré interagujú s radikálmi a spustia reťazovú reakciu tvorby medziproduktov

peroxidácie lipidov, napríklad konjugovaných diénov. Výrazný nárast produkcie konjugovaných diénov sme sledovali po ischemii u oboch vekových skupín (Tab.1), pričom u starých, 14-mes nastal nárast ich tvorby až o 76,8% ($p < 0,05$) oproti kontrolnej skupine.

Skupina	Obsah HNE (nmol/g tkaniva)		Konjug. diény (A_{233nm}/A_{215nm})	
	6-mes	14-mes	6-mes	14-mes
K	10,96 ± 1,04	12,57 ± 1,32	0,203 ± 0,004	0,190 ± 0,008
Isch	19,20 ± 1,26 **	21,82 ± 1,22 ***	0,308 ± 0,024 *	0,336 ± 0,023 ***
IR	16,20 ± 0,69 *	14,45 ± 1,18	0,257 ± 0,015	0,287 ± 0,013 *

Tab.1 Tvorba medziproduktov peroxidácie lipidov, konjugovaných diénov a sekundárneho produktu, 4-hydroxynonenalu (HNE) v tkanive srdca po IR poškodení s vekom.

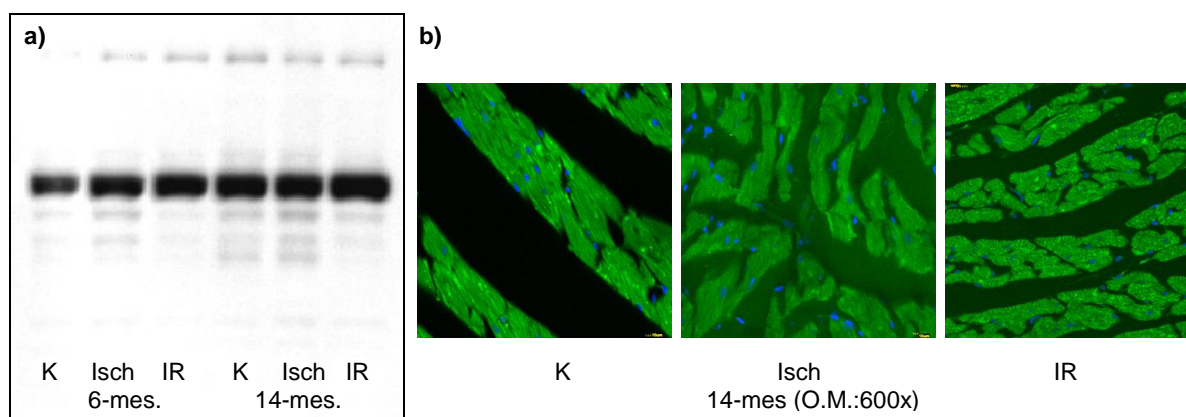
Zatiaľ čo u dospelých, 6-mes jedincov fáza reperfúzie stav zlepšila, u starých jedincov naďalej pretrvával stav s vysokou tvorbou konjugovaných diénov, nárast o 51,1% oproti kontrolnej skupine. Preto nás zaujímalo, čo sa ďalej deje v lipoperoxidačnej kaskáde, kde na konci vznikajú sekundárne neradikálové produkty ako vysokoreaktívny aldehyd, HNE. Hoci sme nezaznamenali vekovo-závislé zmeny v tvorbe HNE, výraznejšie zmeny nastali u starých, 14-mes srdc v oboch stavoch, ischemii aj zlepšení po reperfúzii (Tab.1). Po indukovanej 20-min globálnej ischemii signifikantne narastal obsah HNE z 12,57 na 21,82 nmol/g tkaniva srdca ($p < 0,001$) u 14-mes jedincov, ale reperfúzia výraznou mierou zamedzila tvorbu HNE.

Skupina	Tvorba konjugáty lyzínu s HNE (a.u.)	
	6-mes	14-mes
K	15,13 ± 1,97	15,55 ± 1,76
Isch	20,58 ± 1,08 ***	16,23 ± 0,98
IR	18,36 ± 2,30	15,73 ± 0,62

Tab.2 Tvorba konjugátov lyzínu s produktmi lipoperoxidácie po IR poškodení srdca s vekom.

Z literatúry je známe, že spontánne dochádza ku kombinácii HNE s glutatiónom a lyzínovými zvyškami proteínov a v kardiomyocytoch je príčinou oxidácie tiolov. Preto sme sledovali aj zmeny fluorescencie konjugátov lyzínu s koncovými produktmi peroxidácie lipidov. Hoci u 6-mes skupiny srdc sme sledovali výrazný nárast tvorby konjugátov lyzínu s miernym zlepšením v reperfúzne fáze (Tab.2), v skupine 14-mes srdc nenastali výraznejšie zmeny. So stúpajúcim vekom sa nemenilo množstvo vytvorených konjugátov lyzínu s produktmi peroxidácie lipidov, čo je v súhlase s pozorovaným obsahom reaktívneho HNE, ktorého množstvo sa taktiež nemenilo. 4-hydroxynonenal je schopný modulovať funkciu zvyškov proteínov, preto aby sme zistili do akej miery ovplyvňuje funkčnosť proteínov v bunkách srdca, s využitím špecifickej protilátky proti HNE, sme sledovali jeho schopnosť naviazať sa na proteíny a tým ich potenciálne modifikovať. V porovnaní s nami sledovanými zmenami množstva HNE, schopnosť HNE naviazať sa na bielkoviny bola naopak u 14-mes skupiny vyššia vo všetkých troch (K, Isch, IR) stavoch oproti 6-mes srdciam (Obr.1a). Preto sme v skupine starých, 14-mes jedincov sledovali zmeny aj na úrovni samotného tkaniva. Po aplikácii protilátky na kryorezy sme zistili, že zatiaľ čo v kontrolnej skupine bol HNE naviazaný najmä na vnútrobunkové štruktúry, po

indukcii 20-min ischemie, v dôsledku zvýšenej peroxidácie lipidov, bol nárast HNE aj na vonkajšej strane bunkových membrán (Obr.1b).



Obr.1 a) schopnosť HNE naviazať sa na proteíny kardiomyocytov po IR poškodí s vekom, b) imunohistochemická analýza pre HNE na kryorezoch po IR poškodí srdca.

Preto môžeme predpokladať, že v dôsledku peroxidácie lipidov sa zvýšil prienik HNE z intra- do extracelulárneho priestoru u 14-mes srdc, kde následne môže ovplyvňovať viac a vo vyššej miere proteíny, čo podporuje výsledky detegované western blotovou analýzou.

Záver

Presné mechanizmy ischemicko-reperfúzneho poškodenia stále nie sú úplne známe. Predpokladá sa, že peroxidácia zložiek membránových lipidov je hlavným mechanizmom pôsobenia voľnoradikálovej toxicity, ktorej výsledkom je poškodenie funkčnosti membrán. Naše zistenia prispievajú k objasneniu stavu ischemie a reperfúzie srdca, ktorej závažnosť neustále narastá. Zdá sa, že počas ischemie dochádza k najvýraznejšiemu nárastu hladiny produktov peroxidácie lipidov, ako aj ich príslušných aduktov, pričom adaptabilita 14-mes srdc v porovnaní s dospelými srdcami bola vyššia počas reoxygenčnej reperfúznej fázy. Hoci HNE je vo vysokých koncentráciách vysokotoxický, predmetom súčasných štúdií je jeho potenciálna kardioprotektívna úloha v bunkách.

Podakovanie

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0028/11, VEGA 1/0213/12 a projektom "Centrum excelentnosti pre výskum v personalizovanej terapii (CEVYPET)", ITMS 26220120053, spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Shimokawa, Yasuda. *J. Cardiol.* **2008**, 52, 67–78.
- [2] Kimura, Miura, Iwata, Sugihara, Arimura, Nishikawa, Kawamura, Saku. *J. Cardiol.* **2009**, 53, 65–71.
- [3] Murakami, Toyama, Adachi, Hoshizaki, Oshima, Kurabayashi. *J. Cardiol.* **2008**, 52, 269–275.
- [4] Stowe, Camara. *Antioxid. Redox. Signal.* **2009**, 11, 1373–1414.
- [5] Conklin, Prough, Bhatnagar. *Mol. Biosyst.* **2007**, 3, 136–150.
- [6] Marchitti, Deitrich, Vasiliou. *Pharmacol. Rev.* **2007**, 59, 125–150.
- [7] Zhang, Sano, Shinmura, Tamaki, Katsumata et al. *J. Mol. Cell. Cardiology.* **2010**, 49, 576–586.

Elektronické vydanie: Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine
Ústav histológie a embryológie
Malá Hora 4, 036 01 Martin

Počet strán: 59

Vydané : október 2012