



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



NOVÉ TRENDY A PERSPEKTÍVY V HISTOLÓGII II

Mária Kovalská
Martina Furjelová
Marian Adamkov

Neperiodická publikácia

Editoriál: RNDr. Mária Kovalská, PhD.
Ing. Martina Furjelová, PhD.
prof. MUDr. Marian Adamkov, CSc.

Recenzenti: prof. MVDr. Silvia Rybárová, PhD.
doc. MUDr. Ingrid Hodorová, PhD.
RNDr. Ľudmila Bošelová, CSc.

Za obsahovú ako aj gramatickú úpravu zodpovedajú samotní autori príspevkov.

ISBN 978-80-89544-74-5

EAN 9788089544745

Zostavovatelia publikácie ďakujú RNDr. Veronike Mešťanovej a Ing. Veronike Tupej za technickú spoluprácu.

OBSAH

Adamkov, M.: Vedecká spolupráca v lekárskejších disciplínach.....	1
Furjelová, M.: Expresia a praktický význam anti-apoptotického proteínu survivinu v nádorových léziách mliečnej žľazy.....	2
Kubatka, P.: Histopatologická a imunohistochemická analýza experimentálneho karcinómu mliečnej žľazy po liečbe Chlorelloupyrenoidosa	6
Mahmood, S.: Účinok homocysteínu na neurálne bunky.....	10
Koprda, O.: Asociácia indukovanej hyperhomocysteinémie s neurodegeneratívnymi zmenami v experimentálnom modeli.....	14
Kovalská, M.: Vplyv indukovanej hyperhomocysteinémie na ischemicko-reperfúne poškodenie mozgu potkana: možný experimentálny model rozvoja Alzheimerovej choroby.....	19
Báľentová, S.: Ionizujúcim žiarením indukovaná inhibícia neurogenézy v mozgu za experimentálnych podmienok.....	25
Murín, R.: Glutamát-glutamínový cyklus v nervovom tkanive, alebo ako sa neprietráviť amoniakom pri myslení.....	29
Timková, V.: Aktivácia apoptózy počas ischemie a reperfúzie v myokarde potkanov.....	34
Tatarková, Z.: Úloha tyrozínu pri poškodení kardiomyocytov počas ischemie a reperfúzie srdca.....	38
Mešťanová, V.: Predikcia embryonálneho pôvodu myoidných buniek týmusu na základe imunohistochemickej analýzy.....	42
Miko, M.: Špecifická histologickej metódy prípravy bunkových kultúr mezenchýmových kmeňových buniek na pozorovanie transmisným elektrónovým mikroskopom – naše vlastné skúsenosti.....	46
Dorko, F.: Aktivita AChE a BuChE v lymfopoetických orgánoch.....	55
Macho, P.: Current possibilities of breast reconstruction after mastectomy.....	57

Vedecká spolupráca v lekárskejších disciplínach

V poslednom období badáme zjavný trend v integrácii výskumu v lekárskejších vedách. Klasické hranice medzi jednotlivými vednými odbormi sa postupne, ale zreteľne strácajú. Integráciou sa dosiahne lepšie pochopenie biokomplexity zdravých a patologicky zmenených buniek, tkanív a orgánov. Ľudské telo je zložitý organizmus, ktorý sa vyznačuje precíznou spoluprácou jednotlivých jeho častí. Bunky vytvárajú tkanivá, tkanivá orgány a orgány systémy, pričom systémy sú anatomicky usporiadané do ľudského organizmu. Biologické systémy vykonávajú určité špecifické funkcie. V súčasnosti sú vedci konfrontovaní s enormnou akumuláciou nových poznatkov a nie sú schopní všetky tieto nové informácie objektívne spracovať a využiť. Z toho vyplýva úzka subšpecializácia v jednotlivých medicínskych odboroch a logická spolupráca medzi nimi. Každá vedná disciplína má svoje prirodzené limitácie a potrebuje využiť poznatky a prístupy aj z iných vedných odborov. Ale na druhej strane, vedeckí pracovníci sú v podstate i obeťami svojej úzkej špecializácie. Často môžu hodnotiť biologické javy len zo svojho pohľadu (napr. anatomického či histologického) a môžu pritom prehliadnuť možnosti a potenciál iných príbuzných vedných disciplín. Prítom poznatky z iných odborov by mohli výrazne pomôcť pri riešení ich vlastného vedeckého problému. A prítom netreba zabúdať na fakt, že týmto sa stáva výskum viac efektívnym.

Mnohí vedci sú stále doslova „uväznení“ v ich vlastnom medicínskom odbore, čo je dôsledok úzkej špecializácie a nie sú si niekedy celkom vedomí celkovej biokomplexity buniek, tkanív, orgánov a nakoniec aj celého organizmu.

Ako vhodný príklad si môžeme zobrať morfológický odbor Histológiu. Histológia v podstate stojí kdesi na križovatke medzi anatóniou a fyziológiou a pôsobí ako integrujúci element medzi nimi. Zatiaľ čo z pohľadu pedagogiky sa preferuje výuka funkčnej histológie, tak výskumné aktivity sú zamerané na mikromorfológiu a vzťahy živých substancií v ľudskom tele. Histológia v spolupráci s fyziológiou, biochémiou a biológiou ponúka nové morfológické a funkčné poznatky na úrovni celulárnej, subcelulárnej a intercelulárnej lokalizácii určitých molekúl a substancií. Napr. štúdium apoptózy bolo v nedávnej minulosti postavené len na svetelnej a elektrónovej mikroskopii. Avšak v súčasnosti štúdium apoptózy výrazne ovplyvnili pokroky v biochémií, imunológii, molekulárnej biológii a genetike. Uvedené odbory obohatili výskum programovanej bunkovej smrti ďalšími možnosťami diagnostiky apoptotických buniek, ako sú imunohistochemické metódy, gélová elektroforéza, flow cytometria, fluorescencia, atď. Na tomto mieste je asi zbytočné zdôrazňovať, že metodické postupy slúžia ako spoločný menovateľ vo vedeckej spolupráci.

Bez vzájomnej spolupráce sú v dnešnej dobe vedecké aktivity nepredstaviteľné.

Marian Adamkov

Expresia a praktický význam anti-apoptotického proteínu survivinu v nádorových léziách mliečnej žľazy

Furjelová, M.¹, Kovalská, M.¹, Carbolová, T.², Drahošová, S.³, Benčat, M.³
Adamkov, M.¹

¹Ústav histológie a embryológie JLF UK Martin, ² Ústav histológie a embryológie, LF OU Ostrava,

³Alpha Medical, Patológia, s.r.o., Martin,

martina.furjelova@gmail.com

Abstract

The anti-apoptotic protein survivin is widely expressed in most human cancers, including carcinomas of the breast. On the other hand, it is rarely detected in corresponding normal adult tissues. This protein comes into limelight as promising tumor biomarker. The present study was aimed at detection of above mentioned protein in benign and malignant breast lesions. Immunohistochemically, we evaluated expression of survivin in 43 cases of fibroadenoma and 153 cases of invasive breast carcinoma. In each case, the subcellular localization of antigen, the intensity of staining and the percentage of labeled cells were assessed. The statistical analysis confirmed significant differences in all immunohistochemical characteristics of survivin expression between fibroadenomas and carcinomas. The positive cases showed variable subcellular localization. Weak cytoplasmic positivity dominated in survivin positive fibroadenoma cells. Nuclear and combined (nuclear and cytoplasmic) immunopositivity dominated in survivin positive carcinoma cells. Our results suggest that survivin may be valuable diagnostic and differential-diagnostic biomarker.

Úvod

Survivin patrí do rodiny anti-apoptotických proteínov IAP (z angl. inhibitor of apoptosis proteins). Doteraz je známych 8 jej členov, ktoré sa líšia vo svojej štruktúre. Pôsobia ako negatívne regulátory apoptózy, tým že inhibujú aktiváciu kaspáz [1-2]. Schopnosť týchto proteínov inhibovať apoptózu je daná prítomnosťou jednej alebo viacerých BIR (angl. baculovirus inhibitor of apoptosis repeat) domén. Práve BIR domény sú najcharakteristickejšou funkčnou jednotkou IAP proteínov. Prvé IAP proteíny boli popísané v bakulovíruchoch, z čoho je dovedený aj názov domény. Medzi IAP proteínmi má survivin unikátne postavenie. Je to multifunkčný proteín s molekulovou hmotnosťou 16,5 kDa. Gén kódujúci survivin (gén BIRC5) je lokalizovaný na dlhom ramienku chromozómu 17. Survivin obsahuje vo svojej štruktúre iba jednu BIR doménu, ktorá je rozhodujúca pre jeho anti-apoptotickú funkciu a α -helikálnu doménu, ktorá umožňuje survivinu regulovať mitotické delenie [3].

Materiál a metodika

Imunohistochemicky sme vyšetrili parafrínový materiál. Z každej vzorky boli pripravené tri 4 μ m hrubé rezy na imunohistochemické reakcie na dôkaz survivinu s použitím peroxidázovej techniky. Reakcia bola vizualizovaná DAB chromogénom (DAKO). Jadrá boli dofarbené hematoxylínom (DAKO). Negatívne kontroly sme realizovali bez použitia primárnej protilátky. Pri interpretácii získaných imunohistochemických vyšetrení sme semikvantitatívne (MF, MA) hodnotili subcelulárnu lokalizáciu imunohistochemickej reakcie (jadrová - N, cytoplazmatická - C a kombinovaná lokalizácia v jadre a v cytoplazme bunky - NC). Ďalej sme analyzovali intenzitu reakcie (slabá, stredná, silná) a percento pozitívnych buniek (<10%, 11-50%, >50%).

Výsledky

Benígne lézie

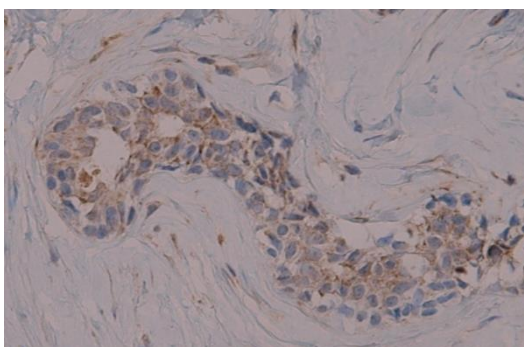
Skúmaný súbor tvorilo 43 prípadov. V 17/43 prípadoch (39,5%) nebola zistená žiadna imunoreakcia na dôkaz survivinu. V 24/43 (55,8%) prípadoch bola detegovaná výlučne cytoplazmatická pozitivita (obr. 1) a v 2/43 prípadoch (4,7%) kombinovaná (jadrová a cytoplazmatická) lokalizácia imunoreakcie. Dominujúcou intenzitou imunoreakcie bola slabá intenzita, ktorá bola prítomná v 25/43 prípadoch (58,2%). Strednú intenzitu reakcie vykazoval 1/43 prípad (2,3%). Menej ako 50% survivin-pozitívnych buniek bolo prítomných v 15/43 prípadoch (34,9%). Viac než 50% survivin-pozitívnych buniek bolo zistených v 11/43 prípadoch (25,6%) fibroadenómov prsnej žľazy.

Malígne lézie

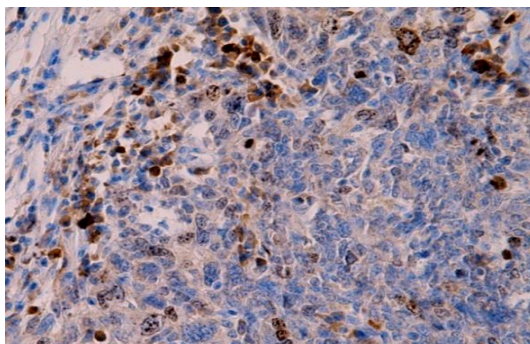
Survivin bol exprimovaný v 107/153 (69,9%) prípadoch karcinómov prsnej žľazy. V skúmanom súbore boli identifikované tri druhy imunohistochemickej positivity. Jadrová pozitivita (obr. 2) bola prítomná v 35/153 prípadoch (22,9%). Cytoplazmatická pozitivita bola pozorovaná v 13/153 (8,4%) prípadoch. Kombinovaná jadrová a cytoplazmatická pozitivita (obr. 3) bola detegovaná v 59/153 prípadoch (38,6%). Intenzita imunoreakcie sa menila od slabej až po silnú. Slabá intenzita imunoreakcie bola zaznamenaná v 51/153 prípadoch (33,3%). Stredná až silná pozitivita bola hodnotená v 56/153 prípadoch (36,6%). Menej ako 50% survivin-pozitívnych buniek bolo detegovaných v 58/153 prípadoch (37,8%). Viac ako 50% survivin-pozitívnych buniek bolo zaznamenaných v 49/153 prípadoch (32,1%) karcinómov.

Štatistická analýza

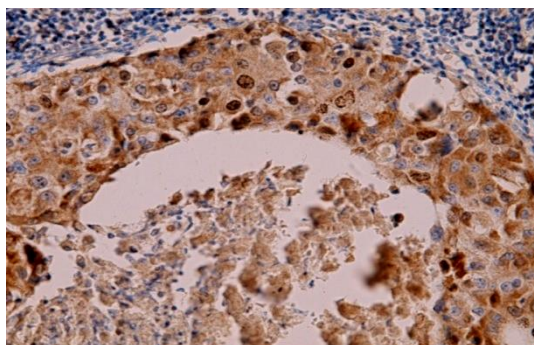
Chi-kvadrát testom bol potvrdený signifikantný rozdiel v subcelulárnej lokalizácii survivinu, v intenzite imunoreakcie a v percente pozitívnych buniek medzi léziami fibroadenómov a karcinómov prsnej žľazy ($p < 0,05$) (tab. 1).



Obr. 1 Slabá cytoplazmatická pozitivita imunoreakcie na dôkaz survivinu



Obr. 2 Silná jadrová pozitivita imunoreakcie na dôkaz survivinu



Obr. 3 Silná kombinovaná jadrová a cytoplazmatická pozitívita imunoreakcie na dôkaz survivinu

Tab. 1 Porovnanie expresie survivinu v benígnych a malígnych léziách prsnej žľazy

Expresia survivinu	A	Subcelulárna lokalizácia reakcie			Intenzita imunoreakcie			Percento survivin-pozitívnych buniek		
		C	N	NC	+	++	+++	<10 %	11-50 %	>50 %
Fibroadenómy (n= 43)	17 (39,5%)	24 (55,8%)	0 (0%)	2 (4,7%)	25 (58,2%)	1 (2,3%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (34,9%)	11 (25,6%)
Karcinómy (n= 153)	46 (30,1%)	13 (8,4%)	35 (22,9%)	59 (38,6%)	51 (33,3%)	50 (32,7%)	6 (3,9%)	32 (20,9%)	26 (16,9%)	49 (32,1%)
Hodnota p		3,66E-14			7,89E-04			1,42E-03		

Diskusia

Fibroadenómy prsnej žľazy variabilne exprimovali vyšetrovaný proteín. Celkovo v nich bola zistená najmä cytoplazmatická expresia survivinu. Dominovala slabá intenzita imunoreakcie. Ani jeden prípad neexprimoval izolovanú jadrovú pozitivitu. Kombinovanú lokalizáciu sme zistili v 2 prípadoch. Tieto naše výsledky sú v zhode s údajmi publikovanými v iných štúdiách [4-5]. Ranade a kol. [6] zistili aj výlučne jadrovú pozitivitu imunoreakcie v jednom prípade fibroadenómu.

V súbore 153 karcinómov medzi pozitívnymi prípadmi dominovala jadrová a kombinovaná (jadrová a cytoplazmatická) pozitivita imunoreakcie. Intenzita imunoreakcie sa menila od slabej až po silnú. Nassar a kol. [7] popisujú iba jadrovú pozitivitu v karcinómoch prsnej žľazy. V štúdii Kennedyho a kol. [8] vykazovalo jadrovú pozitivitu 31% prípadov, cytoplazmatickú 13% prípadov a kombinovanú pozitivitu 16% prípadov. V práci Al-Joudiho a kol. [9] exprimovalo survivin v jadre 16,5% prípadov, v cytoplazme 24,1% prípadov a v jadre i v cytoplazme súčasne 27,5% prípadov. Adamkov a kol. [5] uvádzajú, že 15% prípadov exprimovalo sledovaný proteín v cytoplazme, 12,5% v jadre a 56,3% v jadre aj v cytoplazme.

Záver

Prvým krokom v racionálnom postupe v boji proti nádorovému ochoreniu je jeho precízna diagnostika. Imunohistochemické metódy dnes nesporne predstavuje dôležitý diagnostický nástroj pri karcinóme prsnej žľazy v dennej rutinej praxi. Karcinóm nami sledovaného orgánu predstavuje značne heterogénne ochorenie. Veľkú perspektívu pri jeho presnej diagnostike má využitie multiparametrických vyšetrení. Komplexné zhodnotenie všetkých klinických, morfológických a imunohistochemických parametrov poskytuje presnejšiu informáciu o nádorovom ochorení konkrétneho pacienta a zároveň predstavuje sofistikované riešenie prognostifikácie a individualizácie liečby. Na základe našich výsledkov predpokladáme, že anti-apoptotický survivin by mohol slúžiť ako relevantný

diagnostický a diferenciálno-diagnostický parameter pri tak závažnom nádorovom ochorení, akým karcinóm prsníka rozhodne je. Zároveň by sme chceli zdôrazniť potrebu overiť tieto závery rozsiahlejšími štúdiami s veľkým počtom analyzovaných prípadov.

Práca bola financovaná z grantu VEGA 1/0050/11 a grantu UK/93/2013.

Literatúra

- [1] Hunter, *Apoptosis*. **2007**, 12/9, 1543-1568.
- [2] Adamkov, **2010**, 87-88, ISBN 978-80-968399-7-1.
- [3] Pešl, *Ces Urol*. **2010**, 14/2, 99-103.
- [4] Singh, *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. **2004**, 12/4, 296-304.
- [5] Adamkov, *Neoplasma*. **2010**, 57/6, 572-577.
- [6] Ranade, *Indian J Med Sci*. **2009**, 63/11, 481-490.
- [7] Nassar, *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. **2008**, 16/2, 113-120.
- [8] Kennedy, *Br J Cancer*. **2003**, 88/7, 1077-1083.
- [9] Al-Joudi, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. **2007**, 38/5, 904-910.

Histopatologická a imunohistochemická analýza experimentálneho karcinómu mliečnej žľazy po liečbe *Chlorelloupyrenoidosa*

Kubatka, P.¹, Výbohová, D.², Kajo, K.³, Kapinová, A.⁴, Péč, M.¹, Adamkov, M.⁵

¹Ústav lekárskej biológie JLF UK v Martine, ²Ústav anatómie JLF UK v Martine, ³Ústav patológie SZU a Onkologický ústav Sv. Alžbety v Bratislave, ⁴Ústav lekárskej biochémie JLF UK v Martine, ⁵Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine
kubatka@ifmed.uniba.sk

Abstract

The results from preclinical and clinical research have indicated the anti-tumor effects of isolated phytochemicals and plant-derived functional foods in diverse tumors including breast cancer. It is supposed that carotenoids present in *Chlorella pyrenoidosa* may have antineoplastic potential in breast tissue. In this experiment, the tumor-suppressive effects of *Chlorella pyrenoidosa* in the model of N-methyl-N-nitrosourea induced mammary carcinogenesis in female rats were evaluated. *Chlorella* powder was dietary administered at two concentrations of 0.3 % and 3 %. The experiment was terminated 14 weeks after carcinogen administration. At autopsy, mammary tumors were removed and prepared for histopathological and immunohistochemical analysis. *Chlorella* at higher concentration significantly suppressed tumor frequency by 61 % and significantly lengthened tumor latency by 12.5 days in comparison with the controls. In the groups with administered *chlorella* compared to the control group, an apparent decrease in the number of high grade carcinomas was observed. Immunohistochemical analysis of rat tumour cells showed caspase-7 expression increase by 73.5 % ($P < 0.001$) and VEGFR-2 expression decrease by 19 % ($P = 0.07$) after *chlorella* treatment. The pro-apoptotic effect of *chlorella* in this study was also indicated by the increase in Bax/bcl-2 expression ratio in treated tumour cells.

Our results pointed to significant tumour-suppressive effects of *Chlorella pyrenoidosa* in rat mammary carcinogenesis. Histopathological analysis of tumours pointed to a better prognosis of carcinomas after *chlorella* treatment. The results obtained suggested pro-apoptotic and anti-angiogenic effects of *chlorella* in rat mammary tumour cells.

Keywords: breast cancer, rat, *chlorellapyrenoidosa*, histopathological analysis, apoptosis, angiogenesis, proliferation

Úvod

Jedným z možných prístupov znižovania výskytu nádorových ochorení je chemoprevencia. Chemoprevencia, kde patrí aj použitie prírodných látok na zníženie rizika vzniku ochorenia, sa v súčasnosti stáva oblasťou intenzívneho výskumu. Väčšina týchto prírodných látok je rastlinného pôvodu, preto sa označujú ako fytochemikálie. Intenzívne študovanou skupinou fytochemikálií sú karotenoidy. Ide o prírodné pigmenty, ktoré sú zaujímavé z pohľadu antioxidačného potenciálu. Protinádorový účinok karotenoidov dokumentuje niekoľko epidemiologických štúdií. Vo veľkej americkej štúdií, príjem alfa-/beta-karoténu a luteín/zeaxantínu v potrave boli spojené s poklesom ER-negatívnej rakoviny prsníka [1]. V ďalšej štúdií, vyšší prísun lykopénu, beta-karoténu a beta-kryptoxantínu v potrave znížil riziko rakoviny prsníka u čínskych žien [2]. Zvýšený prísun karotenoidov v potrave znižoval riziko aj ďalších nádorových ochorení [3]. *Chlorellapyrenoidosa* - sladkovodná riasa je zaujímavá

obsahom rôznych druhov karotenoidov [4]. Výsledky japonských autorov potvrdili chemopreventívne účinky Chlorelly p. voči chemicky indukovanej hepatokarcinogéze u potkanov [5]. Pozitívne účinky Chlorelly p. z pohľadu liečby a prevencie nádorových ochorení boli zaznamenané aj v ďalších experimentálnych prácach [6-7] i v klinickej štúdii [8]. Na základe uvedených výsledkov sme sa rozhodli hodnotiť možnosti prevencie a liečby rakoviny mliečnej žľazy u potkanov pomocou komerčne dostupného fytofarmaka - Chlorellypyrenoidosa. Okrem základných parametrov mamárnokarcinogézy sme v experimente sledovali aj vplyv chlorelly na prognózu karcinómov a tiež na vybrané parametre apoptózy, angiogenézy a proliferácie v nádorových bunkách.

Materiál a metodika

V experimente sme použili panenské samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley z chovnej stanice CharlesRiverGermany vo veku 32-36 dní. Zvieratá boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca. Mamárnokarcinogézu sme vyvolali intraperitoneálnou aplikáciou NMU (Sigma, Deisenhofen, Nemecko) medzi 40. - 46. postnatálnym dňom v dávke 50 mg/kg hmotnosti zvieraťa. Tento experimentálny model imitoval situáciu u zdravých ale vysoko rizikových žien. Týždeň pred aplikáciou karcinogénu sme začali s chemoprevenciou, ktorá trvala 15 týždňov až do ukončenia experimentu. Fytofarmakum bolo aplikované v potrave (SSNIFF Spezialdiäten GmbH Soest, Nemecko). Zvieratá v každom experimente v počte 75 kusov boli rozdelené do 3 skupín: 1. kontrolná skupina bez fytofarmaka, 2. skupina s fytofarmakom v nižšej koncentrácii (3 g/kg), 3. skupina s fytofarmakom vo vyššej koncentrácii (30 g/kg). Zvieratá boli raz do týždňa palpované a vážené.

Na konci experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. V krvnom sére sme sledovali zmeny lipidového metabolizmu (AlphaMedical). Časť vzoriek tkaniva mamárnych nádorov boli zafixované v 10%-nom roztoku pufovaného formalínu a následne technikou parafínových rezov pripravené na histologické a imunohistochemické vyšetrenie. Nádory boli klasifikované podľa kritérií pre klasifikáciu mamárnych nádorov u potkanov [9]. Parafínové bločky nádorového tkaniva mliečnej žľazy boli využité k imunohistochemickému stanoveniu parametrov apoptózy, angiogenézy a proliferácie. K vyšetreniu rezov sme využili komerčne dostupné protilátky (Abcam, SantaCruz, Dako). Histopatologická a imunohistochemická analýza tkaniva umožní zhodnotiť riziká dlhodobej aplikácie nových látok u žien. Poskytne tiež informáciu o stupni diferenciácie, prognóze mamárneho nádoru a účinnosti liečby. V štatistickom hodnotení bol použitý Mann-Whitneyho test, ANOVA a Kruskal-Wallisov test.

Výsledky a diskusia

Chlorella v tejto štúdii dávkovo závislým spôsobom potlačila mamárnokarcinogézu u samíc potkanov. V skupine s vyššou dávkou chlorelly bol zistený 61 % pokles frekvencie nádorov ($P=0.019$) a predĺženie latencie nádorov o 12.5 dní ($P=0.016$) voči kontrolám. Najčastejšie vyskytujúce sa lézie vo všetkých experimentálnych skupinách boli zmiešané papilárne/kribriformné a samotné kribriformné karcinómy. V oboch liečených skupinách sme zistili zreteľný pokles pomeru high/lowgrade karcinómov voči kontrole [kontrolná skupina: 27/36 (HG/LG); chlorella nižšia dávka: 14/33 ($P=0.16$ vs kontrola); chlorella vyššia dávka: 10/18 ($P=0.52$ vs kontrola)]. Predpokladali sme, že za výrazným protinádorovým účinkom chlorelly v tejto štúdii stojí pro-apoptotický, antiangiogenetický a antiproliferatívny efekt. Preto sme realizovali rozsiahlu imunohistochemickú analýzu buniek karcinómov. Morfometrická analýza buniek

karcinómov mliečnej žľazy u potkanov poukázala na signifikantný nárast expresie exekučnej kaspázy-7 o 73.5 % ($P=0.0001$) v skupine s vyššou dávkou chlorelly (Obr. 1, Tab. 1). U expresie VEGFR-2 sme pozorovali mierny pokles o 19 % ($P=0.07$) vplyvom liečby. Porovnanie kontrolných buniek s liečenými ukázalo na tendenciu nárastu expresie pro-apoptotického proteínu Bax o 16.5 % ($P=0.17$) a na pokles expresie anti-apoptotického proteínu bcl-2 o 17.5 % ($P=0.34$) (Tab. 1). Zmeny v expresii ďalšej exekučnej kaspázy-3, parametra proliferácie Ki67 a VEGF neboli pozorované. Chlorella vo vyšších dávkach znížila hladiny LDL- a VLDL-cholesterolu a triacylglycerolov.

Podstata výrazného účinku chlorelly na organizmus spočíva vo vysokom obsahu desiatok rôznych fytochemikálií (zvlášť karotenoidov, napr. all-trans-lutein) pôsobiacich aditívne alebo synergicky. Je chybou ísť cestou konzumácie izolovaných jednotlivých fytochemikálií – efekt na organizmus býva celkovo slabší [10]. Napriek skutočnosti, že epidemiologické štúdie nepriniesli dostatočné dôkazy o tumor-supresívnych účinkoch rôznych fytochemikálií/fytofarmák, prísne definované *in vivo* experimenty môžu predstavovať cestu ako dokázať ich antineoplastické účinky v organizme [1].

Záver

Chlorellapyrenoidosa prejavila signifikantný protinádorový účinok v modeli mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov. Chlorella mala zreteľný proapoptotický a mierny antiangiogenetický efekt v nádoroch. Chlorella sa preukázala ako vysoko bezpečné fytofarmakum u laboratórnych zvierat, pričom histopatologická analýza zistila zlepšenie prognózy liečených karcinómov. Aj na základe klinických štúdií sa tento produkt javí ako vhodný pre pravidelné užívanie v prevencii najzávažnejších civilizačných ochorení akými sú rakovina a kardiovaskulárne ochorenia.

Experiment bol schválený Etickou komisiou JLF UK (No. EK1125/2012) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. Ro-1759/11-221). Projekt bol podporený grantom VEGA 1/0071/13.

Literatúra

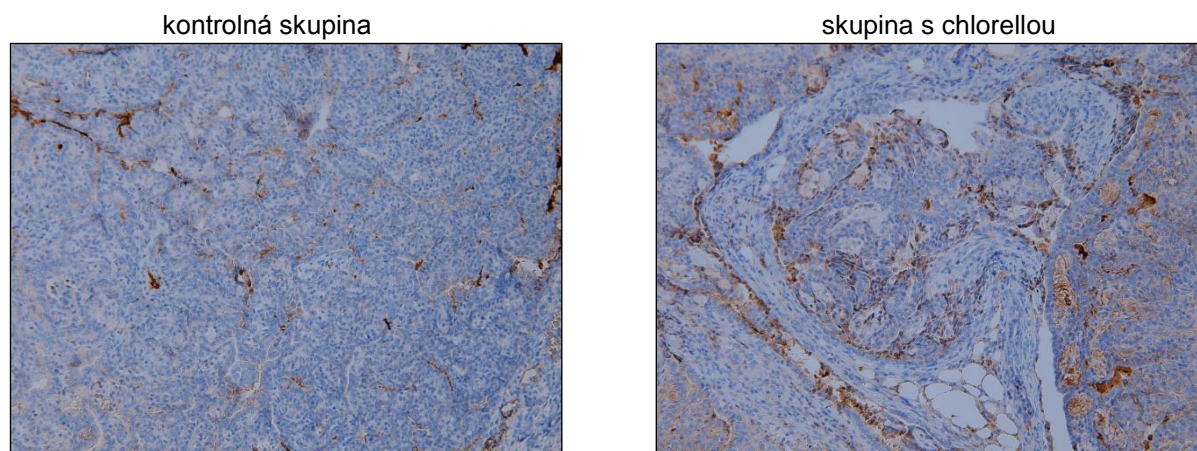
- [1] Zhanget, *Am J Clin Nutr.* **2012**, 95, 713-725.
- [2] Huanget, *Asia Pac J Clin Nutr.* **2007**, 16, 437-442.
- [3] Schabathet, *J Nutr.* **2004**, 134, 3362-3369.
- [4] Inbarajet, *J Chromatography.* **2006**, 1102, 193-199.
- [5] Takekoshi, *Oncol Rep.* **2005**, 14, 409-414.
- [6] Cha, *J Agric Food Chem.* **2008**, 56, 1521-10526.
- [7] Cheng, *Int J Food Sci Nutr.* **2009**, 60, 89-98.
- [8] Merchant, *Phytother Res.* **1990**, 4, 220-231.
- [9] Russo, *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **2000**, 5, 187-200.
- [10] Kuo, *Free Rad Biol Med.* **2010**, 49, 214-226.

Tab.1 Morfometrická analýza expresie kaspázy-3, kaspázy-7, Ki67, VEGF a VEGFR-2 v bunkách karcinómov mliečnej žľazy po liečbe Chlorellou pyrenoidosa.

Skupina	Percentopozitívnychbuniek	Percentobuniek so slabou resp. strednou/silnouimunoreaktivitou	
		+	++/+++
<i>kaspáza-3</i>			
Kontrolnáskupina	6.66±0.82	6.01±0.77	0.65±0.10
Skupina s chlorellou	6.78±0.80	6.18±0.76	0.60±0.09
<i>kaspáza-7</i>			
Kontrolnáskupina	5.03±0.47	4.45±0.38	0.58±0.14
Skupina s chlorellou	8.73±0.67***	7.03±0.47***	1.70±0.50*
<i>Ki67</i>			
Kontrolnáskupina	16.48±1.62	12.25±1.14	4.24±0.66
Skupina s chlorellou	15.42±1.40	11.92±1.10	3.50±0.41
<i>VEGF</i>			
Kontrolnáskupina	14.51±1.77	13.31±1.65	1.20±0.36
Skupina s chlorellou	14.99±1.05	13.77±1.00	1.22±0.18
<i>VEGFR-2</i>			
Kontrolnáskupina	27.46±2.66	20.34±1.58	7.12±1.36
Skupina s chlorellou	22.29±1.50	16.70±0.94*	5.59±0.70

Data sú vyjadrené ako priemery ± SEM. Skupina s chlorellou je skupina so signifikantnými protinádorovými účinkami (dávka 30 g/kg diéty). Intenzita imunoreaktivity: slabá (+), stredná (++), silná (+++). Signifikantný rozdiel, * P<0.05 vs kontrolná skupina, *** P<0.001 vs kontrolná skupina.

Obr. 1 Imunohistochemická detekcia kaspázy-7 v nádorových bunkách mliečnej žľazy po liečbe chlorellou pyrenoidosa.



Detekcia expresie kaspázy-7 poukázala na signifikantný nárast (v priemere o 73,5%) v nádorových bunkách liečených chlorellou vo vyššej dávke. K detekcii sme použili polyklonálnu protilátku voči kaspáze-7 (K-20) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA); zväčšenie: x200.

Účinok homocysteínu na neurálne bunky

Mahmood, S.¹, Murín, R.¹, Škovierová, H.¹

¹Ústav lekárskej biochémie, JLF UK Martin

mahmood@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Homocysteine (Hcy) is a sulfur-containing amino acid involved in S-adenosylmethionine cycle that plays a main role in the metabolism of methyl groups. Hyperhomocysteinemia is a medical condition characterized by elevated level of homocysteine in plasma. Hyperhomocysteinemia is considered to be capable to initiate the death of neural cells during neurodegeneration disorders including Alzheimer's and Parkinson's diseases. Homocysteine may exert its effect on molecular, cellular and tissue level. The exact mechanism, by which homocysteine affects brain cells, has to be elucidated. Here, we review recent knowledges on this topic with a special emphasis on glial cells that play an active role in the etiopathogenesis of several neurodegenerative diseases.

Key words: homocysteine, glial cells, neurotoxicity, neurodegenerative disorders

Homocysteín je nebielkovinová aminokyselina, ktorá je medziproduktom S-adenozylmetionínového cyklu s neuro- i vaskulotoxickým účinkom. V S-adenozylmetionínovom cykle je metionín enzymaticky konvertovaný na S-adenozylmetionín, ktorý je nepostrádateľným substrátom početných metylačných reakcií. S-adenozylmetionín, ako donor metylovej skupiny, je esenciálny pre metabolizmus nukleových kyselín, bielkovín, neurotransmiterov, hormónov, mastných kyselín, polysacharidov a fosfolipidov [1]. Zároveň nukleotidy v štruktúre DNA ako aj históny, ktoré sú metylované prostredníctvom S-adenozylmetionínu, predstavujú dôležitý epigenetický mechanizmus regulácie exprese génov. S-adenozylhomocysteín, ktorý vzniká z S-adenozylmetionínu po prenose metylovej skupiny, je následne hydrolyzovaný na homocysteín. Hcy sa potom metabolizuje prostredníctvom jednej z dvoch metabolických dráh: (i) spätnej remetylačnej, ktorou sa regeneruje na metionín; alebo (ii) prenosom tiolovej skupiny za vzniku cysteínu a 2-oxobutyrátu (obr.1) [2-3]. Nedostatočná kapacita metabolizovať Hcy pomocou uvedených metabolických dráh vedie v konečnom dôsledku k nárastu množstva homocysteínu v organizme. Hladina plazmatického Hcy pritom koreluje s hladinou S-adenozylhomocysteínu v cerebrospinálnej tekutine a mozgu zvierat [4]. Zvýšenie koncentrácie plazmatického Hcy nad fyziologickú hodnotu, ktorá je v rozpätí 5 – 15 µM [5], sa označuje ako hyperhomocysteinémia. Na základe koncentrácie Hcy sa hyperhomocysteinémia ďalej klasifikuje ako mierna (15-30 µM), stredná (30-100 µM) a ťažká nad 100 µM [6]. Všeobecne je v populácii 5-10% výskyt hyperhomocysteinémie, pričom priamoúmerne narastá s vekom [7] a častejšie sa prejavuje u mužov ako u žien. Už mierna hyperhomocysteinémia je pritom považovaná za rizikový faktor kognitívnej dysfunkcie u niektorých neurodegeneratívnych ochorení, ako sú napríklad: Alzheimerova choroba [8], Parkinsonova choroba [9], demencia [10] a atrofia mozgu [11].

Existuje niekoľko hypotéz vysvetľujúcich pôsobenie Hcy na molekulovej a bunkovej úrovni. Na molekulovej úrovni, je Hcy považovaný za „feed-back“ inhibítor enzýmov podieľajúcich sa na syntéze a metabolizme S-adenozylmetionínu (obr.1), a z tohto dôvodu je potenciálnym inhibítorom metylačných reakcií. Okrem toho sa predpokladá, že Hcy spolupôsobí pri nešpecifických nitrozylačných a acylačných modifikáciách proteínov, ale tiež ako iniciátor zvýšenej tvorby voľných radikálov, čo môže viesť k oxidačnému stresu [12]. Na bunkovej úrovni, Hcy cytotoxicky pôsobí predovšetkým na bunky cievneho endotelu, obmedzuje biologickú dostupnosť oxidu dusnatého a zvyšuje oxidačný stres, čo môže iniciovať mechanizmy vedúce k tvorbe aterómov [13].

Akým spôsobom Hcy zvyšuje citlivosť neuronálnych buniek voči excitotoxickému alebo oxidačnému poškodeniu, nie je stále jasné [14-15]. Predpokladá sa, že Hcy nepriamo pôsobí na výmenu látok medzi krvou a mozgovým parenchýmom v dôsledku poškodenia endotelu krvných kapilár [16]. Výsledky experimentov na zvieracích modeloch a neuronálnych bunkových kultúrach poukazujú tiež na priamy cytotoxický efekt Hcy, ktorý má schopnosť iniciovať smrť neuronálnych buniek. Neurotoxický efekt Hcy je pravdepodobne sprostredkovaný excitotoxickou aktiváciou glutamátových receptorov s následným zvýšením vnútrobunkovej koncentrácie vápnika [14]. Ďalším potenciálnym mechanizmom neurotoxického účinku Hcy je pravdepodobne oxidačný stres a ním indukované poškodenie biomolekúl [14, 17-19].

Gliové bunky, okrem neurónov, sú ďalším typom majoritných buniek prítomných v nervovom tkanive. Sú nevyhnutné pre zachovanie fyziologických funkcií nervového tkaniva [20], pričom neuróny a gliové bunky kooperujú na viacerých úrovniach, vrátane energetického metabolizmu. Výsledky experimentov na zvieracích bunkových kultúrach poukázali na možný gliotoxický efekt Hcy. Inkubácia primárnej kultúry potkaních astrocytov ovplyvnených s 2 mM hladinou Hcy viedla k ich bunkovej smrti [21]. Avšak už subletálna dávka homocysteínu (200 μ M) indukovala oxidačný metabolizmus glukózy ako dôsledok nedostatočnej tvorby ATP v mitochondriách [3]. Pozorovaná mitochondriálna dysfunkcia, ktorá je pravdepodobne riadená epigeneticky [22], môže súvisieť so zníženou kapacitou astrocytov aktívne regulovať glutamátergnú neurotransmisiiu.

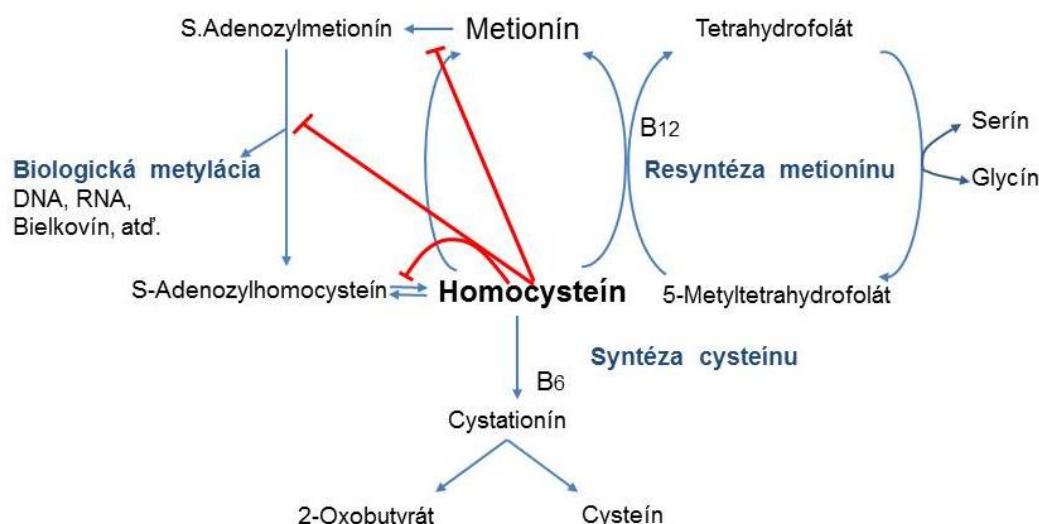
Na rozdiel od spomenutých experimentálnych výsledkov, ktoré boli vykonané na zvieracích modeloch, existuje len minimum štúdií zaoberajúcich sa identifikáciou vplyvu Hcy na ľudské neurálne bunky. Len nedávno, náš kolektív [23] po prvý raz charakterizoval toxické vlastnosti Hcy na ľudské gliové bunky. Naše výsledky ukázali, že DL-Hcy prítomný v inkubačnom médiu už v koncentrácii 50 μ M, čo je ekvivalent 25 μ M biologicky aktívneho L- enantioméru, inicioval smrť ľudských gliových buniek. V porovnaní s často používanými zvieracími bunkami a modelmi, sú ľudské gliové bunky niekoľkonásobne citlivejšie na prítomnosť Hcy. Hcy sa tak ukazuje byť silným gliotoxickým agensom schopným iniciovať smrť gliových buniek. Ako sme už spomenuli, gliové bunky, ktoré tvoria podstatnú bunkovú časť mozgového parenchýmu, sa spolupodieľajú na zabezpečovaní fyziologickej funkcie nervového tkaniva [24], a preto môžeme predpokladať, že ich poškodenie v dôsledku zvýšenej koncentrácie Hcy s veľkou pravdepodobnosťou zohráva významnú úlohu v progresii neurodegenerácie [25-26].

Na záver treba ešte zdôrazniť, že pravdepodobne poškodenie oboch, neurónov aj gliových buniek, môže súvisieť s etiopatogenézou niektorých neurodegeneratívnych ochorení asociovaných s hyperhomocysteinémiou.

Práca bola podporená projektami: VEGA 1/0242/13; „Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení“, kód 26220220153; a projektom „Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení, kód 26220220114, spolufinancovaných zo zdrojov ES a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Chiang, *FASEB Journal* . **1996**, 10, 471-480.
- [2] Vitvitsky, *J.Biol.Chem.* **2006**, 281, 35785-35793.
- [3] Jin , *Neurochemistry Int.* **2008**, 52, 1410-1415.
- [4] McKeever, *Clin. Sci. (Lond.)*. **1995**, 88 /1, 73-79.
- [5] Kang , *Annu Rev Nutr.* **1992**, 12, 279–289.
- [6] Refsum, *Cancer Res.* **1991**, 51, 828-835.
- [7] Selhub, *JAMA.* **1993**, 270, 2693-2698.
- [8] Clarke, *Arch Neurol.* **1998**, 55, 1449-1455.
- [9] Allain, *Neurotoxicology.* **1995**, 16, 527–529.
- [10] Gottfries, *J Neural Transm.* **1998**, 105, 773-786.
- [11] Sachdev, . *Neurology.* **2002**, 58, 1539–1541.
- [12] Perna , *Amino Acids.* **2003**, 25, 409-417.
- [13] Antoniadou, *Eur Heart J.*, **2009**, 30/1,6-15.
- [14] Kruman, *J. Neurosci.* **2000**, 20, 6920-6926.
- [15] Lipton, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1997**, 94, 5923-5928.
- [16] Grieve, *J Neurosci Res.* **1992**, 32:60–68.
- [17] Linnebank, *Neurobiol. Dis.*, **2006**, 23, 725–730.
- [18] Langmeier, *Epilepsia.* **2003**, 44:299-304.
- [19] Mattson, *Antioxid and redox and signal.* **2006**, 8/11-12, 1997-2006.
- [20] Escartin, *J.Neurochem.*,**2006**, 99, 393-401.
- [21] Maler, S. *Neurosci Lett.* **2003**, 347, 85-88.
- [22] Jin, *Neurochem Int.* **2011**, 58, 833–838.
- [23] Škovierová, *Physiol res (in press).* **2015**.
- [24] Allen, *Neuroscience. Nature.* **2009**, 457, 675-677.
- [25] Vila, *Curr Opin Neurol.* **2001**, 41, 483-489.
- [26] Rodriguez, *Cell Death Differ.* **2009**, 16, 378-385.



Obr 1 S-adenozylmethionínový cyklus

Metionín je v prvom kroku aktivovaný na S-adenozylmethionín, ktorý pôsobí ako donor metylovej skupiny pre rôzne biosyntetické reakcie. Po prenose metylovej skupiny je S - adenozylhomocysteín, ktorý vzniká z S-adenozylmethionínu, hydrolyzovaný na homocysteín. Regenerácia metionínu z homocysteínu vyžaduje dva kofaktory; vitamín B₁₂, ktorý je prenášačom metylovej skupiny a tetrahydrofolát, prenášač

jednoulíkových zvyškov. Donorom metylovej skupiny je glycín, ktorý vzniká pri premene aminokyseliny serín. Hcy je považovaný za „feed-back“ inhibítor enzýmov podieľajúcich sa na syntéze a metabolizme S-adenozylmetionínu, a preto je považovaný za potenciálny inhibítor metylačných reakcií (znázornené červenou farbou).

Asociácia indukovanej hyperhomocysteinémie s neurodegeneratívnymi zmenami v experimentálnom modeli

Koprda, O.¹, Lehotský, J.², Adamkov, M.¹, Kovalská, M.¹

¹Ústav histológie a embryológie JLF UK Martin, ²Ustav lekárskej biochémie JLF UK Martin
koprda.tto@gmail.com

Abstract

A high level of circulating plasma homocysteine (Hcy) is an independent risk factor for stroke. Neurodegeneration commonly co-occurs with stroke. Recent studies showed hyperhomocysteinemia (hHcy) to be a strong risk factor for dementia and neurodegenerative disorders. The molecular mechanisms underlying these mechanisms are not fully understood though. Therefore, we investigated the effect of ischemia-reperfusion (IR) injury in combination with hHcy on neurodegeneration in rat brains. We have studied neurodegeneration as well as post-translation changes in MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathways after global IR injury in rat hippocampus in association with hHcy. Global forebrain ischemia was induced by 4-vessels occlusion. In the concrete, 15 min of ischemia followed by a reperfusion period of 72h and 7 days. hHcy was induced by methionin diet (2g/kg) in duration of 28 days. We demonstrated occurrence of degeneration of selectively vulnerable neurons after induced IR as well as after hHcy. Western blot study and imunohistochemical analysis suggested that IR injury and also hHcy down-regulates the p-ERK protein (extracellular signal-regulated kinase), which is associated with survival of neural cells. These findings suggest that IR injury after induced hHcy could have a neurodegenerative role on global brain ischemia in rats.

Keywords: hyperhomocystenemia, atherosclerosis, MAPK, ischemia-reperfusion injury

Úvod

Ložiskové mozgové ischémie sú najčastejšími príčinami náhlych cievnych mozgových príhod v humánnej medicíne. Podstatou vzniku tejto lézie je ložisková hypoperfúzia, teda znížený prítok normálne saturovanej krvi kyslíkom do určitej oblasti mozgu. Najznámejšou lokálnou príčinou sú zmeny cerebrálnych ciev, najmä ich ateroskleróza. Ateroskleróza a jej komplikácie ako infarkt myokardu a cievna mozgová príhoda, sú najčastejšími príčinami smrti vo vyspelých krajinách. Hyperhomocysteinémia (hHcy) sa v súčasnosti považuje za nezávislý rizikový faktor vzniku kardiovaskulárnych ochorení [1]. Epidemiologické štúdie posledných rokov poukazujú na to, že zvýšenie koncentrácie plazmatického Hcy predstavuje aj nezávislý rizikový faktor ischemických mozgových príhod [2]. Asociácia zvýšenej hladiny homocysteínu s konvenčnými rizikovými faktormi aterosklerózy významne zvyšuje kardiovaskulárnu morbiditu a mortalitu. Podľa najnovších štúdií je bezriziková hodnota Hcy do 10 µmol/l. Miernu hyperhomocysteinémiu najčastejšie spôsobuje dedičný defekt aktivity 5,10-metyléntetrahydrofolátreduktázy. Následkom spomalenej remetylácie dochádza k zvýšeniu Hcy v plazme, pričom cievny endotel je vystavený jeho toxickým účinkom. Dochádza k poruche antitrombotickej rovnováhy, zmene oxidačno-redukčnej rovnováhy, transformácii tvorby koagulačných bielkovín a nakoniec k aterosklerotickým zmenám. Významné poškodenie sa doteraz dokázalo na mozgových, periférnych, srdcových a placentárnych cievach [1-3]. Hyperhomocysteinémia je taktiež spájaná s rozvojom neurodegeneratívnych zmien,

s rozvojom Alzheimerovej choroby ako aj Parkinsonovej choroby [3-5]. Dokáže však indukovaná hHcy ovplyvniť priebeh ischemicko-reperfúzneho (IR) poškodenia u laboratórnych zvierat? Mnohé experimentálne štúdie dokazujú, že pri krátkodobej ischemii sú procesy vedúce ku smrti bunky iniciované ischemiou, ale samy osebe prebiehajú počas perfúznej fázy a končia oneskorenou smrťou buniek po 24 – 72 hod. [4]. Ischémia mozgu spôsobuje v prvých štádiách vratné neurochemické a neurofyziologické zmeny, ktoré možno zvrátiť obnovením prietoku krvi. V priebehu dlhšie trvajúcej ischemie poškodenie postupne prechádza z reverzibilného do ireverzibilného štádia.

V našej práci sme sa zamerali na štúdium globálnej mozgovej ischemie a selektívne vulnerabilných neurónov, ktoré sú citlivejšie na ischemiu. Z biochemického hľadiska vyvolávajú ischemicko-reperfúzne (IR) poškodenie zmeny mnohých bunkových ciest a bunkových dejov, ktoré často súvisia, resp. vyúsťujú, až do odumretia týchto neurónov. Doteraz však nie je presne známe ako ERK a p38 proteíny, ktoré sú súčasťou signálnych transdukčných MAPK ciest, môžu viesť k prežívaniu/odumieraniu buniek po ischemii. Vyššie uvedené proteíny zohrávajú dôležitú úlohu v bunkovom raste, proliferácii a diferenciácii/zápale a bunkovej smrti. Jedná sa o serín- a tyrozínkinázy aktivované rastovými faktormi/stresom. Niektoré štúdie potvrdili, že aktivované ERK ako aj p-38 zohrávajú dôležitú úlohu pri IR poškodení rôznych orgánov [6-8]. Na druhej strane, hHcy je jedným z predpokladaných faktorov, ktorý môže priebeh IR poškodenia nepriaznivo ovplyvniť ako aj zmeny vzniknuté IRI potenciovat' [3-5]. Hlbšie poznanie podstaty mechanizmov prebiehajúcich v bunkách pri IR poškodení mozgu v asociácii s hHcy by mohlo v budúcnosti prispieť k zefektívneniu terapie pacientov po ischemickom infarkte.

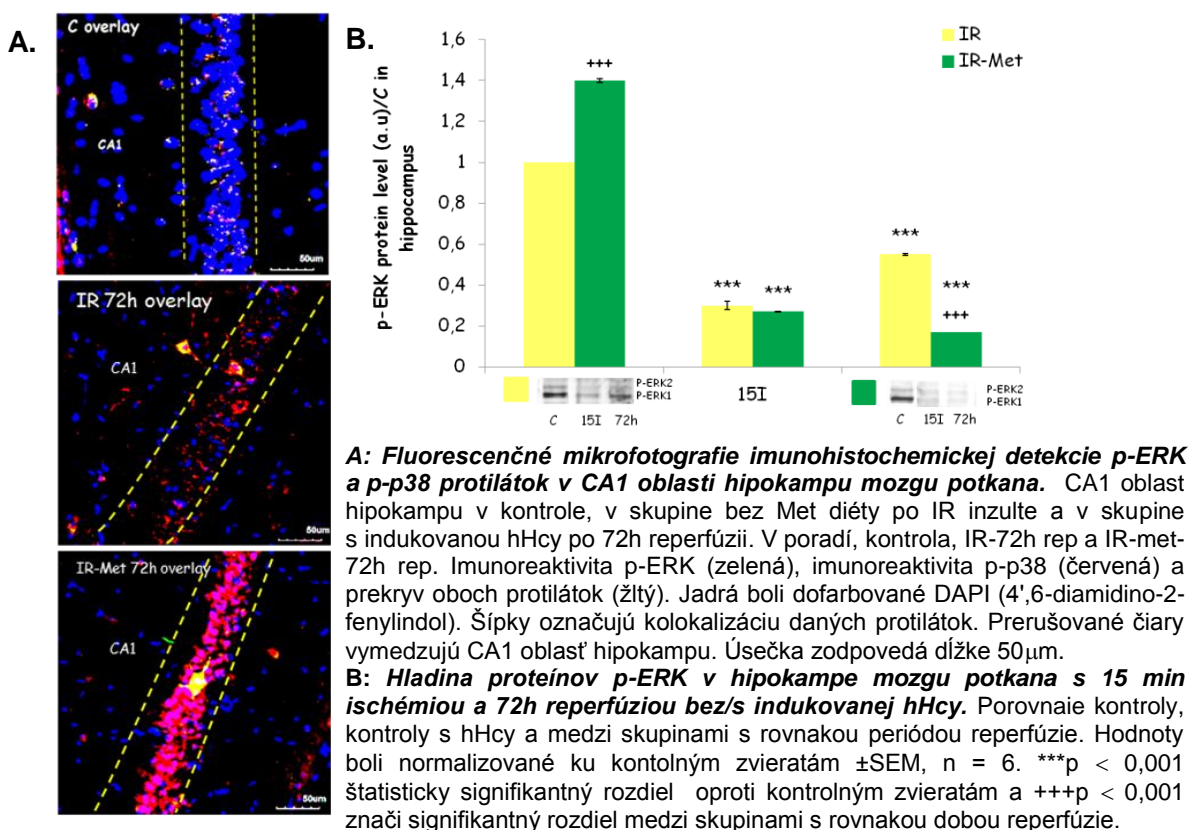
Materiál a metodika

V našich experimentoch sme použili ako biologický materiál samce potkanov kmeňa Wistar vo veku od 6 do 8 mesiacov, chované v štandardných podmienkach vo zverinci. Manipulácia s týmito zvieratami bola schválená Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR s č. rozhodnutia 4373/12-221. Zvieratá boli rozdelené do dvoch skupín. Prvej skupine bola ešte pred experimentom po dobu 28 dní podávaná metionínová diéta (voda obohatená o metionín 2g/kg). Následne bol v oboch skupinách zvierat vyvolaný model globálnej cerebrálnej ischemie počas 15 min [7-8] a následná reperfúzia 72 h a 7 dní. Zvieratá boli usmrtené dekapitáciou v súlade s etickými zásadami práce s laboratórnymi zvieratami. Po usmrtení im bolo odobrané mozgové tkanivo na histologickú analýzu a na prípravu homogenátov na stanovenie bielkovín p-ERK metódou Western blot. Histologickú analýzu sme vykonali na zmrazených rezoch imunofluorescenčnými metódami s použitím primárnych protilátok proti p-ERK a p-p38. Okrem toho sme použili histochemickú metódu TUNEL (in situ značkovanie buniek podliehajúcich bunkovej smrti na základe fragmentácie DNA) na zobrazenie zanikajúcich neurónov. Preparáty sme vyhodnocovali s použitím konfokálneho mikroskopu.

Výsledky

V našej práci sme sa zamerali na štúdium jednej z MAPK dráh v mozgu potkanov, u ktorých bola umelo vyvolaná hHcy. Na fluorescenčných mikrofotografiách (Obr 1: A) je zrejmé, že množstvo p-p38 pozitívnych buniek je početnejšie v preparátoch mozgov zvierat premedikovaných metionínom, zatiaľ čo naopak počet p-ERK značených nervových buniek je najvyššia v kontrolnej skupine zvierat bez aplikácie IR poškodenia či metionínovej diéty.

Obr. 1



Fluorescenčná imunoanalýza korelovala s WB analýzou (Obr. 1: B). Pri prvej skupine zvierat s IR poškodením bez hHcy sme zaznamenali pokles hladiny pERK proteínov s rastúcim intervalom medzi ischemiou a reperfúziou už po samotnej ischemii o 70 % ($p < 0,001$) s miernym nárastom po 72h reperfúzií o 40 % ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolou. V skupine s indukovanou hHcy sme zaznamenali štatisticky signifikantný nárast hladiny o 40 % ($p < 0,001$) so signifikantnejším poklesom hladiny aktivovaného ERK po samotnej ischemii o 75 % ($p < 0,001$) a po 72h reperfúzií o 80 % ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolou bez premedikácie metionínom. Taktiež sme zaznamenali štatisticky signifikantný rozdiel medzi skupinami po 72h reperfúzií s/bez metionínovej diéty, pričom sme zistili pokles hladiny p-ERK proteínu v skupine s metionínovou diétou o 67 % ($p < 0,001$). Naše zistenia naznačujú protektívny efekt aktivácie MAPK/ERK dráhy pri stresom indukovanej apoptóze neurónov, kedy zohráva dôležitú úlohu sila a dĺžka inzultu.

Požitím metodiky TUNEL (deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labeling assay) na detekciu buniek podliehajúcich bunkovej smrti sme zaznamenali nárast počtu TUNEL pozitívnych nervových buniek v CA1 oblasti hipokampu v skupine s indukovanou hHcy po 7 dňovej reperfúzií, pričom sme zistili nárast počtu znečených buniek o 63 násobok ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolou ako aj s kontrolou s indukovanou hHcy. V skupine bez indukovanej hHcy po 7 dňoch bol nárast počtu TUNEL pozitívnych buniek zvýšený o 9 násobok ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolou ako aj s kontrolou s indukovanou hHcy. Štatisticky signifikantný rozdiel sme zaznamenali medzi skupinami po 7 dňovej reperfúzií s/bez metionínovej diéty a to nárast počtu TUNEL pozitívnych nervových buniek v skupine s indukovanou hHcy o 700 % ($p < 0,001$). Zaujímavým zistením bolo pri kontrolnej skupine s indukovanou

hHcy. Detegovali sme zvýšený počet značených buniek glie. Podľa morfologických parametrov išlo pravdepodobne o gliové elementy.

Diskusia

U pacientov s hyperhomocysteinémiou, ktorí prekonali mozgovú príhodu [2-3], či infarkt myokardu [1], sa častejšie vyskytujú ischemické recidívy. Nás zaujímalo, či dokážeme aj u laboratórnych zvierat 28-dňovým podávaním metionínu vo vode vyvolať hHcy a či tá následne dokáže priebeh IR poškodenia v určitom smere ovplyvniť. Zamerali sme sa na zmeny v MAPK ceste po IR inzulte v asociácii s indukovanou hHcy v mozgu potkanov, pretože je známe, že zmeny v intracelulárnych signalizačných dráhach hrajú dôležitú úlohu v mechanizmoch poškodenia/ochrany neurónov po IR inzulte [9]. Naše zistenia naznačujú ochranný efekt aktivácie MAPK/ERK dráhy pri stresom indukovanej apoptóze neurónov, kedy zohráva dôležitú úlohu sila a dĺžka inzultu [2, 6, 10]. Z našich doterajších výsledkov vyplýva, že zvýšená hladina p-ERK proteínov MAPK cesty v cytoplazme pravdepodobne vedie k prežívaniu vulnerabilných neurónov po ischemickom inzulte, čo koreluje so známymi prácami z tejto oblasti [6, 10] ako aj s našimi predchádzajúcimi prácami [3, 7-8]. Na základe výsledkov dosiahnutých pomocou metódy TUNEL sa domnievame, že samotná hHcy zohráva dôležitú úlohu pri rozvoji neurodegenerácie [4-5]. Našou štúdiou sme potvrdili signifikantný vzťah medzi zvýšenou hladinou Hcy a cievnu mozgovou príhodou, čo môže mať význam pri terapii, ktorá môže redukovať riziko alebo opakovanie sa mozgovej príhody. Účinnosť prevencie znižovaním hladiny Hcy v plazme je stále súčasťou intenzívneho medicínskeho výskumu [11]. Výsledky našej práce podporujú výsledky iných prác [12-15], podľa ktorých by sa u pacientov, ktorí prekonali cievnu mozgovú príhodu malo stať stanovenie plazmatickej hladiny Hcy rutinným vyšetrením.

Záver

Podľa našich výsledkov hHcy ovplyvňuje a potenciuje zmeny, ku ktorým v mozgovom tkanive dochádza po IR inzulte. Hyperhomocysteinémia ovplyvňuje posttranslačné zmeny proteínov p-ERK v nervovom tkanive tým, že sa znižuje ich hladiny a počet buniek s ich expresiou. Naše výsledky rozširujú poznatky o mechanizmoch regulácie post-translačných zmien v intracelulárnych MAPK dráhach, ako aj pri hľadaní odpovede na hHcy a s ischémiou asociované zmeny v tkanive neurónov po cievnej mozgovej príhode. V konečnom dôsledku môže aplikácia uvedených výsledkov prispieť k zefektívneniu terapie pacientov po ischemickom poškodení mozgu.

Táto práca bola podporená projektom VEGA 213/2012 a „Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení” spolufinancovaných zo zdrojov ES a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Humphrey, *Mayo Clin. Proc.* **2008**, 83/1, 1203-1212.
- [2] Kénina, *Neurologijos seminarai.* **2009**, 13/41, 139 -142.
- [3] Kovalská, *Slovenský lekár.* **2012**, 22/3-4, 46-51.
- [4] Lehotsky, *Cell Mol Neurobiol.* **2015**, 35/1, 7-15.
- [5] Petras, *J Physiol Pharmacol.* **2014**, 65, 15–23.
- [6] Lee, *Mol. Cells.* **2010**, 29, 373-378.
- [7] Kovalska, *Neurochem. Res.* **2012**, 37, 1568-1577.
- [8] Kovalska, *J Physiol Pharmacol.* **2014**, 65/6, 767-776.
- [9] Lehotsky, *Gen. Physiol. Biophys.* **2009**, 28, 104 -113.
- [10] Veeranna, *Molecular. Brain. Research.* **2000**, 76, 229-236.

- [11] Mudd, *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York : McGraw-Hill, **2001**, 1279-1327.
- [12] Mizrahi, *IMAJ*, **2003**, 5/11, 791-794.
- [13] Narang, *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, **2009**, 53/1, 34 -38.
- [14] Rowan, Published electronically, **2007**, doi:10.1093/ageing/afm006.
- [15] Casas, *Lancet*, **2005**, 365, 224-232.

Vplyv indukovanej hyperhomocysteinémie na ischemicko-reperfúne poškodenie mozgu potkana: možný experimentálny model rozvoja Alzheimerovej choroby.

Kovalská, M.¹, Furjelová, M.¹, Tóthová, B.², Adamkov, M.¹, Lehotský, J.²

¹Ústav histológie a embryológie, JLF UK Martin, ²Ústav lekárskej biochémie, JLF UK Martin
kovalska@jfm.uniba.sk

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disorder that results in dementia and death combined with massive neuronal loss, mainly in the hippocampus and association regions of the neocortex. A high circulating concentration of homocysteine (Hcy) is an independent risk factor for stroke. Alzheimer's disease (AD) commonly co-occurs with stroke. A recent prospective study showed hyperhomocysteinemia to be a strong, independent risk factor for dementia and AD. The molecular mechanisms underlying these mechanisms of are not fully understood. Global forebrain ischemia was induced by 4-vessels occlusion. In the concrete, 15 min of ischemia followed with reperfusion period of 72h and 7 days. hHcy was induced by subcutaneous injection 0,45 $\mu\text{mol/g}$ of Hcy in duration of 14 days. The result showed that IR after induced hHcy may attenuate the neural cell death in the hippocampal CA1 region as well as in forebrain cortex. We demonstrated occurrence of degeneration of selectively vulnerable neurons after induced IR as well as after hHcy. Further western blot study as well as imunohistochemical analysis of MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) suggested that IR and hHcy affect number and level of MAPK/ERK (extracellular signal-regulated kinase) and MAPK/p38 proteins, which are associated with survival/death of neural cells. These findings suggest that IR injury after induced hHcy have a neurodegenerative role on global brain ischemia in rats. Our results also indicate that this model of combined insults could lead to progression of AD-like pathological features.

Key words: hyperhomocysteinemia, Alzheimer's disease, MAPK, stroke

Úvod

Alzheimerova choroba (ACH) je pomaly sa vyvíjajúce degeneratívne ochorenie mozgu [1]. V súčasnej dobe sa radí k najkomplikovanejším formám neurodegenerácie. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie patrí demencia Alzheimeroveho typu medzi prvých 10 hlavných ochorení, ktoré končia smrťou pacienta [2-3]. Alzheimerova choroba vedie k rozpadu nervových vlákien, dochádza k ireverzibilnému poškodeniu nervových buniek, čo vedie k významnému ubúdaniu mozgovej hmoty. Alzheimerova choroba nie je, a to aj napriek intenzívnemu výskumu, v súčasnosti liečiteľná. Je však možné zlepšiť príznaky ochorenia (hormonálna terapia, inhibícia acetylcholinesteráz, podávanie antioxydantov...). Liečba nedokáže zastaviť progresiu ochorenia, dokáže však dočasne spomaliť zhoršovanie príznakov demencie a tak zlepšiť kvalitu života pacientov.[3] Mnohé vedecké práce sa teda uberajú smerom, ktorý upozorňuje na dôležitosť študovania modifikovateľných rizikových faktorov, ktoré môžu rozvoj ACH pozastaviť. Jedným z týchto ovplyvniteľných faktorov môže predstavovať zvýšená hladina homocysteínu (Hcy) v plazme, ktorá je nie vždy úspešne potlačovaná vitamínovou suplementáciou (B₆, B₁₂ a kyselina listová). Výsledky prác z posledných

rokov naznačujú, že hyperhomocysteinémia (hHcy) môže mať priamy efekt na morfológiu mozgu [4-7]. Williams a kol., [6] zistili, že vysoké hladiny Hcy sú asociované s atrofiou hipokampu a temporálneho laloka. Hyperhomocysteinémia tiež ovplyvňuje fosforyláciu hypokampálneho tau-proteínu ([2, 7]. Nedávne experimentálne štúdie preukázali simultánny efekt vysokej hladiny metabolitov Hcy na degradáciu cholinesterázy, ktorá môže podporovať rozvoj ACH [8]. Na základe výsledkov niektorých štúdií existuje predpoklad, že zvyšujúca sa hladina sérového Hcy je predispozíciou vzniku ACH [4-5, 9, 11-12].

Cieľom tejto práce bolo štúdium ireverzibilných degeneratívnych zmien selektívne vulnerabilných oblastí mozgu po aplikácii globálnej mozgovej ischemie v spojitosti s indukovanou hHcy a ich následný vplyv na rozvoj neurodegenerácie s patologickými znakmi ACH. Obzvlášť významné je pochopenie týchto dejov najmä v korelácii s rozvojom demencie v tých sektoroch mozgu, v ktorých sú neuróny viac rezistentné na neurodegeneratívne ochorenia. Objasnenie týchto procesov by mohlo priniesť nové prístupy v humánnej terapii ischemických poškodení vitálnych tkanív a k lepšiemu pochopeniu etiopatogenézy skúmaných patologických stavov.

Materiál a metódy

1. Materiál

Na experiment boli použité homogenáty a tkanivá z mozgu bielych laboratórnych potkanov kmeňa Wistar, manipulácia s ktorými bola schválená Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR s č. rozhodnutia 4373/12-221.

2. Metódy

2.1 Navodenie hyperhomocysteinémie

Potkanom bola počas 14 dní pred ischemiou 2x denne subkutánne aplikovaný DL-Homocysteín (Sigma) v koncentrácii 0,45 $\mu\text{mol/g}$ zieraťa.

2.2 Navodenie ischemie

Po 14 dňovej perióde bola potkanom navodená globálna ischemia metódou Pulsinelliho a Brierleyho [12]. Pri druhej skupine (bez toxikantu) bola vyvolaná 15 minútová globálna ischemia. U oboch týchto skupín boli následne sledované 72h intervaly reperfúzie. Tretiu skupinu reprezentovala kontrolná skupina.

2.3 Homogenizácia tkaniva a stanovenie bielkovín

Tkanivo predného mozgu bolo homogenizované a boli využité na jednotlivé analýzy. Expresia daných proteínov bola analyzovaná metódou Western blot.

2.4 Histologická analýza

Zvieratá boli premyté fyziologickým roztokom a tkanivá boli na 24h ponorené do 4% paraformaldehyd v 0.1 mol/l fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7.4 pri 4 °C. Následne boli tkanivá kvôli kryoprotekcii uložené 24 hodín v 30% sacharóze pri 4°C. Po postfixácii boli mozgové tkanivá narezané na kryocut-e (Thermo Fisher Scientific) na hrúbku 30 μm , rezy boli natiahnuté na silanizované sklá a uskladnené pri -20°C a farbené rôznymi imuno- a histochemickými metódami.

2.5 Vyhodnotenie výsledkov

Výsledky boli vyhodnotené štandardnými metódami bioštatistiky a bioinformatiky.

Výsledky a diskusia

Alzheimerova choroba patrí k najkomplikovanejším formám progresívnej neurodegenerácie. Vzhľadom k tomu, že ešte stále vhodný liek na liečbu ACH absentuje, mnohé štúdie naznačujú, že je dôležité študovať modifikovateľné rizikové faktory, ktoré môžu rozvoj ACH pozastaviť. Jedným z týchto faktorov môže predstavovať hHcy [1-21].

V našej práci sme sa zamerali na štúdium globálnej mozgovej ischémie a selektívne vulnerabilných neurónov, ktoré sú citlivejšie na ischémiu ako aj na neurodegeneratívne zmeny. V našich predchádzajúcich prácach [13-17] sme dokázali negatívnu koreláciu medzi ischemicko - reperfúznym (IR) poškodením a chemicky indukovanou hHcy. Tieto výsledky naznačovali, že v závislosti od sily a dĺžky trvania infarktu, ako aj ich kombinácie, sa rozvoj degenerácie nervového tkaniva bude potenciovat'.

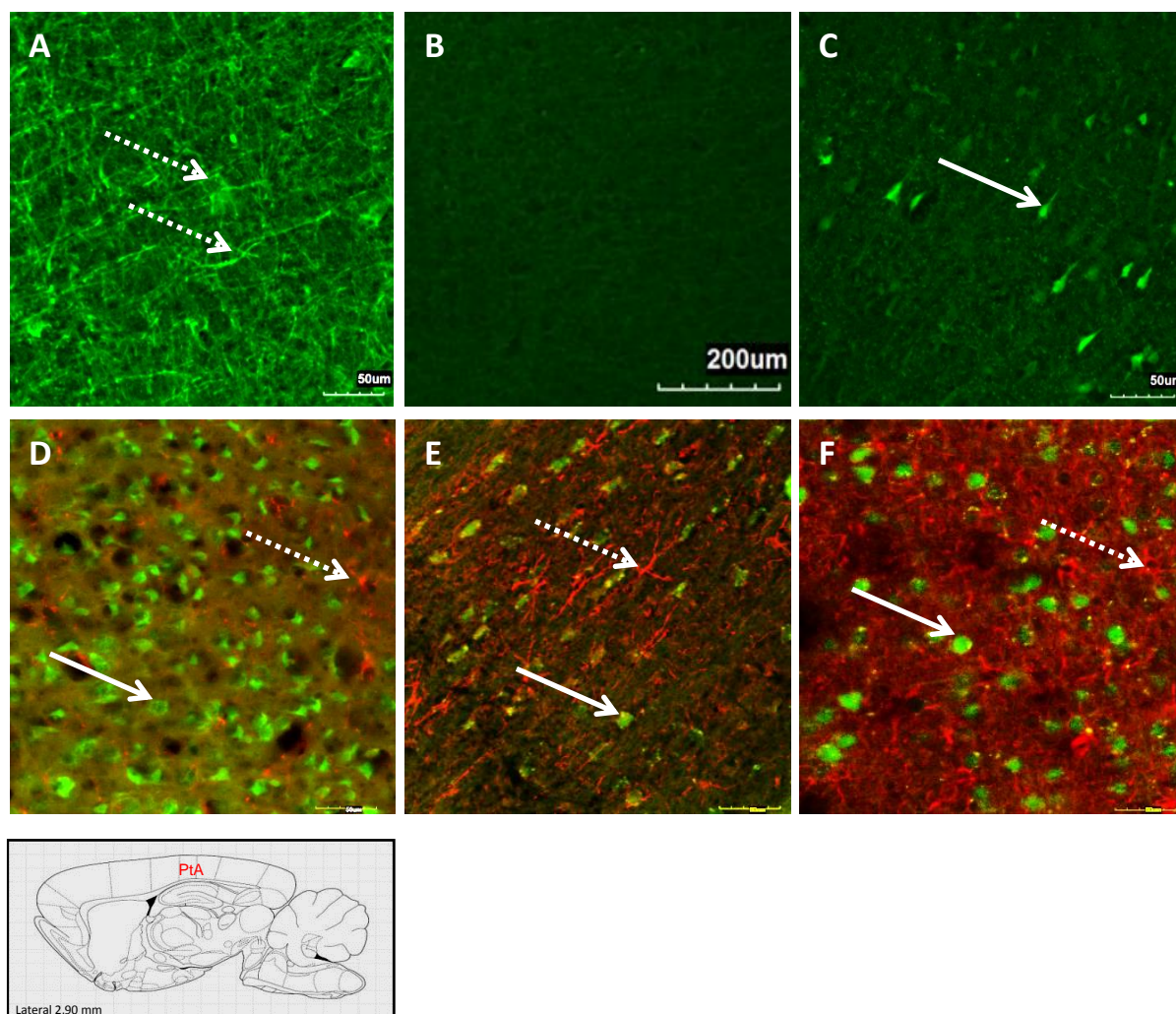
Pomocou metódy Fluoro-Jade C, pomocou ktorej je možné identifikovať desintegrované nervové bunky sme zistili, že 72 hod. reperfúzia vedie k poškodeniu neurónov v CA1 oblasti hipokampu, pričom sme zistili štatisticky významný nárast počtu Fluoro-Jade C značených buniek na 60,2 násobok ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolou. Taktiež sme v tejto skupine pozorovali neuróny so zmenenou morfológiou. V porovnaní s kontrolnou skupinou s indukovanou hHcy sme rovnako zaznamenali nárast počtu značených buniek v IR skupine na 43,8 násobok ($p < 0,001$). Štatisticky významný rozdiel sme sledovali aj medzi IR a Hcy-IR skupinou, kde v Hcy-IR skupine počet buniek po 72 hod. reperfúzií klesol o 42 % ($p < 0,001$; Obr. 2). Tento pokles však súvisel s úbytkom neuronov v CA1 oblasti hipokampu. Prekvapivým zistením bola pozitivita a morfológické zmeny buniek glie v CA1 oblasti hipokampu ako aj v PtA (parietal association brain) oblasti kôry mozgu v kontrole s indukovanou hHcy, tak aj pozitivita neurónov v PtA oblasti kôry v skupine Hcy-IR-72h (Obr. 1: A a C).

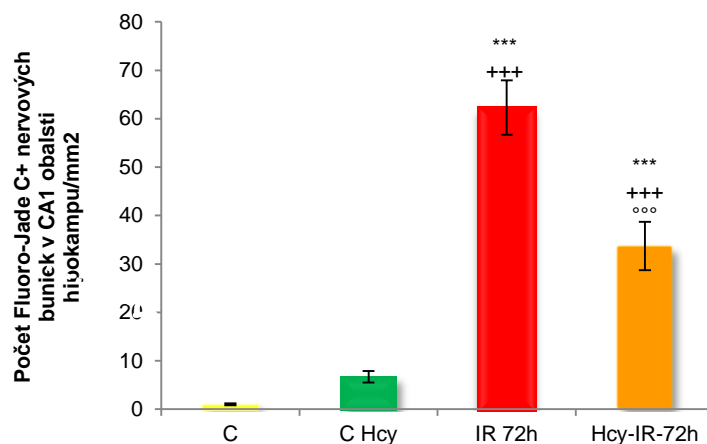
Pre potvrdenie funkčného poškodenia selektívne vulnerabilných oblastí mozgu experimentálnych zvierat sme použili metódu dvojitého farbenia s využitím protilátky proti NeuN, ktorá špecificky označuje jadrá zrelých neurónov a protilátku GFAP, ktorý selektívne farbí bunky glie (astrocyty; [17]; Obr. 1: D-F). Porovnávali sme kontrolu, kontrolu s indukovanou hHcy, IR a Hcy-IR-72h, pričom sme zistili štatisticky významný pokles NeuN pozitívnych neurónov v PtA oblasti kôry o 17,8 % ($p < 0,05$; Obr. 1: E) práve v skupine s indukovanou hHcy po 72h reperfúzií. Analyzovali sme aj počet astrocytov v CA1 oblasti hipokampu, pričom sme zistili štatisticky významný nárast počtu GFAP značených astrocytov v kontrolnej skupine s indukovanou hHcy o 42 % ($p < 0,001$), v IR-72h skupine o 47 % ($p < 0,001$) a v Hcy-IR-72h o 54 % ($p < 0,001$). V PtA kôrovej oblasti bol v C-Hcy skupine nárast počtu GFAP+ astrocytov významnejší a vzrástol o 52 % v porovnaní s kontrolou., taktiež v Hcy-IR-72h sme zaznamenali nárast počtu astrocytov s početnými, rozvetvenými a zhrubnutými výbežkami o 63 % ($p < 0,001$; Obr. 1: F) v porovnaní s kontrolou. Naše výsledky naznačujú, že hHcy v kombinácii s IR infarktom môže viesť k znižovaniu objemu hipokampánej ako aj kortikálnej hmoty, čo podporujú aj výsledky štúdií v humánnej medicíne [3, 10-11] ako aj experimentálne štúdie [12-18,21]. Homocysteín bol tiež významne asociovaný so známami ranej fázy ACH pri aterosklerotických zmenách karotíd alebo s léziami v bielej hmote [3]. Aj napriek mnohým experimentom, či v klinickej alebo experimentálnej medicíne, nie je celkom jasné, či sa hHcy dá považovať za rizikový faktor vzniku ACH [13,15-16].

Z literatúry je známe, že zmeny v intracelulárnych signalizačných dráhach zohrávajú dôležitú úlohu v mechanizmoch poškodenia/protektie po infarkte [13-14, 18, 21], preto sme ďalej v našej práci študovali jednu z MAPK dráh. Pre potvrdenie zmien na post-transkripčnej úrovni v mozgovom tkanive sme tkanivá analyzovali aj pomocou Western blot analýzy MAPK proteínov. Výsledky Western blot analýzy ukázali značný nárast hladiny MAPK/pERK proteínov v C-Hcy skupine v porovnaní s kontrolami bez indukovanej hHcy. V porovnaní s kontrolou sme zistili v C-Hcy skupine štatisticky významné zvýšenie hladiny proteínov o 42 % ($p < 0,001$), čo bolo v korelácii aj

s imunohistochemickou analýzou tkaniva. Na druhej strane, rovnako sme zistili, že po indukcii hHcy dochádza k aktivácii aj MAPK/p-p38 proteínu, pričom sme namerali zvýšenie hladiny tohto proteínu v C-Hcy skupine o 39 % ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Medzi skupinami po IR s/bez hHcy sme štatisticky významné zmeny nezistili. V našich experimentoch sme potvrdili aktiváciu MAPK/ERK dráhy. Následne je aktivovaný MAPK/p-ERK translokovaný do jadra, kde aktivuje transkripčné faktory, ktoré zabránia nástupu bunkovej smrti [13, 17-21]. Na druhej strane sme sledovali tiež aktiváciu MAPK/p-p38, ktorá súvisí s navodením smrti buniek [17-18, 21]. Naše výsledky naznačujú, že umelo indukovaná hHcy v neurónoch aktivuje „cross-talk“ mechanizmus medzi oboma MAPK dráhami, kedy záleží od sily a dĺžky trvania inzultu [13, 18, 21]. Poddar a Paul [18], pri experimentoch na bunkových líniiach nervového tkaniva za podmienok *in vitro* zistili, že po chemickej indukcii hHcy dochádza k aktivácii MAPK/ERK ako aj MAPK/p38 dráhy. Detegovali vyššiu hladinu p-ERK2 proteínov, u ktorých bol dokázaný priamy pro-apoptotický účinok, čo je v zhode s našimi výsledkami. Títo autori ďalej uvádzajú, že v závislosti od typu a intenzity a dĺžky pôsobenia inzultu je aktivita MAPK/ERK dráhy spočiatku vysoká, ale postupne klesá a je nahradená aktivovaním iných dráh, ktoré súvisia s navodením bunkovej smrti, alebo nástupom zápalovej reakcie [17-18]. Predpokladáme, že k podobnej situácii dochádza v nervovom tkanive aj za podmienok *in vivo*.

Obr. 1





Obr. 1 Fluorescenčné mikrofotografie PtA oblasti kôry mozgu potkanov farbené pomocou metódy FluoroJade-C. A. Kontrola s hHcy B. Skupina IR po 72 h reperfúzií. C. Skupina IR s indukovanou hHcy po 72 h reperfúzií. **Fluorescenčné mikrofotografie PtA oblasti kôry mozgu potkanov farbené pomocou double staining imunoanalýzy (NeuN a GFAP):** D. Kontrola s hHcy E. Skupina IR po 72 h reperfúzií. F. Skupina IR s indukovanou hHcy po 72 h reperfúzií. Prerušované šípky označujú pozitívne bunky glie. Plné šípky označujú pozitívne neuróny.. Úsečka zodpovedá dĺžke 200 a 50 μm .

Obr. 2 Kvantifikácia počtu Fluoro-Jade C pozitívnych buniek v CA1 oblasti hipokampu potkana. Porovnanie kontrolnej skupiny (C), kontrolnej skupiny s indukovanou hHcy (C-Hcy), IR-72h a Hcy-IR-72h skupiny na fluorescenčnej úrovni. Hodnoty boli normalizované ku kontrolným zvieratám \pm SEM, $n = 5$. *** $P < 0,001$ predstavuje signifikantný rozdiel oproti kontrolným zvieratám, +++ $p < 0,01$ značí signifikantný rozdiel medzi skupinami s rovnakým poškodením a ooo $p < 0,001$ prezentuje signifikantný rozdiel oproti kontrolnej hHcy skupine.

Záver

Na základe našich výsledkov predpokladáme, že samotná indukovaná hHcy vedie k desintegrácii buniek glie v CA1 oblasti hipokampu ako aj v mozgovej kôre. Indukovaná hHcy v kombinácii s ischemiou prispieva k rozvoju neurodegenerácií v III. a V. vrstve mozgovej kôry, čo je jedným z charakteristických znakov ACH. Indukovaná hHcy tiež prispieva k rozvoju reaktívnej astrogliózy, čo je rovnako charakteristické pre rozvoj ACH. Počas indukovanej hHcy dochádza k aktivácii oboch MAPK dráh, pričom neskorší rozpad p-ERK je charakteristický pre rozvoj ACH. Hlbšie poznanie podstaty molekulovo-biologických mechanizmov prebiehajúcich v bunkách pri IR poškodení mozgu v asociácii s hHcy by mohlo v budúcnosti prispieť k zefektívneniu terapie pacientov po ischemickom infulte v spojitosti s neurodegeneratívnymi zmenami v mozgu ako pri ACH.

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0050/11 a 213/2012, z projektov „Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed)“, kód 26220220153 a „Vytvorenie nového diagnostického panelu pre ochorenia CNS“ spolufinancované zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu sociálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Georges, *Int J Geriatr Psychiatry*, **2008**, 23/5, 546–551.
- [2] Filipcik, *Bratisl Lek Listy*, **2006**, 107/9-10, 384-394.
- [3] Babusikova, In: Chang, R. C. C. **2012**. *Advanced Understanding of Neurodegenerative Diseases*, InTech, 442 p., ISBN 978-953-307-529-7
- [4] Rabaneda, *FASEB J*, **2008**, 22/11, 3823-35.
- [5] Van Dam, *Archives of Gerontology and Geriatrics*. **2009**, 48, 425-430.
- [6] Williams, *Age Ageing*. **2002**, 31, 440-444.
- [7] Zhang, *Neurobiol Aging*, **2008**, 29/11, 1654-65.

- [8] Darvesh, *Cell Mol Neurobiol.* **2007**, 27, 33-48.
- [9] Farkas, *J Alzheimers Dis.* **2013**, 33/4, 1097-104
- [10] Ravaglia, *Mech Ageing Dev.* **2000**, 121, 251-261.
- [11] Seshardi, *N Engl J Med.* **2002**, 346, 476-483.
- [12] Linnebank, [*Neurodegener Dis.*](#) **2010**, 7/6, 373-8.
- [13] Kovalská, *Slovenský lekár.* **2012**, 22/3-4, 46-51.
- [14] Pavlikova, *Gen. Physiol. Biophys.* **2011**, 30, S61–S69.
- [15] Petras, *J Physiol Pharmacol.* **2014**, 65, 15–23.
- [16] Lehotsky, [*Cell Mol Neurobiol.*](#) **2015**, 35/1, 7-15.
- [17] Kovalska, *J Physiol Pharmacol.* **2014**, 65/6, 767-776.
- [18] [Poddar](#), [*J Neurochem.*](#) **2013**, 124, 558-70
- [19] Zhang, *J Mol Med.* **2010**, 16 (7-8), 307-315.
- [20] Yue, *Circ. Res.* **2000**, 86, 692–699.
- [21] Kovalska, *Neurochem. Res.* **2012**, 37, 1568-1577.

Ionizujúcim žiarením indukovaná inhibícia neurogenézy v mozgu za experimentálnych podmienok

Báľentová, S.¹, Hajtmanová, E.², Lehotský, J.³, Adamkov, M.¹

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

Abstract

In our study, adult male Wistar rats received whole-brain irradiation with fractionated doses of gamma rays (a total dose of 20Gy) and were investigated 100 days later. Immunohistochemistry and confocal microscopy were used to determine proliferative activity of cells residing the forebrain anterior subventricular zone (SVZa) and distributed along the subventricular zone–olfactory bulb axis (SVZ-OB axis). Significant reduction of neuroblasts was seen after irradiation in almost all counted parts of the SVZ-OB axis. Fractionated irradiation led to moderate decline of stem cells along the migratory pathway. Results showed that inhibition or lack of neurogenesis of the SVZa derived cells may contribute to development of radiation-induced late effects.

Úvod

Subvetrikulárna zóna (SVZ) lemujúca laterálne mozgové komory (LK) je u cicavcov jednou z dvoch mitoticky aktívnych oblastí, ktorá si zachováva schopnosť neurogenézy a gliogenézy aj v dospelosti. Z progenitorov prednej steny SVZ (anterior; SVZa) vznikajú delením neuroblasty, ktoré migrujú pozdĺž vopred určenej migračnej trasy, tzv. rostrálnej migračnej dráhy do *bulbus olfactorius* (BO), kde dochádza k ich terminálnej diferenciácii a tvorbe nových funkčných spojení [1]. Expozícia ionizujúcim žiarením môže viesť k anatomickému a funkčnému poškodeniu mozgu. Miera poškodenia nervového tkaniva závisí od druhu ionizujúceho žiarenia, ožarovaného objemu, veľkosti a časového rozloženia dávky, spôsobu ožiarenia a i. Frakcionovaná expozičia, resp. rozdelenie celkovej dávky na viacero frakcií viedla za experimentálnych podmienok k porušeniu hemato–encefalickej bariéry, cievnyh léziám, inhibícii neurogenézy, aktivácii mikrogliie, zvýšenému zastúpeniu astrocytov, zvýšenej expresii mediátorov zápalu (cyclooxygenase; Cox, intercellular adhesion molecule-1; ICAM-1, tumor necrosis factor-alfa; TNF- α) do šiestich mesiacov po ožiarení [2].

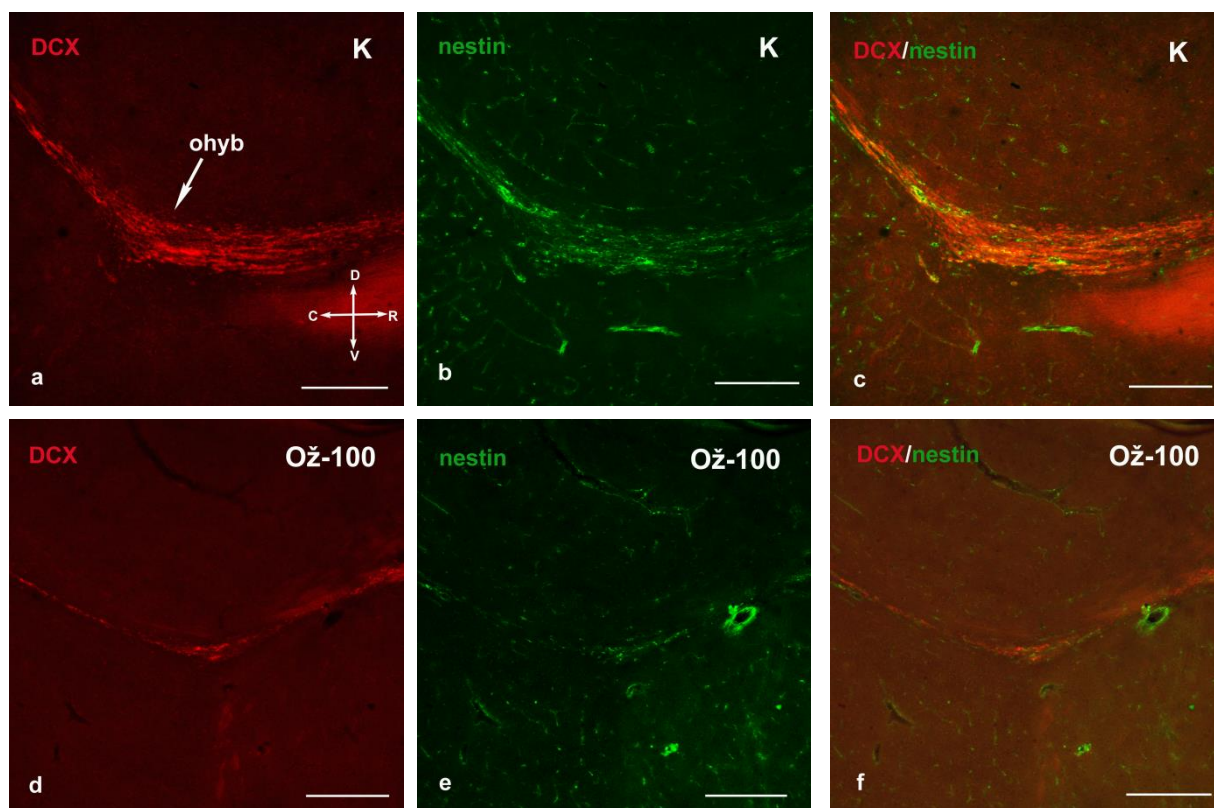
Materiál a metódy

Biele samce potkanov ($n=20$) kmeňa Wistar, vo veku 3-4 mesiacov sme ožiarili celkovou dávkou cTD=20Gy ionizujúceho gama žiarenia, rozdelenú na 4 frakcie, s dávkou na frakciu 5Gy, 1x týždenne. Ožarovaný objem predstavoval hemisféry, mozoček a predĺženú miechu. Zdrojom žiarenia bol ⁶⁰Co (prístroj TERAGAM ÚJP Praha, ČR) a zvieratá preživali 100 dní po expoziícii. Po celkovej injekčnej anestéze, celotelovej transkardiálnej perfúzii 4% paraformaldehydom, dekapitácii, postfixácii a presýtení mozgov v kryoprotektívnom roztoku 30% sacharózy sme na kryostate narezali sériové sagitálne 30 μ m zmrazené rezy a následne sme postupovali podľa protokolu pre imunohistochemické farbenie na detekciu doublecortinu (DCX), markera pre neuroblasty a nestinu, markera pre kmeňové a progenitorové bunky. Preparáty sme fotili na konfokálnom mikroskope Olympus Fluoview FW10i (Olympus, Japonsko). Kvantitatívnu analýzu, resp. počet fluorescenčne značených buniek v jednotlivých

anatomických oblastiach osi SVZ-BO, t.j. v SVZa, vertikálnom ramene, ohybe a horizontálnom ramene sme uskutočnili pomocou programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD,USA).

Výsledky a diskusia

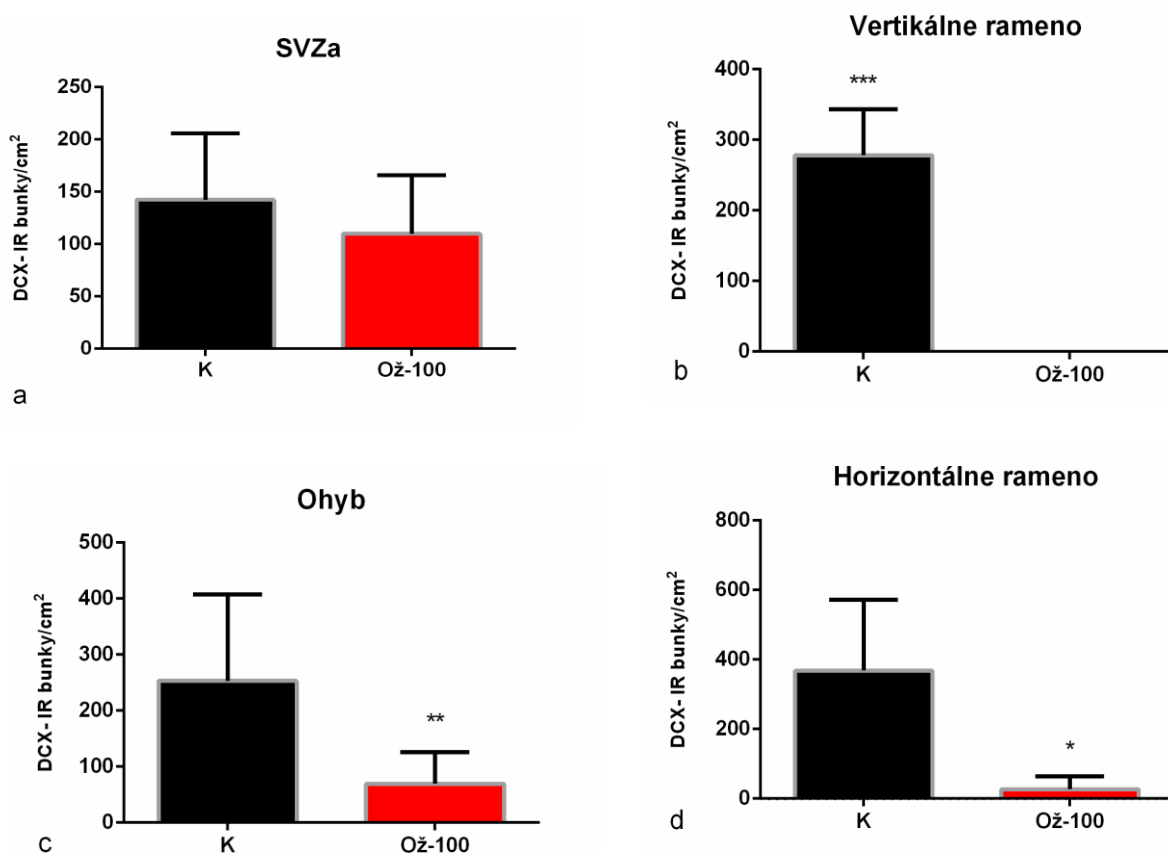
Imunohistochemické farbenie na detekciu DCX zobrazuje os SVZ-BO ako nepravidelne tvarovaný povrazec zložený z husto zoskupených DCX-imunoreaktívnych buniek (DCX-IR), ktoré sa dajú zreteľne odlíšiť od okolitého tkaniva (Obr. 1: a, d). V ožiarenej skupine bol iniciálny pokles počtu DCX-IR neuroblastov v SVZa len mierny (OŽ-100: $109,8 \pm 22,86/\text{cm}^2$ versus K: $142,4 \pm 23,98$) a následne vo vertikálnom ramene, ohybe a horizontálnom ramene sme zistili signifikantný pokles, resp. vymiznutie populácie neuroblastov (vr: OŽ-100: žiadne neuroblasty vs. K: $278 \pm 26,75$; $P < 0,001$; ohyb: OŽ-100: $69,25 \pm 20,12$ vs. K: $253,1 \pm 54$; $P < 0,01$; hr: OŽ-100: $27,25 \pm 18,43$ vs. K: $368,5 \pm 82,94$; $P < 0,05$). Zmeny v populácii nestin-IR kmeňových buniek neboli signifikantné. V priebehu osi SVZ-BO sme zistili len mierny pokles (SVZa: $129,8 \pm 13,37$ vs. K: $170 \pm 30,35$; vr: OŽ-100: $11,8 \pm 7,83$ vs. K: $20,67 \pm 13,63$), ktorý bol najvýraznejší v ohybe (OŽ-100: $86,88 \pm 43,87$ vs. K: $159,2 \pm 63,12$).



Obr 1 Mikrofotografie sagitálnych rezov predným mozgom dospelých samcov potkanov kontrolnej skupiny a zvierat prežívajúcich 100 dní po frakcionovanej expozícii ionizujúcim žiarením (K, OŽ-100) (celková dávka 20Gy gama žiarenia). Tkanivové rezy boli spracované pomocou imunohistochemického farbenia na detekciu doublecortinu, DCX a nestinu. (a-f). Pokles v zastúpení markerov uvedených typov v ohybe osi SVZ-BO v ožiarenej skupine v porovnaní s kontrolnými zvieratami. Mierky: a-f=200 μm .

Účinok frakcionovanej dávky gama žiarenia mal negatívny dopad na neurogénnu populáciu osídľujúcu os SVZ-BO (Obr. 2: a-d). Pre porovnanie, v našej predchádzajúcej štúdii viedlo ožiarenie frakcionovanou dávkou 4 a 5Gy k dočasnému

zvýšení počtu DCX-IR neuroblastov 30 dní po expozícii v niektorých oblastiach, hoci dlhodobšie prežívanie nakoniec spôsobilo ich pokles [3-4]. Práce, ktoré sa zaoberajú modelom traumatického poškodenia mozgu za experimentálnych podmienok naznačujú, že lézie v tkanive mozgu vo všeobecnosti ovplyvňujú neurogenézu a gliogenézu v SVZa a iniciujú migráciu buniek na miesto poškodenia [5]. Získané výsledky a údaje z prechádzajúcich štúdií však ukázali, že kmeňové bunky v SVZa nie sú schopné regenerácie a sebaobnovy aj niekoľko mesiacov po ožiarení [6-7].



Obr. 2 Celkový počet DCX-IR buniek v jednotlivých anatomických oblastiach pozdĺž osi SVZ-BO t.j. v SVZa, vo vertikálnom ramene, ohybe a horizontálnom ramene v kontrolneskupine a zvieratami prežívajúcimi 100 dní po frakcionovanej expozícii ionizujúcim žiarením (K, Ož-100; $\bar{x} \pm \text{SEM}$). Štatistická významnosť rozdielov medzi kontrolnou a ožiarenou skupinou: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

Frakcionované ožiarenie je vovšeobecnosti šetrnejšie k tkanivu mozgu ako jednorazová expozícia veľkou dávkou (napr. 100Gy). Reakcia tkaniva na ožiarenie je rozdielna, v prípade jednorazovej dávky je rýchla a po aplikovaní frakcionovanej dávky je oneskorená a symptómy sa často prejavajú až s určitým časovým odstupom po expozícii [2]. Pri frakcionovanom ožiarení prvá dávka pôsobí na proliferujúce bunky a apoptóza sa prejaví o niekoľko hodín neskôr. Nasledujúca dávka zlikviduje bunky, ktoré sa začnú deliť spontánne alebo ako odpoveď na predchádzajúcu expozíciu [8]. Skúsenosti z experimentálnych štúdií naznačujú, že existuje limit pre počet frakcií [9-10]. K faktorom, ktoré ovplyvňujú účinok žiarenia patria dávková rýchlosť, intenzita zdroja žiarenia, SAD (source to axis distance) a i.

Doteraz publikované práce nám ukázali, že žiarením indukovaná strata buniek, ktoré sa podieľajú na zložení SVZa môže hrať dôležitú úlohu vo vývoji neskorých postradiačných syndrómov. Keď schopnosť sebaobnovy SVZa zlyhá, pokles počtu

gliových buniek, resp. demyelinizácia môže napokon viesť až k radiačnej nekróze. Tento poznatok môže byť dôležitý z hľadiska medicínskej perspektívy, pretože rádioterapeutické dávky sú vyššie ako dávky, ktoré sú schopné eliminovať neurogenézu [11]. Ďalší výskum v tejto oblasti preverí dôležitosť tohto poznatku pre objasnenie komplikácií v rádioterapii nádorov.

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.

Práca bola financovaná z projektov „Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed)“, kód 26220220153 a „Vytvorenie nového diagnostického panelu pre ochorenia CNS“ spolufinancované zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu sociálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Carleton, *Nat. Neurosci.* **2003**, 5, 507-518.
- [2] Gaber, *Int. J. Radiat. Biol.* **2003**, 79, 359-366.
- [3] Balentova, *Acta Histochem.* **2014a**, 116, 265-271.
- [4] Balentova, *Neurochem. Res.* **2014b**, [Epub ahead of print].
- [5] Sundholm-Peters, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2005**, 64, 1089-1100.
- [6] Tada, *Exp. Neurol.* **1999**, 160, 66-77.
- [7] Raber, *Radiat. Res.* **2004**, 162, 39-41.
- [8] Wojtowicz, *Hippocampus.* **2006**, 16, 261-266.
- [9] Shinohara, *Cancer Res.* **1997**, 57, 2694-2702.
- [10] Snyder, *Neuroscience.* **2005**, 130, 843-852.
- [11] Wong, *Mol. Interv.* **2004**, 4, 273-284.

Glutamát-glutamínový cyklus v nervovom tkanive, alebo ako sa nepriotráviť amoniakom pri myslení

Murín, R.¹, Mahmood, S.¹, Murínová, N.², Babušíková, E.¹, Hatok, J.¹

¹Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Martin, Slovenská republika, ²Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové, Česká republika
murin@jfmf.uniba.sk

Abstract

Glutamate is the most abundant amino acid in brain, where it is the major excitatory neurotransmitter. Since glutamate is not imported into the brain parenchyma through blood-brain barrier from blood, the question about its origin among the cells within the brain parenchyma arise. Here we summarize the biochemical prerequisites those might be essential for the *de novo* synthesis of glutamate in brain cells, and in addition, also mechanisms contributing to maintaining nitrogen balance in the glutamate-glutamine cycle existing between neurons and astroglial cells are considered.

Úvod

Neurotransmisia zabezpečovaná prostredníctvom chemických synápsí má nezastupiteľnú úlohu v procese prijímania a spracovania podnetov z vonkajšieho i vnútorného prostredia organizmu a následnej tvorby odpovede buniek centrálného nervového systému (CNS). Neurotransmisia je na bunkovej úrovni sprostredkovaná a regulovaná prostredníctvom špecializovaných buniek - neurónov a gliových buniek [1-6]. Na subcelulárnej úrovni je proces neurotransmisie závislý od tvorby správneho typu synápsí a ich lokalizácie, metabolizmu neurotransmiterov a možnosti tvorby i vedenia akčného potenciálu. Glutamát (Glu) je jeden z najzastúpenejších excitačných neurotransmiterov v CNS a je zapojený do väčšiny mozgových funkcií, zahŕňajúcich tiež myslenie, zapamätávanie a učenie [7-8]. Zároveň je Glu priamym substrátom pre syntézu inhibičného neurotransmitera-aminobutyrátu (GABA), ako aj možným substrátom pre energetický metabolizmus. V poslednej dobe, vďaka možnosti použitia kombinácie imunohistochemických, molekulárno biologických a biochemických metód boli získané údaje objasňujúce metabolizmus Glu v CNS. V tejto práci sa zameriame na zhrnutie týchto poznatkov s dôrazom na *de novo* syntézu Glu v bunkách CNS a tiež existenciu glutamát-glutamínového cyklu potrebného pre zachovanie neurotransmisie sprostredkovanej glutamátom.

Glutamát

Biologicky aktívna, ionizovaná forma kyseliny L-glutámovej [(2S)-2-aminopentándiová kyselina] – glutamát je polárna molekula s negatívnym nábojom. Glutamát je neesenciálna, proteinogénna aminokyselina s niekoľkými dôležitými funkciami vo vnútrobunkovom ako aj medzibunkovom metabolizme:

- ako monomér pre syntézu proteínov;
- ako signálna molekula;
- ako priamy prekurzor pre syntézu GABA, glutamínu i 2-oxoglutarátu;
- aminokyselín a 2-oxokyselín s čím úzko súvisí aj proces metabolizmu amoniaku;
- ako substrát pre energetický metabolizmus buniek;
- ako medziprodukt malát-aspartátového systému zabezpečujúceho prenos redukovaných ekvivalentov z cytoplazmy do mitochondrií.

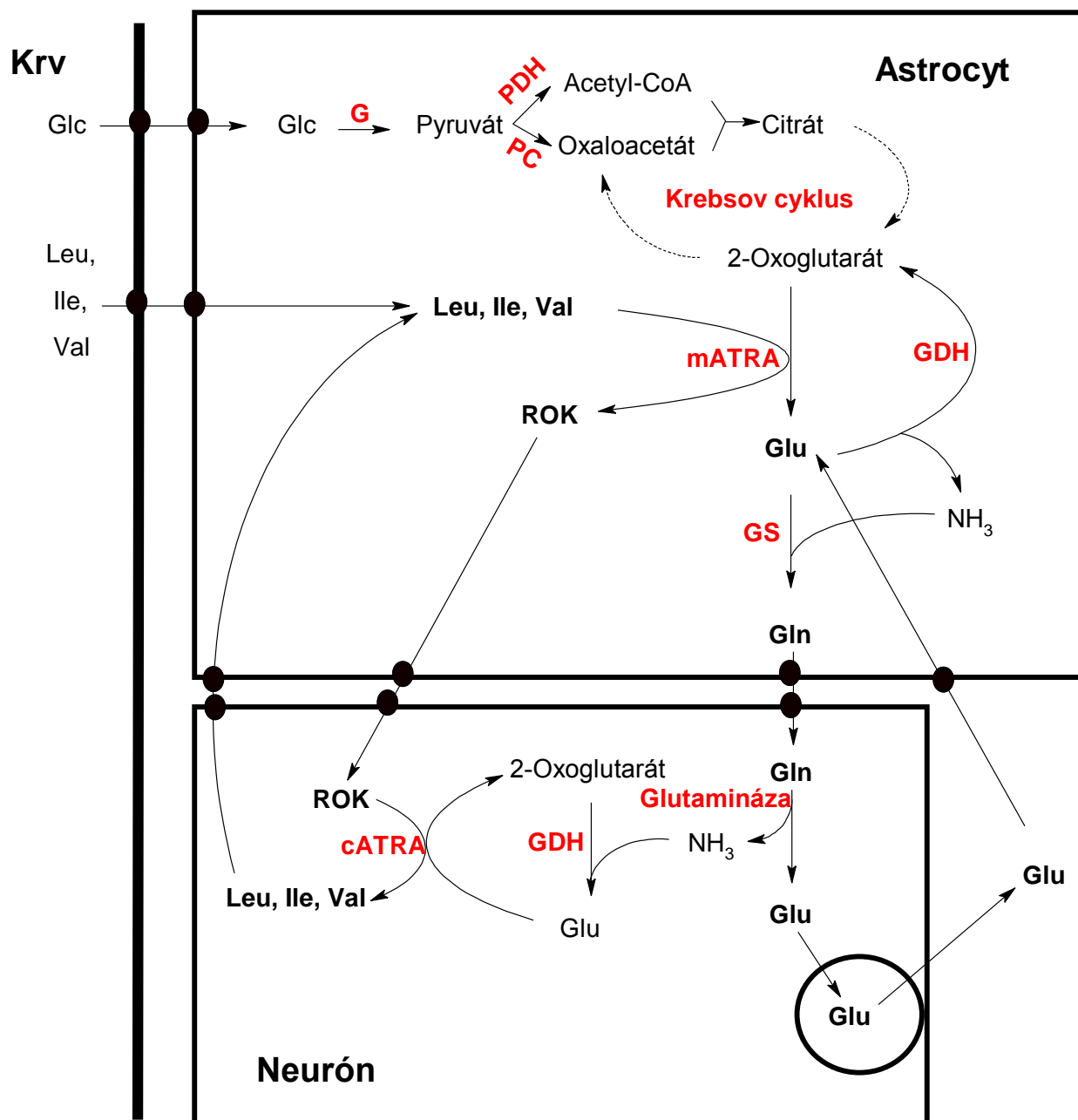
Celková koncentrácia voľného Glu v homogenáte tkaniva CNS je približne 10 mM, a výrazne prevyšuje hodnoty koncentrácií ostatných aminokyselín v mozgu. Väčšina Glu v CNS je prítomná v intracelulárnom priestore, pričom jeho koncentrácia v synaptických vezikulách môže nadobudnúť hodnotu približne 100 mM. Koncentrácia Glu v extracelulárnej tekutine prítomnej v CNS ako aj v cerebrospinálnom moku je v rozsahu hodnôt 0,5 – 2 μ M [8]. Aj keď Glu je podobne ako ostatné aminokyseliny prítomný v krvi, na rozdiel od nich sa nepredpokladá jeho import cez hematoencefalickú bariéru (HEB) do parenchýmu mozgu [8]. Na základe týchto poznatkov je možné usúdiť, že v bunkách CNS je prítomný len v nich *de novo* syntetizovaný Glu.

Syntéza glutamátu

Vo všeobecnosti sú známe dve základné metabolické dráhy, ktorými môže byť syntetizovaný Glu v ľudských bunkách. A to buď jeho *de novo* syntézou, alebo hydrolytickou deamináciou amidovej skupiny prítomnej na glutamíne (Gln). Nakoľko Gln, tak ako Glu nie je importovaný z krvi cez HEB do mozgového tkaniva [9-10], bunky CNS sú závislé na jeho *de novo* syntéze. Pre *de novo* syntézu Glu sú esenciálne dva substráty, a to: (i) 2-oxoglutarát, ktorý tvorí uhlíkový reťazec Glu [11]; (ii) donor amino skupiny vo forme aminokyseliny schopnej importu cez HEB alebo voľný amoniak (Obr. 1) [12].

Syntéza 2-oxoglutarátu je v mozgových bunkách zabezpečovaná niekoľkými metabolickými dráhami, pričom primárnym zdrojom uhlíkových atómov je glukóza. Glukóza importovaná cez HEB do parenchýmu mozgu je glykolyticky štiepená v cytoplazme astrocytov na dve molekuly pyruvátu, ktoré môžu vstupovať do Krebsovho cyklu po enzymatickej premene na acetyl-CoA a oxalocetát. Obe látky po vzájomnej kondenzácii tvoria citrát, ktorý po premene na izocitrát je oxidatívne dekarboxylovaný na 2-oxoglutarát. Premena pyruvátu na acetyl-CoA je katalyzovaná pyruvátdehydrogenázou, multienzymatickým komplexom, ktorý je prítomný v mitochondriách všetkých typov mozgových buniek. Iná je situácia v prípade tvorby oxaloacetátu z pyruvátu. Nakoľko táto syntéza je závislá od exprese pyruvátkarboxylázy, ktorá je prítomná len v mitochondriách gliových buniek, a to hlavne astrocytov [13]. Astrocyty sú preto považované za primárny zdroj 2-oxoglutarátu pre syntézu Glu. Okrem uhlíkových atómov, pôvodne pochádzajúcich z glukózy, sú v molekule 2-oxoglutarátu v menšej miere prítomné aj atómy uhlíka uvoľnené katabolickými procesmi aminokyselín [14-17]. Z aminokyselín importovaných do parenchýmu mozgu, sú to najmä leucín, izoleucín a valín, ktoré sú v najväčšej miere transportované cez HEB do tkaniva mozgu [9-10].

Enzymatická premena 2-oxoglutarátu na Glu je teoreticky možná dvomi spôsobmi. V prítomnosti dostupnej, voľnej amino skupiny vo forme amoniaku by ho mohol syntetizovať enzým glutamátdehydrogenáza (GDH), alebo môže byť tvorený prenosom amino skupiny z inej aminokyseliny pomocou enzýmov zo skupiny aminotransferáz. Aj keď sa v minulosti predpokladalo, že by sa GDH mohla



Obr. 1 Zjednodušená schéma metabolismus glutamátu. Glukóza (Glc) po importe do astrocytov je glykolyticky štiepená (G) na pyruvát, ktorý sa môže ďalej enzymaticky meniť na acetyl-CoA pomocou pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDH) alebo pomocou reakcie katalyzovanej pyruvátcarboxylázou (PC) na oxaloacetát. Obe takto vzniknuté molekuly môžu byť reakciami Krebsovho cyklu metabolizované na 2-oxoglutarát, ktorý je substrátom pre syntézu glutamátu (Glu) a následne glutamínu (Gln) v astrocytoch. Reakcie sú katalyzované enzýmami: mitochondriálna izoforma aminotransferázy rozvetvených aminokyselín (mATRA), glutamínsyntetáza (GS) a glutamátdehydrogenáza (GDH). Vzniknutý Gln je spolu s rozvetvenými 2-oxo kyselinami (ROK), ktoré vznikajú aminotransferázovou reakciou z rozvetvených aminokyselín leucínu (Leu), izoleucínu (Ile) a valínu (Val), transportovaný do neurónov. Glutamín sa môže v neurónoch deamidačnou reakciou, katalyzovanou glutaminázou, meniť späť na Glu, ktorý je v procese glutamátovej neurotransmisie uvoľnený z neurónov do synaptickej štrbiny. Glu je zo synaptickej štrbiny importovaný do astrocytov, ktoré ho môžu v prípade potreby opäť použiť na syntézu Gln.

spolupodieľať na syntéze Glu v CNS vo významnej miere, štúdiom jej kinetických parametrov sa zistilo, že jej afinita voči amoniaku je veľmi nízka. Hodnota K_M enzýmu GDH je väčšia ako 10 mM. Táto hodnota približne päťdesiatnásobne presahuje hodnotu koncentrácie amoniaku v mozgu, pri ktorej dochádza ku kóme. Preto sa predpokladá, že GDH nemá primárnu úlohu v metabolickej dráhe vedúcej k *de novo* syntéze Glu v mozgu.

V súčasnosti akceptovaná hypotéza o pôvode amino skupiny glutamátu *de novo* syntetizovaného v bunkách CNS je založená na predpoklade, že donormi tejto amino skupiny sú aminokyseliny importované do mozgového parenchýmu cez HEB, a to hlavne rozvetvené aminokyseliny (RA) – leucín, izoleucín a valín [12, 19-21]. Tieto aminokyseliny sú importované do tkaniva mozgu z krvného riečišťa pomocou špecifického transportéra typu L, pričom ich import prevyšuje import všetkých ostatných aminokyselín. V mozgových bunkách sú prítomné dve izoformy aminotranferázy rozvetvených aminokyselín (ATRA), a to mitochondriálna (mATRA) a cytoplazmatická (cATRA). Expresia oboch izoform je bunkovo špecifická; mATRA je prítomná v astrocytoch a cATRA v neurónoch [19]. Predpokladá sa, že *de novo* syntéza Glu je ukončená v astrocytoch po prenose amino skupiny z RA na 2-oxoglutarát, pričom ako ďalší produkt tejto reakcie vznikne rozvetvená 2-oxo kyselina (ROK). Pravdepodobne preto, že Glu má funkciu neurotransmitera, je novovytvorený Glu v astrocytoch ďalej konvertovaný na Gln. Táto amidačná reakcia je katalyzovaná pomocou enzýmu špecifického pre astrocyty – glutamínsyntetázou (GS). Aktivita GS je závislá od prítomnosti ATP a tiež dostupnosti druhého substrátu - amoniaku, ktorý vzniká ako jeden z produktov enzymatickej hydrolyzy druhej molekuly Glu na 2-oxoglutarát pomocou GDH. V astrocytoch vytvorený Gln a ROK sú následne transportované z astrocytov do neurónov. V neurónoch je Gln hydrolyticky štiepený na Glu a amoniak pomocou enzýmu glutamináza. Uvoľnený amoniak je pravdepodobne v slede enzymatických reakcií katalyzovaných GDH a cATRA najskôr viazaný na molekulu 2-oxoglutarátu a následne na ROK, pričom vznikne molekula RA. RA je z neurónov exportovaná do astrocytov, kde môže slúžiť opäť ako donor amino skupiny pre pokračovanie syntézy Glu [12, 19-21].

Glutamát-glutamínový cyklus a jeho dusíková rovnováha

Glutamát, ktorý je tvorený v cytoplazme neurónov z importovaného glutamínu, môže slúžiť ako neurotransmitter po jeho transporte do synaptických vezikúl. Z nich je následne uvoľnený počas procesu neurotransmisie do synaptickej štrbiny, kde nárast jeho koncentrácie iniciuje aktiváciu glutamátových receptorov na postsynaptickej membráne. Terminácia glutamátovej neurotransmisie je závislá na odstránení glutamátu zo synaptickej štrbiny. Import Glu do presynaptických, ako aj postsynaptických neurónov je zanedbateľný a najdôležitejšiu úlohu v jeho odstránení zo synaptickej štrbiny majú astrocyty. Tie vo svojej plazmatickej membráne obsahujú glutamátové transportéry [22] schopné importu glutamátu do svojej cytoplazmy. Dôsledkom tohto procesu je pokles množstva Glu v neurónoch a jeho nárast v astrocytoch, z čoho vyplýva potreba neurónov regenerovať svoje zásoby Glu. Ako už bolo spomenuté v predchádzajúcom texte, astrocyty sú schopné zabezpečiť neuróny glutamátom vo forme glutamínu. Na syntézu Gln pomocou GS astrocyty znova potrebujú voľnú molekulu amoniaku. Pôvodným donormom tejto molekuly sú vo veľkej väčšine opäť rozvetvené aminokyseliny, ktoré sú prítomné v astrocytoch po ich importe buď z neurónov, kde vznikli z ROK ako finálny akceptor amidovej skupiny uvoľnenej pri premene Gln na Glu alebo z krvného riečišťa. Aj keď sa v minulosti verilo, že glutamát-

glutamínový cyklus medzi neurónmi a astrocytmi môže prebiehať na základe difúzie amoniaku cez plazmatické membrány, v súčasnosti sa na základe výsledkov histochemických a biochemických experimentov predpokladá, že rozvetvené aminokyseliny spolu s ich 2-oxo derivátmi sú zodpovedné za medzibunkový prenos amino skupiny v tkanive mozgu[12, 19-21]. Prenos amoniaku pomocou aminokyselín a ich 2-oxo derivátov medzi neurónmi a astrocytmizabraňuje nekontrolovanému nárastu jeho koncentrácie v mozgu a jeho neurotoxickému účinku.

Záver

Glutamátom sprostredkovaná neurotransmisia sa podieľa na regulácii celého spektra fyziologických procesov, o čom svedčí aj fakt, že poruchy či už v metabolizme glutamátu, jeho uvoľňovaní z presynaptických neurónov, nedostatočnej alebo zvýšenej aktivácii glutamátových receptor sú dávajú do súvisu s etiopatogenézou tak rozličných ochorení ako sú: amnézia, amyotropná laterálna skleróza, Huntingtonovachorea, epilepsia, amnézia, panický strach, psychóza, neuropatická bolesť, ischémia, traumatické poškodenie či mozgové malígne procesy[7, 8, 23]. Z tohto dôvodu, pochopenie detailov a špecifik metabolizmu glutamátu bunkami CNS ako aj procesu jeho úlohy v procese chemickej neurotransmisie môže napomôcť k dizajnu nových a špecifickejších liečiv či terapeutických postupov s cieľom lepšej pomoci pacientom trpiacim niektorým zo spomenutých ochorení.

Chceme sa poďakovať Ing. Ivete Padovej za jej nezištnú pomoc pri príprave článku. Táto práca bola podporená projektmi: VEGA 1/0242/13 a APVV-0224-12.

Literatúra

- [1] Perea, *Trends Neurosci*, **2009**, 32, 421-31.
- [2] Auld, *Neuron*. **2003**, 40/2, 389-400.
- [3] Clarke, *Cell*. **2013**, 154, 267-8.
- [4] Eroglu, *Nature*. **2010**, 468, 223-31.
- [5] Allen, *Nature*. **2009**, 457, 675-7.
- [6] Yoon, *Front Neural Circuits*. **2014**, 8, 141.
- [7] Fonnum, *J Neurochem*. **1984**, 4, 1-11.
- [8] Meldrum, *J Nutr*. **2000**, 130/4S, 1007S-15S
- [9] Hawkins, *J Nutr*. **2006**, 136/1, 218S-26S.
- [10] Smith, *J Nutr*. **2000**, 130/4S, 1016S-22S.
- [11] Hertz, *J Neurosci Res*. **1999**, 57, 417-28.
- [12] Daikhin, *J Nutr*. **2000**, 130/4S, 1026S-31S.
- [13] Murin, *Neurochem Res*. **2009**, 34, 480-9.
- [14] Zwingmann, *NMR Biomed*. **2003**, 16, 370-99.
- [15] Bixel, *Neurochem Res*. **2004**, 29, 2057-67.
- [16] Murin, *Neurochem Res*. **2010**, 35, 2053-61.
- [17] Murin, *Neurochem Res*. **2009**, 34, 1195-203.
- [18] Murin, *Neurochem Res*. **2009**, 34, 194-204.
- [19] Bixel, *J Histochem Cytochem*. **1997**, 45, 685-94.
- [20] Bixel, *J Histochem Cytochem*. **2001**, 49, 407-18.
- [21] Murin, *Neurochem Res*. **2008**, 33, 279-84.
- [22] Anderson, *Glia*. **2000**, 32, 1-14.
- [23] Takano, *Nat Med*. **2001**, 7, 1010-5.

Aktivácia apoptózy počas ischémie a reperfúzie v myokarde potkanov.

Timková, V.¹, Tatarková, Z.¹, Kovalská, M.², Račay, P.¹, Lehotský, J.¹, Kaplán, P.¹

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

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are the major cause of mortality and morbidity in the developed world. Recent studies suggest that apoptosis, programmed cell death, plays an important role in the pathogenesis in a variety of CVD, including ischemic heart disease, myocardial infarction and ischemia-reperfusion injury. Considerable evidence supports the view that mitochondrial apoptotic pathway is involved in these pathologies but the exact mechanism is not yet clear. To study the role of mitochondria in ischemia-reperfusion injury we assessed the levels of two important members of mitochondrial apoptotic pathway, apoptosis-inducing factor (AIF) and cytochrome c (CytC), in isolated Langendorff perfused rat hearts subjected to 20 min ischemia (I) or 20 min ischemia followed by 30 min reperfusion (IR). The number of apoptotic cells in hearts subjected to I and IR increased nearly 9- and 13-fold, respectively, as detected by TUNEL method. The level of AIF significantly increased after I, while it was only slightly elevated after IR. On the other hand, mitochondrial content of CytC was significantly decreased during I, and there was further decrease after IR. These results suggest that mitochondrial apoptotic pathway is an important contributor to myocardial ischemia-reperfusion injury.

Key words: ischemia-reperfusion injury, heart, apoptosis, TUNEL

Úvod

Kardiovaskulárne ochorenia sú hlavnou príčinou chorobnosti a úmrtnosti vo vyspelých krajinách. Ischémia a ischemicko-reperfúzne poškodenie srdca 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 boli sledované vo vzťahu k možnej redukcii rozsahu poškodenia myokardu či poklesu úmrtnosti po IR poškodení [2]. Narušenie homeostázy vápnika, nárast reaktívnych foriem kyslíka, pokles vysokoenergetických fosfátov a akumulácia škodlivých produktov metabolizmu zohrávajú kľúčové úlohy v patogenéze IR poškodenia. V súčasnosti je jednoznačne dokázané, že mitochondrie majú významnú úlohu pri sprostredkovaní ochrany, ako aj poškodenia počas ischémie a reperfúzie myokardu [3]. Xu a kol. [4] popísali, že prechodná blokáda transportu elektrónov (inhibícia komplexu I amobarbitalom) počas ischémie alebo pred nástupom reperfúznej fázy, je schopná ochrániť mitochondrie voči IR poškodeniu. Iné práce popísali, že v dôsledku tejto inhibície sa zlepšuje funkcia oxidačnej fosforylácie. Neboli pozorované výraznejšie zmeny v hladine anti-apoptotického Bcl-2 proteínu, pričom sa znížila miera otvorenia permeabilného tranzitného póru v mitochondriách po IR poškodení myokardu. Následne tieto zmeny viedli k zníženiu uvoľnenia cytochrómu c do cytozolu [6]. Práve preto, jedným z významných modulátorov IR poškodenia srdca je mitochondriová dráha apoptózy lokalizovanej v mitochondriách. Na základe nedávnych štúdií sa zdá, že cytochróm c (CytC) a apoptózu-indukujúci faktor (AIF) zohrávajú jednu z kľúčových úloh počas mitochondriami sprostredkovanej dráhy apoptózy. AIF je jadrom kódovaný flavoproteín lokalizovaný v medzimembránovom

priestore je ukotvený k vnútornej membráne mitochondrií, pričom za fyziologických podmienok sa prejavuje aj jeho antioxidačná úloha [5]. Na druhej strane, po uvoľnení AIF do cytozolu nasleduje jeho translokácia do bunkového jadra, čím zvyšuje mieru apoptózy nezávislej od kaspázy, a to stimuláciou kondenzácie chromatinu a fragmentácie DNA [6]. Keďže nižšia expresia mitochondriálneho AIF je stimulátorom poškodenia myokardu po IR, je dôležité zachovať obsah apoptózu-indukujúceho faktora v mitochondriách [5]. Zvýšená permeabilizácia vonkajšej mitochondriovej membrány a uvoľnenie CytC ovplyvňuje aj samotný transport elektrónov v dýchacom reťazci mitochondrií, čo následne vyvoláva stratu transmembránového potenciálu mitochondrií a pokles hladiny ATP. Cytochróm c sa v dôsledku týchto zmien redistribuuje do cytozolu a ponaviazaní na ďalší apoptózu aktivujúci faktor APAF1 vedie k aktivácii kaspázového systému, konkrétne dráhu kaspázy 9 [6].

Cieľom našej práce bolo sledovať mieru aktivácie mitochondriovej dráhy apoptózy počas ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu u dospelých potkanov.

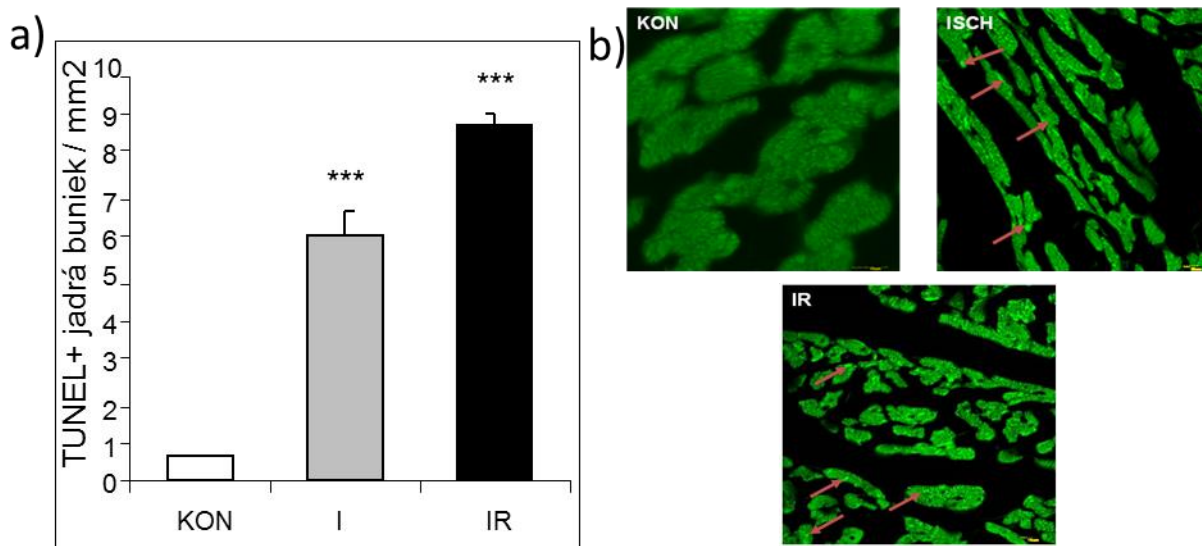
Materiál a metodika

Pre naše experimenty sme použili srdcia dospelých (6 mes) potkanov kmeňa Wistar, $n=6$. Experimentálne zvieratá boli rozdelené do troch skupín. Kontrolná skupina (K) srdca bola perfundovaná podľa Langendorffa nepretržite 65 minút, ischemická skupina (I) bola vystavená 20-min globálnej ischémii a ischemicko-reperfúznej (IR) skupine bola po ischemickej perióde ešte indukovaná 30-min reperfúzia.

Srdcové tkanivo narezané na hrúbku 30 μm sme použili na špecifickú identifikáciu apoptotických buniek s využitím metódy TUNEL, ktorá bola robená v spolupráci s Ústavom histológie a embryológie JLF UK v Martine. Druhú skupinu tvorili srdcia, z ktorých sme vyizolované mitochondrie pre biochemické analýzy. Na detekciu miery apoptózy sme použili western blotting s imunodetekciou a protilátkami anti-cytochróm c mouse monoclonal (1:200) a anti-AIF rabbit polyclonal antibody (1:500, Santa Cruz Biotechnology). Výsledky boli vyhodnotené programom GrafPad InStat V3.01 s využitím Student-Neuman-Keulsovoho testu, kedy hladina $p < 0,05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

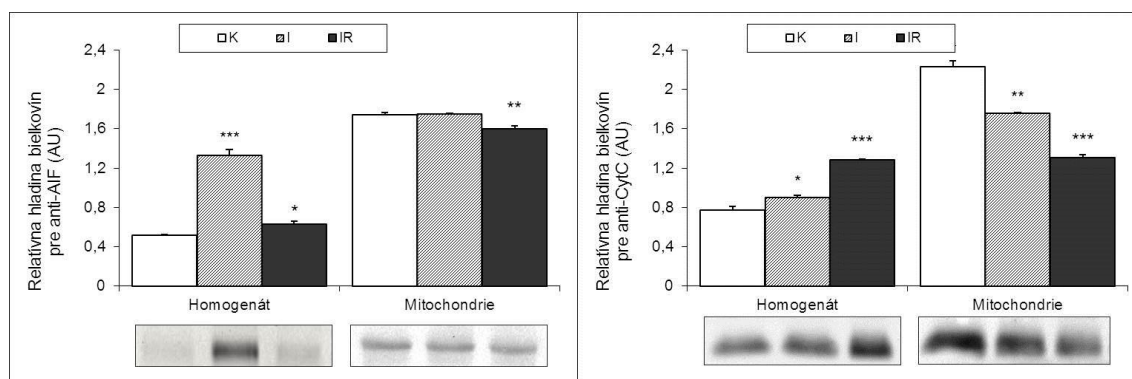
Výsledky a diskusia

Biologický mechanizmus apoptotickej kaskády je veľmi komplexný a zložitý. Vo väčšine prípadov sa uskutočňuje iba v individuálnych bunkách bez ovplyvnenia susedných elementov. Jedným z najdôležitejších znakov apoptotickej bunky je zaguľatený tvar, zmenšený objem z dôvodu zníženého množstva vody a elektrolytov, poškodený bunkový matrix, zmeny v cytoslekte, kondenzácia chromatinu či extrakcia proteínov z jadra do cytoplazmy. Apoptotické bunky sú pomerne ľahko rozpoznateľné vo všetkých druhoch tkanív, líšia sa iba vo frekvencii svojho výskytu. Práve preto jedným z významných modulátorov IR poškodenia myokardu je proces v mitochondriách lokalizovanej apoptózy. Zhang a kol. [7] poukázali na to, že IR poškodenie srdca je sprevádzané rozsiahlou smrťou kardiomyocytov. Metóda TUNEL nám umožnila identifikovať jadrá apoptotických buniek kardiomyocytov (Obr. 1) a to detekciou voľných 3'-OH DNA zakončení, ktoré sú prítomné v jadre buniek počas apoptózy.



Obr. 1 a) Kvantifikácia počtu TUNEL+ buniek v srdci potkanov po Ia IR, b) Fluorescenčné mikrofotografie TUNEL metódy v myokarde potkana po I a IR. Šípky→ označujú TUNEL+ jadrá buniek. Úsečka zodpovedá dĺžke 10 µm.

Identifikovali sme zvýšený počet TUNEL pozitívnych (+) buniek v skupine po indukovanej ischemii, kde sa počet imunoreaktívnych buniek zvýšil približne 9-násobne a v skupine vystavenej IR bol počet buniek 13-násobne ($p < 0,001$) vyšší v porovnaní kontrolnou skupinou. Mnohé štúdie potvrdili dôležitosť cytochrómu c (CytC) a apoptózu-indukujúceho faktora (AIF) pri mitochondriálnej dráhe apoptózy.



Obr. 2 Western blotová analýza vplyvu I a IR na hladinu a) AIF a b) CytC v homogenáte a v mitochondriách srdca. Hladiny predstavujú priemer \pm SEM, $n=3$ individuálnych stanovení * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ signifikantne odlišné oproti kontrole.

V tkanivových homogenátoch sme pozorovali signifikantný nárast produkcie AIF proteínu o $61,2 \pm 2,3\%$ ($p < 0,001$) po indukovanej globálnej ischemii myokardu (Obr. 2: a), pričom po znovuobnovení prietoku koronárnou tepnou sme detegovali iba mierny nárast relatívnej hladiny AIF oproti kontrolnej skupine srdca. AIF sa štiepi na t-AIF v dôsledku aktivácie mitochondriového kalpáinu, pričom t-AIF je delokalizovaný do medzimembránového priestoru. Inserte a kol. [8] poukázali na to, že obsah AIF ako aj t-AIF sa nemení počas ischemie v mitochondriách, čo sme zaznamenali aj v našom experimente (Obr. 2: a). Na druhej strane v dôsledku IR poškodenia klesol obsah AIF, avšak iba o $8,8 \pm 1,6\%$. Podobné výsledky zaznamenali [9], keď sa znížilo množstvo obidvoch foriem AIF v mitochondriách srdca, a teda sa zvyšovala miera ich translokácie do cytolu. Zvýšená permeabilizácia vonkajšej membrány mitochondrií a uvoľnenie

CytC ovplyvňuje aj samotný transport elektrónov v dýchacom reťazci mitochondrií, pričom postupne klesá aj hladina ATP. Cytochróm c je v dôsledku týchto zmien redistribuovaný do cytozolu a vedie k aktivácii kaspázami-sprostredkovanej apoptózy. V našich experimentoch sme sledovali postupný nárast množstva cytochrómu c v homogenátoch srdca počas ischemickej fázy so významným vzostupom po indukovaní IR myokardu až o 67,4% (Obr. 2b) oproti kontrolnej skupine srdc. Ischémia stimulovala uvoľnenie cytochrómu c z mitochondrií do cytozolu, čím jeho množstvo v mitochondriách klesalo [8]. Niektoré práce dokázali, že inhibícia elektrónového transportu v dýchacom reťazci má protektívny účinok na uvoľnenie cytochrómu c z mitochondrií počas ischémie myokardu [4, 9].

Záver

Ochorenia kardiovaskulárneho systému predstavujú v súčasnej dobe závažný medicínsky problém, keďže sú napriek rozsiahlej a dlhodobej liečbe hlavným dôvodom úmrtnosti obyvateľstva na celom svete. Podstatou IR poškodenia je vznik funkčných a biochemických zmien v bunkových organelách, najmä v mitochondriách, kde dochádza k zvýšenej produkcii ROS a k indukcií apoptoticky pôsobiacich faktorov. Aj keď sa apoptóza objavuje s relatívne nízkou frekvenciou po inzulte ako IR poškodenie, je to konštantný proces vyúsťujúci do progresívnej straty kardiomyocytov, ktorý postupne redukuje schopnosť kontraktility srdcového svalu. Zistili sme, že pri I a IR dochádza k prestupu pro-apoptotických molekúl AIF a CytC z mitochondrií. Tieto výsledky potvrdzujú poškodenie membrán mitochondrií kardiomyocytov a poukazujú na význam týchto faktorov apoptózy v myokarde.

Práca bola podporená grantmi MŠVVaŠ SR a SAV, VEGA 1/0129/14 a VEGA 1/0213/12 a grantom „Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení“ spolufinancovaných zo zdrojov ES a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Shimokawa, *Journal of cardiology*. **2008**, 52, 67-78.
- [2] Kimura, *Journal of cardiology*. **2009**, 53, 65-71.
- [3] Stowe, *Antioxidants and redox signaling*. **2009**, 11, 1373-1414.
- [4] Xu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, 5, 627-633.
- [5] Wang, *Experim. Neurology*. **2009**, 218, 193-202.
- [6] Norberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 396, 95-100.
- [7] Zhang, *Am. J. Physiol.* **2010**, 298, 433-439.
- [8] Ince, *Cardiovasc. Res.* **2009**, 81, 116-122.
- [9] Chen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, 415, 533-538.

Úloha tyrozínu pri poškodení kardiomyocytov počas ischémie a reperfúzie srdca.

Tatarková, Z.¹, Kovalská, M.², Timková, V.¹, Račay, P.¹, Lehotský, J.¹, Kaplán, P.¹

¹Ústav lekárskej biochémie JLF UK Martin, ²Ústav histológie a embryológie JLF UK Martin
tatarkova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Functional, biochemical and ultrastructural damage during myocardial ischemia-reperfusion injury is characterized by an overproduction of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which directly attack the molecules of proteins, lipids and Ca^{2+} overload in the cytosol, where the sarcoplasmic reticulum plays an important regulatory function. In our experiments we used the hearts of the adult rats, specifically the homogenate and fractions of sarcoplasmic reticulum (SR), which were divided into three groups: control, ischemic (I) and ischemia-reperfusion (IR). Oxidative stress and calcium overload lead to subsequent abnormalities in contractility of the myocardium. Therefore, we have analyzed basal parameters of the heart function. We observed changes in the rate of contraction indexes (LV +dP/dt) and relaxation (LV -dP/dt) of the heart, which had recoverability after induced IR 62.8%, respectively 57.0%. The production of dityrosine increased during ischemia with no changes after IR when compared to control in heart tissue, but in contrary, decreasing trend was observed in SR. The attack of RNS led to the massive increase in the amount of nitrotyrosines after IR injury. The nitration in the sarcoplasmic reticulum caused elevation of the modified proteins, especially one with a molecular weight of about 100 kDa. According immunohistochemical analyzes, an extent of protein tyrosines nitration was higher in intracellular structures like SR after myocardial ischemia when compared to control and IR group. It seems like sarcoplasmic reticulum plays a very important role during IR of adult heart. IR injury is directly linked to cardiac dysfunction and results in an imbalance in Ca^{2+} homeostasis and highly affects calcium-related proteins through nitrosylation.

Key words: ischemia-reperfusion injury, heart sarcoplasmic reticulum, tyrosine

Úvod

Ischemicko-reperfúzne (IR) poškodenie myokardu je jednou z hlavných príčin srdcového zlyhania. Je charakterizované nedostatočným prívodom kyslíka a živín, spomalenou asynchrónnou kontrakciou a porušenou relaxáciou srdcového svalu [1]. Kľúčovým regulátorom srdcovej funkcie je hladina intracelulárneho Ca^{2+} , ktorý pôsobí ako druhý posol a zohráva dôležitú úlohu v regulácii fyziológie a patofyziológie srdca. Práve pozmenená expresia a aktivita Ca^{2+} -regulovaných proteínov by mohla mať kľúčovú úlohu pri dysfunkcii srdca, ktorá je pozorovaná u mnohých pacientov so srdcovým zlyhaním [2]. Počas ischémie je v dôsledku nedostatku kyslíka inhibovaná oxidačná fosforylácia, čo následne znižuje syntézu ATP. Akumulácia laktátu a zrýchlené okyslenie v dôsledku anaeróbnej glykolýzy postupne vedie k preťaženiu iónmi Na^+ a k vzostupu koncentrácie Ca^{2+} v cytozole, ako aj k abnormálnej aktivite Ca^{2+} -ATPázy [3]. Znovuobnovenie prísunu kyslíka reperfúziou je nevyhnutné pre zlepšenie fungovania ischemizovaného srdca, avšak je stimulátorom bunkovej smrti v kardiomyocytoch [4]. Prudká obnova membránového potenciálu mitochondrií má za následok rozpojenie oxidačnej fosforylácie, nárast reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a vedie k trvalému vzostupu hladiny Ca^{2+} , ktorý je vychytávaný mitochondriami [5].

Práve v dôsledku porušenej vápnikovej homeostázy sú Ca^{2+} -regulované proteíny jedným z hlavných cieľov ataku IR-vyvolaných zmien v srdci. Pritom môžu byť modifikované niektorými sekundárnymi produktmi lipoperoxidácie alebo priamo voľnými radikálmi kyslíka a dusíka, ktoré útočia na bočné reťazce zvyškov aminokyselín. Jednou z takýchto aminokyselín je tyrozín. Po ataku ROS na tyrozín vznikajú z páru tyrozylových radikálov priame produkty radikálovej reakcie dityrozínu (diTyr). Na druhej strane je nitrácia tyrozylových zvyškov sprostredkovaná reaktívnymi formami dusíka (RNS), ktorá môže viesť k následnej nitrozylácii proteínov. Avšak nie všetky tyrozínové zvyšky proteínov podliehajú nitrácii. Existuje tu určitý stupeň selektivity na štrukturálno-funkčnej úrovni (špecifické funkčné domény bielkovín) ako aj nitráciou spôsobený posun v hodnote pKa, čím sa pozmení štruktúra a/alebo funkcia daného proteínu [6]. Za podmienok *in vivo* existuje určitý stupeň ochrany (napr. glutatión), avšak ak vznikne prednostne 3-nitrozotyrozín a z neho 3-nitrotyrozín, tento krok prevencie sa obchádza. U mnohých klinických porúch bola spolu s nárastom oxidačného stresu pozorovaná aj nitrácia tyrozínu, avšak len v určitých typoch buniek a na niektorých poškodených miestach danej bunky [7]. Pochopenie špecifických modifikácií zvyškov aminokyselín proteínov by mohlo napomôcť pri objasnení patofyziológie myokardu. Preto cieľom našej práce bolo sledovať mieru poškodenia tyrozínu v dôsledku ataku reaktívnych foriem kyslíka a dusíka s dopadom na proteíny myokardu po I a IR poškodení.

Materiál a metodika

Pre naše experimenty sme použili srdcia dospelých (6 mes) potkanov kmeňa Wistar, $n=6$. Experimentálne zvieratá boli rozdelené do troch skupín. Kontrolnú skupinu (K) srdc bola perfundovaná podľa Langendorffa nepretržite 65 minút, ischemická skupina (I) bola vystavená 20-min globálnej ischémii a ischemicko-reperfúzne (IR) skupine bola po ischemickej perióde ešte indukovaná 30-min reperfúziou.

Srdcia boli zhomogenizované a následne vyizolované sarkoplazmatické retikulum. Množstvo dityrozínu bolo stanovené spektrofotometricky a tvorba 3-nitrotyrozínu podľa komerčného kitu (Bioxytech, Nitrotyrosine-EIA). Na detekciu miery nitrácie tyrozínových zvyškov proteínov bol použitý western blotting s imunodetekciou a protilátka anti-nitrotyrosine rabbit polyclonal (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Imunohistochemická analýza tkanivových rezov myokardu bola robená v spolupráci s Ústavom histológie a embryológie JLF UK v Martine. Pre detekciu a lokalizáciu nitrotyrozín-pozitívnych miest sme použili rovnakú protilátku anti-nitrotyrosine rabbit polyclonal (1:50, Santa Cruz Biotechnology). Výsledky boli vyhodnotené programom GrafPhad InStat V3.01 s využitím Student-Neuman-Keulsovoho testu, pričom hladina $p<0,05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

Výsledky a diskusia

Ischemicko-reperfúzne poškodenie myokardu je spojené s funkčným, biochemickým a ultraštruktúrnym poškodením [1], pričom je charakterizované dvomi patologickými procesmi, nadprodukciou ROS a Ca^{2+} preťažením v cytozole [3]. Obidva mechanizmy vedú k poškodeniu Ca^{2+} homeostázy a následným výskytom abnormalít kontraktilnej funkcie myokardu. Hlavným regulátorom intracelulárnej koncentrácie vápnika je sarkoplazmatické retikulum (SR), ktoré tak zohráva kľúčovú úlohu pri posudzovaní miery kontraktility myokardu [8]. Preto na začiatku experimentov sme sledovali zmeny v základných parametroch činnosti srdca. Tepová frekvencia ako aj prietok koronárnou tepnou neboli ovplyvnené IR, avšak výrazné zmeny sme zaznamenali v indexoch rýchlosti kontrakcie (+LV dP/dt) a relaxácie (-LV dP/dt) srdca (Tab.1), ktoré mali

návratnosť po indukovanej IR 62,8% resp. 57,0%. Znížená kontraktilita myokardu môže byť negatívne ovplyvnená SR, ktoré reguluje hladiny vápnika.

Tab. 1 Základné parametre činnosti srdca dospelých potkanov

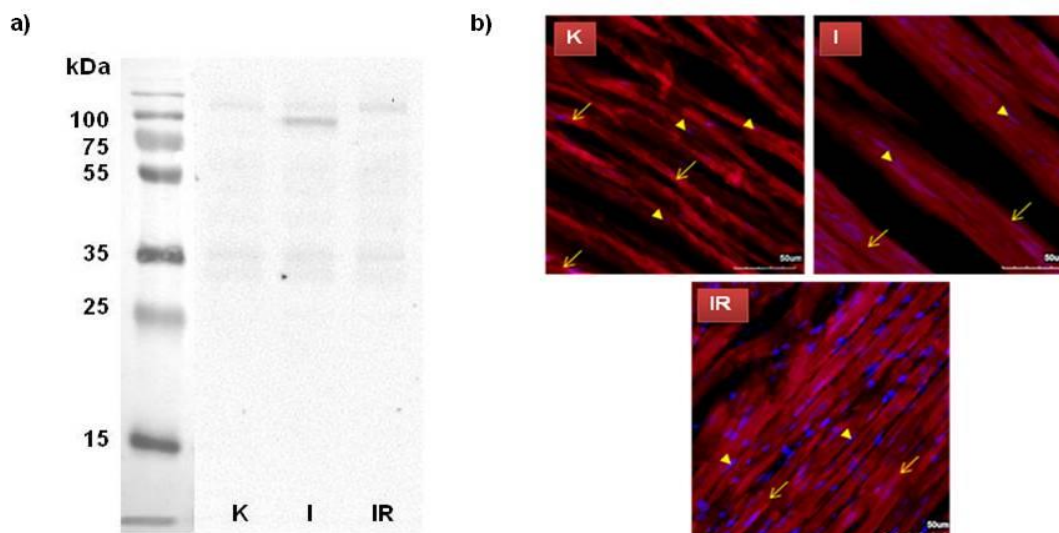
Parameter / Skupina	K	po IR
Prietok koron. tepnou (ml/min)	15,10 ± 0,61	13,94 ± 0,60
Tepová frekvencia (min ⁻¹)	242,88 ± 31,97	193,36 ± 28,61
+ LVdP/dt (mmHg/s)	1603,00 ± 347,22	1007,44 ± 127,48
- LVdP/dt (mmHg/s)	1007,40 ± 71,14	669,48 ± 83,08

Keďže koncentrácia proteínov v SR nebola ovplyvnená, zamerali sme sa na jeden z markerov oxidačného poškodenia proteínov, aminokyselinu tyrozín. Po ataku ROS na tyrozín vznikajú z páru tyrozylových radikálov priame produkty radikálovej reakcie dityrozíny. Zistili sme približne rovnakú mieru ich produkcie v K a IR skupine v homogenátoch s ich vzostupom tvorby po ischémii. Táto skutočnosť však ešte neznamena, že funkcia proteínu nie je narušená. Stačí ak vzniknú dityrozínové krížne väzby, čím sa naruší stabilita štruktúry proteínu. Naopak v SR sme pozorovali kontinuálny pokles produkcie dityrozínov v priebehu ischémie s pretrvávajúcim poklesom počas reoxygenačnej fázy (Tab. 2). Tieto zistenia naznačujú snahu SR zabrániť potenciálnemu poškodeniu mechanizmami, ktoré nám nie sú nateraz známe.

Tab. 2 Vplyv I a IR na tvorbu dityrozínov a 3-nitrotyrozínov v tkanive srdca

Skupina	Tvorba dityrozínov (Intenzita fluorescencie, a.u.)		Obsah 3-nitrotyrozínov (pmol/mg proteínov)
	Homogenát	Sarkoplazm. retikulum	Homogenát
K	130,10 ± 2,11	11,53 ± 1,17	0,94 ± 0,05
I	140,22 ± 5,11 *	9,41 ± 0,27 *	1,76 ± 0,31 *
IR	130,05 ± 3,77	8,54 ± 0,53 *	11,44 ± 1,12 ***

Na druhej strane je nitrácia tyrozylových zvyškov sprostredkovaná RNS. Jedným z vysvetlení prečo sme nepozorovali v homogenátoch zásadné zmeny po IR, by mohlo byť, že väčšia časť tyrozínových zvyškov podlieha procesu nitrácie. Dokázali sme masívny nárast produkcie 3-nitrotyrozínov (z 0,94±0,05 na 11,44±1,12 pmol/mg proteínov) v IR skupine (Tab. 2). V niektorých orgánoch boli identifikované denitračné procesy, čo poukazuje na možnosť reverzibilnej nitrácie tyrozínu. Avšak, či enzýmový denitračný komplex existuje a do akej miery je relevantný za podmienok *in vivo*, stále nie je objasnené [9]. V ďalšom kroku nás zaujímalo, koľko proteínov myokardu bude modifikovaných 3-nitrotyrozínom. V homogenátoch srdca sme nezaznamenali významné zmeny (neuvedené) ale v SR sme pozorovali zmeny v K, I a IR skupine, najmä proteíny s vyššou molekulovou hmotnosťou (Obr. 1: a). Zaujímavým bol proteín (~100 kDa), ktorý by mohol zodpovedať vápnikovej pumpe SR. Pre potvrdenie predpokladov sme na tkanivové rezy aplikovali protilátku proti nitrotyrozínom. Najintenzívnejšiu kolokalizáciu 3-nitrotyrozínov v cytoplazme sme detegovali v kontrolnej skupine s následným poklesom po ischémii a opätovnom náraste v IR skupine (Obr. 1: b). Toto čiastočne vysvetľuje zvýšený výskyt modifikovaných proteínov v SR, najmä počas ischémie, oproti celkovému homogenátu. Výsledkom je teda vyššia miera nitrácie proteínových tyrozínov v intracelulárnych štruktúrach (sarkoplazmatické retikulum) po 20-min globálnej ischémii myokardu v porovnaní s pozorovanou cytoplazmatickou lokalizáciou.



Obr. 1 a) western blotová analýza vplyvu I a IR na mieru nitrácie tyrozínov proteínov v SR, b) fluorescenčné mikrofotografie imunohistochemickej detekcie nitrotyrozínov v myokarde.

Šípka → označuje cytoplazmatickú pozitivitu, ► jadrá kardiomyocytov. Dĺžka úsečky je 50μm.

Avšak nie všetky tyrozínové zvyšky proteínov podliehajú nitrácii. Existuje určitý stupeň selektivity na štrukturálno-funkčnej úrovni, čo je jeden z faktorov ovplyvňujúcich nitráciu tyrozínov, ktorá je lokalizovaná na špecifických funkčných doménach modifikovaných proteínov. Toto predstavuje jeden z cieľov súčasných proteomických štúdií, ako aj potenciálna reverzibilita vzniknutých nitro-proteínov.

Záver

Akumulácia špecifických nitro-proteínov, ktorá koreluje s patologickými procesmi naznačila, že nitrácia tyrozínov reprezentuje dynamický a selektívny proces a nejde len o niečo náhodné. U mnohých klinických porúch bola spolu s nárastom oxidačného stresu pozorovaná aj nitrácia tyrozínu, avšak len v určitých typoch buniek a na niektorých poškodených miestach danej bunky. Naše experimenty poukázali na masívny nárast tvorby 3-nitrotyrozínov počas reoxygenačnej fázy v ischemizovanom myokarde. Na druhej strane práve ischemia sa javí kritickou pri nitrácii proteínov sarkoplazmatického retikula, ktoré zohráva kľúčovú úlohu pri posudzovaní miery kontraktility myokardu.

Práca bola podporená grantmi MŠVVaŠ SR a SAV, VEGA 1/0129/14 a VEGA 1/0213/12 a grantom „Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení“ spolufinancovaných zo zdrojov ES a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Luo, *Circ. Res.* **2013**, 113, 690–708.
- [2] Viola, *Heart Lung Circ.* **2014**, 23, 602–609.
- [3] Mozaffari, *Am. J. Cardiovasc. Dis.* **2013**, 3, 180–196.
- [4] Garcia-Dorado, *Cardiovasc. Res.* **2012**, 94, 168–180.
- [5] Ong, *Cardiovasc. Res.* **2012**, 94, 190–196.
- [6] Zhan, *Anal. Biochem.* **2006**, 354, 279–289.
- [7] Mutay, *J. Proteomics.* **2011**, 74, 2274–2288.
- [8] Chohan, *Cardiovasc Res.* **2006**, 69, 152–163.
- [9] Shao, *J. Mol Cell Cardiology.* **2012**, 52, 550–558.

Predikcia embryonálneho pôvodu myoidných buniek týmusu na základe imunohistochemickej analýzy

Mešťanová, V.^{1,2}, Adamkov, M.², Drahošová, S.³, Benčat, M.³, Varga, I.⁴

¹ Ústav lekárskej biochémie, JLF UK Martin, ² Ústav histológie a embryológie, JLF UK Martin, ³ Alpha Medical, Patológia, s.r.o., Martin, ⁴ Ústav histológie a embryológie, LFUK Bratislava
mestanova.veronika@gmail.com

Abstract

Physiological development of the thymic T lymphocytes depends on the cellular and humoral non-lymphoid microenvironment that is responsible for the precursor T cells proliferation and maturation. Contribution of the individual specific cell populations and the precise mechanisms underlying the process of acquiring immunocompetence is largely unknown. Thymic myoid cells are one such cell type. Thymic myoid cells are localised mostly in the area of the cortico-medullary junction and in the medulla. Extramedullary localization is typical for the early fetal development period. Myoid cells possess antigenic characteristics specific for the skeletal muscle cells. Despite of the frictions considering embryonic origin and functions of the myoid cells, an enormous biological role is subscribed to this thymic cell population arising from their precise conservation during the evolution. Presented immunohistochemical study, primarily focused on detection of myoid thymic cells, was performed on the human thymic tissue obtained during the partial thymectomy from the patients suffering from the various congenital heart defects. For immunohistochemical analysis the markers (desmin, α -actin and MyoD) for myoid cells and subsequent semiquantitative evaluation were used. Our observations suggest that the quantity of the myoid thymic cells descends in such congenital heart defects that pathogenesis is closely related with the disrupted migration of the neural crest cells that participate on formation of conotruncal portion of the developing heart. To sum our findings up, thymic myoid cells are of neuroectodermal origin

Úvod

Myoidné bunky týmusu predstavujú málopočetnú bunkovú populáciu, ktorá sa podieľa na formovaní jedinečného mikroprostredia a determinuje adekvátny rozvoj získaných imunitných reakcií organizmu a imunologickej tolerancie. Počas evolúcie živočíšnych druhov sa myoidné bunky vyznačujú vysokou mierou konzervácie a preto sa im pripisuje obrovský fyziologický význam [1-2]. Prvé pozorovanie a identifikácia myoidných buniek týmusu sa datuje do roku 1888, kedy Mayer opisuje dlhé bunky vretenovitého tvaru s výrazným priečnym pruhovaním v cytoplazme [3]. Vedecký náhľad na embryonálny pôvod myoidných buniek týmusu nie je jednotný, o čom svedčí existencia a pretrvávanie niekoľkých teórií. Časť vedeckej obce sa prikláňa k názoru o extra-týmusovom pôvode a teda o myoidných bunkách týmusu uvažujú ako o sekundárných inklúziách. Iní autori preferujú neuroektodermovú hypotézu pôvodu týchto buniek a teda, že pochádzajú z migrujúcej štruktúry neurálnej lišty [4-6]. U človeka je myoidná bunková populácia lokalizovaná najmä v dreni a kortikomedulárnej oblasti týmusu. Podobne ako u ostatných živočíšnych druhov, vyznačuje sa nízkym počtom buniek [7-8]. Viaceré práce dokazujú podobnosť so svalovými bunkami nielen na fenotypovej, ale aj na molekulárnej úrovni. Cytoplazmatická membrána myoidných buniek sa vyznačuje expresiou niekoľkých markerov identických s bunkami kostrového svalu a to konkrétne dezmin, myozín, troponín T, myogénny transkripčný faktor a päť podjednotiek acetylcholínového

receptoru [9-10]. Práve posledný menovaný exprimovaný proteín naznačuje rolu myoidných buniek týmusu v imunopatogenéze autoimunitného ochorenia *myasthenia gravis* [11]. V posledných rokoch niektorí autori zmieňujú dokonca o účasti myoidných buniek týmusu na vzniku onkologických ochorení rhabdomyómov a rhabdomyosarkómov [12]. Napriek pomerne veľkému záujmu o postavenie myoidných buniek v patogenéze rôznych ochorení, ich fyziologická funkcia nie je jednoznačne definovaná. Predpokladá sa, že myoidné bunky týmusu participujú na migrácii lymfoidných buniek naprieč orgánom prostredníctvom ich spasmodických kontrakcií [4]. Na druhej strane, biologická aktivita myoidných buniek týmusu v procese diferenciácie a selekcie imunokompetenciu nadobúdajúcich T lymfocytov je pripisovaná najmä ich účasti na riadení programovanej bunkovej smrti. Demonštrácia nadmernej produkcie TNF- α a IL-8 v bunkových kultúrach myoidných buniek môže byť poznatkom, ktorý podporí hypotézu regulačnej aktivity myoidných buniek v diferenciačnom procese vyvíjajúcich sa a zrejúcich tymocytov [13].

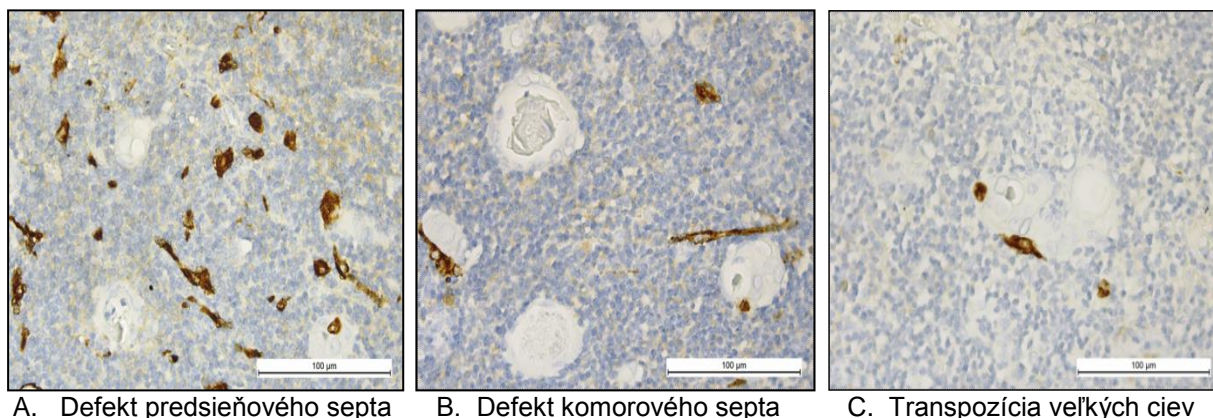
Materiál a metodika

Vzorky tkaniva týmusov boli odobraté počas chirurgickej korekcie vrodenej vývinovej chyby srdca u pacientov Detského kardiocentra v Bratislave. Bezprostredne po odbere bolo tkanivo fixované v 4 % formaldehyde. Následne bolo štandardnou metodikou zaliate do parafínu. Pre imunohistochemickú detekciu myoidných buniek týmusu boli použité monoklonálne protilátky proti desminu, alfa-aktínu, and myoD. Celkový počet analyzovaných vzoriek týmusov bol 31. Vekové rozpätie bolo od päť dní do 13 rokov. Z uvedeného súboru 83,33 % pacientov tvorili deti do jedného roku života.

Výsledky a diskusia

Pozitívna imunohistochemická detekcia myoidných buniek týmusu v dreni a v oblasti rozhrania kôry a drene orgánu, konkrétne použitím protilátok voči desminu, alfa-aktínu a MyoD, korešponduje s výsledkami viacerých autorov [9-10], ktorí dokázali zhodu viacerých antigénnych charakteristík myoidných buniek s antigénmi svalových buniek. Avšak naše závery zamerané na embryonálny pôvod myoidných buniek týmusu sa nezhodujú so zisteniami Wonga a spol. [14]. Tí uvádzajú, že vývin populácie myoidných buniek týmusu má spoločné prvky s vývinom periférnych svalových elementov v dôsledku zníženého počtu myoidných buniek v tkanive týmusu v prípadoch mdx dystrofických myší. Výsledky našej štúdie poukazujú na pokles výskytu myoidných buniek v týmuse pri takých vrodených vývinových anomáliách srdca, ktoré nastali narušeným transferom buniek neurálnej lišty. Spomínané pluripotentné bunky migrujú cez 3. faryngový vačok a okrem iného participujú aj na rozvoji párových primordií týmusu [2, 15]. Práve na tejto skutočnosti sa zakladajú naše predpoklady o neuroektodermálnom pôvode myoidných buniek týmusu. Závery predloženej práce sú v súlade s dnes najviac akceptovanou hypotézou, ktorá myoidné bunky týmusu označuje za deriváty neurálnej lišty [6]. Myoidné bunky týmusu patria do kategórie buniek, ktorých fyziologická funkcia nie je dodnes dostatočne objasnená. Väčšia pozornosť je sústredená na rolu myoidných buniek v patologických procesoch. Dostupné sú štúdie zaoberajúce sa participáciou myoidných buniek týmusu najmä na patogenéze autoimunitného ochorenia *myasthenia gravis*. Predpokladom pre túto hypotézu je schopnosť uvedených buniek vystupovať ako antigén prezentujúce bunky a to konkrétne exprimovať acetylcholínový receptor na ich bunkovom povrchu [16-17]. Medzi predpokladané fyziologické vlastnosti myoidných buniek týmusu patrí ich potenciálna participácia na indukcii a zachovaní imunologickej tolerancie [9]. Závery našej imunohistochemickej analýzy nastoľujú otázku, či môže pokles počtu myoidných

buniek týmusu prispieť k zníženej obranyschopnosti organizmu, keďže práve prítomnosť týchto buniek zabezpečuje afinitu a infiltráciu progenitorových T-lymfocytov do parenchýmu týmusu počas 2. a 3. trimestra intrauterinného vývinu jedinca [18].



Obr. 1 Detekcia myoidných buniek pomocou monoklonovej protilátky alfa-aktín (zväčšenie 100x). Mikrofotografia A demonštruje fyziologickú početnosť myoidných buniek v dreni týmusu u pacienta s defektom predsieňového septa (DAS). Mikrofotografie B a C zachytávajú znížený počet myoidných buniek v oblasti Hassallových teliesok drene týmusu u pacientov s diagnostikovaným defektom komorového septa (DVS) a transpozíciou veľkých ciev (TGA). DVS a TGA patri do skupiny vrodených vývinových chýb srdca, ktoré sú podmienené patologickou migráciou pluripotentných buniek kardiogénnej sekcie neurálnej lišty, čoho dôsledkom je pokles výskytu myoidných buniek týmusu. Patogenéza DAS nie je podmienená správnym presunom buniek kardiogénnej neuroektodermy, a teda početnosť myoidných buniek nie je nepriaznivo ovplyvnená.

Záver

Imunohistochemická analýza vzoriek tkaniva týmusu prostredníctvom použitia monoklonových protilátok desmín, aktín a MyoD naznačuje, že kvantita myoidných buniek drene týmusu sa znižuje pri takých vrodených vývinových chybách srdca, ktorých etipatogenéza je podmienená migráciou pluripotentných buniek neurálnej lišty. Na základe predložených výsledkov môžeme predpokladať, že myoidné bunky týmusu majú neuroektodermový embryonálny pôvod. Pre definitívne konštatovanie je potrebné kontinuálne pokračovať vo výskumnej činnosti, a to z pohľadu navýšenia počtu vzoriek ako aj aplikácie iných biologicko-molekulárnych metód.

Práca bola podporená grantom VEGA č. 1/0902/11 – Týmus v ontogenéze človeka.

Literatúra

- [1] Van de Velde, *Am J Pathol.* **1970**, 59/2, 347-368.
- [2] Béder. *Systema lymphaticum hominis.* **2015**, ISBN 978-80-89631-27-8.
- [3] Mayer, *Anat Anz.* **1888**, 3, 97-103.
- [4] Raviola, *Am J Anat.* **1967**, 121/3, 623-645.
- [5] Roxanis, *J Neuroimmunol.* **2002**, 125/1-2, 185-197.
- [6] Nakamura, *Curr Top Dev Biol.* **1986**, 20, 111-115.
- [7] Schluep, *Ann Neurol.* **1987**, 22/2, 212-222.
- [8] Varga, *Neuro Endocrinol Lett.* **2009**, 30/3, 275-283.
- [9] Le Panse-Ruskoné, *Ann N Y Acad Sci.* **2003**, 998, 266-269.
- [10] Mesnard-Rouiller, *J Neuroimmunol.* **2004**, 148/1-2, 97-105.
- [11] Bornemann, *Virchows Arch.* **1998**, 432/4, 357-361.
- [12] Eimoto, *Histopathology.* **2002**, 40/1, 46-57.
- [13] Wakkach, *Am J Pathol.* **1999**, 155/4, 1229-1240.
- [14] Wong, *Biochem Cell Biol.* **1999**, 77, 33-40.
- [15] Varga, *Bratisl Lek Listy.* **2011**, 112/7, 368-376.

- [16] Dhillon, *J Physiol.* **1985**, 362, 349-358.
- [17] Leite, *Brain.* **2008**, 131, 1940-1952.
- [18] Lambropoulou, *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* **2007**. 111/3, 710-716.

Špecifiká histologickej metódy prípravy bunkových kultúr mezenchýmových kmeňových buniek na pozorovanie transmisným elektrónovým mikroskopom – naše vlastné skúsenosti

Miko, M.¹, Danišovič, L.², Varga, I.¹

¹ Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, ² Ústav lekárskej biológie a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

michal.miko@fmed.uniba.sk

Abstract

The main goal of this work which was to obtain quality, reproducible and comparable output from the TEM analysis of the adipose tissue-derived stem cells (or other rare cell population), to be able to concentrate on specific problems and features of cell population and not to distortions and artifacts was achieved. We repeated our procedures several times, with cell population from different passages, with different quantities, always with freshly made solutions and the result remained within the standards. Thus, we were able to describe morphology of long-term cultivated stem cells. There are several peculiarities and issues to solve when working not with solid tissue, but with cell pellets instead. And more, here we were working with relatively rare population of cells that we obtained after many days of passaging, so very efficient and gentle procedures were highly necessary. We provide a reader with detailed protocols we performed during creation of specimen suitable for a TEM analysis and specifics of processing of cell pellets.

Úvod

Výzvy súvisiace s prípravou vzorky z bunkovej suspenzie, môžu zabrániť ich analýze pomocou transmisného elektrónového mikroskopu. Bolo opísaných niekoľko metód spracovania celulárnej vzorky pre elektrónovú mikroskopiu, my predstavujeme naše skúsenosti s netypickou bunkovou populáciou - somatickými kmeňovými bunkami z rôznych zdrojov. Tieto somatické kmeňové bunky môžu mať obrovský potenciál z pohľadu regeneračnej medicíny. Výskum kmeňových buniek prináša nové poznatky o regenerácii tkanív a celých orgánov. Mnohé z týchto informácií sú postupne implementované do klinickej praxe. Mezenchýmové kmeňové bunky sú vo všeobecne mnohými autormi považované za bezpečný a preferovaný zdroj kmeňových buniek, veľmi vhodné pre biomedicínske využitie. Z týchto dôvodov v tejto práci predkladáme problematiku histologického spracovania bunkových kultúr pri príprave preparátu na elektrón mikroskopickú analýzu.

Keď pracujeme s bunkovou kultúrou a nie so solídnym tkanivom, je treba vyriešiť niekoľko problémov a zvoliť modifikovaný postup pri spracovaní týchto buniek. Ba čo viac, pracujeme zvyčajne (ako aj v našom prípade) s relatívne vzácnymi bunkovými populáciami získanými po mnohých týždňoch pasážovania, takže zvoliť čo najefektívnejší a najjemnejší postup, ktorým získame z tkaniva maximum informácií, je mimoriadne dôležité. Práve pre toto komplikované histologické spracovanie zostávala ultraštruktúra mezenchýmových kmeňových buniek v minulosti nepoznaná.

My sme zvolili semi-konzervatívny prístup, ktorý spočíval v modifikovanom rutinnom postupe pre spracovanie solídneho tkaniva pre TEM (rôzne predĺžené/skrátené časy v protokole fixácie, postfixácie, kontrastovania, zalievania a modifikované koncentrácie chemikálií, najlepšie vyhovujúce kvalitnému výstupu) a v použití centrifúgy po každom z krokov na segregáciu buniek. Diskutované boli i iné prístupy spomínané v literatúre:

zalievanie suspenzie alebo bunkového pelletu do albumínu z bovinného séra (bovine serum albumin – BSA) a akrylamidu (bis-acrylamide – BA), slúžiace na identifikáciu bunkových pelletov pre TEM procesovanie [1] alebo vytvorenie cytopsin preparátov (nízkootáčková centrifúga dokáže uložiť uniformnú vrstvičku buniek na nami definovanú plochu sklíčka a zachovať morfológiu buniek nedotknutú) nasledované TEM analýzou.

Materiál a metódy

Izolácia a kultivácia kmeňových buniek

Somatické humánne kmeňové bunky sme izolovali z rôznych zdrojov, akými sú tukové väzivo (po liposukcii), kostrový sval, zubná dreň (zdravé zuby po extrakcii z ortodontických dôvodov), kostná dreň alebo Whartonov rôsol pupočníka. Presný postup izolácie a kultivácie je uvedený v našich predchádzajúcich prácach [napr. 2-5].

Fixácia

Výhoda pri práci s bunkovou suspenziou tkvie v tom, že odpadá spracovávanie excízií (alebo iným spôsobom získaných materiálov – exfoliáciou, pukciou, lavážou, abráziou, atď.) a s tým súvisiaca narušená integrita tkaniva, jeho topografických súvislostí a poškodenie nesprávne prevedeným odobratím. Ďalšou výhodou je, že bunky môžeme fixovať okamžite a úplne, odpadá najväčší problém pri fixácii tkanív – ich autodegradačné procesy až dezintegrácia a neúplná fixácia pre komplexnosť takýchto štruktúr a následné asfyktické zmeny.

Po enzymatickom natrávení boli bunky transferované do centrifugačnej trubičky a centrifugované pri 1200 ot./min. 10 minút. Bunkový pellet bol následne fixovaný pri izbovej teplote rôzne dlhý čas v 2,5% čistenom čerstvom roztoku glutaraldehydu (dialdehyd, pH 5) [6] v 0,2M tlmivom fosfátovom pufry s dostatočnou kapacitou, s pH 7,1. Žiadne ďalšie prídavné zlúčeniny pre zvýšenie reaktivity vlastnej fixačnej látky sme nepoužili. Ako optimálny čas fixácie sme po mnohých pokusoch určili 25 minút. Tu vidíme značnú odlišnosť od fixácia solídneho materiálu, kedy najčastejšie fixujeme glutaraldehydom 3 hodiny. Teplota fixačného roztoku nebola zvlášť sledovaná. Pre výraznú spotrebu kyslíka pri fixácii sme celú zmes občasne prevzdušňovali. Pre bezproblémové pokračovanie spracovávania buniek bolo kriticky dôležité udržať stabilné pH na hladine, ktorú sme stanovili parametrom 6,8 – 7,1; aj vzhľadom na intracelulárne pH, ktoré sa osciluje najčastejšie v rozmedzí hodnoty 6,8. pH sme korigovali na stanovenú hladinu pridávaním hydrogénfosforečnanu sodného (pri príliš nízkom pH) alebo dihydrogénfosforečnanu draselného (pri príliš vysokom pH) po kvapkách. Použitá koncentrácia glutaraldehydu zabezpečila jeho osmoticky inertné vlastnosti (do 300mmol/l). Potom boli bunky vypierané vo vychladenom 0,1M fosfátovom pufry s 10% sacharózou 3 krát po 30 minút a následne uložené do chladničky cez noc.

Samozrejme, pri takto zvolenej chemickej fixácii sme sa nevyhli problému zníženej disperzity kvapalných koloidných sústav, kedy sa dispergované častice zhlukujú do väčších sústav a dochádza k ich koagulácii. S týmto problémom treba rátať pri ďalšom spracovaní preparátu ako aj pri samotnej TEM analýze [7]. Napriek tomu hodnotíme všeobecne konformačné zmeny ako malé a preto glutaraldehyd plní svoju úlohu pri fixácii buniek obstojne. Ako alternatívu k nami zvolenému fixačnému roztoku je možné použiť glutaraldehyd s kakodylanovým tlmivým roztokom [8] alebo glutaraldehyd s akroleínom [9].

Postfixácia

Postfixácia tkanív, ale aj buniek je potrebná na zvýraznenie kontrastu. Pre tieto potreby sme použili Millonigov roztok, bežne používaný na našom pracovisku, spolu s 1% oxidom osmičelým. Bunky sme postfixovali v chladničke po dobu dvoch hodín. Oxid osmičelý nedostatočne fixuje základné hmoty bunkovej cytoplazmy, čo sa prejaví vyplavením týchto štruktúr, čo je pod mikroskopom viditeľné ako nepravidelné prázdne miesta s nízkou elektrodenzitou. Preto OsO_4 nepoužívame ako primárne fixatívum, ale iba v postfixačnom protokole po primárnej fixácii aldehydom (glutaraldehydom) [7].

Millonigov roztok sa skladá z 2,26% roztoku hydrogénfosforečnanu sodného (2,26g NaH_2PO_4 + 100 ml dvakrát destilovanej, tzv. redestilovanej vody); 2,52% roztoku hydroxidu sodného (2,52 g NaOH + 100 ml redestilovanej vody); 5,4% roztoku glukózy (5,4g $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ + 100 ml redestilovanej vody). Postup je nasledujúci: 41,5ml 2,26% roztok hydrogénfosforečnanu sodného zmiešame s 8,5ml 2,52% roztokom hydroxidu sodného, výsledok musí mať pH 7,3 (pridávame kvapku hydroxidu sodného pri nízkom pH alebo hydrogénfosforečnanu sodného pri privysokom pH). Potom sa do 45 ml získaného roztoku pridá 5 ml 5,4% roztoku glukózy. Výsledok, 50 ml Millonigovho roztoku s pH 7,3 uskladníme v tmavej uzavretej fľaši v chladničke, a to až do 3 dní. Fixácia glutaraldehydom spolu s postfixáciou oxidom osmičelým môže viesť k tvorbe rôznych artefaktov a distorzií (v podobe elektron-denzných granúl a figúr, najmä v priebehu membrán). Predchádzať takýmto artefaktom sa dá použitím extrémne čistého glutaraldehydu a používaním toho istého tlmivého pufru v každom kroku [10] – po použití fosfátových tlmivých roztokov s použitými fixatívami sú membrány aj orgány dobre zachované. Po postfixácii sme boli schopní rozlíšiť predmet nášho záujmu – bunkovú populáciu, ako sivastú štruktúru (pri reakcii oxidu osmičelého s organickými látkami sa vytvára tzv. osmiová čierna – $\text{OsO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ [7]), a preto bola orientácia v preparáte adekvátne a satisfaktórna.

Odvodnenie

Voda, ktorá by sa vo vzorke nachádzala, by sa pri vysokom vákuu v mikroskope prudko vyparila a došlo by ku zrúteniu štruktúry vzorky, k jej vysušeniu. Preto treba vodu v tkanive nahradiť prechodne inou látkou, ktorá napokon ustúpi zalievacej hmote. Odvodnenie musí byť dokonalé, treba však zvoliť vhodný kompromis medzi dobre zaliatym preparátom a konformačnými zmenami bielkovín. Pri odvodňovaní sme postupovali podľa protokolu v tab. 1. Čím bola fixácia kvalitnejšia, tým viac makromolekúl sa stabilizovalo a previedlo do formy nerozpustných komplexov a tým menej sa ich vyplaví počas odvodnenia. Ak sa po postfixácii s OsO_4 a odvodňovaním etanolom bunky dôkladne nevyprali od zvyškov fixačného roztoku, vnikli precipitáty aj do vnútra buniek [7]. Po každom kroku bola nutná centrifugácia pri 1000 ot./min. počas dvoch minút a následná jemná aspirácia tekutiny - supernatantu.

Tab. 1: Odvodňovací protokol

Chemikália	Čas	Poznámka
50% alkohol	10 minút	uzavreté, chladené (4°C)
70% alkohol	10 minút	uzavreté, chladené (4°C)
96% alkohol	10 minút	uzavreté, chladené (4°C)
100% (bezvodý) alkohol	25 minút	uzavreté, izbová teplota (20°C)
100% (bezvodý) alkohol	25 minút	uzavreté, izbová teplota (20°C)

100% (bezvodý) alkohol	25 minút	uzavreté, izbová teplota (20°C)
propylénoxid (epoxid)	15 minút	uzavreté, izbová teplota (20°C)
propylénoxid (epoxid)	30 minút	uzavreté, izbová teplota (20°C)
propylénoxid + Durcupan I	počas noci	otvorené, izbová teplota (20°C)

Presycovanie, zalievanie, polymerizácia

Pri presycovaní sme postupovali podľa protokolu uvedeného v tab. 2. Opäť sme po každom kroku suspenziu centrifugovali pri 1000 ot./min., vždy po dobu 2 minút, aj keď sa môže použiť i iná frekvencia a k tomu upravená doba centrifugovania (nižšia frekvencia = dlhšie ako 2 minúty, a naopak), takisto s uspokojivými výsledkami.

Tab. 2: Presycovací a zalievací protokol

Chemikália	Čas	Poznámka
<i>Presycovanie</i>		
Durcupan I	120 minút	uzavreté, 50°C
Durcupan II	180 minút	uzavreté, 40°C
Durcupan II	120 minút	uzavreté, 40°C
Durcupan II	cez noc	
<i>Zalievanie</i>		
čerstvý Durcupan II		

Polymerizácia sa vykonala pri 60°C a trvala 3 dni. Ako Durcupan I tak i Durcupan II sú vo vode rozpustné zalievacie médiá, vyrobené z Durcupan ACM (Fluka, Švajčiarsko), podľa návodu výrobcu. Durcupan je epoxidovou zalievacou hmotou na báze Aralditu. Skladá sa zo štyroch zložiek (pozri tabuľku 3).

Tab. 3: Komponenty Fluka Durcupan ACM

Komponent	Zloženie
A	100g zalievacej vo vode rozpustnej substancie - alifatický polyepoxid
B	100g 964 stvrdzovača - anhydrid diazidu s alifatickým postranným reťazcom
C	20g 960 stvrdzovača, derivát fenolu s amino skupinami
D	20g zmäkčovadla (dibutylftalát)

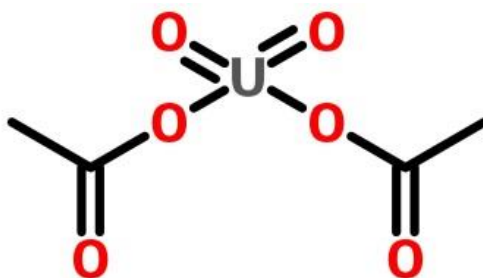
Pre výrobu Durcupan I (použitý v odvodňovacom protokole) treba zmiešať dohromady zložky A (100ml alebo 104,8g), B (100ml alebo 107,4g) a D (1,5ml). Roztok (nažltkastá viskózna tekutina) je nutné dobre premiešať a následne riadne utesnený uložiť do chladničky. Je nevyhnutné, aby sa zabránilo jeho kontaktu s vlhkosťou. Pre výrobu Durcupan II treba k 21g Durcupan I pridať 0,45ml až 0,48ml zložky C (urýchľovač). Roztok treba najprv dobre premiešať a potom ho nepriedušne uzavrieť. Pre zalievanie je vhodné pripraviť vždy nový, čerstvý roztok Durcupan II. Podľa našich skúseností, zložka C v Durcupan II môže byť použitá i vo väčších množstvách (až do 0,50ml) ako je odporúčané výrobcom, aby bolo zaistené správne stuhnutie zalievacieho činidla. Treba však pamätať na to, že nadbytok zložky C môže spôsobiť,

že sa preparát stane zrnitým. Výsledný roztok je oranžovo-ružová vo vode dobre rozpustná tekutina.

Kontrastovanie

Pre lepšiu kontrolu a orientovanie v zaliatom pellete sme si z každého narezali polohrubé rezy ($0,7\mu\text{m}$) a zafarbili sme ich toluidínovou modrou. Ďalšie kroky sa nelíšia od rutinej prípravy pre TEM analýzu – zaliate bunky boli narezané kvalitnými sklenenými nožmi na ultramikrotóme a na vode (alebo na inom vhodnom inertnom médiu) plávajúce rezy – „páska“, boli umiestnené na predpripravené čistené medené sieťky), na ktoré bola nanosená podložná fólia (ide o veľmi jemný film s hrúbkou nie väčšou ako 5 – 10 nm). Snažili sme sa o rezy bez vibrácií, rýh a trhlín, pravidelnej hrúbky, čo si vyžaduje istý stupeň erudície a skúsenosti.

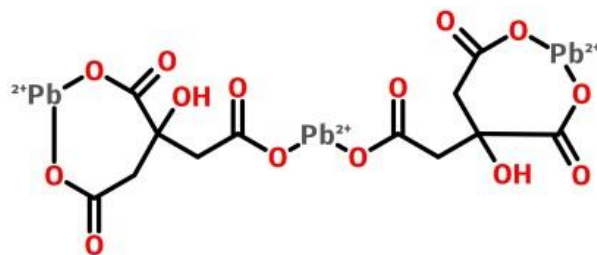
Vzhľadom k tomu, že kontrast v elektrónovom mikroskope závisí predovšetkým na rozdieloch v hustote elektrónov organických molekúl v bunke, účinnosť zvýraznenia tkaniva sa určuje podľa atómovej hmotnosti použitej kontrastujúcej látky, ktorá sa chemicky spojí s biologickými štruktúrami. Dnes sa na zvýšenie kontrastu používa prevažne impregnácia biologických štruktúr zlúčeninami ťažkých kovov. Tieto kovy dokážu zvýšiť rozptyl primárnych elektrónov a tým aj zvýšiť kontrast štruktúr vo vzorke. Kontrastovali sme priamo ultratenké rezy alkoholovým roztokom uranylacetátu (vyskúšali sme ako metanolový, tak i 96% etanolový roztok so satisfaktórnym výsledkom – výsledná kvalita obrazu sa takmer nelíšila). Avšak najvyšší kontrast sa získa, keď sa použije dvojité kontrastovanie - uranylacetát a tzv. Reynoldsov roztok [11]. Spojením týchto dvoch kontrastovacích látok sa získa skoro rovnomerný kontrast všetkých štruktúr bunky.



Obr. 1 Rozvinutý štruktúrny vzorec uranylacetátu

Uranylacetát je výhodný na kontrastovanie biologických membrán, voľných nukleových kyselín ako aj nukleových kyselín, ktoré sú obsiahnuté v konglomerátoch s proteínovými komplexami (ribozómy). V našom laboratóriu sa Reynoldsov roztok používa na kontrastovanie rutinne, s dobrými výsledkami. Je vyrobený z citrátu sodného, dvojmocného olova, dusičnanov a vody, takže výsledkom chemickej reakcie je citrát olovnatý, ktorý sa používa na kontrastovanie bežne po celom svete. Citrát olovnatý potom reaguje s membránami, proteínmi, nukleovými kyselinami a s glykogénom. Po dvojitém kontrastovaní tak vzorka získa rovnomerný kontrast všetkých bunkových štruktúr.

Pri kontrastovaní olovom môže vzniknúť jemný precipitát z nerozpustného PbCO_3 , ktorý sa z rezov ťažko odstraňuje a má afinitu k cytoplazmatickým štruktúram, kde vytvára artefakty nerozlíšiteľné od iných cytoplazmatických granúl [7].



Obr. 2 Rozvinutý štruktúrny vzorec citrátu olovnatého

Pred zmiešaním chemických látok dohromady, je dôležité, aby sa zabránilo vyzrážaniu uhličitanu olovnatého vo vode a následnej kontaminácii vzorky (ktorá sa v elektrónovom mikroskope javí ako čierna granulácia). Zabezpečili sme to tak, že sme zabránili prítomnosti uhličitanov vo vode. Používali sme preto redestilovanú, ionizovanú vodu, ktorú sme ešte prevarili alebo sme ju nechali uzavretú cez noc vo vákuu v kužeľovej banke. Vzorec pre prípravu 50 ml Reynoldsovho roztoku je nasledovný: 1,33 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + 1,76 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 30 ml redestilovanej vody zbavenej uhličitanov, následne intenzívne pretrepávať po dobu 15 minút. Vzniknutú suspenziu občasne pretrepávať (1 až 2 minúty) po dobu ďalších cca 30 minút a potom nechať 30 minút stáť pri izbovej teplote. Vzniknutá kvapalina by mala byť mliečne zakalená. V ďalšom kroku treba do tejto suspenzie pridať 8 ml NaOH a doplniť redestilovanú vodu do objemu 50 ml. Po ďalšom premiešaní sa precipitát rozpustí a výsledok, 50 ml číreho priehľadného roztoku bez zakalenia - Reynoldsov roztok je pripravený k použitiu. Skladuje sa prefiltrovaný, v tmavej fľaši so zábrusom v chladničke a to maximálne 6 týždňov (my sme vždy použili čerstvo zarobený Reynoldsov roztok). Ak sa v ňom objavajú precipitáty alebo zakalenie, nikdy ho na kontrastovanie nepoužijeme a jediným správnym riešením bude príprava nového. pH by po celý čas malo byť 12.0 +/- 0.1. Práve presná hodnota pH sa ukázala ako podstatná podmienka pri následnej TEM analýze.

Vždy sme kontrastovali najprv v uranylacetátovom roztoku, až následne v Reynoldsovom roztoku. Do kontrastovacích komôrok sme napipetovali kvapky uranylacetátového alkoholového roztoku a sieťky (mriežky) sme umiestnili (preparátom nadol) do kvapky tohto roztoku, prikryli sme komôrky sklíčkom, ochranným sklom a alobalom a preparát sme nechali kontrastovať po dobu 15 minút. Potom sme ho odobrali pinzetou a opláchli v 50% alkohole 5 krát (mali sme pripravených 5 ampuliek s 50% alkoholom a priebežne sme v nich vymieňali alkohol). Filtračným papierom sme odsali prebytočný alkohol zo sieťky. Nakontrastovanú sieťku sme potom vložili naspäť do Petriho misky, aby sa zabránilo vyzrážaniu citrátu olovnatého pôsobením atmosférického CO_2 . Po týchto krokoch bolo možné pristúpiť ku kontrastovaniu Reynoldsovým roztokom. Pripravili sme si Petriho misku s dentálnym voskom a ten sme oplachovali prúdom tečúcej a redestilovanej vody po dobu niekoľko minút. Potom sme vosk vytreli dosucha nechlpatou handričkou. V ďalšom kroku sme čistou pipetou kvapli na vosk jednu kvapku Reynoldsovho roztoku (roztok čo najskôr treba vrátiť do chladničky) a do tejto kvapky sme jemne vložili sieťku s preparátom. Následne treba vosk so sieťkou prikryť Petriho miskou a nechať kontrastovať 5 minút. Po uplynutí času treba sieťky vybrať a opláchnuť kvapkami redestilovanej vody po dobu 1 minúty, prebytočnú vodu je potrebné odsáť filtračným papierom. Vosk treba po každom kroku znovu opláchnuť vodou a vytrieť dosucha. Po vyschnutí mohli byť sieťky analyzované.

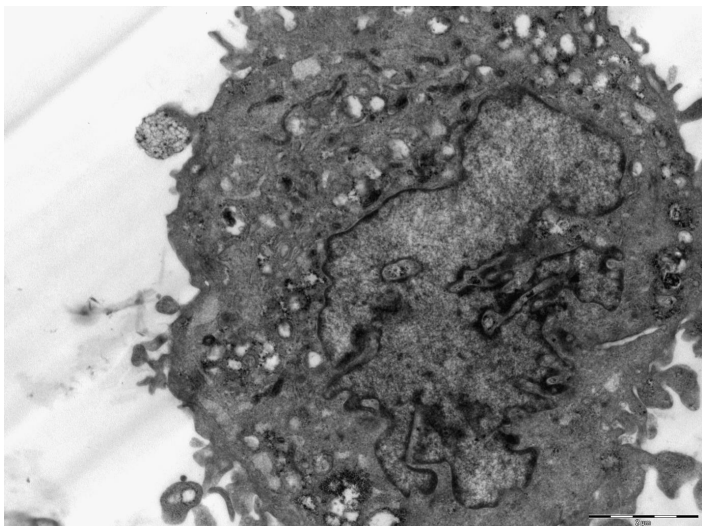
Výsledky a diskusia

Transmisná elektrónová mikroskopia prináša ultraštruktúrne podrobnosti buniek, teda je to cenná a užitočná metóda pre štúdium bunkových organel [12]. To je dôvod, prečo sme ju použili pre podrobnejší popis mezenchýmových kmeňových buniek. Príprava vzorky z bunkovej kultúry vhodná pre analýzu v transmisnom elektrónovom mikroskope je však oveľa náročnejšia ako histologické spracovanie normálneho, bežného tkaniva [13].

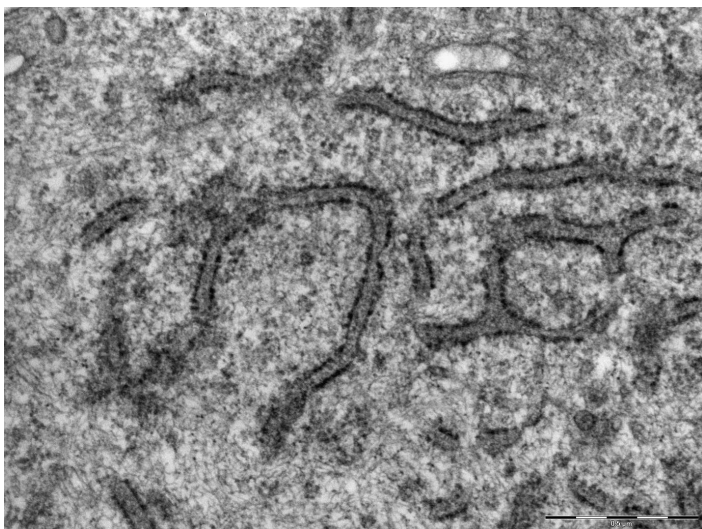
Na obr. 3 až 7 prezentujeme výber niektorých reprezentatívnych elektronogramov mezenchýmových kmeňových buniek z rôznych zdrojov, ktoré sme získali použitím predstavenej histologickej techniky. V prvých pasážach mali všetky mezenchýmové kmeňové bunky, bez ohľadu na miesto ich pôvodnej lokaliácie, ultraštruktúru zodpovedajúcu bunkám s vysokou proteosyntetickou aktivitou. Bunky mali zväčša sférický až podlhovastý tvar. Obsahovali veľké polymorfné jadrá s hlbokými zárezmi a s prevahou euchromatínu. V ňom sa nachádzal variabilný počet nápadných jadriok. V cytoplazme, v blízkosti jadra, sa nachádzalo dobre vyvinuté drsné endoplazmatické retikulum a cisterny Golgiho aparátu. V prípade kmeňových buniek izolovaných z tukového väziva sa v ich cytoplazme nachádzali početné, malé tukové vakuoly a medzi nimi boli ojedinelé, malé a nenápadné elektrónovo-denzné, lamelárne telieska pripomínajúce myelínové figúry. Charakteristiké pre bunky, ktoré boli už plne prichytené na podklad, sú početné a viacnásobne vetvené výbežky ich cytoplazmy pripomínajúce filopódie.

Hlavným cieľom tejto práce mal byť popis spoľahlivého a opakovateľného protokolu pre spracovanie bunkových kultúr kmeňových buniek (alebo inej vzácnej bunkovej populácie) pre potreby TEM analýzy, so snahou získať kvalitné a porovnateľné digitálne obrázky, aby bolo možné sa v ďalších krokoch (a prácach) sústrediť na konkrétne otázky spojené so štúdiom tejto biomedicínsky veľmi zaujímavej populácie buniek a vyhnúť sa riešeniu problémov spojených s nekvalitne alebo neadekvátne pripraveným preparátom, obsahujúcim rôzne artefakty a reziduá kontrastovacej látky. Opakovali sme naše postupy niekoľkokrát, s populáciou buniek z rôznych pasáží, s rôznym počtom buniek, pracovali sme vždy s čerstvo vyrobenými roztokmi a vo výsledku sme konštatovali, že takto rôzne pripravené preparáty sa pri dodržaní protokolov nijako štatisticky medzi sebou nelíšili. Preto sme boli schopní popísať morfológiu dlhodobých kultivovaných kmeňových buniek bez rušivých elementov v obraze - to je bod, kde vidíme najväčší dopad našej práce.

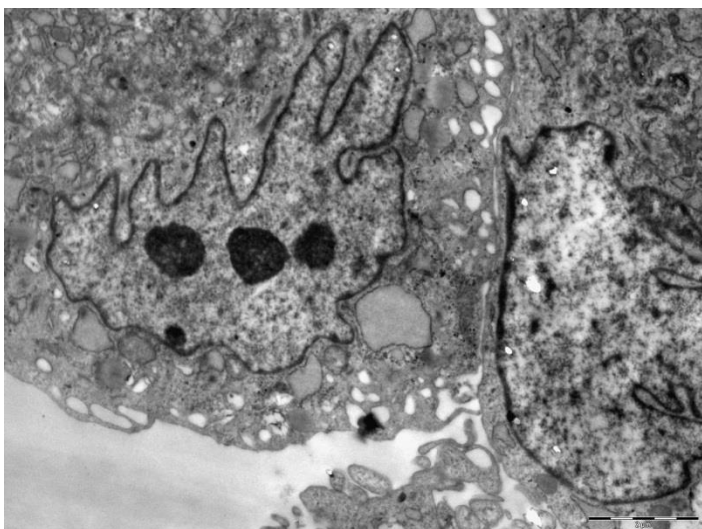
Práca vznikla vďaka podpore projektu Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-0434-12.



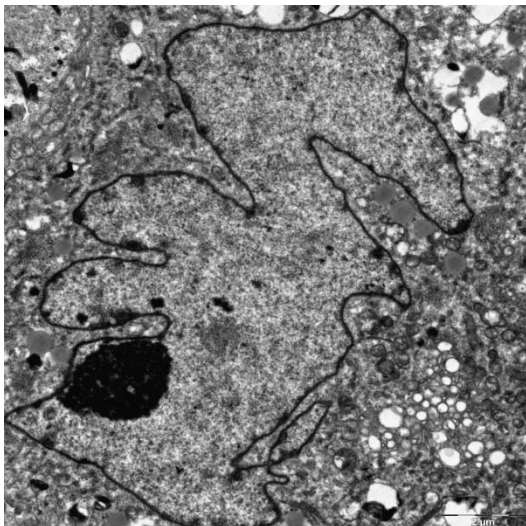
Obr. 3. Celkový pohľad na somatickú kmeňovú bunku izolovanú zo zubnej drene. Vidieť nápadne polymorfné jadro s prevahou euchromatínu. V cytoplazme veľké množstvo mitochondrií a početné široké cisterny drsného endoplazmatického retikula (TEM, orig. zväčšenie 7.100x)



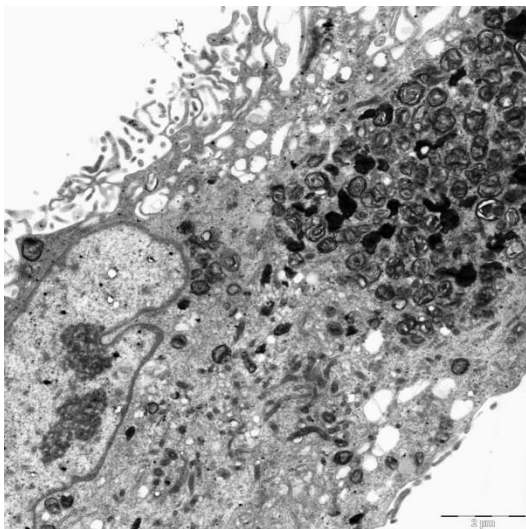
Obr. 4. Detail na drsné endoplazmatické retikulum v cytoplazme somatickej kmeňovej bunky izolovanej zo zubnej drene (TEM, orig. zväčšenie 36.000x)



Obr. 5. Celkový pohľad na dve kmeňové bunky (satelitové) izolované z kostrového svalu. Vidieť nápadne polymorfné jadrá s prevahou euchromatínu a v nich početné jadierka. V cytoplazme veľké množstvo extrémne dilatovaných cisterien drsného endoplazmatického retikula (TEM, orig. zväčšenie 7,100x)



Obr. 6. Detail na jadro somatickej kmeňovej bunky izolovanej z tukového väziva. V okolí polymorfného jadra s prevahou euchromatínu sú početné lipidové kvapôčky (TEM, orig. zväčšenie 8,800x)



Obr. 7. Myelínové lamelárne telieska v cytoplazme somatickej kmeňovej bunky z tukového väziva po 30. pasáži. Na povrchu výbežky cytoplazmy – filopódie, ktorými bola bunka prichytená o dno Petriho misky počas kultivácie (TEM, orig. zväčšenie 7.100x)

Literatúra

- [1] Taupin, *Eur J Histochem.* **2008**, 52/2, 135-9.
- [2] Varga, *Biologia.* **2011**, 66/4, 707-701.
- [3] Danisovic, *Tsitologija.* **2011**, 53/6, 482-7.
- [4] Danisovic, *Gen Physiol Biophys.* **2009**, 28/1, 56-62.
- [5] Danisovic, *Biomed Pap.* **2008**, 152/2, 235-238.
- [6] Gillett, *Histochemie.* **1972**, 30/2, 162-7.
- [7] Mráz, *Veda*, **1988**, 312 s.
- [8] Glauert, *Oxford, Amer. Elsevier*, **1974**, 353 s.
- [9] Mersey, *J. Micr.* **1978**, 114, 49-76
- [10] Kuthy, *J Microsc.* **1976**, 107/2, 177-82.
- [11] Reynolds, *J Cell Biol.* **1963**, 17, 208-12.
- [12] Graham, *Nat Protoc.* **2007**, 2/10, 2439-50.
- [13] Kumar, *J Immunol Methods.* **2014**, 404, 87-90.

Aktivita AChE a BuChE v lymfopoetických orgánoch

Dorko, F.

Ústav anatómie, Lekárska fakulta Ostravskej univerzity, Ostrava, Syllabova 19, Česká republika,
frantisek.dorko@osu.cz

Abstract

With respect to practical needs they investigated the ways of visualization of the activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) in the thymus of rabbits after protracted immersion prefixation with formaldehyde (4°C) by means of the direct tiocholine method of cytochemical proof of AChE modified by El Badawi and Schenk. During the postnatal period 54 - 90-days the AChE and BuChE – positive nerves were identified in typical topographies of the thymus. They were seen in the perivascular localization as nerve plexuses but also as free AChE and BuChE nerves passing separately. The highest number of the AChE, BuChE – positive intrathymic nerve structures was observed at the period of the largest differentiation of the functional parenchyma of the organ duringfor three months of postnatal development).

Úvod

Cholinesterázy sa z biochemického hľadiska definujú ako hydrolázy, patriace do skupiny esterázkarboxylových kyselín, ktoré za optimálnych reakčných podmienok hydrolyzujú estery cholínu. Podľa ich substrátovej afinity a inhibovateľnostieserínom, či organofosfátmi sa viac menej zhodujú s acetylcholinesterázou, ktorá má enzýmové číslo Ec 3.1.1.7. označovaná ako špecifická cholinesteráza. ButyrylcholinesterázaBuChE je známa pod názvom nešpecifická cholinesteráza jej Ec je 3.1.1.8. (acylhydrolázaacetylcholínu). Hydrolyzuje butyrylcholín, ale tiež sa podieľa na hydrolýze AChE. BuChE slúži na odlíšenie týchto dvoch cholinesteráz. Nie je súčasťou mozgu, je viac aktívna v pečeni, kde sa syntetizuje a vylučuje do plazmy. Nachádza sa vo väčšine buniek, okrem červených krviniek. Má väčšiu substrátovúšpecifickosť, ako AChE [1-2].V bežnej histochemickej a biochemickej praxi sa uprednostňujú reakčné substráty, a to acetyltiocholínjodidpri zisťovaní aktivity AChE a butyryltiocholínjodid pri stanovení aktivity BuChE. Ich špecifickosť je relatívna, pretože v rámci obidvoch skupín cholinesteráz treba rátať s existenciou viacerých príbuzných enzýmov.

Materiál a metodika

V experimente sme použili králika domáceho (*Oryctolagus cuniculus*), v počte 30 kusov oboch pohlaví. Priemerná hmotnosť bola 1 250 gr, vek zvierat bol 54 dní. Králiky pochádzali zo súkromného chovu a boli dochované vo zverinci za štandardných podmienok chovu pri teplote 16-18°C. Kŕmené boli granulovanou zmesou a napájané pitnou vodou ad libitum. Pri chove a experimente boli dodržané zásady stanovené etickou komisiouUVLaF v Košiciach.

Na znázornenieAChE a BuChEpozitivity nervových vlákien v týmuse sme použili priamu tiocholínovú metódu cytochemického dôkazu AChE, BuChE v modifikácii [3] prispôbenej našim podmienkam. Ako inhibitoryacetylcholinesteráz sme použili acetyltiocholínjodid a butyryltiocholínjodid.

Výsledky a diskusia

Cieľom práce bolo zmapovať distribúciu AChE a BuChE pozitívnych nervových vlákien v týmuse kráľíka v období od 54 dní do 90 dní. Nervové vlákna v týmuse sa vyskytujú v dvoch formách.

1. Nervové vlákna, ktoré sa spájajú s cievami. Tieto vytvárajú perivaskulárne splete prebiehajúce v septách a smerujú do parenchýmu orgánu. Do kôrovej vrstvy vstupujú zo subkapsulárnej nervovej splete. Na rozhraní kôry a drene sme pozorovali bohaté nervové zoskupenia, kým v časti kôry, kde sídlia početné lymfocyty je zastúpenie nervových vlákien veľmi chudobné.

2. Druhú skupinu tvoria vlákna nezávislé na cievach. Ich výskyt je najpočetnejší na kortikomedulárnej hranici a v dreni. AChE a BuChE pozitívne nervové vlákna vstupujú do týmusu s tepnami v podobe perivaskulárnych nervových spleť. V orgáne prebiehajú v interlobulárnych septách, smerujú do kôry. Z hrubších spleť sa oddeľujú jemnejšie vlákna prebiehajúce parenchýmom orgánu. V kôrovej časti týmusu tenké nervové vlákna smerujú až k povrchu orgánu. Výskyt jemných BuChE pozitívnych periarteriolárnych a solitárnych nervových vlákien sme zaznamenali aj v dreni, zatiaľ čo AChE pozitívne nervové vlákna sme v tejto topografii nepozorovali. Vedecké práce [5-6], poukazujú na to, že je málo pravdepodobné, aby hlavná funkcia cholinesteráz v krvi spočívala len v hydrolýze voľného ACh, pretože sa vyskytujú nielen v krvi, ale i v niektorých tkanivách. Nebola tiež potvrdená hypotéza o tom, že BuChE by mohla byť prekursorom pre AChE. BuChE je syntetizovaná v pečeni [4]. U niektorých jedincov, so zníženou aktivitou BuChE sa zaznamenáva zvýšená vnímavosť na myorelaxancie [6], akými sú organofosfátové a karbamátové pesticídy, ktoré sú týmto enzýmom rozkladané, alebo vychytávané. Funkčný význam cholinesteráz sa v súčasnosti skúma nielen v rámci cholinergickýchneuro-neuronálnych a neuro-efektorovýchsynapsii, ale i z časti na regulácii bunkových procesov, ktoré sú závislé na primárnej interakcii ACh so špecifickými receptormi.

Literatúra

- [1] Dave, *Naturforsch.* **2000**, 55c, 100-108.
- [2] Ehholm, *Helsinki.* **2001**, Dec., 13-th, 44.
- [3] El Badawi, *J Histochem.* **1967**, 15, 580-588.
- [4] Cammisa, *Endocrinol.* **1988**, 122, 991-996.
- [5] Kurča, *Actamedica Hradec Králové.* **2004**, 47, 167-170.
- [6] Ratner, *Israel J Med Sciences.* **1983**, 19, 810-815.

Current possibilities of breast reconstruction after mastectomy

Macho, P., Fedeleš J. sen.

Clinic for plastic, esthetic and reconstruction surgery, Faculty of Medicine, Comenius University
in Bratislava

machopaloo@yahoo.com

Abstract

In present days breast reconstruction is considered as integral part of complex therapy of breast cancer in developed countries. It has been approved that consciousness of physical deformity for women after mastectomy can have devastating effect on their psychics and even lives. For women the purpose is not only to survive the breast cancer, but also to live a normal life after that. It can be told, that reconstruction of breast after its resection due to cancer is one of the most intimate operation, which woman can undergo. With early detection, therapy and following reconstruction of breast every woman can reach back her natural shape of breast and return self-confidence for her health. The aim for this briefing article is to introduce to the subject of breast reconstruction and summarize current possibilities of techniques for breast reconstruction after mastectomy.

Key words: breast reconstruction, auto transplantation of fat (fatgrafting), breast cancer

Introduction

Breast reconstruction is a surgical intervention, whose aim is to recreate the volume of breast after its resection.

In Slovakia breast cancer affects more than 2.500 women annually. It is the most frequent cancer in women. The mastectomy is still the method of treatment in approximately one third of women. Together with fear, women face also to the anxiety, depression and lost of self-confidence, which influence their ability to heal and returning to normal life.

Increasing of feminism between 1960 and 1970 lead to income in new therapy methods and operative methods of breast cancer. Radical mastectomy with lymphatic node extirpation was improved. Breast saving operation was developed (segmentectomy) together with sentinel node biopsy and radiotherapy. Breast reconstruction was proved and became a optimal choice.

Reconstruction techniques for breast developed mainly from half of the 20th century together with advancement of silicone implants. In 1962, after using first silicone implant for aesthetic augmentation, many societies start to propose implants for breast reconstruction. In 1992 the popularity of silicone implant decreased. In several women patients a rupture of implants occurred with leakage of silicone into tissue, what lead to painful scar and malformation of breast. In consequence FDA recalls silicone implants from the market and ordered a further study. Silicone implants came back to American market in 2006 after their safety was approved. Parallel another technique for breast reconstruction occurs. Techniques that reconstruct breast using own tissue flaps were tested. In 1970 it was reconstruction using LD (*Latissimus Dorsi*) flap and in 1982 first reconstruction using TRAM (*Transversus Rectus Abdominis Musculocutaneous*) flap. This endures as one of the most popular reconstruction technique after mastectomy till present. In recent years the reconstruction technique using autologous fat tissue

becomes more popular. It is advantageous mainly in breast saving operations whose number increases in comparing to mastectomy.

Breast reconstruction is available for majority of women, disregarding the age, if they are in good health condition and are in a need for breast reconstruction. Including women with high risk for developing cancer (BRCA +), who undergo breast resection for prophylactic reason.

Former treatment plan delayed breast reconstruction for a period of time so women can mentally and emotionally recover after mastectomy, so called delayed reconstruction. Recently the breast reconstruction takes place together with cancer resection, so called immediate reconstruction.

Material and methods

For breast reconstruction current three methods are available:

- 1, reconstruction using implants or expander-implants
- 2, reconstruction using own tissue from another part of body
- 3, reconstruction using combination of these two aforementioned methods

Type of chosen breast reconstruction method depends on agreement between patient and surgeon, in consideration to local findings on thorax, therapy process and advantages and disadvantages of available methods.

Patients that underwent breast volume reconstruction of new breast commonly need correction of shape on opposite breast. This is realized by reduction of large breast or by elevating the breast (mastopexy). At the end of reconstruction a new mamilla and areola is created from autologous tissue.

Continuing medical research influenced also breast reconstruction, where autotransplantation of fat, as a promising method for breast volume increasing, is currently mentioned [1]. Essence of this method is the presence of adult stem cells in fatty tissue that enables ingrowing of the fat tissue in recipient area [2]. Although some in vitro experiments show a potential risk of malign transformation [3] this was not proven by longlasting clinical trials [4]. Consistent improving of process of intake, processing and application of fat tissue lead to approximately 60-70 % of graft survival [5]. It was also improved that adult stem cells have regenerative influence on surrounding tissue that was previously irradiated during cancer therapy and for which depletion of stem cells is typical [6].

At our Clinic for plastic surgery we started with fat tissue autotransplantation in patients after breast resection before 5 years. Continuing with getting more familiar with this procedure the number of indications for this, according to us very effective, operation rises. Patients praise this method not only for its effect on breast deformity, but also for effect of accessory liposuction, which is performed for fat tissue intake. Fat grafting is mainly used as an accessory method for definitive shape correction after breast reconstruction using flaps or implants (Fig. 1). Increasing number of patients occurs after breast sparing operations, which are associated with shape deformity together with alteration of areolo-mamillar complex and changes to soft tissue after irradiation. According to our opinion, fat tissue autotransplantation is a method of choice for this group of patients (Fig. 2). Fatgrafting can be also performed as a breast reconstruction method after mastectomy for reshaping whole volume of breast (Fig. 3).

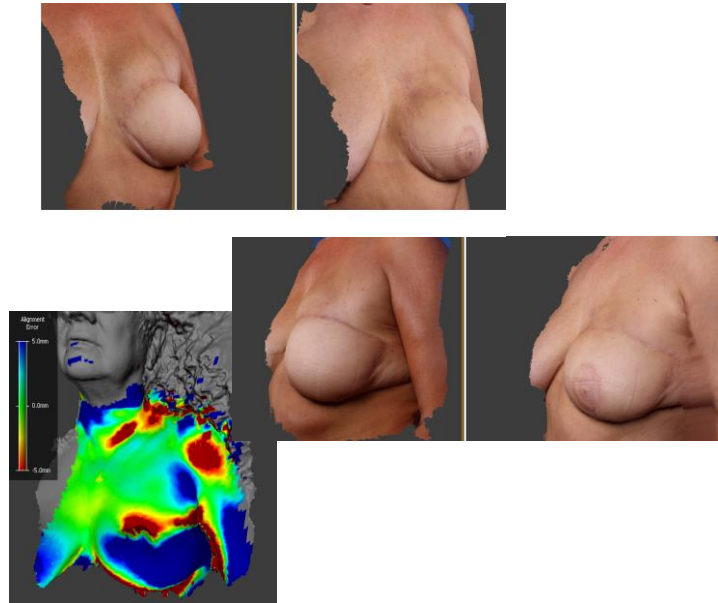


Fig. 1 Imagining the amount of tissue gain - 6 months after fat tissue application with the aim for increasing the volume on reconstructed breast from TRAM flap on left side, using DI3D Scan

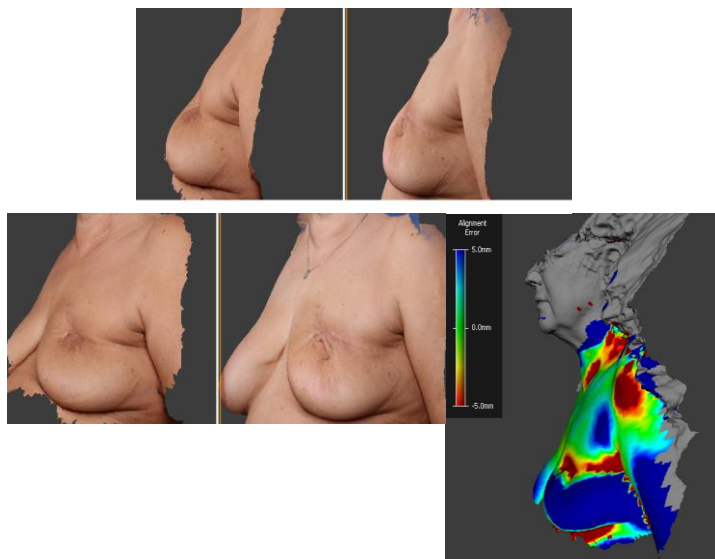


Fig. 2 Imagining the amount of tissue gain - 6 months after fat tissue application to breast after quadrantectomy and radiotherapy left sided, using DI3D Scan

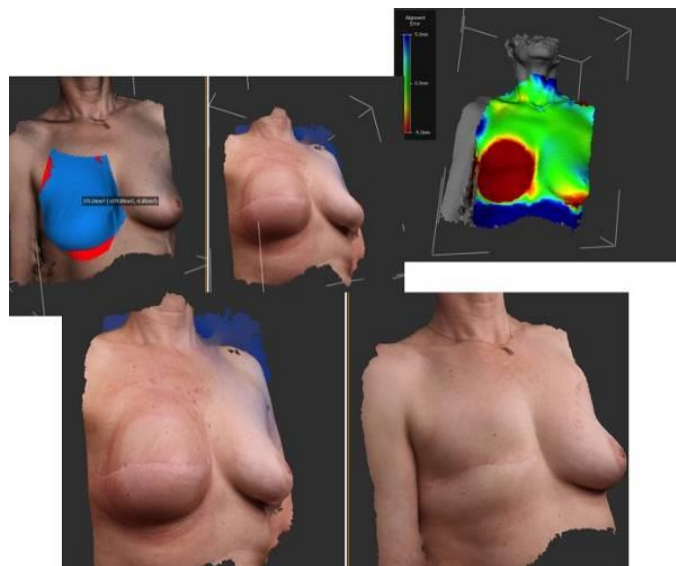


Fig. 3 Imagining the amount of tissue gain - 6 months after fat tissue application with purpose for breast reshaping, right side, using DI3D Scan

Conclusion

All types of breast reconstruction methods have some advantages and disadvantages and indications for application. Despite continuing development all this methods still preserve in reconstruction armamentarium. According to our experience, autotransplantation of fat tissue, as a relative new method, approved. It enriches the reconstruction possibilities for breast reconstruction after breast resection and sometimes became a method of choice.

Literature

- [1] Boháč, *Lekársky obzor*. **2014**, 63/3, 104-109.
- [2] Zuk, *Mol Biol Cell*. **2002**, 13, 4279-4295.
- [3] Kucerova, *Neoplasma*. **2011**, 58,/5, 361.
- [4] Petit, *Plast Rec Surg*. **2011**, 128, 341-346.
- [5] Boháč, *BIOMEDICÍNSKY VÝSKUM II*. **2014**, 9-15, ISBN: 978-80-971370-1-4
- [6] Rigotti, *Plast Rec Surg*. **2007**, 119, 1409-1422.

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

Počet strán: 61

Vydané : február 2015