



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



NOVÉ TRENDY A PERSPEKTÍVY V HISTOLÓGII III

Martin, 2017

Neperiodická publikácia

Editori: RNDr. Mária Kovalská, PhD.
MUDr. Eva Ochodnická, CSc.
MUDr. Elena Fuseková, CSc.

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

Ilustrácia titulnej strany: MUDr. Martina Rausová

Za obsahovú ako aj gramatickú úpravu zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov.

ISBN 978-80-8187-030-9
EAN 9788081870309

Zostavovatelia publikácie ďakujú pani Jane Višňovcovej za technickú spoluprácu a MUDr. Martine Rausovej za vyhotovenie a poskytnutie ilustrácie k príprave titulnej strany.

OBSAH

Adamkov, M.: <i>Postavenie a význam histológie v medicínskych vedách</i>	1
Kunertová, L.: <i>Lymfatický systém a imunitné reakcie pri zápalových procesoch</i>	2
Výbohová, D.: <i>Lymfatické kapiláry v papilách dermis v léziách lichen ruber planus</i>	6
Adamicová, K.: <i>Niektoré zmeny štvrtej edície Klasifikácie tumorov mäkkých tkanív v histopatologickej praxi</i>	10
Škuciová, V.: <i>Expresia PD-L1 proteínu v malígnych nádoroch</i>	14
Tupá, V.: <i>Karbonická anhydráza IX ako potenciálny biomarker kolorektálnych karcinómov</i>	18
Grussmannová, A.: <i>Vzácné lokalizácie nádorů skupiny Ewingova sarkomu</i>	22
Tokarčík J.: <i>Hepatocelulárny karcinóm</i>	24
Ježková, E.: <i>Metylácia génu RASSF1A a korelácia s histopatologickými charakteristikami pri karcinóme prsníka</i>	28
Uramová, S.: <i>Analýza mechanizmu protinádorového účinku klinčeka v experimentálnom karcinóme prsníka</i>	32
Kubatka, P.: <i>Epigenetický vplyv rastlinných potravín v animálnom modeli karcinómu prsníka</i>	36
Báľentová, S.: <i>Zmeny v distribúcii neurónov po expozícii mozgu potkana ionizujúcim žiarením</i>	40
Hnilicová, P.: <i>Úbytok neurónov bulbus olfactorius u potkanov ako následok poškodenia mozgu radiačným žiarením</i>	44
Koprda, O.: <i>Vplyv metionínom vyvolanej hyperhomocysteinémie na rozvoj neurodegenerácie za experimentálnych podmienok</i>	48
Tóthová, B.: <i>Sledovanie hladiny acetylácie histónu H4 (Lys12) v tkanive mozgu po globálnej ischemii v podmienkach hyperhomocysteinémie u potkana</i>	52
Petráš, M.: <i>Zmeny superoxiddizmutázy po indukovanej hyperhomocysteinémii, ischemicko-reperfúznom poškodení a ischemickom preconditioningu v kortexe mozgu potkanov</i>	56
Hányšová, S.: <i>Proteomická profilizácia séra, likvoru a mozgového tkaniva u pacientov so sclerosis multiplex</i>	60
Tatarková, Z.: <i>Úloha NO a nitrácie bielkovín v procese ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu</i>	64
Brozmannová, M.: <i>Zhodnotenie počtu eozinofilov v modeli eozinofilnej ezofagitídy</i>	68
Marčeková, M.: <i>Komplexná manifestácia Marfanovho syndrómu u dospelého muža</i>	72
Durďáková, R.: <i>Akupunktúrna dráha LI</i>	76

Postavenie a význam histológie v medicínskych vedách

Histológia má nezastupiteľné miesto pri štúdiu medicíny. Histológia ponúka dôležité poznatky o mikroskopickej a submikroskopickej stavbe ľudských buniek, tkanív, orgánov a systémov. Svojim postavením a významom predstavuje nespochybniteľný integračný element medzi ďalšími medicínskymi odbormi, ako sú napr. anatómia, fyziológia, biológia, biochémia, patológia, hematológia a imunológia. Už z tohto faktu je zrejmé, že histológia je úzko spätá s funkčnými prejavmi horeuvedených štruktúr a pomáha objasniť vzťah medzi štruktúrou a funkciou. Pochopenie logického vzťahu histológie s inými medicínskymi odvetvami zaujímavo oživuje statickú deskriptívnu histológiu a uľahčuje jej štúdium. A navyše, histológia predstavuje pre niektoré predmety medicínskeho kurikula študijnú prerekvizitu (napr. pre patológiu).

Funkčná histológia sa bezpochyby javí ako progresívny odbor, ktorý otvára nové dimenzie tak pre zainteresovaných odborníkov ako aj pre vedychtivých a poctivých študentov a môže byť aj zdrojom intelektuálneho potešenia.

Histológia ako vedný odbor využíva v súčasnosti širokú škálu metodických postupov a techník, ktoré zahŕňajú klasické základné farbiace metódy, histochemické a imunohistochemické postupy a ich modifikácie, rôzne typy elektrónovej mikroskopie, histoautoradiografiu, morfometrickú analýzu, frakcionáciu buniek, extrakčné metódy, kultiváciu buniek, molekulovo-genetické metódy, atď. Na tomto mieste sa nedajú nespomenúť ani moderné štatistické analýzy a ich využitie pri hodnotení získaných výsledkov. Uvedené metodiky môžu v podstate tiež predstavovať spoločného menovateľa s príbuznými vednými odbormi.

Z pohľadu praktickej histológie, najmä posledné desaťročia sú charakterizované zvýšenou požiadavkou klinických odborov na mikroskopické vyšetrenie ľudských, ale aj zvieracích tkanív a orgánov. To len zdôrazňuje potrebu adekvátnej histologickej erudovanosti každého lekára, zdravý prehľad v histologických vyšetrovacích metódach, poznať zásady odberu, fixácie tkanív a ich odosielanie na príslušný typ vyšetrenia. Profesionálna znalosť týchto princípov je základným a nevyhnutným predpokladom presného histologického zhodnotenia morfológického obrazu (normálneho alebo patologicky zmeneného tkaniva) a správnej interpretácie získaných nálezov.

Marian Adamkov

Lymfatický systém a imunitné reakcie pri zápalových procesoch

Kunertová, L., Mellová, Y.

Ústav anatómie, JLF UK v Martine
kunertova@lefa.sk

Abstract

The lymphatic vasculature plays important roles in tissue fluid balance, immune defense, metabolism and cancer metastasis. In adults, lymphatic vessel formation and remodeling occurs primarily during inflammation, development of the corpus luteum, wound healing, and tumor growth. Unlike the blood circulation, where unidirectional flow is sustained by the pumping actions of the heart, pumping actions intrinsic to the lymphatic vessels themselves are important drivers of lymphatic flow.

Key words: lymphatic system, development of lymphatic vessels, inflammation

Úvod

Lymfatické cievy zohrávajú dôležitú úlohu v udržiavaní rovnováhy tkanivovej tekutiny, v imunitnej odpovedi organizmu, metabolizme, v rozvoji a priebehu zápalových ochorení, pri metastázovaní nádorových ochorení. U dospelých sa tvorba lymfatických ciev a remodelácia vyskytuje primárne počas zápalu, vývoja corpus luteum, hojenia rán, prípadne rastu nádoru. Na rozdiel od krvného obehu, kde je jednosmerný tok krvi udržiavaný akciou srdca, je hnacím motorom prestupu tkanivového moku z interstícia do lymfatických ciev intenzita lymfatického toku.

Za fyziologických podmienok výmena tekutiny a plazmatických elementov medzi krvným riečiskom a tkanivami sa deje na kapilárnej úrovni, takto bunky získavajú živiny a eliminujú odpad. Lymfatické cievy tu zohrávajú dôležitú úlohu, vracajú prebytočnú tekutinu a pozostatky metabolizmu naspäť do krvného riečiska. Tekutina, lymfa, sa spočiatku zhromažďuje v primárnom lymfatickom plexe a potom sa prepravuje do zberných lymfatických ciev, ktoré majú k tomu prispôbenú svoju stavbu, stena ciev obsahuje vlákna hladkej svaloviny a v lúmene sa nachádzajú chlopne. Svalové vlákna napomáhajú toku lymfy a chlopne do usmerňujú jedným smerom. Lymfa, ktorá je bohatá na antigény a imunitné bunky, je odvádzaná cez lymfatické uzliny. Sú účinnou súčasťou organizácie imunitnej reakcie organizmu. Antigén je zachytený dendritickými bunkami v periférnych tkanivách, je transportovaný cez lymfatické bunky do lymfatických uzlín, tu sa nachádzajú lymfocyty pre špecifické antigény. Lymfocyty udržiavajú imunokompetenciu tým, že cirkulujú z jednej lymfatickej uzliny do inej, ku každému jednotlivému tkanivu.

Porušenie lymfatickej drenáže spôsobuje vznik lymfedému. Lymphedem alebo lymfatická insuficiencia je charakterizovaný bolestivým regionálnym opuchom, keď sa tekutina akumuluje v interstíciu. V postupom čase vedie lymfedém zhoršeniu imunitnej obrany v postihnutej oblasti. Najčastejšími príčinami poruchy funkcie lymfatického systému sú rôzne vrodené ochorenia, parazitárne infekcie, lymfadenektómia a postchirurgická rádioterapia u pacientov s rakovinou, a podobne. Zhubné nádory môžu priamo meniť obklopujúce lymfatické cievy, čo umožňuje transport rakovinových buniek cez lymfatickú drenáž do lymfatických uzlín [5].

Vývoj lymfatických ciev

Lymfatické cievny systém sa začínajú tvoriť in utero približne v 6 – 7 týždni. Vyvíjajú sa nezávisle od krvného riečiska a k prepojeniu týchto dvoch systémov dochádza až sekundárne. Základy lymfatických ciev sa začínajú objavovať pozdĺž venae cardinales ako systém štrbiniek v mezenchýme. Tieto štrbinky sa navzájom spájajú do vakovitých útvarov, ktoré sú vystlané vrstvou endotelových buniek a z týchto vakov vyrastajú lymfatické cievky, tento proces sa nazýva lymfagiogenéza. Novovytvorené cievky sa spájajú s oddelenými lymfatickými kapilárnymi sieťami a spolu vytvárajú lymfatické plexy. Okolo tretieho mesiaca sa v týchto plexoch začínajú hromadiť uzlíky mezenchýmu, z ktorých sa diferencujú lymfatické uzliny [6, 7]. Ako sa lymfatický cievny strom rozširuje, spojenia s krvnými cievami sa strácajú, okrem prípadov, keď sa lymfa vráti späť do krvného obehu v mieste vyústenia ductus thoracicus a truncus lymphaticus dexter do angulus venosus. Expresia nereceptorovej cytoplazmatickej tyrozín kinázy SYK a signálneho - transdukčného adaptorového proteínu SLP 76 v endotelových, ako aj v cirkulujúcich hematopoetických bunkách, je rozhodujúca pre separáciu krvných a lymfatických ciev. Strata týchto mediátorov vedie k abnormálnym spojeniam medzi lymfatickými a krvnými cievami počas embryogenézy [1, 6]

Pri vývoji a udržiavaní lymfatických ciev má význam množstvo rastových faktorov tak, že sa viažu na príbuzné receptory umiestnené na povrchu lymfatických endoteliálnych buniek. Toto spojenie aktivuje alebo naopak potláča enzymatickú aktivitu, ktorá prenáša signály pre zmenu bunkových biologických procesov. Existujú dve hlavné dráhy, ktoré riadia aktivitu lymfatických endoteliálnych buniek, je to väzba vaskulárneho endotelového rastového faktora (VEGF) na VEGF receptor (VEGFR) a angioproteínová (Ang) -TIE (tyrozínkináza s Ig). Lymfangiogenéza a rast prvých endoteliálnych buniek počas embryogenézy sú riadené VEGF-C a VEGF-D sprostredkovanou aktiváciou VEGFR-2 a VEGFR-3. Tieto faktory sú zodpovedné za aktiváciu lymfatického systému aj počas dospelosti [2, 5]. Rast ciev v postnatálnom období, ako aj ich remodeláciu a dozrievanie stimulujú Ang molekuly.

Lymfatický systém a imunitná reakcia

Lymfa je bohatá na antigény a humorálne faktory, ktoré buď prestupujú z okolitých tkanív alebo sú prítomné v lymfatických cievach, v momente, keď prechádza cez lymfatickú uzlu na ceste späť do systémovej cirkulácie. Týmto spôsobom sú antigén a bunky prezentujúce antigén (APC) z periférnych tkanív účinne koncentrované v efektorovej časti LN. V normálnom homeostatickom stave patria medzi bunky, ktoré vstupujú do LN, primárne dendritické bunky (DC) a pamäťové T bunky. DC obsahujú vlastné antigény a migrujú do LN, kde si zachovávajú nezrelý stav, ktorý je charakterizovaný nízkou úrovňou expresie stimulačných molekúl. Nehematopoetické stromálne bunky (napr. LEC alebo fibroblastické retikulárne bunky (FRC)) tiež podporujú toleranciu, prostredníctvom expresie antigénov periférneho tkaniva. Funkčné lymfatické cievky sú potrebné na udržanie LN mikro-architektúry, ktorá podporuje optimálne interakcie medzi bunkami prezentujúcimi antigén (APC) a vzácnymi antigén-špecifickými lymfocytmi. V lymfatických uzlinách sú primárne folikuly zložené z B buniek s folikulárnymi DC umiestnenými v kôre lymfatickej uzliny. T bunky a DC sa distribuujú v parakortikálnej oblasti. Väčšina makrofágov lymfatických uzlín sa nachádza v okrajových sínusových a medulárnych kordoch. LEC obklopujú LN a sústreďujú sa do oblasti medulla a sínusu [5].

Zápalové zmeny lymfatického systému

Jemne ladená zápalová odpoveď vytvára imunitnú reakciu na cudzie antigény, pričom zabraňuje zjavným reakciám na vlastné antigény. Štruktúra lymfatických uzlín podlieha po aktivácii antigénu dramatickým zmenám, vrátane angiogenézy a lymfangiogenézy. Tieto dočasné zmeny zabraňujú prístupu antigénov k T- a dendritickým bunkám a ich vzájomným interakciám, pričom zvyšujú schopnosť efektorových buniek opustiť uzliny, a tak zabraňovať patologickým imúnne sprostredkovaným škodám. Vírusová infekcia a imunitný stimulant zvyšuje supresiu fibroblastických retikulárnych buniek a potláča odpovede T- buniek. Avšak narušenie steny lymfatickej cievy alebo ich autonómne kontrakcie zhoršujú odtok tekutín, a tým aj schopnosť aktivovať imunitnú odpoveď na patogén, čo vedie k pretrvávaniu infekcie. Počas akútneho zápalu dochádza k lymfangiogenéze v oblasti zápalu a v oblasti odtoku z lymfatickej uzliny. Významne k lymfangiogenéze v uzlinách prispievajú aj B-bunky. Počas chronického zápalu lymfangiogenéza podporuje formovanie ektopického lymfatického tkaniva známeho ako terciálne lymfatické orgány de novo (TLO). TLO zdieľajú značné morfológické, bunkové, chemokínové a vaskulárne charakteristiky s lymfatickými uzlinami. Napríklad chronické odmietnutie transplantovaných ľudských obličiek je poznačené podstatným zvýšením hustoty lymfatických ciev v infiltrátoch imunitných buniek a okolitých infiltrátov v porovnaní s orgánmi, ktorých prijímanie sa vyvíja dobre. Alebo odmietnutie rohových štepov môže byť predpovedané prítomnosťou lymfangiogenézy. U pacientov s reumatoidnou artritídou sa lymfangiogénny faktor VEGF-C zvyšuje. Lymfangiogenéza bola zaznamenaná aj pri iných autoimunitných ochoreniach, ako sú zápalové ochorenia čriev, Crohnova choroba a ulcerózna kolitída, pričom sa ďalej zdôrazňuje dôležitá úloha lymfatických ciev v týchto imunitných procesoch [6].

Záver

V posledných rokoch bol dosiahnutý významný pokrok v chápaní zápalovej lymfangiogenézy a významu lymfatických ciev vo vývoji a riešení zápalových reakcií. Výskum ukázal, že lymfatické cievy tvoria vysoko dynamickú sieť, ktorá rýchlo reaguje na zápal tkaniva v závislosti od stimulu a typu tkaniva. Funkčný význam zápalovej lymfangiogenézy sa javí ako vysoko špecifický, svedčia o tom pro- alebo protizápalové účinky pozorované v závislosti na analyzovanom tkanive. Niektoré štúdie vykonané na zvieratách ju identifikovali ako potenciálny terapeutický cieľ pre moduláciu zápalových a imunitných odpovedí. Aj keď sa dosiahli sľubné výsledky na týchto modeloch, zostáva ešte veľa nezodpovedaných otázok vedúcich k lepšiemu pochopeniu presného mechanizmu prostredníctvom, ktorého sa lymfatické cievy podieľajú na regulácii zápalu tkaniva a imunitnej odpovede. Je pravdepodobné, že úloha lymfatickej siete v regulácii imunitných reakcií presahuje transport antigénu, zápalových mediátorov, a leukocytov medzi periférnymi tkanivami [3].

Lymfatické cievy hrajú kľúčovú úlohu pre udržanie rovnováhy tekutín, obranyschopnosť organizmu. Lymfatické cievy uľahčujú metastázovanie nádorových ochorení. Bola popísaná úloha lymfangiogenézy v imunologickom odmietnutí transplantovaných tkanív a na riešenie tejto problematiky boli vyvinuté nové liečby. Sekrécia lymfangiogénnych rastových faktorov, ako je VEGF-C, bola spojená s produkciou NO, syntézou prostaglandínov. Stále viac je jasné, že štruktúra lymfatických ciev sa od štruktúry krvných ciev veľmi líši, takisto ako aj v molekulárnych mechanizmoch, ktoré riadia ich funkciu. Konkrétne, transport tekutiny lymfatickými cievami je sprostredkovaný mechanizmami, ktoré sú vlastné samotným

zhromažďujúcim sa lymfatickým nádobám a nie centralizovaným čerpadlom, ako je srdce u krvného riečiska.

Literatúra

- [1] Abtahian, *Science*. **2003**, 299: 247-251.
- [2] Breslin, *J Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2007**, 293: H709-718.
- [3] Card, *J Clin Invest*. **2004**, 124: 943-952.
- [4] Karkkainen, *Nat Immunol*. **2004**, 5: 74-80.
- [5] Kasler, *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. **2013**, 5/1: 111-124.
- [6] Sebzda, *Dev Cell*. **2006**, 11: 349-361.
- [7] Stanek, *Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied*. 1972, s. 315-316
- [8] Wang, *Genes Dev*. **2010**, 24: 2115-2126.

Lymfatické kapiláry v papilách dermis v léziách lichen ruber planus

Výbohová, D.¹, Adamicová, K.², Adamkov, M.³, Mellová, Y.¹

¹Ústav anatómie JLF UK v Martine, ²Ústav patologické anatómie JLF UK v Martine, ³Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine
vybohova@lefa.sk

Abstract

Objective of present study was the observation of lymphatic capillaries position within the dermal papillae of the cutaneous lichen ruber planus lesions and healthy skin. Pathological samples (17) and control healthy skin samples (13) were taken from abdominal, back and femoral regions. Blood and lymphatic endothelium was detected using double immunohistochemistry with antibodies to CD34 and podoplanin. Results revealed that lymphatic capillaries in healthy skin are situated mainly below the papillary line or in the lower levels of the dermal papillae. In lichen planus lesions proliferating lymphatics ingrew to higher levels of the dermal papillae, in 53% at the area between the papillary and midpoint line and in 41% to the top of the papillae. Although lymphatic capillaries run in vicinity of blood capillaries, it was evident that blood capillaries ascend higher than lymphatic in both lesional and healthy skin.

Key words: lymphatic capillaries, dermal papillae, cutaneous lichen ruber planus

Úvod

Lymfatické kapiláry sú integrálnou súčasťou mikrocirkulačného systému kože, ktoré slepo začínajú v papilách dermis [1] resp. na rozhraní pars papillaris et reticularis dermis [2]. Lymfatické kapiláry prebiehajú v tesnej blízkosti krvných kapilár ich lúmen je však väčší (okolo 50-60 µm) a značne nepravidelný, stena oveľa tenšia (50-100nm vs 2,5-3,5 µm) [3]. Lymfatické kapiláry vytvárajú v dermis dve spleti: povrchovú a hlbokú v blízkosti krvných spleťí plexus subpapillaris et plexus reticularis, pričom lymfatická spleť je uložená vždy trochu hlbšie. Z hlbkej spleti je následne lymfa drenovaná do lymfatických kolektorov [1-4].

Lichen ruber planus je relatívne časté subakútne až chronické zápalové ochorenie kože, ktoré sa môže vyvíjať aj na slizniciach. Podľa najnovších štúdií sa lichen ruber planus zaraďuje ochoreniam sprostredkovaným T – lymfocytmi. Predpokladá sa, že ide o autoimunitné ochorenie, sprostredkované autoreaktívnymi T – lymfocytmi, ktoré skrížene reagujú voči epidermálnym keratinocytom najmä bazálnym [5-6]. Aj keď dôkazy o angioproliferácii v plexus subpapillaris v léziách lichen ruber planus sa začínajú objavovať, o úlohe a zmenách lymfatickej mikrocirkulácie je zatiaľ známych iba málo informácií. V experimentálnych štúdiách sa však úloha lymfangiogenézy v procese chronického zápalu jednoznačne potvrdila. Je teda predpoklad, že by mohla byť súčasťou zápalového procesu pri chronických dermatózach ako lichen ruber planus ako sme potvrdili v našej predchádzajúcej práci [7]. V tejto štúdii sme sa zamerali na sledovanie polohy novotvorených lymfatických kapilár v papilách dermis v kožných léziách psoriasis vulgaris.

Materiál a metodika

Náš súbor tvorilo 17 vzoriek kože (archivovaných parafínových bločkov) odobratých z kožných lézií lichen ruber planus z regiones dorsi, abdominis et femoris od pacientov vo vekovom rozmedzí 30 - 60 rokov. Kontrolné vzorky (13) boli odobraté

zo zdravej kože od pacientov (kadaverov), ktorí nemali v anamnéze kožné ochorenie. Vzorky boli zaliate do parafínu, rezané na hrúbku 4 μm a ukladané na silanizované sklíčka.

Na detekciu krvných a lymfatických kapilár sme použili metódu dvojitej imunohistochemie s protilátkami: antiCD34 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD34 Class II Clone QBEnd-10 M 7165, DakoCytomation Denmark A/S) na detekciu krvných endotelií a antiD2-40 (Monoclonal Mouse Anti-Human D2-40 Clone D2-40, DakoCytomation Denmark A/S) detekciu lymfatických endotelií. Odmaskovanie epitopov sme robili teplom, pričom predtým sme rezy inkubovali v Target Retrieval Solution High pH (Code No. S3308, DakoCytomation Denmark A/S). Na vizualizáciu sme použili kit EnVision Doublestain System (Code K 1395, DakoCytomation Denmark A/S), ktorý umožnil súčasnú detekciu dvoch antigénov (CD34 aj podoplanín). Ako chromogény boli použité diaminobenzidín a permanentná červeň. Na záver boli rezy dofarbené Mayerovým hematoxylínom.

Morfometrické vyhodnocovanie sme robili použitím softvéru QuickPhoto Micro Version 3.1 (Promicra, Praha). Vyhodnocovali sme polohu lúmenov krvných a lymfatických kapilár vzhľadom k subpapilárnej línii (čiara spájajúca najnižšie miesta epidermálnych čapov) a polohu k midpoint línii (čiara spájajúca body, ktorý ležia v strede vzdialenosti medzi povrchom epidermis a subpapilárnou líniiou). Vzorky boli následne zaradené do troch skupín podľa toho, v akej výške sa nachádzali najvyššie uložené lúmeny lymfatických kapilár: kapiláry zasahujúce do úrovne subpapilárnej línie, kapiláry zasahujúce do oblasti papily medzi subpapilárnou a midpoint líniiou a kapiláry zasahujúce do oblasti papily nad midpoint líniiou. Výsledky sme štatisticky vyhodnocovali χ^2 – testom.

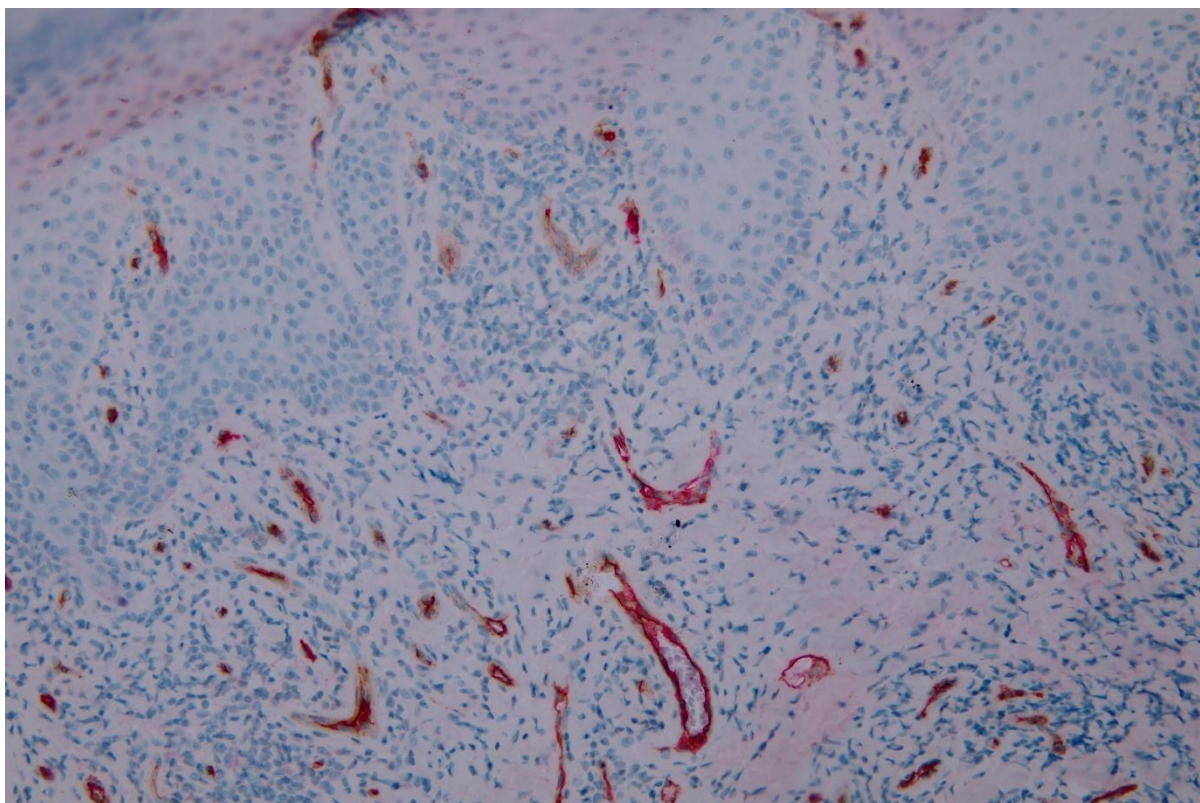
Výsledky a diskusia

Hoci lymfatické a krvné kapiláry prebiehajú v tesnej blízkosti, zistili sme isté charakteristické odlišnosti medzi lymfatickými a krvnými kapilármi.

Lúmeny krvných kapilár mali menší priemer a pravidelný tvar, avšak lúmeny lymfatických kapilár boli nepravidelné a zvyčajne väčšie (viď obrázok 1). Už v predchádzajúcej štúdii [7] sme potvrdili nárast lymfatickej mikrocirkulácie v léziách lichen ruber planus v porovnaní so zdravou kožou (viď tabuľka 1). Teraz sme sa zamerali na polohu lymfatických kapilár v papilách dermis.

V zdravej koži boli lúmeny krvných kapilár viditeľné aj vysoko v papilách, avšak lymfatické kapiláry boli väčšinou pod subpapilárnou líniiou (69%) alebo iba tesne nad ňou (31%).

Vo vzorkách lichen ruber planus sme pozorovali lymfatické kapiláry aj vo vyšších etážach papily, keď v úrovni medzi subpapilárnou a midpoint líniiou boli najvyššie viditeľné lúmeny lymfatických kapilár v 53% vzoriek a u ďalších 41% vzoriek zasahovali lúmeny lymfatických kapilár ešte vyššie nad midpoint líniiou. Štatistická analýza potvrdila signifikantné odlišnosti v polohe lymfatických kapilár v zdravej koži a v léziách lichen ruber planus ($\chi^2 = 15,057$; $p = 0,0005$).



Obr. 1 Lúmeny krvných (hnedá) a lymfatických (červená) kapilár znázornené pomocou dvojitej imunohistochemie s použitím anti CD34 a D2-40 v kožnej lézii lichen ruber planus.

Tab. 1

	Zdravá koža (n=13)	Kožné lézie lichen ruber planus (n=17)
LVA[*] (lymphatic vessel area) (podľa Výbohová et al., 2015)	[*] 0,383±0,076	[*] 0,813±0,189
Lymfatické kapiláry zasahujúce do úrovne subpapilárnej línie	9 / 69%	1 / 6%
Lymfatické kapiláry zasahujúce do oblasti papily medzi subpapilárnou a midpoint líniou	4 / 31%	9 / 53%
Lymfatické kapiláry zasahujúce do oblasti papily nad midpoint líniou	0 / 0%	7 / 41%
χ^2 - test	$\chi^2 = 15,057$ p= 0,0005	

Pre lymfatické kapiláry je charakteristická tenšia endotelová výstelka ako v krvných kapilárach, bazálna membrána chýba alebo je inkompletná a jej stena nie je stabilizovaná pericytmi. K abluminálnemu povrchu endotelových buniek lymfatických kapilár sa však upínajú mikrofilamenty fibrilínu tzv. kotviace fibrily, ktoré fixujú kapiláru k elastickým a kolagénovým vláknam v dermis a reagujú na zmeny v interstíciu. V prípade zvýšeného tlaku v interstíciu, napríklad pri edéme, sa ťahom kotviacich fibríl kapiláry otvárajú (zväčšujú svoj lúmen) a zväčšujú sa aj štrbiny

medzi endotelovými bunkami, čím sa výrazne zvýši permeabilita cievnej steny [3-4, 8-10].

Endotelové bunky lymfatických kapilár sa tvarom podobajú dubovému listu a nie sú medzi sebou tak pevne spojené ako v krvných kapilárach. Vytvárajú ventilové spojenia [10] tzv. „button like junctions“ [9] alebo „overlapping intercellular junctions“ [3], ktoré sú jedinečné a typické iba pre lymfatické kapiláry. Výbežky susedných endotelových buniek lymfatických kapilár sa vzájomne prekrývajú a fungujú ako ventily. Zjednotene povedané, za kludových podmienok, ak je tlak v interstíciu nízky, ventily zostávajú uzatvorené (výbežky endotelových buniek sa prekrývajú), ak však dôjde k hromadeniu tekutiny v interstíciu a tlak sa zvýši, ťahom kotviacich fibríl sa susedné endotelové bunky od seba vzdialia (výbežky endotelových buniek sa už nebudú prekrývať) a ventil medzi susednými bunkami sa otvorí pre prestup tekutín, bielkovín aj buniek [3, 9-10].

Novotvorené lymfatické cievy v mieste chronického zápalu pomáhajú redukovať zápalový edém a podporujú imunitné procesy transportom makrofágov a dendritických buniek. Predpokladá sa, že niektoré zápalové cytokíny, najmä prostaglandíny a histamín, negatívne ovplyvňujú kontraktilitu lymfatických ciev, ktorá vyúsťuje do ich insuficiencie a následne do kompenzačnej lymfangiogenézy [9, 11]. Tá je súčasťou zápalového procesu aj v kožných léziách lichen ruber planus.

Záver

Z výsledkov vyplýva, že lymfatické kapiláry v kožných léziách lichen ruber planus zasahujú v papilách dermis do vyšších etáží ako lymfatické kapiláry v zdravej koži, proliferujú smerom k epidermis. Hoci lymfatické a krvné kapiláry prebiehajú v patologických léziách v papilách dermis v tesnej blízkosti, zo štúdia vyplynulo, že krvné kapiláry zasahovali v dermálnych papilách vyššie ako lymfatické a to tak v zdravej koži ako aj v léziách lichen ruber planus.

Literatúra

- [1] Čihák, *Grada*, 2016.
- [2] Standring, *Churchill-Livingstone Elsevier*, 2008.
- [3] Skobe, *J. Invest Dermatol Symp Proc.* 2000, 5: 14-19
- [4] Lund, *Cancer Discovery.* 2016, 6: 22-35.
- [5] Braun-Falco, *Osveta.* 2001.
- [6] Bolognia, *Elsevier Saunders.* 2012
- [7] Výbohová, *Acta Histochem.* 2015, 117: 20-28.
- [8] Gerli, *Lymphology.* 2000, 33: 148-157.
- [9] Baluk, *J Exp Med.* 2007, 204: 2349-2362.
- [10] Lullman-Rauch, *Grada.* 2012.
- [11] Tamella, *Cell.* 2010, 140: 460-476.

Niektoré zmeny štvrtej edície Klasifikácie tumorov mäkkých tkanív v histopatologickej praxi

Adamicová, K.

Ústav patologickej anatómie JLF UK v Martine
adamicova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

In year 2013, the new classification of tumours of soft tissue and bones was released. This edition belongs to the fourth series of so-called Blue Books published under the auspices of the World Health Organisation (WHO). The current classification follows the previous third edition, from which it differs in several aspects. The vast majority of changes are related to the soft tissue tumour section, which was enriched with three new chapters, some entities or terms were removed, new diagnoses were introduced, and several tumours were reallocated to other categories. Compared to the previous edition, more detailed molecular and cytogenetic data were incorporated in the current issue. However, abundant molecular and cytogenetic data highlight an increasing problem of growing numbers of genetic overlaps even among quite different tumours. In the current contributions applies in particular to certain information in the category of tumors of uncertain differentiation and undifferentiated/unclassified sarcoma.

Key words: soft tissue tumors, WHO classification, undifferentiated pleomorphic sarcoma

Úvod

WHO klasifikácia tumorov mäkkých tkanív a kostí prekonala v ostatných decéniách značné zmeny. O tých najpodstatnejších sa diskutovalo už v predchádzajúcej edícii, v treťom vydaní (2002) [1]. Ku kľúčovým pokrokom v kategórii „soft tissue tumors“ patrí zistenie, že niektoré morfológicky jednoznačne benígne nádory (napr. benígny fibrózny histiocytóm alebo difúzny typ obrovskobunkového tumoru šľachových pošiev môžu veľmi zriedkavometastázovať. Túto prognózu nemožno stanoviť na základe morfológického či iného charakteru [2-4].

Niektoré všeobecné zmeny v novej klasifikácii

V príspevku sa chceme venovať najmä zmene jednotky historicky nazývanej malígny fibrózny histiocytóm (MFH). Tento nádor sa v predchádzajúcom vydaní synonymicky označoval ako nediferencovaný pleomorfný sarkóm. Zdokonaľovaním vyšetrovacích metód v patológii možno väčšinu pleomorfných nádorov pri podrobnom vyšetrení ďalej subklasifikovať a nádor správne zaradiť ako pleomorfný leiomyosarkóm, high-grade myxofibrosarkóm, dediferencovaný alebo pleomorfný liposarkóm alebo pleomorfný rhabdomyosarkóm. Tzv. pleomorfný MFH bol v minulosti najčastejšie diagnostikovaným sarkómom u dospelých pacientov, pri dôslednej aplikácii kritérií WHO klasifikácie by však jeho početnosť nemala prekročiť 5 % zhubných nádorov mäkkých tkanív [2]. Štvrté vydanie WHO zastaralý názov MFH úplne vypustilo. Táto kategória nádorov je v súčasnosti zaradená do samostatnej, novej kategórie nediferencovaných/neklasifikovaných sarkómov. Kategória nádorov s neistou diferenciáciou sa tak postupne rozrastá o nádory, ktoré boli pôvodne zaradené do inej skupiny alebo o novo uvedené jednotky [2, 4].

Neoddeliteľnou súčasťou obidvoch posledných klasifikácií WHO klasifikácie mezenchýmových nádorov sú rýchlo sa rozrastajúce informácie o genetických dátach, ktoré na jednej strane robia diagnózu presnejšou, no na druhej strane generujú jednotky, pri ktorých sa vyskytujú rovnaké genetické zmeny, ale histogeneticky boli dodnes zaradované do iných skupín, čo pôsobí pri ich diagnostike zavádzajúco [4].

Histologický grade sarkómov tkanív sa pokladá za najvýznamnejší prognostický faktor. Ani v súčasnosti však neexistuje jednotná a univerzálne akceptovaná gradingová schéma týchto nádorov. Medzi v súčasnosti najčastejšie používané schémy patria dve trojstupňové, tzv. NCI (National Cancer Institute) a FNCLCC (Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer) gradingové systémy. Obidva systémy sú založené na kvantifikácii mitotickej aktivity a rozsahu koagulačnej nekrózy. Ich hlavným komponentom je histologický typ nádoru [5]. Medzi hlavné slabiny obidvoch schém patrí správne určenie histologického typu, prípadne subtypu sarkómu, sporne aplikované kritériá počtu mitotických štruktúr pri hypocelulárnych (myxoidných) nádoroch a stanovenie rozsahu intralezionálnej nekrózy pri nádoroch s veľkými rozmermi, pri ktorých je vyšetrovaná iba malá časť nádorového tkaniva. Veľmi problematické je tiež hodnotenie nekrózy pri nádore, ktorý bol pred vyšetrením liečený chemoterapiou, prípadne rádioterapiou [5]. V najnovšej WHO klasifikácii je uvedený tzv. molekulový gradingový systém založený na identifikácii expresívneho profilu 67 génov súvisiacich s komplexitou chromozómov a riadiacich mitóz (CINSARC, Complexity Index in SARComas), ktorý bol opísaný na veľkom súbore sarkómov s komplexným genómovým profilom. Tento molekulárny gradingový systém pri high-grade sarkómoch, gastrointestinálnych stromálnych tumoroch (GIST), ale napr. aj pri karcinóme prsníka a difúznom veľkobunkovom B-lymfóme prognosticky prekonáva histologický grading [6-7].

Tab. 1 Výpočet kategórií tumorov mäkkých tkanív v 3. a 4. edícii WHO klasifikácie

Kategórie tumorov mäkkých tkanív	
WHO 2002	WHO 2013
Adipocytárne tumory	Adipocytárne tumory
Fibroblastické/myofibroblastické tumory	Fibroblastické/myofibroblastické tumory
Tzv. „fibrohistiocytárne“ tumory	Tzv. „fibrohistiocytárne“ tumory
Pericytické (perivaskulárne) tumory	Pericytické (perivaskulárne) tumory
Hladkosvalové tumory	Hladkosvalové tumory
Tumory kostrového svalu	Tumory kostrového svalu
Vaskulárne tumory	Vaskulárne tumory
Chondrooseózne tumory	Chondrooseózne tumory
Tumory neistej diferenciácie	GISTy
	Tumory nervových obalov
	Tumory neistej diferenciácie
	Nediferencované/neklasifikované sarkómy

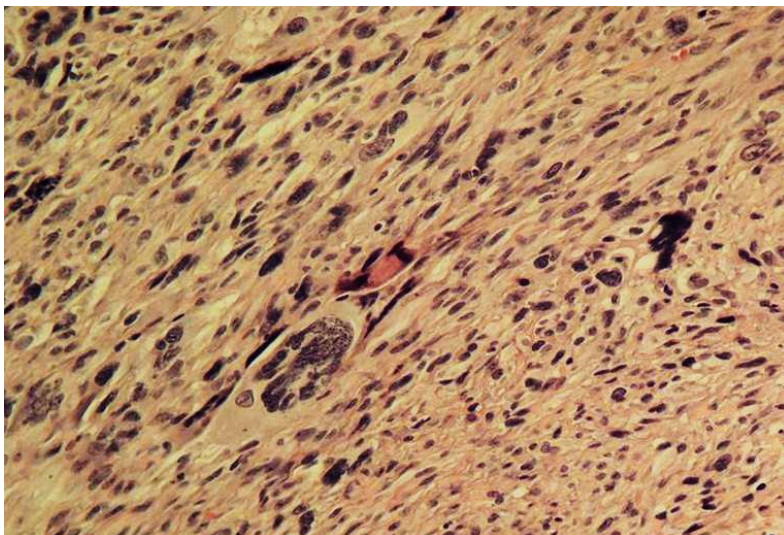
Nádory neistej diferenciácie

Pri nádoroch zaradených do tejto kategórie nie je známa línia diferenciácie, ktorú nádory rekapitulujú. Tieto nádory sú vymedzené histochemicky alebo molekulovogeneticky. Táto skupina nádorov bola rozšírená o štyri jednotky. Akrálny (digitálny) fibromyxóm patrí medzi benígne nádory dospelých, takmer vždy je lokalizovaný v blízkosti nechtového lôžka. Pozostáva z uniformných vretenovitých buniek, ktoré sú obklopené myxoidným matrixom. Druhým novo uvedeným nádorom je atypický fibroxantóm (AFX), pôvodne zaradený medzi WHO klasifikáciu kožných

nádorov, ktorý sa v takmer všetkých prípadoch správa benígne, a to napriek svojej „jednoznačne malígnej“ morfológii. Extrémne zriedka však môže založiť vzdialené metastázy. Tretím, úplne nanovo zaradeným nádorom je hemosiderotický fibrolipomatózny tumor (HFLT), niekedy označený ako hemosiderotická fibrohistiocytárna lipomatózna lézia. Ide o zriedkavú afekciu postihujúcu dospelých pacientov. Pozostáva z neostro ohraničenej proliferácie zrelého tukového tkaniva a uniformných fibroblastov s depozitmi hemosiderínu. Lokálne recidivuje až v 1/3 prípadov a má potenciál k malígnej progresii. V HFLT bola identifikovaná rovnaká translokácia ako pri myxoinflamatórnom fibroblastickom sarkóme (alebo atypickom myxoinflamatórnom fibroblastickom tumore), teda $t(1;10)(p22;q24)$. Obidve afekcie sa klinicky podobne prezentujú a v súčasnosti boli opísané so zmiešanými morfológickými charakteristikami. Posledným novopredstaveným nádorom v tejto skupine je fosfaturický mezenchýmový tumor, ktorý sa zjavuje u dospelých stredného veku v ľubovoľnej lokalizácii a prostredníctvom fibroblastického rastového faktora 23 (FBGF23). Pozostáva z morfológicky charakteristických buniek so vzhlľadom a s usporiadaním myofibroblastov alebo myopericitov, ktoré sú obklopené hyalinizovaným matrixom, miestami s granulárnymi kalcifikáciami. Ide o intermediárny zriedkavo metastázujúci tumor [4]. V súčasnej klasifikácii sa už pre Ewingov sarkóm nepoužíva synonymický termín primitívny neuroektodermálny tumor (PNET), a to z dôvodu možnej zámeny s podobne označovanými léziami v CNS a v ženskom genitálnom systéme. Kriticky sa pristupuje aj k diagnóze malígneho mezenchymómu, ktorý je vylúčený zo zoznamu kódov MKN-0. Väčšina v minulosti opisovaných prípadov malígneho mezenchymómu pravdepodobne predstavuje heterológnu líniu diferenciácie v konkrétnych sarkómoch, najčastejšie v myxoidnom liposarkóme, ALT alebo dediferencovanom liposarkóme [3].

Nediferencované/neklasifikované sarkómy

Ide o novo včlenenú skupinu malígnych nádorov, ktorá obsahuje lézie, pôvodne označované ako tzv. malígný fibrózny histiocytóm (MFH) (obr. 1). Do tejto kategórie sa zaraďujú sarkómy, pri ktorých sa nijakou dostupnou metódou nepodarí zistiť líniu diferenciácie. Ich ďalšia subklasifikácia je založená na bunkovej morfológii. V súčasnosti sa teda rozlišuje päť variantov nediferencovaných sarkómov: nediferencovaný vretenobunkový, pleomorfný, guľatobunkový a epiteloidný sarkóm, ako aj nediferencovaný sarkóm bližšie nešpecifikovaný. Približne štvrtina nediferencovaných/neklasifikovaných sarkómov vzniká v súvislosti s predchádzajúcim ožiarением. Pomocou molekulovogenetických metód boli odhalené mnohé chromozomálne prestavby, prevažne translokácie, pomocou ktorých sú medzi guľatobunkovými sarkómami vyčleňované niektoré genetické podskupiny. U časti pediatrických pacientov bol napr. identifikovaný fúzny gén CIC-DUX4, ktorý kóduje chimerický proteín deregulujúci gény podtriedy PEA3 rodiny ETS. Podobné gény sú vo zvýšenej miere exprimované aj v klasickom Ewingovom sarkóme. Tak sa vysvetľuje napr. morfológická podobnosť guľatobunkového variantu nediferencovaného sarkómu s Ewingovým sarkómom. Genetické údaje v tejto kategórii sarkómov rýchlo pribúdajú. Z tohto dôvodu možno očakávať, že v budúcnosti nastane reorganizácia celej kapitoly nediferencovaných/neklasifikovaných sarkómov.



Obr. 1 Nediferencovaný pleomorfný sarkóm, ktorý v predchádzajúcej edícii mohol byť diagnostikovaný ako malígny fibrózny histiocytóm (HE, 240x).

Záver

Možno očakávať, že s pokračujúcimi úspechmi molekulových a genetických štúdií budú definované ďalšie neoplastické jednotky mezenchýmových tumorov a tie súčasné budú presnejšie subklasifikované.

Literatúra

- [1] Fletcher, *IARC Press: Lyon*. **2002**.
- [2] Fletcher, *Histopathology*. **2006**, 48: 3-12.
- [3] Fletcher, *4th Ed, IARC Press: Lyon*, **2013**.
- [4] Fletcher, *Histopathology*. **2014**, 64/1: 2-11.
- [5] Deyrup, *Histopathology*. **2006**, 48: 42-50.
- [6] Chibon, *Nat Med*. **2010**, 16: 781-787.
- [7] Zambo, *Čes-slov Patol*. **2014**, 50/2: 64-70.

Expresia PD-L1 proteínu v malígnych nádoroch

Škuciová, V.¹, Drahošová, S.¹, Benčat, M.¹, Adamkov, M.², Dzuracký, J.^{1,3}

¹Patológia s.r.o., Martin, ²Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine, ³Patológia
NÚTPCHaHCH Vyšné Hágy
veronika.skuciova@gmail.com

Abstract

The immunotherapy goes through a huge development these days. There is a contribution of new findings about complex interactions between tumorous cells, cells of tumorous microenvironment (TME) and organism. One of these interaction is the engagement PD1 and PD-L1 between T cells and tumorous cells and the necessity of its reconnaissance and inhibition during therapy. Determining which patients derive benefit from specific therapy remains an important clinical question, particularly in light of the autoimmune toxicity of these drugs. Immunohistochemical detection of PD-L1, as an exclusionary predictive biomarker for now, is confounded by multiple unresolved issues and for the future there will be necessary to find and add more biomarkers.

Key words: PD-L1 protein, PD-1 receptor, immunohistochemical detection, biomarker, immunotherapy

Úvod

Imunitný dohľad je proces, v ktorom imunitný systém dokáže identifikovať a kontrolovať novovznikajúce nádorové bunky. Pri nádorovom procese často dochádza ku supresii antitumoróznej imunity a úniku neoplastických buniek spod imunitného dozoru [1].

Jednou z podstatných ciest úniku spod imunitného dozoru je expresia proteínu PD-L1 (Programmed death-ligand 1), ku ktorej dochádza nielen v nádorových bunkách, ale tiež v tumor-infiltrujúcich bunkách v nádorovom mikroprostredí. Väzbou tohto proteínu na PD-1 receptor, prítomný na T-lymfocytoch, dochádza k utlmeniu cytotoxickej reakcie T-lymfocytov mechanizmom negatívneho ovplyvnenia ich migrácie, proliferácie a sekrécie cytotoxických mediátorov [2].

História objavenia PD dráhy

Receptor PD-1 (CD279) bol objavený v roku 1992, kedy sa podarilo vyizolovať jeho DNA pri štúdiu dvoch bunkových línií – hematopoetickej progenitorovej bunkovej línie LyD9 a T bunkového hybridómu, ktoré podliehali programovanej apoptóze [12, 18]. Ďalšie vedecké štúdie ukázali, že deficit PD-1 vedie ku zvýšenej odpovedi T buniek na rôzne alo- i autoantigény a súvisí s rozvojom autoimunitných ochorení, z čoho vyplýva, že sa PD-1 na T bunkách podieľa na tlmení ich imunitnej odpovede [3-5].

Viaceré štúdie prispeli k objaveniu molekúl viažúcich sa na receptor PD-1. V roku 1999 bol identifikovaný nezávisle od PD-1 B-7 homológ 1 a ukázalo sa, že v podmienkach in vitro hrá úlohu v inhibícii T bunkovej imunitnej odpovedi [5-6].

Tieto dve nezávislé štúdie sa spojili v roku 2000, kedy sa potvrdilo, že PD-L1 proteín je funkčný partner PD-1 [7]. Neskôr sa jasne ukázalo, že interakcia PD-1 / PD-L1 má dôležitú rolu v supresii T-bunkovej odpovedi v podmienkach in vivo, zvlášť v mikroprostredí tumoru [8-9].

Okrem PD-L1 je ligandom PD-1 i proteín PD-L2 (B7-CD) identifikovaný prvýkrát v roku 2001 na dendritických bunkách, ktorý rovnako ako PD-L1 sprostredkoval

inhibičné signály [10-11]. Ligandy PD-L1 a PD-L2 však môžu interagovať i s inými receptormi a mať iné kosignálne pôsobenie na bunky imunitného systému [12].

PD-L1 proteín a jeho expresia

PD-L1 (B7-H1), produkt génu CD274, je kosignálna molekula a člen B7 rodiny ligandov, zohrávajúci významnú úlohu pri imunitných reakciách organizmu. Tento transmembránový glykoproteín pozostáva z IgV-like a IgC-like extracelulárnej domény a krátkej cytoplazmatickej domény dĺžky 30 aminokyselín. PD-L1 proteín sa viaže na receptor PD-1 a má tiež afinitu ku kosignálnej molekule B7-1 [2].

PD-L1 proteín je exprimovaný širokou škálou buniek. Za bazálnych podmienok sú to najmä T bunky a po ich aktivácii pri strete s antigénom sa expresia ešte viac zvýši. Ďalej je expresia po stimulácii prítomná i na dendritických bunkách, B bunkách, makrofágoch, mastocytoch a dochádza k nej i na mnohých nehematopoetických bunkách. PD-L1 proteín bohato exprimujú aj mnohé typy nádorových a tumor-infiltrujúcich buniek s cieľom inhibície antitumoróznej imunitnej odpovede a úniku spod imunitného dozoru organizmu. Expresia PD-L1 môže byť konštitutívna (u nádorových buniek k nej dochádza onkogénnymi signálnymi dráhami) alebo indukovaná, napríklad prozápalovými mediátormi (najmä IFN gama) [2].

PD-1 a jeho expresia

PD-1 je membránový proteín pozostávajúci z 268 aminokyselín. Je to člen imunoglobulínovej rodiny CD8/CTLA-4 T-bunkových regulátorov, imunitný kontrolný bod T buniek zúčastňujúci sa tlmenia imunity na periférii počas efektorovej fáze T-bunkovej aktivácie a navodenia imunitnej tolerancie pri strete s bunkami exprimujúcimi PD-L1 [2,15].

Pozostáva z extracelulárnej Ig-V domény, transmembránovej domény a z intracelulárnej domény, ktorá obsahuje dva imunoreceptory : ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) a ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif) s možnosťou fosforylácie. V prípade naviazania ligandov k nej dochádza a ďalej sa aktivizujú fosfotyrozín fosfatázy SHP-1 a SHP-2, ktoré znižujú aktiváciu molekúl zúčastňujúcich sa signálnej dráhy, a tým dochádza následne ku negatívnej regulácii TCR [2, 13]. Navyše ligácia PD-1 na T bunkách s PD-L1 na DC spôsobí TCR down-reguláciu tým, že podporí expresiu Cbl-b E3 ubikvitín ligázy [13].

Väzba PD-1/PD-L1 ovplyvňuje vrodenu i T-bunkovú imunitu a má význam v prevencii autoimunitných reakcií organizmu. Sprostredkuje doručovanie inhibičných signálov regulujúcich rovnováhu medzi T bunkovou aktiváciou, toleranciou a imunitným poškodzovaním tkaniva pri perzistujúcej antigénnej stimulácii (napr. počas chronickej infekcie alebo strete vlastných antigénov). Väzba má tiež rozhodujúcu rolu v regulácii antitumoróznej imunity. Okrem supresie migrácie a proliferácie T buniek tiež negatívne ovplyvňuje sekréciu cytokínov. Spôsobuje aj zmeny v diferenciácii regulačných T buniek zotrvávajúcich v TME, ktoré inhibujú imunitnú odpoveď. Zatiaľ nie celkom objasnenými mechanizmami spôsobuje oslabenie a vyčerpanie tumor infiltrujúcich T-lymfocytov (TIL) a ich následnú apoptózu [14].

PD-1 je za bazálnych podmienok exprimovaný v menšej miere iba na T regulačných T bunkách. Po stimulácii sa jeho expresia výrazne zvýšenie len na T regulačných bunkách, ale aj CD4+ a CD8+ T bunkách, NKT bunkách, B bunkách a makrofágoch. Istá expresia sa pozorovala aj na myeloidných DC a monocytoch. Expresiu riadia viaceré cytokíny, interferóny, zložky komplementu a iné [2].

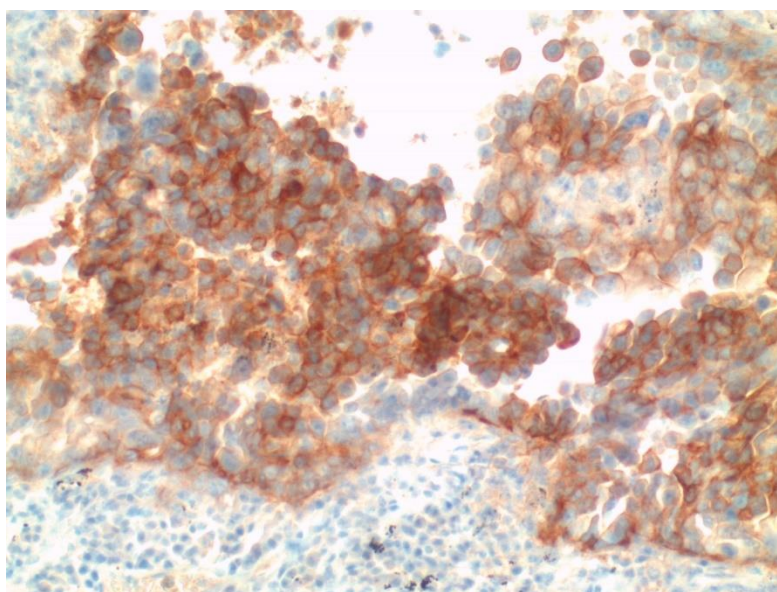
Biomarker PD-L1 a jeho detekcia

Expresia ligandu PD-L1 je momentálne jediným prediktívnym markerom odpovede na liečbu inhibítormi kontrolných bodov (checkpointov) imunitnej reakcie [15-16]. Imunohistochemická detekcia proteínu PD-L1 v malígnych nádoroch sa však stretáva s množstvom problémov v interpretácii výsledkov.

Prvé nezrovnalosti môžu nastať pri neadekvátnej fixácii a príprave tkaniva a použití rôznych protokolov farbenia. Existuje množstvo klonov protilátky od rôznych výrobcov s rozdielnou senzitivitou, ktorý v odporúčaniach používajú často iné postupy hodnotenia a stanovujú iné „cut-off“ hodnoty. Je potrebné odlišovať farbenie nádorových buniek od buniek TME a identifikovať prípadné artefakty v podobe nekróz alebo zmliaždenia tkaniva. Myslieť treba i na tzv. temporospaciálnu heterogenitu a dynamiku expresie, kedy môže byť expresia proteínu PD-L1 ovplyvnená vývojom nádoru, predchádzajúcou terapiou či indukovaná zápalom. Tiež býva diskordancia statusu expresie medzi primárnym nádorom a metastázou u toho istého pacienta [15,17].

Pri hodnotení statusu expresie PD-L1 proteínu vo vzorke je v svetelnom mikroskope nutné brať do úvahy parciálnu alebo kompletnú membránovú pozitivitu nádorových buniek slabej, stredne silnej alebo silnej intenzity a vyjadriť počet ofarbených nádorových buniek v percentách (tumor proportion score – TPS). Prípadná cytoplazmatická pozitivita nie je významná, keďže biologickú aktivitu má iba proteín PD-L1 lokalizovaný na membráne [17].

Podľa mnohých štúdií sú ďalším definovaným markerom odpovede na liečbu mismatch repair proteíny (MMR) spájajúce genomiku s imunoterapiou. MMR – deficientné nádory viac exprimujú ligandy imunitných checkpointov (PD-L1, PD-1, CTLA-4, LAG-3 a IDO) a obyčajne sa spájajú s denznejším infiltrátom imunitných buniek v tumoróznom mikroprostredí [17]. Kandidátom na prediktívny faktor je teda viac, vrátane určovania imuniskóre, hodnotenia CD8+ T lymfocytov infiltrovaných v nádore a tiež zápalového mediátora IFN- γ [18]. Z predošlých skutočností vyplýva, že čím je nádor mutagénnejší, čiže schopnejší vytvárať väčšie množstvo neoantigénov asociovaných s mutáciami, tým sa stáva pre antitumorózny imunitný systém atraktívnejší a po blokáde PD-1/PD-L1 dráhy sa dosahuje lepšia odpoveď [17].



Obr 1 PD-L1 pozitívny adenokarcinóm pľúc (TPS = 95-100 %)

Diskusia a záver

Imunoterapia predstavuje výrazný posun v stratégií liečby nádorových ochorení. Pre porovnanie mechanizmov účinkov imunoterapie uvádzame HER2 onkogén. V nádore s jeho overexpresiou sa stáva výborným markerom pre cielenú anti-HER2 liečbu. Rovnako overexprimovaný fúzny gén BCR-ABL je zároveň marker pre BCR-ABL tyrozín kinázový inhibítor. Defekt onkogénov je pri vyšetrovaní vzorky detekovaný a následne je nasadená špecificky namierená terapia. Oproti týmto druhom imunoterapie je blokáda imunitných kontrolných bodov v zásade terapiou zameranou na zabránenie imunitnej tolerancie navodenej nádorovými bunkami a následne umožnenie natívneho imunitného systému pacienta efektívne bojovať s nádorom [15, 19-20].

PD-L1 proteín predstavuje maladaptívny spôsob ochrany nádorových buniek pred imunitným dozorom organizmu. Pacienti s overexpresiou proteínu v nádore majú lepšiu celkovú terapeutickú odpoveď. Neplatí to však uniformne a mnohí pacienti bez expresie PD-L1 proteínu profitujú z liečby tiež. Práve preto IHC detekcia proteínu v súčasnosti nemôže predstavovať exkluzívny prediktívny biomarker. Ideálne by bolo disponovať multiparametrickým skóre odrážajúcim okrem expresie PDL-1 proteínu i mutagénnosť nádoru, imunorskóre, úroveň exprimácie IFN- γ , prípadne ďalšie zatiaľ neobjavené markery, ktoré by boli spoľahlivejšie v predikcii ako samotný status expresie PD-L1 [14-15, 18].

Cielená terapia anti- PD-1/ PD-L1 dosahuje významné úspechy dokonca pri takých na konvenčnú terapiu refraktérnych nádoroch ako je melanóm, renálny karcinóm či nemalobunkový nádor pľúc. Sľubná účinnosť tejto terapie vedie k nutnosti získania ďalších biomarkerov pre lepšiu a spoľahlivejšiu selekciu pacientov [15].

Literatúra

- [1] Vesely, *Ann NY Acad Sci.* **2013**, 1284/1: 1-5.
- [2] Francisco, *Immunol Rev.* **2010**, 236: 219-242.
- [3] Nishimura, *Immunity.* 1999, 11/2: 141-151.
- [4] Nishimura, *Science.* 2001, 291/5502: 319-322.
- [5] Chen, *JCI.* **2015**, 125/9: 3384-3391.
- [6] Dong, *Nat Med.* **1999**, 5/12: 1365-1369.
- [7] Freeman, *J Exp Med.* **2000**, 192/7: 1027-1034.
- [8] Chen, *Nat Rev Immunol.* 2004, 4/5: 336-347.
- [9] Zou, *Nat Rev Immunol.* 2008, 8/6: 467-477.
- [10] Tseng, *J Exp Med.* 2001, 193/7: 839-846.
- [11] Latchman, *Nat Immunol.* 2001, 2/3: 261-268.
- [12] Wang, *J Exp Med.* **2003**, 197/9: 1083-1091.
- [13] Karwacz, *EMBO Molecular Medicine.* **2011**, 3/10: 581-592.
- [14] Sui, *Oncotarget.* **2015**, 6/23: 19393-19404.
- [15] Patel, *Mol Cancer Ther.* **2015**, 14/4: 847-856.
- [16] Keytruda, Hertfordshire, UK: Merck Sharp & Co. **2017**.
- [17] Wang, *Onco Targets Ther.* **2016**, 9: 5023-5039.
- [18] Abiko, *BJC.* **2015**, 112/9: 1501-1509.
- [19] Stickeler, *Breast Care.* 2011, 6/3: 193-198.
- [20] Sweet, *Journal of Hematology & Oncology.* 2013, 6: 54.

Karbonická anhydráza IX ako potenciálny biomarker kolorektálnych karcinómov

Tupá V.¹, Drahošová S.², Benčat M.², Adamkov M.¹

¹Ústav histológie a embryológie, JLF UK v Martine, ²Alpha medical, s.r.o., Martin
veronika.tupa@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the second most commonly diagnosed cancer among females and third among males worldwide. Patient survival is highly dependent on the tumor stage at the time of diagnosis. Biomarkers currently play an important role in the detection and treatment of patients with colorectal cancer [1,2]. Carbonic anhydrase IX (CAIX) is a hypoxia-inducible enzyme that is overexpressed by cancer cells from many types of tumors (including CRC). On the other hand, this protein is rarely expressed in corresponding normal tissues. CA IX protects tumor cells from hypoxia and acidosis, it is involved in the regulation of cell adhesion and in maintaining the intracellular pH. Colorectal tumours show an abnormal CA IX expression, which is associated with poor prognosis of CRC [3,4]. In this study we examined the expression of this protein in CRC tissues by immunohistochemical staining in the panel of 60 samples. We semiquantitatively evaluated percentage of CA IX positive cells, subcellular localization and intensity of immunoreaction. CA IX expression was detected in 51/60 cases of CRC (85%). Under 25% of reactive cells were found in 37,3% carcinomas, under 50% were in 33,3% and more than 50% of reactive cells were detected in 29,4% CRC. Membrane staining alone was observed in 88,2% carcinomas, while combined membrane and cytoplasmic staining of CA IX was detected in 11,8% carcinomas. The intensity of immunoreactivity was in the most cases strong (96,1%).

Key words: colorectal cancer, carbonic anhydrase IX, hypoxic marker, immunohistochemical staining

Úvod

Kolorektálny karcinóm sa celosvetovo dostal v posledných rokoch na popredné miesta vo výskyte onkologických ochorení. Na Slovensku je u mužov na prvom a u žien po karcinóme prsníka na druhom mieste v incidencii zhubných ochorení. Ide taktiež o najčastejšiu malignitu tráviaceho traktu. Predstavuje tak závažný celospoločenský, medicínsky a v neposlednom rade aj ekonomický problém. Výber prognostických faktorov je založený na hodnotení klasických ukazovateľov prognózy a prognostických faktorov charakterizujúcich biologickú aktivitu nádoru [5-6]. Nádorové mikroprostredie predstavuje zložitý ekosystém pozostávajúci z navzájom sa ovplyvňujúcich zložiek – nádorových a stromálnych buniek, extracelulárnej matrix, solubilných faktorov a cytokínov. Typickým faktorom definujúcim mikroprostredie solídnych nádorov je hypoxia, teda nedostatočné zásobením kyslíkom, ktorá je považovaná za indikátor zlej prognózy. Súčasné klinické štúdie podporujú fundamentálny význam hypoxie v rozvoji nádorového ochorenia a poukazujú na dôležitosť tohto fenoménu pre onkologickú prax. Detekcia hypoxie v tumoroch je nevyhnutným predpokladom pre voľbu správneho terapeutického prístupu. V súčasnosti sa používajú metódy invazívneho charakteru, ktoré sú zaťažené nádorovou heterogenitou a sú uplatniteľné výlučne perspektívne. Z tohto dôvodu je

možnosť použiť prirodzený marker hypoxie veľmi žiaduca. Medzi najviac hypoxiou-indukované proteíny patrí karbonická anhydráza IX, ktorej expresia sa javí ako potenciálny prognostický biomarker CRC. Tento zinkový metaloenzým sa podieľa na katalýze premeny oxidu uhličitého a vody na bikarbonátové anióny a protóny. Hlavnou úlohou CA IX je udržiavanie intracelulárnej pH homeostázy spojennej s acidifikáciou extracelulárneho prostredia. Pritom platí, že hodnoty intracelulárneho aj extracelulárneho pH prísne kontrolujú mnohé bunkové procesy. CA IX teda predstavuje faktor prežívania, ktorý ochraňuje nádorové bunky pred fyziologickými stresmi. Imunohistochemická detekcia tohto proteínu môže poskytnúť nielen informácie o prítomnosti intratumorovej hypoxie, ale aj prognóze nádorového ochorenia. Preto objasnenie úlohy CA IX by mohlo viesť k novým kľúčovým poznatkom a tiež k inovatívnym terapeutickým stratégiám [7-9].

Materiál a metodika

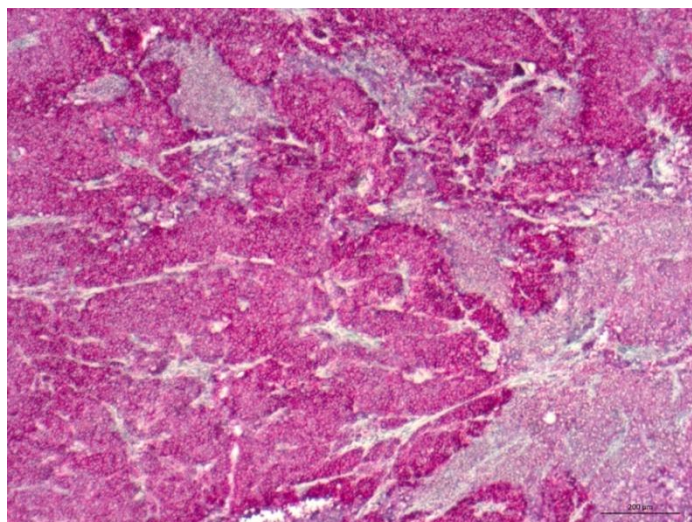
V našej práci sme imunohistochemicky vyšetrili parafrínový materiál zo 60 vzoriek kolorektálnych karcinómov. Z každej vzorky boli pripravené 4 µm hrubé rezy. Na imunohistochemické reakcie na dôkaz CA IX sme použili automat Ventana Benchmark Ultra (Roche). Monoklonálnu protilátku proti CA IX (klon: H-11; Zeta corporation) sme riedili v pomere 1:300. Reakcia bola vizualizovaná Fast Red chromogénom (Roche). Pri interpretácii získaných imunohistochemických vyšetrení sme semikvantitatívne hodnotili percento pozitívnych buniek, subcelulárnu lokalizáciu a intenzitu imunoreakcie (Tab.1).

Tab. 1 Hodnotené parametre v nádorových bunkách

Percento pozitívnych buniek	<5%
	6 – 25%
	26 – 50%
	>51%
Subcelulárna lokalizácia imunoreakcie	membránová lokalizácia
	kombinovaná lokalizácia (membránová a cytoplazmová)
Intenzita imunoreakcie	slabá
	stredná
	silná

Výsledky

Predkladaná práca opisuje expresiu karbonickej anhydrázy IX v nádorových léziách kolorekta. CA IX bola exprimovaná v 51/60 prípadoch CRC (85%). Menej ako 25% CA IX-pozitívnych buniek bolo prítomných v 19/51 prípadoch (37,3%) a menej ako 50% pozitívnych buniek v 17/51 prípadoch (33,3%). Viac ako 50% pozitívnych buniek sme detegovali v 15/51 prípadoch CRC (29,4%). Zistili sme dva druhy imunohistochemickej positivity. V 45/51 vzorkách (88,2%) bola pozorovaná membránová pozitivita (Obr. 1) a v 6/51 vzorkách (11,8%) dominovala kombinovaná (membránová aj cytoplazmatická) pozitivita. Intenzita imunoreakcie bola v 49/51 prípadoch (96,1%) silná a v 2/51 prípadoch (3,9%) stredná.



Obr. 1 Membránová pozitivita imunoreakcie na dôkaz CA IX v CRC

Diskusia

Karbonická anhydráza IX je prirodzene exprimovaná v rámci úzkeho spektra tkanív, ktoré patria predovšetkým ku gastrointestinálnemu traktu (najmä v epiteli žlčníka, žalúdka a tenkého čreva), pričom expresia smerom k hrubému črevu klesá. Na druhej strane často vykazuje silnú pozitivitu v nádorových tkanivách, hlavne v ich agresívnejších formách [8,10]. CA IX bola použitá ako endogénny marker hypoxie v mnohých solídnych nádoroch (močového mechúra, obličkových buniek, pľúc, hlavy a krku). Kolorektálny karcinóm patrí medzi prvé typy nádorov, v ktorých bola zaznamenaná expresia anhydráz kyseliny uhličitej [11]. Väčšina CRC vykazuje abnormálnu expresiu CA IX, čo naznačuje jej zapojenie do patogenézy tohto nádorového ochorenia. Saarnio a kol. ako prví pozorovali pozitivitu CA IX v 16/21 prípadoch CRC (76%). Z toho 6/16 (37,5%) prípadov vykazovalo slabú a 10/16 (62,5%) strednú až silnú intenzitu imunoreakcie, ktorá korelovala s grade-om, pričom bola vyššia v dobre diferencovaných nádoroch. Lokalizáciu imunoreakcie detegovali na membráne nádorových buniek [10]. Rovnako aj v našej práci sa expresia viaže so silnou intenzitou (96,1%) a membránovou lokalizáciou imunoreakcie (88,2%). Expresia CA IX je študovaná hlavne z dôvodu, že by tento proteín mohol slúžiť ako prirodzený marker hypoxie s možným diagnostickým a prognostickým potenciálom. S cieľom objasniť jej význam a uplatnenie aj v klinickej praxi boli preto uskutočnené početné štúdie založené na imunohistochemickej detekcii CA IX v rôznych typoch nádorov (vrátane CRC) [8].

Záver

Príprava vhodných reagensí, vypracovanie protokolov a overenie diagnostickej a terapeutической hodnoty CA IX si vyžiada ešte množstvo úsilia zainteresovaných odborníkov. Na základe našich doterajších výsledkov predpokladáme, že sa CA IX môže stať diagnostickým a prognostickým biomarkerom využívaným v každodennej praxi pri analýze CRC. Nevyhnutným predpokladom praktického uplatnenia CA IX bude aj pochopenie funkčného významu tohto proteínu na molekulovej úrovni. Študovaný súbor pacientov plánujeme rozšíriť a získané výsledky budeme následne korelovať s vybranými klinicko-morfologickými a viacerými imunohistochemickými parametrami.

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

Literatúra

- [1] Gonzalez-Pons, *Biomed Research International*. **2015**, 2015: 1-14.
- [2] Lech, *World J Gastroenterol*. **2016**, 22: 1745-1755.
- [3] McDonald, *Oncotarget*. **2012**, 3: 84-97.
- [4] Korkeila, *BJC*. **2009**, 100: 874-880.
- [5] Žitňan, *Onkologia*. **2015**, 10: 33-35.
- [6] Prochotský, *Litera Medica, Bratislava*. **2006**, s. 652. ISBN 80-967189-4-0
- [7] Sedlakova, *Front Physiol*. **2014**, 4: 1-14.
- [8] Pastoreková, *Molekulárna biológia rakoviny*. **2009**, 30-66. ISBN 978-80-224-1114-1
- [9] Takáčová, *Klin Onkol*. **2015**, 28: 183-190.
- [10] Niemelä, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2007**, 16: 1760-1766.
- [11] Saarnio, *J. Histochem. Cytochem*. **1998**, 46: 497-504.

Vzácné lokalizace nádorů skupiny Ewingova sarkomu

Grussmannová A., Dorko F.

Ústav anatomie, LF OU Ostrava, Česká republika
alzbeta.grussmannova@osu.cz

Abstract

Ewing's family of tumours contains Ewing sarcoma (ES) with its skeletal and extraskeletal localisation (EES), atypical Ewing sarcoma and Primitive neuroectodermal tumor (PNET). It is a group of primitive, highly malignant tumours typical for childhood and adolescence with predominant skeletal localisation. The article provides an overview of some rare cases.

Key words: Ewing sarcoma, extraskeletal Ewing sarcoma, primitive neuroectodermal tumor, rare cases

Úvod

Ewingův nádor byl poprvé popsán v roce 1921 Jamesem Ewingem jako endoteliom kostí s předpokladem, že vyrůstá z krevních cév kostní tkáně. Až později histopatologicky popsal malé tmavé buňky pevně adherující k sobě [3]. Skupina nádorů Ewingova sarkomu představuje po osteosarkomu druhou nejčastější kostní malignitu u dětí a dospívajících. Ve větším množství případů postihuje kost. Vyrůstá ze dřevnaté dutiny, s nejčastější lokalizací na dlouhých kostech horní a dolní končetiny a pánevním skeletu. Vzácnější je postižení lebečních kostí, které tvoří přibližně 3% [1] ze všech ES/PNET. Převažuje spánková kost, následována je temenní a týlní kostí. Vzácněji vyrůstá EES/PNET z měkkých tkání, v literatuře počet kolísá mezi 11 – 24%, přičemž některé z orgánů jsou popsány pouze v několika případech [1]. ES/PNET se řadí do skupiny nádorů s vysokým stupněm malignity, metastazuje hematogenně nejčastěji do plic (38%) a ostatních kostí (31%). Lymfogenní metastazování je vzácnější, častěji prorůstá přímo do okolních struktur [1]. Histologicky je tvořen solidními ložisky malých kulatých tmavých buněk, obsahujících malé množství cytoplasmy s větším množstvím glykogenu. Nádorové buňky k sobě pevně adherují. ES i PNET se řadí ke kulatobuněčným sarkomům, liší se pouze stupněm diferenciací, buňky ES vykazují nižší stupeň diferenciací. Imunohistochemicky lze na povrchu buněk detekovat antigen CD 99 [17]. Na chromozomální úrovni je pro něj typická translokace mezi 11 a 22 chromosomem (vyskytuje se v 85 – 90%), výsledkem translokace je juxtapozice genu EWS na 22. chromosomu a genu FLI-1 na 11. chromosomu; vzniklý chimerický protein EWS-FLI-1 vykazuje vysoký transformační potenciál. Pro potvrzení translokace se používá fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Vzácněji dochází k translokaci mezi 21. a 22. Chromosomem [1,17].

Klinicky se projevuje nespecifickými příznaky (teplota, leukocytóza, zvýšená sedimentace, hubnutí), lokálně bolestí a otoky, velmi dobře imituje akutní osteomyelitidu [2]. Léčba zahrnuje radikální odstranění nádoru, radioterapii a systémovou léčbu cytostatiky.

Metodika a výsledky

K vyhledávání kazuistik byla použita databáze *pubmed.com*. Po zadání klíčových slov *Ewing sarcoma* bylo nalezeno 7516 souhrnů, klíčová slova byla dále specifikována na *Ewing sarcoma, rare* (925, po vymezení na souhrny obsahující

pouze klíčová slova 20), *extraskelatal Ewingsarcoma* (278). Ve výsledku bylo použito 15 kazuistik z posledních desíti let, z nichž některé popisují nepočetné nebo jediné případy svého druhu prezentované v anglicky psané literatuře.

Diskuze

Jak již bylo dříve zmíněno, predilekční lokalizaci kostní formy ES představují dlouhé kosti končetin, pánevní pletenec a osový skelet. Zřídka se objevuje Ewingův sarkom lebečních kostí. Obě nalezené kazuistiky ukazují dětské pacienty. První je případ dvacetiměsíčního chlapečka s ES klínové kosti a erozí přilehlých tkání[6], druhý představuje jediný případ mnohočetného ES lebečních kostí pětiletého pacienta [14]. Z extraskelatálních forem se objevuje EES/PNET lokalizován v gastrointestinálním traktu. Popsán byl jeden ze čtyř případů jaterního EES [15], poté dva ojedinělé případy nádoru mesocolon (jeden u dítěte[9], odkazující na jediný případ u dospělého [8]) a EES žaludku [7].

Dýchacím ústrojím byl popsán jeden z osmi případů primárního plicního sarkomu u šedesáti sedmiletého muže[4]; rovněž se EES nacházel v pleuře [5] a průduškách [16].

V pohlavním ústrojí byly nalezeny u ženy lokality jako děloha[13], následně ojedinělý EES vulvy u postmenopauzální ženy [11], který byl považován za cystu glandula vestibularis major/Bartholini, u muže se objevil nádor penisu [12]. Zajímavé případy týkající se lokalit v močovém ústrojí ukazovala klinicko - patologická studie 23 pacientů s EES ledviny, s mediánem věku 31 let [10].

Závěr

Pro mnoho klinických pracovníků představuje Ewingův sarkom pouze nádor kostní tkáně; je zajímavé, kolik případů, byť vzácných, ukazuje extraskelatální lokalizaci. Zároveň je brán jako nádor dětského a adolescentního věku, s velmi vzácným výskytem po 40. roce. Ve zkoumaných studiích se věkové rozmezí pohybovalo mezi rokem a půl a sedmdesáti léty.

Literatura

- [1] Bajčiová, *Praha: Grada*. **2011**, ISBN 978-80-247-3554-2
- [2] Gallo, *Univerzita Palackého v Olomouci*. **2011**, ISBN 978-80-244-2486-6
- [3] <http://www.cancerindex.org/bone/ewing.htm> [online]. [cit. **2017-04-29**].
- [4] Lee, *J Korean Med Sci*. **2007**, 22: S159-S163.
- [5] Karatziou, *Hippokratia*. **2011**, 15/4: 363-365.
- [6] Singh, *JCDR*. **2017**, 11/2: ED15-ED16.
- [7] Maxwell, *Clin Imaging*. **2016**, 40/5: 843-5.
- [8] Maisonneuve, *Gastroenterol Clin Biol*. **2007**, 31/5: 552-4.
- [9] Turkyilmaz, *J Pediatr Surg*. **2012** 47/9: E1-3.
- [10] Murugan, *POR*. **2017**, doi: 10.1007/s12253-017-0228-0.
- [11] Boldorini, *Pathol Res Pract*. **2010**, 206/7: 476-9.
- [12] Ma, *IJPS*. **2013**, 21/1: 63-7.
- [13] Yi, *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. **2015**, 41/3: 478-82.
- [14] Wang, *Int J Clin Exp Pathol*. **2015**, 8/6: 7575-7582.
- [15] OzakiY, *BMC Cancer*. **2015**, doi: 10.1186/s12885-015-1017-3.
- [16] Hayakawa, *Am J Case Rep*. **2013**, 14: 67-69.
- [17] Povýšil, *Praha: Galén*. **2007**, ISBN 978-80-7262-494-2.

Hepatocelulárny karcinóm

Tokarcík, J.¹, Dorko, F.¹, Dvořáčková, J.², Vaculová J.²

¹ Ústav anatómie LF OU Ostrava, ² Ústav patológie FNO a LF OU Ostrava
jan.tokarcik@osu.cz

Abstract

World-wide, hepatocellular carcinoma (HCC) is a leading cancer in terms of steadily increasing prevalence, among all other malignancies. The cause of this rapid growth in prevalence has not been clarified yet, but the overwhelming majority of cases of HCC have been found to develop based on liver cirrhosis. The article deals with risk factors, clinical signs and, in particular, histopathological imaging with hematoxylin and eosin and immunohistochemistry.

Key words: hepatitis, hepatocellular carcinoma, histological imaging

Úvod

Hepatocelulárny karcinóm je celosvetovo 5. najčastejšie ochorenie a 3. najčastejšou príčinou úmrtia v rámci onkologických ochorení [4]. HCC väčšinou sa vyskytuje v rozvojových krajinách a je častejšie u mužov ako u žien. Najvyššia incidencia HCC je v juhovýchodnej Ázii, Číne, v štátoch západnej a centrálnej Afriky, u imigrantov z vysokorizikových oblastí do USA [2]. V Severnej Amerike, Európe a Japonsku je infekcia HCV hlavným rizikovým faktorom spolu s užívaním alkoholu. Výskyt HCC súvisí s faktormi životného prostredia, stravovania a životného štýlu. Mortalita sa prakticky rovná incidencii, priemerný čas prežívania je približne jeden rok. Nepriaznivé výsledky sú spojené s neskorou diagnostikou, keďže viac ako 2/3 pacientov je diagnostikovaných až v pokročilom štádiu choroby spôsobom [1].

Medzi hlavné rizikové faktory patria cirhózy pečene všetkých etiológií, ale najmä na podklade chronickej hepatitídy B, C, alkoholová cirhóza, hemochromatóza, deficit alfa-1-antitrypsínu, neskorá kožná porfýria, nealkoholová steatohepatitída (NASH). Pri HCC, ktorý vznikol ako komplikácia cirhózy pečene, určuje klinický obraz základná choroba.

Klinický obraz môže byť pri HCC dlho asymptomatický a karcinóm dlhodobo nespôsobuje žiadne ťažkosti. Obraz je menlivý. Medzi príznaky pokročilej choroby patria bolesti brucha, úbytok hmotnosti, slabosť, nechutenstvo, horúčka, žltáčka. Môže sa vyskytnúť náhla brušná príhoda s hemorágiou do brušnej dutiny, metastatické postihnutie. Bolesť pacienti lokalizujú do pravého hypochondria a epigastria, býva tupá a trvalá. Pri prerastení do peritonea a jeho ruptúre je bolesť náhla, spojená s intraabdominálnym krvácaním a šokovým stavom, ktoré bez urgentného zákroku vedú k úmrtiu pacienta.

V rámci skríningu HCC u ohrozených pacientov sa odporúča v 6-mesačných intervaloch realizovať abdominálnu ultrasonografiu [3].

Diagnóza HCC sa stanoví na základe zobrazenia tumoru pomocou zobrazovacích metód a histologickej techniky. Je potrebné si uvedomiť, že pri HCC sa môžu vyskytnúť zvýšené hladiny AFP v sére. U niektorých pacientov s HCC môžu vzniknúť paraneoplastické syndrómy, ako sú hypercholesterolémia, hypoglykémia, hyperkalcémia, erytrocytóza. Ich klinický význam a vzťah k prežívaniu pacienta dosiaľ nie dostatočne objasnený.

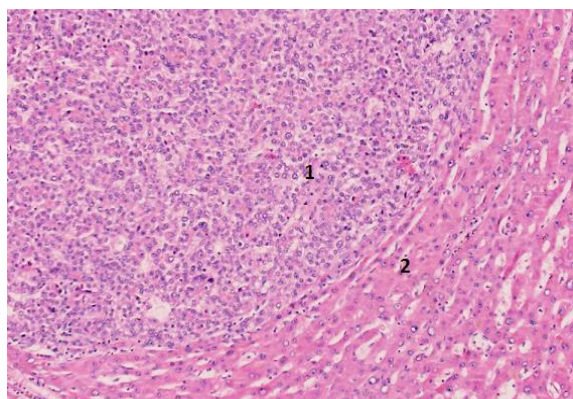
Materiál a metodika

Do retrospektívnej štúdie bolo zahrnutých 20 pacientov s diagnózou HCC. Vzorky k štúdiu boli získané z databázy Ústavu patológie Fakultnej nemocnice Ostrava v období január 2016 do marca 2017. Získané jednotlivé vzorky boli fixované v 10% formalíne počas 48 hodín a následne boli zaliate do parafínu. Jednotlivé parafínové bločky boli následne vložené do rotačného mikrotómu a nakrájané na histologické rezy. Tieto boli farbené hematoxylínom a eozínom na histopatológiu. Jednotlivé skúmané vzorky boli farbené imunohistochémiou s využitím alfa-fetoproteínu (AFP) a CD10. Jednotlivé preparáty boli mikroskopicky skúmané a fotograficky zdokumentované.

Výsledky a diskusia

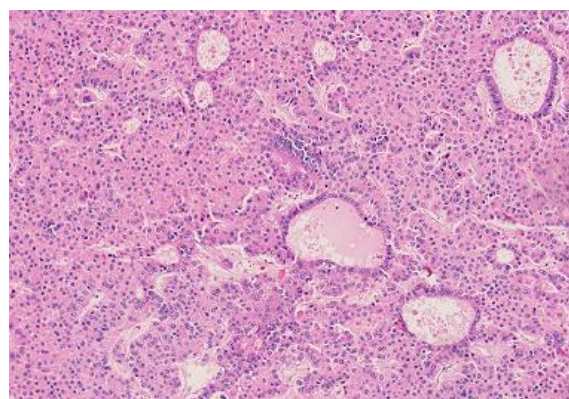
S rozvojom technológií došlo v poslednej dobe aj k rozvoju v oblasti rádiodiagnostiky a zmenili sa kritériá pre histologickú diagnózu HCC. Morfologické štúdie poukázali, že mnohé HCC vznikajú v nejednoznačných nodulárnych léziách, ako sú dysplastické uzliny v cirhóze pečene a sú v počiatočných štádiách veľmi diferencované. Diferencovaný HCC v počiatočných štádiách sa postupne vyvíja na pokročilý a nediferencovaný nádor viacstupňovým spôsobom [7, 10]. Platí to najmä pre pacientov s chronickými infekciami spôsobenými HBV a HCV. Pri cirhóze u uzlov menších ako 2 cm je biopsia ďalšou metódou umožňujúca určiť biologickú povahu ložiska. Základný problém v histopatologickej diagnostike skorých HCC predstavuje priamo štruktúra pečeneového tkaniva. Hepatocyty fyziologicky nemajú bazálnu membránu, ktorej prekročenie v iných orgánoch je považované za kritérium invazívneho rastu.

Mikroskopickým skúmaním vzoriek sme zistili klasické histomorfologické znaky HCC. Dobré vaskularizované nádory so širokými trabekuly, prominentný acinárny vzor, zmeny malých buniek, cytologická atypia, mitotická aktivita, cievna invázia, absencia Kupfferových buniek a strata retikulovej siete [12](obr. 1,2,3,4).

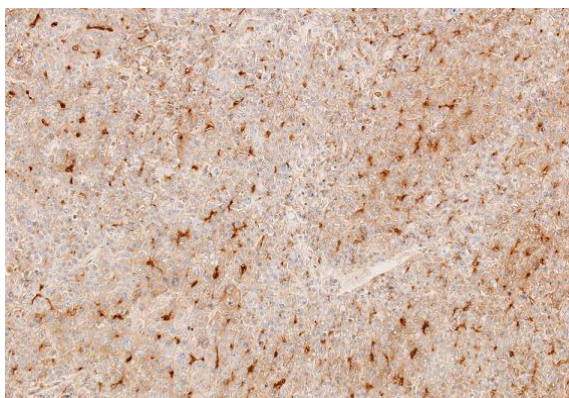


Obr. 1 Hranica hepatocelulárneho karcinómu a zdravého tkaniva (farbenie H&E, zväčšenie 100x)

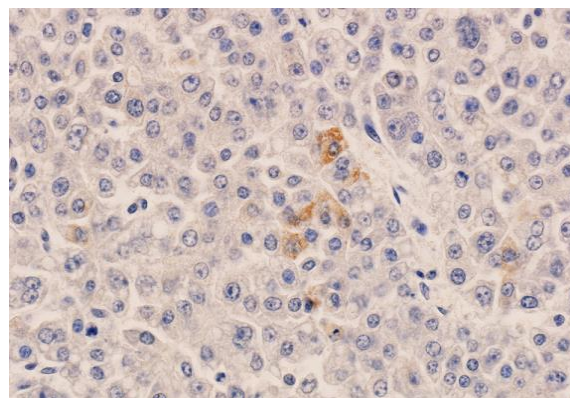
1. Hepatocelulárny karcinóm
2. Zdravé tkanivo



Obr. 2 Mikroskopický obraz hepatocelulárneho karcinómu (farbenie H&E, zväčšenie 100x)



Obr. 3 Hepatocelulárny karcinóm
(imunohistochemická reakcia CD10,
zváženie 100x)



Obr. 4 Alfafetoprotein (zváženie 20x)

Ďalším charakteristickým znakom HCC je častý výskyt vo forme viacerých uzlín [14]. Jedným z nich je výskyt mnohonásobných HCC, ktorý odráža šírenie malígnych buniek z jediného primárneho nádoru na vytvorenie nodulárnych nádorov. Druhou formou je synchronný vývoj niekoľkých nezávislých nádorov. Mechanizmy vývoja HCC odrážajú dôležité rozdiely v patogenéze, ktoré majú vplyv na liečbu a prognózu [8]. Rozdiely v prognóze pri HCC sa vyvíjajú z intrahepatálnych metastáz, ktorá je agresívnejšia a menej zrozumiteľná. HCC, ktorý je zložený z niekoľkých nezávislých nádorov sa objavuje viac-menej súčasne.

V HCC angiarchitektúra hrá veľmi dôležitú úlohu pri raste nádoru a je tiež neoddeliteľnou súčasťou moderných zobrazovacích modalít. Tieto tepny nie sú spojené s portálovým traktom a preto nemajú žiadny kontakt s žilovými kanálmi. Okrem toho vykazujú menej elastické vlákna v porovnaní s normálnymi intrahepatálnymi tepnami. Skorý HCC málo nodulárneho typu má zníženú hustotu nespálených artérií v porovnaní s progresívnym HCC, a preto sa v zobrazovaní vyskytuje hypovaskulárny obraz. V dôsledku prítomnosti portálnych traktov v nádore, hoci menej ako v normálnom pečenevom tkanive, tieto lézie tiež dostávajú krv z portálnej žily [9, 15]. Skoré HCC z výrazne nodulárneho typu ako aj pokročilého HCC sa javia hypervaskulárne kvôli skoršej neovaskularizácii s nepárovými tepnami.

Dobre rozlíšená lézia je zvyčajne nahradená nedefinovanou zložkou tkaniva pri pokročilom ochorení [6, 10-11, 13]. Na rozdiel od toho pokročilý HCC vykazuje expanzívny a infiltračný histologický rastový model s úplnou neovaskularizáciou s nepárovými tepnami a možnou vaskulárnou infiltráciou.

Záver

HCC je reálny medicínsky problém. Šíri sa intrahepatálne a to hematogénnou cestou s tvorbou viacnásobných metastáz v pečeni alebo extrahepatálne prebieha cez pečenevé a portálne vény na rôzne miesta, najmä do pľúc a kostí a lymfatickou cestou do regionálnych lymfatických uzlín v porta hepatis a medistinálnych a krčných lymfatických uzlín. Histomorfologický výskyt HCC sa značne líši od pacienta k pacientovi, u každého pacienta môžu sa pozorovať rôzne štádiá intratumorálnej diferenciácie a vzory rastu. Nádor je možné zachytiť vo včasnom štádiu a efektívne liečiť pri efektívnom skríningu. Cieľom tohto individuálneho prístupu je potrebné stabilizovať nádor v pečeni a oddialiť hrozbu zlyhania pečene. Lokálna liečba môže byť účinnejšia ako systémová protinádorová terapia.

Literatúra

- [1] Anzola, *J Viral Hepat.* **2004**, 11: 383-393.
- [2] Bosch, *Gastroenterology.* **2004**, 127: S5-S16.
- [3] Bruix, *Hepatology.* **2011**, 53: 1022-22.
- [4] Brůha, *Postgraduální medicína. Praha.* **2011**.
- [5] Fattovich, *Gastroenterology.* **2004**, 127: S35-S50.
- [6] Kojiro, *Hoboken: Wiley.* **2009**, pp 1-184.
- [7] Kojiro, *Hepatogastroenterology.* **1998**, 45/3: 1203-1205.
- [8] Nakano, *Am J Gastroenterol.* **1994**, 89:189-193.
- [9] Nakashima, *Hepatology.* **1995**, 22: 101-105.
- [10] Oikawa, *J Hepatol.* **2005**, 42: 225-229.
- [11] Sakamoto, *Hum Pathol.* **1991**, 22: 172-178.
- [12] Shafizadeh, *Adv Anat Pathol.* **2011**, 18: 438-445.
- [13] Sugihara, *Cancer.* **1992**, 70: 1488-1492.
- [14] Sugitani, *J Hepatol.* **1998**, 28: 1045-1053.
- [15] Nakashima, *Liver.* **1999**, 19: 12-18.

Metylácia génu *RASSF1A* a korelácia s histopatologickými charakteristikami pri karcinóme prsníka

Ježková, E¹., Kajo, K²., Žúbor, P³, Marián Grendár, M.⁴, Bobrovská, M.⁵, Zora Lasabová, Z.⁶, Adamkov, M.¹

¹Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine; ²Onkologický ústav sv. Alžbety v Bratislave; ³Gynekologicko-pôrodná klinika JLF UK a UNM v Martine; ⁴Bioinformatické oddelenie, Martinské centrum pre biomedicínu, BioMed JLF UK v Martine; ⁵Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM v Martine; ⁶Divízia onkológie, Martinské centrum pre biomedicínu, BioMed JLF UK v Martine
jezkova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Breast cancer is a heterogeneous disease with very different responses to therapy and different length of survival. To understand the molecular signature of breast cancer, we attempted to identify the methylation status of key tumour suppressor gene *RASSF1A* and to correlate results with known histopathological features of breast cancer.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of breast carcinomas (n = 149) were used for DNA extraction. Based on MS-HRM results for *RASSF1A*, all degrees of methylation status for gene underwent analysis of dependence with known histopathological features. In 134 of 149 (89.9%) primary breast carcinomas the *RASSF1A* promoter was methylated. *RASSF1A* hypermethylation had significant association with increased age (p < 0.05), tumour grade (p < 0.0001) and stage (p < 0.0001) in the 100% methylated group.

This study shows methylation of the promoter region of *RASSF1A* and its relationship with histopathological features of 149 breast cancer patients. All these data suggest that hypermethylation of the CpG island promoters of *RASSF1A* might play an essential role in the very early stages of breast cancer pathogenesis.

Key words: DNA methylation, *RASSF1A*, high-resolution melting assay, breast cancer

Úvod

Karcinóm prsníka je dlhodobo najčastejším malígnym nádorovým ochorením u žien. U malígnych nádorov je potlačená transkripcia tumor supresorových génov v dôsledku DNA metylácie, a tým je ovplyvnená regulácia bunkového cyklu.

RASSF1A (RAS-association domain 1 isoform A) bol charakterizovaný v posledných desaťročiach [1] a zmena jeho expresie je asociovaná s patogenézou rôznych nádorov [2], čo podporuje názor o tumor supresorovej funkcii tohto génu. Inaktívny ciagén *RASSF1A* je kritická v súvislosti s patogenézou určitých typov nádorov. Hypermetylácia CpG ostrovčekov promótorovej oblasti *RASSF1A* umlčuje expresiu tohto génu v mnohých nádoroch, predovšetkým nádoru pľúc, prsníka, prostaty, obličiek, gliómu a neuroblastómu [3].

Materiál a metódy

Imunohistopatologická klasifikácia vrátane rozsahu nádoru (pT), stupňa diferenciácie (G), stavu lymfatických uzlín (pN), stavu estrogénových (ER) a progesterónových (PR) receptorov a amplifikácie *HER2* génu boli stanovené kvalifikovaným patológom. Typ nádoru bol vyhodnotený na základe WHO klasifikácie nádorov [4-5], histologické štádium a klasifikácia bola vykonaná v súlade s revidovanou pTNM klasifikáciou

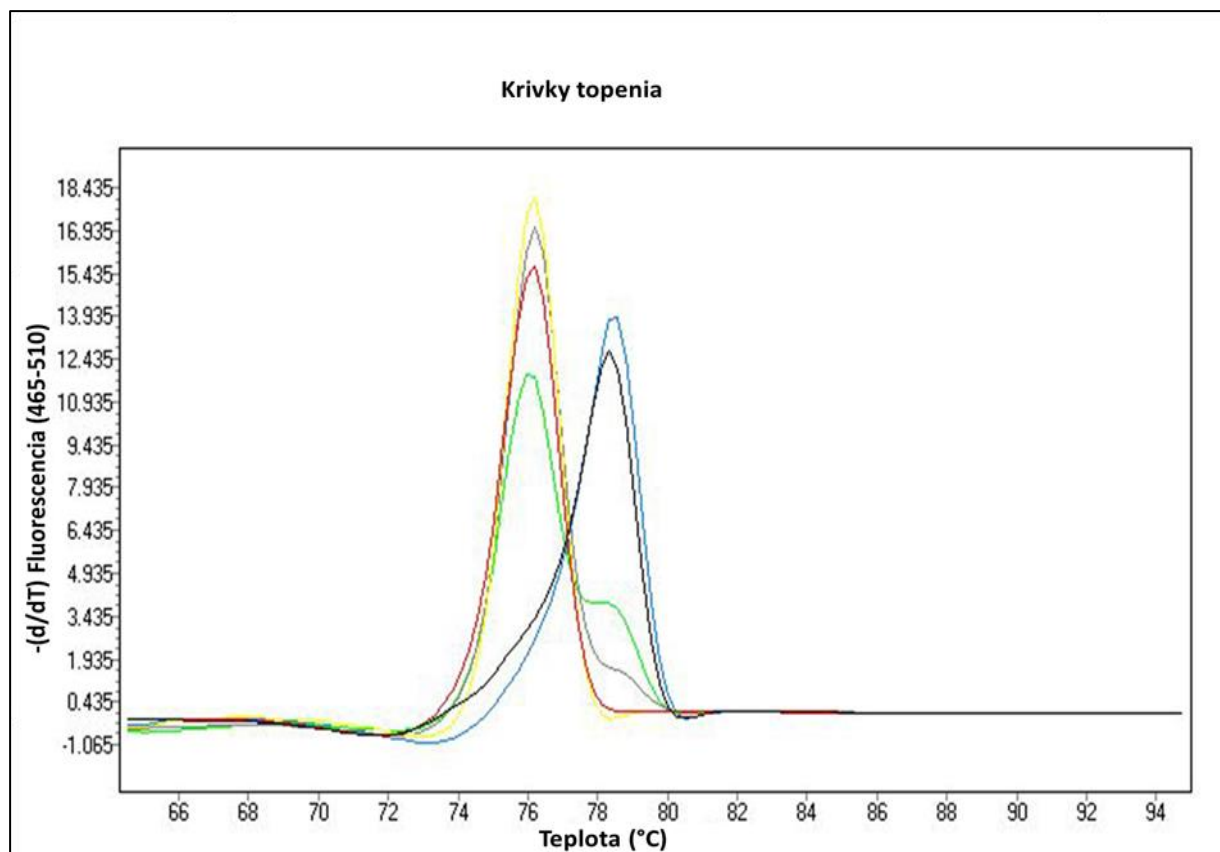
AJCC a UICC [6]. Stav estrogénového a progesterónového receptora bola vyjadrená ako percentuálne zastúpenie pozitívnych reaktívnych buniek z celkového počtu zachytených buniek. Za pozitívny stav ER alebo PR sa považoval prípad, v ktorom $\geq 1\%$ buniek bolo pozitívnych [7]. Stav amplifikácie *HER2* bol zistený pomocou imunohistochemie (HercepTest) a hodnotený podľa kritérií v súčasnej platnosti publikovaných ACSO/CAP 2007 [8].

DNA pre účel metylačnej analýzy bola z parafrínových rezov tkaniva v skúmavke podrobená deparafinizácii. Samotná extrakcia DNA bola vykonaná pomocou DNeasyBlood&TissueKit (Qiagen, Germany), kde sme postupovali podľa odporúčaní výrobcu. Metóda metylačne senzitivnej vysoko rozlišovacej analýzy kriviek topenia (MS-HRM) bola vykonaná na prístroji LightCycler®480 (Roche, Switzerland). Pre MS-HRM boli použité interné primery jednak pre metylovanú aj nemetylovanú sekvenciu génu *RASSF1A*. Analýza MS-HRM umožnila detekciu rozsahu metylácie v genómovej DNA za pomoci porovnania so štandardami získanými nariadením univerzálnej kontrolnej metylovanej DNA do nemetylovanej DNA, čím sme získali 100%, 50%, 25%, 0% riedenia metylovanej DNA.

Všetky štatistické testy boli vykonané použitím R softvéru [9]. Za štatisticky významné boli určené hodnoty P rovné alebo menšie ako 0,05 ($P \leq 0,05$).

Výsledky

Zistili sme asociáciu metylačného statusu génu *RASSF1A* s histopatologickými parametrami. Asociácia metylačného stavu génu *RASSF1A* so stupňom nádoru (G) bola signifikantná v skupine s $>50\%$ metyláciou ($P < 0.0001$ pre G1, G2 a G3). Signifikantná asociácia medzi stupňom 3 duktálneho karcinómu prsníka a metylačným statusom génu *RASSF1A* bola v $>50\%$ metylovanej skupine ($p < 0.05$). Metylačný status génu so štádiom nádoru (pT) bol pri géne *RASSF1A* signifikantne asociovaný v skupine s $>50\%$ metyláciou génu ($P < 0.0001$ pre pT1 a pT2; $P < 0.05$ pre pT4). Vzťah medzi úrovňou metylácie a typom karcinómu prsníka bol silno asociovaný iba v duktálnom type invazívneho karcinómu (DIC) a so skupinou s $>50\%$ metyláciou ($P < 0.0001$) a vo vzorkách so 100% metyláciou ($P = 0.01$) pre *RASSF1A* gén.



Obr. 1 Krivky topenia MS-HRM metódy zobrazujúce štandardy pre promótorovú oblasť génu *RASSF1A* a reprezentatívne vzorky. Modrá krivka ako 100% metylovaná kontrolná DNA, 50% metylovaná DNA v pozadí nemetylovanej DNA (zelená), 25% metylovanej v pozadí nemetylovanej DNA (sivá) a 0% metylovanej DNA t.j. 100% nemetylovaná DNA (žltá). Čierna krivka zobrazuje 100% metylačný status hypermetylovanej reprezentatívnej vzorky a červená krivka je vzorka s 0% stavom metylácie, t.j. úplne nemetylovaná.

Diskusia

Posledné štúdie ukazujú diagnostický a prognostický potenciál *RASSF1A* metylácie. V súvislosti s karcinómom prsníka sa incidencia metylácie *RASSF1A* v mnohých nezávislých štúdiách vyskytuje v rôznom rozsahu. Honorio et al [10] dokázali prítomnosť *RASSF1A* promótoru metylovaného v 65% invazívneho karcinómu prsníka a v 42% príslušného duktálneho karcinómu in situ (DCIS), pričom Burbee et al [11] zaznamenali 49% primárnych nádorov prsníka s metylovaným *RASSF1A*. Najväčší výskyt metylácie promótoru *RASSF1A* (95%) v tkanive karcinómu prsníka zaznamenala vedecká skupina Yeo et al [12]. V nedávnej štúdii bola zistená súvislosť medzi ER-pozitívnym a ER-negatívnym statusom v súvislosti s epigenetickými zmenami v génoch súvisiacich s karcinómom prsníka vrátane *RASSF1A* génu [13].

Záver

Karcinóm prsníka je heterogénne ochorenie s veľmi odlišnými odpoveďami na terapiu a s rôznou dĺžkou prežívania. Tradične je určený pomocou histopatologických kritérií založených na veľkosti, úrovni invazivity a infiltrácie lymfatických uzlín, a na imunochemickej charakteristike povrchu bunkových receptorov, zahŕňajúce estrogénový receptor (ER), progesterónový receptor (PR) a ľudský receptor epidermálneho rastového faktora 2 (*HER2*). V mnohých prípadoch však určenie stupňa karcinómu prsníka nepostačuje na predikciu prognózy alebo odpovede na

liečbu pre obrovskú heterogenitu ochorenia. Preto sa v súčasnosti objavujú nové prístupy klasifikácie založené na génových expresných modeloch. Zmeny v génovej expresii ktoré pozmeňujú funkciu bunky z normálnej na nádorovú zahŕňajúce mnohé genetické usporiadania, vytvárajú charakteristické znaky génovej expresie definujúce jedinečnú bunkovú identitu. DNA metylácia je silný biomarker, značne stabilnejší ako RNA alebo proteíny, a preto je sľubným cieľom pre rozvoj nových prístupov v stanovení diagnózy a prognózy nádoru prsníka a iných nádorov.

Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť rôzne úrovne heterogénnej metylácie alel pre promótorovú oblasť *RASSF1A* a jej potenciálny vzťah s imunohistopatologickými charakteristikami karcinómu prsníka. Naše výsledky naznačujú, že hypermetylované génové loci môžu počas karcinogenézy vykazovať heterogénny alebo úplne metylovaný stav, a vo vzťahu k histopatologickým parametrom sa metylácia javí ako skorá udalosť nádorovej transformácie.

Táto práca vznikla s podporou projektu VEGA 1/0129/16, VEGA 1/0243/12 a APVV/14/0815.

Literatúra

- [1] Dammann, *Cancer Res.* **2001**, 61: 3105-3109.
- [2] Vaissière, *Cancer Res.* **2009**, 69: 243-252.
- [3] Pfeifer, *Biochemistry.* **2005**, 70: 576–83.
- [4] Lakhani, *Lyon, IARC.* **2012**.
- [5] Elston, *Histopatology.* **1991**, 19/5: 403-410.
- [6] Edge, *Ann Surg Oncol.* **2010**, 17/6: 1471-4.
- [7] Hammond, *Arch pathol Lab Med.* **2010**, 134: E1-E16.
- [8] Wolf, *Arch Pathol Lab Med.* **2014**, 138/2: 241-56.
- [9] R Development Core Team. **2008**, ISBN 3-900051-07-0.
- [10] Honorio, *Oncogene.* **2003**, 22: 147-150.
- [11] Burbe, *J Nat Cancer Inst.* **2001**, 93: 691-699.
- [12] Yeo, *Pathology.* **2005**, 37: 125-130.
- [13] Sunami, *Breast Cancer Res.* **2008**, 10: R46.

Analýza mechanizmu protinádorového účinku klinčeka v experimentálnom karcinóme prsníka

Uramová, S.¹, Kubatka P.^{2, 3}, Kajo K.⁴, Výbohová D.⁵, Adamkov M.⁶, Péč M.²,
Žúbor P.¹, Danko J.¹

¹Klinika gynekológie a pôrodnictva JLF UK v Martine, ²Ústav lekárskej biológie JLF UK v Martine,
³Divízia Onkológia, Martinské centrum pre biomedicínu, JLF UK v Martine, ⁴Ústav patológie,
Onkologický ústav sv. Alžbety v Bratislave, ⁵Ústav anatómie JLF UK v Martine, ⁶Ústav histológie
a embryológie JLF UK v Martine
sonicka.rybka@gmail.com

Abstract

It is supposed that plant functional foods, rich in phytochemicals, may potentially have preventive effects in carcinogenesis. In this study, the anticancer effects of cloves in the *in vivo* mammary carcinoma model were assessed.

Dried flower buds of cloves (CLO) were used at two concentrations of 0.1 % and 1 % through diet during 13 weeks after the application of chemocarcinogen. After autopsy, histopathological and immunohistochemical analyses of rat mammary carcinomas were performed.

Dietary administered CLO caused the dose-dependent decrease in tumour frequency by 47.5% and significantly lengthened tumour latency by 7,5 days and 58.5% when compared to control. Analysis of mammary carcinoma cells showed Bcl-2, Ki67, VEGF expression decrease and caspase-3 expression increase after high dose CLO administration. MDA levels were substantially decreased in rat carcinomas in both CLO groups.

This study showed a significant proapoptotic, antiproliferative, antiangiogenic, and antioxidant effects of clove buds in the rat mammary carcinoma model *in vivo*.

Key words: mammary carcinogenesis, rat, cloves, epigenetics, angiogenesis, apoptosis, cell proliferation

Úvod

Jedným z možných prístupov znižovania výskytu nádorových ochorení je chemoprevencia. Chemoprevencia, kde patrí aj použitie prírodných látok, sa v súčasnosti stáva oblasťou intenzívneho výskumu. Väčšina týchto prírodných látok je rastlinného pôvodu, preto sa označujú ako fytochemikálie. Konzumácia týchto bioaktívnych rastlinných zložiek obsiahnutých v ovocí, zelenine, obilninách a v ďalších rastlinných potravinách, sa spája s poklesom výskytu rizika vážnych ochorení. U fytochemikálií či u celých tzv. rastlinných funkčných potravín boli preukázané antioxidantné, protizápalové, antiproliferatívne a antiangiogénne účinky či schopnosť indukovať apoptózu [1]. Niektoré štúdie naznačujú významný genoprotektívny účinok rastlinných potravín [2-3]. V nedávnom období boli dokázané výrazné významné antineoplastické účinky rastlinných funkčných potravín akými sú chlorella [4], lyofilizát šupiek tmavého ovocia [5], či oregano [6] u experimentálneho karcinómu prsníka *in vivo* a *in vitro*. Z daných štúdií vyplýva, že za pozitívne účinky rastlinných substancií nezodpovedá iba jedna chemická látka, ale ide o aditívny či synergický efekt pôsobenia desiatok rôznych fytochemikálií.

Pupene klinčeka (*Syzygium aromaticum* L.) sú zaujímavé svojim zložením pozostávajúcím zo zmesi fytochemikálií: fenolových kyselín, flavonoidov, karotenoidov [7]. Pozitívny účinok extraktu z klinčeka pri protirakovinovom účinku

zaznamenalo iba niekoľko málo štúdií *in vitro*. Rôzne výťažky klinčeka a následne ich mix, poukazujú na cytotoxickú aktivitu voči bunkovým líniam, MDA-MB-231 a MFC-7 [7]. Doposiaľ nebol antikarcinogénny účinok klinčeka skúmaný na animálnom modeli rakoviny prsníka. Okrem základných parametrov experimentálnej mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov sme v experimente sledovali aj vplyv klinčeka na prognózu karcinómov a tiež na vybrané parametre apoptózy, angiogenézy, proliferácie a antioxidačných účinkov v nádorových bunkách karcinómu mliečnej žľazy.

Materiál a metodika

V experimente sme použili panenské samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley z chovnej stanice CharlesRiver vo veku 32-36 dní. Zvieratá boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca. Mamárnu karcinogenézu sme vyvolali intraperitoneálnou aplikáciou N-metyl-N-nitrozourey (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 13 týždňov až do ukončenia experimentu. Klinček bol aplikovaný v potrave (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Nemecko). Zvieratá v počte 75 kusov boli rozdelené do 3 skupín: 1. kontrolná skupina bez fyto-substancie, 2. skupina s fyto-substanciou v nižšej koncentrácii (1g/kg), 3. skupina s fyto-substanciou vo vyššej koncentrácii (10 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 [8]. Parafínové bločky nádorového tkaniva mliečnej žľazy boli využité k imunohistochemickému stanoveniu parametrov apoptózy, angiogenézy, oxidačného poškodenia a proliferácie. K vyšetreniu rezov sme využili komerčne dostupné protilátky (Abcam, SantaCruz, Dako). Histopatologická a imunohistochemická analýza poskytne informáciu o stupni diferenciácie, či prognóze mamárneho nádoru a účinnosti liečby.

V štatistickom hodnotení bol použitý Mann-Whitneyho test, ANOVA a Kruskal-Wallisov test. Experimenty boli schválené Etickou komisiou JLF UK (No. EK1125/2012) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. Ro-1759/11-221). Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0108/16.

Výsledky a diskusia

Klinček inhiboval rakovinu mliečnej žľazy u potkanov závisle od dávky. Riziko výskytu mamárneho karcinómu pokleslo v skupine s vyššou dávkou klinčeka o 58,5% ($P = 0,01$) a došlo k predĺženiu latencie o 7,5 dňa ($P = 0,10$), v skupine s nižšou dávkou bol zaznamenaný pokles frekvencie nádorov o 44 % ($P = 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Najčastejšie vyskytujúce sa lézie vo všetkých experimentálnych skupinách boli kribriiformné, zmiešané kribriiformné/papilárne a papilárne/kribriiformné karcinómy. V žiadnej zo skupín sme nepozorovali rozdiel pomeru výskytu medzi high/low grade karcinómami. Predpokladali sme, že za výrazným protinádorovým účinkom klinčeka v tejto štúdii stojí pro-apoptotický, antiangiogenetický, antiproliferatívny a antioxidačný efekt. Preto sme realizovali rozsiahlu imunohistochemickú analýzu

buniek karcinómov. Morfometrická analýza buniek karcinómov mliečnej žľazy u potkanov poukázala na signifikantný nárast expresie exekučnej kaspázy-3 o 69,5% ($P=0.0008$) v skupine s vyššou dávkou klinčeka (Tab. 1). U expresie parametrov Bcl-2, Ki67, VEGF a MDA sme pozorovali signifikantný pokles, konkrétne u Bcl-2 o 26 % ($P=0.020$), u Ki67 o 25% ($P=0,049$), u VEGF o 55% ($P=0,0015$) a u MDA o 50,5% ($P=0,0004$) pri vyššej dávke klinčeka v porovnaní s kontrolnou skupinou. Nižšia dávka preukázala signifikantný pokles MDA o 35,5% ($P= 0,021$) voči kontrolnej skupine. Expresie Bax a VEGFR-2 nevykázali zmenu v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Tab. 1 Percento pozitívnych buniek s expresiou kaspázy-3, Bax, Bcl-2, Ki67, VEGF, VEGFR-2 a MDA v mamárnych karcinómoch u potkanov po liečbe klinčekom.

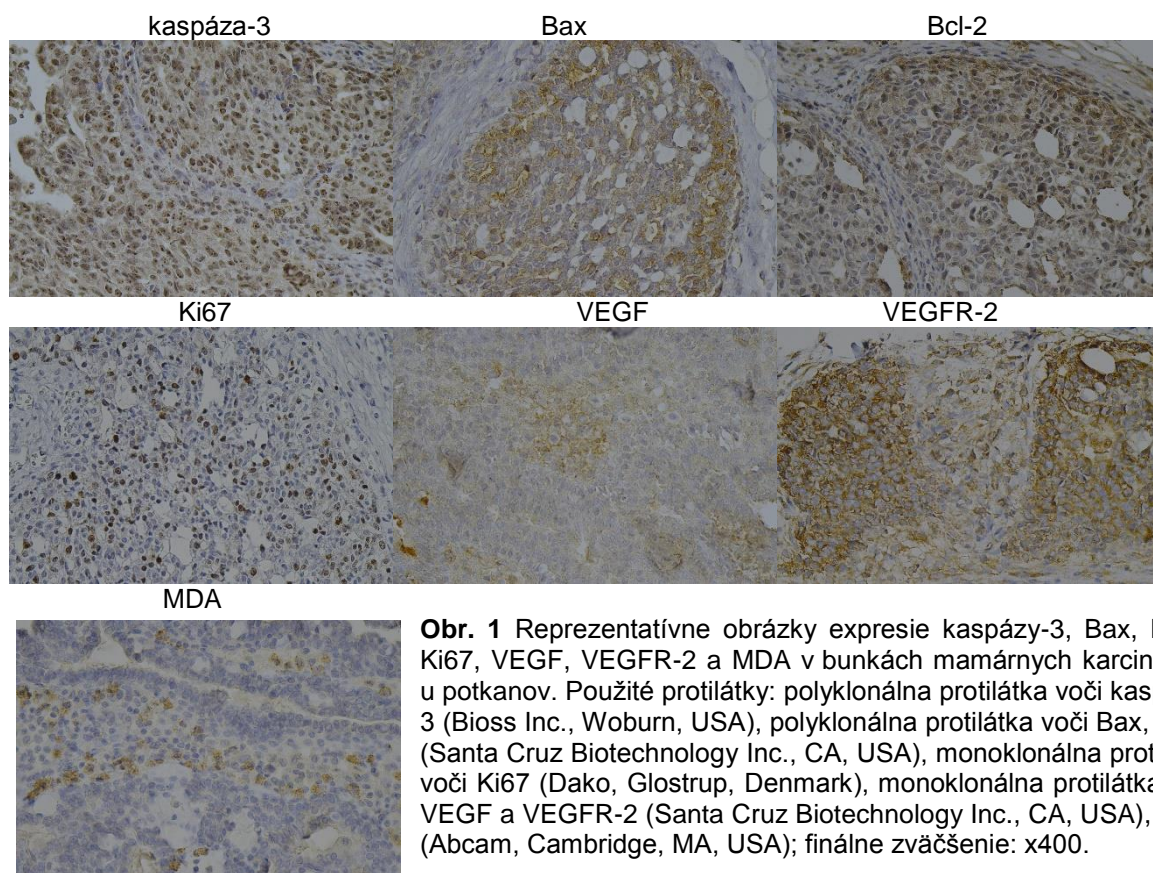
	KONT	KLIN 0.1	KLIN1
kaspáza-3	25,14±1,27	27,25±0,79	30,98±0,92****
Bax	21,34±1,45	17,92±1,29	21,24±0,93 ⁺
Bcl-2	15,04±1,18	14,87±1,75	11,13±1,45*
Ki67	9,37±0,67	9,49±0,77	7,02±0,91*
VEGF	5,92±0,62	6,32±0,84	2,67±0,59****
VEGFR-2	20,12±1,31	22,89±1,67	21,54±1,68
MDA	4,90±0,53	3,16±0,49*	2,43±0,33***

KONT – neliečená kontrola, KLIN 0.1 – skupina s dávkovaním 1g/kg diéty, KLIN 1 - skupina s dávkovaním 10g/kg diéty. Dáta sú vyjadrené ako priemery (%) ± SEM. Signifikantný rozdiel * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs KONT, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ vs KLIN 0.1.

Podstata výrazného účinku klinčeka na organizmus spočíva vo vysokom obsahu desiatok rôznych fytochemikálií (zvlášť karotenoidov, napr.all-trans-lutein) pôsobiacich aditívne alebo synergicky. Opakované experimenty predklinického výskumu naznačujú, že je chybou ísť cestou konzumácie izolovaných fytochemikálií – efekt na organizmus býva celkovo slabší [1]. Napriek skutočnosti, že epidemiologické štúdie nepriniesli dostatočné dôkazy o tumor-supresívnych účinkoch rôznych fytochemikálií/celých rastlinných potravín, prísne definované *in vivo* experimenty môžu predstavovať cestu ako dokázať ich antineoplastické účinky v organizme [9].

Záver

Protinádorový účinok klinčeka použitého v našej štúdii vyplynul z proapoptického, antiproliferatívneho, antiangiogenetického a antioxidačného účinku biologicky aktívnych látok, ktoré sú obsiahnuté v klinčeku a zodpovedajú za jeho aktivitu, ktorá bola dokázaná v našom modeli rakoviny prsníka u samíc potkanov. Antineoplastické účinky širokého spektra fytochemikálií prítomných v klinčeku majú výrazný vplyv na vyvolanie programovanej bunkovej smrti a taktiež dokážu inhibovať proliferáciu a angiogézu v experimentálnych mamárnych nádoroch *in vivo*.



Obr. 1 Reprezentatívne obrázky exprese kaspázy-3, Bax, Bcl-2, Ki67, VEGF, VEGFR-2 a MDA v bunkách mamárných karcinómov u potkanov. Použité protilátky: polyklonálna protilátka voči kaspáze-3 (Bioss Inc., Woburn, USA), polyklonálna protilátka voči Bax, Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), monoklonálna protilátka voči Ki67 (Dako, Glostrup, Denmark), monoklonálna protilátka voči VEGF a VEGFR-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), MDA (Abcam, Cambridge, MA, USA); finálne zväčšenie: x400.

Literatúra

- [1] Kuoet, *Free Rad Biol Med.* **2010**, 49: 214-226.
- [2] Habibi, *Pharm Biol.* **2015**, 53: 92-7.
- [3] Kober, *Drug Chem Toxicol.* **2016**, 39: 48-52.
- [4] Kubatka, *Nutrition.* **2015**, 31: 560-9.
- [5] Kubatka, *Eur J Nutr.* **2016**, 68: 611-21.
- [6] Kubatka, *Eur J Nutr.* **2017**, 56: 1303-1316.
- [7] Dwivedi, *Asian Pac J Cancer Prev.* **2011**, 12: 1989-93.
- [8] Russo, *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **2000**, 5: 187-200.
- [9] Zhang, *Am J Clin Nutr.* **2012**, 95: 713-725.

Epigenetický vplyv rastlinných potravín v animálnom modeli karcinómu prsníka

Kubatka, P.^{1,2}, Uramová, S.³, Jašek, K.², Grendár, M.⁴, Lasabová, Z.²,
Výbohová, D.⁵, Adamkov, M.⁶, Péč, M.¹, Žúbor, P.³, Danko, J.³

¹Ústav lekárskej biológie JLF UK v Martine, ²Divízia Onkológia, Martinské centrum pre biomedicínu, JLF UK v Martine, ³Klinika gynekológie a pôrodnictva JLF UK v Martine, ⁴Oddelenie bioinformatiky, BioMed JLF UK v Martine, ⁵Ústav anatómie JLF UK v Martine, ⁶Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine
kubatka@jfmmed.uniba.sk

Abstract

It is well-documented that regular consumption of phytochemicals from whole (functional) foods is linked with a risk reduction of the diseases of civilization, including cancer. The aim of this study was to evaluate the histone chemical modifications and changes in methylation levels in selected oncogene promoters in mammary carcinoma tissue using rat model.

Dried flower buds of cloves were administered at two concentrations of 0.1 % and 1 % through diet during 13 weeks after the application of chemocarcinogen. After autopsy, histopathological, immunohistochemical, and pyrosequencing analyses of rat mammary carcinomas were performed.

This study demonstrated significant dose-dependent chemopreventive effects of cloves in rat mammary gland carcinoma model. The evaluation of histone modifications revealed increase in lysine trimethylations and acetylations (H4K20me3, H4K16ac) in carcinomas after cloves administration. TIMP3 promoter methylation levels of CpG3, CpG4, CpG5 islands were significantly changed in treated cancer cells. An increase in total RASSF1A promoter methylation (including three CpG sites) in the high dose clove group was found.

This study revealed significant chemopreventive and epigenetic effects of clove buds in the rat mammary carcinoma model *in vivo*.

Key words: experimental breast carcinoma, rat, chemoprevention, cloves, epigenetics, promoter methylation, histone chemical modification

Úvod

Karcinóm prsníka predstavuje z celosvetového hľadiska závažný medicínsky problém [1]. Jedným z možných prístupov znižovania výskytu nádorových ochorení je vhodná úprava stravovania s bohatým zastúpením fytochemikálií v potrave. Do úvahy pripadajú jednak izolované fytochemikálie, ale aj zmesi fytochemikálií z tzv. rastlinných funkčných potravín, kde boli preukázané významné protinádorové účinky [2]. Niektoré štúdie naznačujú významne pozitívny epigenetický účinok rastlinných potravín v karcinogéze [3]. U viacerých fytochemikálií s protirakovinovými vlastnosťami bola preukázaná schopnosť ovplyvniť epigenóm s priamym účinkom na procesy karcinogézy. Posttranslačné modifikácie molekúl histónov ovplyvňujú interakcie DNA-histón a následne aj transkripciu genómu. Aberantné chemické modifikácie histónov zohrávajú dôležitú úlohu v karcinogéze [4]. Zmeny metylácie a acetylácie histónov lyzínu, ako je H3K4m3, H3K9m3, H4K20m3 a H4K16ac, sú často spojené s karcinómom prsníka [5]. Okrem modifikácií histónov, tiež celková metylácia DNA, či metylácia promótorov génov,

ktorých produkty zasahujú do regulácií bunkového cyklu (napr. *rassf1a*, *timp 3*, *p53*, *raf*, *neu*, *K-ras*, *H-ras*), zohrávajú dôležitú úlohu v karcinogénze.

Na základe uvedených poznatkov sme sa rozhodli analyzovať protinádorový a epigenetický vplyv pupeňov klinčeka (*Syzygium aromaticum* L.), potraviny bohatú na fenolické látky (fenolové kyseliny, flavonolové glukozidy, taníny, či prchavé oleje), v modeli experimentálnej mamárnej karcinogénzy u samíc potkanov.

Materiál a metodika

V experimente sme použili panenské samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley z chovnej stanice Charles River Germany vo veku 32-36 dní. Zvieratá boli adaptované v štandardných podmienkach zverinca. Mamárnu karcinogénzu sme vyvolali intraperitoneálnou aplikáciou N-metyl-N-nitrozourey (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 13 týždňov až do ukončenia experimentu. Klinček bol aplikovaný v diéte (SSNIFF Spezialdiäten GmbH Soest, Nemecko). Zvieratá v každom experimente v počte 75 kusov boli rozdelené do 3 skupín: 1. kontrolná skupina bez fyto-substancie (KONT), 2. skupina s klinčekom v nižšej koncentrácii (1 g/kg) (KLIN 0.1), 3. skupina s klinčekom vo vyššej koncentrácii (10 g/kg) (KLIN 1). Zvieratá boli raz do týždňa palpované a vážené.

Na konci experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Časť vzoriek tkaniva mamárnych nádorov bola zafixovaná v 10%-nom roztoku pufovaného formalínu a následne technikou parafrínových rezov pripravená na histologické a imunohistochemické vyšetrenie. Druhá časť vzoriek bola zmrazená pre pyrosekvenčnú analýzu. Nádory boli klasifikované podľa kritérií pre klasifikáciu mamárnych nádorov u potkanov [6]. Parafrínové bločky nádorového tkaniva mliečnej žľazy boli využité k imunohistochemickému stanoveniu parametrov epigenetiky. K vyšetreniu rezov sme využili komerčne dostupné protilátky detegujúce chemické modifikácie histónov H3 a H4 - H3K4m3, H3K9m3 H4K16ac a H4K20me3 (Abcam, Dako). Kvantitatívna pyrosekvenčná analýza bola realizovaná pomocou PyroMark PCR kitu (Qiagen, Germany). Metylačná analýza bola použitá na stanovenie úrovne metylácie troch CpG ostrovčekov u promotora RASSF1A a šiestich CpG ostrovčekov promotora TIMP3 (PyroMark CpG assay, Qiagen, Germany). V štatistickom hodnotení bola použitá ANOVA a Kruskal-Wallisov test.

Výsledky a diskusia

Klinček v tejto štúdii signifikantne a dávkovo závislým spôsobom potlačil riziko experimentálneho karcinómu prsníka u samíc potkanov.

Imunohistochemické analýzy chemických modifikácií histónu H4 preukázali signifikantný, dávkovo závislý nárast parametra H4K16ac o 25 % ($P=0.001$) v skupine KLIN 0.1 a o 44.5 % ($P<0.0001$) v skupine KLIN 1 po porovnaní s kontrolnými vzorkami. V skupine KLIN 1 sme zistili signifikantný nárast parametra H4K20me3 o 74 % ($P<0.0001$) porovnaním voči kontrole. Rozdiely expresie u parametrov H3K4m3 a H3K9m3 neboli signifikantné medzi experimentálnymi skupinami. Reprezentatívne zábery imunohistochemickej analýzy chemických modifikácií histónov predstavuje obrázok 1.

Kvantifikácia stupňa metylácie jednotlivých CpG ostrovčekov promotora RASSF1A nepreukázala signifikantné rozdiely medzi liečenými skupinami a kontrolou. Analýza celkovej metylácie promotora RASSF1A (zahŕňajúca tri CpG ostrovčeky) preukázala

štatisticky signifikantný nárast v skupine KLIN 1 v porovnaní s kontrolou ($P=0.033$) (obr.2). V prípade promótoru TIMP3 sme porovnaním s kontrolou pozorovali signifikantný pokles priemerných úrovní metylácií ostrovčekov CpG3 a CpG4 v skupine s vyššou dávkou klinčeka ($P=0.016$, resp. $P=0.048$), na druhej strane stupeň metylácie u ostrovčeka CpG5 v tej istej experimentálnej skupine signifikantne narástol v porovnaní s kontrolnou skupinou ($P=0.012$). Pri hodnotení celkového stupňa metylácie promótoru TIMP3 (zahrňujúc všetkých šesť CpG ostrovčekov) sme nezistili rozdiely medzi liečenými skupinami a kontrolou (obr.2).

Klinčky prejavili v našej štúdii signifikantný metylačný účinok na vybrané CpG ostrovčky promótorov RASSF1A a TIMP3. Výsledok z podobného animálneho modelu rovnako preukázal signifikantný účinok extra panenského oleja na metyláciu histónu 4 (H4K20m3) a promótoru RASSF1A v nádorových bunkách [4]. Klinicky bolo preukázané, že strata trimetylácie histónu H4K20 je spojená so zlou prognózou a zvýšenou invázivnosťou karcinómu prsníka u žien [7]. V našej štúdii sme po liečbe klinčekom pozorovali nárast expresie H4K20m3, čo poukazuje na lepšiu prognózu liečených mamárnych karcinómov u potkana. Naše výsledky z epigenetiky experimentálnej karcinogenézy naznačujú jeden z mechanizmov, ktorými fytochemikálie z klinčeka prejavujú protinádorový účinok v modeli N-metyl-N-nitrozoureu-indukovaného karcinómu mliečnej žľazy u samíc potkanov. V ďalšom kroku bude potrebné naše výsledky validovať ďalšími štúdiami, kde bude nevyhnutné použiť napr. širšie spektrum použitých markerov tak u génových promótorov ako aj u chemických modifikácií histónov [8-9].

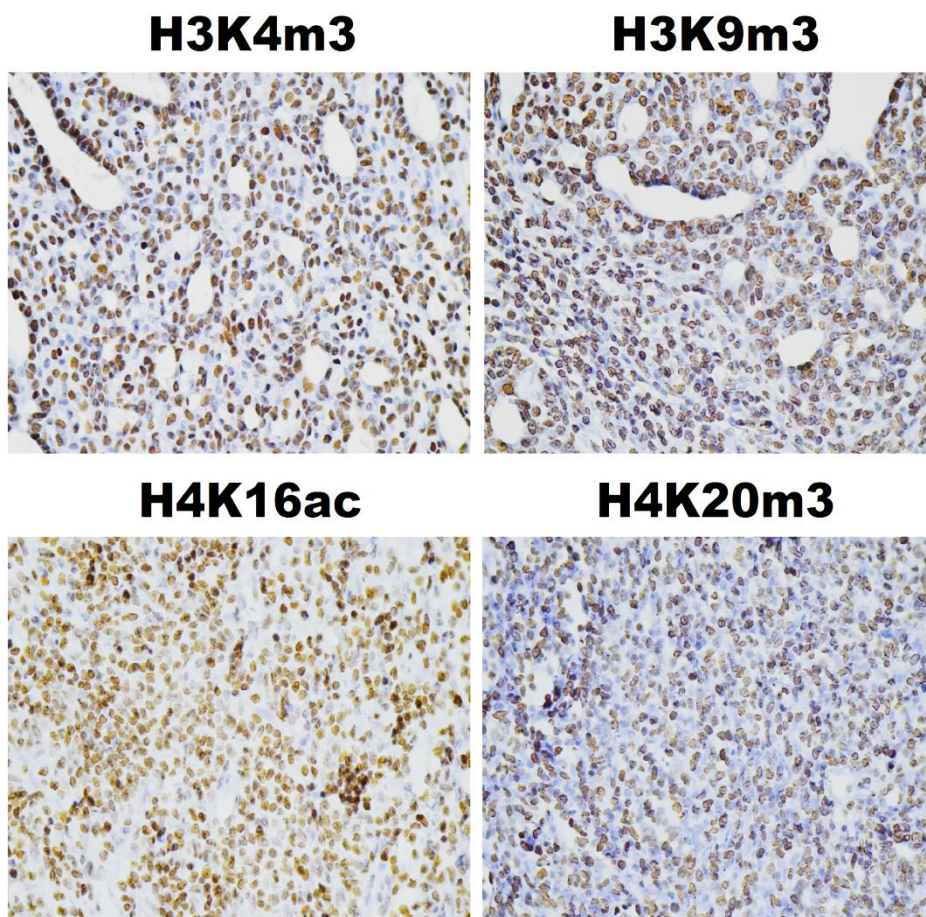
Záver

Pupene klinčeka prejavili signifikantný chemopreventívny účinok v modeli mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov. Klinček preukázal zreteľný epigenetický efekt v karcinómoch mliečnej žľazy, čo možno považovať za jeden z mechanizmov jeho protinádorového pôsobenia. Na základe epidemiologických štúdií sa klinček javí ako vhodná potrava pre pravidelnú konzumáciu v prevencii karcinómu prsníka. Sú však potrebné cielené klinické štúdie, ktoré potvrdia náš výsledok a súčasne zadefinujú nielen dávkovanie, ale aj špecifické rizikové skupiny žien pre karcinóm prsníka, u ktorých možno očakávať chemopreventívny efekt klinčeka.

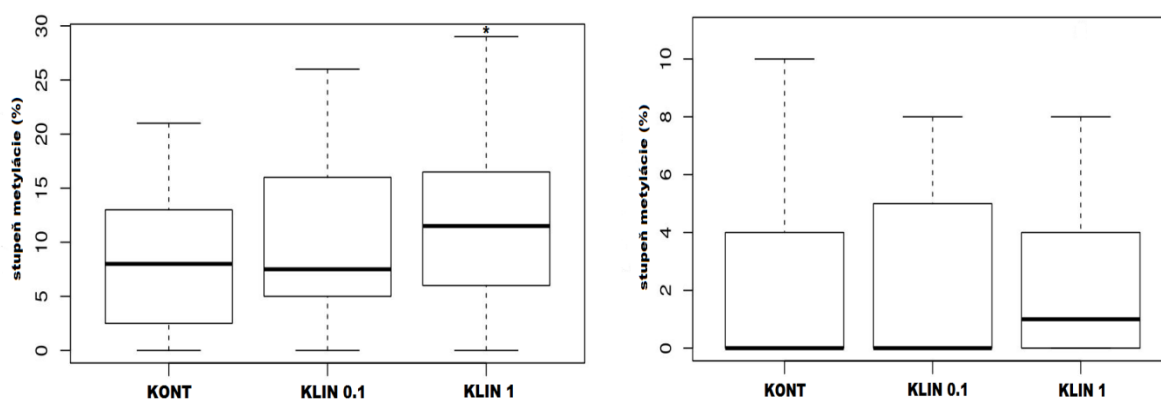
Experiment bol schválený Etickou komisiou JLF UK (No. EK1125/2012) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (No. Ro-1759/11-221). Projekt bol podporený grantom VEGA 1/0108/16 a 1/0102/15. Táto práca bola podporená projektom „Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin)“ ITMS kód projektu: 26220220187, ktorý je spolufinancovaným zo zdrojov EÚ.

Literatúra

- [1] Ferlay, *Int J Cancer*. **2010**, 127: 2893-2917.
- [2] Kuo, *Free Rad Biol Med*. **2010**, 49: 214-226.
- [3] Hardy, *Epigenomics*. **2011**, 3: 503-518.
- [4] Rodríguez-Miguel, *PLoS ONE*. **2015**, 10: e0138980.
- [5] Fraga, *Nat Genet*. **2005**, 37: 391-400.
- [6] Russo, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. **2000**, 5: 187-200.
- [7] Yokoyama, *Breast Cancer Res*. **2014**, 16: R66.
- [8] Elsheikh, *Cancer Res*. **2009**, 69: 3802-3809.
- [9] Greer, *Nat Rev Genet*. **2012**, 13: 343-357.



Obr. 1 Reprezentatívne obrázky imunohistochemickej analýzy exprese metylácií a acetylácie histónov H3 a H4 v mamárnych karcinómoch u samíc potkanov. Použité boli polyklonálne protilátky výrobcu Abcam (Cambridge, MA, USA); zväčšenie: 400x.



Obr. 2 Kvantitatívna metylačná (pyrosekvenčná) analýza. Celkový stupeň metylácie promótoru RASSF1A (ostrovčeky CpG 1-3) a TIMP3 (CpG 1-6). Signifikantný rozdiel, *P<0.05 vs KONT.

Zmeny v distribúcii neurónov po expozícii mozgu potkana ionizujúcim žiarením

Báľentová, S.¹, Kalenská, D.³, Murín, P.⁴, Hajtmanová, E.⁴, Lehotský, J.^{2,3}, Adamkov, M.¹

¹Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine, ²BioMed- Divízia Neurovedy JLF UK v Martine,

³Ústav lekárskej biochémie JLF UK v Martine, ⁴Onkologické centrum UNM v Martine

balentova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

In the present study we investigated histopathological changes in the rat brain following fractionated whole-brain exposure with ionizing radiation. Adult male Wistar rats received a total dose of 35Gy delivered in 7 fractions (dose 5Gy per fraction) once per week in the same weekday during 7 consecutive weeks. Histochemistry, immunohistochemistry and confocal microscopy were used to determine radiation-induced histopathological changes of neurogenesis in 2 neurogenic regions: the hippocampal dentate gyrus (DG) and the subventricular zone-olfactory bulb axis (SVZ-OB axis). Image analysis of the brain sections 18-21 weeks after the exposure showed a radiation-induced increase of neurodegeneration and inhibition of neurogenesis. Results showed that fractionated whole-brain irradiation led to development of late radiation-induced changes.

Key words: radiation-induced brain injury, neurogenesis, neurodegeneration

Úvod

V súčasnosti je zvýšená pozornosť venovaná pacientom po absolvovanej rádioterapii primárnych nádorov mozgu a metastáz najmä kvôli progresii neskorých postradiačných symptómov. U týchto pacientov sa približne 6 mesiacov po rádioterapii vyvíjajú výrazné kognitívne zmeny, často bez prítomnosti detekovateľných anatomických abnormalít [1]. Keďže počet pacientov s neskorými postradiačnými zmenami postupne rastie, v súčasnosti je záujem zameraný na prevenciu a zmiernenie prejavov žiarením indukovaného poškodenia. Aj predklinické štúdie u experimentálnych potkanov ukázali široké spektrum žiarením indukovaných zmien na molekulárnej, bunkovej a funkčnej úrovni. Tieto zmeny zahŕňajú napr. zrútenie hematoencefalickej bariéry, zmeny v synaptickej plasticite a expresii génov neurónov (immediate-early genes; IEG, glutamatergic N-methyl-D-aspartic acid; NMDA receptor subunits), inhibíciu neurogenézy, aktiváciu mikroglie, zvýšenú expresiu markerov pre astrocyty, vyššiu expresiu zápalových cytokínov (napr. tumor necrosis factor alpha; TNF α) a zhoršenie pamäťových schopností minimálne 6 mesiacov po ožiarení [2-8].

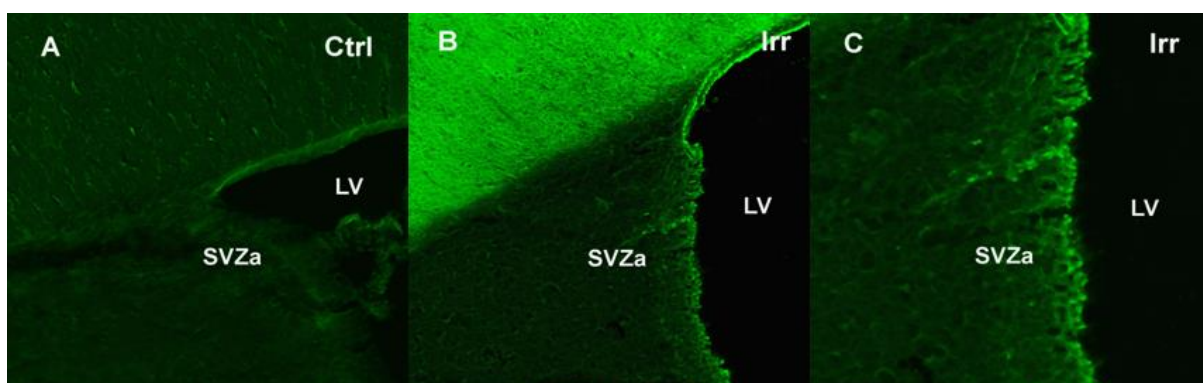
Materiál a metodika

Samcom potkanov (n=14) kmeňa Wistar, vo veku 3-4 mesiacov sme ožiarili kranium celkovou dávkou cD=35Gy ionizujúceho gama žiarenia rozdelenú na 7 frakcií, s dávkou na frakciu=5Gy, 1-krát týždenne. Zdrojom žiarenia bol rádioizotop ⁶⁰Co (prístroj TERAGAM ÚJP Praha, ČR) a zvieratá preživali 18 až 21 týždňov po expozícii. Po uplynutí zvolenej doby prežívania po ožiarení sme vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu pomocou 4% paraformaldehydu a po dekapitácii sme z mozgových hemisfér narezali sériové sagitálne 30 μ m zmrazené rezy. Preparáty

sme farbili imunofluorescenčnou metodikou na detekciu doublecortinu (DCX), markera pre nezrelé neuróny a po ofarbení histochemickou metódou Fluoro-Jade C (FJ-C) sme zisťovali neurodegeneratívne zmeny. Kvantitatívnu analýzu, resp. počet fluorescenčne značených buniek v jednotlivých anatomických oblastiach osi subventrikulárna zóna - bulbus olfactorius (SVZ-BO) a gyrus dentatus hipokampu (GD) sme uskutočnili pomocou programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

Výsledky a diskusia

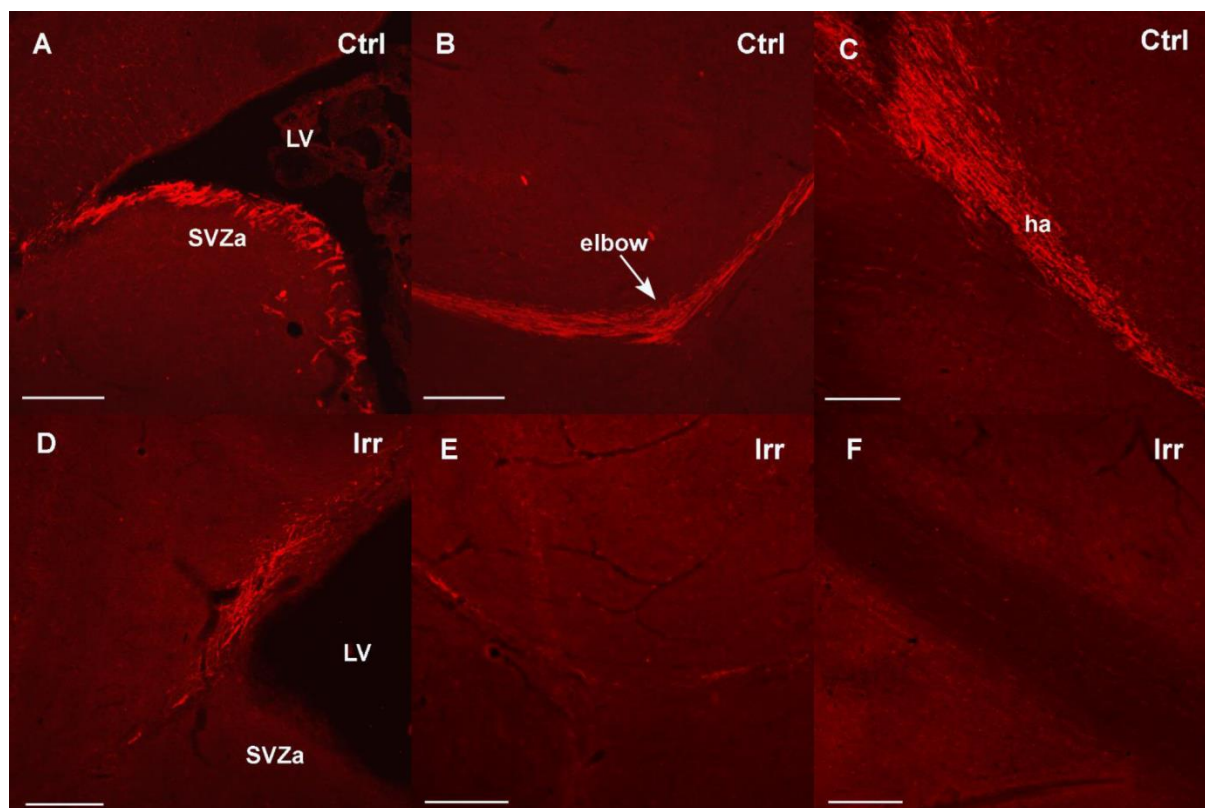
Neurodegeneratívne zmeny, ktoré sme hodnotili po ofarbení metódou FJ-C boli výraznejšie v GD hipokampu ako pozdĺž osi SVZ-BO. Metodika Fluoro-Jade značí somata a výbežky neurónov, ktoré podliehajú patologickej degenerácii ale neznačí nepoškodené neuróny [9] (Obr. 1). V našom experimente FJ značila aj endym laterálnych mozgových komôr (LK) a ďalšie gliové bunky, pravdepodobne astrocyty. Výsledky niektorých štúdií ukazujú, že použitím metódy Fluoro-Jade je možné značiť aj gliové bunky, najmä reaktívne formy astrocytov a mikroglie pri rôznych modeloch experimentálneho poškodenia [10]. V našom experimente sa počet Fluoro-Jade C značených buniek po ožiarení zvýšil vo všetkých oblastiach pozdĺž osi SVZ-BO (SVZa: $15,11 \pm 4,29/\text{cm}^2$ verzus kontrolná skupina: žiadne bunky; vertikálne rameno: $15,26 \pm 7,09/\text{cm}^2$ vs. K: žiadne bunky; ohyb: $21,63 \pm 6,77/\text{cm}^2$ vs. K: žiadne bunky; horizontálne rameno: $12,06 \pm 4,18/\text{cm}^2$ vs. K: žiadne bunky). Signifikantný nárast bol zistený len v GD ($96 \pm 7,83/\text{cm}^2$ vs. K: žiadne bunky; $P < 0,001$) (Obr.3).



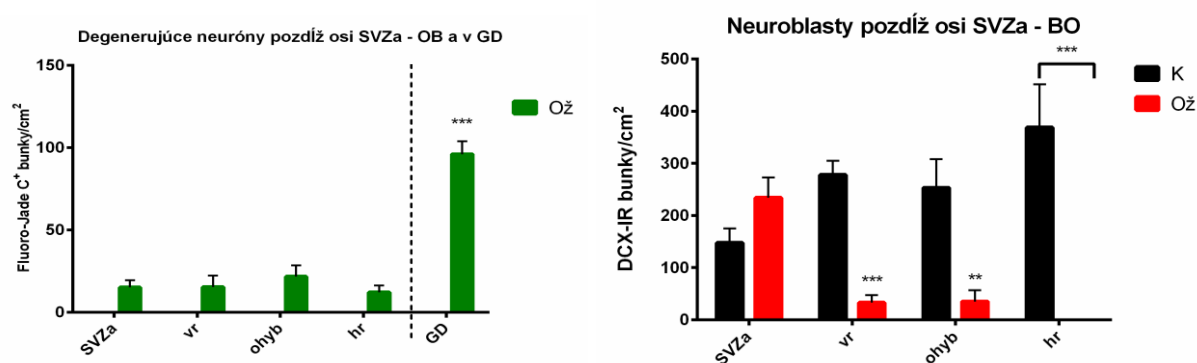
Obr. 1 Mikrofotografie sagitálnych rezov mozgu potkanov farbených metódou Fluoro-Jade C na dôkaz fluorescenčne FJ-C značených degenerujúcich neurónov (zelená fluorescencia) v gyrus dentatus hipokampu v kontrolnej skupine (A) a u potkanov prežívajúcich 18 až 21 týždňov po ožiarení (B, C) celkovou dávkou 35Gy. sg; stratum granulosum. Mierky = 200µm a 50µm.

Po ožiarení došlo aj k zmenám v zastúpení nezrelých, deliacich sa neurónov (Obr. 2, 3). V oblasti SVZa malo žiarenie za následok dočasné zvýšenie počtu neurónov značených proteínom DCX ($233,84 \pm 39,12/\text{cm}^2$ vs. K: $147,50 \pm 27,74/\text{cm}^2$). Naopak, v ďalších oblastiach došlo k signifikantnému poklesu alebo až k vymiznutiu DCX značených neurónov (vertikálne rameno: $32,88 \pm 14,71/\text{cm}^2$ vs. K: $278 \pm 26,75/\text{cm}^2$; $P < 0,001$; ohyb: $35 \pm 21,41/\text{cm}^2$ vs. K: $253,13 \pm 54,65/\text{cm}^2$; $P < 0,01$; horizontálne rameno: žiadne bunky vs. K: $368,5 \pm 82,93/\text{cm}^2$; $P < 0,001$). Nahromadenie nezrelých neurónov v stene LK v blízkosti corpus callosum môže byť prejavom zvýšenej mitotickej aktivity pôvodne kľudovej populácie kmeňových buniek [11]. Avšak prevažná väčšina štúdií (vrátane našej súčasnej a aj predchádzajúcich prác) uvádza že populácia buniek v SVZa nie je schopná regenerovať a obnoviť pôvodné počty kmeňových buniek a prekursorov niekoľko mesiacov po ožiarení [12-15]. Keď schopnosť sebaobnovy SVZa zlyhá, dochádza aj k poklesu počtu gliových buniek,

ktorý môže viesť až k vzniku radiačnej nekrózy. Tento fakt je dôležitý z klinického hľadiska, lebo terapeutické dávky používané v rádioterapii primárnych nádorov mozgu sú vyššie ako dávky, ktoré sú schopné eliminovať neurogenézu [16].



Obr. 2 Mikrofotografie sagitálnych rezov mozgu kontrolných potkanov (A-C) a v skupine prežívajúcej 18 až 21 týždňov po ožiarení (D-F) celkovou dávkou 35Gy. Preparáty boli farbené imunofluorescenčnou metodikou na dôkaz proteínu doublecortinu (DCX; červená fluorescencia), ktorý značí nezrelé neuróny v jednotlivých oblastiach pozdĺž osi SVZ-BO: v prednej stene subvetrikulárnej zóny (SVZa; vľavo), ohybe (v strede) a horizontálnom ramene (hr; vpravo). LK; laterálna komora. Mierky=200µm.



Obr. 3 Distribúcia neurónov značených pomocou metodiky FJ-C (vľavo) a nezrelých neurónov – neuroblastov (vpravo), značených imunofluorescenčne na detekciu proteínu DCX v jednotlivých oblastiach pozdĺž osi SVZ-BO (SVZa, vertikálne rameno, ohyb a horizontálne rameno) a v GD hipokampu. Štatistická významnosť rozdielov medzi kontrolnou (K) a ožiarenou skupinou (Ož): *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Záver

Porovnaním výsledkov našej štúdie a iných experimentálnych prác môžeme konštatovať, že histopatologické zmeny v zastúpení neurónov v neurogénnych oblastiach mozgu môžu byť príznakom rozvoja závažnejších kognitívnych dysfunkcií a štrukturálnych zmien (radiačná nekróza). Výsledky tiež poukazujú na to, že predklinický výskum je nevyhnutný pre uplatnenie výsledkov v klinickej praxi. Štrukturálne a funkčné zmeny v mozgovom tkanive výrazne zhoršujú kvalitu u dospelých a pediatrických pacientov po absolvovanej rádioterapii.

Práca vznikla za podpory grantov VEGA č. 1/0129/16, 1/0128/16 a projektu "Martinské centrum pre Biomedicínu", (ITMS: 26220220187), ktorý je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Sundgren, *Neuroimaging Clin N Am.* **2009**, 19: 657-68.
- [2] Kyrkanides, *J Neuroimmunol.* **1999**, 95: 95-106.
- [3] Yuan, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **2006**, 66: 860-866.
- [4] Ramanan, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **2009**, 75: 870-877.
- [5] Rosi, *Cancer Res.* **2008**, 68: 9763-9770.
- [6] Wilson, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **2009**, 74: 934-941.
- [7] Machida, *Radiat Res.* **2010**, 174: 618-623.
- [8] Brown, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **2016**, 96: 470-478.
- [9] Schmued, *Brain Res.* **1997**, 751: 37-46.
- [10] Damjanac, *Brain Res.* **2007**, 1128, 40-49.
- [11] Mizumatsu, *Cancer Res.* **2003**, 63: 4021-4027.
- [12] Tada, *Exp Neurol.* **1999**, 160: 66-77.
- [13] Raber, *Radiat Res.* **2004**, 162: 39-47.
- [14] Báľentová, *Acta Histochem.* **2014**, 116: 265-271.
- [15] Báľentová, *Neurochem Res.* **2015**, 40: 501-513.
- [16] Wong, *Mol Interv.* **2004**, 4: 273-284.

Úbytok neurónov *bulbus olfactorius* u potkanov ako následok poškodenia mozgu radiačným žiarením

Hnilicová P.¹, Báľentová S.², Kalenská D.³, Murín P.⁴, Hajtmanová E.⁴, Dobrota D.³, Adamkov M.², Lehotský J.^{1,3}

¹BioMed – Divízia Neurovedy JLF UK v Martine, ²Ústav histológie a embryológie, ³Ústav lekárskej biochémie JLF UK v Martine, ⁴Klinika rádioterapie a onkológie UNM v Martine
hnilicova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

We explored the morphological and metabolic effect of a clinically relevant fractionated irradiation on the rat brain using MRI and ¹H MRS at 7T MR-scanner. After whole brain irradiation procedures (18-21 weeks) performed by radioactive isotope ⁶⁰Co (35Gy in 7 fractions), irradiated (*n*=9) and sham-irradiated (*n*=5) animals underwent *in vivo* MR-examination. Tissue volumetry was examined via high-resolution multi-slice T₂-weighted MRI and evaluated by semiautomatic ParaVision software. MR spectra in olfactory bulb were measured by SVS with the voxel volume of 27μl and quantified in LCModel. Except of the significantly reduced tNAA/tCr in irradiated animals, increased tissue atrophy of *olfactory bulb* was confirmed, reflecting an early radiation-induced brain injury consisting of increasing neurodegeneration and growing inhibition of neurogenesis. *In vivo* MR-examination of the animal model imitating the phenotype of clinically relevant cranial irradiation effects seems to be useful for modeling, mechanistic evaluations, and treatment planning strategies.

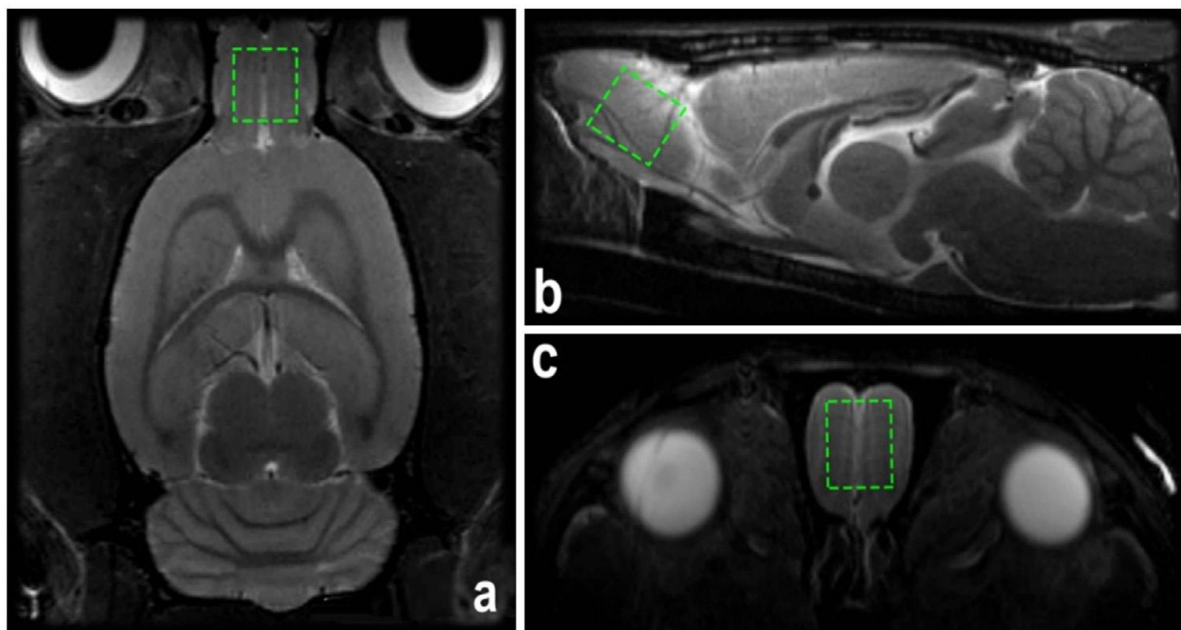
Key words: Radiation-Induced Injury, *BulbusOlfactorius*, Magnetic Resonance

Úvod

V súčasnej dobe je frakcionované ožarovanie celého tkaniva mozgu ionizujúcim žiarením súčasťou radiačnej terapie mnohých typov intrakraniálnych nádorov, alebo metastázujúcich ložísk [1]. Existuje však množstvo preukázaných post-radiačne vyvolaných poškodení centrálnej nervovej sústavy (CNS), ktoré limitujú plánovanie aj stratégiu radiačnej liečby [1-2]. Na základe časového pôsobenia a klinicky relevantných príznakov, radiačne vyvolané poškodenie mozgu vykazuje akútne, skoré a neskoré odpovede tkaniva na radiačnú liečbu [2,3]. Nie všetky poškodenia sú pritom reverzibilné. Preukázané boli zmeny na cievnom endoteli [2], narušená hemato-encefalická bariéra [1], abnormálna expresia génov alebo iniciovaná apoptóza gliálnych buniek [3-4]. Hoci animálne modely umožňujú imitovať mechanizmy prebiehajúce v radiačne poškodenom tkanive, skoré odpovede CNS na klinicky relevantné frakcionované ožarovanie sú len veľmi slabo preskúmané [5]. Preto zámerom tejto štúdie bolo prostredníctvom modalít magnetickej rezonancie (MR), konkrétne MR zobrazovania (MRI) a protónovej MR spektroskopie (¹H MRS), sledovať skoré anatomické a metabolické zmeny v *bulbusolfactorius* potkanieho mozgu vyvolané frakcionovaným ožarovaním s biologicky efektívnou dávkou (BED; 117 Gy) ekvivalentnou terapeutickou dávkou bežne aplikovanej pri nádorovej rádiologickej liečbe [1,6].

Materiál a metodika

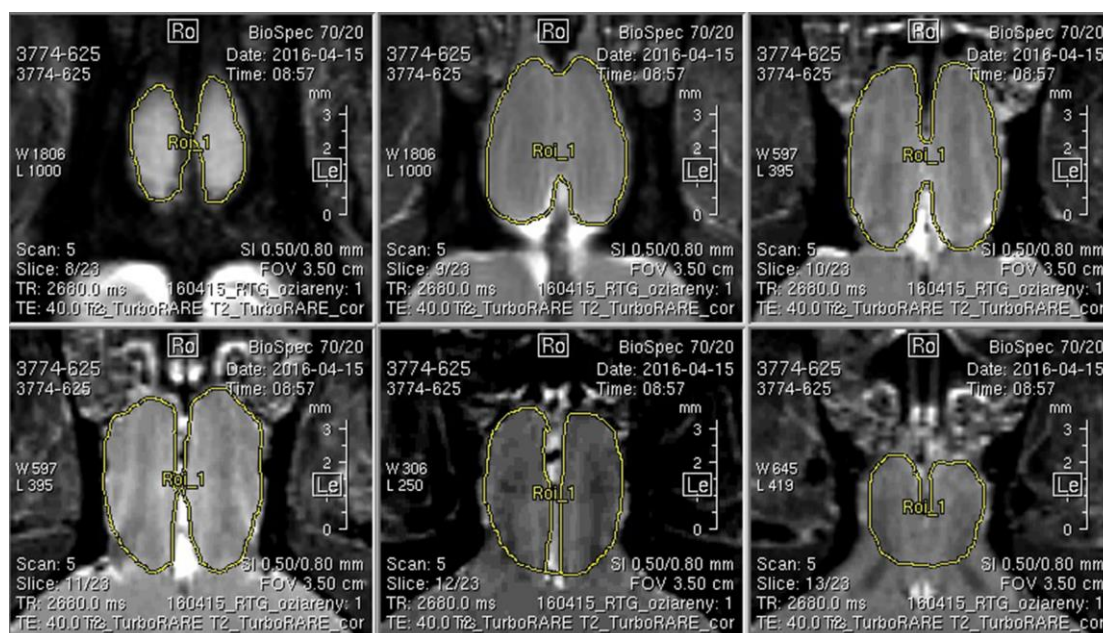
Do experimentu bolo zaradených štrnásť 4-mesačných samcov potkanov rodu Wistar (Velaz, Praha, ČR), pričom deviatim z nich bolo pod vplyvom anestézie (i.p: ketamín hydrochlorid + s.c.: xylazín hydrochlorid) aplikované radiačné ožarovanie (Teragam KO-2, UJP, Praha, ČR) celého mozgu s využitím rádioaktívneho izotopu ^{60}Co v celkovej dávke 35 Gy (7 frakcií po 5 Gy). Uvedená dávka je ekvivalentná biologickej efektívnej dávke BED = 117 Gy, ktorá je bežne využívaná v radiačnej terapii nádorových lézií mozgu [6]. MR vyšetrenia boli vykonané prostredníctvom 7 T MR skeneru Bruker BioSpec 70/20 (Bruker, Ettlingen, Nemecko) v časovom horizonte 18-21 týždňov po poslednej iradiačnej dávke. Všetky zvieratá ($n=14$) podstupujúce MR-vyšetrenia boli počas merania pod regulovanou anestéziou (3,5-5,5% sevofluran a O_2) a bola im udržiavaná stála telesná teplota prostredníctvom vyhrievaného lôžka (Bruker, Ettlingen, Nemecko). Súčasťou MR-meracieho protokolu bolo vysoko-rozlíšené T_2 -vážené anatomické MRI v troch na seba kolmých rezoch (TR-opakovací čas/TE-echo čas = 2680/40 ms, oblasť zobrazenia-FOV = $35 \times 35 \text{ mm}^2$, veľkosť obrazu = 256×256 , 23 rezov s hrúbkou rezu 0,5 mm). Protónové MRS dáta z *bulbus olfactorius* boli získané pomocou jedno-voxelovej spektroskopie (SVS) s nominálnou veľkosťou voxela $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$ (TR/TE = 1500/20 ms, 200 priemerov), (Fig.1). Kvantitatívne vyhodnotenie ^1H MRS bolo vykonané pomocou LCModelu 6.3-1K (S. Provencher, Ontario, Kanada), pričom sme sa zamerali na metabolický pomer tNAA (celkový N-acetyl-aspartát; spoločný signál N-acetyl-aspartátu a N-acetyl-aspartyl-glutamátu) ku tCr (kreatín-obsahujúce zlúčeniny; predovšetkým príspevok fosfokreatínu) ako metabolický biomarker počtu a viability neurónov [7].



Obr. 1 Anatomické T_2 -vážené MRI s lokalizáciou SVS (zelený štvorček; veľkosť $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$) v *bulbus olfactorius* u potkana v koronálnej (a), sagittálnej (b) a transverzálnej (c) rovine.

Tkanivová volumetria *bulbus olfactorius* bola získaná prostredníctvom poly-automatického softvéru ParaVision 6.0.1 (Bruker, Ettlingen, Nemecko). Oblasti záujmu reprezentujúce celé skúmané tkanivo boli najprv vykreslené na 6-tich po sebe nasledujúcich T_2 -vážených koronálnych MR rezoch tak, aby pokryli celé skúmané tkanivo (Obr.2) a následne mohli byť sčítané pre získanie volumetrických hodnôt vykreslenej oblasti. Výsledky štúdie boli vyjadrené ako priemer \pm štandardná

odchýlka (SD) a porovnanie ožiarenej a kontrolnej skupiny bolo vypočítané na základe nepárového t-testu pomocou softvéru GraphPad InStat 3.01 (Leuven, Belgicko). Ako štatisticky významná bola určená hranica 0,05.



Obr. 2 T₂-vážené koronálne MRI rezy s vykreslenými oblasťami záujmu pokrývajúcimi celé tkanivo *bulbus olfactorius* u potkana pre výpočet tkanivovej volumetrie.

Výsledky a diskusia

Pôsobenie ionizujúceho žiarenia na mozog vyvoláva mnohé patologické zmeny tkaniva a ovplyvňuje populácie tak neurónov ako aj gliálnych buniek, čo sa odzrkadľuje ako výrazné morfológické, metabolické aj funkčné deficity v CNS [1-2]. V tejto experimentálnej štúdii sme pozorovali skoré post-radiačné zmeny na bunkovej úrovni v *bulbus olfactorius*, konkrétne štatisticky významný pokles metabolického markeru viability a počtu neurónov – tNAA/tCr (Tab.1). Predpokladá sa, že tNAA sa syntetizuje v mitochondriách neurónov z aspartátu a acetyl-CoA, následne sa transportuje k oligodendrocytom, kde je ďalej metabolizovaný a slúži ako zdroj acetylových skupín pre syntézu lipidov a bielkovín [7]. Podľa literatúry znížené hladiny tNAA/tCr korelujú s narastajúcou inhibíciou neurogenézy a zvýšenou nerodegeneráciou vedúcou k iniciácii bunkovej smrti [7-8]. Uvedené procesy môžu byť vyvolané množstvom post-radiačných zmien pozorovaných v rámci CNS, mimo iné narušením hematoencefalickej bariéry, aktiváciou mikroglíi, apoptózou oligodendrocytov, zvýšenou expresiou astrocytov či zmenami synaptickej plasticity alebo aj génovej expresie [4,9]. Z našich výsledkov je teda zrejmé že už v krátkom čase po aplikovaní radiačnej dávky na tkanivo mozgu nastávajú výrazné zmeny na metabolickej úrovni s výrazným dopadom na neurodegeneráciu tkaniva.

Tab. 1 Skorá post-radiačná atrofia tkaniva a pokles pomeru tNAA/tCr v *bulbus olfactorius*.

<i>bulbus olfactorius</i>	kontrola (n=5)	ožiarené (n=9)	nepárový t-test (p)
tNAA/tCr (priemer ± SD)	1,207 ± 0,162	0,962 ± 0,203	0,039
volumetria (priemer ± SD) cm ³	1,034 ± 0,030	0,909 ± 0,049	0,0002

Zároveň sme v štúdiu pozorovali štatisticky významnú atrofiu tkaniva v oblasti *bulbus olfactorius* (Tab.1) v dôsledku skorého poškodenia mozgu radiačným žiarením. Hraničná hladina atrofie tkaniva bola definovaná ako priemerná volumetrická hodnota *bulbus olfactorius* vypočítaná v kontrolnej skupine potkanov mínus jej štandardná odchýlka. Vzhľadom na takto získanú hraničnú hodnotu atrofie skúmaného tkaniva, sme u ožiarených potkanov potvrdili úbytok tkanivovej hmoty v tejto oblasti mozgu v priemere o $10 \pm 5\%$. Morfologické zmeny tkaniva môžu byť vyvolané následkom poklesu proliferujúcej kapacity gliálnych buniek alebo endoteliálnych cievnych buniek, ktoré nastávajú vplyvom ionizujúceho žiarenia [2,8].

Záver

V našej experimentálnej štúdiu sme potvrdili výrazný úbytok neurálnej hmoty v oblasti *bulbus olfactorius* spojený so zníženou metabolickou funkčnosťou týchto buniek ako dôsledok skorého poškodenia mozgu radiačným žiarením s aplikovanou ionizačnou dávkou ekvivalentnou terapeuticky aplikovaným dávkam používaným pri nádorovej rádioterapii. Táto skutočnosť môže byť významná z klinického hľadiska keďže rádioterapeutické dávky využívané pri intrakraniálnych nádoroch často prevyšujú hodnoty nevyhnutné na zachovanie neurogézy a neuroprotektie.

Táto publikácia bola podporená projektami „Martinské centrum pre biomedicínu (ITMS: 26220220187)“ a „Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení (ITMS: 26220220153)“, spolufinancovaná grantami VEGA 1/0129/16 a APVV-15-0107, spolu so zdrojmi EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Greene-Schloesser, *Front Oncol.* **2012**, 2: 73.
- [2] Wong, *Mol Interv.* **2004**, 4: 273-284.
- [3] Lawrence, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **2010**, 76: 20-27.
- [4] Hwang, *Neurobiol Dis.* **2006**, 21: 457-467.
- [5] Forbes, *Radiat Res.* **2013**, 180: 326-333.
- [6] Fowler, *Br J Radiol.* **2010**, 83: 554-568.
- [7] Barker, *Clinical MR Spectroscopy (Cambridge)*. **2010**, p. 1-18.
- [8] Chan, *J Magn Reson Imaging.* **2009**, 29: 1013-1020.
- [9] Lledo, *Nat Rev Neurosci.* **2006**, 7: 179-193.

Vplyv metionínom vyvolanej hyperhomocysteinémie na rozvoj neurodegenerácie za experimentálnych podmienok

Koprda, O.¹, Tóthová, B.^{2,3}, Kalenská, D.^{2,3}, Lehotský, J.^{2,3}, Adamkov, M.¹, Kovalská, M.¹

¹Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine, ²Ústav lekárskej biochémie JLF UK v Martine,

³Biomed – Divízia Neurovedy JLF UK v Martine

kovalska@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Diseases of the central nervous system are often diagnosed in patients with hyperhomocysteinemia (hHcy). A high level of circulating plasma homocysteine (Hcy) is an independent risk factor for stroke. Recent studies suggest hHcy to be a strong risk factor for dementia. The concurrent effect of brain ischemia and Hcy has a broad application in the clinical field. Therefore, we investigated the effect of ischemia-reperfusion injury (IRI) in combination with hHcy on neurodegeneration in rat brains. We have studied neurodegeneration after global brain ischemia in rat brain in association with hHcy and possible unfolding of neurodegeneration. 30 male Wistar rats were used in this experiment, half of which had been fed a methionine-rich diet (4 g/kg during 28 days) in order to induce hHcy. Global cerebral ischemia with reperfusion was applied using a 15 min vascular occlusion. We assessed the tissue damage in the hippocampal area CA1 using fluorescence microscopy after Fluoro-Jade C staining. The experimental group of animals after ischemia and 72-hour reperfusion without pre-treatment with methionine showed 1500-times higher neuronal disintegration in the hippocampal CA1 area compared to the control group ($p < 0,001$), while the group with the same reperfusion time fed methionine-rich diet showed a 37% decrease compared to the previous group ($p < 0,001$). These results show a protective effect of oral methionine administration on neuronal survival after ischemia-reperfusion injury.

Key words: hyperhomocysteinemia, ischemia-reperfusion injury, methionine, programmed neuronal death

Úvod

Výskyt hyperhomocysteinémie (hHcy) spolu s mozgovou ischémiou je častým medicínskym úkazom. Hladina homocysteínu (Hcy) sa však väčšinou stanovuje až po prebehnutí cievnej mozgovej príhody, a tak je hHcy diagnostikovaná *ex post*. Viaceré literárne zdroje pojednávajú o potenciálnej prediktívnej hodnote Hcy a možnosti rutinného sledovania jeho koncentrácií, teda využitia Hcy ako biomarkera rizika kardiovaskulárnych, resp. cerebrovaskulárnych ochorení, v rámci preventívnych opatrení [1-3].

Klinický význam zvýšenej koncentrácie Hcy v plazme pri rozvoji ischemických cievnych mozgových príhod, ich recidív a možnosti predikcie ich mortality (obzvlášť u pacientov s aterosklerózou veľkých ciev), bol dokázaný vo viacerých štúdiách [4-5]. Následkom spomalenej remetylácie dochádza k zvýšeniu Hcy v plazme, pričom cievy 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 [6-8]. Taktiež, hHcy je spájaná s rozvojom

neurodegeneratívnych zmien, s rozvojom Alzheimerovej choroby ako aj Parkinsonovej choroby [8-10]. Napriek veľkému klinickému významu existuje len obmedzené množstvo experimentálnych prác, ktoré sa venujú skúmaniu vzájomného vplyvu hHcy a ischemického poškodenia nervového tkaniva [11]. Preto sme sa v našej práci zamerali na asociáciu týchto dvoch patologických činiteľov pri ich súčasnom ako aj izolovanom pôsobení s ohľadom na prežívanie neurónov, čo má potenciálny význam aj pre liečbu pacientov. HHcy je jedným z predpokladaných faktorov, ktorý môže priebeh ischemického poškodenia nepriaznivo ovplyvniť ako aj zmeny vzniknuté ischémiou potenciovat' [8-10]. Hlbšie poznanie podstaty mechanizmov prebiehajúcich v bunkách pri ischemickom poškodení mozgu v asociácii s hHcy by mohlo v budúcnosti prispieť k zefektívneniu terapie pacientov po ischemickom infulte.

Materiál a metódy

V našich experimentoch sme použili ako biologický materiál samce potkanov kmeňa Wistar vo veku od 6 do 8 mesiacov (30 ks), chované v štandardných podmienkach vo zverinci. Manipulácia s týmito zvieratami bola schválená Etickou komisiou JLF UK ako aj ŠVPS SR pod číslom 727/12-221. Zvieratá boli rozdelené do dvoch skupín; prvej skupine bola ešte pred experimentom po dobu 28 dní podávaná metionínová (Met) diéta (voda obohatená o metionín; 4g/kg zvierat'a), druhá skupina bola bez Met diéty. Obom skupinám zvierat bol aplikovaný model globálnej mozgovej ischémie počas 15 min [8] s následnou reperfúziou 72 hodín a 7 dní. Zvieratá boli usmrtené dekapitáciou v súlade s etickými zásadami práce s laboratórnymi zvieratami. Po usmrtení im bolo odobraný mozog na histologickú analýzu. Histologickú analýzu sme vykonali na zmrazených rezoch. Na zobrazenie dezintegrovaných neurónov sme použili fluorescenčnú metódu FluoroJade-C. Preparáty sme vyhodnocovali s použitím konfokálneho mikroskopu Olympus FluoView FV10i v CA1 (*Cornu Ammonis* 1) oblasti hipokampu. Výsledky sme vyhodnotili programom GrafPhad InStat V3.01 a Student-Neuman-Keulsovho testu, kde hladina $p < 0.05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

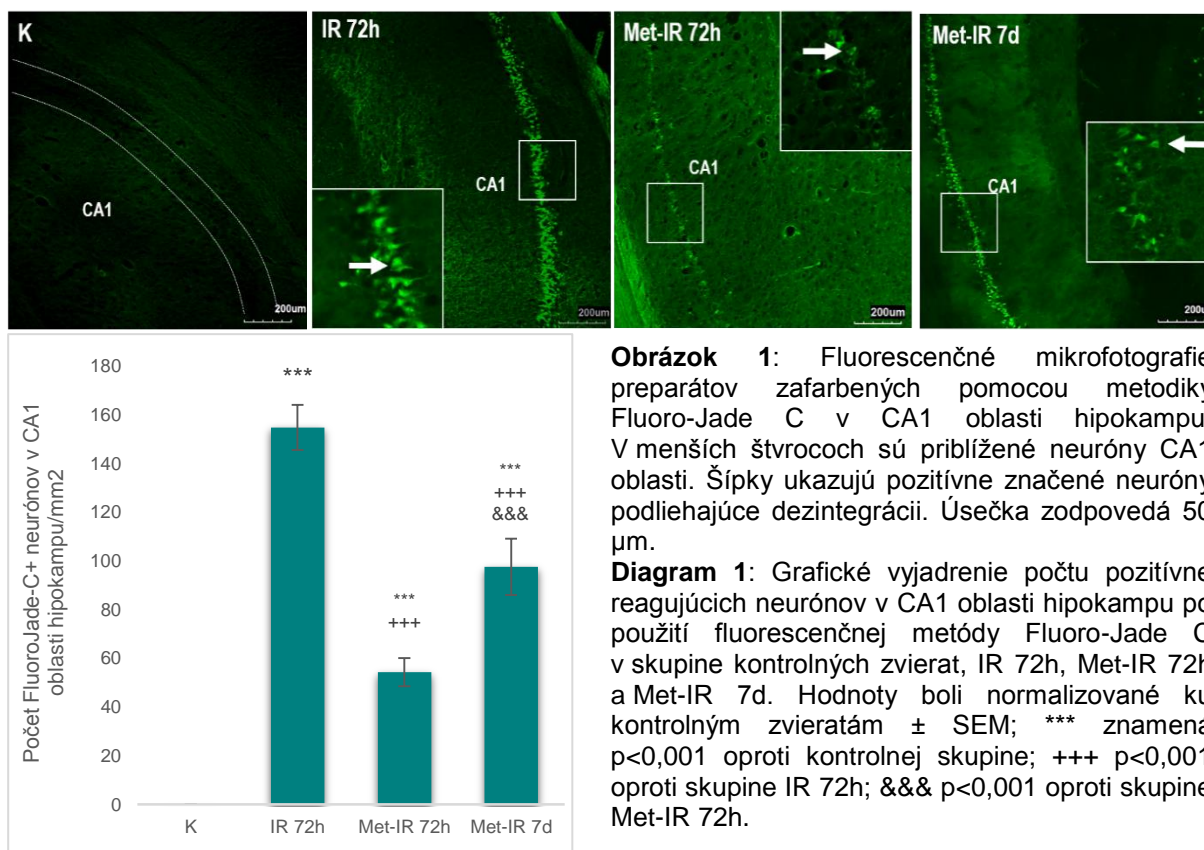
Výsledky

Fluoro-Jade C predstavuje pokročilú fluorescenčnú metódu značenia neurónov podliehajúcich dezintegrácii. Táto metodika je najsenzitívnejším markerom neuronálnej degenerácie a fluorescenčne označuje nielen perikaryá, ale aj distálne dendrity a axóny [12]. Detailné fluorescenčné mikrofotografie preparátov zhotovených z mozgov sledovaných skupín zvierat demonštruje obr. 1. Morfológické zmeny sme hodnotili a kvantifikovali pomocou softvéru Image-Pro Plus 6.0.

Zmeny vyvolané našim experimentom na bunkovej a tkanivovej úrovni sme sledovali v skupine kontrolných zvierat (K), v skupine zvierat s navodenou ischémiou a 72-hodinovou reperfúziou (IR 72h), v skupine zvierat s rovnako vyvolaným ischemicko reperfúznym poškodením, ale po predchádzajúcej Met diéte (Met-IR 72h) a v skupine zvierat s Met diétou po 7-dňovej reperfúzii (Met-IR 7d). V našich experimentoch sme dospeli k nasledovným výsledkom (uvedené hodnoty predstavujú aritmetický priemer hodnôt napočítaných na 4 rezoch \pm štandardná chyba, SEM):

CA1 oblasť hipokampu sa vyznačovala výraznou pozitivitou vo všetkých ovplyvňovaných skupinách (okrem kontrolnej). Medzi sledovanými skupinami boli výrazné rozdiely vo fluorescenčnej pozitivite. Mozgy zvierat kontrolnej skupiny nevykazovali takmer žiadnu fluorescenciu. V skupine IR 72h sme zaznamenali najvýraznejšie poškodenie, priemerný počet pozitívne označených neurónov na 1

mm² tkaniva $154,75 \pm 9,23$; čo predstavuje viac ako 1500-násobný nárast positivity oproti kontrole ($p < 0,001$). V skupine Met-IR 72h sme pozorovali značne slabšie poškodenie, priemerný počet pozitívne reagujúcich neurónov na 1 mm² tkaniva bol $54,25 \pm 5,80$; tieto hodnoty takisto predstavujú štatisticky významný viac než 540-násobný nárast oproti kontrole ($p < 0,001$), ale zároveň významný pokles oproti skupine IR 72h o 65% ($p < 0,001$). Aj skupina Met-IR 7d vykazovala významný nárast dezintegrácie neurónov, priemerný počet pozitívne reagujúcich buniek na 1 mm² tkaniva bol $97,5 \pm 11,6$. Táto hodnota vyjadruje 975-násobný nárast oproti kontrolnej skupine ($p < 0,001$), pokles oproti skupine IR 72h o 37% ($p < 0,001$) a nárast oproti skupine Met-IR 72h o 44% ($p < 0,001$).



Diskusia

Naše výsledky ukazujú výrazný poškodzujúci efekt ischemie na mozgové tkanivo. Zaujímavé bolo zistenie, že Met diéta zlepšila prežívanie neurónov po ischemii a 72-hodinovej reperfúzii. Z výsledkov je zrejmé, že so stúpajúcou dobou reperfúzie stúpa bunkové poškodenie. Príčinou je spustenie dráh apoptózy aj nekrózy ako odpoveď na ischemiu, pričom rozvoj tejto odpovede je přímo úmerný dĺžke reperfúzneho času. Skupina zvierat po IR 72h bez navodenej hHcy sa zdá byť postihnutá ťažšie. Zvieratá, u ktorých ischemiu predchádzala indukcia hHcy podávaním Met diéty, sa vyznačovali relatívne menším rozsahom bunkového poškodenia oproti skupinám bez tejto diéty. Mimoriadne markantný je kontrast medzi postihom CA1 oblasti skupín IR 72h a Met-IR 72h, kde u Met skupiny badáme stále slabú farbitelnosť a teda aj vitalitu buniek, zatiaľ čo skupina bez Met diéty vykazuje masívny úbytok viabilných neurónov. V skupinách po 7-dňovej reperfúzii je rozdiel v postihu CA1 už menší, napriek tomu je však stále viditeľné väčšie poškodenie v IR-72h ako v Met-IR 7d. Podľa výsledkov získaných za použitia tejto metodiky sa javí, že Met v strave ako

zdroj Hcy môže pôsobiť do určitej miery protektívne po navodení ischemie. Ako vysvetlenie pozorovaného fenoménu Met indukovanej neuroprotektie by pripadalo do úvahy zlepšenie pomeru SAM/SAH zvýšením dostupnosti Met, a teda by sa v patogenéze hHcy v mozgu mohol menej uplatniť proces hypometylácie. Je tiež známe, že znížený pomer SAM/SAH v CSL vyvoláva stav hypometylácie s pridruženou bunkovou patológiou [13-15]. Zlepšovanie pomeru SAM/SAH v prospech SAM ako univerzálneho donora metylovej skupiny je kľúčové pre ochranu neurónov pred oneskorenou neuronálnou smrťou [16]. Naše výsledky tiež naznačujú, že protektívny vplyv Met je možné vidieť až po prebehnutom ischemicko-reperfúznom poškodení a v mozgoch kontrolných zvierat s Met diétou sa neuplatnil. Niektorí autori zistili, že existuje subpopulácia hipokampálnych neurónov s lepšou toleranciou ischemie [17], pričom tieto bunky boli identifikované ako interneuróny [18], čo sa zatiaľ v našej práci nepodarilo dokázať. Modely orálne navodenej hHcy sú limitované širokým zásahom do intermediárneho metabolizmu [3], pričom hHcy vyvolaná subkutánnym podávaním homocysteínu vernejšie napodobňuje hHcy ako klinickú jednotku [8, 19].

Záver

Táto práca mala zhodnotiť účinky hHcy na tkanivo centrálného nervového systému pri spolupôsobení ďalšieho silného patologického faktora, ktorým je mozgová ischemia v experimentálnych podmienkach *in vivo*, teda modelovať častý klinický stav, pri ktorom je rozvoj liečby umožňujúcej záchranu čo najväčšieho množstva neurónov kľúčový a má mimoriadny význam.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0229/15, APVV-15-0107 a projektom "Martinské centrum pre Biomedicínu", (ITMS: 26220220187), ktorý je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Herrmann, *CCLM*. **2011**, 49/3: 435-441.
- [2] Stanger, *Expert Rev Neurotherapeutics*. **2009**, 9/9: 1393-1412.
- [3] McIlroy, *Stroke*. **2002**, 33/10: 2351-2356.
- [4] Sato, *BBRC*. **1988**, 150/1: 491-496.
- [5] Zhang, *Mol Med Rep*. **2016**, 14/1: 289-300
- [6] Humphrey, *Mayo Clin Proc*. **2008**, 83/1, 1203-1212.
- [7] Kénina, *Neurologijos Seminarai*. **2009**, 13/41, 139 -142.
- [8] Kovalska, *J Physiol Pharmacol*. **2015**, 66: 887-897.
- [9] Lehotsky, *Cell Mol Neurobiol*. **2015**, 35/1, 7-15.
- [10] Petras, *J Physiol Pharmacol*. **2014**, 65, 15-23.
- [11] Dayal, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2008**, 28/9: 1596-1605.
- [12] Di Simone, *BOR*. **2003**, 69/4: 1129-1134.
- [13] Mato, *FASEB Journal*. **2002**, 16/1: 15-26.
- [14] Hetman, *Eur J Biochem*. **2004**, 271/11: 2050-2055.
- [15] Kovalska, *Neurochem Res*. **2012**, 37/7: 1568-1577
- [16] Gao, *JCBFM*. **2005**, 25/6: 694-712.
- [17] Chwatko, *FASEB Journal*. **2007**, 21/8: 1707-1713.
- [18] Jakubowski, *JBC*. **2000**, 87/1: 45-51.
- [19] Petras, *Cel Mol Neurobiol*. **2017**, doi: 10.1007/s10571-017-0473-5.

Sledovanie hladiny acetylácie histónu H4 (Lys12) v tkanive mozgu po globálnej ischémii v podmienkach hyperhomocysteinémie u potkana

Tóthová, B.¹, Kovalská, M.², Kalenská, D.¹, Beňová, A.¹, Lehotský, J.¹

¹Ústav lekárskej biochémie a BioMed JLF UK v Martine, ²Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine
tothova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Spectrum of epigenetic processes play an important role in the etiopathogenesis of neurodegenerative disorders including cerebral ischemia. Histone acetylation is among the most studied epigenetic modifications associated with active transcription state of chromatin. Open chromatin state is more available for various transcription factors providing activation or repression of gene expression. Ischemia is associated with overall decrease in histone acetylation levels, thus repressing prosurvival gene expression. On the other side, it can result in active expression of genes responsible for mediating neuronal cell death and cause aggravation of tissue damage after ischemic insult. In this paper, we investigate a specific epigenetic mark, acetylation levels of histone H4 (Lys12) in animal model of global cerebral ischemia with the correlation of brain tissue injury. We observed elevated acetylation levels in groups with induced hyperhomocysteinemia, what correlates with the increase in neurodegeneration of ischemic brain tissue. This could indicate to a specific role of epigenetic histone acetylation in association with ischemia-reperfusion injury in hyperhomocysteinemic conditions.

Key words: cerebral ischemia, hyperhomocysteinemia, histone acetylation

Úvod

Epigenetické modifikácie zahrňujúce acetyláciu a deacetyláciu histónov sú zodpovedné za uchovanie stability chromatinu a sú zapojené do etiológie širokej škály neurodegeneratívnych ochorení. Acetylácia sa spája s otvoreným a transkripčne aktívnym stavom chromatinu, pričom chromatin sa stáva viac prístupným pre transkripčné faktory [1]. Abnormálny acetylačný profil ovplyvňuje synaptickú plasticitu, učenie a pamäť. Acetylácia histónov sa objavuje na rôznych lyzínových zvyškoch, špecifické zmeny acetylácie H4K12 sa spájajú s formovaním dlhodobej pamäte a synaptickou plasticitou. U starnúcich myší deregulácia acetylácie H4K12 v hipokampe bránila spusteniu hipokampálnej génovej expresie spojennej s ustálením pamäte a následným výrazným poklesom pamätevej efektivity [2]. Taktiež sa čiastočne spája s procesom priestorového učenia a strachovou pamäťou [3]. Nedávne štúdie dokázali, že amyloidný prekursorový proteín potláča cez acetyláciu H4K12 mnohé skoré gény nevyhnutné pre synaptickú plasticitu [4]. Niektoré práce spájajú zmenenú hladinu acetylácie s reguláciou expresie prozápalových génov [5]. Zvýšená acetylácia bola pozorovaná v tkanivách vystavených zápalu u rôznych zvieracích modelov, pričom bola spojená s nadmernou reguláciou génov zodpovedných za sprostredkovanie zápalovej odpovede [6].

Ischemická cievna mozgová príhoda má v dôsledku nedostatočného prísunu kyslíka a živín za následok rozsiahlu neuronálnu smrť v zasiahnutej oblasti a nenávratnú stratu neuronálnych funkcií. Etiopatogenéza cievnej mozgovej príhody je veľmi

komplexná a zahrňuje poškodenie v dôsledku excitotoxicity, aktivácie prozápalových mechanizmov, zvýšeného oxidačného stresu, iónovej nerovnováhy [7]. V ischemických podmienkach všeobecne dochádza k poklesu celkovej acetylácie histónov a potlačeniu génovej expresie, na druhej strane však dochádza ku zvýšenej transkripcii génov kontrolujúcich bunkový stres, zápalové a apoptotické odpovede.

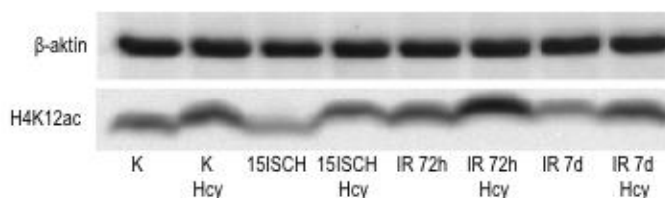
Materiál a metodika

V našich experimentoch sme použili dospelé samce potkanov kmeňa Wistar, ktorým sme po dobu 21 dní subkutánnou injekciou aplikovali 1,2 μmol Hcy/g hmotnosti zvieraťa na navodenie hyperhomocysteinémie. Po uplynutí tohto obdobia zvieratá podstúpili globálnu 15-minútovú ischémiu metódou 4-cievneho podväzu [8]. Zvieratá sme následne rozdelili na ischemickú skupinu bez reperfúzie, skupinu so 72-hodinovou a 7 dňovou reperfúziou, počet zvierat v skupine $n=3$. Kontrolnú skupinu predstavovali zvieratá bez operačného zákroku. Hladinu Hcy v plazme sme stanovili komerčne dostupnou súpravou. Mozgové tkanivo sme spracovali na biochemické (Western blot, imunodetekcia) a imunohistochemické analýzy. Výsledky sme vyhodnotili programom GrafPad InStat V3.01 a pomocou Student-Neuman-Keulsovoho testu, pričom za štatisticky významnú bola považovaná hladina $p<0,05$.

Výsledky a diskusia

Stanovením hladiny plazmatického Hcy sme zistili zvýšenú koncentráciu u skupiny s indukovanou hHcy na $8,456\pm 0,38$ $\mu\text{mol/l}$, pričom fyziologická hladina Hcy u kontrolných zvierat predstavovala $7,151\pm 0,42$ $\mu\text{mol/l}$.

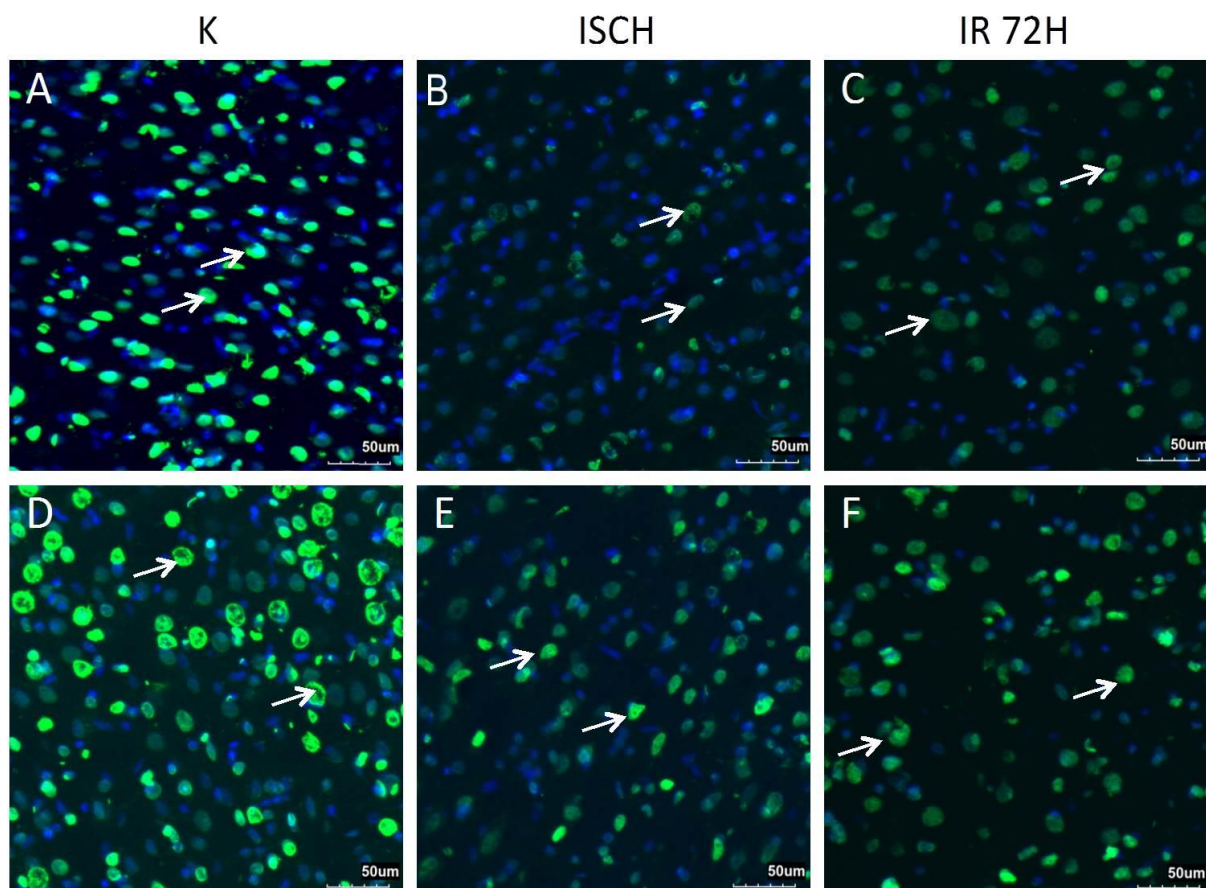
Pri ischemických podmienkach trpí celá zasiahnutá oblasť predného mozgu nedostatkom prísunu kyslíka a živín, avšak krátky ischemický inzult spôsobuje bunkovú smrť predovšetkým CA1 pyramidálnych neurónov. Neuronálna smrť vykazujúca črty apoptózy a nekrózy, a je v postihnutej oblasti detekovateľná na druhý až tretí deň po ischemickom inzulte. Na detekciu tkanivového poškodenia po ischemickom inzulte a identifikáciu dezintegrovaných neurónov sme použili metódu FluoroJade-C. V skupine IR 72h bez hHcy sme v CA1 oblasti hipokampu zistili 773,75-násobný nárast ($154,75\pm 9$; $p<0,001$) FluoroJade-C pozitívnych neurónov. V skupine s indukovanou hHcy sa počet dezintegrovaných buniek 1,35-násobne zvýšil (209 ± 11 ; $p<0,001$) v porovnaní s IR 72h kontrolou. V primárnom motorickom kortexe sme taktiež zaznamenali masívny nárast FluoroJade-C pozitívnych neurónov v porovnaní s kontrolnou IR 72h skupinou 94,7-násobným zvýšením (71 ± 11 ; $p<0,001$).



Obr. 1 Western blotová analýza acetylovaného H4K12 v homogenáte kortexu.

Nerovnováha acetylačných mechanizmov a zmenený acetylačný profil môže mať vplyv na rozsah IR poškodenia v dôsledku zmenenej expresie génov spojených so smrťou, či naopak, prežívaním neurónov. My sme v našom modeli globálnej ischémie sledovali zmeny v hladinách celkovej acetylácie histónu H4 na lyzíne 12 v mozgovom kortexe. U hHcy skupín sme v porovnaní s kontrolnou skupinou zaznamenali štatisticky významný pokles na $15,97\pm 3,77\%$ ($p<0,05$) u skupiny s 15-minútovou ischémiou s ďalším nárastom na $242,56\pm 7,42\%$ ($p<0,001$) v skupine hHcy IR so 72-

hod. reperfúziou, ktoré pretrvávalo aj po 7-dňovej reperfúzii ($233,25 \pm 31,84\%$; $p < 0,001$). V porovnaní s hHcy kontrolou boli zmeny v hladine acetylácie signifikantné aj u skupiny s 15-min. ischemiou ($p < 0,01$) a IR Hcy skupinami so 72-hod. ($p < 0,001$) a 7d ($p < 0,001$) dlhou reperfúziou. Znížená hladina acetylácie pri 15-min. ischemii bola signifikantná voči skupinám IR 72-hod. ($83,61 \pm 14,15\%$; $p < 0,05$), 7-dňovej IR ($76,72 \pm 10,05\%$; $p < 0,05$) a rovnako aj voči IR Hcy skupinám so 72-hod. ($p < 0,001$) a 7-dňovou ($p < 0,001$) reperfúziou, ktoré boli rovnako signifikantne zvýšené aj v porovnaní s hHcy ischemickou skupinou ($127,41 \pm 9,46\%$). Spomedzi zhodných kontrolných a hHcy skupín sme signifikantné rozdiely pozorovali u ischemickej skupiny ($p < 0,01$) a skupín IR 72-hod. ($p < 0,001$) a 7-dňovej IR ($p < 0,001$).



Obr. 2 Fluorescenčné mikrofotografie imunohistochemickej detekcie H4K12ac protilátky v M1 kôrovej oblasti mozgu potkana u kontrolnej, ischemickej a skupiny po 72-hodinovej reperfúzii. Kontrolné skupiny bez hHcy (A-C), skupiny s indukovanou hHcy (D-F). Jadrá nervových buniek sú dofarbené DAPI (modrá), H4K12ac pozitívne jadrá nervových buniek (zelená). Šípky označujú prekryv DAPI a H4K12ac pozitívnych jadier nervových buniek. Úsečka zodpovedá dĺžke 50 μm .

Pre bližšie potvrdenie výsledkov Western blotovej analýzy sme sledovali imunoreaktivitu H4K12 v M1 kôrovej oblasti fluorescenčnou imunoanalýzou. Zaznamenali sme celkovo vysokú imunoreaktivitu H4K12ac s jadrovou lokalizáciou. Počet H4K12ac pozitívnych jadier nervových buniek bol vysoký v oboch kontrolných skupinách. Nižšiu acetyláciu sme pozorovali u kontrolnej ischemickej a IR skupiny v porovnaní s naivnými kontrolami, ako aj voči ischemickej a IR skupine s indukovanou hHcy.

Niektoré štúdie pozorovali zvýšenú hladinu acetylácie H4K12 v spojení so zvýšenou zápalovou odpoveďou u transgénnych AD zvieracích modelov aj u pacientov s AD, čo súviselo so zvýšenou vulnerabilitou na bunkové poškodenie [9]. Takisto nárast

hladiny acetylovaného H4K12 pripisovaný zvýšenej tvorbe reaktívnych druhov kyslíka a oxidačného stresu bol pozorovaný *in vitro* počas starnutia oocytov [10].

Záver

Na základe potvrdeného tkanivového poškodenia po ischemickom inzulte a pozorovaných zmien v hladinách acetylácie H4K12 môžeme predpokladať, že práve táto epigenetická modifikácia by mohla zohrávať dôležitú úlohu pri expresii génov zodpovedných za bunkovú smrť a prežívanie v dôsledku ischemie a mohla by byť možným cieľom pri hľadaní farmakologickej terapie po mozgovej ischemii. Avšak na vyvodenie konečných záverov sú potrebné ďalšie špecificky zamerané analýzy.

Táto práca bola podporená projektom APVV 15-0107, VEGA 1/0229/15, VEGA 0128/16 a "Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení", ITMS kód projektu: 26220220153, spolufinancovanými zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Rice, *Curr Opin Cell Biol.* **2001**, 13/3: 263-273.
- [2] Peleg, *Science.* **2010**, 328/5979: 753-756.
- [3] Bousiges, *PLoS One.* **2013**, 8/3: e57816.
- [4] Hendric, *PLoS One.* **2014**, 9/6: e99467.
- [5] Ito, *Mol Cell Biol.* **2000**, 20/18: 6891-903.
- [6] Tsaprouni, *J Inflamm. (Lond).* **2011**, 8/1: 1.
- [7] Deb, *Pathophysiol.* **2010**, 17/3: 197-218.
- [8] Pulsinelli, *Stroke.* **1979**, 10/3: 267-272.
- [9] Plagg, *Curr Alzheimer Res.* **2015**, 12/8: 752-760.
- [10] Cui, *Theriogenol.* **2011**, 75/4: 638-646.

Zmeny superoxiddizmutázy po indukovanej hyperhomocysteinémii, ischemicko-reperfúznom poškodení a ischemickom preconditioningu v kortexe mozgu potkanov

Petráš, M.¹, Kovalská, M.², Tatarková, Z.³, Šarlinová, M.¹, Lehotský, J.^{1,3}, Drgová, A.³, Halašová, E.^{1,4}

¹BioMed JLF UK v Martine, ²Ústav histológie a embryológie JLF UK v Martine, ³Ústav lekárskej biochémie JLF UK v Martine, ⁴Ústav lekárskej biológie JLF UK v Martine
petras@jfm.uniba.sk

Abstract

Hyperhomocysteinemia (hHcy) – the increase level of homocysteine (Hcy) is an accompanying phenomenon of many diseases including brain stroke and can aggravates the outcome of ischemia-reperfusion (IR) damage, causes the increased formation of reactive oxygen species (ROS), the homocysteinylation and thiolation of proteins and enzymes, thus reducing their functionality. The induction of ischemic tolerance (IT) - the endogenous phenomenon in which brief periods of ischemia make tissue more resistant to further more severe ischemic injury that would otherwise be lethal can mitigate the effects of the ischemic attack. The aim of this study was to study the effect of hHcy on the the activity and the production of antioxidant enzyme mitochondrial superoxiddismutase (MnSOD) in the rat brain cortex after induced ischemia, IR damage and ischemic preconditioning (IPC). HHcy alone induces progressive neuronal cell death and morphological changes. If combined with hHcy, IPC could preserve the neuronal tissue from lethal ischemic effect and initiates alterations of MnSOD with the most significant effect observed after 3 hours of reperfusion. The activity of MnSOD significantly decreased after the induced hHcy, however the level of MnSOD protein increased. We observed a similar trend using the Western blot analysis. These results indicate post-translational modifications due to the elevated level of Hcy and correlate also with immunohistochemical analysis.

Key words: hyperhomocysteinemia, superoxide dismutase, ischemia-reperfusion injury, ischemic preconditioning

Úvod

Viaceré experimentálne a klinické štúdie uvádzajú, že mierna hyperhomocysteinémia (hHcy) zvyšuje riziko klinických prejavov pri cievnej mozgovej príhode (CMP). Etiopatogenéza homocysteínu (Hcy) je spojená s jeho autooxidáciou a následne zvýšenou tvorbou voľných radikálov [1,2], ďalej post-translačnými modifikáciami bielkovín, tioláciou a homocysteinylláciou vedúcimi k inaktivácii enzýmov, tvorbe modifikovaných proteínov a strate biologickej aktivity [3], ako aj nadmernou stimuláciou NMDA receptorov [4]. Patogenéza CMP, ktorá vzniká ako dôsledok obmedzenia toku krvi do mozgu je spojená s poklesom energetických zdrojov, uvoľnením excitačných aminokyselín, dysfunkciou mitochondrií, ako aj tvorbou reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a dusíka (RNS) [2,5]. Paradoxne, obnovená perfúzia vedie k ďalšiemu tzv. ischemicko-reperfúznemu (IR) poškodeniu, ktoré negatívne ovplyvňuje aj antioxidantné enzýmy – superoxiddizmutázu (MnSOD) a katalázu (CAT), a keďže tkanivo mozgu je veľmi citlivé na hypoxiu a ischémiu navrhnutých bolo viacero mechanizmov na zmiernenie dôsledkov CMP. Jedným

z takých nástrojov je ischemická tolerancia (IT) navodená ischemickým preconditioningom (IPC), pri ktorom krátke periódy subletálneho inzultu vedú k protekcii voči ďalšiemu ataku, ktorý by bol inak letálny [2, 5]. IPC je spojený aj so zmenami antioxidačných enzýmov, a preto sme sa v štúdií zamerali práve na sledovanie aktivity, množstva a imunohistochemickú analýzu MnSOD v kombinácii s navodenou hHcy.

Materiál a metodika

6 mesačné samce potkanov kmeňa Wistar boli rozdelené do štyroch skupín – 1. **kontrolná skupina**, 2. **hHcy skupina** - ktorej bol po dobu dvoch týždňov subkutánne podávaný Hcy v dávke 0,45 $\mu\text{mol/g}$ živej hmotnosti dvakrát denne s 8 hodinovým intervalom [6], 3. **IR skupina** - s indukovanou hHcy, 15-minútovou ichémiou a následnými reperfúziami (REP) (3,24 a 72 hodín) – a 4. **IPC skupina** - skupina s indukovanou hHcy, 5-minútovou preischémiou, 15-minútovou ichémiou a následnými REP. Zvieratá boli humanne usmrtené a tkanivo mozgu bolo použité na izoláciu mitochondrií [7] a na histologické vyšetrenie [8]. Mitochondriálna frakcia bola analyzovaná spektrofotometricky a metódou Western blotting (WB). Výsledky boli korelované s fluorescenčnou imunohistochemickou analýzou tkaniva [8] a štatisticky vyhodnotené v programe GraphPad InStat V3.01, pomocou Student-Neumann-Keulsovoho testu, pričom ako štatisticky významné boli brané hodnoty $p < 0.05$.

Výsledky a diskusia

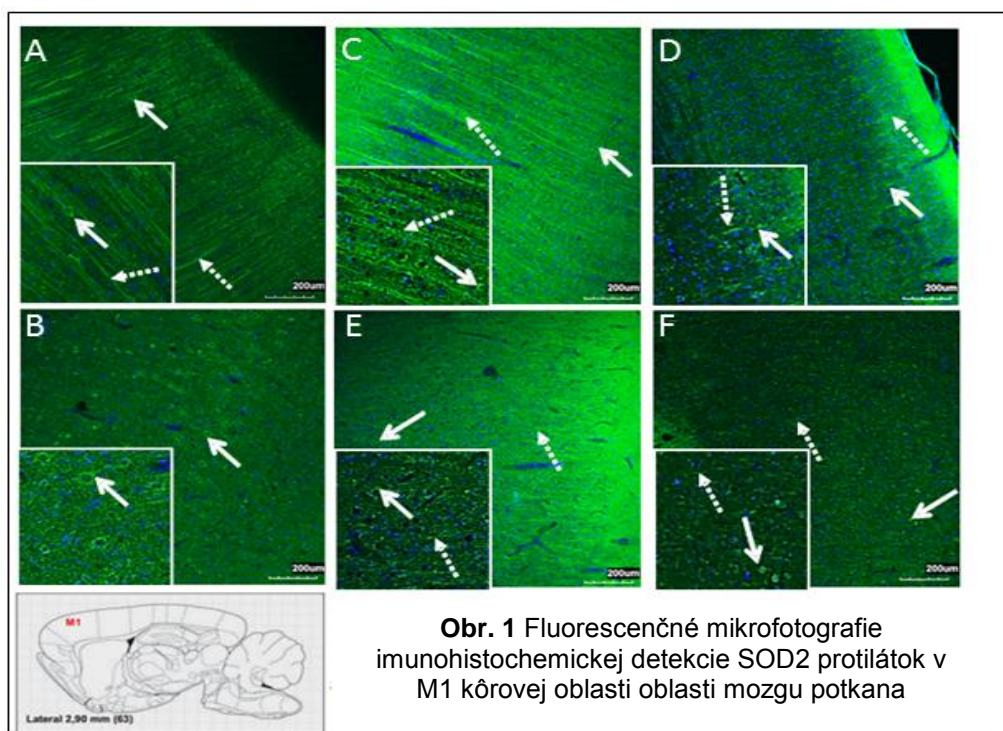
Pozorovaný bol štatisticky významný pokles aktivity MnSOD o 57,9 % v hHcy skupine v porovnaní s kontrolnou skupinou (***) ($p < 0,001$) (Tab. 1). Aktivita MnSOD bola závislá na dĺžke REP s maximálnym nárastom po 3-hodinovej REP v IR aj v IPC skupine v porovnaní s hHcy skupinou (Tab. 1), pričom 24 a 72 hodinové REP po IPC viedli k poklesu aktivity. Vo všetkých IR skupinách v porovnaní s hHcy skupinou bol detegovaný štatisticky významný nárast. Navodený IPC prispel k významnému nárastu aktivity MnSOD pri 3- (+ $p < 0,001$) a 24-hodinovej REP (+ $p < 0,01$). Výsledky WB analýzy poukazujú na zvýšenú hladinu bielkoviny v hHcy skupine o 15,7 % oproti kontrole. V IR skupine bol zaznamenaný nárast o 28,8% po 3- a o 10,9 % po 24-hodinovej REP v porovnaní s hHcy skupinou. V IPC skupinách bol zaznamenaný nárast o 9,4 % po 3-hodinovej REP (Tab. 1). Výsledky získané pomocou spektrofotometrických metód a WB boli doplnené o imunohistochemickú analýzu. Pri porovnaní kontrolnej a hHcy skupiny je zrejmé, že už v hHcy skupine dochádza v neurónoch kôrovej vrstvy k zmenám aj na histo-morfologickej úrovni (obr. 1A,B). V hHcy skupine bola imunoreaktivita MnSOD detegovaná v M1 oblasti kortexu (obr. 1B). V IR skupine sme po 3-hodinovej REP sledovali masívny nárast v intenzite zafarbenia perikaryonov aj výbežkov neurónov (obr. 1C). Imunoreaktivita MnSOD po 24-hodinovej REP v oboch sledovaných skupinách bola takmer identická, pričom v IR skupine sme nachádzali pozostatky ko-lokalizácie MnSOD aj vo výbežkoch (obr. 1D), pričom v IPC skupine boli pozitívne výhradne perikaryony neurónov (obr. 1F). MnSOD vo výbežkoch pyramidálnych neurónov. Pri porovnaní hHcy skupiny, IR a IPC skupín sme pozorovali odlišnú ko-lokalizáciu MnSOD ako v IR, tak aj v IPC skupinách. V IR skupine sme po 3-hodinovej REP sledovali masívny nárast v intenzite zafarbenia v perikaryonoch aj vo výbežkoch neurónov (obr. 1C). Výsledky indikujú nedostatočné farbenie MnSOD ako vo výbežkoch, tak v axónoch pyramidálnych neurónov po 3-hodinovej REP v IPC skupine (obr. 1E). Imunoreaktivita MnSOD po 24-hodinovej REP v oboch sledovaných skupinách bola takmer identická, pričom v IR skupine sme nachádzali pozostatky ko-lokalizácie MnSOD aj vo

výbežkoch (obr. 1D). V IPC skupine boli pozitívne výhradne perikaryony neurónov (obr. 1F). Nerovnováha medzi aktivitou a množstvo MnSOD môže súvisieť s post-translačnými modifikáciami, ktoré vedú k homocysteinyllácii a tiolácii [9] a dokázaná bola reverzibilná acetylácia lyzínov MnSOD [10]. Zvýšenú imunoreaktivitu MnSOD dokázali aj ďalšie štúdie [11]. Pozorované zmeny po navodenom IPC korelujú s výsledkami, kde bol zaznamenaný pokles aktivity MnSOD v ischemizovanej mieche u králikov [12] a po navodenej IT u potkanov [13]. Na druhej strane v iných štúdiách nebola pozorovaná zmena aktivity MnSOD, prípadne bola zvýšená [14].

Tab. 1 Vplyv hHcy na aktivitu a množstvo superoxididizmutázy v kortexe mozgu potkanov

		MnSOD (nmol/mg bielkovín)	MnSOD (% kontrolnej skupiny)	MnSOD (% hHcy skupiny)
kontrolná skupina		22,19 ± 1,42	100	
hHcy skupina		9,34 ± 0,67 ^{***}	121,48 ^{***}	100
IR skupina	15 ISCH	15,09 ± 1,04 [*]		93,09
	3 H REP	35,42 ± 1,61 ^{*** ###}		130,23 ^{** ###}
	24 H REP	31,02 ± 1,34 ^{*** ###}		156,26 ^{*** ###}
	72 H REP	28,29 ± 2,75 ^{*** ###}		121,48 [*]
IPC skupina	5/15 ISCH	8,93 ± 0,77		98,06
	3 H REP	20,58 ± 2,19 ^{+++ ###}		156,65 ^{+++ ###}
	24 H REP	16,83 ± 1,65 ^{+++ ###}		103,17 ^{###}
	72 H REP	12,69 ± 1,12 ^{###}		108,27

Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SEM. $p < 0,05$, $^{*}p < 0,01$, $^{**}p < 0,001$; štatisticky významné pri porovnaní hHcy skupiny s kontrolnou skupinou a IR skupiny s hHcy skupinou, $^{+++}p < 0,001$; štatisticky významné pri porovnaní IPC skupiny s hHcy skupinou, $^{###}p < 0,001$; štatisticky významné pri porovnaní IR skupiny s IPC skupinou



Mikrofotografie M1 kôrovej oblasti mozgu potkana v kontrolnej skupine (A), hHcy skupine (B), IR skupine po 3h REP (C) a 24h REP (D). Spodnú radu mikrofotografií predstavuje IPC skupina po 3h REP (E) a 24h REP (F). V ľavom dolnom rohu každej mikrofotografie sa nachádza detail M1 kôrovej

oblasti mozgu potkanov. Šípky (➡) označujú prekryv fluoescenčnej imunoreaktivity SOD2 (zelená) a DAPI (modrá) v nervových bunkách a prerušované šípky (→) označujú SOD2+ nervové bunky s cytoplazmatickou kolokalizáciou v oblasti nervových výbežkov. Úsečka zodpovedá dĺžke 200µm.

Záver

Zvýšená hladina Hcy v bunkách a jeho metabolity po homocysteinylnácii a tiolácii spôsobujú posttranslačné modifikácie MnSOD, ktoré ovplyvňujú príslušnú antioxidačnú schopnosť, ako aj samotnú aktivitu a množstvo enzýmu. Zvýšená produkcia superoxidového radikálu, nárast peroxidu vodíka a peroxynitritového radikálu vedie k štrukturálnym zmenám proteínov a ďalších modifikovaných foriem, ktoré ovplyvňujú enzymatickú aktivitu MnSOD a súčasne vedú k nárastu neenzymových endogénnych foriem, ktoré sa podieľajú na celkovej antioxidačnej hotovosti nervovej bunky. Úplný mechanizmus toxicity Hcy a množstvo dráh zapojených v procese IT nie sú ešte stále úplne objasnené. Keďže väčšina klinických štúdií nedokázala pokles CMP po znížení hladiny Hcy, nie je stále jasné, či Hcy zohráva príčinnú úlohu v patologických javoch, s ktorými je asociovaný alebo či je len marker niektorých základných mechanizmov. Je teda možné, že hHcy nie je primárnou príčinou aterotrombotických ochorení, ale len marker systémového a endotelového oxidačného stresu, ktoré sú hlavným mediátorom týchto patologických javov. Pochopenie viacerých mechanizmov, vrátane genetických a epigenetických je teda dôležité pre vyvíjanie terapeutických stratégií pri CMP indukovanej v dôsledku hHcy.

Práca bola podporená grantmi VEGA 1/0229/15, 1/0128/16, projektom "Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení", ITMS kód projektu: 26220220153 a projektom Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin), ITMS: 26220220187 spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Petras, *J Physiol Pharmacol.* **2014**, 65: 15-23.
- [2] Lehotský, *Front Neurosci.* **2016**, 10: 538.
- [3] Jakubowski, *Springer, Wien.* **2013**, pp 7-18.
- [4] da Cunha, *Int J Dev Neurosci.* **2012**, 30: 69-74.
- [5] Gidday, *Front Neurol.* **2015**, 6: 42; doi:10.3389/fneur.2015.00042.
- [6] Streck, *Neurochem Res.* **2002**, 27: 1585-1590.
- [7] Dodd, *Brain Res.* **1981**, 226: 107-118.
- [8] Kovalska, *J Physiol Pharmacol.* **2014**, 65: 767-776.
- [9] Longoni, *Int J Dev Neurosci.* **2016**, 48: 71-79.
- [10] Ozden, *Aging (Albany NY).* **2011**, 3: 102-107.
- [11] Ruetzler, *J Cereb Blood Flow Metab.* **2001**, 21: 244-252.
- [12] Mechírová, J. *Acta Histochem.* **2014**, 116: 252-257.
- [13] Danielisova, *Neurochem Int.* **2014**, 72: 22-29.
- [14] Park, *Neural Regen Res.* **2016**, 11: 1081-1089.

Proteomická profilizácia séra, likvoru a mozgového tkaniva u pacientov so *sclerosis multiplex*

Hányšová, S.¹, Beňová, A.¹, Tatarková, Z.¹, Kurča, E.³, Lehotský, J.^{1,2}

¹Ústav lekárskej biochémie JLF UK v Martine, ²BioMed JLF UK v Martine, ³Neurologická klinika JLF UK v Martine a UNM v Martine
hanysova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Sclerosis multiplex (SM) is a chronic progressive autoimmune disease of central nervous system, which is typical by neuroinflammation, axon demyelination and neurodegeneration. Disease symptoms are associated with the degree and localization of nerve tissue damage. It is supposed that the etiopathogenesis of SM includes genetic, immune and environmental factors, but the ultimate driving forces for disease onset and variable rate of disability progression in individuals still remain unknown. Validation of existing and identification of new disease biomarkers for diagnostic or prognostic purposes are still needed. Proteomic profiling of blood serum and cerebrospinal fluid is a non-invasive, reliable method for initial screening and finding new candidate biomarkers also for further study in SM brain tissue by methods of histopathology and immunohistochemistry. The aim of our work was to test and optimize the first step of proteomic approach for *sclerosis multiplex* research, which included the profiling of blood serum proteins from patients with various SM forms and healthy individuals by two-dimensional gel electrophoresis and identification of differently expressed proteins by mass spectrometry. Our results provide a precise information about blood serum protein profiles and are promising for following research and translation to the clinical application.

Key words: blood serum, cerebrospinal fluid, brain tissue, sclerosis multiplex

Úvod

Sclerosis multiplex – roztrúsená mozgomiechová skleróza (SM) je chronické autoimunitné ochorenie centrálnej nervovej sústavy typické procesmi demyelinizácie axónov, neurozápalu a neurodegenerácie. Predpokladá sa, že za etiopatogézu ochorenia sú zodpovedné imunitné, genetické a environmentálne faktory [1,2]. Symptómy ochorenia súvisia so stupňom a lokalizáciou poškodenia nervového tkaniva, ktoré manifestuje prítomnosťou sklerotických lézií. Je rozlišovaných niekoľko klinických foriem SM, pričom najčastejšou je relaps-remitujúca (RR-SM), pri ktorej dochádza k striedaniu období atakov a remisie. Ochorenie časom progreduje do sekundárne-progresívnej formy (SP-SM), kedy nad neurozápalom prevažuje neurodegenerácia [3]. Príčiny vzniku SM a rôznej rýchlosti progresie zneschopnenia u jednotlivých pacientov doteraz nie sú plne objasnené. Miera a progresia zneschopnenia u postihnutého jedinca je stanovovaná kvalifikovanými neurológmi s využitím široko akceptovaných hodnotiacich škál EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) a MSSS (*Multiple sclerosis Severity Score*), ktorá okrem stupňa zneschopnenia pacienta zohľadňuje tiež dobu trvania ochorenia [4].

Súčasný diagnostický možnosti SM pracujú s kombináciou vyšetrení, medzi ktoré patrí zobrazovanie mozgu magnetickou rezonanciou alebo vyšetrenie prítomnosti oligoklonálnych IgG bandov v krvnom sére a likvore [5]. Je popísaných niekoľko skupín dopĺňujúcich diagnostických a prognostických markerov SM s rôznou úlohou v patogeneze SM [6]. Stále aktuálnou výzvou je validácia existujúcich a hľadanie

nových parametrov indikujúcich patologický proces alebo farmakologickú odpoveď na terapeutický zásah, čo je zásadné pre identifikáciu interindividuálnych rozdielov u pacientov. Tieto môžu pomôcť včasnej diagnostike, predikcii progresie ochorenia a monitoringu účinnosti aplikovanej terapie. Pri hľadaní nových biomarkerov zohráva úlohu design a vývoj pokročilých skriningových technológií a metód „omics“ [7]. Proteomický prístup je neinvazívnym a rentabilným pre bližšie štúdium metabolických dráh, sledovanie priebehu ochorenia alebo efektivity aplikovanej terapie. Možnosti neinvazívneho štúdia ľudského mozgu sú obmedzené, preto sú preferovanými zdrojmi štúdia kandidátnych molekulových znakov neurologických ochorení v procese prvého skriningu krvné sérum a likvor [8]. Ich profilizácia a porovnanie ponúkajú bližší pohľad na patologické mechanizmy spojené s ochorením a umožňujú výber špecifických proteínov, na ktoré je možné zacieliť ďalší výskum na tkanivovej úrovni pomocou metód histopatológie a imunohistochemie. Cieľom našej práce bolo zaviesť a optimalizovať testovanú metodiku proteomickej analýzy krvného séra u súborov pacientov a kontrolných jedincov, analýzy získaných proteínových profilov, výberu proteínov s rozdielnou mierou expresie a ich identifikácie pomocou hmotnostnej spektrometrie.

Materiál a metodika

V pilotnej štúdii zameranej na proteomickú analýzu krvného séra sme súbor slovenských pacientov Neurologickej kliniky JLF UK a UNM v Martine s klinicky definovanou SM rozdelili na základe klinických údajov a skóre MSSS do podskupín relaps-remitujúca forma s pomalou progresiou (vek $46,6 \pm 6,31$, skóre $1,02 \pm 0,32$), relaps-remitujúca forma s rýchlou progresiou (vek $51,8 \pm 6,38$; skóre $8,2 \pm 1,45$) a sekundárne-progresívna forma (vek $48 \pm 11,34$; skóre $7,52 \pm 0,86$). Súbor bol doplnený o podskupinu kontrolných jedincov (vek $51,6 \pm 6,83$). Do každej podskupiny boli zaradené vzorky krvného séra dvoch mužov a troch žien. Vzorky sme dealbuminizovali a proteíny sme separovali dvojdimenzionálnou gélovou elektroforézou. Získané proteínové profily sme porovnávali medzi jednotlivými skupinami, vzájomné rozdiely sme hodnotili Studentovým t-testom s kvantitatívnou analýzou zmeny expresie na úrovni viac ako 1,5 násobnej zmeny a menej ako 0,6; s hodnotou $p < 0,05$ považovanou za štatisticky významnú. Vybrali sme spoty zodpovedajúce odlišne exprimovaným proteínom, tieto sme následne identifikovali pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI TOF/TOF.

Výsledky a Diskusia

Pomocou hmotnostnej spektrometrie sme úspešne identifikovali nasledovné proteíny (Tabuľka č. 1) s odlišnou expresiou medzi pacientami a kontrolným súborom, tiež medzi jednotlivými podskupinami pacientov.

Tab. 1: Proteíny identifikované hmotnostnou spektrometriou, informácia o kvantitatívnej zmene expresie v porovnaní medzi jednotlivými podskupinami. RR-SM – relaps-remitujúca forma, SP-SM – sekundárne progresívna forma sclerosis multiplex.

	RR-SM pomalá progresia / kontroly	RR-SM rýchla progresia / kontroly	SP-SM / kontroly	RR-SM rýchla progresia / RR-SM pomalá progresia	SP-SM / RR-SM pomalá progresia	SP-SM / RR-SM rýchla progresia
Sérotransferín		***	*			**
Alfa-1-antitrypsín	*	*				
Haptoglobín		*	*	**		
Dynamínu-1 podobný proteín			*			
Apolipoproteín A-IV				**		*
Apolipoproteín A-I			**	*		
Leucín-bohatý alfa-2-glykoproteín				*		
Glycín N-acyltransferáza			*			
Centrozómový proteín 19 kDa	**				*	

Farebná škála kvantitatívnej zmeny expresie:

< 0,6	0,6 – 1,5	1,5 - 3	3 - 5	nad 5
-------	-----------	---------	-------	-------

Naše výsledky svedčia o možnosti definovať rozdiely v proteínových profiloch krvného séra u pacientov a kontrolných jedincov, tiež rozdiely medzi klinickými formami SM a rýchlosťou progresie. Zistili sme zmeny expresie u proteínov s rôznymi funkciami pre metabolické dráhy a s potenciálnym významom pre patogenézu SM, napríklad zvýšenú expresiu proteínu akútnej fázy, alfa-1-antitrypsínu, ktorá bola špecifická pre relaps-remitujúcu formu SM. Zvýšenie hladiny expresie tohto proteínu v likvore RR-SM pacientov preukázala tiež štúdia [9]. Tento jav môže byť spojený s narušením funkcií hematoencefalickej bariéry a poukazuje na nevyhnutnosť simultánnej analýzy krvného séra a likvoru pacienta. Zníženie hladiny expresie apolipoproteínu A-I u sekundárne-progresívnej formy SM je v súlade so štúdiou [10] a poukazuje na tento proteín ako kandidátneho pre ďalšie štúdium z hľadiska jeho dokázaných protizápalových účinkov a všeobecnej dysregulácie metabolizmu lipidov u SM a tiež jeho aplikácie ako potenciálneho biomarkera [11].

Vzhľadom na komplexnú povahu SM sa predpokladá, že neexistuje žiadny proteín alebo peptid, ktorý by mohol slúžiť ako robustný a klinicky relevantný biomarker [12]. Proteínový profil krvného séra a likvoru ako celok však identifikuje individuálny vzor jednotlivých proteínov, ktoré samostatne nie sú spoľahlivými ukazovateľmi stavu choroby ale ako komplexný obraz reprezentujú maticu s potenciálnym prognostickým významom [13]. Vytvárajú sa tak nové možnosti pre ciele výskum patológie mozgového tkaniva sklerotických lézií a pochopenie etiopatogenézy SM. Získané poznatky môžu byť po verifikácii translatované do kliniky a potenciálne užitočné pre diagnostický proces, monitoring progresie, účinnosti nasadenej liečby a utvorenie základu personalizovanej terapie u pacientov s SM.

Záver

Aplikovanie proteomického prístupu umožňuje analýzy proteínov rôznych typov vzoriek. Naša pilotná štúdia u pacientov s SM preukazuje jeho využiteľnosť pre komplexnú profilizáciu krvného séra a určenie proteínov s odlišnou expresiou medzi jednotlivými klinickými typmi ochorenia, čo môže slúžiť ako ukazovateľ progresie. Následný skrining likvoru, porovnanie profilov a identifikácia kandidátnych znakov ochorenia sú kľúčové pre pochopenie molekulových mechanizmov neurologických ochorení, medzi ktoré patrí aj *sclerosis multiplex*, a ďalšie štúdium potenciálnych molekulových parametrov na tkanivovej úrovni.

Táto práca bola podporená projektom APVV 15 -0107 a "Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení", ITMS kód projektu: 26220220153, spolufinancovanými zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Mahad, *Lancet Neurol.* **2015**, 14: 183-193.
- [2] Olsson, *Nat Rev Neurol.* **2017**, 13: 25-36.
- [3] Hagemeyer, *Histol Histopathol.* **2012**, 27: 277-287.
- [4] Roxburgh, *Neurology.* **2005**, 64: 1144-51.
- [5] Szilasiová. *Lekárske Listy*, **2014**, 09.10.2014.
- [6] Katsavos, *Mult Scler Int.* **2013**, 340508.
- [7] Del Boccio, *Proteomics Clin Appl.* **2016**, 10: 470-484.
- [8] Farias, *Proteomics*, **2014**, 14: 467-80.
- [9] O'Connor, *Dis Markers.* **2006**, 22: 213-225.
- [10] Meyers, *J Neuroimmunol.* **2014**, 277: 176-185.
- [11] Hyka, *Blood*, **2001**, 97: 2381-2389.
- [12] Tremlett, *J Proteomics*, **2015**, 118: 2-11.
- [13] Romeo, *Expert Rev Proteomics*, **2005**, 2: 57-70.

Úloha NO a nitrácie bielkovín v procese ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu

Tatarková, Z.¹, Kovalská², M., Onteková, M.¹, Adamkov, M.², Račay, P.¹, Kaplán, P.¹

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

Abstract

Several pathologies of the cardiovascular system are associated with nitric oxide, superoxide-derived oxidants or alteration in the antioxidant detoxification pathways that lead to nitro-oxidative stress. One of the most important consequences at the biochemical level is the nitration of protein tyrosines. Proteins nitrated at tyrosine residues were detected in various cellular compartments. In the present investigation we focused our attention to changes on the level of mitochondria in hearts from adult male Wistar rats. Nitric oxide is one of the biological molecules that can out compete superoxide dismutase for superoxide and produce peroxynitrite. This process is faster than dismutation and led to the 11-fold higher production of nitrotyrosine in IR group. Distribution of 3-nitrotyrosine positive cells was predominantly within the cytoplasm of histologically normal tissue but with higher intensity and colocalization in the nuclei after IR injury. All this suggest development of nitrative stress during reoxygenation phase. Moreover, 12 proteins were identified to be affected by nitration during IR. ATP synthase subunit beta was only one more nitrated after IR when compared to the control. Therefore selective nitration of proteins from the oxidative phosphorylation system at the beginning of reperfusion may contribute to the suppression of oxygen consumption and other pathological consequences.

Key words: ischemia-reperfusion injury, heart mitochondria, nitration

Úvod

Ischemicko-reperfúzne poškodenie je komplexný patofyziologický proces, ktorý zodpovedá za orgánové poškodenie u širokej skupiny klinických stavov, ako napr. infarkt myokardu, zlyhanie srdca. Oxid dusnatý (NO) syntetizovaný z L-arginínu účinkom NO syntázy (endoteliálna-eNOS, indukčná-iNOS a neuronálna-nNOS), je hlavným prispievateľom regulácie normálnej homeostázy v kardiovaskulárnom systéme spolu s mnohými vazoprotektívnymi funkciami [1]. Fyziologické hladiny •NO produkované endoteliálnou NO syntázou, sú hlavnými determinantmi endotelium-závislej relaxácie a regulátorom cievneho tonusu. Okrem toho, •NO inhibuje adhérenciu a agregáciu krvných doštičiek, redukuje adhérenciu leukocytov k endotelu, potláča proliferáciu a diferenciáciu buniek na stenách ciev [2]. Naopak zníženie produkcie •NO alebo jeho účinku predisponuje krvné cievy k poškodeniu. V počiatočnom štádiu IR poškodenia zvýšený vstup vápnika do buniek endotelu vedie k aktivácii eNOS spojennej so vzostupom hladiny NO. Následne spotrebovaný L-arginín aktivuje uncoupling eNOS, čím stabilizuje eNOS-sprostredkovanú tvorbu NO [3]. Hoci nárast exprese iNOS bol jednoznačne dokázaný počas IR poškodenia, produkcia NO je závislá od kyslíka a počas ischemie môže byť funkcia iNOS oslabená. Niektoré štúdie dokázali škodlivý účinok podávania inhibítorov NO syntázy, čo viedlo k predpokladu, že endogénne vytvorený NO má protektívny účinok počas IR poškodenia [4] a zníženie jeho biologickej dostupnosti je spojené s nespočetným

množstvom kardiovaskulárnych chorobných stavov. Exogénne podávanie NO agensov redukovalo účinky IR poškodenia myokardu na zvieracích modeloch ale nie je známy efekt u ľudí. Navyše je tu aj možnosť škodlivých účinkov exogénne podávaného NO, napr. peroxynitritom stimulovaná apoptóza [4]. Tieto protichodné teórie iba potvrdzujú, že doposiaľ nie je jednoznačne definovaná úloha NO v procese IR poškodenia myokardu.

Superoxidový aniónový radikál je primárne produkovaný mitochondriami, NAD(P)H oxidázou, xantínoxidázou, pričom jeho hlavnými miestami produkcie v KVS systéme sú bunky endotelu, hladkého svalstva a kardiomyocyty [2]. Tento môže spolu s inými reaktívnymi formami kyslíka (ROS) atakovať tyrozínové zvyšky bielkovín za vzniku tyrozylových radikálov. Po ataku reaktívnych foriem dusíka (RNS), najmä nekontrolovaná nadprodukcia oxidu dusnatého vedie k vzniku peroxynitritového aniónu (ONOO^-), ktorý po interakcii s tyrozylovými radikálmi produkuje nitrotyrozíny. Na biochemickej úrovni je nitrácia tyrozínových zvyškov bielkovín sprostredkovaná jednou z dvoch relevantných dráh v podmienkach *in vivo*: peroxynitrit- a hemperoxidáza-závislej dráhy. Experimenty využívajúce izolovaný sval srdca poukazujú na dysfunkciu srdca v spojitosti so zvýšenou tvorbou ONOO^- počas hypoxie a reoxygenácie, pričom inhibícia NO viedla k zníženiu peroxynitritom-sprostredkovanej nitrácii a zmiernila hyperoxygénáciu v postischemickom srdci [5]. Administrácia mimetik Mn-superoxiddizmutázy potlačila tvorbu ONOO^- a mala protektívny účinok na srdce vystavené IR poškodeniu [6]. Práve kompetícia medzi MnSOD a NO o superoxid je jedným z možných limitujúcich faktorov rozhodujúcich o osude buniek srdca v procese ischemie a reperfúzie.

Možnosť reverzibilnej nitrácie, a teda či denitračný komplex skutočne pracuje za podmienok *in vivo*, stále nie je objasnené [7]. Preto sa predpokladá, že bielkoviny oxidované RNS nie sú vo zvýšenej miere akumulované počas fyziologického starnutia v srdci. Navyše bola dokázaná určitá miera selektivity s ohľadom na špecifické funkčné domény modifikovaných bielkovín. Je dokázané, že nitrácia bielkovinových tyrozínov je vysoko dynamický a selektívny proces a nejedná sa len o náhodne sa vyskytujúci dej [8]. S využitím proteomických štúdií sa postupne zvyšuje množstvo identifikovaných nitráciou ovplyvnených bielkovín pri najrôznejších typoch ochorení. Preto cieľom našej práce bolo sledovať primárne ciele nitrácie na úrovni tkaniva i individuálnych bielkovín v mitochondriách srdca vystavenému IR poškodeniu.

Materiál a metódika

Pre naše experimenty sme použili srdcia dospelých, 6-mes potkanov kmeňa Wistar ($n=6$ /skupinu), ktoré boli rozdelené na kontrolnú (KON) skupinu srdc (perfundovaná podľa Langendorffa 65 minút), ischemickú skupinu sme vystavili 20-min. globálnej ischemii a IR skupinu s 30-min. reperfúziou. Následne sme srdcia spracovali a uskladnili na -70°C (Western blotting, Imunodetekcia, Hmotnostná spektrometria UTX MALDI-TOF, Bruker) a v 4% paraformaldehyde (imunohistochemická analýza). Výsledky sme vyhodnotili programom GrafPhad InStat V3.01 a Student-Neuman-Keulsovho testu, kde hladina $p<0,05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

Výsledky a diskusia

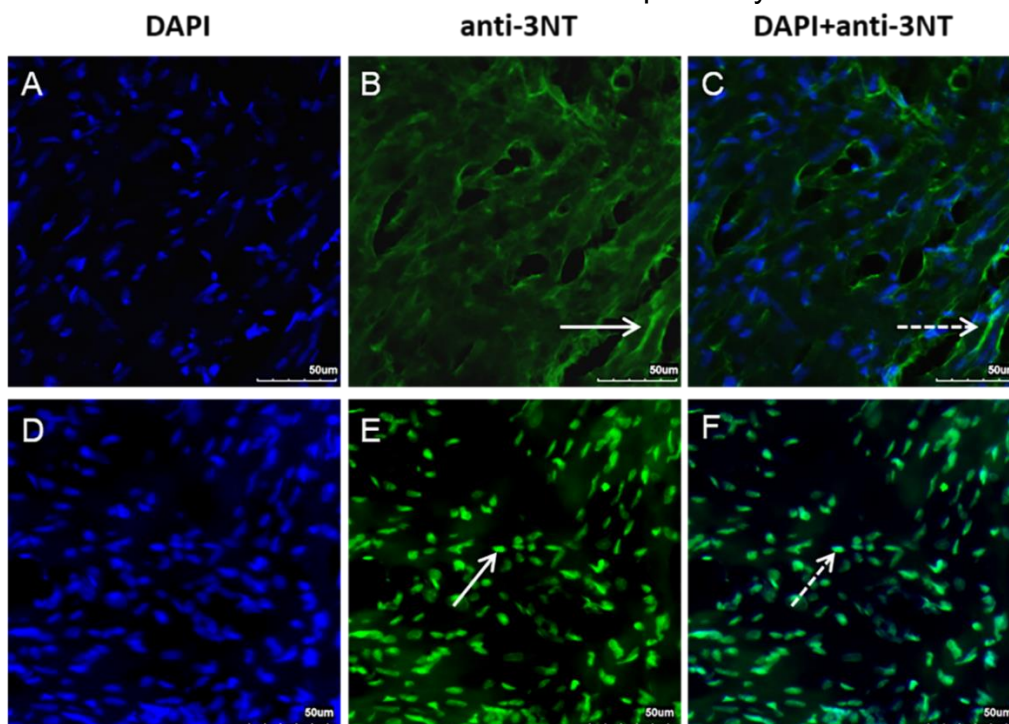
Mnohé patologické zmeny tkaniva myokardu sa spájajú so zvýšenou produkciou NO a/alebo od superoxidu odvodených oxidantov, resp. narušením antioxidačnej ochrany vedúcej k nitro-oxidačnému stresu. Nitrácia tyrozylových zvyškov je sprostredkovaná RNS, vzostup ktorých je výsledkom nadprodukcie NO. Tento po

reakcii so superoxidom produkuje ONOO^- a po jeho adícii na tyrozínové zvyšky vzniká 3-nitrotyrozín. V našom modeli globálnej IR srdca sme pozorovali masívny až 11-násobným nárast($***p<0,05$)obsahu 3-nitrotyrozínov po znovuoobnovení prietoku koronárnou tepnou v porovnaní s KON skupinou (Tabuľka1).

Tab. 1 Obsah produkovaných 3-nitrotyrozínov v tkanive srdca po IR poškodení.

	Obsah Nitrotyrozínov ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ bielkovín)
KON	$0,935 \pm 0,053$
ISCH	$1,764 \pm 0,306$
IR	$11,441 \pm 1,119$

Toto poukazuje na prítomnosť obrovského množstva buď peroxynitritového aniónu alebo s ním súvisiacich oxidantov obsahujúcich dusík, čím dochádza k rozvoju nitračného stresu v reperfúznej fáze sprevádzanej hyperoxygénáciou [5].Aplikáciu špecifickej protilátky proti 3-nitrotyrozínom priamo na tkanivové rezy srdca sme pozorovali množstvo i distribúciu/kolokalizáciu 3NT-pozitívnych buniek.

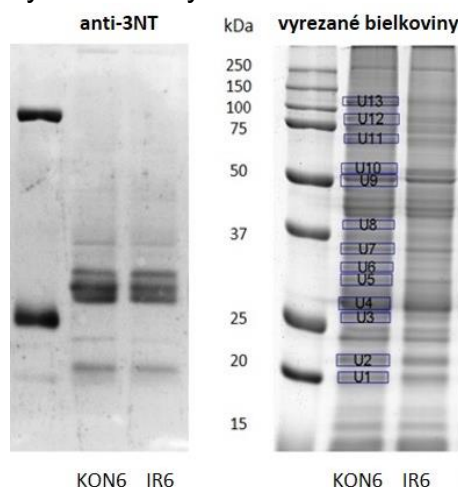


Obr.1 Imunohistochemická analýza 3NT-pozitívnych buniek na rezoch tkaniva myokardu v kontrolnej (A-C) a IR skupine (D-F); Šípky označujú 3NT pozitivitu (zelená) a jadrá kardiomyocytov sú označené DAPI (modrá). Dĺžka úsečky zodpovedá 50 μm .

Prevládajúcu cytoplazmatickú pozitivitu anti-3NT značených kardiomyocytov (Obr.1B-C) sme pozorovali v histologicky normálnom tkanive. Na druhej strane v skupine vystavenej IR poškodeniu (Obr.1E) intenzita a počet pozitívnych buniek sa zvýšil s prevládajúcou pozitivitou v jadrách (Obr.1F) buniek srdca potkanov, o čom svedčí kolokalizácia s DAPI-značenými jadrami kardiomyocytov.

Nitrácia špecifických bielkovín bola identifikovaná pri viac ako 50 poruchách, a preto sme si s využitím imunodetekcie a špecifickej protilátky označili nitráciou pozmenené bielkoviny v mitochondriách srdca (Obr. 2).S využitím hmotnostnej spektrometrie sme vybraných 12 bielkovín identifikovali. Išlo o podjednotky komplexu I dýchacieho

reťazca (1beta podjednotka 10; 39kDa, 42kDa a 75kDa podjednotka), ktoré potvrdili aj iné štúdie [9]. Ďalej ATP syntáza (F0 komplex podjednotka B1 a podjednotky O, beta a alfa) publikované [10], malátdehydrogenáza [11], kreatínkináza S-typ [12] a CoA ligáza 6 masných kyselín s dlhým reťazcom.



Obr. 2 Schopnosť naviazania sa anti-3NT na bielkoviny a 1D profil vybraných nitrovaných bielkovín mitochondrií na hmotnostnú analýzu

Ako možno vidieť z výsledkov, ide o podjednotky, resp. enzýmy s dominantným zastúpením a úlohou v mitochondriách. Navyše iba v prípade ATP syntázy podjednotky beta sme zaznamenali 21% vzostup nitrácie po IR, čo ovplyvňuje aktivitu i schopnosť syntézy ATP, keďže beta podjednotka je jej miestom. Zatiaľ boli identifikované 2 miesta nitrácie beta podjednotky na Tyr³⁴⁵ a Tyr³⁶⁸ [10].

Záver

Oxid dusnatý potláča proliferáciu a diferenciáciu buniek na stenách ciev, pričom jeho nedostatok zvyšuje riziko ich poškodenia. V reperfúzne fáze sprevádzanej hyperoxygéniáciou dochádza k rozvoju nitračného stresu vedúceho k apoptóze alebo k stimulácii selektívnej nitrácie bielkovín mitochondrií s možným dopadom na funkciu a prežívanie kardiomyocytov po IR, s dôrazom na reoxygenačno-kompenzačné mechanizmy s možným vývojom terapeutických postupov postischemického srdca.

Táto práca bola podporená projektom "Kompetenčné centrum pre výskum a vývoj v oblasti diagnostiky a terapie onkologických ochorení", ITMS kód projektu: 26220220153, spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja a projektom VEGA1/0129/14.

Literatúra

- [1] Ferdinandy, *Br J Pharmacol.* **2003**, 138: 532-543.
- [2] Peluffo, *Cardiovasc Research.* **2007**, 75: 291-302.
- [3] Kietadisorn, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2012**, 302: 481-495.
- [4] Roberts, *Shock.* **2013**, 39: 229-239.
- [5] Wang, *J Biol Chem.* **1996**, 271: 29223-29230.
- [6] Liu, *Biochim et Biophys. Acta.* **2009**, 1794: 476-485.
- [7] Shao, *J Mol Cell Cardiol.* **2012**, 52: 550-558.
- [8] Zhan, *Anal Biochem.* **2006**, 354: 279-289.
- [9] Chinta, *Free Radic Res.* **2011**, 45: 53-58.
- [10] Haynes, *Am J Physiol.* **2010**, 298: E978-E987.
- [11] Kawasaki, *Free Radic Biol Med.* **2011**, 50: 419-427.
- [12] Nuss, *Aging (Albany NY).* **2009**, 1: 557-572.

Zhodnotenie počtu eozinofilov v modeli eozinofilnej ezofagitídy

Brozmanová M.^{1,2}, Holešová Z.², Mazúrová L.², Hennel M.²

¹BioMed JLF UK v Martine, ²Ústav patologickej fyziológie, JLF UK v Martine
brozmanova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Eosinophilic esophagitis is an immune-mediated disease characterized by esophageal eosinophilia and symptoms (dysphagia, heartburn, chest and abdominal pain, vomiting, or food impaction) related to esophageal sensory and motor neural dysfunction.

We aimed to establish a model of eosinophilic inflammation in the esophagus for the study of the inflammation-induced changes in the esophageal nerves using various routes of administration of ovalbumin antigen. The animals were sensitized by ovalbumin (10mg/kg, i.p.) and three weeks later sensitized animals either inhaled ovalbumin (0.3%) for several days (8, 15 or 20 days, respectively) or received injection of ovalbumin into the surgically exposed cervical esophagus. The middle portion of the esophagus was harvested and the eosinophils were evaluated in transversal esophageal sections (12µm) by using Giemsa staining.

Repeated inhalations of ovalbumin (8, 15 or 20 days) in ovalbumin-sensitized animals failed to evoke consistent eosinophilic infiltration of esophageal mucosa averaging 0-1 eosinophils per high power field (hpf) (n=3, 7 and 2 animals, respectively). In contrast OVA injection into the esophageal wall in sensitized animals resulted in vigorous eosinophil infiltration of esophageal mucosa (140±24 eosinophils per hpf, n=6, p<0.05) on day 2 following the injection. The eosinophils were located predominantly in the subepithelial layers but were also found in the epithelium (99±16 vs. 41±10 eosinophils per hpf).

We conclude that the injection of the ovalbumin antigen into the esophagus of sensitized guinea pigs is effective approach to induce massive eosinophilic infiltration of esophageal mucosa. This model proves useful for those studying eosinophilic inflammation-induced changes in the esophagus.

Key words: ovalbumin, eosinophilic esophagitis, eosinophils, guinea pigs

Úvod

Eozinofilná ezofagitída (EE) so stúpajúcou incidenciou a prevalenciou je chronické imunitné zápalové ochorenie charakterizované infiltráciou eozinofilov v pažeráku, čo vyvoláva poruchy funkcie pažeráka s typickými klinickými príznakmi ako sú poruchy príjmu potravy, dysfágia, dyspepsia, nekardiálna bolesť na hrudníku [1-2]. Spoločným znakom týchto symptómov je porucha funkcie pažerákových senzorických a motorických nervových dráh.

Je preukázaná asociácia medzi eozinofilmi a enterickým nervovým systémom, ktorý prispieva k patogenéze ochorenia. *In vitro* štúdie ukázali vplyv eozinofilov na aktiváciu nervov, vrátane nervovej remodelácie so zvýšením počtu adhézných molekúl, muskarínových M2 receptorov a zvýšením produkcie nervového rastového faktora [3]. Jedným z rozhodujúcich diagnostických kritérií je nález eozinofilného infiltrátu v sliznici pažeráka s výskytom minimálne 15 eozinofilov na jedno vysokorozlišovacie pole (>15 eo/HPF) z proximálneho a distálneho segmentu pažeráka [4-5].

Pretože našim hlavným cieľom bolo prispieť k pochopeniu molekulárnych

mechanizmov viscerálnej bolesti pri eozinofilnej ezofagitíde, v prvej fáze našich štúdií sme sa sústredili na vyvinutie a optimalizáciu modelu akútneho alergického zápalu pažeráka a na histologické potvrdenie eozinofilného infiltrátu v sliznici pažeráka morčatá. Na základe literárnych údajov na zvieracom modeli sme predpokladali, že opakovaná inhalácia alergénu ovalbumínu vyvolá významnú eozinofilnú infiltráciu [6-7].

Materiál a metodika

V experimentoch boli použité morčatá Dunkin Hartley (samce, 250-300g, Oddelenie chovu laboratórnych zvierat ÚEF SAV Dobrá Voda). Všetky štúdie boli schválené podľa platnej legislatívy.

Senzibilizácia a inhalácia ovalbumínu

Zvieratá boli senzibilizované antigénom ovalbumínom (OVA, Sigma, 10mg/kg, i.p.) 3x po sebe v dvojdňových intervaloch. Senzibilizácia bola potvrdená pozitívnym kožným testom. Po troch týždňoch senzibilizované zvieratá inhalovali ovalbumín (0.3% OVA) počas 5 minút v rôznych časových intervaloch (8, 15 alebo 20 dní).

Senzibilizácia a injekcia ovalbumínu

V druhom usporiadaní experimentov zvieratá boli rovnako senzibilizované intraperitoneálnym podaním ovalbumínu ako predchádzajúca skupina zvierat, po týždni od posledného podania OVA zvieratá boli anestetizované (ketamín 50mg/kg /xylazín 2,5mg/kg), následne im bola vykonaná chirurgia krčného pažeráka, kde sme injikovali 0,1% ovalbumín (20 μ l). Zvieratá sme postupne usmrtili inhaláciou CO₂ po 48 hod, potom po 5, resp. 14 dňoch. Kontrolným zvieratám bol aplikovaný fyziologický roztok za rovnakých podmienok.

Histologická analýza bioptických vzoriek a hodnotenie počtu eozinofilov

V prvej fáze modelovania akútneho alergického zápalu sme sa sústredili na hodnotenie eozinofilov s použitím štandardného spracovania histologického materiálu. Histologické rezy boli farbené podľa Giemsu a hodnotené v svetelnom mikroskope. Hodnotili sme maximálny počet eozinofilov (peak) v najväčšom zornom poli (HPF) analyzovaný v 10-12 zorných poliach pri objektíve 40x.

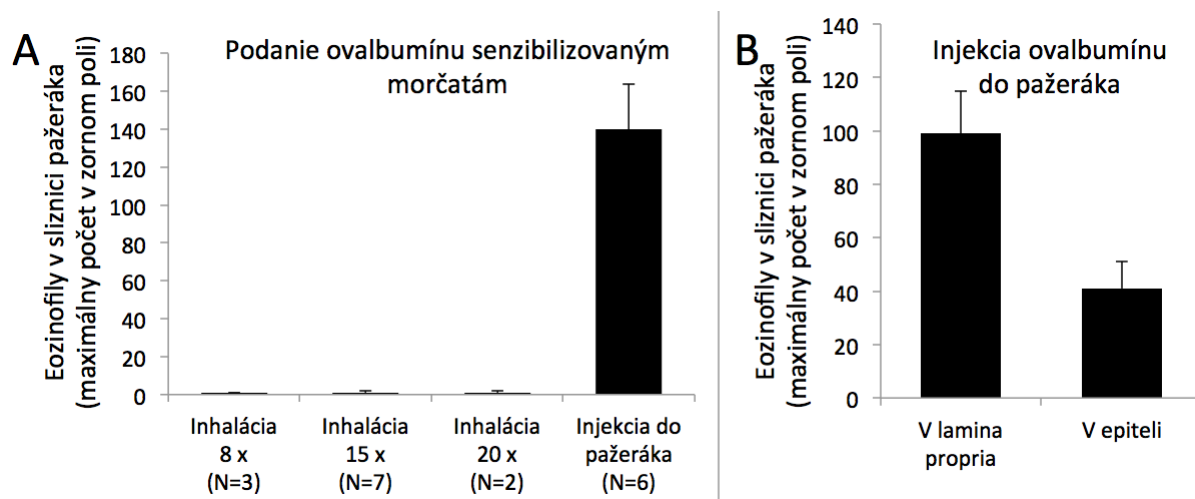
Štatistická analýza

Výsledky sme hodnotili ako priemer \pm SEM a na porovnávanie boli použité tieto štatistické analýzy: two-way ANOVA a náležitý t-test. Za štatisticky významný rozdiel bol považovaný $p < 0,05$.

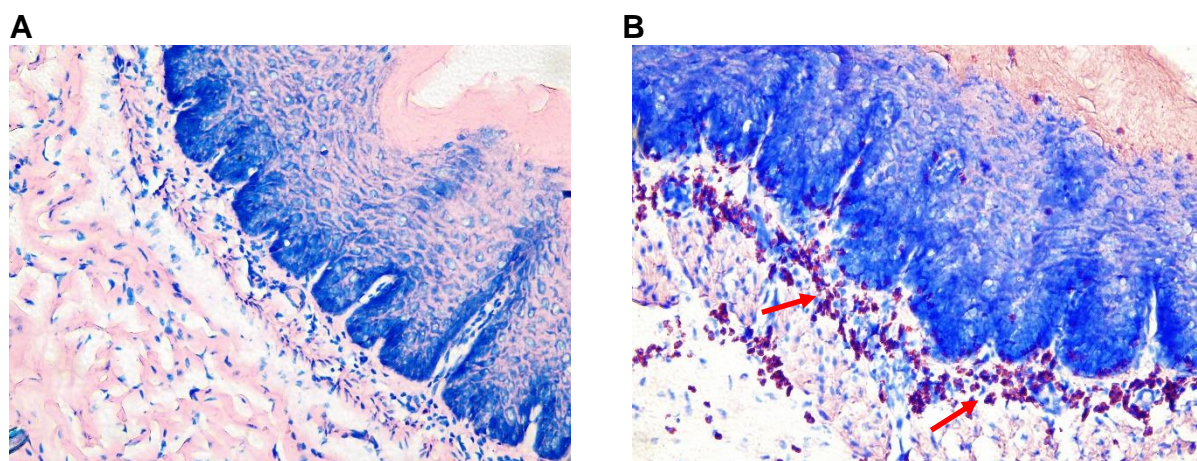
Výsledky a diskusia

V prvom usporiadaní experimentov sme zistili, že inhalácia ovalbumínu nevyvoláva eozinofilnú infiltráciu v pažeráku u senzibilizovaných zvierat počas rôznej dĺžky expozície OVA. Prítomnosť eozinofilov bola len zriedkavá (0-1/HPF), dokonca ani 20x opakovaná inhalácia nevyvolala infiltráciu eozinofilov (Obr. 1A). Na rozdiel od inhalácie, injekcia OVA do krčnej steny pažeráka viedla k masívnej infiltrácii eozinofilov v sliznici nielen v krčnej ale aj v strednej časti pažeráka senzibilizovaných zvierat. Maximálny počet eozinofilov bol v priemere 140 ± 24 /HPF ($n=6$, $p < 0,05$) pozorovaný po 48 hod od injekcie ovalbumínom (Obr. 1A). Eozinofily boli hlavne lokalizované v subepitelovej vrstve v porovnaní s epitelom pažeráka (99 ± 16 vs.

41±10/HPF, $p<0,05$), čo ilustruje obrázok (Obr. 1B, 2B) s výraznou eozinofilnou infiltráciou v porovnaní s normálnou sliznicou pažeráka (Obr. 2A).



Obr. 1 (A) Maximálny počet eozinofilov v zornom poli v stene pažeráka s vysokým zväčšením (400x) po opakovaných inhaláciách a pažerákovej injekcii OVA u senzibilizovaných morčiat. (B) Distribúcia eozinofilov v lamina propria a epiteli po pažerákovej injekcii OVA ($n=6$) (mean±SEM).



Obr. 2 Eozinofilný infiltrát sliznice v strednej časti pažeráka po injekcii alergénu do krčnej časti v pažeráka (B) v porovnaní s normálnou sliznicou (A) pri 200x zväčšení.

Aj keď etiológia a patogenéza eozinofilnej ezofagitídy nie je úplne jasná, predpokladá sa, že ide o alergické zápalové ochorenie, často označované aj ako "astma pažeráka" [8] a vo väčšine prípadov má progresívny priebeh [9-10]. Dôsledkom chronického zápalu sú fibrotické zmeny pažeráka, ktoré vedú k dysfágii a častým epizodám uviaznutia sústa potravy [11]. Literárne údaje uvádzajú, že viscerálna hypersenzitivita je hlavným charakteristickým znakom pacientov s funkčnou poruchou pažeráka [12]. Keďže symptómy EE sú spojené s viscerálnou bolesťou, perspektívne sme hľadali model na štúdium aferentných nervov relevantný pre viscerálne ochorenia.

Použili sme rozdielne metodiky modelovania zápalu u senzibilizovaných zvierat, jednak inhalačne v bdelom stave, ako aj lokálne podanie ovalbumínu priamo do steny pažeráka u anestézovaných zvierat.

V prvej fáze modelovania akútneho eozinofilného zápalu sme sa sústredili hlavne na histomorfologické nálezy a našim cieľom bolo maximalizovať alergický zápal a následne študovať neuroplastické zmeny vágových aferentných nervov. Zistili sme, že na rozdiel od inhalácie OVA, kde boli prítomné eozinofily v sliznici pažeráka len raritne, OVA injekcia vyvolala masívnu infiltráciu eozinofilov v subepitelovej a epitelovej vrstve pažeráka s kulmináciou po 48 hodinách od podania injekcie. Preto tento interval sa ukazuje najvhodnejší pre študovanie mechanosenzitívnych a chemosenzitívnych zmien vágových nociceptívnych nervových dráh v zmysle hypersenzitivity a hyperreaktivity.

Záver

Injekcia antigénu ovalbumínu do pažeráka senzibilizovaným zvieratám vyvoláva akútny eozinofilný zápal, ktorý je efektívny na indukciu masívnej eozinofilnej infiltrácie v mukóze pažeráka. Tento model je vhodný na analýzu eozinofilného zápalu ako aj neuroplastické zmeny aferentných nervov inervujúcich pažerák.

Finančná podpora: BioMed Martin (ITMS: 26220220187) a VEGA 1/0070/15

Literatúra

- [1] Dellon, *Gastroenterol Clin N Am.* **2013**, 42: 133–153.
- [2] Abonia, *Annu Rev Med.* **2012**, 63: 421–34.
- [3] Zuo, *Immunol Allergy Clin North Am.* **2007**, 27/3: 443–455.
- [4] Wen, *Gastroenterology.* **2013**, 145/6: 1289-1299.
- [5] Nielsen, *Am J Gastroenterol.* **2014**, 109/4: 515-520.
- [6] Hu, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2014**, 307/2: G149-57.
- [7] Mishra, *J Clin Invest.* **2001**, 107/1: 83-90.
- [8] Virchov, *Dig Dis.* **2014**, 32/1-2: 54-60.
- [9] Abonia, *Annu Rev Med.* **2012**, 63: 421–34.
- [10] Markowitz, *Clin North Am.* **2003**, 32: 949-966.
- [11] Furuta, *Aliment Pharmacol Ther.* **2006**, 24: 173-182.
- [12] Remes-Troche, *Curr Gastroenterol Rep.* **2010**, 12: 417-426.
- [13] Kollarik, *Pulm Pharmacol Ther.* **2009**, 22/2: 130-4.
- [14] Brozmanova, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2016**, 310: G215–G223.

Komplexná manifestácia Marfanovho syndrómu u dospelého muža

Marčeková, M.¹, Marček, J.², Mellová, Y.¹, Neščáková, E.³

¹Ústav anatómie JLF UK v Martine, ² Očná klinika JLF UK v Martine, ³ Katedra antropológie PvF UK v Bratislave
marcekova@jfmmed.uniba.sk

Abstract

The authors present a case report of an adult man with a complete manifestations of Marfan syndrome. Marfan Syndrome is a connective tissue disorder caused by a mutation of the FBN1 gene on the chromosome 15. Connective tissue provides strength and flexibility to different structures throughout the body. The disorder affects most organs and tissues, especially lungs, eyes and heart. People with Marfan syndrome are very tall and thin, arms, legs, fingers and toes are too long for the rest of the body. Hypermobility joints can be dislocated. Spine may be curved and breast bone excavated (Pectus excavatus). Long narrow face is higher than normal, the roof of mouth forms the pointed arch. The dilation of aorta, aortic dissection and mitral valve prolapse are the common finding.

Disability of respiratory system often ends by restriction of respiratory tract. Ectopia lentis can be present in the eyes.

We present an adult man with the arachnodactyly, coxarthrosis, pectus excavatus and Dupuytren's contracture on both hand. The aortic dilatation, dissection of aorta, mitral valve prolapse and venous insufficiency were detected. The pseudopterygium on the left eye was found.

Key words: Marfan syndrome, Dupuytren's contracture, pseudopterygium

Úvod

Autori predkladajú kazuistiku dospelého muža, u ktorého možno pozorovať komplexnú manifestáciu Marfanovho syndrómu.

Marfanov syndróm je porucha spojivového tkaniva, ktorá je spôsobená mutáciou génu FBN1 na 15. chromozóme. Toto ochorenie postihuje viaceré orgány a tkanivá, najviac bývajú postihnuté pľúca, oči a srdce. Postihnutí sú veľmi vysokí, horné a dolné končatiny a tiež prsty sú oproti zvyšku tela nepomerne dlhé. Hypermobilné kĺby môžu byť dislokované, chrbtica býva pokrivená a sternum vpáčené (Pectus excavatus). Tvár je úzka a dlhá, podnebie vytvára gotický oblúk [3]. Obvyklým nálezom býva dilatácia aorty, aorta dissecans a prolaps mitrálnej chlopne. Postihnutie respiračného systému často končí reštrikciou dýchacích ciest rôzneho stupňa. U očí možno pravidelne pozorovať Ektopiu lentis, občasným nálezom býva Coloboma lentis.

Materiál a metodika

Dospelý muž s Marfanovým syndrómom, pravidelne prichádzajúci na očné oddelenie Martinskej univerzitnej nemocnice pre recidivujúce pseudopterygium na ľavom oku. Po konzultácii boli so súhlasom pacienta urobené fotografie fotoaparátom Olympus.

Výsledky

Dospelý, 191cm vysoký muž, vážiaci 68 kg, s početnými klinickými prejavmi Marfanovho syndrómu. Hrudník je deformovaný asymetrickým Pectus excavatus. Už viac ako tridsať rokov sa objavujú spontánne pneumothoraxy striedavo na pravej aj na ľavej strane. Jazvy na koži hrudníka svedčia o mnohonásobných operáciách. Recidivujúce pneumothoraxy kombinované s pľúcnym emfyzémom viedli ku stredne ťažkej reštrikcii dýchacích ciest, dýchanie sťažuje aj deviatio septi nasi.

Arachnodactýlia je prítomná obojstranne, malé kĺby sú hypermobilné a artrotické, interfalangeálne kĺby sú vo flekčnom postavení. Palmárne aponeurózy obidvoch rúk sú stiahnuté Dupuytrénovými kontraktúrami. Pre viacnásobné a často sa opakujúce recidívy bol pacient rehospitalizovaný v rôznych nemocniciach a riešený operačne. Napriek tomu aj po opakovaných fascietómiách sú prsty ľavej ruky stále vo flekčnom postavení, pričom najmenej je ohnutý druhý prst a najviac piaty prst (obr. 1).

V anamnéze nachádzame informáciu o prolapse mitrálnej chlopne, o recidivujúcich inguinálnych herniách a o operácii hiátovej hernie. Na nohách pozorujeme pes excavatus et plantus. Obidva palce sú vo valgóznom postavení, na predkolení vidno dôsledky venózneho insuficiencie (obr. 2)

Po keratotómii sa u postihnutého vyskytujú recidívy pseudopterygia na obidvoch očiach. Pravé oko sa podarilo vyliečiť aplikáciou Avastinu, ľavé oko je ešte stále v liečbe (obr. 3).



Obr.1 Dupuytrénova kontraktúra na ľavej ruke



Obr. 2 Klinický obraz venózneho insuficiencie na dolných končatinách



Obr.3 Pseudopterygium na ľavom oku.

Diskusia

Marfanov syndróm je ochorenie so značnou morbiditou a mortalitou. Toto ochorenie postihuje 6-8% populácie [3].

Dupuytrénova kontraktúra je progresívne ochorenie, ktoré spôsobuje skrátenie a zhrubnutie ligament, ktoré sa upínajú do palmárnej fascie. Ochorenie začína tvorbou tuhých uzlov na dlani a pomaly progreduje do kontraktúry prstov ruky. Flekčný uhol sa objaví najprv v metakarpofalangeálnych kĺboch, potom pokračuje do proximálnych interfalangeálnych kĺbov. Obojstranné postihnutie je bežné, jedna ruka býva postihnutá ťažšie ako druhá, avšak výraznejšie postihnutie nezodpovedá dominantnej ruke [5]. Ochorenie častejšie postihuje mužov nad 40. rokov a progreduje u nich rýchlejšie ako u mužov nad 50. rokov [4].

Pseudopterygium je vzácné ochorenie oka, ktoré je sprevádzané nadmerným rastom spojovkovej membrány, s adhézou na ktoromkoľvek kvadrante rohovky [1].

Toto ochorenie môže byť dôsledkom periférneho vredu rohovky, konjunktivitídy, alebo chemického popálenia, ale môže sa tiež objaviť ako následok chronického mechanického dráždenia kontaktnými šošovkami pri žmurkaní, v spojitosti s nedostatočnou lumbrikáciou povrchu rohovky [7]. Gagnon a kol. [2] popisujú prvý prípad vzniku pseudopterygia po popálení oka vajcom prehriatym v mikrovlnnej rúre.

Thapa a kol. [8] uvádzajú prípad 14 ročného dievčaťa s Marfanovým syndrómom s Coloboma lentis na pravom oku a s Ektopiou lentis na ľavom oku.

Coloboma lentis je vrodená chyba šošovky, pri ktorej je poškodený jej okraj a stráca sa hmota šošovky, tvar však ostáva nezmenený. Okraj defektu môže byť rovný, odsadený, zakrivený alebo vyčnievajúci. Pri Ectopia lentis subluxovaná šošovka vytvára dojem defektu, ale jej okraj je neporušený [6].

Záver

Pre často sa opakujúce recidívy uvedených symptómov je prezentovaný pacient dlhoročný invalidný dôchodca.

Literatúra

- [1] Georghe, *Rom J Ophthalmol.* **2016**, 60/1: 2-5.
- [2] Gagnon, *Eye Contact Lens.* **2005**, 31/3: 109-110.
- [3] Groth, *OJRD.* **2015**, 10: 153.
- [4] Gudmundsson, *Scand J Rheumatol.* **2001**, 30: 31-34.
- [5] Hart, *Postgrad Med J.* **2005**, 81: 425-428.
- [6] Rones, *Arch. Ophthalmol.* **1930**, 4/2: 174-179.
- [7] Roze, *VOP.* **2001**, 4/3: 171-174.
- [8] Thapa *BMJ Case Rep.* **2014**, doi: 10.1136/bcr-2014-207112.

Akupunkturní dráha LI

Durdáková, R.¹, Durdák, R.¹, Mičaník, T.², Dorko, F.³

¹Student LF OU všeob. lék., Česká republika; ²Ústav fyziologie a patofyziologie LF OU Ostrava, Česká republika; ³Ústav anatomie LF OU Ostrava, Česká republika
frantisek.dorko@osu.cz

Abstract

Acupuncture belongs to teachings of the traditional Chinese medicine, and its principle lies in the insertion of special acupuncture needles into specific points (acupuncture points) with the purpose of entirely or partially healing of an illness as well as prevention of issues related to specific acupuncture points. Acupuncture points are spread out throughout the human body on acupuncture pathways, so called meridians, which are according to Chinese teaching channels through which flows energy through the body and it gets closer to the surface in the location of acupuncture points, where it can be harnessed for acupunctural treatment. Our research focuses on the acupuncture pathway of the large intestine. This meridian according to the traditional Chinese teaching affects the intestine (including digestion, etc.), but it also in large part copies the effect of the lung meridian on the respiratory system, where it can be used for treatment of hay fever, bronchial asthma, or allergies.

Key words: acupuncture, acupuncture path, acupuncture points, meridians, meridian of large intestine, cadaver, qi

Úvod

V čínské historii nacházíme zmínku o nálezu prvních kostěných jehel již před 7 tisíci lety. Právě u těchto jehel se usuzuje, že sloužily k provádění prvních historických akupunkturních vpichů. Později byly nalezené jehly kovové, spolu s kovovými modely lidského těla, které nesly označení prvních akupunkturních bodů. Z těchto důvodů je čínská akupunktura nazývána nejstarší léčebnou metodou světa. Léčba probíhá na základě vpichu speciálních kovových jehel určených pro akupunkturu, do specificky daných bodů. Tyto body nacházíme rozmístěné po lidském těle a seřazené po tzv. energetických drahách – meridiánech, neboli akupunkturních drahách. Cílem léčby je dle čínského učení náprava vychýlení organismu z rovnováhy a nespornou výhodou je, že tato léčba, kromě možného zánětu apod. při nedodržení základních hygienických pravidel nebo při zásahu do průběhu nervu, nemá negativní účinky na lidský organismus. Meridián tlustého střeva, na který je zaměřena naše práce, doprovází dráhu plic a proto, dle čínského učení, působí nejen na samotné střevo, ale také na dýchací obtíže a onemocnění dýchací soustavy.

Materiál a metody

Studie byla prováděna na kadaverech, protože i přesto, že akupunktura byla předmětem mnoha výzkumů, většina z nich nedokázala vyloučit nezanedbatelnou subjektivní složku pacienta, zejména placebo efekt. Kadavery byly darovány dárci k vědeckým účelům a před zahájením výzkumu byly standartní fixační metodou fixovány na Ústavu anatomie LFOU. Studie byla zaměřena na akupunkturní dráhu LI – tlustého střeva, kdy nejdříve proběhla projekce na živé lidské tělo (neboť na kadaverech nemohla být zajištěna neutrální poloha, a dále během fixace vznikají mikrodeformace tkáně, které by mohli vyvolat chybnou odchylku při projekci bodů

přímo na kadaver) dle studia literatury, speciálních akupunkturních nákrešů a modelů k tomu určených. Jednotlivé body byly poté postupně vypreparovány se zřetelem na průběh jednotlivých struktur po vrstvách. Meridián LI má celkem 20 bodů, které se většinou nacházejí na horní končetině.

Výsledky

Akupunkturní body se nacházejí na energetických akupunkturních drahách – meridiánech, a dle čínského učení jimi proudí životní energie, tzv. qi (čchi). Tradiční učení popisuje 12 hlavních a 2 vedlejší energetické dráhy, na kterých se nachází 361 akupunkturních bodů, z toho 20 bodů je umístěno na dráze tlustého střeva – meridiánu LI. Začátek je orientován na radiální straně posledního článku ukazováčku a dále probíhá po předloktí až na paži do fossa supraclavicularis. Povrchový průběh sledujeme na krku a dále pokračuje k hornímu rtu. Je úzce spjat s drahou plic, a proto kromě střeva významně ovlivňuje také plicní onemocnění. Akupunkturní body LI byly naprojektovány na kadaver a jsou postupně opatrně preparovány se zřetelem na probíhající struktury.

Diskuze

Názor na akupunkturu je stále ne zcela jasný a v Evropě nejsou popisované účinky spojované s léčbou pomocí akupunktury významněji uznávány. Je to zčásti způsobené i výzkumy, které nevyvracejí subjektivní složku ze strany pacienta, především pak placebo efekt. Přesto nelze říct, že akupunktura pracuje jen a pouze právě na placebo efektu, neboť v Číně je tradice léčbou pomocí akupunktury uznávaná již několik tisíc let a tato metoda se těší stále větší oblibě než racionální západní medicína. Proto je přístup k léčbě pomocí této metody stále rozpačitý a stanovisko k ní převážně nejasné, nebo negativní a lékař málokdy přistupuje k léčbě ve stylu východní čínské medicíny.

Závěr

Akupunkturní body meridiánu LI byly nanесeny na kadavery lidského těla, určených k výzkumu a momentálně probíhá jejich šetrná preparace.

Výzkumná studie je podporovaná z finančních prostředků projektu SGS05/LF/2017

Literatura

- [1] Unschuld, *University of California Press*. **2003**, ISBN 0-520-23322-0.
- [2] White, *Acupunct Med*. **2004**, 22/3: 122-33.
- [3] Kessler, *Acupunct Med*. **2008**, 26/4: 231-3.
- [4] Hecker, *Prague: Grada*. **2010**, p. 285.
- [5] Čihák, *Prague: Grada*. **2004**, ISBN 80-247-1132-X.
- [6] Zheng, *Integr Med Res*. **2014**, 3: 103-110.