



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



NOVÉ TRENDY A PERSPEKTÍVY V HISTOLÓGII IV

Martin 2018

Nové trendy a perspektívy v histológii IV

Recenzovaný zborník prác

Zostavovatelia: RNDr. Mária Kovalská, PhD.
prof. MUDr. Marian Adamkov, CSc.

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

Zborník neprešiel jazykovou korektúrou.

Za obsahovú ako aj gramatickú stránku zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov.

Miesto a rok vydania: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martin, 2018

Počet strán: 89

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

ISBN 978-80-8187-047-7

EAN 9788081870477

Zostavovatelia tejto publikácie ďakujú MUDr. Martine Rausovej za poskytnutie ilustrácie pre vyhotovenie titulnej strany zborníka.

Homo doctus in se semper divitias habet.

Phaedrus

OBSAH

Adamkov M.	Predhovor	3
Nicodemou A.	Vplyv dlhodobej in vitro expanzie na vybrané vlastnosti ľudských stromálnych kmeňových buniek izolovaných z tukového väziva	4
Chyliková J.	Morfologie podkožní tukové tkáně v závislosti na metodě odběru	9
Kunertová L.	Lymfangiogenetické mechanizmy v primárných nádoroch a pri ich metastázovaní	13
Tupá V.	Význam a vzájomná korelácia CA IX a COX-2 v kolorektálnych karcinómoch	16
Škuciová V.	PD-L1 proteín a jeho korelácia s mutáciou BRAF V600E a prítomnosťou TIL v malígnych melanómoch	20
Výbohová D.	Expresia VEGF-A v kožných léziách lichen ruber planus s rôznym stupňom zápalovej infiltrácie	24
Kubatka P.	Vplyv tymiánu na parametre nádorových kmeňových buniek v modeli chemicky indukovanej mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov	28
Báľentová S.	Zmeny v zastúpení neurónov a astrocytov v mozgu potkana po expozícii ionizujúcim žiarením	32
Hnilicová P.	In vivo ¹ H MRS štúdia účinkov frakcionovaného ionizujúceho žiarenia na neuróny v hipokampe a bulbus olfactorius mozgu potkanov	36
Holovská K.	Elektromagnetická radiácia a jej vplyv na štruktúru a ultraštruktúru pečene u juvenilných potkanov	40
Almášiová V.	Indukcia mnohojadrových gigantických buniek v semenníkoch juvenilných potkanov vplyvom 2.45 GHz mikrovlnného žiarenia	43
Tatarková Z.	Mechanizmy kardioprotekcie srdca dospelého potkana vystaveného ischemicko-reperfúznemu poškodeniu	47
Sroková Z.	Vplyv homocysteínu na funkčné a morfológické parametre srdca experimentálnych zvierat	52
Cigánková V.	Patologicko-histologický obraz pľúcnej červivosti u muflónov	56
Haviarová Z.	Mikroskopický obraz extradurálnych lumbosakrálnych anomálií spinálnych nervov	60
Marčeková M.	Polandov syndróm u mladého muža	64
Grussmannová A.	Vliv jednotlivých fází menstruačního cyklu na výkonnost a efektivitu tréninku u rekreačních běžkyň	68
Kocianová K.	Odber a fixácia materiálu určeného na histologické vyšetrenie	72
Marcinková M.	Použitie histologických metód vo forenznej antropológii	76
Ďurišová D.	Ako z nízkeho množstva vstupnej DNA získať kvalitné výsledky – SureSelectXT HS Target Enrichment NGS Kit	80
Adamkov M.	Nové pohľady na bunkovú smrť a prehľad menej známych typov bunkovej smrti	84

Predhovor

Význam zborníka „Nové trendy a perspektívy v histológii IV“

Zborník je charakterizovaný ako publikácia, ktorá predstavuje pod spoločným názvom súbor štúdií, ktoré majú spoločné ideové črty alebo sú „aspoň rámcovo tematicky príbuzné“. Tieto štúdie sú obyčajne písané tak, že by mohli byť publikované aj samostatne.

Periodický recenzovaný zborník „Nové trendy a perspektívy v histológii IV“ ponúka súbor vedeckých článkov, ktoré sú viac, či menej príbuzné s funkčnou histológiou. To len opäť dokazuje známu skutočnosť, že histológia stojí na pomyselnnej križovatke medzi ďalšími vedeckými odbormi a svojim postavením pôsobí ako integrujúci element medzi nimi, napr. možno spomenúť anatómiu, fyziológiu, biochémiu, biológiu a patologickú anatómiu.

Potešiteľný je tiež fakt, že do zborníka zasielajú svoje práce aj mladí vedeckí pracovníci, ktorí len začínajú svoju profesionálnu a publikačnú kariéru. Ako príklad môžeme uviesť doktorandov, ktorí si takto testujú svoje schopnosti, učia sa písať vedecké články a týmto si brúsia svoje publikačné ostrohy do budúcnosti. Avšak na druhej strane, do nášho zborníka prispievajú už tradične aj skúsení vedeckí pracovníci, ktorí sa chcú podeliť o výsledky svojich výskumných aktivít. Sme milo prekvapení, že sme dostali príspevky na uverejnenie aj spoza rieky Moravy.

Veríme, že predkladaný zborník obohatí naše vedomosti a čitatelia získajú prehľad o výskumných projektoch na rôznych pracoviskách v rámci našej fakulty a Slovenska, čo môže byť prvý impulz pre vzájomnú a plodnú spoluprácu.

Marian Adamkov

Vplyv dlhodobej *in vitro* expanzie na vybrané vlastnosti ľudských stromálnych kmeňových buniek izolovaných z tukového väziva

Nicodemou, A., Varchulová Nováková, Z., Kuniaková, M., Danišovič, Ľ.

Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej biológie, Bratislava
nicodemou1@uniba.sk

Abstract

Stromal stem cell therapies have great potential for regenerative medicine. There are many clinical trials ongoing in mentioned respect. However, their biosafety and efficacy issue represent a major concern especially after prolonged cultivation *in vitro*. The aim of this study was to evaluate the biological features and morphology of human adipose tissue-derived stem cells undergoing prolonged expansion. We performed morphological analysis and analysis of selected biological properties (expression of surface antigens and selected genes involved in cell regulation and apoptosis, cell cycle analysis and cell senescence). Our results showed that long-term expansion lead in to significant changes in morphology. On the other hand they maintain immunophenotype of stem cells, and normal function of cell cycle and apoptosis regulators as well as lack of telomerase activity also in high passages.

Keywords: stromal stem cells, long-term cultivation, morphological changes, cell senescence

Úvod

Stromálne kmeňové bunky (SKB) sú primitívne, nediferencované bunky vyznačujúce sa potenciálom sebaobnovy a plasticity. SKB sú schopné aktívnej migrácie do miest zápalu alebo degeneratívnych procesov v tele a sú schopné produkovať bio-aktívne molekuly potrebné na podporu regeneračných procesov. Uvedené z nich robí unikátny nástroj regeneratívnej medicíny [1].

Počas posledných dekád boli SKB izolované z mnohých tkanív (napr. kostnej drene, tukového väziva, kostrových svalov, pečene, placenty atď.). Avšak nie všetky tkanivá sú vhodné pre účely odberu, pretože je potrebné vziať do úvahy nielen výťažok získaných buniek, ale aj bezpečnosť postupu odberu, záťaž a riziká pre pacienta. Zdá sa, že tukové väzivo je vhodným zdrojom zodpovedajúcim uvedeným kritériám. Jeden gram tukového väziva obsahuje cca. $1 \cdot 10^6$ SKB a liposukcia je bezpečný spôsob odberu v porovnaní s inými tkanivami. Navyše SKB z tukového väziva boli komplexne charakterizované mnohými výskumníkmi, pričom sa dospelo k záveru, že majú významné biologické vlastnosti a preto sú vhodné na prenos do klinickej praxe. Navyše, existuje veľa klinických štúdií využívajúcich SKB izolovaných z tukového väziva pre bunkovú terapiu rôznych patologických stavov [2].

Základným predpokladom aplikácie SKB v humánnej medicíne je ich terapeuticky dostatočné množstvo dosiahnuteľné kultiváciou *in vitro*. Ukázalo sa však, že táto technika je spojená s rizikom transformácie buniek, čo predstavuje biologické riziko. Viacerí autori pozorovali počas kultivácie zmeny v morfológii buniek, cytogenetickú nestabilitu, zvýšenú aktivitu telomerázy a alternáciu génov, zodpovedajúcich za reguláciu delenia buniek, apoptózy a senescencie [3,4]. V tejto štúdii sme zamerali na analýzu zmien v biologických a morfológických vlastnostiach *in vitro* expandovaných SKB izolovaných z tukového väziva.

Materiál a metodika

Izolácia a in vitro kultivácia buniek. Ľudské SKB boli izolované z lipoaspirátov zdravých dárkyň (n=5, priemerný vek=36,4 r.), ktoré podstúpili estetické operácie. Odbery boli vykonané v súlade s Helsinskou deklaráciou, vždy po získaní informovaného súhlasu pacienta. Lipoaspiráty boli opláchnuté fyziologickým roztokom, natrávené 0,1% kolagenázou typ I (Gibco, USA) a inkubované 1h pri 37°C. Potom boli vzorky centrifugované, supernatant bol odsatý a sediment resuspendovaný v kompletnom kultivačnom médiu (KKM): DMEM s nízkym obsahom glukózy (Sigma-Aldrich, USA); 10% fetálne teľacie sérum (PAA, Rakúsko); 100µg/ml streptomycín; 100U/ml penicilín (Sigma-Aldrich, USA). Po ďalšej centrifugácii, boli pelety resuspendované v KKM, prefiltrované cez 40µm sitká do 75cm² kultivačných fľašiek. Kultivácia prebiehala v inkubátore pri 37°C s humidifikovanou atmosférou obsahujúcou 5% CO₂ vo vzduchu. Po 24 hodinách, boli neadherované bunky odstránené výmenou média. KKM sa menilo každé 2–3 dni. Keď bunky dosiahli cca. 80% konfluenciu, boli uvoľnené 0,25% trypsínom (Sigma-Aldrich, USA) a pasážované za rovnakých podmienok až po 25. pasáž.

Imunofenotypové analýzy. Bunky boli resuspendované vo farbiacom pufri: fosfátový tlmivý roztok (FTR) s pH=7,2; 0,5% BSA; 2mM EDTA). Po centrifugácii boli pripravené alikvóty obsahujúce 5.10⁵ buniek resuspendovaných vo farbiacom pufri. MSC Fenotyping kit (Miltenyi Biotec, Nemecko), obsahujúci protilátky proti ľudským CD14, CD20, CD34 a CD45 (negatívne povrchové markery); CD73, CD90, CD105, CD146 a CD271 boli použité vo všetkých pokusoch. Časť buniek označená MSC Fenotypingovým kokteílom. Druhá časť predstavovala izotypovú kontrolu. Všetky vzorky sa inkubovali 15 minút pri teplote 2–8°C v tme, potom sa premyli farbiacim tlmivým roztokom, resuspendovali sa v 500µl rovnakého pufru. Následne boli analyzované s použitím MACSQuant® Analyzer (Miltenyi Biotec, Nemecko) a vyhodnotené pomocou softvéru MACS Quantify (Miltenyi Biotec, Nemecko).

Morfologické analýzy. Morfológia buniek na mikroskopickej úrovni bola analyzovaná na invertovanom mikroskope Zeiss Axiovert 40 (Carl Zeiss, Nemecko). Ultraštruktúra SKB z tukového väziva bola analyzovaná na TEM FEI Morgagni 268D (FEI, USA). Bunky boli fixované v 2,5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, USA), pH=7,2, pri 4°C počas 15 minút. Potom boli opláchnuté FTR a postfixované 2% OsO₄ (Serva, Nemecko) ďalších 15 minút, potom opláchnuté v destilovanej vode a dehydratované v etanole (Centralchem, Slovensko). Potom boli bunky zaliate do Durcupanu (Sigma-Aldrich, USA) a narezané na polohrubé rezy, ktoré boli farbené toluidínovou modrou (Sigma-Aldrich, USA) a ďalej narezané na ultra tenké rezy. Tie boli premiestnené na medené mriežky, dvojito zafarbené pomocou uranyl acetátu a citrátu olovnateho (Sigma-Aldrich, USA).

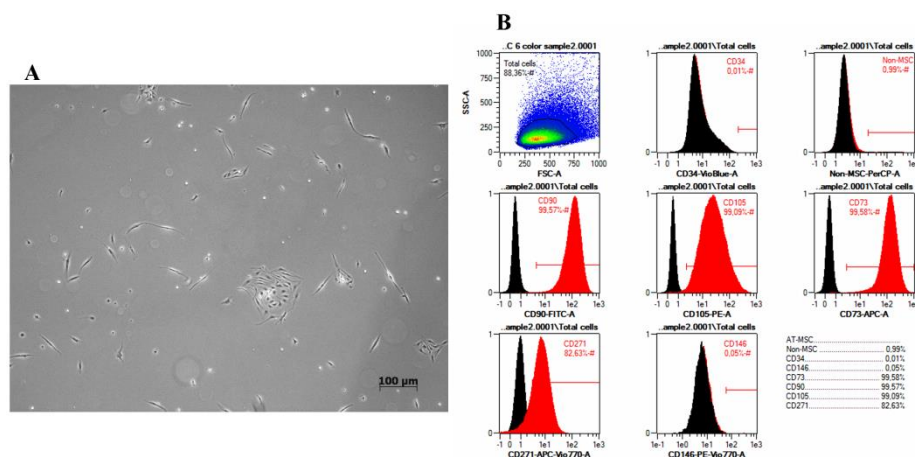
Analýzy telomerázovej aktivity. Detekcia telomerázovej aktivity SKB bola vykonaná s použitím TRAPeze® RT Telomerase Detection Kit (Merck Millipore, USA). Bunky boli resuspendované v 200µl CHAPS lyzačnom pufri (Merck Millipore, USA) a 30 minút inkubované na ľade. Potom boli centrifugované. Nakoniec sa „Master Mix“ pripravil zmiešaním všetkých reagensov so vzorkou. PCR reakcie sa uskutočnili na Eco Real-Time PCR System (Illumina, USA).

qReal-Time PCR. Celková RNA bola extrahovaná z buniek pomocou GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA). cDNA bola syntetizovaná z celkovej RNA prostredníctvom Maxima First Strand cDNA pre RT-qPCR (Thermo Scientific, USA). Podmienky tepelného cyklu: 25°C počas 10 minút, 50°C počas 15 minút a 85°C počas 5 minút. Získaná cDNA sa použila ako templát na kvantitatívnu PCR na stanovenie úrovne expresie vybraných génov súvisiacich so senescenciou,

reguláciou bunkového cyklu a apoptózy (CDK1, TP53, Bcl-2, c-Myc a RB1). GAPDH bola použitá ako interná kontrola. PCR reakcie sa uskutočnili na Eco Real-Time PCR System. Reakcia sa uskutočnila v 5 μ l zmesi obsahujúcej 2,5 μ l Maxima Probe / ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific), 0,25 μ l každého primeru - TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems), 0,5 μ l cDNA a reakčný objem bol upravený destilovanou vodou. Podmienky tepelného cyklu: 50°C počas 2 minút, nasledovala počiatková denaturačná fáza pri 95°C počas 10 minút, 45 cyklov pri 95°C počas 15 s, 60°C počas 1 min. Expresia analyzovaných génov sa normalizovala na GAPDH.

Výsledky

Po 24 hodinách boli SKB izolované z tukového väziva adherované na povrch kultivačnej fľašky a rástli ako jednotlivé bunky. Mali heterogénnu morfológiu – bunky mali bipolárny až polygonálny tvar. V nasledujúcich dňoch proliferovali v kolóniách a získali typickú morfológiu buniek podobných fibroblastom (Obr. 1A). V prvej pasáži, exprimovali povrchové antigény CD73, CD90, CD105 a CD271 a boli negatívne na CD14, CD20, CD34 a CD45. Chýbala tiež expresia CD146 (Obr. 1B).



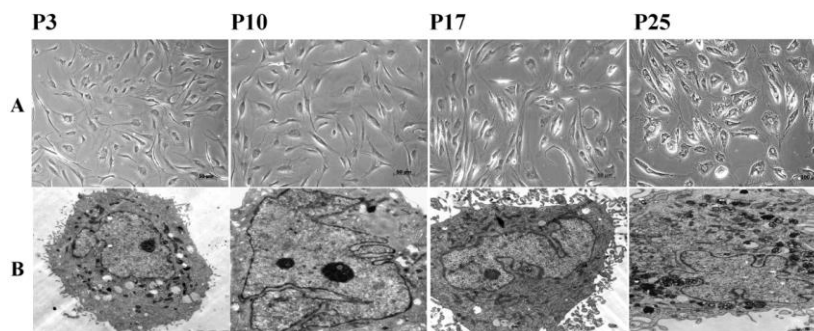
Obr. 1 A – morfológia SKB izolovaných z tukového väziva v primárnej kultúre; **B** – imunofenotyp SKB v prvej pasáži.

Zaznamenali sme zmeny v morfológii na mikroskopickej aj ultramikroskopickej úrovni. Počas prvých 10. pasáží mali bunky vretenovitú až polygonálnu morfológiu. Vo vyšších pasážach (P11–P20) bola táto morfológia takmer identická, ale bunky boli väčšie. V najvyšších pasážach (P20–P25) sa bunky vyznačovali nepravidelnou morfológiou, stali sa plochými a ich cytoplazma obsahovala zvýšené množstvo granúl a vlákien (Obr. 2A). Analýza TEM ukázala normálnu ultraštruktúru SKB až po P10. Bunky mali nepravidelnú morfológiu s výraznými jadrami s prevahou euchromatínu a dobre vyvinutými kompaktnými jadierkami. Pozorovali sme aj dobre vyvinuté drsné endoplazmatické retikulum. Cytoplazma obsahovala mitochondrie a početné vezikuly, ako aj granuly glykogénu a lipidové vakuoly. Vo vyšších pasážach sa cytoplazma obohacovala o lipidové vakuoly a veľké množstvo tmavých elektrónových lamelárnych štruktúr (Obr. 2B).

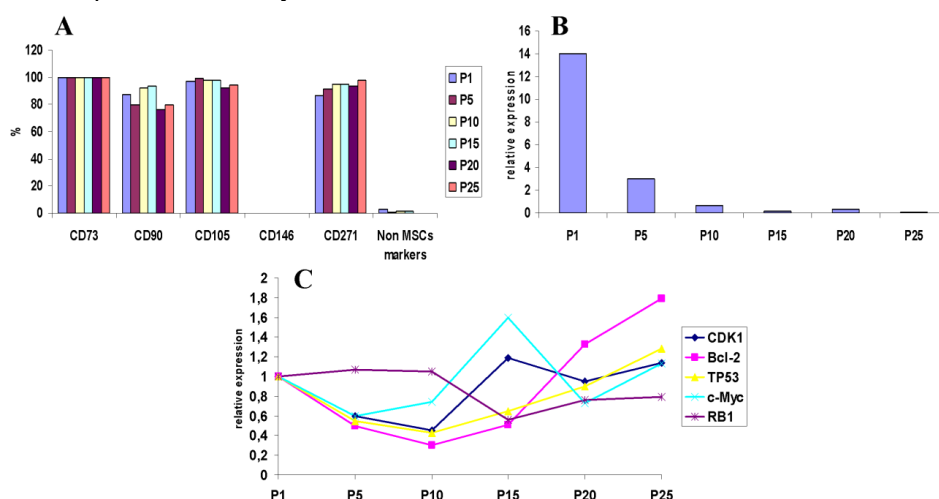
Imunofenotypová analýza ukázala, že SKB izolované z tukového väziva boli pozitívne na CD73, CD90, CD105 a CD271 a neexprimovali markery typické pre hematopoetické a endotelové bunky CD14, CD20, CD34 a CD45. Takisto boli negatívne na CD146. Expresia povrchových antigénov sa významne nemenila až do ukončenia experimentu v 25 pasáži (Obr. 3A).

Test TRAPeZe preukázal, že nami analyzované SKB postupne strácajú

telomerázovú aktivitu. Od P15 je táto aktivita takmer nedetegovateľná (Obr. 3B). Obr. 3C prezentuje výsledky génovej expresie, pričom najvýraznejšie zmeny boli zaznamenané v prípade expresie Bcl-2, ktorá sa znižovala po P10 a ku koncu experimentu výrazne stúpala. Podobný charakter mala aj expresia TP53, pričom najvyššie hodnoty sme zistili v P25. V prípade c-Myc a CDK1 bola najvyššia hodnota nameraná v P15, následne klesla a ku koncu experimentu mala opäť stúpajúcu tendenciu. Expresia RB1 sa po P10 nemenila, v P15 sa expresia znížila a až do ukončenia experimentu si zachovala tieto hodnoty.



Obr. 2 A – morfológia SKB izolovaných z tukového väziva; **B** – ultraštruktúra SKB izolovaných z tukového väziva počas dlhodobej kultivácie.



Obr. 3 A – imunofenotyp SKB izolovaných z tukového väziva počas dlhodobej kultivácie; **B** – analýzy telomerázovej aktivity; **C** – expresia vybraných génov asociovaných so senescenciou, reguláciou bunkového cyklu a apoptózy.

Diskusia

Dospelé kmeňové bunky, ktoré boli prvýkrát opísané pred päťdesiatimi rokmi, stále priťahujú obrovský záujem vedeckej obce, nakoľko bolo dobre zdokumentované, že majú veľký terapeutický potenciál pre regeneráciu alebo náhradu poškodených a/alebo stratených tkanív. Aj napriek tomu je využitie *in vitro* expandovaných SKB limitované kvôli biologickým rizikám ako sú napr. cytogenetická nestabilita, zvýšená telomerázová aktivita a alternácia funkcie niektorých proteínov zapojených do regulácie bunkového cyklu, apoptózy a senescencie.

Naše výsledky ukázali, že SKB izolované z tukového väziva začali rásť v kolóniách a vykazovali vysoký proliferačný potenciál, čo korelovalo so zisteniami iných autorov, ktorý pracovali so SKB z iných tkanivových zdrojov [5-7]. Imunofenotypové analýzy ukázali, že bunky boli pozitívne na markery mezenchýmových kmeňových buniek CD73, CD90, CD105 a CD271 a vykazovali negativitu na CD14, CD20, CD34 a

CD45, ktoré sú typické pre krvotvorné a endotelové bunky [8]. Chýbanie expresie CD146 vysvetľujeme tým, že použitá metóda disagregácie tkaniva viedla k tomu, že sa v ňom nenachádzali takmer žiadne zvyšky ciev, ktoré by boli zdrojom kontaminácie pericytami [9]. Tento fenotyp si zachovali až po 25. pasáži. To dokazuje, že tieto SKB majú väčší potenciál na udržanie imunofenotypu počas dlhodobej kultivácie v porovnaní s inými kmeňovými bunkami. V prípade SKB izolovaných z kostnej drene strácajú typický imunofenotyp v 12. pasáži [10] a v prípade SKB z mandlí v 15. pasáži [11].

Prvým dôkazom transformácie buniek je zmena morfológie. V našej štúdii boli prvé zmeny zaznamenané až po 10. pasáži. Bunky sa zväčšili, resp. mali dlhé cytoplazmatické výbežky. Najvýraznejšie morfológické zmeny boli viditeľné počas posledných pasáží. TEM analýzy odhalili zmeny v morfológii SKB vo vyšších pasážach a najdôležitejším nálezom bola akumulácia tmavých elektrónových teliesok a lamelárnych štruktúr v cytoplazme, ktoré môžu predstavovať reziduá vznikajúce rozpadom bunkových organel, najmä mitochondrií [12].

Analýzy aktivity telomerázy ukázali, že dlhodobá kultivácia (až po P25) neviedla k jej zvýšeniu, čo bolo v plnej zhode s predchádzajúcimi štúdiami zaoberajúcimi sa kmeňovými bunkami z rôznych zdrojov [13]. Existuje však aj možnosť alternatívneho predlžovania telomér (ALT), ku ktorému dochádza v niektorých ľudských nádoroch mezenchýmového pôvodu. Nava a kol. [14] analyzovali ALT v SKB, ale ich výsledky nepreukázali prítomnosť ALT.

Výsledky analýz expresie vybraných regulátorov bunkového cyklu, apoptózy a senciencie ukázali najmä zvýšenú expresiu Bcl-2 vo vysokých pasážach, čo by mohlo poukazovať na možnú malígnu transformáciu najmä v súčinnosti so zvýšenou expresiou c-Myc, tak ako je to v prípade niektorých rakovinových chorôb [15]. Na druhej strane, zvýšená expresia TP53 vo vyšších pasážach poukazuje na možnosť akumulácie zmien v DNA a indukciu apoptózy, čím dochádza ku ochrane pred malígnou transformáciou [16].

Záver

Získané výsledky naznačujú, že dlhodobá kultivácia *in vitro* ľudských SKB má za následok zmeny ich morfológických vlastností. Na druhej strane vykazujú nízky tumorigénny potenciál, najmä hlavne kvôli udržaniu normálnej funkcie regulátorov bunkového cyklu a apoptózy, ako aj v dôsledku nízkej telomerázovej aktivity.

Literatúra

- [1] Shende, *Biomed Pharmacother.* **2018**, 97:38-44.
- [2] Miana, *Ecancermedicallscience.* **2018**, 12:822.
- [3] Jiang, *Appl Biochem Biotechnol.* **2012**, 168:2230-44.
- [4] Suchanek, *Acta Medica.* **2010**, 53:93-9.
- [5] Liew, *Methods Mol Biol.* **2017**, 1627:193-203.
- [6] Mappeling, *Cytotherapy.* **2016**, 18:729-739.
- [7] Beravolu, *J Vis Exp.* **2017**, 3:122.
- [8] Dominici, *Cytotherapy.* **2006**, 8:315-7.
- [9] James, *Pharmacol Ther.* **2017**, 171:93-103.
- [10] Pogozhykh, *Stem Cell Res Ther.* **2015**, 120:150.
- [11] Yu, *J Anat.* **2014**, 225:510-518.
- [12] Huotari, *EMBP J.* **2011**, 30:3481-500.
- [13] Fu, *Tissue Eng Part C Methods.* **2015**, 21:1088-97.
- [14] Nava, *Plast Reconstr Surg.* **2015**, 135:114e-23e.
- [15] Otake, *Blood.* **2007**, 109:3069-75.
- [16] Amaral, *Discov Med.* **2010**, 9:145-52.

Morfologie podkožní tukové tkáně v závislosti na metodě odběru

Chyliková, J.¹, Kamarád, V.², Holéczy, P.³, Dvořáčková, J.⁴

¹Ostravská univerzita, Lékařská fakulta, Ústav histologie a embryologie, Ostrava, Česká republika;
²Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Ústav histologie a embryologie, Olomouc, Česká republika; ³Vítkovická nemocnice a.s., Ostrava – Vítkovice, Chirurgické oddělení, Ostrava, Česká republika; ⁴Ostravská univerzita, Lékařská fakulta, Ústav patologie, Ostrava, Česká republika
jaroslava.chylikova@osu.cz

Abstract

The morphological, morphometric and immunohistochemical evaluation of histological preparations can be influenced by tissue procurement. Part of our long-term research into the role of tissue macrophages and morphometric analysis of adipocytes is the characterization of selected morphological features of white adipose tissue in morbidly obese patients. In this work we compare the results of the subcutaneous adipose tissue analysis of a morbidly obese man obtained by the classic method of excision and core needle biopsy. The removed material was fixed with neutral formalin and further processed in the histology laboratory. Morphometric and qualitative assessment of the subcutaneous adipose tissue of a morbidly obese patient showed that the sampling methods used (excision, needle biopsy) had no effect on the parameters studied. This information is important to provide valid and comparable research data.

Keywords: morphometry, adipose tissue, core needle biopsy, excision

Úvod

Součástí našeho dlouhodobého výzkumu úlohy tkáňových makrofágů v tukové tkáni patologicky obézních pacientů je charakteristika morfologických vlastností podkožní a viscerální tukové tkáně u těchto jedinců. K posouzení vývoje morfologických změn tukové tkáně v delším časovém období po provedení bariatrického zákroku je potřeba opakovaně provádět odběr tkáňových vzorků. V průběhu bariatrické operace jsme snadno získali podkožní a viscerální tuk excizí. V období po operaci je tato cesta získání materiálu z etických důvodů neschůdná. Je ji však možno nahradit provedením biopsie silnou jehlou. Cílem této studie je porovnat strukturu a morfometrické parametry podkožní tukové tkáně získané při odběru silnou jehlou a klasickou metodou excize.

Materiál a metodika

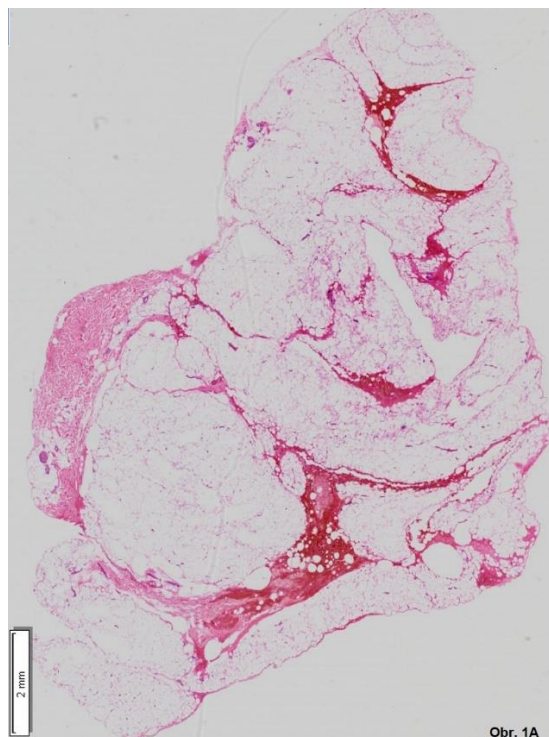
Biopsie podkožní tukové tkáně byla získána od morbidně obézního muže ve věku 55 let, BMI 48.3, bez dalších doprovodných onemocnění. Postup byl schválen příslušnou etickou komisí a pacient podepsal předchozí informovaný souhlas.

Vzorky byly získány standardní excizí a biopsií jehlou (Medax, Bio-Feather 14G x 120MM). Materiál byl vložen do nádoby s neutrálním formalínem, přepraven do histologické laboratoře a během 24 hodin zpracován do parafínových bloků. Parafínové bloky byly nařezány na 5 µm řezy na rotačním mikrotomu a obarveny základním histologickým barvením hematoxylin-eosin. U vybraných řezů byla provedena imunohistochemická analýza nepřímou dvoustupňovou metodou za použití detekčního systému EnVision (Dako) a vizualizace pomocí chromogenu DAB. Přítomné makrofágy jsme detekovali s použitím protilátky CD68 (Monoclonal Mouse

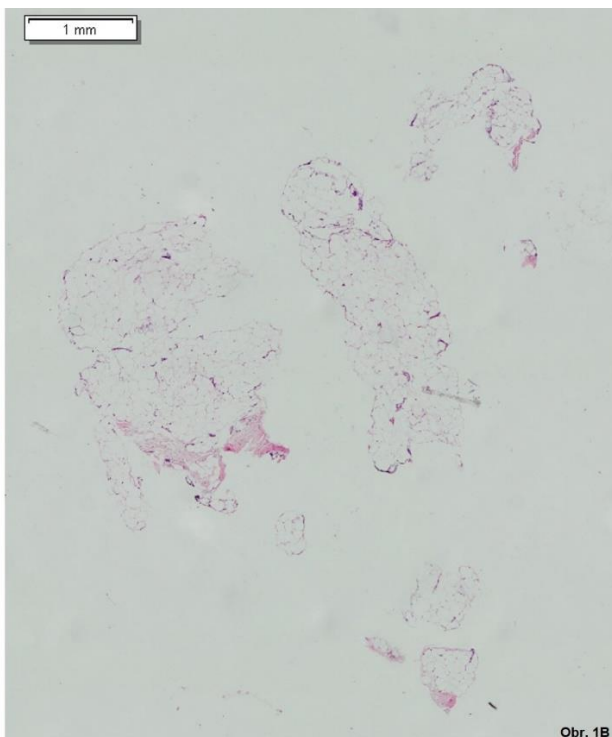
Anti-Human CD68, DakoCytomation). Průměrnou velikost adipocytů jsme stanovili za pomoci programu CellSens (Olympus).

Výsledky

Zjevný rozdíl ve vzorcích souvisel s množstvím získané tkáně. Standardní biopsie excizí poskytla vzorek oblasti tkáně přibližně 100 mm^2 a vzorek z bioptické jehly byl 20krát menší (přibližně 5 mm^2) (Obr. 1A, 1B). Malá oblast vzorku získaná bioptickou jehlou poněkud omezila naši schopnost analyzovat hrubší strukturu bílé tukové tkáně (tloušťka a uspořádání vazivových sept, morfologie větších cév), které lze pozorovat u bioptických vzorků získaných excizí.

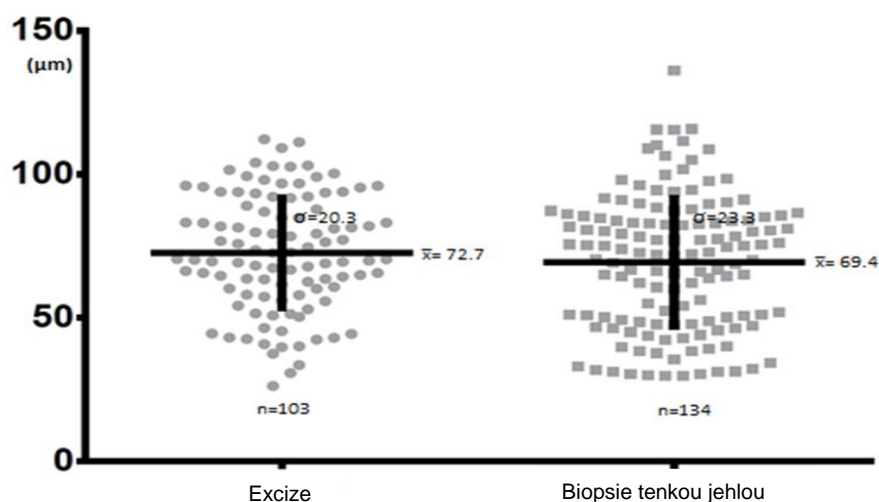


Obr.1A Podkožní bílá tuková tkáň získaná chirurgickou excizí. HE, 4 \times .



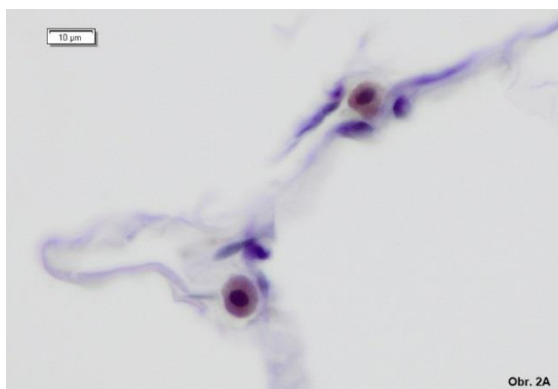
Obr. 1B Podkožní bílá tuková tkáň získaná bioptickou jehlou. HE, 4 \times .

Průměrná velikost adipocytů byla ve vzorcích získaných excizí $72,7 \pm 20,3 \mu\text{m}$ a ve vzorcích získaných pomocí jehly Medax, $69,4 \pm 23,3 \mu\text{m}$ (Graf 1). V programu GraphPad Prism 6 jsme testovali statistickou významnost rozdílu velikostí tukových buněk pomocí unikátního t-testu ($p = 0,2521$). Je zřejmé, že jsme nezaznamenali žádný statisticky významný rozdíl.

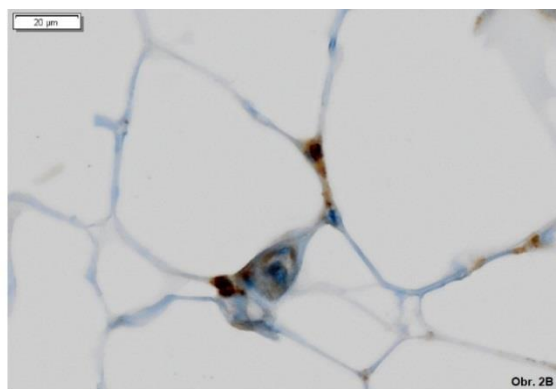


Graf 1 Srovnání průměrné velikosti adipocytu v podkožní tukové tkáni ve vzorcích získaných oběma metodami.

Imunohistochemické barvení pro detekci CD68+ makrofágů v tukové tkáni také nezjistilo žádné rozdíly v rozložení nebo počtu těchto buněk vzhledem k metodě odběru vzorků (Obr. 2A, 2B).

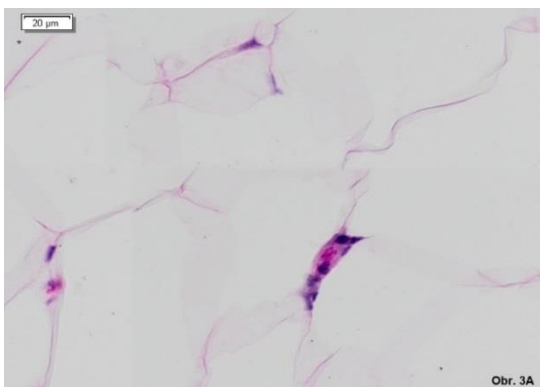


Obr. 2A CD68 pozitivní makrofágy v podkožní tukové tkáni získané excizí. 40×.

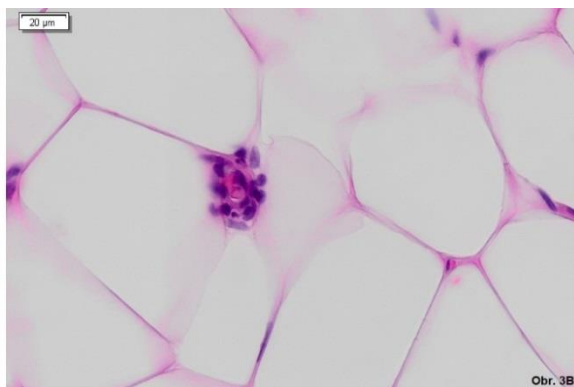


Obr. 2B CD68 pozitivní makrofágy v podkožní tukové tkáni získané biopsií tenkou jehlou. 20×.

Perivaskulární infiltrace byla patrná (Obr. 3A, 3B) ve vzorcích získaných oběma metodami.



Obr. 3A Perivaskulární infiltrace podkožní tukové tkáně získaná biopsií tenkou jehlou. HE, 20×.



Obr. 3B Perivaskulární infiltrace podkožní tukové tkáně získané excizí. HE, 20×.

Diskuse

Hlavním projevem účinku morbidní obezity na bílou tukovou tkáň je chronická zánětlivá odpověď, která mimo jiné významně přispívá k rozvoji inzulinové rezistence a diabetu 2. typu. [1] Naším cílem bylo studium dlouhodobých změn v morfologii tukové tkáně po bariatrické operaci. Během operace je snadné získat vzorky tukové tkáně standardní excizií. Ke sledování vývoje změn v delším časovém horizontu po ukončení procedury je opakovaný bioptický odběr tkáně užitím bioptické jehly pro pacienta méně problematický a je zde menší pravděpodobnost nežádoucích zdravotních následků.

Biopsie silnou jehlou je moderní diagnostická metoda. Pro histologické vyšetření je odebrán malý vzorek tkáně o délce 10-20 mm a šířce 1,4-2 mm. Jedná se o bezpečnou, rychlou a spolehlivou metodu, která se používá pro odběr tkáně z orgánů, měkkých tkání nebo nádorů v mnoha částech těla, nejčastěji při odběru tkáně z prsu nebo jater. Výhodou je minimální invazivita, adekvátní histologický vzorek a malé riziko komplikací. Výkon se provádí ambulantně bez nutnosti celkové anestezie. [2]

Výhodou klasické biopsie excizí je, že téměř vždy poskytuje dostatečný vzorek tkáně pro stanovení diagnózy. Nevýhodou je však vysoká invazivita, zvýšené riziko infekce, poškození přidružených nervových a cévních struktur a jizvení. Biopsie excizí je také nákladnější (vyžadující použití operačního sálu), zpoždění případné diagnózy a léčby (protože chirurgický zákrok musí být naplánován předem) a může nést rizika spojená s medikací sedativy a/nebo celkovou anestezí. [3]

Obrazová analýza vzorků podkožní tukové tkáně získaných excizí a pomocí punkční jehly nevykazovala žádné rozdíly v základních morfometrických parametrech adipocytů.

V tukové tkáni morbidně obézních lidí převažují hlavní projevy chronické zánětlivé reakce (perivaskulární infiltrace, CD68+ makrofágy, velikost a tvar adipocytů) a v takové míře, že změny ve sledované oblasti nemají žádný vliv na závěry hodnocení.

Závěr

Srovnání morfologické analýzy podkožní tukové tkáně získané klasickou metodou excize a biopsií tlustou jehlou neodhalilo žádné významné rozdíly mezi vzorky. Z toho hlediska byly studované tkáně rovnocenné.

Literatura

- [1] Xu, *J Clin Invest.* **2003**, 112/12:1821-30.
- [2] Pagni, *Case Rep Oncol.* **2014**, 7/2:452-8.
- [3] Shives, *Clin Orthop Relat Res.* **1993**, 289:32-35.

Lymfangiogenetické mechanizmy v primárnych nádoroch a pri ich metastázovaní

Kunertová, L., Mellová, Y., Výbohová, D.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin
kunertova@lefa.sk

Abstract

Lymphangiogenesis, the growth of lymphatic vessels, is essential in embryonic development. In adults, it is involved in many pathological processes such as lymphedema, inflammatory diseases, and tumor metastasis. Lymphatic vessels form an elaborate vascular system throughout the skin and in most internal organs. They interdigitate with blood vessels and play important functions in interstitial fluid drainage, lipid absorption, and immune responses. It seems that most lymphatic vessels originate from veins during embryonic development and then undergo extensive expansion and remodeling to form a hierarchical, mature vessel network consisting of lymphatic capillaries, precollectors, and collecting vessels, which conduct lymph fluid through the LNs and back to the blood circulation [1].

Keywords: lymphatic vessels, cancer, lymphangiogenic factors

Úvod

Lymfatický systém je tvorený systémom lymfatických ciev, lymfatických uzlín, lymfatických kmeňov a lymfatických orgánov. Veľmi sa podobá krvnému systému, je však mnohonásobne jemnejší, nie je to uzatvorený systém a nemá centrálnu pumpu, srdce, ako krvný systém. Sieť lymfatických ciev zhromažďuje tekutinu z extracelulárneho priestoru z tkanív, transportuje ju ako lymfu cez zberné lymfatické cievy a ductus thoracicus do krvného, venózneho systému. Lymfatické cievy sa tiež podieľajú na imunitných funkciách organizmu, transportom bielych krviniek a antigén prezentujúcich buniek do rôznych lymfatických orgánov, kde spúšťajú imunitné reakcie. Povrchové lymfatické látky v koži a čreve, ktoré sú v kontakte s cudzími antigénmi, fungujú ako transportné cesty pre antigén prezentujúce Langerhansove bunky a iné lymfoidné bunky. Nanešťastie, aj malígne bunky, ktoré uniknú z primárneho nádoru, môžu prechádzať pozdĺž lymfatických ciev do lymfatických uzlín a vstupom do cievneho obehu spôsobiť rozšírenie metastáz do vzdialených orgánov [2,3]. Metastatické šírenie nádorových buniek do vzdialených orgánov je jednou z hlavných príčin úmrtnosti na onkologické ochorenia [4,5]. Hoci metastatické šírenie nádoru sa môže diať prostredníctvom rôznych mechanizmov, vrátane priamej lokálnej invázie do tkaniva alebo očkovania telesných dutín, väčšina metastáz vzniká po invázii a šírení prostredníctvom obehových systémov. Historicky sa lymfatické cievy považovali za pasívnych účastníkov nádorového metastázovania jednoduchým poskytnutím kanálov na prechod nádorových buniek. Objav niekoľkých kľúčových lymfatických špecifických molekulárnych markerov a zvýšená dostupnosť experimentálnych systémov in vitro a in vivo na štúdium lymfatickej biológie ukázali oveľa zložitejšiu aktívnu úlohu lymfatického systému pri šírení nádoru [6,7].

Morfológia lymfatického systému

Lymfatická sieť poskytuje jednosmerný transportný systém, na rozdiel od krvného cievneho systému, chýba mu centrálna pumpa, ktorú v krvnom systéme predstavuje srdce, tým sa lymfatický systém musí pre transport lymfy spoliehať na kontrakciu

kostrového svalstva. Dôležité je, že nedostatok centrálnej hnacej sily v lymfatických cievach poskytuje dopravnú sieť pre bunky, v ktorých je povrchové napätie minimálne, čo je pre prežitie buniek optimálne. Lymfatické cievy začínajú ako tenkostenné lymfatické kapiláry, ktoré vznikajú slepo končiacim sa koncom v periférnych tkanivách, sú štrukturálne optimálne na absorpciu alebo vychytávanie tekutín, proteínov a buniek. Lymfatické kapiláry sú vystlané jednou vrstvou endotelových buniek s diskontinuálnou bazálnou membránou s nízkym počtom tesných a aderenových spojov a na rozdiel od krvných ciev nie sú obklopené pericytmi alebo bunkami hladkej svaloviny. Väčšina interakcií medzi interendoteliálnymi bunkami sa udržiava spojmami typu "button-like". Tieto prekrývajúce sa spojenia robia periférne lymfatické kapiláry vysoko priepustné pre intersticiálne tekutiny a proteíny a tiež uľahčujú transmigráciu imunitných buniek [8].

Mechanizmy lymfangiogenézy v nádoroch

Lymfangiogenéza je veľmi dynamický proces, ktorý je intenzívny hlavne počas embryogenézy. V dospelosti sa vyskytuje iba počas určitých patologických stavov - zápal, reparačné procesy alebo rast nádorov. Počas týchto stavov sa vytvárajú vhodné podmienky pre proliferáciu a rozmnožovanie nových ciev. Nedávne výsledky ukazujú, že homeodomérový transkripčný faktor Prox-1 je dôležitým faktorom určujúcim osud lymfatických endotelových buniek (LEC), ktorý môže indukovať transkripciu génov špecifických pre LEC dokonca aj v endoteliálnych bunkách krvných ciev (BEC). Vaskulárny endotelový rastový faktor C (VEGF-C) a VEGF-D sú peptidové rastové faktory schopné indukovať rast nových lymfatických ciev in vivo.. Patria k väčšej skupine faktorov, ktorá tiež zahŕňa VEGF, placentový rastový faktor (PIGF) a VEGF-B. VEGF-C a VEGF-D sú ligandy pre špecifické tyrozínkinázové receptory pre endotelové bunky VEGFR-2 a VEGFR-3. V dospelých ľudských aj myšacích tkanivách sa VEGFR-3 exprimuje prevažne v lymfatických endoteliálnych bunkách, ktoré tvoria vnútorný povrch lymfatických ciev. Hoci sa predpokladá, že VEGFR-2 je hlavným mediátorom angiogenézy, signalizácia VEGFR-3 je rozhodujúca pre vývoj lymfatických ciev. Inaktivácia VEGFR-3 tyrozínkinázy vedie k primárnemu lymfedému v dôsledku chybného lymfatickej drenáže v končatinách. Medzi ďalšie faktory, ktoré sa zdajú byť zahrnuté do lymfangiogenézy, patrí systém Tie / angiopoietín, neuropilín-2 a integrín $\alpha 9$. VEGF-C indukuje rast lymfatických ciev, ale vysoké hladiny VEGF-C tiež viedli k rastu krvných ciev [9]. Neuropilín-2, normálne exprimovaný v lymfatických cievach počas embryogenézy je nachádzaný aj v lymfatických cievach spojených s nádorom. Funkčná blokáda neuropilínu-2 s použitím neutralizujúcej protilátky blokuje lymfatickú migráciu endotelových buniek, ale nie proliferáciu.

Záver

Krvné a lymfatické cievy prítomné v malígnych tkanivách vykazujú určité rozdiely s normálnymi tkanivami. Odhaľovanie angiogenézy a lymfangiogenézy v primárnych nádoroch a aj metastázach má veľký význam pre pochopenie biológie nádorov a navrhovanie budúcich preventívnych opatrení. Vzhľadom na to, že obe systémy sa navzájom prekrývajú, zdieľajú spoločné signály, porovnávajú sa ich štrukturálne a funkčné aspekty. Krvné cievy sú veľmi dezorganizované, prekrvené a dilatované s nerovnomerným priemerom, nadmerným rozvetvením, neúplnou alebo chýbajúcou svalovou vrstvou. Ich steny majú početné "otvory", rozšírené medziendotelové spojenia a prerušovanú alebo chýbajúcu bazálnu membránu. Endotelové bunky majú abnormálny tvar, rastú nad sebou a vyčnievajú do lúmenu. V dôsledku toho sú

nádorové cievy prázdne a prietok krvi je chaotický a premenlivý, čo všetko prispieva k zvýšeniu intersticiálneho tlaku, čo zhoršuje dodávanie terapeutických látok do nádorov. Nádorové lymfatické cievy sú menej preskúmané, hlavne kvôli nedostatku vhodných molekulárnych markerov. Často je v súčasnosti veľmi diskutovaná otázka, či vnútri nádorov existujú funkčné lymfatické cievy. Lymfangiografia intravitálnou mikroskopiou po injekcii farbív na experimentálnych zvieracích modeloch implantovaných a spontánne vznikajúcich nádorov odhaľuje, že lymfatické cievy na periférii nádorov sú zväčšené a perfundované, ale stlačené a nefunkčné vo vnútri nádoru. Jedným z vysvetlení môže byť to, že neoplastické bunky rastúce v obmedzenom priestore vytvárajú mechanické bloky, ktoré stláčajú novovytvorené lymfatické kanály vo vnútri nádoru, zatiaľ čo na periférii prebytok VEGF-C spôsobuje zväčšenie lymfatických uzlín. Tieto zväčšené lymfatické uzliny môžu zhromažďovať intersticiálnu tekutinu a metastatické rakovinové bunky, ktoré sa transportujú z povrchu nádoru a tým uľahčujú metastázovanie nádoru. Absencia funkčných lymfatických buniek v nádoroch môže prispieť k intersticiálnej hypertenzii a interferovať s podávaním terapeutických látok [2,10].

Literatúra

- [1] Zheng, *The Journal of Clinical Investigation*, **2014**, 124/3:878-887
- [2] Alitalo, *Cancer Cell*, **2002**, 1:219-227..
- [3] Skobe, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. **2000**, 5:14-19
- [4] Fidler, *Curr Probl Surg*. **1987**, 24:129-209
- [5] Sleeman, *Int J Cancer*. **2009**, 125:2747-56
- [6] Sporn, *Lancet*, **1996**, 347:1377-81
- [7] Stacker, *FASEB J*. **2002**, 16:922-34
- [8] Christiansen, *Genes Cancer*, **2011**, 2/12:1146-1158.
- [9] Lohela, *Thromb Haemost*. **2003**, 90/02:167-184
- [10] Jain, *Sci. Am*. **2001**, 285:38-45

Význam a vzájomná korelácie CA IX a COX-2 v kolorektálnych karcinómoch

Tupá V.¹, Drahošová S.², Adamkov M.¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ²Hermes LabSystems, s.r.o., Bratislava
veronika.tupa@jfmmed.uniba.sk

Abstract

This work was designed to determine the relationship between hypoxia-inducible protein carbonic anhydrase IX (CA IX) and pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) in patients with colorectal cancer (CRC). We examined CA IX and COX-2 expression in CRC tissues by immunohistochemical staining of 111 samples. We evaluated the correlation between the expression of these proteins and their correlation with the clinico-morphological parameters of CRC. CA IX was detected in 75.7% of cases. We predominantly observed membrane staining (68.5%) and a strong immunoreaction intensity (73%). The COX-2 protein was expressed in 95.5% of cases. We noticed only cytoplasmic localization, while immunoreaction intensity varied from weak to strong. No statistically significant correlations were observed between CA IX expression and clinico-morphological parameters. COX-2 expression was only significantly correlated with the CRC lesion site. Statistical analysis confirmed a significant correlation between the parameters of expression of the CA IX and COX-2 proteins. We suggested that CA IX/COX-2 interplay promotes hypoxia survival and the invasion of tumor cells and CA IX can serve as a marker of COX-2 activation.

Keywords: carbonic anhydrase IX, cyclooxygenase-2, colorectal cancer, immunohistochemistry

Úvod

Kolorektálny karcinóm (CRC) je celosvetovo tretie najbežnejšie nádorové ochorenie u mužov a druhé u žien [1]. CRC je zvyčajne asymptomatický až do pokročilých štádií, preto je dôležitá jeho včasná detekcia [2]. Na jeho vzniku sa môžu podieľať rôzne rizikové faktory súvisiace so životným štýlom alebo kumulatívne účinky genetických zmien v protoonkogénoch, tumor-supresorových génoch a mismatch reparačných génoch [3]. Pri karcinogenéze CRC môžu zohrávať dôležitú úlohu aj dva environmentálne stavy, ktoré prispievajú k agresívnemu fenotypu nádorových buniek - hypoxia a zápal [4]. Hypoxia je stav, ktorý nastáva pri nedostatočnom prívode kyslíka k nádorovým bunkám v dôsledku rýchleho rastu nádorovej masy a jej nedostatočnej vaskularizácie [5]. Z klinického hľadiska sú fenotypové zmeny spôsobené hypoxiou kritické, pretože hypoxia je spojená s progresiou, rezistenciou na liečbu a zvýšenou mortalitou [6]. Jedným z adaptačných mechanizmov nádorových buniek na hypoxiu je zvýšená expresia a aktivácia karbonickej anhydrázy IX (CA IX), ktorá je dôležitá v prežívaní, proliferácii, migrácii a adhézii nádorových buniek [5,7]. Expresia CA IX môže byť regulovaná transkripčným faktorom HIF-1 (faktor indukovaný hypoxiou-1) a prostredníctvom aktivácie dráhy MAPK/ERK (Mitogén-aktivovaná proteínkinázová / extracelulárna signálna regulovaná kináza) [8]. Zápal môže tiež zohrávať rozhodujúcu úlohu pri karcinogenéze hrubého čreva [9]. Cyklooxygenáza-2 (COX-2) je pro-zápalový

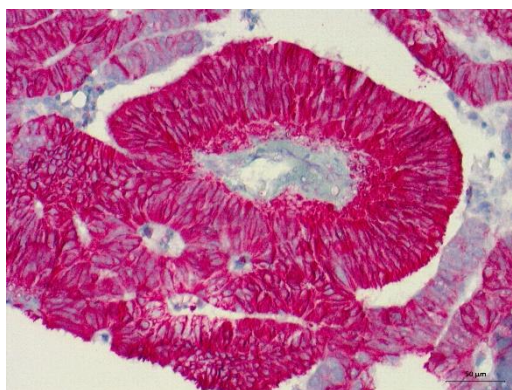
enzým, ktorý sa podieľa na regulácii syntézy prostaglandínu E₂ (PGE₂). Je zapojený do rôznych dôležitých bunkových funkcií, vrátane rastu a diferenciácie buniek, pohyblivosti a invázie nádorových buniek, angiogenézy a imunitných funkcií. PGE₂ podporuje karcinogézu hrubého čreva indukciou proliferácie buniek a redukciou apoptózy [10]. Počas hypoxie hladina COX-2 a PGE₂ stúpa, pričom je táto up-regulácia asociovaná s indukciou HIF-1 α . PGE₂ aktivuje MAPK/ERK dráhu a zvyšuje transkripčnú aktivitu HIF-1 a tým aj expresiu HIF-1-regulujúcich génov (vrátane CA9) [11]. Expresia CA IX môže byť teda počas hypoxie regulovaná prostredníctvom COX-2 cez PGE₂-závislú aktiváciu MAPK/ERK dráhy [4]. Vzhľadom na sporadické údaje v literatúre sme sa rozhodli študovať vzťah medzi proteínmi CA IX a COX-2 v CRC. Skúmali sme koreláciu medzi expresiou týchto proteínov a ich koreláciou s klinicko-morfologickými parametrami pacientov s CRC.

Materiál a metódika

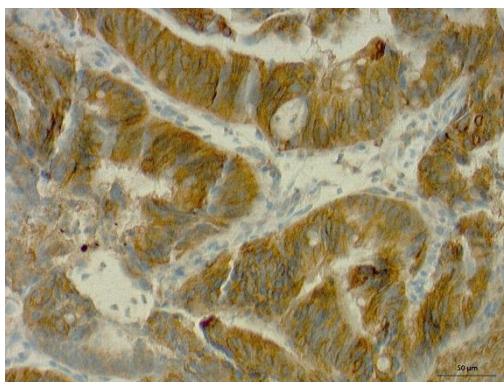
Imunohistochemicky sme vyšetrili parafrínový materiál zo 111 vzoriek CRC. Z každej vzorky boli pripravené 4 μ m hrubé rezy na imunohistochemické reakcie na dôkaz CA IX a COX-2 s použitím automatu Ventana Benchmark Ultra (Roche). Monoklonálne protilátky proti CA IX (klon: H-11; Zeta corporation) a COX-2 (klon: SP21; Cell Marque) boli riedené v pomere 1:300. Reakcia bola pri CA IX vizualizovaná Fast Red chromogénom (Roche) a pri COX-2 DAB chromogénom (Roche). Pri interpretácii získaných imunohistochemických vyšetrení sme semikvantitatívne hodnotili percento pozitívnych buniek, subcelulárnu lokalizáciu a intenzitu imunoreakcie. Štatistické hodnotenie bolo realizované pomocou testu Chi-square (χ^2) v softvéri R (verzia 3.2.3). Výsledky s p-hodnotou pod 0,05 boli považované za štatisticky signifikantné.

Výsledky

CA IX bola exprimovaná v 84/111 (75,7%) prípadoch CRC. Pozitívne prípady vykazovali prevažne silnú membránovú expresiu (Obr.1). Chi kvadrát test nepotvrdil žiadne signifikantné asociácie medzi klinicko-morfologickými charakteristikami CRC (vek pacientov, pohlavie, grade, stage, lokalizácia lézie, stav lymfatických uzlín a vaskulárna invázia) a parametrami expresie CA IX ($p > 0,05$). Expresiu COX-2 sme zaznamenali v 106/111 (95,5%) prípadoch, pričom prevažovala stredná cytoplazmová pozitivita (Obr. 2). Chi kvadrát test potvrdil signifikantnú asociáciu iba medzi lokalizáciou lézie a percentom COX-2-pozitívnych buniek ($p = 0,025$). Štatistickou analýzou sme zistili signifikantnú koreláciu medzi expresiou CA IX a COX-2 ($p < 0,05$). Sumarizáciu získaných výsledkov znázorňuje Tabuľka 1.



Obr. 1 Silná membránová pozitivita nádorových buniek CRC na dôkaz CA IX



Obr. 2 Stredná cytoplazmová pozitivita nádorových buniek CRC na dôkaz COX-2

Tabuľka 1 Korelácia expresie CA IX a COX-2 v CRC

	CA IX	COX-2
Negatívne prípady	27 (24,3%)	38 (34,2%)
Pozitívne prípady	84 (75,7%)	73 (65,8%)
Hodnota p	6.0E-05	
Intenzita imunoreakcie		
+	0	36 (32,4%)
++	3 (2,7%)	55 (49,6%)
+++	81 (73,0%)	15 (13,5%)
Hodnota p	2.2E-16	
Percento pozitívnych		
11 – 25%	28 (25,2%)	0
26 – 50%	24 (21,6%)	8 (7,2%)
>50%	32 (28,8%)	98 (88,3%)
Hodnota p	1.83E-15	

Diskusia

V našej skupine 111 kolorektálnych karcinómov sme zaznamenali expresiu CA IX v 84 prípadoch (75,7%). Saarnio a kol. ako prví študovali expresiu CA IX v CRC a zistili, že 76% prípadov bolo pozitívnych [12]. Ďalší autori tiež zaznamenali nadmernú expresiu tohto proteínu v CRC [13,14,15]. Avšak Saka a kol. pozorovali prítomnosť CA IX len v 15,6% prípadov CRC [16]. Intenzita expresie CA IX je podľa našich výsledkov a údajov z literatúry [12,14] vo väčšine prípadov silná, čo môže súvisieť s vysokou akumuláciou tohto proteínu v bunkách CRC. V predloženej práci sme nenašli žiadne významné vzťahy medzi expresiou CA IX a klinicko-morfologickými parametrami CRC (vek pacientov, pohlavie, grade, stage, lokalizácia lézie, stav LU, vaskulárna invázia). Naše výsledky sa zhodujú s ďalšími štúdiami [16,17], v ktorých tiež nepozorovali významné korelácie medzi CA IX a klinicko-morfologickými charakteristikami pacientov s CRC. V našej sérii 111 CRC bolo 106 prípadov (95,5%) pozitívnych na expresiu COX-2. Lin a kol. uvádzajú, že 80-90% CRC nadmerne exprimuje COX-2 a vo všeobecnosti sa nenachádza v zdravom tkanive hrubého čreva [18]. Mahmoud a kol. zistili vo svojej štúdii, že COX-2 bol pozitívny v 77% prípadov CRC [10]. Wu a Sun pozorovali, že COX-2 bol exprimovaný v 77,97% CRC [19]. Nami detegovaná expresia COX-2 sa zdá byť vyššia v porovnaní s údajmi v iných štúdiách. Môže to byť spôsobené veľkosťou populácie alebo použitím rozdielnych protilátok a metodológie [20]. Štatistickou analýzou sme zistili významnú asociáciu iba medzi lokalizáciou lézie (proximálna časť hrubého čreva) a vyšším percentom COX-2 pozitívnych buniek. Ďalšie klinicko-

morfologické parametre (vek, pohlavie, grade, stage, stav LU a vaskulárna invázia) nekorelovali s parametrami expresie COX-2. Zhang a Sun tiež uvádzajú, že expresia COX-2 je asociovaná s lokalizáciou nádoru a nekoreluje s vekom a pohlavím pacienta [21]. Al-Maghrabi a kol. a Elzagheid a kol. zistili významnú koreláciu expresie COX-2 so stagingom [22,23]. Mahmoud a kol. nenašli štatisticky významné vzťahy medzi COX-2 a patologickými a morfologickými znakmi [10]. Tieto výsledky môžu naznačovať, že COX-2 je nezávislým prognostickým faktorom CRC [24]. Podľa našich výsledkov existuje významná korelácia medzi expresiou CA IX a COX-2 v tkanive CRC. Sansone a kol. tiež pozorovali významnú koreláciu medzi expresiou týchto proteínov pomocou imunohistochemickej analýzy [4]. Autori zistili, že expresia CA IX a COX-2 v CRC navzájom koreluje a zvyšuje sa s narastajúcim stagingom. Tieto zistenia naznačujú, že expresia CA IX môže byť markerom aktivácie COX-2 v dôsledku vystavenia CRC buniek hypoxii. V súlade s našimi výsledkami a štúdiom literatúry, interakcia CA IX/COX-2 sa podieľa na agresívnom správaní buniek CRC tým, že podporuje ich prežívanie a inváziu [4,25,26]. Sú však potrebné ďalšie štúdie na objasnenie úlohy tohoto úzkeho vzájomného vzťahu.

Záver

V podmienkach hypoxie COX-2 reguluje expresiu génu CA9, pričom sa expresia týchto proteínov zvyšuje s narastajúcim stagingom. Štatisticky sme aj v našej štúdii zaznamenali významnú koreláciu medzi expresiou CA IX a COX-2. Ich vzájomná interakcia sa podieľa na agresívnom správaní buniek CRC tým, že podporuje ich prežívanie a invazívne vlastnosti. Z tohto dôvodu súčasné farmakologické potlačenie aktivity CA IX a COX-2 by mohlo byť stratégiou na zníženie agresivity buniek CRC.

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

Literatúra

- [1] Lech, *World J Gastroenterol.* **2016**, 22:1745-1755.
- [2] Gonzales-Pons, *BioMed Research International.* **2015**, 2015:14.
- [3] Vavrečka, *Via pract.* **2010**, 7:10-13.
- [4] Sansone, *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* **2009**, 13:3876-87.
- [5] Pastorek a Pastoreková, *Semin Cancer Biol.* **2015**, 31:52-64.
- [6] Takáčová a Pastoreková, *Klin Onkol.* **2015**, 28:183-190.
- [7] Ilie, *Int J Cancer.* **2011**, 128:1614-23.
- [8] Kaluz, *J Cell Biochem.* **2006**, 97:207-16.
- [9] Yang a Pei, *World J Gastroenterol.* **2006**, 14:6741-6.
- [10] Mahmoud, *Asian Pac J Cancer Prev.* **2014**, 15:6787-90.
- [11] Kaidi, *Cancer Res.* **2006**, 66:6683-91.
- [12] Saarnio, *J Histochem Cytochem.* **1998**, 46:497-504.
- [13] Cleven et al., *Cellular Oncology.* **2007**, 29:229-40.
- [14] Hong, *BMC Cancer.* **2009**, 9:1-9.
- [15] Rasheed, *Pathol Res Pract.* **2009**, 205:1-9.
- [16] Saka, *Pathology – Research and Practice.* **2017**, 213:783-92.
- [17] Viikilä, *World J Gastroenterol.* **2016**, 22:8168-77.
- [18] Lin, *Int J Mol Sci.* **2015**, 16:26936-52.
- [19] Wu a Sun, *World J Gastroenterol.* **2015**, 21:6206-14.
- [20] Soumaoro, *Clin Cancer Res.* **2004**, 10:8465-71.
- [21] Zhang a Sun, *Am J Gastroenterol.* **2002**, 97:1037-41.
- [22] Al-Maghrabi, *World J Gastroenterol.* **2012**, 18:1793-9.
- [23] Elzagheid, *Anticancer Res.* **2013**, 33:3137-43.
- [24] Ogino, *Gut.* **2011**, 60:397-411.
- [25] Strillaci, *J Biomed Biotechnol.* **2010**, 2010:1-11.
- [26] Sedláková, *Frontiers in Physiology.* **2014**, 4:1-14.

PD-L1 proteín a jeho korelácia s mutáciou BRAF V600E a prítomnosťou TIL v malígnych melanómoch

Škuciová, V.¹, Drahošová, S.², Výbohová, D.³, Adamkov, M.⁴,

¹Patológia s.r.o., Martin; ²Hermes LabSystems, s.r.o., Bratislava; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
veronikaskuciova@gmail.com

Abstract

Melanoma has been considered an immunogenic malignancy. Expression of PD-L1 protein on tumour cells suppresses immune reactions through binding to its receptor PD-1 on T-cells and allows to avoid elimination. PD-L1 expression is regulated in tumour microenvironment and precise mechanisms still remain unclear. We analyzed 42 formalin-fixed paraffin-embedded malignant melanomas from our archive from 41 different patients for the purpose to determine relationship between expression of PD-L1, BRAF mutational status and presence of immune infiltrate in tumour microenvironment. The results revealed that PD-L1 expression did not depend on mutation BRAF V600E. PD-L1 positive cases had always only focal expression which was geographically associated in close proximity with tumour infiltrate lymphocytes (TILs). On the other hand, we evaluated many TILs+ cases lacked expression of PD-L1. Adaptive immune resistance has dominant influence in driving PD-L1 expression in melanomas. PD-L1 is expressed upon immune cells infiltration but not only very presence is essential. The expression is performed as in response to interferons and other substances released by TILs and they are necessary to provoke expression.

Keywords: melanoma, PD-L1 protein, BRAF mutation, TIL

Úvod

Nádorové bunky využívajú mnohé spôsoby úniku spod imunitného dozoru. Jedným z nich je expresia proteínu PD-L1 (Programmed death-ligand 1), ku ktorej dochádza nielen v nádorových bunkách, ale tiež v nádorovom mikroprostredí (TME). Proteín má afinitu ku PD-1 receptoru, nachádzajúceho sa na T-bunkách. Väzba vedie k supresii migrácie a proliferácie T-lymfocytov a k inhibícii sekrécie cytotoxických mediátorov [1-3].

Aberantná PD-L1 expresia môže byť získaná (indukovaná) proinflatórnymi pôsobiacimi cytokínmi a faktormi, ktoré do mikroprostredia uvoľňujú TIL (tumor-infiltrujúce lymfocyty). Mechanizmus takejto expresie sa označuje ako adaptívny a dochádza pri ňom ku fenoménu adaptívnej rezistencie, pri ktorej TIL svojou aktivitou spôsobia vlastnú downreguláciu cez expresiu proteínu PD-L1 [4-6].

V niektorých typoch nádoroch hrajú pri expresii PD-L1 dôležitú úlohu onkogény (konstitutívny typ expresie) a tento mechanizmus predstavuje vrodenú tumorovú rezistenciu. Oba typy expresie spolu častokrát interagujú a ich podiel na expresii PD-L1 sa mení podľa typu nádoru [4]. U malígnych melanómoch (MM) dominuje cytokínmi podmienená expresia. Minoritný efekt má onkogénna cesta MAPK (cez mutáciu génu BRAF a NRAS) a tiež PI3K/AKT (zahrňujúca stratu PTEN) [4, 7, 8].

BRAF gén kóduje proteín BRAF patriaci do RAF rodiny serín/treonín špecifických kináz, ktoré sú pri malígnych ochoreniach často aktivované mutáciou, pričom najčastejšou je mutácia V600E. Proteín BRAF hrá dôležitú rolu v regulácii bunkového

delenia a apoptózy cez MAPK signálnu dráhu [9]. Takmer polovica melanómov vykazuje mutácie v géne BRAF [10].

V našej práci sme sa zamerali na posúdenie vzťahu medzi PD-L1 expresiou, BRAF V600E mutáciou a prítomnosťou TIL v malígnych melanómoch.

Materiál a metodika

Pacienti a vzorky

Náš súbor predstavoval 42 malígnych melanómov od 41 pacientov. Vzorky boli vyšetrené na našom pracovisku od januára 2016 do februára 2018. Súbor predstavoval 35 primárnych melanómov rôznych histologických typov (15 superficiálne sa šíriacich, 19 typu lentigo maligna, 1 bližšie nešpecifikovateľný) a 4 metastázy. V troch prípadoch nebolo možné rozlíšiť, či sa jedná o nodulárny melanóm alebo metastázu do kože.

Spracovanie vzoriek

Bioptické vzorky boli štandardne formalínom fixované, spracované a zaliate parafrínom. Následne boli narezané na hrúbku 4 μ m a ofarbené hematoxylin-eozínom. Pri hodnotení sme použili svetelný mikroskop (Olympus CX31).

Imunohistochemia

Po vybraní vhodných tkanivových blokov sme vykonali imunohistochemickú detekciu použitím Ventana BenchMark Ultra (Roche). PD-L1 proteín sme detekovali zajačiou monoklonálnou protilátkou, (klon 28-8, Abcam), ktorá bola riedená pomerom 1:70. Detekcia mutovaného génu BRAF V600E bola vykonaná myšou protilátkou (VE1, Roche) a TIL bol potvrdený anti-CD8 protilátkou (SP57, Roche) použitím štandardných automatických metód. Vizualizácia prebehla vďaka naviazaniu chromogénu 3,3-diaminobenzidínu (DAB). Nakoniec sme vzorky opäť hodnotili svetelným mikroskopom (Olympus CX31).

Hodnotenie PD-L1

Do úvahy sme brali parciálnu alebo kompletnú membránovú pozitivitu nádorových buniek s vynechaním buniek s cytoplazmatickou pozitivitou, buniek TME, nekrotických buniek, debris a iných artefaktov. Následne sme určili tumor proporčné skóre (TPS), čo predstavuje percento pozitívnych buniek. Melanómy s minimálne 1% TPS sme považovali za pozitívne.

Hodnotenie BRAF

Hodnotili sme intenzitu difúznej cytoplazmatickej positivity vo viac ako 85 % nádorových buniek (stupeň 0 až 3), pričom stupne 2 a 3 boli považované za pozitívne.

Kvantifikácia zápalovej reakcie

Intenzitu zápalu sme posudzovali semikvantitatívnou škálou 0 až 3+, pričom použitím imunohistochemickej detekcie antigénu CD8 bola dosiahnutá lepšia vizualizácia.

Výsledky

42 malígnych melanómov bolo vyšetrených na prítomnosť PD-L1 expresie, BRAF V600E a TIL.

PD-L1 a tumor infiltrujúce lymfocyty v melanómoch

PD-L1 expresia (TPS $\geq 1\%$) bola prítomná v 21,43 % (9/42) vzoriek, v 7 prípadoch bolo dokonca TPS väčšie ako 5%. Expresia bola vždy fokálna a všimli sme si, že bola vždy lokalizovaná blízko TIL. Množstvo TIL (intenzita 0-3+) bolo zistených v 78,57% (33/42) vzoriek. Všetky PD-L1 pozitívne vzorky (9/9) boli sprevádzané minimálne ľahkým lymfocytovým infiltrátom. Pri porovnaní s 81,81% (27/33) PD-L1

negatívnych a TIL+ vzoriek ($P = 0,155$) však nevyplýva signifikantná korelácia. Ani v jednom prípade sme nezaznamenali difúznú expresiu PD-L1 proteínu so súčasnou absenciou TIL. Dôležitým faktom je, že tri prípady metastatického melanómu (75% 3/4) neboli sprevádzané žiadnym infiltrátom a štvrtá metastáza mala iba ľahký a fokálny infiltrát.

Tabuľka 1 Korelácia PD-L1 expresie a prítomnosti lymfocytárneho infiltrátu

TIL (CD8)	PD-L1 pozitívne	PD-L1 negatívne
0	0 (0)	7 (21,21)
1+	4 (44,44)	13 (39,39)
2+	4 (44,44)	10 (30,3)
3+	1 (11,11)	3 (9,09)

PD-L1 a BRAF mutačný status v melanómoch

IHC odhalila BRAF V600E mutáciu (skóre 2+ a 3+) v 26,19 % (11/42). Nezaznamenali sme žiadne rozdiely medzi skupinami BRAF mutovaných PD-L1 pozitívnych a negatívnych prípadoch 22,23% (2/9) a 27,27% (9/33) ($P = 0,727$).

Tabuľka 2 BRAF a PD-L1 v malígnych melanómoch

BRAF skóre	PD-L1 pozitívne n (%)	PD-L1 negatívne n (%)
0	4 (44,45)	19 (57,57)
1+	3 (33,34)	5 (15,15)
<i>Spolu – BRAF negatívne</i>	7 (77,78)	24 (72,72)
2+	0 (0)	4 (12,12)
3+	2 (22,23)	5 (15,15)
<i>Spolu – BRAF pozitívne</i>	2 (22,23)	9 (27,27)

Diskusia

Melanóm je považovaný za výrazne imunogénnu neopláziu kvôli frekventovaným mutáciám. Spontánna regresia je extrémne vzácna a ojedinelá, drvivá väčšina melanómov pri neliečení rýchlo progreduje [11]. Tumorózne bunky zneužívajú interakciu PD-1 a PD-L1 ako jeden z hlavných spôsobov úniku spod imunitného dozoru a touto cestou docieľujú T-bunkovú toleranciu, ktorá umožňuje prežívanie nádorových buniek a progresiu nádorového ochorenia [12].

Liečebné postupy pre onkologických pacientov s metastatickým melanómom sú skutočne limitované. V poslednom období sa cielená liečba javí ako najlepšie riešenie. Použitie imunitných check-point inhibítorov, najmä anti-PD-1 a anti-PD-L1 protilátok prináša sľubné výsledky a mnoho pacientov zaznamenáva dlho trvajúcu nádorovú regresiu [13]. V prípade BRAF mutovaných MM je namieste použitie BRAF inhibítorov s vysokou mierou odpovede, avšak s pomerne rýchlo sa vyvíjajúcou rezistenciou [14].

V našej práci nás zaujímalo či dva biomarkery na cielenú terapiu – PD-L1 a BRAF spolu navzájom korelujú. Vo vzťahu sú v prípade konštitutívnej expresie PD-L1, pri ktorej expresia je vyvolaná MAPK onkogénnou cestou s BRAF mutáciou. V MM je však dominantnou cestou expresie práve cytokínmi indukovaná, čo sa v našom súbore i potvrdilo, pretože sme nezaznamenali ani jeden prípad difúznej expresie PD-L1. Atefi et al. vo svojej práci tvrdí, že iba PD-L1 expresia sprevádzaná T-bunkovou infiltráciou a vyvolaná interferónmi a inými substanciami má byť

považovaná za biomarker [8]. V práci Rodić et al. sa nepotvrdila žiadna korelácia medzi BRAF a PD-L1 [4] a v našom súbore sme dosiahli rovnaké výsledky.

Pri hodnotení prítomnosti lymfocytového infiltrátu V MM sme zistili, že väčšina MM je s prítomnou imunitnou reakciou, avšak korelácia s expresiou PD-L1 proteínu nám na rozdiel od prác Rodić et al. a Taube et al. nevyšla [4, 5]. Možno však konštatovať, že všetky PD-L1 pozitívne MM obsahovali určité množstvo infiltrátu v geografickej súvislosti s PD-L1 pozitívnymi bunkami. Naše výsledky by mohli viesť k úvahe, že samotná prítomnosť lymfocytárneho infiltrátu nestačí a je potrebná prítomnosť určitých lymfocytárných populácií v TME s produkciou určitých faktorov pri ktorej by došlo k stimulácii expresie PD-L1. Taube et al. uvádza najmä IFN gamma, ale pripúšťa že i ďalšie faktory ako IL-10, IL-6 a bežný gamma reťazec môžu byť taktiež zapojené [5].

Záver

Hodnotenie mutačného statusu BRAF a expresie PD-L1 ako dvoch nezávislých modalít by malo byť rutinnou súčasťou každého vyšetrenia melanómu vedúceho k cielej terapii [4]. Taktiež zhodnotenie rozsahu zápalovej infiltrácie má v diagnostickom procese svoje miesto, najmä pri melanómoch s vertikálnou rastovou fázou, i keď je v dnešnej dobe diskutabilný praktický význam nielen s ohľadom na prognózu, ale tiež v predikcii odpovede na terapiu inhibítormi kontrolných bodov imunitnej reakcie [15].

Literatúra

- [1] Francisco, *Immunol Rev.* **2010**, 236:219-242.
- [2] Robainas, *OncoTargets Ther.* **2017**, 10:1803-1807.
- [3] Patel, *Mol Cancer Ther.* **2015**, 14/4:847-856.
- [4] Rodić, *Cancer Immunol Res.* **2015**, 3/2:110-115.
- [5] Taube, *Sci Transl Med.* **2012**, 4:127-37.
- [6] Ahmadzadeh, *Blood.* **2009**, 114:1537-44.
- [7] Berry, *Oncoimmunology.* **2015**, 4/10:e1029704.
- [8] Atefi, *Clin Cancer Res.* **2014**, 20/13:3446-3457.
- [9] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=673>
- [10] Davies, *Nature.* **2002**, 417/6892:949-954.
- [11] Haanen, *EJC Supplements.* **2013**, 11/2:97-105.
- [12] Botti, *J Transl Med.* **2017**, 15:46.
- [13] Tan, *Signal Transduct Target Ther.* **2016**, 1:16029.
- [14] Sosman, *N Engl J Med.* **2012**, 366/8:707-714.
- [15] Dundr, *Cesk patol.* **2018**, 54/1:27-31.

Expresia VEGF– A v kožných léziách lichen ruber planus s rôznym stupňom zápalovej infiltrácie

Výbohová, D.¹, Adamicová, K.², Adamkov, M.³, Mellová, Y.¹, Hešková, G.¹, Kunertová, L.¹

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

² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav patologickej anatómie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav

histológie a embryológie, Martin

vybohova@jfmf.uniba.sk

Abstract

VEGF–A expression in cutaneous lesion of lichen ruber planus is studied in relation to inflammatory cell infiltration. Expression was detected using the single immunohistochemistry with monoclonal mouse antibody and subsequently quantitatively evaluated by morphometric software. Results confirmed significantly increased expression in LRP lesions in both epidermis and dermis in comparison to healthy skin. Statistical analysis between the lesions with various degree of inflammation confirmed the tendency of VEGF-A expression to increase, however, differences were not statistically significant. Results revealed mild positive correlation between VEGF-A expression and inflammatory cell infiltration area in cutaneous lesions of lichen ruber planus.

Keywords: VEGF-A, chronic inflammation, lichen ruber planus

Úvod

Vaskulárny endotelový rastový faktor A (VEGF-A) má nezastupiteľnú úlohu už v embryonálnom období, ale aj v postnatálnej angiogenéze pri fyziologických aj patologických procesoch [1].

Experimentálne štúdie dokázali, že VEGF-A výrazne zvyšuje permeabilitu cievnej steny [2], je špecifickým mitogénom endotelových buniek [3], indukuje migráciu endotelových buniek cez extracelulárnu matrix, ale aj pôsobením na matrixmetaloproteinázy [4]. VEGF-A ovplyvňuje aj prežívanie endotelových buniek vplyvom na expresiu antiapoptotického proteínu bcl-2 [5].

V dostupnej literatúre sa stále častejšie objavujú informácie o vzájomnej previazanosti angiogenézy a chronického zápalu. Najnovšie výsledky navyše dokazujú, že VEGF- A je dôležitým cytokínom nielen špecificky pre endotelové bunky, ale aj pre niektoré bunky imunitného systému a má významné prozápalové účinky aj tým, že zvyšuje permeabilitu cievnej steny a súčasne pôsobí chemotakticky na mastocyty a leukocyty [6-8].

Typickým chronickým zápalovým ochorením kože je lichen ruber planus. Etiológia tejto dermatózy je neznáma. Podľa najnovších štúdií sa lichen ruber planus zaraďuje k ochoreniam sprostredkovanými T– lymfocytmi [9,10].

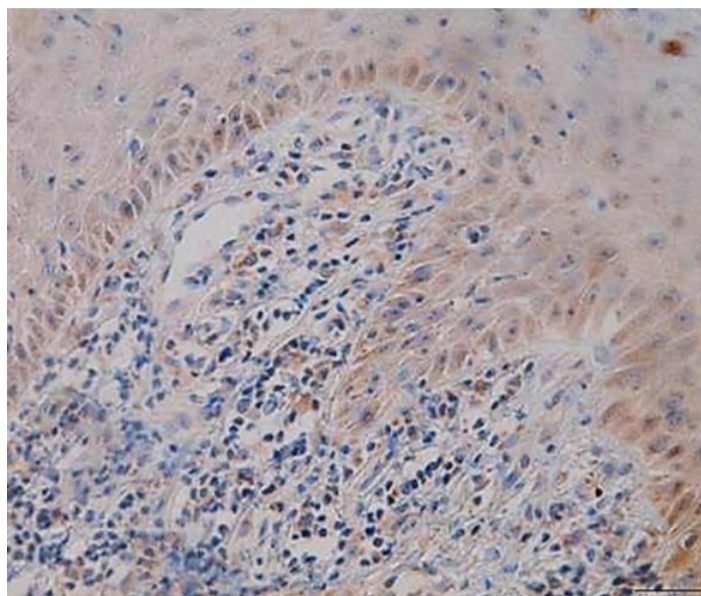
V jeho histopatologickom obraze je typické zhrubnutie epidermis s akantózou a ortokeratózou. V stratum basale je zjavná hydropická vakuolárna degenerácia, v stratum spinosum sú objemné keratinocyty s bledou cytoplazmou. Zápalové zmeny v dermis charakterizujú balónovito rozšírené dermálne papily a hustý epidermotropne orientovaný lymfocyto - histiocytový infiltrát, zvyčajne ostro ohraničený nadol, niekedy s prímiesou melanofágov. Hustota infiltrátu reflektuje štádium lézie [9-12].

V predchádzajúcej práci sme potvrdili, že expresia VEGF-A v léziách lichen ruber planus v rôznych oblastiach kože je porovnateľná a nejaví známky regionálnej variability [13].

Cieľom predkladanej práce je kvantitatívne hodnotenie expresie VEGF-A v koži chronických lézií lichen ruber planus vo vzťahu k stupňu bunkovej infiltrácie, resp. k stupňu zápalovej infiltrácie.

Materiál a metodika

Pracovali sme so vzorkami zdravej kože (10) a s archivovanými vzorkami z lézií lichen ruber planus odobratých z oblastí trupu (14). Expresiu VEGF-A sme zisťovali použitím jednoduchšej imunohistochemie (viď Obr. 1) s protilátkou Monoclonal Mouse Anti-Human Vascular Endothelial Growth Factor Clone VG1 M7273 (DakoCytomation Denmark). Na detekciu a vizualizáciu naviazaných protilátok sme použili kit LSABTM+ / HRP (Labelled Streptavidin-Biotin Complex / Horseradish Peroxidase, code No. K0679; DakoCytomation Denmark A/S). Ako chromogén sme použili diaminobenzidín (DAB). Na záver sme rezy dofarbili Mayerovým hematoxylínom (Dako Mayer's Hematoxylin, code No. S3309) a uzavreli montovacím médiom (Faramount Aqueous Mounting Medium, code No. S3025 DakoCytomation, Denmark A/S). Vizualizačný systém Olympus Evolt E-420 bol nainštalovaný na mikroskop Olympus BX41N, pomocou neho sme vytvorili digitálny obraz pri 200 a 400 násobnom zväčšení, podľa potreby vyhodnocovania pre jednotlivé parametre. Kvantitatívne vyhodnotenie sme robili pomocou morfometrického softvéru QuickPhoto Micro (Promicra, Praha, Česká republika). Plocha buniek exprimujúcich VEGF-A (VEGF-A pozitívna plocha) bola definovaná ako percento plochy buniek detekovaných pomocou monoklonálnej protilátky anti-human VEGF v štandardnej ploche epidermis a pars papillaris dermis. Podobne sme hodnotili aj plochu infiltrovanú bunkami (cellular infiltration area - CIA) ako percento plochy infiltrujúcich buniek v pars papillaris dermis zafarbených Mayerovým hematoxylínom v štandardnej ploche pars papillaris dermis v hotspot oblastiach [14-16].



Obr. 1 Imunohistochemická detekcia VEGF-A v kožnej lézii lichen ruber planus. Mierka 50µm.

Výsledky

Výsledky potvrdili signifikantný nárast expresie VEGF-A v léziách lichen ruber planus vo všetkých troch skupinách s rôznou mierou bunkovej infiltrácie oproti zdravej koži a to tak v epidermis ako aj v dermis.

Vzájomné porovnanie medzi skupinami lézií s rôznym stupňom zápalu však ukázalo, že VEGF-A pozitívna plocha v epidermis síce vykazovala nárast medzi skupinami (viď tabuľka 1), ale ten nebol štatisticky signifikantný. Rovnako sme štatisticky nevýznamný nárast zaznamenali aj v dermis.

Korelačná analýza potvrdila miernu pozitívnu koreláciu medzi plochou bunkovej infiltrácie (CIA) a VEGF-A pozitívnou plochou v epidermis ($r=0,415$, $p=0,140$) aj v dermis ($r=0,463$, $p=0,095$).

Tabuľka 1 VEGF-A pozitívna plocha v kožných léziách lichen ruber planus (LRP).

		VEGF-A pozitívna plocha	
		v epidermis v%	v dermis v%
zdravá koža		0,46 ± 0,40	0,20 ± 0,40
zdravá koža vs lézie LRP		< 0,0001	< 0,0001
lichen ruber planus			
slabý stupeň zápalovej infiltrácie CIA do 4%		5,73 ± 4,99	1,96 ± 1,70
stredný stupeň zápalovej infiltrácie CIA 4-8%		8,71 ± 1,81	2,79 ± 0,18
silný stupeň zápalovej infiltrácie CIA nad 8%		8,86 ± 0,69	3,01 ± 0,14
ANOVA hodnota p		0,201	0,178
Student Neuman Keuls test hodnota p	slabý vs stredný	0,122	0,155
	stredný vs silný	0,923	0,641
	slabý vs silný	0,210	0,161

Diskusia

Chronický zápal charakterizuje proliferácia, migrácia a infiltrácia tkaniva zápalovými bunkami. Narastajúca masa tkaniva s nadbytkom zápalových buniek vedie v mieste zápalu k zvýšeniu nutričných požiadaviek a k relatívnej hypoxii tkaniva, čo je významným stimulom angiogenézy [17,18].

Migrácia a infiltrácia T-lymfocytov v chronických zápalových dermatózach je sprostredkovaná prostredníctvom dendritických buniek a cytokínmi riadenou zvýšenou tvorbou adhezívnych molekúl na povrchu endotelových buniek ako ICAM-1, VCAM-1, alebo E-selektín. T-lymfocyty zas aktivujú makrofágy, endotelové bunky a fibroblasty a tie produkujú pro-zápalové cytokíny, chemokíny a matrixmetaloproteinázy [18-20]. Okrem toho T-lymfocyty aktivované niektorými cytokínmi, najmä TNF- α , interleukín-6 a interleukín-2, stimulujú produkciu VEGF-A vo fibroblastoch a tkanivových makrofágoch v mieste zápalu čo následne vedie k iniciácii angiogenézy [18,21].

V koži je VEGF-A exprimovaný predovšetkým keratinocyty v epidermis, menej fibroblastami a endotelovými bunkami v dermis. Jeho expresia je v zdravej koži vyvolaná zvyčajne hypoxiou. V patologických podmienkach je jeho expresia

predovšetkým následkom cytokínovej stimulácie z hyperplastickej epidermis a je teda predominantne exprimovaný v epidermis a v menšej miere fibroblastami dermis [3]. Výsledky kvantitatívnej analýzy v našej práci sú v zhode s uvedeným tvrdením a ukázali výrazne vyšší nárast expresie VEGF–A v epidermis a menší, ale tiež štatisticky signifikantný nárast v dermis.

Tao et al. [22] a Scardina et al. [19] potvrdili signifikantný nárast VEGF–A expresie v orálnych léziách lichen planus. Salem et al. [23] hodnotili expresiu VEGF–A v kožných léziách lichen ruber planus semikvantitatívne, a rovnako potvrdili signifikantný nárast oproti zdravej koži. Zistili aj tendenciu vzrastajúcej expresie so zvyšujúcim sa stupňom zápalovej reakcie. K obdobnému výsledku sme dospeli aj my. Pri porovnaní expresie VEGF–A v léziách so slabou a miernou infiltráciou sme zistili viac ako 52% nárast expresie v epidermis a 42% nárast v dermis. Nárast v expresii medzi léziami s miernym a silným stupňom infiltrácie bol menej výrazný iba 1% v epidermis a 7% v dermis.

Zvyšujúca sa expresia VEGF – A stimuluje angiogézu v léziách a novotvorené cievy následne zabezpečujú nielen výživu a oxygenáciu, ale súčasne zvyšujú aj turnover zápalových buniek v lézii. Navyše už spomenutá chemotaktická schopnosť VEGF–A voči zápalovým bunkám a aj jeho schopnosť zvyšovať permeabilitu cievnej steny potencuje zápalovú reakciu v lézii. Je preto možné predpokladať, že zvýšená expresia VEGF-A a patologická angiogéza sprevádzajúca chronický zápal zvyšujú intenzitu zápalového procesu a predlžujú jeho trvanie. Doposiaľ však nie je jasné, ktorý z týchto dejov je príčina a ktorý následok [17-21].

Práca bola podporená Grantom VEGA 1/0060/09.

Literatúra

- [1] Adams and Alitalo, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2008**, 8:464-78.
- [2] Senger, *Science.* **1983**, 219:983-5.
- [3] Detmar, *J Invest Dermatol.* **1995**, 105:44-50.
- [4] Detmar, *J Invest Dermatol.* **2000**, 5:20-3.
- [5] Gerber, *J Biol Chem.* **1998**, 273:13313-6.
- [6] Detmar, *J Invest Dermatol.* **1998**, 111:1-6.
- [7] Takahashi and Shibuya, *Clin Sci.* **2005**, 109:227-41.
- [8] Senger, *Mol Biol Cell.* **2010**, 21:377-379.
- [9] Braun-Falco, *Osveta* **2001**, ISBN 80-8063-080-1.
- [10] Bolognia, *Elsevier Saunders.* **2012**, ISBN-13: 978-0723435716.
- [11] Murphy, W.B. *Saunders Company*, **1995**, ISBN-13 978-0721624181.
- [12] Joshi, *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* **2013**, 79:349-359.
- [13] Výbohová, *Histol Histopathol.* **2015**, 30:697-706.
- [14] Mylona, *Histol Histopathol.* **2007**, 22:825-835.
- [15] Deb, *Microvasc Res.* **2012**, 84:34-43.
- [16] Boruah, *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* **2013**, 79:216-223.
- [17] Jackson, *FASEB J.* **1997**, 11:457-465.
- [18] Costa, *Angiogenesis.* **2007**, 10:149-166.
- [19] Scardina, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* **2009**, 14:558-562.
- [20] Mittal, *J Oral Maxillofac Pathol.* **2012**, 16:45-48.
- [21] Monaco, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* **2004**, 3:35-42.
- [22] Tao, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **2007**, 103:661-669.
- [23] Salem, *Eur J Dermatol.* **2011**, 21:197-202.

Vplyv tymiánu na parametre nádorových kmeňových buniek v modeli chemicky indukovanej mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov

Kubatka P.¹, Uramová, S.², Výbohová D.³, Adamkov M.⁴, Líšková A.⁵, Péč M.¹, Žúbor P.², Danko J.²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Klinika gynekológie a pôrodnictva, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin; ⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ⁵Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoológie a antropológie, Nitra
kubatka@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Preclinical studies show the anti-cancer effects of phytochemicals regarding its antioxidant or immunomodulatory properties, also the antiproliferative, anti-inflammatory, and anti-angiogenic effects, and finally the ability to induce apoptosis. In addition to the mechanisms of anticancer activity, phytochemicals also affect the survival of cancer stem cells (CSCs). The aim of our study was to analyze the mechanism of anticancer effect of the thyme by analyzing selected cancer stem cell markers in the chemopreventive model of rat mammary carcinogenesis. Mammary carcinogenesis was induced in animals by N-methyl-N-nitrosourea. Chemoprevention began 1 week before application of carcinogen and lasted for 15 weeks until the end of experiment. Thyme administered in the diet (1%) reduced the risk of mammary carcinoma by 53 % compared to control group. Immunohistochemical analysis of mammary carcinomas in rats demonstrated significantly altered CSCs parameters, namely CD44 and ALDH1A1. In our study, we observed a significant anticancer effect of the thyme, which was associated with changes in CSCs markers in mammary gland tumors *in vivo*.

Keywords: breast carcinoma, rat, thyme, cancer stem cells markers

Úvod

Neoplázie mliečnej žľazy predstavujú v súčasnosti vo svete druhé najčastejšie diagnostikované onkologické ochorenie u žien [1]. Jeden z možných prístupov znižovania výskytu nádorových ochorení je chemoprevencia. V rámci chemoprevencie sa využívajú syntetické látky, ale do úvahy pripadajú aj fytochemikálie. Tieto sa aplikujú buď v izolovanej forme alebo ako zmesi fytochemikálií prostredníctvom tzv. rastlinných funkčných potravín [2]. V poslednom období pribúdajú dáta o schopnosti fytochemikálií potláčať populáciu nádorových kmeňových buniek (CSCs), progenitorových buniek a CSCs-podobných buniek, ktoré v mnohých prípadoch zodpovedajú za relaps ochorenia a mnohopočetnú liekovú rezistenciu [3]. Klinické hodnotenie parametrov CD44, CD24 a ALDH1 (aldehyddehydogenáza 1) je považované za dôležité vyšetrenie v rámci identifikácie populácie CSCs u žien s karcinómom prsníka [4]. V nedávnej štúdií Renno et al. [5] boli biomarkery CD133, CD24, CD34, CD44 zvýšené v DMBA-indukovaných tumoroch u samíc potkanov, čo poukazuje na adekvátnosť použitého modelu rakoviny prsníka pre štúdium CSCs ako potenciálneho farmakologického markera. Imunofenotypický profil CSCs a CSCs-podobných buniek môže variovať

medzi rôznymi neoplastickými subpopuláciami, oblasťami nádoru, bunkovými líniami, či jedincami, preto je potrebné analyzovať hneď niekoľko špecifických markerov, ktoré sú vhodné pre animálny model.

Vňať tymiánu (*Thymus vulgaris* L.) je zaujímavý obsahom silice, fenolových látok, saponínov a sterolov. Vedecké bádanie poukázalo na protinádorové účinky tymiánu *in vitro* v bunkových líniiach hrubého čreva resp. prsníka [6,7].

Na základe uvedených poznatkov sme sa rozhodli analyzovať protinádorový účinok vňate tymiánu v modeli experimentálnej mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov so zameraním na vybrané parametre CSCs.

Materiál a metódy

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 karcinogenézu sme vyvolali intraperitoneálnou aplikáciou N-methyl-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 15 týždňov až do ukončenia experimentu. Tymián 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 fytošubstancie (KONT), 2. skupina s tymiánom v nižšej koncentrácii (1 g/kg) (TYM 0.1), 3. skupina s tymiánom vo vyššej koncentrácii (10 g/kg) (TYM 1). Zvieratá boli raz do týždňa palpované a vážené.

Na konci experimentu boli zvieratá usmrtené rýchlou dekapitáciou. Časť vzoriek tkaniva mamárnych nádorov boli zafixované v 10%-nom roztoku pufrovaného formalínu a následne technikou parafrínových rezov pripravené na histologické a imunohistochemické vyšetrenie. Druhá časť vzoriek bola zmrazená pre ďalšie vyšetrenia. Nádory boli klasifikované podľa kritérií pre klasifikáciu mamárnych nádorov u potkanov [8]. Detekcia parametrov CSCs bola realizovaná pomocou nepriamej imunohistochemickej metódy na celistvých parafrínových rezoch za použitia komerčne dostupných protilátok (Santa Cruz Biotechnology, Paso Robles, CA, USA; Dako, Glostrup, Denmark; Bioss, Woburn, MA, USA). Reprezentatívne oblasti rezov tkaniva boli nasnímané, pričom expresia proteínov bola kvantifikovaná ako priemerná percentuálna hodnota antigén pozitívnych oblastí v štandardných poliach (0,5655 mm²) "hot spot" oblastí rezu nádorového tkaniva. Na kvantifikáciu sa použila morfometrická analýza (QuickPhoto Micro, verzia 3.1, Promicra, Praha, Česká republika). V štatistickom hodnotení bola použitá 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).

Výsledky a diskusia

Tymián (1% v diéte) v našej štúdií signifikantne a dávkovo nezávislým spôsobom potlačil riziko experimentálneho karcinómu prsníka u samíc potkanov.

Hodnotenie parametrov nádorových kmeňových buniek preukázalo signifikantný pokles expresie CD44 v skupine s vyššou dávkou tymiánu v diéte voči kontrole. V skupine s nižšou dávkou tymiánu (0,1 %) sme pozorovali signifikantný pokles expresie ALDH1 voči kontrolným mamárnym nádorom. Analýza expresie CD24

nepreukázala signifikantné zmeny medzi liečenými a neliečenými skupinami (Obr. 1 a 2).

Nižšia expresia CD24, CD44, ALDH1 alebo iných markerov CSCs (napríklad EpCAM) je spájaná u pacientov s karcinómom prsníka s lepšou prognózou ochorenia [9]. Naša predchádzajúca štúdia s oreganom preukázala signifikantný pokles expresie CD24 a EpCAM v liečených mamárnych nádorových bunkách potkana *in vivo* [10]. Výsledky nedávneho experimentu s klinčekom preukázali v liečených mamárnych karcinómoch signifikantné zníženie expresie CD24 a CD44, na druhej strane nárast expresie ALDH1A1 [11]. Aktuálna štúdia s tymiánom v tom istom modeli mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov rovnako preukázala signifikantné zmeny expresie CD44 a ALDH1A1. Napriek skutočnosti, že mechanizmus anti-CSCs účinku fytochemikálií nie je dostatočne vysvetlený, naše výsledky zreteľne ukázali, že tak klinček, oregano, ako aj tymián signifikantne pozmenili expresiu klinicky významných markerov CSCs v mliečnej žľaze.

Výsledky existujúcich epidemiologických štúdií zatiaľ nedostatočným spôsobom podporujú koncepciu, že celistvé rastlinné (funkčné) potraviny môžu znižovať riziko prípadne zlepšovať prognózu nádorového ochorenia u ľudí. Výsledky našich experimentov poukazujú na zreteľný protinádorový účinok zmesi fytochemikálií obsiahnutých v rastlinných funkčných potravinách (*Chlorella pyrenoidosa*, mladý jačmeň, tmavé ovocie, oregano, klinček, tymián) v nami použitom experimentálnom modeli. Benefity širokého spektra rôznych fytochemikálií nachádzajúcich sa v nami skúmaných nutraceutikách/funkčných potravinách vyplývajú zo vzájomnej kombinácie ich biologických aktivít. Signifikantné protinádorové účinky prirodzených substancií boli dôsledkom aditívnych, prípadne synergických účinkov fytochemikálií a nie samostatne pôsobiacej látky. Sú však potrebné ďalšie mechanistické a klinické štúdie hodnotiace preventívnu či terapeutickú úlohu rastlinných celistvých potravín v procese karcinogenézy [12]. Na základe našich výsledkov možno dospieť k záveru, že pravidelná konzumácia testovaných funkčných potravín môže byť prospešná na zníženie rizika rakoviny prsníka u ľudí.

Záver

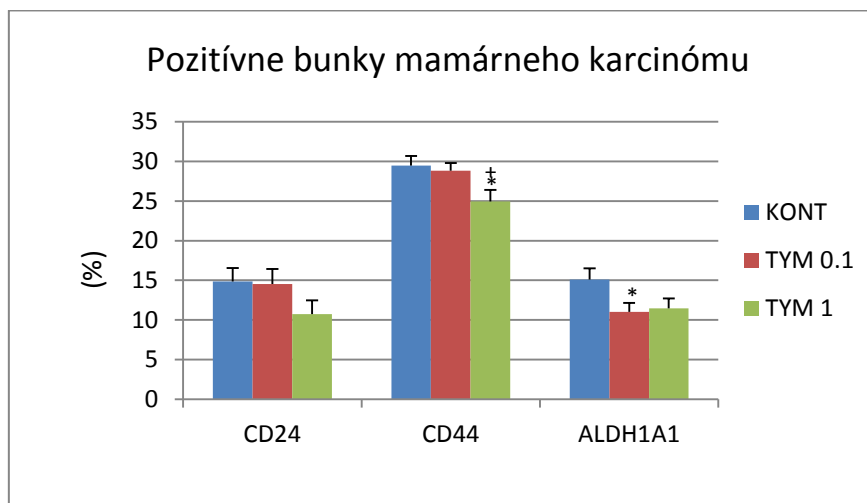
Vňať tymiánu prejavila signifikantný chemopreventívny účinok v modeli mamárnej karcinogenézy u samíc potkanov. Tymián preukázal signifikantný anti-CSCs efekt v karcinómoch mliečnej žľazy, čo možno považovať za jeden z mechanizmov jeho protinádorového pôsobenia. Naše výsledky predstavujú prvú zmienku v rámci vedeckého bádania, avšak definovanie presných mechanizmov zodpovedných za uvedené účinky si vyžadujú ďalšie analýzy (napr. definovanie špecifických signálnych dráh bunky) a to v rámci predklinických experimentov, ale aj klinických štúdií.

Finančná podpora bola zabezpečená grantom VEGA 1/0108/16.

Literatúra

- [1] Ferlay, *Int J Cancer*. **2010**, 127:2893-2917.
- [2] Kuo, *Free Rad Biol Med*. **2010**, 49:214-226.
- [3] Kawasaki, *Mol Interv*. **2008**, 8:174-183.
- [4] Ricardo, *J Clin Pathol*. **2011**, 64:937-946.
- [5] Rennó, *Toxicol Pathol*. **2015**, 43:400-410.
- [6] Al-Menhali, *J Med Food*. **2015**, 18, 54-9.
- [7] Bozkurt, *Nutr Cancer*. **2012**, 64:1245-50.
- [8] Russo, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. **2000**, 5:187-200.
- [9] Schmidt, *Ann Oncol*. **2010**, 21:275-282.

- [10] Kubatka, *Eur J Nutr.* **2017**, 56:1303-1316.
 [11] Kubatka, *J Cell Mol Med.* **2017**, 21:2837-2851.
 [12] Kubatka, *Vydavateľstvo UK v Bratislave*, **2017**, pp.202.



Obr. 1 Imunohistochemická analýza parametrov nádorových kmeňových buniek CD24, CD44 a ALDH1A1 u zvierat na konci experimentu – efekt tymiánu. Dáta sú vyjadrené ako priemery \pm SEM. Signifikančný rozdiel, * $P < 0,05$ vs KONT; † $P < 0,05$ vs TYM 0.1

PARAMETER	KONT	TYM 0.1	TYM 1
CD24			
CD44			
ALDH1A1			

Obr. 2 Reprezentatívne digitálne zábery imunohistochemickej analýzy parametrov nádorových kmeňových buniek CD24, CD44 a ALDH1A1 v mamárnych nádorových bunkách potkana bez a po liečbe tymiánom. Reprezentatívne zábery boli vybrané na základe výsledkov zhrnutých v Obr. 1. Zväčšenie: 400x.

Zmeny v zastúpení neurónov a astrocytov v mozgu potkana po expozícii ionizujúcim žiarením

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

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ³Univerzitná nemocnica Martin, Onkologické centru, Martin;

⁴Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed Martin-Divízia Neurovedy, Martin
balentova@jfm.ed.uniba.sk

Abstract

Ionizing radiation affects neuronal, glial, and endothelial cell population in the brain and lead to significant histopathological and functional deficits. In the present study we investigated radiation-induced subacute histopathological changes. Adult male Wistar rats received fractionated whole-brain irradiation (fWBI) with a total dose of 40Gy delivered in 5 fractions (dose 8Gy per fraction) once per week in the same weekday during 5 consecutive weeks. Histopathological changes were evaluated by immunohistochemical staining of brain sections to determine alteration of neurogenesis and glial cell response in two neurogenic regions: the anterior subventricular zone (SVZa) and following subventricular zone-olfactory bulb axis (SVZ-OB axis) and the hippocampal dentate gyrus (DG). Image analysis of the brain sections 16 weeks after the exposure showed a radiation-induced inhibition of neurogenesis and a weak astrocytic response. Results revealed presence of subacute and gradual development of late radiation-induced changes.

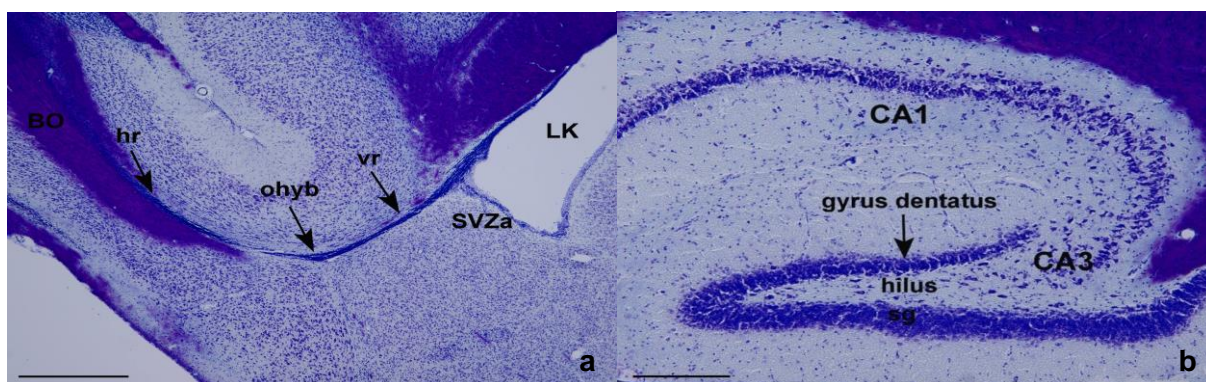
Key words: radiation-induced brain injury, neurogenesis, neurodegeneration

Úvod

Poškodenie mozgového tkaniva po frakcionovanej expozícii ionizujúcim žiarením je často sprievodným javom pri rádioterapii pacientov s primárnymi nádormi mozgu a metastázami. Na základe klinických prejavov a časovej postupnosti poznáme akútne, subakútne a neskoré symptómy poškodenia mozgu po ožiarení. Je známe, že u pacientov, ktorí absolvujú rádioterapiu primárnych nádorov mozgu sa po určitom čase môžu vyvinúť výrazné kognitívne zmeny bez in vivo detekovateľných štrukturálnych zmien [1]. Vzhľadom na narastajúcu skupinu pacientov s neskorými symptómami sa tento problém stáva čoraz viac akútnej. Zmeny v mozgovom tkanive po ožiarení odzrkadľujú zložitú interakciu medzi jednotlivými typmi buniek. Dôležitým fenoménom, ktorý často stojí v pozadí kognitívnych zmien je inhibícia neurogenézy. Experimentálne zvieracie štúdie ukazujú, že neurogenéza v dospelosti pretrváva v dvoch oblastiach: subvetrikulárnej zóne (SVZ) v stene bočných mozgových komôr a subgranulárnej zóne (SGZ) v gyrus dentatus (GD) hipokampu. Štúdie na zvieratách poskytujú prehľad o širokom spektre zmien na molekulárnej, bunkovej úrovni a tiež funkčné zmeny tkaniva mozgu po frakcionovanom ožiarení. Tieto zmeny zahŕňajú napr. poškodenie endotelu, aktiváciu mikrogliových buniek a astrocytov, inhibíciu neurogenézy, zvýšenú expresiu zápalových mediátorov a narušenie kognitívnych funkcií minimálne šesť mesiacov po ožiarení [2-5].

Materiál a metodika

Samce potkanov kmeňa Wistar vo veku 3-4 mesiace sme rozdelili na dve skupiny: kontrolnú (n=10) a druhú skupinu (n=7), ktorú sme ožiarili celkovou dávkou cD=40Gy ionizujúceho žiarenia rozdelenú na 5 frakcií, s dávkou na frakciu=8Gy. Ožarovaný objem predstavoval hlavu, krk a zdrojom žiarenia bol rádioizotop ^{60}Co (prístroj TERAGAM ÚJP Praha, ČR). Po uplynutí stanovenej doby prežívania po ožiarení (16 týždňov) sme vykonali celotelovú transkardiálnu perfúziu pomocou 4% paraformaldehydu a po dekapitácii sme z mozgových hemisfér narezali sériové sagitálne 30 μm zmrazené rezy. Metodikou Krezylová violet sme ilustračne znázornili oblasti v prednom mozgu s pretrvávajúcou neurogenézou. Imunofluorescenčným farbením tkanivových rezov sme detekovali proteín doublecortin (DCX), ktorý je markerom pre nezrelé neuróny a glial fibrillary acidic protein (GFAP), marker pre astrocyty. Počet fluorescenčne značených buniek sme vyhodnocovali v jednotlivých anatomických oblastiach osi subventrikulárna zóna - bulbus olfactorius (SVZ-BO): SVZa, vertikálne rameno, ohyb a horizontálne rameno a v stratum granulosum v gyrus dentatus (GD) hipokampu. Obrazovú analýzu preparátov sme uskutočnili pomocou programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD,USA).

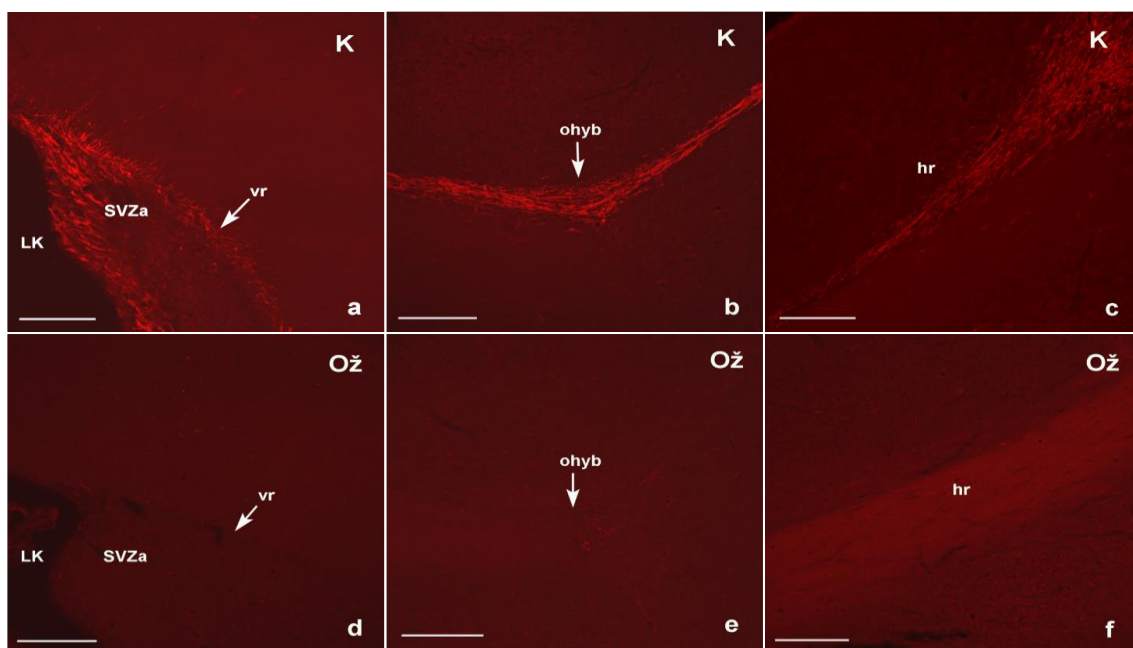


Obr. 1 Mikrofotografie sagitálneho rezu predného mozgu potkana, zobrazujúce dve hlavné oblasti neurogenézy: (a) predná stena subventrikulárnej zóny (SVZa) a na ňu nadväzujúca os subventrikulárna zóna – bulbus olfactorius (SVZ-BO) a (b) gyrus dentatus v hipokampe. Preparáty boli farbené metodikou Krezylová violet. LK – laterálna komora; vr – vertikálne rameno; hr – horizontálne rameno; CA1, CA3 – cornu ammonis 1, 3; sg – stratum granulosum. Mierky: a=500 μm ; b=200 μm .

Výsledky a diskusia

Frakcionované ožiarenie celkovou dávkou 40Gy malo za následok elimináciu počtu DCX imunoreaktívnych (DCX-IR) neuroblastov v takmer všetkých hodnotených oblastiach pozdĺž osi SVZ-BO. Po signifikantnom poklese v SVZa (Ož: $62,6 \pm 11,82/\text{cm}^2$ verzus K: $563,75 \pm 78,6/\text{cm}^2$; $P < 0,001$) nasledovalo vymiznutie populácie neuroblastov vo vertikálnom ramene (Ož: žiadne bunky vz. K: $309,64 \pm 75$; $P < 0,001$), ohybe (Ož: $0,25 \pm 0,18$ vz. K: $468,25 \pm 57,90$; $P < 0,001$) a v horizontálnom ramene (Ož: žiadne bunky vz. K: $444,07 \pm 60,62$; $P < 0,001$). Po ožiarení sme zistili neočakávaný pokles populácie GFAP-imunoreaktívnych astrocytov v takmer všetkých oblastiach pozdĺž osi SVZ-BO, a to v SVZa (Ož: $631,87 \pm 58,30$ vz. K: $781,85 \pm 80,85$), vertikálnom ramene (Ož: $515,06 \pm 44,44$ vz. K: $841,36 \pm 82,74$) a v ohybe (Ož: $759,71 \pm 75,57$ vz. K: $1216,10 \pm 127,12$; $P < 0,05$), s výnimkou mierneho nárastu v horizontálnom ramene (Ož: $832,67 \pm 93,23$ vz. K: $644,60 \pm 80,51$). V GD sme zistili tiež mierny pokles počtu astrocytov (Ož: $1245,40 \pm 133,32$ vz. K: $1580,90 \pm 162,52$). Výrazná redukcia až eliminácia počtu neuroblastov pozdĺž osi SVZ-BO 16 týždňov po frakcionovanom ožiarení je v súlade s výsledkami našich

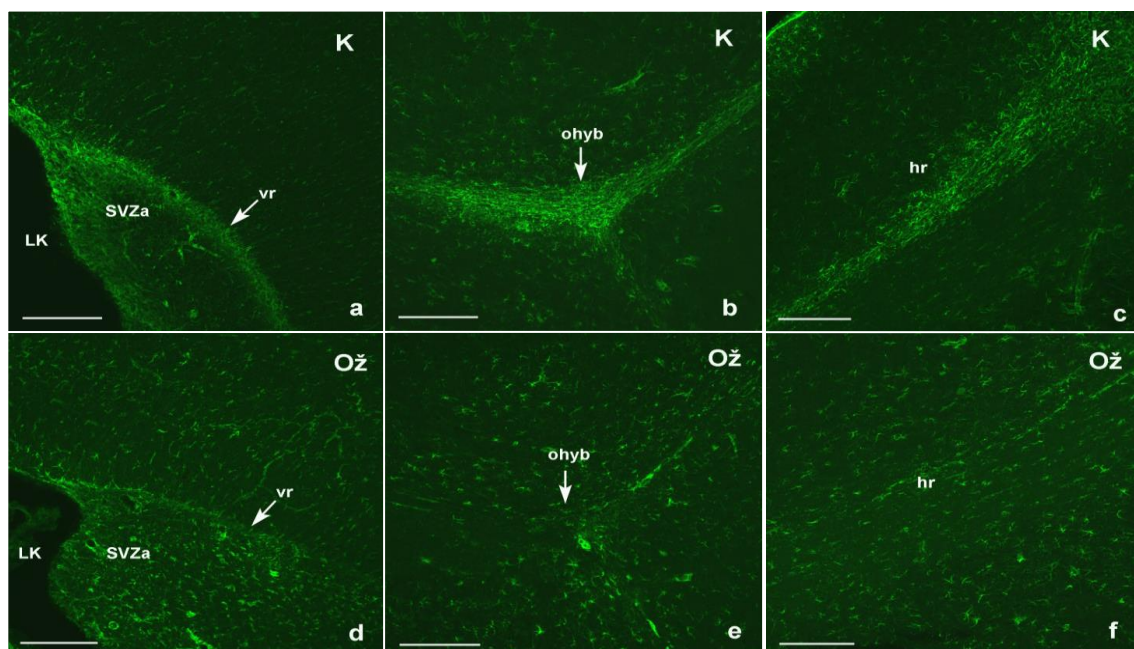
predchádzajúcich štúdií [6-7]. V našej najnovšej práci viedlo frakcionované ožiarenie (celková dávka=20Gy, rozdelená na 4 frakcie, 1 frakcia=5Gy) k porovnateľnému signifikantnému zníženiu počtu neuroblastov približne tri mesiace po ožiarení [7]. Po ožiarení vyššou celkovou dávkou (cD=35Gy; rozdelená na 7 frakcií, 1frakcia=5Gy) došlo k signifikantnému poklesu DCX-IR buniek pozdĺž osi SZ-BO päť až šesť mesiacov po expozícii [6]. Výsledky našich prác ukazujú, že frakcionované ožiarenie malo za následok vymiznutie populácie neuroblastov, a to bez ohľadu na veľkosť dávky a dobu prežívania po ožiarení. Iné štúdie tiež uvádzajú, že primárnym cieľom ionizujúceho žiarenia sú neuroblasty, ich prekursori a nervové kmeňové bunky [8]. Výsledky sú v súlade s predchádzajúcimi poznatkami o neschopnosti nervových kmeňových buniek regenerovať a obnoviť svoje pôvodné počty niekoľko mesiacov po ožiarení [9, 6, 7].



Obr. 2 Mikrofotografie sagitálnych rezov mozgov kontrolných (K) a ožiarených (Ož) potkanov prežívajúcich 16 týždňov po frakcionovanej expozícii ionizujúcim žiarením (cD=40Gy). Preparáty boli farbené imunofluorescenčne na detekciu doublecortinu (DCX), markera pre nezrelé neuróny – neuroblasty (červená fluorescencia). V mozgu ožiarených potkanov (d-f) došlo v porovnaní s kontrolnými jedincami (a-c) k takmer úplnému vymiznutiu DCX-imunoreaktívnych neuroblastov. Vysvetlivky sú uvedené pod Obr. 1. Mierky: a-f=200 µm.

Z klinického hľadiska ide o dôležitý poznatok, lebo terapeutické dávky žiarenia pri liečbe primárnych nádorov mozgu a metastáz sú vyššie, ako dávky, ktoré inhibujú neurogenézu [10]. Eliminácia DCX-IR neuroblastov pozdĺž osi SVZ-BO bola sprevádzaná prekvapujúcim znížením počtu astrocytov, ktoré sprevádzajú neuroblasty počas ich migrácie do BO. V predchádzajúcich štúdiách sme po expozícii subletálnymi (3, 4Gy), klinicky relevantnými dávkami (celková dávka=35Gy) a rôznymi intervalmi prežívania (týždeň až šesť mesiacov) zaznamenali signifikantný nárast počtu GFAP-imunoreaktívnych (GFAP-IR) astrocytov pozdĺž osi SVZ-BO. V iných prácach sa uvádza, že frakcionované ožiarenie vedie k aktivácii astrocytov a mikrogliových buniek minimálne šesť mesiacov po expozícii [2, 4]. V našej štúdii sme pomocou in vivo protónovej magnetickej rezonančnej spektroskopie zistili pokles koncentrácie metabolitu, ktorý je markerom pre astrocyty prítomné v sivej hmote mozgu. Histopatologické zmeny v zastúpení astrocytov boli v zhode s detekovanými metabolickými zmenami. Pokles počtu astrocytov môže predstavovať prechodný,

latentný stav, nasledovaný zvýšením expresie GFAP a pravdepodobne aj astrogliózou.



Obr. 3 Mikrofotografie sagitálnych rezov mozgov kontrolných (K) a ožiarených (Ož) potkanov prežívajúcich 16 týždňov po frakcionovanej expozícii ionizujúcim žiarením (cD=40Gy). Preparáty boli farbené imunofluorescenčne na detekciu glial fibrillary acidic protein (GFAP), markera pre astrocyty (zelená fluorescencia). V mozgu ožiarených potkanov (d-f) došlo v porovnaní s kontrolnými jedincami (a-c) k miernemu poklesu počtu GFAP-IR astrocytov. Vysvetlivky sú uvedené pod Obr. 1. Mierky: a-f=200 μ m.

Záver

Histopatologické zmeny v zastúpení neurónov v neurogénnych oblastiach mozgu môžu byť predzvesťou rozvoja závažnejších kognitívnych dysfunkcií a štrukturálnych zmien. Výsledky poukazujú na to, že predklinický výskum je nevyhnutný pre uplatnenie výsledkov v klinickej praxi.

Práca bola financovaná z prostriedkov grantov VEGA č. 1/0129/16, 1/0128/16, 1/0243/18, APVV č. 15/0107 a z projektov „Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení“, kód: 26220220114 a „Centrum translačnej medicíny“, kód: 26220220021, spolufinancovanými zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Sundgren, *Neuroimaging Clin N Am.* **2009**, 19:657-68.
- [2] Ciciarello, *Neurosurgery.* **1996**, 38:772-779.
- [3] Gaber, *Int J Radiat Biol.* **2003**, 79:359-366.
- [4] Yuan, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **2006**, 66:860-866.
- [5] Rola, *Exp Neurol.* **2004**, 188:316-330.
- [6] Bálentová, *Neurotoxicology.* **2017**, 60: 70-81.
- [7] Bálentová, *Int J Radiat Biol.* **2018**, 94: 238-247.
- [8] Mizumatsu, *Cancer Res.* **2003**, 63:4021-4027.
- [9] Tada, *Exp Neurol.* **1999**, 160:66-77.
- [10] Wong, *Mol Interv.* **2004**, 4:273-284.

***In vivo* ^1H MRS štúdia účinkov frakcionovaného ionizujúceho žiarenia na neuróny v hipokampe a bulbus olfactorius mozgu potkanov**

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

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed Martin-Divízia Neurovedy, Martin; ²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ³Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ⁴Univerzitná nemocnica Martin, Klinika rádioterapie a onkológie, Martin
petra.hnilicova@jfm.uniba.sk

Abstract

Ionizing radiation influences neuronal, glial, and endothelial cell population in the brain and lead to significant metabolic, histopathological and functional deficits. The most affected post-radiation mechanism is neurogenesis that is spatially restricted into the specific brain regions, predominantly in hippocampal dentate gyrus and in the in the subventricular zone-olfactory bulb axis. In this experimental study we explored the radiation-induced metabolic changes in dorsal hippocampus and olfactory bulb of rat brain using the proton magnetic resonance spectroscopy (^1H MRS), involving 7T MR scanner. Eighteen weeks after the whole brain ^{60}Co irradiation with the total dose of 35Gy in 7 fractions, irradiated ($n=5$) and sham-irradiated ($n=5$) animals underwent *in vivo* MR-examination. ^1H MRS in dorsal hippocampus was measured by multivoxel-CSI sequence with the voxel volume of 9.68 μl and in olfactory bulb by singlevoxel-SVS method with the volume of 27 μl . In irradiated animal group was found significant decrease in the total N-acetyl aspartate to total creatine (tNAA/tCr) ratio in both selected brain areas. These results showed that fractionated whole-brain irradiation led to the loss of neuronal viability and function. Metabolic changes were closely associated with histopathological findings, i.e. increasing neurodegeneration (Fluoro-Jade C detection) and inhibition of neurogenesis (DCX-detection).

Keywords: Ionizing radiation, ^1H MRS, brain, neurodegeneration

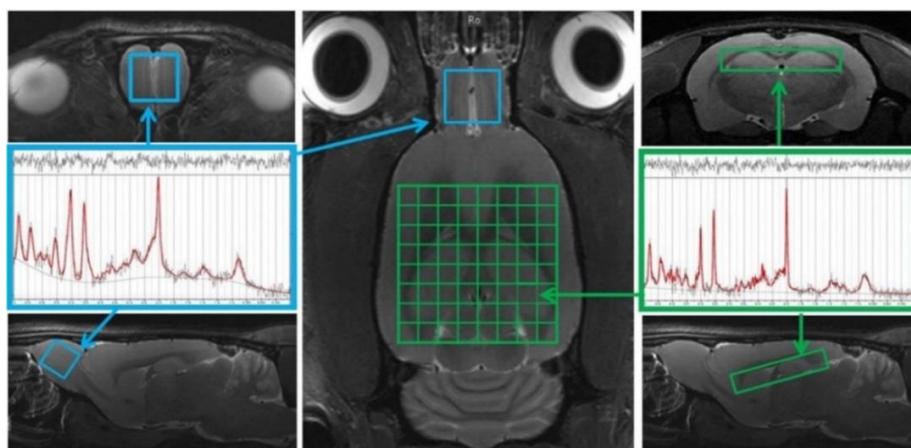
Úvod

Frakcionované ionizujúce žiarenie je v klinickej onkologickej praxi rutinne využívané pri rádioterapii mnohých typov intrakraniálnych nádorov a metastáz [1]. Negatívnym sprievodným javom liečby však ostáva radiačne-indukované poškodenie centrálnej nervovej sústavy (CNS) - metabolické, histopatologické, ale aj funkčné deficity v tkanive mozgu [2,3]. Výrazne narušený býva cievny endotel [2], ale aj hematoencefalická bariéra [1], prejavuje sa abnormálna expresia génov alebo je iniciovaná apoptóza gliových buniek [4,5]. Preukázané zmeny nastávajú aj v procesoch neurogenézy, ktorej zdroj je lokalizovaný predovšetkým v hipokampálnom gyrus dentatus (GD) a pozdĺž osi subventrikulárna zóna – bulbus olfactorius (SVZ-OB) [6,7]. Cieľom tejto štúdie bolo preto analyzovať metabolické zmeny v dorzálnom hipokampe a v bulbus olfactorius (BO) mozgu animálneho modelu skorého poškodenia CNS frakcionovaným ožarovaním ^{60}Co s biologicky efektívnou dávkou (BED; 117 Gy) ekvivalentnou terapeutickú dávku bežne aplikovanej pri nádorovej rádiologickej liečbe [1,8]. Experimentálny výskum bol založený na *in vivo* vyšetrení relatívnych koncentrácií metabolitov skúmaného

tkaniva mozgu pomocou protónovej magnetickej rezonančnej spektroskopie (^1H MRS) a *in vitro* imunohistochemických farbiacich metódach potvrdzujúcich účinky frakcionovaného ionizujúceho žiarenia.

Materiál a metodika

Do štúdie bolo zaradených desať 4-mesačných samcov potkanov rodu Wistar (Velaz, Praha, ČR). Piatí jedinci podstúpili pod vplyvom anestézie (i.p: ketamín hydrochlorid + s.c.: xylazín hydrochlorid) frakcionované ionizujúce žiarenie rádioaktívnym izotopom ^{60}Co celého mozgu (Teragam KO-2, UJP, Praha, ČR) v celkovej dávke 35 Gy (7 frakcií po 5 Gy), ktorá je ekvivalentná biologickej efektívnej dávke BED = 117 Gy. Osemnásť týždňov po poslednej radiačnej dávke boli všetky zvieratá merané prostredníctvom 7 T MR skeneru Bruker BioSpec 70/20 (Bruker, Ettlingen, Nemecko). Počas MR vyšetrenia boli zvieratá regulovane anestéziované (3,5-5,5% sevofluran a O_2). Súčasťou MR-meracieho protokolu bolo T_2 -vážené anatomické MRI v troch ortogonálnych rezoch s nasledujúcimi parametrami: TR opakovací čas/TE echo čas = 2680/40 ms; počet priemerov 2; oblasť zobrazenia FOV = 35x35 mm²; veľkosť obrazu = 256x256; 23 rezov s hrúbkou rezu 0,5 mm. Spektroskopické dáta z *dorzálneho hipokampu* (Obr.1) boli získané pomocou multivoxelovej CSI (chemical shift imaging) spektroskopie s reálnou veľkosťou voxela 2,75x2,2x1,6 mm³ (TR/TE = 1500/20 ms; 36 priemerov; 8x8 CSI matica s nominálnou veľkosťou voxela 8x10x1,6 mm³; FOV = 22x22 mm²). V oblasti BO (Obr.1) bola využitá jednovoxelová SVS (single voxel spectroscopy) metóda s reálnou veľkosťou voxelov 3x3x3 mm³ (TR/TE = 1500/20 ms; 200 priemerov). Všetky ^1H MRS dáta boli kvantifikované pomocou LCModelu (verzia 6.3-1K, S. Provencher, Kanada), pričom sme sa zamerali na metabolický pomer tNAA (spoločný signál N-acetyl-aspartátu a N-acetyl-aspartyl-glutamátu) ku tCr (signál kreatín-obsahujúcich zlúčenín). Po ukončení MR časti experimentu boli všetky zvieratá po navodení anestézie dekapitované. Mozgy boli po vyňatí postfixované pri 4°C v 30% sacharóze, po oddelení oboch hemisfér zamrazené a následne spracované na sériu sagitálnych 30 µm rezov. Vzorky boli pripravované pre histochemické Fluoro-Jade C⁺ farbenie a imunohistochemickú DCX (doublecortinu) analýzu podľa postupov uvedených v Báľentová et al. 2017 [9].



Obr. 1 T_2 -vážené ortogonálne MRI rezy s vykreslením umiestnenia CSI mriežky (veľkosť voxela 8x10x1,6 mm³) v oblasti *dorzálneho hipokampu* (zelená) a lokalizáciou SVS voxelu (veľkosť voxela 3x3x3 mm³) v BO (modrá) mozgu potkana spolu s reprezentatívnymi ^1H MR spektrami danej oblasti.

Výsledky

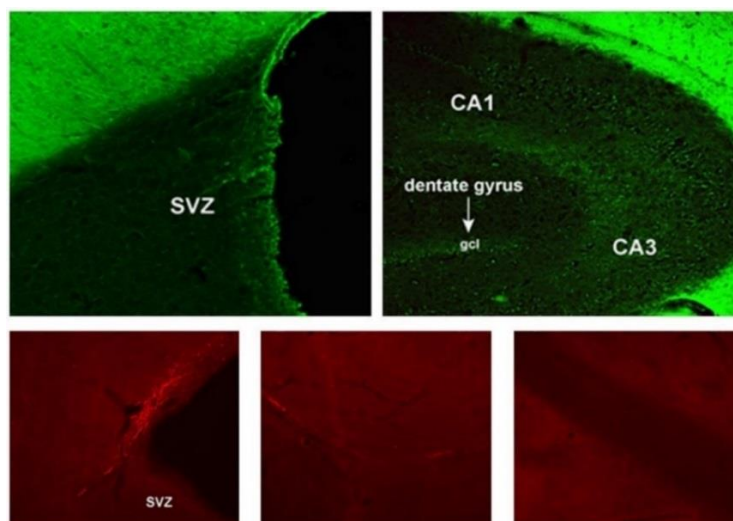
Hodnoty relatívnych koncentrácií tNAA/tCr dorzálneho hipokampu a BO mozgu potkanov spolu so štatistickým porovnaním ožiarenej a kontrolnej skupiny,

vykonaným na základe nepárového dvojstranného t-testu v softvéri SPSS (verzia 15.0; Chicago; USA), sú znázornené v Tab.1. Štatisticky významná hladina $p=0,05$. Z výsledkov štúdie bol zrejmy signifikantný úbytok tNAA/tCr v oboch sledovaných oblastiach mozgu ožiarenej skupiny.

Tabuľka 1 Relatívne koncentrácie metabolického pomeru tNAA/tCr v dorzálnom hipokampe a BO mozgu potkanov kontrolnej a ožiarovanej skupiny potkanov.

relatívna koncentrácia tNAA/tCr (priemer \pm SD)	kontrola (n=5)	ožiarené (n=5)	nepárový t-test (p)
dorzálny hipokampus	1,54 \pm 1,18	0,67 \pm 0,17	0,046
BO	1,21 \pm 0,16	0,96 \pm 0,20	0,040

V oblasti SVZ-OB a v hipokampálnej oblasti GD sme detegovali degenerujúce neuróny pomocou metodiky Fluoro-Jade C. (Obr. 2). Pozdĺž osi SVZ-BO bol navyše na základe imunofluorescenčného farbenia proteínu DCX evidentný výrazný pokles až eliminácia migrujúcich a deliacich sa neuroblastov (Obr. 2).



Obr. 2 Reprezentatívne mikrofotografie predného mozgu ožiarených potkanov, znázorňujúce Fluoro-Jade C⁺ značené degenerujúce neuróny (zelená fluorescencia) a imunofluorescenčné farbenie na detekciu DCX-imunoreaktívnych neuroblastov (červená fluorescencia) pozdĺž osi SVZ-BO a v hipokampálnej oblasti GD.

Diskusia

Ionizujúce žiarenie ovplyvňuje populácie neurónov, gliových, ale aj endotelových buniek v mozgu a vyvoláva morfológické, metabolické, a funkčné deficity v CNS [1,2]. Najvýraznejším radiačne-indukovaným zmenám podliehajú procesy neurogenézy, ktoré sú za fyziologických podmienok priestorovo obmedzené pozdĺž osi SVZ-OB a v subgranulárnej zóne GD dorzálného hipokampu [6,7]. V tejto experimentálnej *in vivo* MR-štúdii, zameranej na skoré post-radiačné neurálne zmeny v dorzálnom hipokampe a BO mozgu potkanov, sme pozorovali štatisticky významný pokles tNAA/tCr v oboch sledovaných oblastiach. tNAA je syntetizovaný v mitochondriách neurónov a transportovaný k oligodendrocytom, kde slúži ako zdroj acetylových skupín pre syntézu lipidov a bielkovín [10,11]. Preto je tento spektroskopický pík považovaný za marker viability a funkčnosti neurónov a ich axónov [10,12]. Bolo dokázané, že pokles relatívnej koncentrácie jeho metabolického pomeru tNAA/tCr koreluje s narastajúcou nerodegeneráciou, ako aj zvýšenou inhibíciou neurogenézy v tkanive mozgu [10,13]. Oba patologické procesy sú

v odbornej literatúre často uvádzané ako typické radiačne-indukované poškodenie mozgu spôsobené predovšetkým narušením hematoencefalickej bariéry a cievneho endotelu, aktiváciou mikroglií, apoptózou oligodendocytov, zvýšenou expresiou astrocytov či zmenami synaptickej plasticity alebo aj génovej exprese [4,6]. Okrem metabolických alternácií v oboch sledovaných oblastiach sme pozdĺž osi SVZ-BO a v hipokampálnom GD pozorovali výrazný nárast Fluoro-Jade C⁺ značených degenerujúcich neurónov v skupine ožiarených zvierat. Vzhľadom na to, že toto histochemické farbenie fluorescenčne označuje telá, dendrity, ale aj axóny poškodených neurónov predpokladáme, že pozorovaný masívny nárast neurodegenerácie pravdepodobne nastal v dôsledku skorého poškodenia mozgu radiačným žiarením [9,14]. Navyše sme pozdĺž osi SVZ-BO ožiarenej skupiny zvierat pozorovali znížený výskyt DCX-imunoreaktívnych migrujúcich a deliacich sa neuroblastov. To je v súlade so štúdiami poukazujúcimi na neschopnosť SVZ-OB regenerovať populáciu buniek a obnoviť tak pôvodné počty kmeňových buniek a prekursorov niekoľko mesiacov po ožiarení [9,14]. Uvedené metabolické a histologické zmeny tkaniva môžu byť zároveň zosilnené poklesom proliferatívnej kapacity gliových buniek alebo endotelových buniek, ktoré taktiež nastávajú vplyvom ionizujúceho žiarenia [2,13]. Výsledky naznačujú, že už v krátkom čase po klinicky relevantnom, frakcionovanom radiačnom ožiarení mozgu experimentálnych zvierat nastávajú výrazné metabolické a morfológické zmeny v dorzálnom hipokampe, ale aj pozdĺž osi SVZ-OB s výrazným dopadom na neurodegeneráciu a neurogenézu radiačne-poškodeného tkaniva.

Záver

V našej *in vivo* ¹H MRS štúdii sme potvrdili zvýšenú inhibíciu neurogenézy spolu s výraznou neurodegeneráciou tkaniva dorzálného hipokampu a pozdĺž osi SVZ-OB radiačne-poškodeného mozgu potkanov v dôsledku skorého narušenia tkaniva CNS radiačným žiarením s dávkou ekvivalentnou klinicky aplikovaným hladinám počas nádorovej rádioterapie. Z klinického hľadiska je modelovanie radiačného-poškodenia mozgu dôležitá experimentálna úloha, keďže rádioterapeutické dávky využívané pri intrakraniálnych nádoroch často prevyšujú hodnoty nevyhnutné na zachovanie neurogenézy a neuroprotektie.

Podporené projektami CENTRUM TRANSLAČNEJ MEDICÍNY (ITMS: 26220220021), Martinské Centrum pre Biomedicínu (ITMS: 26220220187), spolufinancovaná grantami VEGA 1/0129/16, 1/0128/16, 1/0243/18 a APVV-14-0088 podporená zo zdrojov Operačného Programu Výskum a Inovácie ERDF a EU zdrojov.

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] Lledo, *Nat Rev Neurosci.* **2006**, 7:179-193.
- [7] Kempermann, *J Neurosci.* **2002**, 22:635-638.
- [8] Fowler, *Br J Radiol.* **2010**, 83:554-568.
- [9] Bálintová, *NeuroToxicology.* **2017**, 60:70-81.
- [10] Barker, *Clinical MR Spectroscopy (Cambridge).* **2010**, p. 1-18.
- [11] Garrett and , Grisham, *Biochemistry.* **2008**, ISBN 0-495-10935-5.
- [12] Soares and Law, *Clin Radiol.* **2009**, 64/1:12-2.
- [13] Chan, *J Magn Reson Imaging.* **2009**, 29:1013-1020.
- [14] Raber, *Radiat Res.* **2004**, 162:39-47.

Elektromagnetická radiácia a jej vplyv na štruktúru a ultraštruktúru pečene u juvenilných potkanov

Holovská, K.¹, Almášiová, V.¹, Šimaiová, V.¹, Račková, E.², Cigánková, V.¹

¹ Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Ústav histológie a embryológie, Košice;

² Slovenská akadémia vied, Neurobiologický ústav, Košice

katarina.holovska@uvlf.sk

Abstract

The aim of this study was to observe structural and ultrastructural changes in liver of adolescent rats exposed to pulsed non-ionizing electromagnetic radiation. Experimental rats were irradiated by pulsed electromagnetic field at a frequency of 2.45 GHz and mean power density of 2.8 mW/cm² 3 h a day per 3 weeks. Samples of the liver were obtained after the last irradiation and processed for light and transmission electron microscopy. Data demonstrated that the structure of liver was not changed markedly. In some lobuli small inflammatory foci were observed in the periportal zones. The ultrastructure of hepatocytes was comparable with that in the control group. The significant changes were detected in the wall of liver sinusoids where enlargements of the fenestrations in the endothelium were observed. In these areas the space of Disse was damaged and the basal surface of hepatocytes was directly exposed to blood. In these areas the plasma membrane of hepatocytes was smooth without the microvilli.

Keywords: liver, electromagnetic radiation, structure, ultrastructure

Úvod

V modernej spoločnosti sú ľudia ako aj zvieratá bežne vystavovaní vplyvu elektromagnetickej radiácie (EMR). Hlavným zdrojom EMR sú mobilné telefóny, antény prenosových staníc, radary, Wi-Fi, ako aj mnohé ďalšie zariadenia. Biologický účinok EMR závisí od mnohých faktorov, ako sú charakter poľa, použitý rozsah frekvencií, intenzita a doba pôsobenia. Početné výskumy, ktoré sledovali vplyv EMR na organizmus poukázali na množstvo zmien hlavne v nervovom systéme [1, 2]. Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv EMR na štruktúru a ultraštruktúru pečene u juvenilných potkanov, ktoré boli vystavené žiareniu 3 hodiny denne po dobu 3 týždňov.

Materiál a metodika

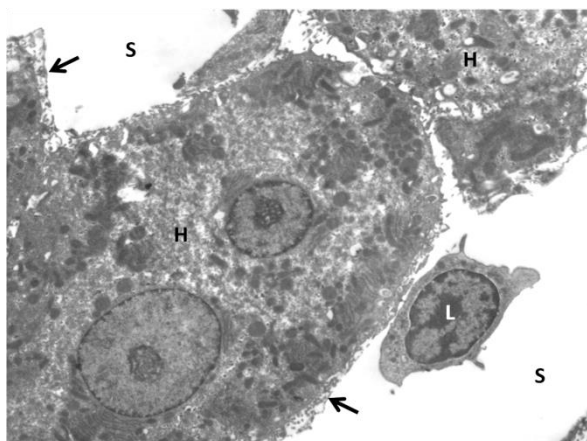
Potkany (Wistar) vo veku 14 dní, boli rozdelené do dvoch skupín, kontrolnej (n=6) a experimentálnej (n=6). Experimentálne zvieratá boli vystavené elektromagnetickému žiareniu 2,45 GHz, 3 hodiny denne po dobu 3 týždňov. Na tento účel bolo skonštruované špeciálne zariadenie, ktoré slúžilo ako zdroj elektromagnetického žiarenia. Vzorky pečene z kontrolných a experimentálnych zvierat boli odobraté hneď po poslednej aplikácii EMR. Tkanivo bolo fixované v 10% neutrálnom formole a zaliate do parafínu. Histologické rezy 7–12 µm boli ofarbené hematoxylín-eozínom, montované do Entelanu a fotografované svetelným mikroskopom Jenamed. Vzorky pečene pre elektrónovú mikroskopiu boli fixované v 3 % glutaraldehydom pufri a postfixované 1% OsO₄ a zaliate do Durcupanu ACM. Ultratenké rezy boli pozorované elektrónovým mikroskopom Tesla BS 500.

Výsledky

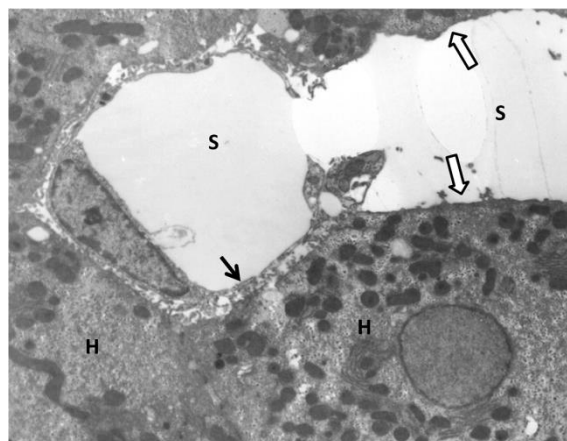
V experimentálnej skupine bola štruktúra pečene porovnateľná s kontrolou skupinou.

Pečeňový lalôčik mal zachovaný tvar a veľkosť. Nepozorovali sme žiadne zápalové zmeny v blízkosti v. *centralis* a ani v portobiliárných priestoroch. V niektorých lalôčikoch sme ojedinele pozorovali drobné zápalové ložiská, ktoré sa vyskytovali na hranici medzi susednými pečeňovými lalôčikmi.

Pri sledovaní ultraštruktúry hepatocytov sme v experimentálnej skupine nepozorovali žiadne výrazné zmeny. Mitochondrie a granulované endoplazmatické retikulum, mali zachovanú ultraštruktúru. V cytoplazme hepatocytov sme však pozorovali vakuoly, ktoré sa vytvárali v blízkosti cytoplazmatickej membrány, na vaskulárnom póle hepatocytov. Vakuoly mali homogénny vzhľad a často sa v ich tesnej blízkosti vyskytovali mitochondrie. Endotelové bunky, ktoré vystielajú pečeňové sínusoidy, mali zachovanú ultraštruktúru. Endotelové bunky mali dobre viditeľné fenestrácie, ktoré však na mnohých miestach boli rozšírené v porovnaní s kontrolou. V niektorých úsekoch pečeňových sínusoid sme pozorovali aj výraznejšie poškodenie endotelovej výstelky. To sa prejavilo chýbajúcim ohraňovaním Disseho priestoru. V týchto miestach boli hepatocyty priamo v kontakte s lúmenom sínusoid. Cytoplazmatická membrána týchto hepatocytov mala na vaskulárnom póle nepravidelné, redukované, až vymiznuté mikrokylky (Obr. 1 a 2).



Obr. 1 Elektrónogram pečene, kontrolná skupina. H - hepatocyt, S - sínusoidy, L - lymfocyt, ↑ - endotelové bunky. Zväčšenie 5 300x



Obr. 2 Elektrónogram pečene, experimentálna skupina. H - hepatocyt, S - sínusoidy, ↑ - endotelové bunky, ↑↑ - chýbajúci Disseho priestor. Zväčšenie 5 300x

Diskusia

V súčasnej dobe sa stále častejšie objavujú štúdie, ktoré sa intenzívne venujú sledovaniu účinku EMR na zdravie človeka, ako aj zvierat. Nepriaznivý účinok EMR na tkanivá a orgány dokazujú mnohé práce, v ktorých autori pozorovali zmeny nielen v nervovom systéme, ale aj v orgánoch, ako sú semenníky [3], pľúca [4], slinné žľazy [5] a srdce [4]. Morfológické zmeny rôzneho rozsahu boli pozorované aj v pečeni. Al-Glaib a kol. [6] pozorovali zápal pečene a vakuolizáciu hepatocytov u myší. U potkanov, ktoré boli vystavené žiareniu 1 h denne o intenzite 900 MHz po dobu 3 a 6 mesiacov, bola pozorovaná steatóza, nekróza, zmnoženie väziva a zápalové zmeny rôzneho rozsahu [7]. V našom pokuse sme sa zamerali na zmeny v štruktúre a ultraštruktúre pečene u juvenilných potkanov. Naše výsledky poukázali na to, že nami krátkodobo použitá dávka EMR nespôsobila výraznejšie zmeny v štruktúre sledovaného orgánu. Avšak na úrovni TEM sme v hepatocytoch pozorovali vakuoly, ktoré sa vyskytovali v blízkosti cytoplazmatickej membrány na vaskulárnom póle buniek. Podobné výsledky sme zistili aj u pohlavne dospelých potkanov. U týchto

experimentálnych zvierat došlo vplyvom EMR k miernej hyperémii a dilatácii pečňových sínusoid. Elektrónová mikroskopia odhalila okrem vezikúl aj proliferáciu hladkého endoplazmatického retikula [8]. Okrem vyššie uvedených zmien sme u jevenilných potkanov pozorovali výrazné zmeny vo výstelke pečňových sínusoid. Na niektorých miestach došlo k úplnému vymiznutiu endotelových buniek, čím sa hepatocyty dostali do priameho kontaktu s lúmenom sínusoid. Avšak u dospelých potkanov sme takéto zmeny v ultraštruktúre endotelových buniek nezistili [8].

Záver

Ako vyplýva z našich výsledkov, elektromagnetické žiarenie 2,45 GHz aplikované 3 hodiny denne po dobu 3 týždňov, nespôsobilo výrazné morfológické zmeny v pečeni u pohlavne nedospelých potkanov. Pravdepodobne to súvisí s intenzitou žiarenia, ako aj pomerne krátkou dobou, ktorej boli experimentálne zvieratá vystavené EMR. Napriek tomu mnohé práce poukazujú na možné riziko, ktoré je spojené s EMR.

Práca bola finančne podporená grantovou agentúrou VEGA 1/0060/18.

Literatúra

- [1] Stam, *Brain Res Rev.* **2010**, 5:80-97.
- [2] Orendáčová, *Acta Histochemica.* **2011**, 113:723-728.
- [3] Almášiová, *Acta Vet Brno.* **2017**, 86:413-419.
- [4] Hanafy, *Res J Medicine & Med Sci.* **2010**, 5:95-99.
- [5] Aydogan, *Forum Allergy Rhinol.* **2015**, 5: 626-32.
- [6] Al-Glaib, *Libyan J Med.* **2008**, 3:8-9.
- [7] El- Bediwi, *J Med Sci.* **2011**, 11:265-260.
- [8] Holovská, *J Toxicol Environ Health, Part A.* **2015**, 78:353-356.

Indukcia mnohjadrových gigantických buniek v semenníkoch juvenilných potkanov vplyvom 2.45 GHz mikrovlnného žiarenia

Almášiová, V.¹, Holovská, K.¹, Cigánková, V.¹, Šimaiová, V.¹, Račeková, E.²

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach, Katedra anatómie, histológie a fyziológie, Ústav histológie a embryológie, Košice; ²Slovenská akadémia vied, Neurobiologický ústav, Košice
viera.almasiova@uvlf.sk

Abstract

The present study was designed to determine the possible negative effect of microwave pulsed radiation on the testicular tissue of juvenile rats. 14 days old rats were exposed to 2.45 GHz radiofrequency radiation at a mean power density of 2.8 mW.cm⁻² 2 h a day per 3 weeks. Immediately after the last exposure, the tissue samples were obtained and processed for histopathological examination. Some seminiferous tubules revealed the presence of multinucleated giant cells and the epithelium contained many irregular empty spaces after cellular sloughing. Sloughed immature germ cells were often found within the lumens of seminiferous tubules. The interstitium housed dilated and congested blood vessels. The results of the present work showed the distinct negative effect of pulsed microwave radiation on structure of juvenile rats.

Keywords: microwave radiation, gigantic cells, testes, juvenile rats

Úvod

Ľudská populácia je v súčasnej dobe do značnej miery nepretržite exponovaná vplyvom umelého neionizujúceho elektromagnetického žiarenia. Zdrojmi radiácie sú najmä prístroje používané na transport elektronických dát na veľké vzdialenosti prostredníctvom mikrovln ako mobilné telefóny, bezdrôtové telefóny, bluetooth a Wi-Fi zariadenia, baby monitory a ďalšie. Neionizujúce žiarenie síce nedokáže narúšať chemické väzby atómov a molekúl – ionizovať hmotu, avšak pri dostatočnej intenzite v hmote môže spôsobiť vibrácie a rotácie atómov, a tým narúšať jej stabilitu.

Z pohľadu interakcie neionizujúceho žiarenia so živou hmotou je známy jeho tepelný a netepelný efekt. Tepelné účinky vznikajú, ak výkonová hustota žiarenia pd (power density) – množstvo energie žiarenia ktoré pod pravým uhlom dopadne na jednotku povrchu tkaniva za sekundu, presiahne úroveň 100 W/m². Rovnako interakciu žiarenia so živou hmotou charakterizuje aj hodnota SAR (Specific absorption Rate) - množstvo energie absorbovanej tkanivom za sekundu. Pre kontrolované expozície boli pre celotelové ožiarovanie stanovené expozičné limity pd 50 W/m² a SAR 0,4 W/kg. Je však potrebné poznamenať, že tieto limity boli vypočítané s použitím umelého modelu ľudského tela a stanovené pre časový limit 6 minút [1]. Rovnako tieto limity nerešpektujú špecifické vlastnosti tkanív ako je vyšší obsah vody v mladom tkanive alebo špecifickú štruktúru opuzdrených orgánov so zníženou schopnosťou odvádzať naakumulované teplo. Netepelné – špecifické účinky neionizujúceho žiarenia zahŕňajú rozličné procesy ako ovplyvňovanie permeability bunkových membrán [2], indukciu akčných potenciálov v neurónoch [3], poškodzovanie DNA, tvorbu voľných radikálov [4] a zvýšenú produkciu stresových proteínov [5].

Materiál a metodika

Experiment bol uskutočnený na Neurobiologickom ústave SAV v Košiciach. Pri manipulácii so zvieratami boli dodržané všetky zásady etiky podľa pravidiel Komisie

na ochranu zvierat pri NbÚ SAV ako aj Štátnej veterinárnej a potravinovej správy SR (Ro 2792/15-221/2). V pokuse boli použité 14 dňové potkany kmeňa Wistar albino samčieho pohlavia (n=12). Zvieratá boli umiestnené v klietkach, kde mali zabezpečený voľný pohyb a prístup k vode a potrave. Potkany boli náhodne rozdelené do 2 skupín – kontrolnej (n=6) a pokusnej (n=6). Pokusné zvieratá boli celotelovo ožarované 2 hodiny denne pulzným elektromagnetickým žiarením s frekvenciou 2,45 GHz (priemernou silovou hustotou $2,8 \text{ mW/cm}^2$) počas 3 týždňov. Po poslednom ožiarení a následnom usmrtení všetkých zvierat boli odoberané vzorky semenníkov. Tkanivo bolo fixované v Bouinnovom roztoku, odvodnené v sérii alkoholových kúpeľov, prejasnené xylénom a zaliate do parafínu. 5 μm rezy boli ofarbené metódou hematoxylín – eozín a vyhodnotené prostredníctvom svetelného mikroskopu Zeiss AxioLab. A1. Na fotodokumentáciu bolo použité zariadenie Axio Cam ICc 5.

Výsledky

Parenchým semenníkov kontrolných potkanov mal typickú štruktúru, ktorá charakterizuje peripubertálnu periódu. Semenotvorné kanáliky mali pravidelný tvar a zárodočný epitel obsahoval typické Sertoliho bunky, ako aj jednotlivé dozrievajúce formy zárodočných buniek vrátane malého množstva podlhovastých neskorých spermatíd. Peritubulárne bunky mali charakteristickú štruktúru. V interstíciu sa vyskytovali menšie skupinky Leydigových buniek a typické krvné a lymfatické cievy (Obr. 1).

V semenníkoch pokusných potkanov mali semenotvorné kanáliky väčšinou nepravidelný tvar a zárodočný epitel obsahoval typické Sertoliho bunky a jednotlivé vývojové štádiá zárodočných buniek (Obr. 2 - 4). V niektorých semenotvorných kanálikoch sa medzi zárodočnými bunkami tvorili prázdne priestory ako následok odlupovania nezrelých zárodočných buniek. Odlúpnuté bunky boli prítomné jednotlivo alebo vo forme malých skupiniek v lumene kanálikov (Obr. 3 a 4). V oblasti rozhrania spermatocytov a okrúhlych spermatíd (Obr. 2), respektíve v blízkosti lumenu semenotvorného kanálika (Obr. 3) sa v niektorých kanálikoch vyskytovali aj gigantické mnohohjadrové bunky. Peritubulárne bunky a intersticiálne Leydigove bunky mali zachovanú štruktúru. V interstíciu sa vyskytovali dilatované krvné cievy (Obr. 2 a 4).

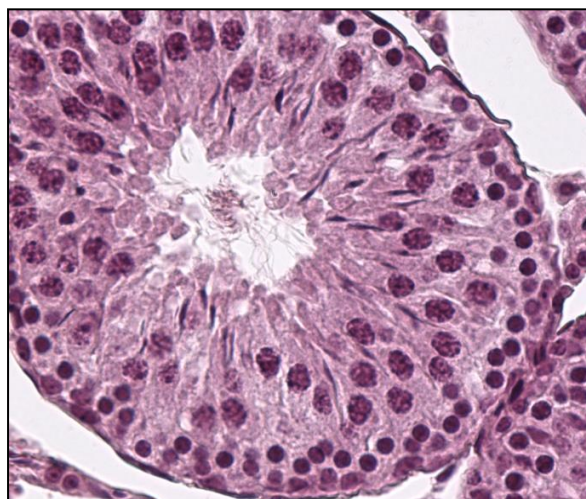
Diskusia

Semenníky prepubertálnych respektíve peripubertálnych jedincov vďaka relatívne vysokému obsahu vody v tkanive a v dôsledku ich typického anatomického usporiadania ako je hrubé väzivové puzdro sa radia medzi jedny z najsenzitívnejších orgánov voči neionizujúcemu mikrovlnnému žiareniu. V práci sme sa zamerali na vplyv 2,45 GHz mikrovlnného žiarenia na semenníky potkanov v peripubertálnom období. Zvieratá boli celotelovo ožarované 2 hodiny denne v priebehu 3 týždňov. Použitá silová hustota žiarenia v experimente neprekročila stanovené expozičné limity, s čím korešpondovala aj hodnota SAR 1-2 W/kg ktorá vylučuje tepelný efekt v tkanive [6]. V semenníkoch ožarovaných potkanov sme pozorovali difúzne degeneratívne zmeny, ktoré korešpondujú s nálezmi pozorovanými v semenníkoch pohlavne dospelých potkanov [7,8]. Za unikátnu zmenu však považujeme prítomnosť gigantických mnohohjadrových buniek v semenotvornom epiteli, ktorá v súvislosti s mikrovlnným žiarením nebola podľa dostupnej literatúry opublikovaná žiadnymi autormi. Mnohohjadrové gigantické bunky ako prejav degenerácie zárodočných buniek boli často pozorované ako následok vplyvu niektorých chemických látok či ionizujúceho žiarenia [9,10]. Mechanizmy patogenézy symplastov nie sú úplne

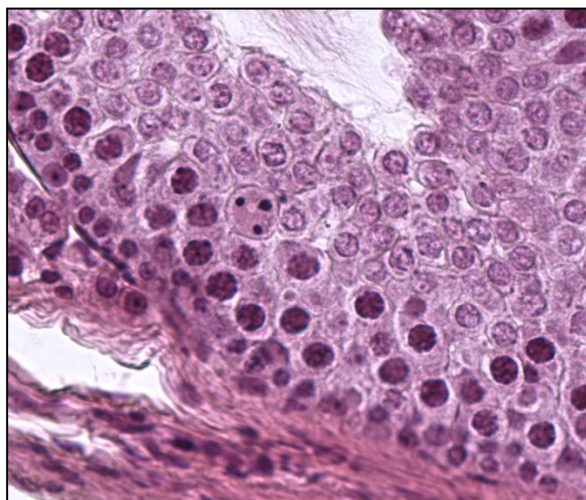
objasnené a predpokladá sa že ide buď o fúziu poškodených spermatíd, alebo neúplnú cytokinézu spermatíd [9]. V interstíciu sme pozorovali výrazne nastrieknuté a dilatované krvné kapiláry, ktoré sú príznakom aktivácie termoregulačných mechanizmov v semenníkoch s cieľom odvádzať naakumulované teplo. Podobné zmeny na cievach semenníkov potkanov ožarovaných mikrovlnným žiarením pozorovali viacerí autori [11,12]. Na základe závažných histopatologických zmien v semenníkoch celotelovo ožarovaných potkanov predpokladáme, že aj napriek skutočnosti, že pri použitých dávkach žiarenia nedochádza k zvýšeniu telesnej teploty ako bolo pozorované v prácach s použitím podobných hodnôt SAR [13], v parenchýme semenníkov pravdepodobne došlo ku kumulácii tepla v dôsledku nedostatočnej termoregulačnej kapacity orgánu.

Záver

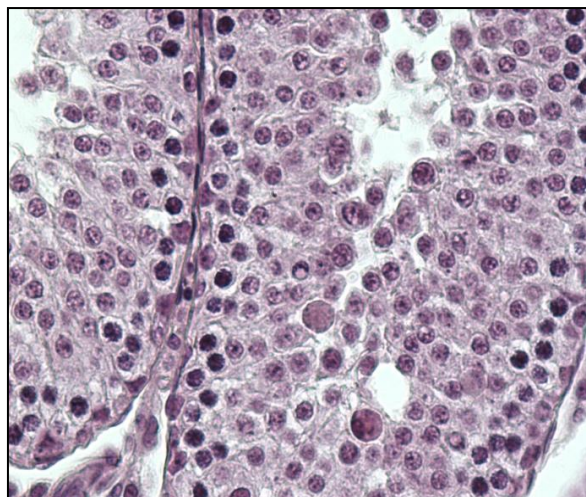
V súčasnosti je problematika vplyvu neionizujúceho elektromagnetického žiarenia na semenníky pohlavne dospelých jedincov veľmi dobre objasnená a je známy jeho nepriaznivý vplyv. Dostupné informácie z danej oblasti týkajúce sa mladých a dospievajúcich jedincov sú však nedostatočné. Výsledky našej práce potvrdili, že mikrovlnné žiarenie s frekvenciou 2,45 GHz a priemernou silovou hustotou 2,8 mW/cm² malo výrazne negatívny vplyv na semenníky juvenilných potkanov.



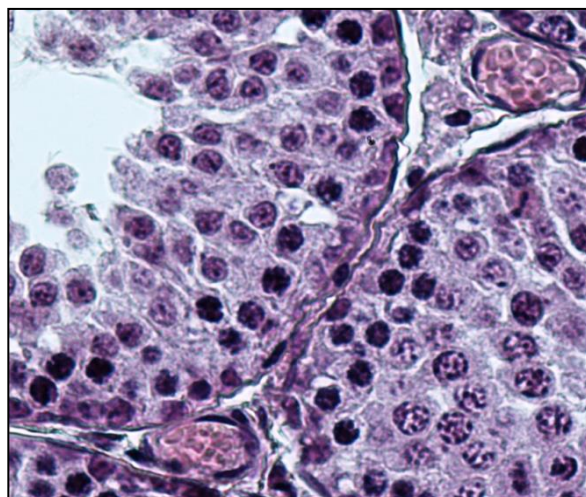
Obr. 1 Semenotvorný kanálik kontrolného potkana s charakteristickou histologickou štruktúrou, zväčšenie 200 ×, HE.



Obr. 2 Semenotvorný kanálik pokusného potkana s výskytom gigantickej bunky, zväčšenie 200 ×, HE



Obr. 3 Semenotvorné kanáliky pokusného potkana s výskytom gigantických buniek a deskvamáciou nezrelých zárodočných buniek, zväčšenie 100 ×, HE.



Obr. 4 Dilatované krvné kapiláry v interstíciu semenníka pokusného potkana, zväčšenie 200 ×, HE

Práca bola finančne podporená grantovou agentúrou VEGA 1/0060/18.

Literatúra

- [1] ICNIRP, *Health Phys.* **1998**, 74:494-522.
- [2] Lai and Singh, *Bioelectromagn.* **1997**, 18:156-165.
- [3] Ferreri, *Ann Neurol.* **2006**, 60:188-196.
- [4] Yurekli, *Electromagn Biol Med.* **2006**, 25:177-188.
- [5] Kim, *Circul.* **2006**, 113:2589-2597.
- [6] IEGMP, *Nat Radiol Prot Board, Chilton, Oxon.* **2000**, www.iegmp.org.uk.
- [7] Khayyat, *EurAsian J Bio Sci.* **2011**, 5:103-109.
- [8] El-Bediwi, *J Med Sci.* **2011**, 11:256-260.
- [9] Creasy, *Toxicol Pathol.* **2012**, 40:40-43.
- [10] Spade, *Biol Reprod.* **2015**, 93:110–115.
- [11] Nassar, *Egypt J Hosp Med.* **2009**, 37:685-699.
- [12] Celik, *Urol.* **2012**, 79:346-350.
- [13] Trosic, *Mutat Res.* **2002**, 521:73–79.

Mechanizmy kardioprotekcie srdca dospelého potkana vystaveného ischemicko-reperfúznemu poškodeniu

Tatarková, Z.¹, Kovalská, M.², Tomašcová, A.¹, Račay, P.¹, Lehotský J.¹, Kaplán, P.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
tatarkova@ifmed.uniba.sk

Abstract

Mitochondria are highly dynamic and responsive organelles that react to environmental cues with fission and fusion. They undergo mitochondrial autophagy (mitophagy) and biogenesis, and are subjected to extensive post-translational modifications. Mitophagy plays an important role in myocardium. It degrades/recycles cytoplasmic components and selectively removes damaged mitochondria as a cytoprotective mechanism under normal or mild stress conditions. However, unrestrained stimulation of autophagy might induce apoptosis, cause accumulation of abnormal proteins and it might also promote NADPH oxidase 4-dependent stress of endoplasmic reticulum in heart. An excessive degradation of proteins leads to collapse of cardiomyocytes, disorganized structure of sarcomeres, misalignment of mitochondria, and aberrant concentric membranous structures. These results indicate that constitutive cardiomyocyte autophagy is required for protein quality control, normal cellular structure, and function under physiological condition. The understanding of the close relationship between mitochondrial dynamics, mitophagy, ion and redox balance is therefore essential for maintaining normal cardiac structure and function.

Keywords: Ischemia-reperfusion injury, heart, mitophagy, apoptosis

Úvod

Ischemicko-reperfúzne (IR) poškodenie je komplexný patofyziologický proces, ktorý zodpovedá za orgánové poškodenie u širokej skupiny klinických stavov, ako napr. infarkt myokardu, zlyhanie srdca. Preto už takmer štyri desaťročia je venovaná vysoká pozornosť snahe vyvinúť nové prístupy, ktoré by umožnili potlačenie letálneho IR poškodenia, jeho sprievodných i dlhodobých poškodzujúcich následkov [1].

Doterajšia pozornosť sa do značnej miery venovala snahe o zmiernenie nekrózy a apoptotickej programovanej smrti buniek. V poslednej dobe sa však objavila v mnohých ohľadoch provokatívna paradigma: koncept, zameriavajúci sa na moduláciu autofágie v srdcových bunkách (vrátane kardiomyocytov, fibroblastov, mastocytov), ktorá by mohla umožniť rezistenciu myocytov voči IR poškodeniu s dlhodobými účinkami v procese hojenia a prestavby srdca po infarkte.

Správna funkcia mitochondrií a endoplazmatického retikula (ER) je kľúčová pre udržanie bunkovej homeostázy, najmä ich prepojenie cez MAMs - s mitochondriami-asociované membrány ER [2]. Dôležitú úlohu mitochondrií sprostredkováva mitochondriálne štiepenie a fúzia, ktoré následne regulujú embryonálny vývoj, metabolizmus, apoptózu a autofágiu [3]. Odstránenie poškodených mitochondrií, primárne autofágiou, je nevyhnutné k zabráneniu bunkovej dysfunkcie [4]. MAMs sú intracelulárne lipidové rafty regulujúce homeostázu Ca^{2+} , metabolizmus glukózy,

fosfolipidov a cholesterolu. Vápnik je translokovaný z ER cez inozitol-1,4,5-trifosfátové receptory (IP3R) a napäťovo-závislý aniónový kanál (VDAC), zatiaľ čo mitochondriálny šaperón GRP75 sprostredkováva interakciu VDAC s IP3R [5]. Toto prepojenie ER-mitochondria reprezentuje primárnu platformu pre tvorbu autofagozómu [6]. Mitochondriálna autofágia (mitofágia), zahŕňa snímanie, sekvestráciu a presun poškodených mitochondrií k lyzozómu na degradáciu [7], pričom boli odhalené viaceré signalizačné cesty *in vitro*, ktorými by sa mohli poškodené mitochondrie transportovať k lyzozómom [4]. Avšak stále nie je objasnené či vôbec a ako prebieha mitofágia v rôznych typoch buniek *in vivo*. Nedávno McWilliams a kol. [8] vyvinuli "mito-QC" transgénnu myš s fluorescenčným mitochondriálnym signálom citlivým na pH, ktorá umožňuje *in vivo* sledovať mitofágiu a štruktúru na úrovni individuálnej bunky.

Blízkosť ER a mitochondrií vedie k akumulácii Ca^{2+} v mikroprostredí mitochondrií, čím sa zvyšuje citlivosť mitochondrie voči reaktívnym formám, a nakoniec môže stimulovať otvorenie permeabilného tranzitného póru. V skorých štádiách apoptózy sa cytochróm c uvoľnený z mitochondrií translokuje do ER a selektívne sa viaže na IP3R, čo vedie k trvalému zvýšeniu cytosolového Ca^{2+} [5]. Stres ER spúšťa ďalšie uvoľňovanie cytochrómu c z mitochondrií, čo vedie k dodatočnému efluxu Ca^{2+} z ER v spätnoväzbovej slučke. Navyše nadprodukcia reaktívnych foriem mitochondriami pôsobí stimulačne na oxidáciu tiolových skupín ďalších Ca^{2+} -uvoľňujúcich kanálov ER ako je aktivácia ryanodínových receptorov (RyRs) vyúsťujúca do uvoľnenia Ca^{2+} z ER. Vápnik preto pôsobí ako vstupný signál aktivácie IP3R alebo RyRs, čo je proces známy ako Ca^{2+} -indukované uvoľňovanie Ca^{2+} [9]. Zdá sa, že stres ER, oxidačný stres a mitochondriálna dysfunkcia sú úzko prepojené udalosti a nič nie je tak jednoduché ako sa zdá.

Preto cieľom našej práce bola snaha pochopiť základné molekulárne mechanizmy, ktoré sú stimulované v procese postischemického poškodenia myokardu v modeli srdca dospelých potkanov.

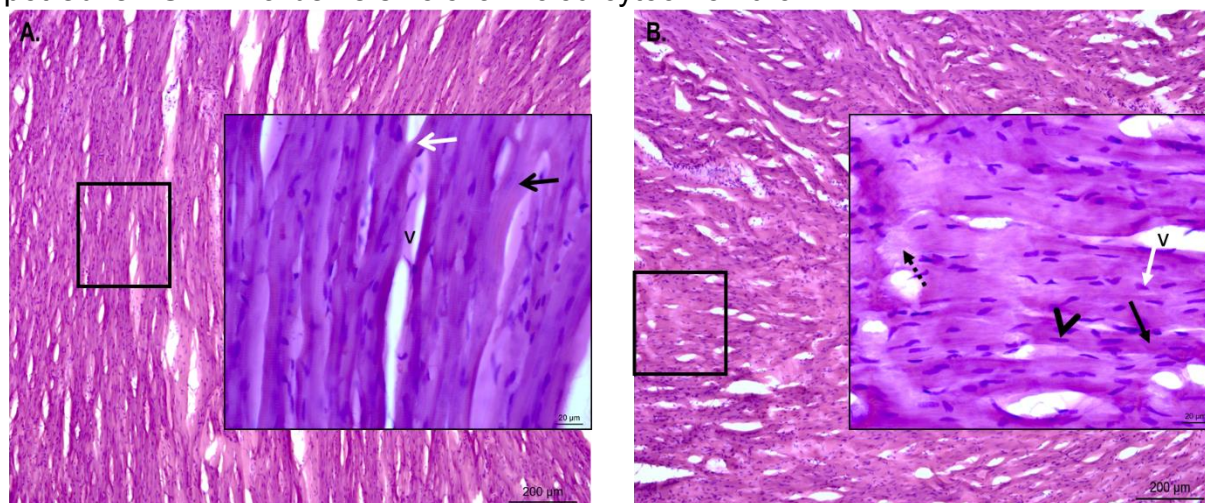
Materiál a metodika

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 min), ischemickú skupinu sme vystavili 20-min globálnej ischémii (ISCH) a IR skupinu s 30-min reperfúziou. Následne sme srdcia spracovali a uskladnili na -70°C (tenkovrstvová chromatografia, Western blotting, Imunodetekcia) a fixácia pre morfológické farbenie Hematoxylín-Eozín). Výsledky sme vyhodnotili pomocou programu GrafPhad InStat V3.01 a Student-Neuman-Keulsovoho testu, kde hladina $p<0,05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

Výsledky a diskusia

Aplikáciou farbenia Hematoxylín-Eozín (H&E) na tkanivové rezy kontrolných srdc (Obr. 1A) a srdc vystavených 20-min globálnej ischémii s 30-min reperfúziou (Obr. 1B) sme monitorovali základného morfológické zmeny. Detail rezu kontrolného srdca vykazuje normálnu morfológiu myokardu. Možno vidieť cylindrické rozvetvenie srdcových myocytov s acidofilnou sarkoplazmou (biela šípka) a oválne centrálné lokalizované jadrá (čierna šípka) s kapilármi nachádzajúcimi sa v spojivovom tkanive medzi myocytmi (v). Na druhej strane, mikrografy IR skupiny poukazujú na štrukturálne zmeny, ktorými myokard prechádza v postreperfúznom procese. Ide o prítomnosť lokálneho opuchu kardiomyocytov (prerušovaná šípka) a náznaky perinukleárneho haló (biela šípka), ktoré sú markermi striedania reverzibilných zmien

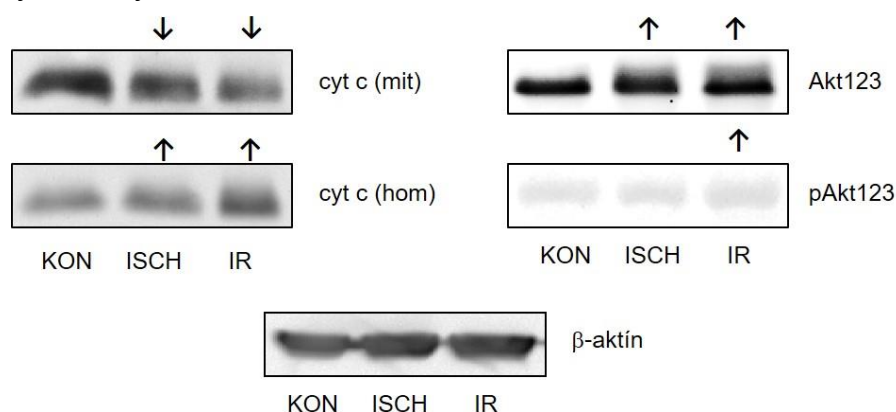
v dôsledku ischemického poškodenia. V niektorých vláknach bola detegovaná aj tmavá acidofilná sarkoplazma (čierna šípka) a periférne tmavé jadrá (hlava šípky). Tieto výsledky naznačujú zmeny tkaniva myokardu, kedy dochádza pravdepodobne k stimulácii autofágie a apoptózy v určitej miere. Pre potvrdenie je v budúcnosti potrebné TUNEL farbenie s kolokalizáciou cytochrómu c.



Obr. 1 Mikrografy reprezentujúce základné morfologické farbenie Hematoxylín-Eozín (H&E) na rezoch tkaniva myokardu v kontrolnej (A) a IR skupine (B). Dĺžka úsečky zodpovedá 20 a 200 µm.

Hoci tieto neboli nateraz detegované imunohistochemickým farbením, z literatúry je známe, že mechanizmy programovanej bunkovej smrti sú aktivované, avšak pri tak krátkej globálnej 20-min ischemii dochádza k ich kompetícii s indukciou autofágie resp. mitofágie, ktoré môžu pôsobiť za určitých stresových podmienok ako stimulátori apoptózy.

S využitím špecifickej protilátky proti cytochrómu c (cyt c) sme detegovali postupne znižujúce sa množstvo cyt c v mitochondriách po ISCH resp. IR, ako aj vzostup cyt c v homogenáte najmä po reoxygénácii tkaniva (Obr. 2). Toto by mohlo znamenať postupné unikanie cyt c z poškodenej mitochondrie do cytosolu, najmä vo fáze reperfúzie (IR skupina) kde stimuluje dráhu apoptózy. Avšak uvoľnený cyt c je najskôr translokovaný do ER a selektívne sa viaže na IP3R, čo až neskôr vedie k trvalému zvýšeniu cytosolového Ca^{2+} .



Obr. 2 Imunodetekcia relatívneho množstva pro-apoptotického cytochrómu c (cyt c) a proteínkinázy B (Akt) a jej fosforylovanej formy pAkt

Preto sme sa pozreli na ďalší proteín, Ser/Thr proteínkinázu (Akt), ktorá reguluje okrem iného aj myokardiálnu angiogénzu, fosforyláciu proteínov, metabolismus

glukózy a bunkovú smrť v kardiomyocytoch. Nadexpresia Akt (Obr. 2) vedie k selektívnej ochrane voči apoptóze prostredníctvom inaktívácie rôznych pro-apoptotických proteínov. Na druhej strane, reoxygenáciou-stimulovaná nadprodukcia pAkt podporuje rozvoj angiogenézy a zvyšuje riziko rozvoja apoptózy, inhibície bunkového cyklu či proliferácie. Hoci autofágiou stimulovaný rozpad lipidov vedie k uvoľneniu mastných kyselín, fosfolipidy membrán sú reorganizované na akýkoľvek patologický podnet. Tak ako v skorých štádiách apoptózy pri akumulácii vápnika v cytosole Annexín V rozpozná translokáciu fosfatidylserínu z intra- do extracelulárneho priestoru, oxidovaný kardiolipín a fosfatidyletanolamín (PE) okrem iného participujú v procese tvorby autofagozómu.

Tabuľka 1 Množstvo kardiolipínu a fosfatidyletanolamínu v mitochondriách po IR poškodení

	PE (nmol/mg bielkovín)	Kardiolipín (nmol/mg bielkovín)
KON	84,31 ± 5,87	45,52 ± 1,28
ISCH	77,76 ± 6,33*	42,01 ± 4,18
IR	83,98 ± 4,25	35,64 ± 1,40**

Interakcia cyt c s kardiolipínom vedie k vzniku komplexu kardiolipín-cyt c. Keď dôjde k oxidácii kardiolipínu, jeho afinita k cyt c klesá a tento je následne vypudený na vonkajšiu membránu mitochondrií (pokles obsahu kardiolipínu po IR, Tab. 1), kde je rozpoznávaný LC3 (light chain 3) systémom fagofóru. Súčasne v mitochondriách zostávajú remnanty kardiolipínu, najmä vo forme hydroperoxidov, ktoré stimulujú uvoľnenie ďalších proapoptotických molekúl ako je apoptózu-indukujúci faktor, VDAC, a iné. V procese sekvestrácie je LC3 účinkom cysteínovej proteázy premenený na svoju cytosolovú formu LC3I. Táto interaguje a následne sa konjuguje s translokovaným PE, ktorého pokles v mitochondriách sme sledovali po ischémii (Tab. 1). Interakcia PE s cytosolovým LC3I na vonkajšej i vnútornej strane membrány fagofóru umožní vznik LC3II a po úspešnej elongácii je obsah pohltený a vzniká autofagozóm [10]. Na základe našich výsledkov sa javí, že v procese indukovanej 20-min ischémie myokardu dochádza k stimulácii autofágie, resp. mitofágie so selektívnou protekciou voči zatiaľ nejednoznačne špecifikovaným pro-apoptotickým dráham, či už sprostredkované cez nadexpresiu Akt ale i nejednoznačnú translokáciu cyt c do ER/cytosolu a jeho vzájomná interakcia s kardiolipínom. Otázkou ostáva množstvo akumulovaného vápnika, ktorého podľa predbežných výsledkov našich ďalších experimentov nepostačuje na masívnu stimuláciu apoptózy v tak krátkej ischémii. Na druhej strane po reštarte kardiomyocytov reoxygenáciou (IR skupina) signifikantne pokleslo množstvo cyt c a kardiolipínu v mitochondriách, ako aj nadexpresia pAkt. Tieto všetky udalosti podporujú nástup apoptózy ako i rozvoj angiogenézy. Reoxygenácia myocytov síce reštartuje respiráciu a tvorbu ATP, ale na druhej strane nárast reaktívnych foriem kyslíka umožňuje prudký nástup autofágie aj s jej možným duálnym účinkom.

Záver

Autofágia je prirodzený proces degradácie, kedy cytoplazmatické proteíny s dlhým polčasom eliminácie a organely sú odstránené a recyklované. Ide o proces aktivovaný za bazálnych podmienok i v dôsledku stresu akým je vyčerpanie nutrientov. Autolizozomálnou degradáciou membránových lipidov a proteínov sú uvoľnené mastné kyseliny a aminokyseliny, slúžiace pre tvorbu ATP a proteosyntézu, čím je podporené prežívanie buniek. Avšak autofágia môže za určitých podmienok

sprostredkovať programovanú bunkovú smrť. Duálna úloha autofágie pri prežívaní cardiomyocytov ešte stále nie je jednoznačne preskúmaná. Zostáva stále otázne, či autofágia resp. mitofágia je potrebná pre prežívanie buniek srdca alebo je mediátorom bunkovej smrti počas patologických stresov akými je ischémia a reperfúzia.

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.

Literatúra

- [1] Schwartz, *Circulation*. **2011**, 124:1172-1179.
- [2] Martínez-Pizarro, *PLoS ONE*. **2016**, 11:e0150357.
- [3] Green, *Science*. **2014**, 345:1250-1256.
- [4] Wei, *Biochem Biophys. Acta*. **2015**, 1853:2784-2790.
- [5] Malhotra, *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **2011**, 3:1-13.
- [6] Marchi, *Biochim Biophys Acta*. **2014**, 1837:461-469.
- [7] Yoshii and Mizushima, *Biochim Biophys Acta*. **2015**, 1853:2797-2801.
- [8] McWilliams, *J Cell Biol*. **2016**, 214:3333-3345.
- [9] Cooper, *J Physiol*. **2013**, 591:5895-5911.
- [10] Anzell, *Mol Neurobiol*. **2017**, 55:2547-2564

Vplyv homocysteínu na funkčné a morfológické parametre srdca experimentálnych zvierat

Sroková, Z.¹, Tatarková, Z.², Kalenská, D.², Tomašcová, A.², Tóthová, B.³,
Lehotský, J.^{2,4}, Adamkov, M.¹, Kovalská, M.¹

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin; ³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed Martin-Divízia onkológie, Martin; ⁴ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, BioMed Martin-Divízia neurovedy, Martin
kovalska@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Risk factor modification remains as the principal aspect of care for cardiovascular diseases (CVD) prevention. One of those factors could present elevated plasma level of homocysteine (Hcy) known as hyperhomocysteinemia (hHcy). However, effective treatment remains a challenging task in clinical practice. Rats were divided in two groups. One group of animals was treated by subcutaneous injection of Hcy (1.2 $\mu\text{mol/g}$) once a day in duration of 3 weeks. The second group served as a control. The animals were after treatment sacrificed; the hearts were rapidly excised, placed on Langendorff perfusion system and perfused with the K-H solution for 20 minutes. Afterwards, the hearts were fixed in 10% formalin and prepared for paraffin method according standard protocols and proceeded for immunohistochemical analyses. We observed significant increase of the perfusion pressure, decrease of the left ventricle end-diastolic pressure (LVDP) and the heart contraction and relaxation indexes (+LVdP/dt and -LV dP/dt). Immunohistochemical analyses displayed presence of Annexin 5+ cells as well as TUNEL+ nuclei of cardiomyocytes in group treated with Hcy. These findings suggest that induced hHcy influence left ventricle more than right and cardiomyocytes self. These changes resulted in changes not only in the morphological structure, but also in the functional parameters.

Keywords: hyperhomocysteinemia, cardiomyocytes, Annexin 5, cell death

Úvod

Funkcia srdca ako pumpy je esenciálnou podmienkou vitality ľudského organizmu. Patologické stavy kardiovaskulárneho systému (KVS) sa v celosvetovom meradle podpisujú pod prvé miesto v rebríčku príčin úmrtnosti [1]. Za najčastejšiu príčinu poškodenia KVS sa pokladá ateroskleróza, definovaná ako kontinuálne zápalové postihnutie arteriálnej *intimae* sprevádzané zvýšenou priepustnosťou pre plazmu, depozíciou plazmatických lipidových plakov a ich následnou fibrotizáciou a kalcifikáciou [1-3]. Viaceré štúdie ďalej potvrdili súvislosť aterosklerózy už na úrovni miernej hyperhomocysteinémie (hHcy) [3, 4]. Homocysteín (Hcy) prispieva k rozvoju kardiovaskulárnej morbidítu niekoľkými mechanizmami, pričom poškodenie kardiomyocytov je priamoúmerne závislé od jeho sérovej koncentrácie [1-6]. Zistilo sa, že riziko vzniku ischemickej choroby srdca sa s každým zvýšením hladiny Hcy o 5 $\mu\text{mol/l}$ zvýši o 20%. Asociácia hHcy s konvenčnými rizikovými faktormi výrazne zvyšuje kardiovaskulárnu morbiditu a mortalitu [7]. Vysoká hladina Hcy je stresor aktivujúci vnútornú cestu apoptózy [8]. Hcy-indukovaná apoptóza kardiomyocytov nastáva v dôsledku akumulácie ROS a koncentrácie-dependentnej $\Delta\Psi_m$ [9].

Niekoľko štúdií tiež poukázalo na mediátor S-adenozylhomocysteín (SAH) ako účinný inhibítor rôznych metylačných reakcií a induktor bunkovej smrti [10, 11]. V experimentálnych štúdiách *in vivo* bol rovnako dokázaný priamy vplyv Hcy na systolickú dysfunkciu srdca a na progres reaktívnej srdcovej fibrózy [9, 12]. V súčasnosti existuje len obmedzené množstvo prác, ktoré popisujú vplyv Hcy na samotné kardiomyocyty. Detailné objasnenie patogenézy poškodenia týchto buniek by mohlo v budúcnosti prispieť k zefektívneniu vhodnej terapie pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami.

Materiál a metódy

V našich experimentoch sme ako biologický materiál použili samce potkanov kmeňa Wistar vo veku od 4 - 6 mesiacov (8 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 bol po dobu 21 dní subkutánne podávaný Hcy v koncentrácii 1,2 $\mu\text{mol/g}$ zvieraťa (hHcy skupina; 4ks). Druhá skupina bola bez navodenej hHcy a slúžila ako kontrola (K). Na 22. deň boli srdcia vyoperované, nasadené na Langendorffov perfúzný systém a kontinuálne premývané 20 minút Krebs-Henseleitových roztokom. Po nameraní fyziologických parametrov boli srdcia zafixované 10% formalínom a zaliate do parafínu podľa štandardného protokolu. Následne boli srdcia narezané na poloténkové rezy. Znemy v tkanivá sme sledovali pomocou analýz TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) a Annexin 5. Preparáty boli vyhodnocované pomocou svetelného mikroskopu Zeiss Axio Scope A1 a počítačovým programom GraphPad InStat V2.04a (GraphPad Software, Inc.).

Výsledky

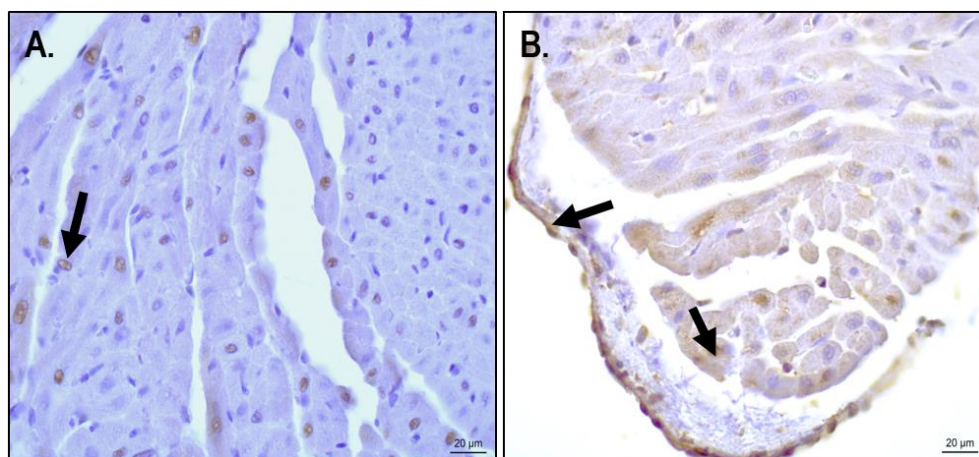
V skupine s indukovanou hHcy sme počas experimentu pozorovali zvýšenie hodnôt perfúzneho tlaku na $81,42 \pm 6,57$ oproti fyziologickému rozmedziu $73,05 \pm 2,15$ mmHg u kontrolnej skupiny. Pulzová frekvencia v hHcy skupine sa oproti kontrolnej skupine zvýšila o 25,8% ($p < 0,05$). Koncový ľavokomorový tlak bol v hHcy skupine nižší o 5,2 % ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou. Vyhodnotenie indexov rýchlosti kontrakcie (+ LV dP/dt) a relaxácie (-LV dP/dt) ľavej komory v hHcy skupine ukázalo zníženie parametra + LV dP/dt o 49,11 % ($p < 0,01$) v porovnaní s kontrolou (Tabuľka 1).

Tabuľka 1: Fyziologické parametre srdca potkanov

	Perf.tlak (mmHg)	Pulzová frekvencia/min	+LV dp/dT (mmHg/s)	-LV dp/dT (mmHg/s)	LVDP (mmHg)
K	$73,05 \pm 2,15$	$204,05 \pm 44,59$	$1718,00 \pm 289,23$	$941,35 \pm 214,72$	$90,73 \pm 8,16$
hHcy	$77,42 \pm 6,57$ *	$274,84 \pm 12,5$ **	$860,81 \pm 64,33$ **	$640,14 \pm 41,29$ **	$86,07 \pm 1,53$ **

V histologických preparátoch tkaniva myokardu s indukovanou hHcy sme na úrovni základného farbenia (HE) pozorovali zmeny objemu kardiomyocytov, lokalizácie bunkového jadra, prejasnenie perinukleárnej cytoplazmy a miernu dezintegráciu kontraktilných proteínov v rámci jednotlivých buniek. Imunohistochemicky sme pomocou TUNEL metódy, ktorá špecificky identifikuje bunky podliehajúce bunkovej smrti, dokázali štatisticky významný, 16 násobný nárast v skupine s hHcy ($P < 0,001$) oproti kontrole (Obr. 1A). Ďalšou metódou na zistenie prítomnosti apoptózy bolo pomocou protilátky Annexin 5, pričom sme detekovali nárast počtu pozitívnych

buniek 132,7 násobne v hHcy skupine ($P < 0,001$) v porovnaní s kontrolou (Obr. 1B).



Obr. 1 Demonstratívne mikrofotografie preparátov srdca potkanov hHcy skupiny farbené pomocou metodiky TUNEL (A) a vizualizáciou proteínu Annexin 5 (B). Šípky označujú bunky s jadrovou (A) a plazmatickou/cytoplazmatickou (B) pozitivitou. Jadrá buniek oboch preparátov sú dofarbené hematoxylínom. Úsečka predstavuje 20 µm.

Diskusia

Hyperhomocysteinémia je všeobecne akceptovaná ako nezávislý rizikový faktor kardiovaskulárnych ochorení. Jej patomechanizmus však stále ostáva nie úplne objasnený [1-16]. Predpokladá sa niekoľko možných biologických účinkov hHcy na cievnu stenu vedúcich k iniciácii a akcelerácii procesu aterogenézy, koagulopatie a trombogenézy s možnou klinickou manifestáciou v podobe infarktu myokardu, či periférnej vaskulárnej okluzívnej príhody [2, 9]. HHcy nepriaznivo ovplyvňuje biosyntézu a funkciu vazodilatačných faktorov cievnej steny. To prispieva k zníženiu mitotickej aktivity endotelových buniek a naopak, k intenzívnej proliferácii a migrácii myocytov a poklesu biosyntézy komponentov extracelulárnej matrix. Následkom takejto remodelácie dochádza k zníženiu jej flexibility a diastolickej dysfunkcii [1]. Naše výsledky dokazujú, že indukovaná hHcy spôsobuje signifikantné zhoršenie kardiálnych funkcií charakterizované systolickou a diastolickou dysfunkciou. Údaje o parametroch činnosti srdca počas hHcy sú však vzácne. Timková a kol. [13] dosiahli podobné zistenia, pričom po 2- týždňovej aplikácii Hcy dokázali, že u potkanov dochádza ku kontraktnej disfunkcii myokardu. Na rozdiel od našich výsledkov, Suematsu a kol. [14] vo svojich experimentoch na psovi srdci počas 2 – týždňovej indukcie Hcy, nepozorovali žiadne zmeny. V objasnení tejto diskrepancie môže zohrávať rolu niekoľko faktorov vrátane práce s rozdielnymi laboratórnymi zvieratami, či použitie odlišných izoform molekuly Hcy.

V našej štúdii sme skúmali aj potencionálny priamy efekt Hcy na štruktúru myokardu. Naše výsledky sa zhodujú s výsledkami Josepha a kol. [15], ktorý laboratórnym potkanom kmeňa Wistar počas 10 týždňov indukoval miernu hHcy. Výsledky poukazujú na Hcy ako na nezávislý stimulujúci faktor remodelácie myokardu, kedy hypertrofická odpoveď kardiomyocytov ako aj intersticiálna depozícia kolagénu môžu odzrkadľovať kompenzačnú odpoveď myokardu na včasnú stratu kardiomyocytov. Takáto štrukturálna zmena môže byť podkladom kontraktnej dysfunkcie. Záverom práce Josepha a kol. je, že v neprítomnosti iných hypertrofických stimulov, krátkodobá mierna hHcy spôsobuje patologickú hypertrofiu a remodeláciu oboch komôr s diastolickou dysfunkciou ľavej komory, a teda, že Hcy má priamy nepriaznivý účinok tak na štruktúru, ako aj na funkciu myokardu a zodpovedá našim ako aj výsledkom iných autorov [13, 16].

Na vyšetrenie prítomnosti apoptózy v srdciach potkanov sme použili TUNEL metódu, *in situ* imunohistochemickým značením fragmentov jadrovej DNA buniek ako aj protilátku Annexin 5, ktorá identifikuje fosfadylylerín naviazaný na vonkajšej strane plazmatickej membrány. Pomocou TUNEL metódy s využitím rTdT a diaminobenzidínu sa nám podarilo vizualizovať jadrá apoptotických buniek v rezoch tkanív myokardu skupín s indukovanou hHcy (TUNEL) ako aj zvýšený počet Annexin+ buniek v myokarde hHcy zvierat. Timková a kol. [13], rovnako potvrdili prítomnosť bunkovej smrti v myokarde laboratórnych potkanov. Schergers a kol. [17] potvrdili, že u pacientov s kardiovaskulárnymi poruchami je hladina Annexin 5 signifikantne vyššia ako u kontrolnej skupiny pacientov a že sa dá považovať za vhodný prediktívny biomarker mortality u pacientov s diagnostikovaným kardiálnou insuficienciou. Mnohí autori sa však rozchádzali v názoroch na intenzitu apoptózy z časového hľadiska. Sam a kol. [18] analýzou TUNEL+ buniek potvrdil, že typ bunkovej smrti je závislý od zvyškovej ATP, frekvencia apoptózy je úmerná vážnosti dysfunkcie ľavej komory a je spojená s remodeláciou tkaniva myokardu.

Záver

Apoptóza sa teda evidentne, a to nielen na základe našich výsledkov, spúšťa v poškodenom tkanive s cieľom bezpečne odstrániť ireverzibilne zmenené bunky. Pretože strata kardiomyocytov prispieva ku kardiálnej dysfunkcii a je negatívnym prediktorom kardiálnej insuficientných pacientov. Demonštrácia aktivácie apoptotickej kaskády u kardiomyopatie môže v budúcnosti predstavovať základ nových intervenčných liečebných prístupov. Je však stále potrebné doplnenie nových dôkazov a objasnenie mechanizmu aktivácie a následkov týchto biologických pochodov, keďže výsledky prác niektorých autorov sa v záveroch, zväčša z dôvodu inej metodiky a hodnotiacich algoritmov, rozchádzajú.

Práca bola podporená projektami VEGA 1/0129/17, 1/0171/18 a APVV-15-0107.

Literatúra

- [1] Ganguly and Alam, *Nutrition Journal*. **2015**, 14/6:1-10.
- [2] Kénina, *Neurologijos Seminarai*. **2009**, 13/41:139-142.
- [3] Shenov, *Ind J Clin Biochem*. **2014**, 29/3:339-44.
- [4] Schaffer, *Thromb Res*. **2014**, 134:288-93.
- [5] Sipkens, *Apoptosis*. **2007**, 12:1407.
- [6] Kovalská, *Klinická biochemie a metabolismus*. **2014**, 22 /43-2:81-86.
- [7] Humphrey, *Mayo Clin Proc*. **2008**, 83/1:1203-1212.
- [8] Vré, *ATVB*. **2012**, 32:887-893.
- [9] Kolling, *Cardiovasc Toxicol*. **2011**, 11:67-73.
- [10] Casrto, *J Mol Med*. **2005**, 83:831-836.
- [11] Tóthová, *Activitas Nervosa Superior Rediviva*. **2017**, 59/2:57-63.
- [12] Vizzardi, *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.*, **2009**, 4/1:5-21.
- [13] Timkova, *Mol Cell Biochem*. **2016**, 411/1-2:261-70.
- [14] Suematsu, *Circulation*. **2007**, 115:255-262.
- [15] Joseph, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2003**, 285:H679-686.
- [16] Tyagi, *J Cell Biochem*. **2006**, 98/5:1150-1162.
- [17] Schurgers *JIM*. **2016**, 279:89-97.
- [18] Sam, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2000**, 279:422-428.

Patologicko-histologický obraz pľúcnej červivosti u muflónov

Cigánková, V¹., Almášiová V¹., Holovská K¹., Pošiváková T².

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Ústav histológie a embryológie, Košice;

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Ústav hygieny zvierat a životného prostredia, Košice
viera.cigankova@uvlf.sk

Abstract

Muellerius capillaris is a cosmopolitan parasite of the lung parenchyma of domestic sheep, goats and many wild ruminants. The prevalence of this nematode is very high in grazing goats and mouflons. Muelleriosis in domestic small ruminants is often overlooked because this infection is usually asymptomatic or subclinical. In this work we describe a clinical case, a larvosopic and patho-histological finding of pulmonary worms in young mouflons on animal farms, which were orally dewormed by the anthelmintic preparation Helmigal plv.

Keywords: pulmonary worms, mouflons, histopathological observation

Úvod

Cieľom tejto štúdie bolo opísať klinický prípad pľúcnej červivosti muflónov, ako aj larvoskopický nález a patologicko – morfológický obraz pľúc zvierat uhynutých na zverofarme. *Muellerius capillaris* (Mueller, 1889) Cameron, 1927 patrí medzi pľúcne nematódy čeľade *Protostrongylidae*, ktoré sú veľmi rozšírenými parazitmi nielen u domácich oviec a kôz, ale najmä u voľne žijúcich prežúvavcov. Muelleriáza je strongylatóza vyvolávajúca pľúcnu červivosť, pre ktorú je charakteristická bronchitída a intersticiálna pneumónia s tvorbou typických liahňových uzlíkov v pľúcnom parenchýme [1, 2]. *Muellerius capillaris* je okrúhly vlasovitý červ, ktorý parazituje v pľúcnom parenchýme oviec a kôz, ako aj voľne žijúcich prežúvavcov, napr. muflónov a kamzíkov. Nevyskytuje sa u dobytká, ošípaných, psov, mačiek, ani u ľudí. Samičky sú dlhé 20 – 23 mm, samce sú menšie. Chvostový koniec je špirálovito stočený, kopulačná burza je veľmi malá a otvor kloaky je opatrený papilami. Spikuly sú dlhé 140 – 160 µm. Larvy 1. štádia (L₁) majú skrutkovito stočený chvostový koniec s jedným dorzálnym trňom [3, 4].

Životný cyklus je nepriamy, medzihostiteľmi sú rôzne suchozemské slimáky rodov *Limax*, *Agriolimax*, *Arion*, *Helix*, *Succinea* a i., v ktorých larvy L₃ môžu prežívať počas celého života slimákov. Definitívny hostiteľ sa nakazí prehltnutím slimákov s larvami L₃, ktoré sa v tráviacom aparáte uvoľnia, penetrujú cez stenu tenkého čreva do mezenterálnych lymfatických uzlín kde sa zvliekajú a menia na L₄. Lymfou sa dostávajú do *ductus thoracicus* a odtiaľ do pľúc, kde pohlavne dospievajú. Prepatentná perióda trvá 25 – 37 dní. Pľúcne červy lokalizované v bronchioloch a pľúcnych alveolách vyvolávajú lokálny zápal, ktorý sa výpotkom šíri do distálnejších peribronchiálnych vrstiev. Zápalový exudát zaplňuje alveoly a v pľúcnych lalokoch sa vytvárajú sa žltosivé ložiská. Okrúhle uzlíky veľkosti až 2 cm sa nachádzajú na povrchu pľúc, najčastejšie v blízkosti apikálnych lalokov. Liahňové uzlíky obsahujú dospelé červy a ich fragmenty, vajíčka aj larvy. Tieto uzlíky niekedy aj kalcifikujú a sú pomerne tvrdé. Výsledkom sú kónické ložiská, lobulárna pneumónia a pleuritída. Nakazené zvieratá spočiatku ešte nemajú zjavné klinické príznaky. Avšak pridružením bakteriálnej infekcie vzniká akútny zápal pľúc. Pri silnom nakazení môže zapríčiniť hynutie postihnutých zvierat [5].

Intravitálna diagnóza je založená na prítomnosti larií *L₁* v čerstvom truse zvierat. Postmortálne sa vyšetrujú vzorky zo zmeneného pľúcneho tkaniva histologicky, larvoskopickou metódou podľa Vajdu, alebo prítomnosť liahňových uzlíkov kompresoricky [6]. Na terapiu sa používajú benzimidazolové preparáty a ivermektín [7, 8]. Avšak voči uvedeným liečivám je značná rezistencia. Pretože použitie konvenčných anthelmintík pri liečbe muelleriôzy u kôz, oviec a voľne žijúcich prežúvavcov nie je v dlhodobom horizonte dostatočne účinné, skúma sa účinnosť dlhodobého pôsobiaceho prípravku moxidektínu [9]. Zistili, že jeho účinok na jednotlivé vývojové štádiá pľúcnych červov u kôz a muflónov nebol úplný a dochádzalo k opakovaným inváziám, preto poukázali na potrebu redukovania medzihostiteľov, najmä slimákov. Prevencia spočíva v tom, že najmä mladé zvieratá by sa nemali pásť na tých miestach, kde sa predtým pásli dospelé nakazené zvieratá. Avšak prípravok moxidectin mal veľmi dobrý účinok na elimináciu nematod z gastrointestinálneho traktu [10].

Diferenciálnou diagnostikou je potrebné *Muellerius capillaris* odlíšiť od *Protostrongylus rufescens* (Leuckart, 1965), ktorý parazituje v bronchoch a bronchioloch oviec, kôz, muflónov a kozorožcov. Larvy 1. štádia *P. rufescens* majú chvostový koniec ostrý a bez trňov.

Materiál a metodika

Majiteľ zverofarmy pozoroval u mladých asi polročných muflónov sťaženie dýchanie a výtok penovitého sekrétu z nosa. Zvieratá mali veľmi dobrú kondíciu. Uhynuté muflóny boli nájdené v bočnej pozícii s viditeľnými stopami po kopaní okolo seba, dýchacie cesty boli zaplnené penou, čo svedčilo o tom, že sa zvieratá udusili. Podľa udania majiteľa boli všetky zvieratá dvakrát do roka perorálne odčervované antihelmintickým prípravkom Helmigal plv. dávkou 7,5 mg / kg ž. hm.

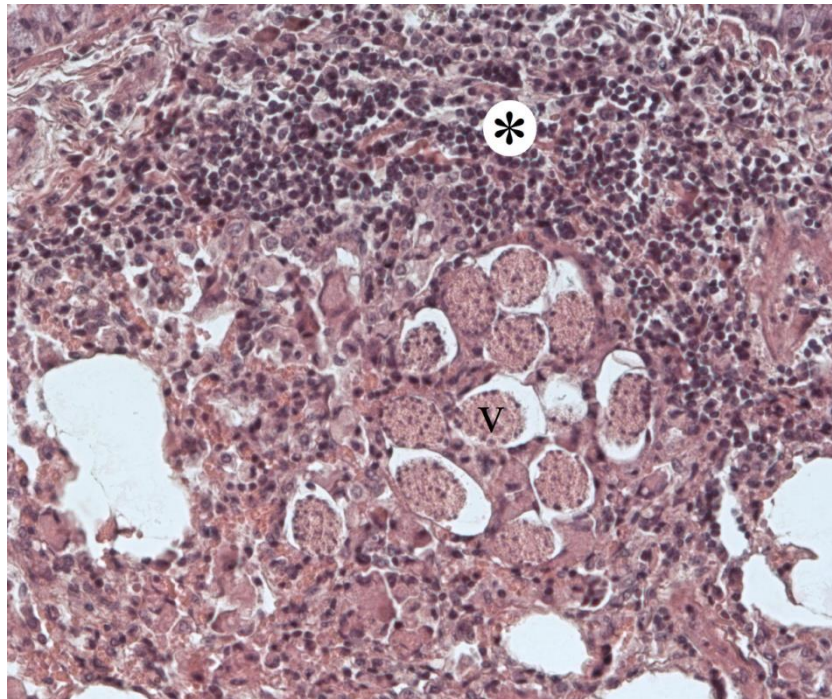
Patologicko-anatomickou pitvou boli zistené výrazné zmeny na pľúcach, ktoré boli hemoragické. V trachei a nosovej dutine sa nachádzal biely sekrét penovitej konzistencie. Na ostatných orgánoch neboli pozorované žiadne zmeny.

Excízy na patologicko-histologické vyšetrenie boli odobrané z rôznych častí pľúc, fixované v 10% neutrálnom formalíne a následne spracované bežnou histologickou metódou zaliatím do parafrínu. Rezy o hrúbke 5 – 7 µm boli rezané na sánkovom mikrotóme, ofarbené hematoxylín – eozínom (H&E) a vyšetrené svetelným mikroskopom Axiolab A1 s digitálnou kamerou.

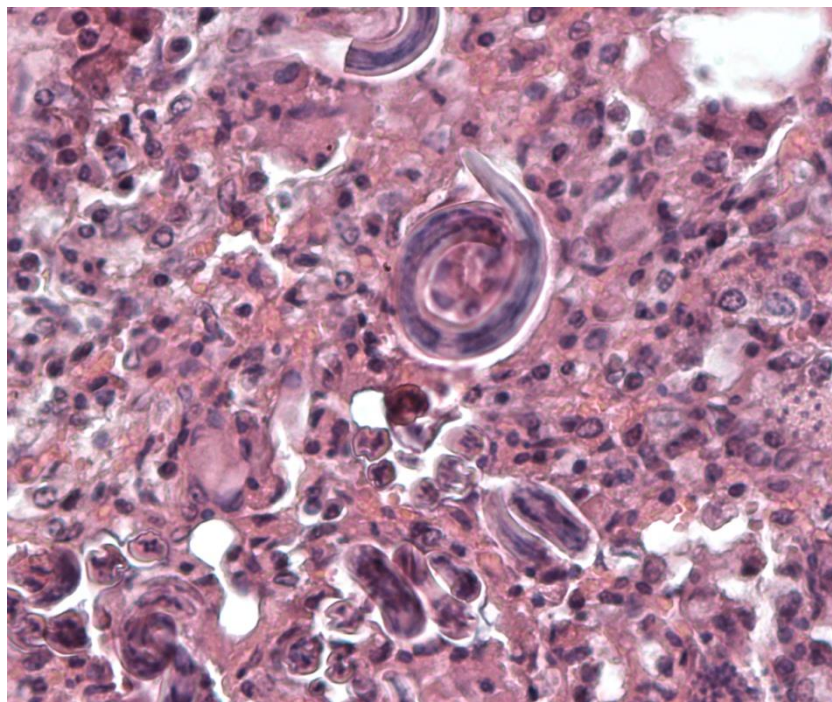
Výsledky a diskusia

Vyšetrením parenchýmu pľúc sme zistili, že tkanivo pľúc bolo nevzdušné a obsahovalo len málo alveol vyplnených vzduchom. Interstícium v blízkosti alveol bolo difúzne infiltrované lymfocytmi a krvné kapiláry boli enormne natrieknuté. Interalveolárne septá boli nevýrazné a v lúmene alveol sme nachádzali skupinky vajíčok pľúcnych červov sférického tvaru (Obr. 1). V pľúcnou parenchýme, najmä odobratého z apikálnych častí pľúcnych lalokov sme nachádzali početné liahňové uzlíky s larvami a ich fragmentami (Obr. 2). Niektoré liahňové uzlíky obsahovali dospelé červy a ich fragmenty, larvy aj vajíčka (Obr. 3). Okolo liahňových uzlíkov sme pozorovali výraznú intersticiálnu infiltráciu lymfocytmi. Dospelé červy v pľúcnych alveolách sme nachádzali v histologických preparátoch na pozdĺžnom, priečnom aj šikmom reze.

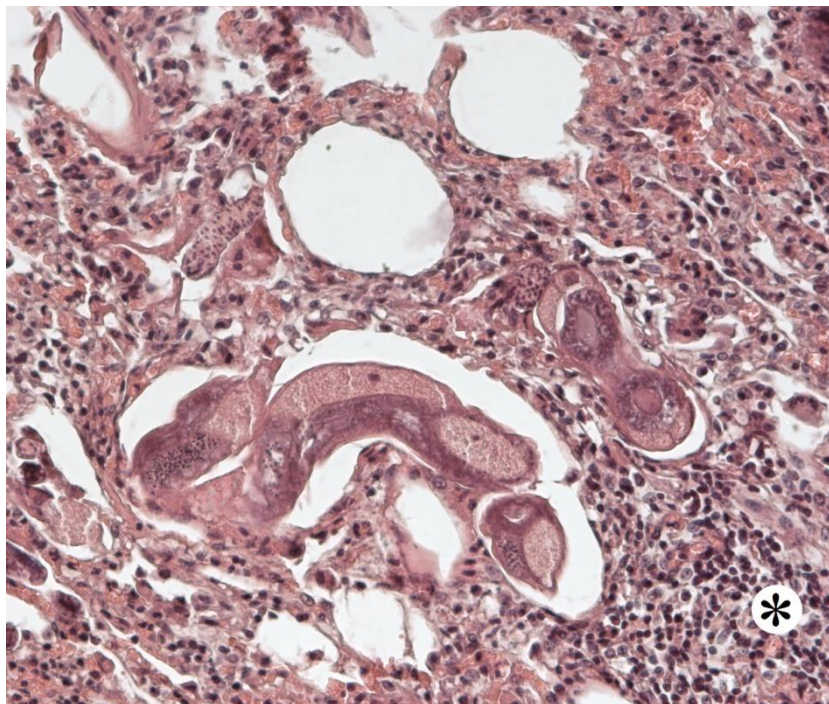
Obrázová príloha



Obr. 1 Skupinka vajíčok *Muellerius capillaris* uložených vo vnútri pľúcnych alveol (v) a výrazná lymfocytárna infiltrácia intersticiálneho tkaniva pľúc (hviezdička). (H&E) Zväčšenie: 200 x (orig. foto)



Obr. 2 Liahňové uzlíky s larvami pľúcnych červov a ich fragmentami. (H&E) Zväčšenie: 250 x (orig. foto)



Obr. 3 Dospelé pľúcne červy *Muellerius capillaris* v lúmene pľúcnych alveol a výrazná lymfocytárna infiltrácia intersticiálneho tkaniva pľúcneho parenchýmu (hviezdička). (H&E) Zväčšenie: 200 x (orig. foto).

Záver

Muelleriáza patrí medzi najrozšírenejšie ochorenia malých prežúvavcov vyvolávané pľúcnyimi nematódami. Obyčajne sa vyskytuje u mladých voľne sa pasúcich oviec, kôz a voľne žijúcich prežúvavcov. Prameňom nákazy sú staršie zvieratá, ktoré kontaminujú pasienky. Patologicko-histologickým vyšetrením vzoriek odobratých z pľúc uhynutých mladých muflónov sme potvrdili nález rôznych štádií pľúcnych červov – vajíčka, liahňové uzlíky, ako aj dospelé červy *Muellerius capillaris* v lúmene pľúcnych alveol. Intersticiálne tkanivo pľúc bolo masívne infiltrované lymfocytami. Predpokladáme, že u muflónov chovaných na zverofarme bolo hlavnou príčinou muelleriázy nedostatočné odčervenie zvierat málo účinným antihelmintickým prípravkom na báze fenbendazolu - Helmigal plv. 25 mg (PharmaGal) dávkou 7,5 mg / kg. ž. hm. a pasenie na vlhkých pasienkoch s výskytom slimákov.

Literatúra

- [1] Berrag, *Vet Immunol Immunopathol.* **1997**, 58/1:77-88.
- [2] Jenkins, *J Wildlife Diseases.* **2007**, 43/2:189 -205.
- [3] Svarc, *Helminthologia.* **1984**, 21/2:141-150.
- [4] Iacob, *Scientia Parasitol.* **2007**, 1.:77-79.
- [5] Panayotova-Pencheva, *Vet Med Int.* **2010**, 1-9.
- [6] Czizsmárová, In: Jurášek a kol. *Veterinárna parazitológia, Príroda, Bratislava.* **1993**, 268-270.
- [7] Van Wyk, *Onderstepoort J Vet Res.* **2013**, 80:539.
- [8] McCraw, *Can Vet J.* **1988**, 29:453-454.
- [9] Vajdlejch, *Veterinary Parasitology* **2016**, 218:98-101.
- [10] Balmer, *Small Rumin Res.* **2015**, 126:80-89.

Mikroskopický obraz extradurálnych lumbosakrálnych anomálií spinálnych nervov

Haviarová¹ Z., Matejčík² V., Halgaš² F., Kuruc³ R.,

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

Abstract

Great number of unsuccessful operations of intervertebral discs hernia in lumbosacral (LS) region highlighted importance of knowledge of different types of nerve roots anomalies. Results of greater incidencies are achieved from anatomical studies (and operational findings) compared to those from image methods works. We have focused on microscopic image of found intraspinal extradural LS anomalies. Study was performed on 43 cadavers within 24 hours after death (32 males, 11 females). Uncommon extradural features in the lumbosacral region were followed and documented according to plexus type. Found anomalies were excised, processed with light microscopic method and stained with hematoxylin-eosin. Totally 20.93% of extradural LS nerve root origins anomalies were found, with the normotyped plexus prevailing. We have proved nervous tissue presence in nearly all found anomalies (except 2 samples). All found extradural LS anomalies contain nerve fascicles. Further studies are need in elucidating detailed microscopic character of all observed and referred anomalies.

Keywords: spinal root, lumbosacral, extradural

Úvod

Určitá časť pacientov s herniou medzistavcovej platničky v lumbo-sakrálnej oblasti nevykazuje charakteristické symptómy tohto ochorenia. Nie zriedka sa pri následnom operačnom riešení našli anatomické abnormality miechových nervov, ktoré podnietili ich následný výskum rôznymi metodikami: od anatomických štúdií až po rádiografické pozorovania [1]. Etiológia týchto anomálií je zatiaľ neznáma: jedna z hypotéz predpokladá poruchu migrácie nervových koreňov počas embryonálneho vývoja, čo do určitej miery vysvetľuje jav, že táto migrácia je jednostranná [2]. Anomálie v lumbosakrálnej oblasti sa uvádzajú v rozsahu 5 – 10%, čo koreluje s miešnymi anomáliami. Hoci súčasný výskyt spondylózy a hernie medzistavcových platničiek je častý, anomálie sprevádzajúce tieto lézie sú skôr zriedkavejšie. Vrodené intraspinálne LS anomálie koreňov sa môžu prejaviť symptómami radikulopatie aj bez útlaku na korene [3, 4]. Správy o týchto prípadoch sa vyskytujú už posledných 65 rokov vo vedeckej literatúre [5]. Zvyčajne sa vyskytujú na jednej strane: najčastejšie v úrovni L5- S1 [1-3, 5, 6] a môžu byť príčinou zlyhania operácie pre herniu disku [2, 8]. Keďže význam poznatkov o rôznych druhoch anomálií miechových koreňov vzrastá kvôli požiadavke zvýšenia počtu úspešných operácií [1, 10], preoperatívne aj perioperatívne zhodnotenie nálezu musí byť starostlivé, aby sa predišlo poškodeniu nervu počas operácie [7, 9, 11]. Odchýlky nervových koreňov môžu vykazovať symptómy úrovne viac ako jedného segmentu miechy, podobne ako pri hernii disku. Útlak abnormálne prebiehajúceho koreňa môže byť zdrojom nesprávnej informácie o úrovni herniovaného disku. Ak je postihnutý len 1 koreň, symptómy môžu byť mätúce

a diagnóza radikulopatie môže byť v mnohých prípadoch ťažká, keďže symptómy nekorelujú s očakávaným vzorcom usporiadania dermatómov a myotómov. Napriek rastúcemu počtu prác zaoberajúcich sa odchýlkami spinálnych nervov, málo prác sa zaoberá mikroskopickým obrazom nájdených anomálií.

Materiál a metodika

Pozorovanie bolo realizované na 43 nefixovaných ľudských kadáveroch (do 24 hodín po smrti, zvyčajne násilnej- prevažovali obeť autonehôd): 32 mužov (vekový rozsah 18- 84 r.) a 11 žien (vekový rozsah 27-68 r.) bez zjavného alebo dokumentovaného poškodenia miechy (tieto boli zo štúdie vylúčené). Štúdia bola vykonaná na Ústave súdneho lekárstva Nemocnice sv. Cyrila a Metoda a Úradu pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou (Antolská ul. 11, Bratislava) po predošlom súhlase príslúchajúcej Etickej komisie. Na každom tele (v ležiacej polohe) bolo odpreparované paravertebrálne svalstvo, trňové výbežky a laminy stavcových oblúkov pravej aj ľavej strany od cerviko-kraniálneho prechodu až po sacrum, čo umožnilo priamu vizualizáciu obsahu chrbtice kanála bez poškodenia miechy a jej koreňov a preštudovanie koreňov od jeho odstupu až po výstup cez medzistavcový otvor a hiatus sacralis. Všetky miechové korene boli preštudované obojstranne: celkovo sa zhodnotilo 86 stranových oblastí miech, väčšia pozornosť sa kládla na lumbosakrálnu oblasť. Následná dlhá incízia dura mater spinalis umožnila vizualizáciu spinálnych koreňov a conus medullaris a rozlíšenie typu plexu (prefixovaný, postfixovaný alebo normotypový). Odhalené miechové segmenty, korene a ich anomálie boli vyšetrené a zdokumentované podľa typu variácie (viď Tab.). Tkanivo každej anomálie bolo excidované, spracované metodikou svetelnej mikroskopie (do parafrínových bločkov), narezané na tenké rezy a prehľadne ofarbené hematoxylínom-eozínom pre ozrejmienie ne/prítomnosti nervového tkaniva vo vnútri.

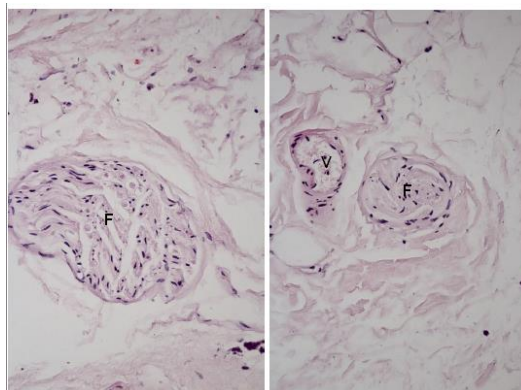
Výsledky a diskusia

Intraspinálny typ splete (plexu) bol definovaný určením výstupu C2 koreňa: prefixovaný typ sme zaznamenali v 9 prípadoch, postfixovaný v 4 prípadoch a zbytok (30 prípadov) boli normotypové plexy. Intumescencia lumbosacralis varíovala vo svojom tvare a priebehu: pri prefixovanom type bola kratšia a viac vyznačenejšia, pri postfixovanom type dlhšia a menej vyznačenejšia, jej hrot bol v úrovni T12 stavca, kde pri normotypovom plexe vystupoval koreň L3, pri prefixovanom type koreň L2 a pri postfixovanom type korene L4 a L5. Druhy pozorovaných anomálií odstupov LS miechových koreňov (diferencované podľa typu plexu) sú zobrazené v Tabuľke.

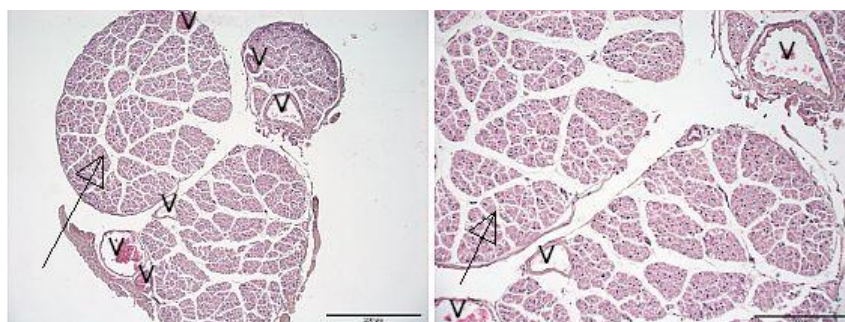
Tabuľka 1 Extradurálne anomálie odstupov LS miechových koreňov.

typ plexu	počet	nerovnaké rozostupy LS koreňov- blízko, dvojité, kombinácia kraniálneho a kaudálneho odstupu	2 korene v 1 neuro-foramene	extradurálna spojka	extradurálne chýbanie koreňa
normotyp	30	2	1	1	-
prefixovaný	9	-	-	1	2
postfixovaný	4	2	-	-	-
celkovo	43	4	1	2	2

Celkovo sme zaznamenali 9 extradurálnych LS anomálií (20.93%): **A)** 4 prípady nerovnakých rozstupov medzi odstupmi LS koreňov (9.31%): 2x u normotypovej splete (4.65%) a 2x u postfixovaného plexu (4.65%), **B)** 1 prípad 2 lumbálnych koreňov vystupujúcich cez 1 neuroforamen (normotypový plexus) (2.33%), **C)** 2 prípady (normotypový a prefixovaný plexus) prítomnosti extradurálnej spojky (anastomózy) medzi susednými koreňmi (4.65%): u normotypového plexu bola spojka zdvojená (medzi L5 – S1 a S1- S2) a u prefixovaného typu bola spojka v úrovni S3 (Obr. 1 a 2), **D)** 2 prípady (prefixovaný typ) chýbajúcich koreňov (4.65%).

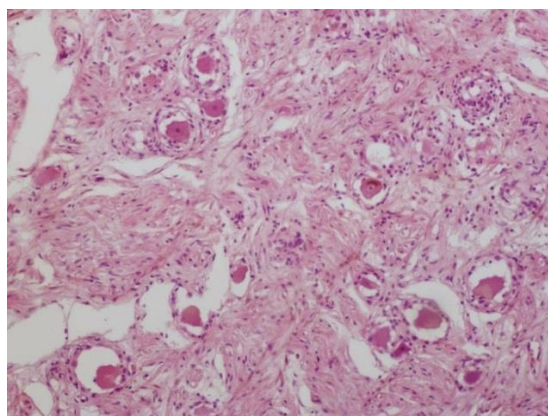


Obr. 1 Ľavá časť: priečny histologický rez nájdenej extradurálnej spojky medzi koreňmi L5- S1. Pravá časť: histologický rez spojky medzi koreňmi S1-S2 (zväčšenie 400x, farbenie hematoxylín- eozín), F= priečne prerezaný nervový zväzok, V= priečne prerezaná cieva.



Obr. 2 Histologický rez spojky medzi koreňmi S3-S4, farbenie hematoxylín-eozín, zväčšenie 100x (vľavo) a detail pri zväčšení 200x (vpravo). V= priečne prerezané cievy, šípky poukazujú na priečne prerezaný nervový zväzok (fascikul).

Nervové tkanivo (priečne prerezaný nervový zväzok s krvnými cievami) sa znázornilo vo všetkých vzorkách odobratých LS anomálií, v niektorých prípadoch sa v reze znázornili aj gangliové bunky (Obr.3).



Obr. 3 Zachytené štruktúry nervu s gangliovými bunkami (zväčšenie 100x, HE)

Výskyt anomálií odstupov miechových koreňov (14%), zvyčajne vľavo a v úrovni L5/S1 už bolo spomínané Kadishom a kol. u kanadskej populácie v r.1984 [3]. Anomálie miechových koreňov boli pozorované u pacientov so symptómami hernie intervertebrálneho disku, u kt. korešpondujúci nález sa našiel počas operácie [1, 12]. Výsledok operácie nebol uspokojivý a len u niekoľkých pacientov sa zmiernili alebo odstránili ťažkosti. Predpokladané príčiny takéhoto neúspechu sú 2: 1) anomálie môžu pôsobiť bolesť a 2) anomálie koreňov môžu zaberať väčší priestor v spinálnom kanáli, takže aj malé zhrubnutie medzistavcovej platničky môže byť príčinou symptómov. Miecha je počas normálnej flexie a extenzie mobilná, avšak anomálne korene byt' príčinou väčších trakčných síl aj pri normálnych pohyboch chrčtice [13].

Záver

Potvrdenie prítomnosti spojok medzi rôznym úrovňami poukazuje na absenciu „absolútnej inervácie“. Spinálni chirurgovia by mali brať možný výskyt týchto anomálií v úvahu pri operáciách a vyhnúť sa trakčným poraneniam miechových koreňov. Vedomosť o prítomnosti týchto odchýlok vzrastá aj so zavádzaním nových menej invazívnych operačných techník herniovaného disku (ako napr. perkutánna endoskopická diskektómia používajúca transformálny prístup), keďže predoperačne nerozpoznaná anomália miechového koreňa môže byť príčinou náhle (perioperačnej) zmeny operačnej techniky alebo príčinou celkového neúspechu procedúry [14].

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0028/16.

Literatúra

- [1] Arslan, *Clinical Anatomy*. **2012**, 25:218-223.
- [2] Dhar, *Neurol Res*. **2017**, 39/4:311-314.
- [3] Kadish a Simmons, *J Bone Joint Surg Br*. **1984**, 66:411-416.
- [4] Burke, *Neurosurg Focus*. **2013**, 35/2: E9:1-6.
- [5] Zagnosi, *Atti Soc Med Chir (Padova)*. **1949**, 27:48-52.
- [6] Ethelberg, *J Bone Joint Surg Br*. **1952**, 34-B/3:442-446.
- [7] Tevfik, *J Cardiovertebral Jun Spine*. **2014**, 5:99-101.
- [8] Neidre a Macnab, *Spine (Phila Pa 1976)*. **1983**, 8:294-299.
- [9] Scarf, *Sur Forum*. **1981**, 32:489- 491.
- [10] Keegan, *Arch Surg*. **1947**, 55:246-270.
- [11] Kilocuckni, *Spine*. **1984**, 9:23.
- [12] Rask, *Surg Neurol*. **1977**, 8:139-140.
- [13] Transfeld a Simons, *Presented at the International Society for the Study of the Lumbar Spine Meeting, Toronto*. **1982**: June 7.
- [14] Henmi, *J Neurol Surg A*. **2018**, 79:19-24.

Polandov syndróm u mladého muža

Marčeková, M.¹, Neščáková, E.², Mellová, Y.¹

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

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie, Bratislava
marcekova@fmed.uniba.sk

Abstract

Poland Syndrome is characterized by unilateral, partial or complete absence of the sternocostal head of the major pectoral muscle and brachysyndactyly of the fingers on the same side. The incidence is 1:30 000, with a higher frequency among males [5]. In 75% of the unilateral cases it is located in the right hemithorax [2]. We report the case of a young man with a Poland Syndrome located on the right side. Initial physical examination showed: agenesis of the right pectoralis major and minor muscles, hypoplasia of the supraspinatus and infraspinatus muscle, hypoplasia of the bones of forearm and hypoplasia and brachysyndactyly of the fingers. These anomalies were compatible with the diagnosis of Poland syndrome.

Key words: Poland syndrome, congenital anomalies of the limbs, disturbance of fetal development, outgrowth of the radiation

Úvod

Polandov syndróm je vzácna anomália, ktorá sa zvyčajne vyskytuje unilaterálne, ako čiastočná alebo úplná agenéza m. pectoralis minor a pars sternalis m. pectoralis major. Táto porucha je spravidla sprevádzaná brachysyndaktýliou rovnostrannej končatiny [1]. Často bývajú prítomné aj ďalšie anomálie, ako defekty rebier, malformácie prednej brušnej steny a prsníka. Tento syndróm sa najčastejšie vyskytuje na pravej strane - až 75% prípadov je pravostranných; bilaterálny výskyt je len ojedinelý [5]. Pri ľavostrannom výskyte sa vzácne stretávame s dextrocardiou, môže byť prítomná herniácia pľúc, renálne anomálie, deformácia stavcov a dolnej končatiny [4]. Incidencia tohto syndrómu je 1:30 000, častejšie sa vyskytuje u mužov. Príčina vzniku je neznáma, pravdepodobne ide o redukciu alebo obštrukciu periférnych vetiev a. subclavia, alebo aa. vertebrales, počas šiesteho týždňa embryonálneho vývinu [4]. Polandov syndróm sa v rodinách objavuje len sporadicky. Pravdepodobne ide o paradominantný mechanizmus dedičnosti, pri ktorom sa môžu mutácie prenášať cez viacero generácií, bez objavenia sa zreteľného fenotypu. Asociácie s inými syndrómami nie sú bežné, uvádza sa len asociácia s Moebiovým syndrómom [1].

Materiál a metodika

Pacient mužského pohlavia s mnohopočetnými vývinovými anomáliami pravej hornej končatiny. Vyšetrovaný muž sa narodil ako štvrté dieťa z gravidity, ktorá sa začala v priebehu prvých dvoch mesiacov po výbuchu jadrovej elektrárne v Černobyle, v apríli 1986. Matka aj detský lekár predpokladajú vplyv radiácie na vývin plodu a vývinové anomálie pravej hornej končatiny sú považované za jej dôsledok. Priebeh gravidity aj pôrod bol bezproblémový. Diagnóza Polandovho syndrómu nebola v zdravotnej dokumentácii uvedená. Vývinové anomálie hornej končatiny sa v rodine nevyskytli, u dvoch príbuzných mužského pohlavia sme

identifikovali pes equinovarus. Genetické vyšetrenie zatiaľ nebolo urobené, na zhotovenie fotografií bol použitý fotoaparát Olympus EF 130.

Výsledky

U dvadsaťpäťročného muža boli zistené vývinové anomálie kostí a svalov pravej hornej končatiny. Na prvý pohľad bola pravá horná končatina kratšia ako ľavá. Dôvodom skrátenia bola hypoplázia obidvoch kostí predlaktia - rádia aj ulny (Obr. 1). Rovnako hypoplastické boli aj kosti ruky, redukcia bola zistená u ossa metacarpalia aj u phalanges digitorum, najvýraznejšie u palca a u druhého prsta (Obr. 2, 3, 4).

Parciálna syndaktília 1. stupňa - syndactylia cutanea bola prítomná medzi trojčlánkovými prstami pravej ruky, najvýraznejšie medzi 2. a 3. prstom, čo spôsobovalo mužovi problémy pri nosení rukavíc (Obr. 5).

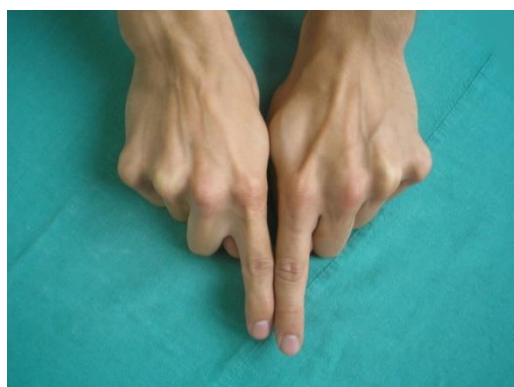
Palpačne sme overili agenézu m. pectoralis minor a m. pectoralis major (obr. 6, 7, 8). Zistili sme hypopláziu m. supraspinatus a m. infraspinatus (Obr. 9), a tiež hypopláziu m. biceps brachii a svalov predlaktia (Obr. 10).



Obr. 1 Hypoplázia predlaktia a ruky



Obr. 2 Hypoplázia prstov ruky



Obr. 3 Hypoplázia kostí ukazováka



Obr. 4 Hypoplázia kostí palca



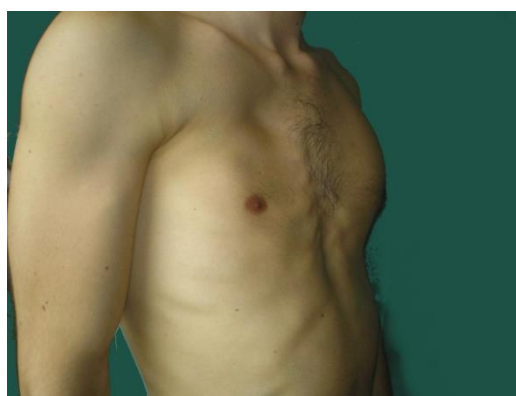
Obr. 5 Parciálna syndactylia cutanea



Obr. 6 Agenéza m. pectoralis minor et major



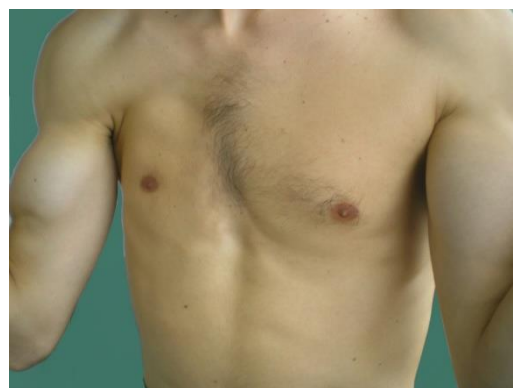
Obr. 7 Agenéza m. pectoralis minor et major – pohľad z ľavej strany



Obr. 8 Agenéza m. pectoralis minor et major - pohľad z pravej strany



Obr. 9 Hypoplázia m. supraspinatus et infraspinatus



Obr. 10 Hypoplázia m. biceps brachii

Diskusia

Diagnóza Polandovho syndrómu sa zvyčajne určuje postnatálne, len vo výnimočných prípadoch sa jej určenie robí prenatálne [1]. Pacienti s výraznými deformáciami hrudníka absolvujú chirurgickú liečbu obyčajne po ukončení rastu, výnimkou sú respiračné problémy, kedy sa chirurgická liečba aplikuje aj u malých detí [5]. [3] uvádza, že ionizujúce žiarenie spôsobuje jednoduché a dvojité zlomy DNA a vznikajúce radikály spôsobujú vznik chromozómových aberácií a mutácií.

Po výbuchu atómovej elektrárne v Černobyle, v rokoch 1988-1994 v Bielorusku prudko vzrástol počet vrodených vývinových porúch (161%) a počet detí chorých na rakovinu - 2500(1986), 6713(1989). Vzhľadom na väčšiu citlivosť plodov mužského pohlavia v priebehu fetálneho vývinu, predpokladá sa u tejto skupiny zvýšený počet spontánnych abortov poškodených plodov [3].

Záver

U vyšetrovaného mladého muža bola diagnóza Polandovho syndrómu potvrdená na základe viditeľných a palpačne zistiteľných malformácií pravej hornej končatiny. Na želanie vyšetrovaného plánujeme uskutočniť röntgenologické a genetické vyšetrenie.

Literatúra

- [1] Baban, *Am J Med Genet* . **2009**, 149A/7:1597-1602. Pub Med Abstract
- [2] Ferraro, *Aest plast Surg*. **2005**, 29:3.
- [3] Gazjuk, *Stem Cells, Suppl*. **1997**, 2: 255-60.
- [4] Moir, *Sem in Ped Surg*. **2008**,17:161-166.
- [5] Supulveda, *Prenat diagn*. **2009**, 29(9): Pub Med Abstract

Vliv jednotlivých fází menstruačního cyklu na výkonnost a efektivitu tréninku u rekreačních běžkyň

Grussmannová, A., Muri, J., Kredbová, B., Buroňová, V., Tokarčík, J., Dorko, F.

Ostravská univerzita, Lékařská fakulta, Ústav anatomie, Ostrava, Česká republika
alzbeta.grussmannova@osu.cz

Abstract

Menstrual cycle and its phases influence the performance of every fertile woman. Regarding the increasing popularity of endurance running, we have decided to put these two facts into context. As for this research, we worked with the data of 53 fertile women, who have decided to devote their free time to recreational, longer-distance running (at least 10 kilometres 3 times a week). Out of these 53 women, we have earmarked a group of 15 using hormonal contraception. Subjects were observed during a period of three menstrual cycles.

Keywords: menstrual cycle, long-distance runners, training influence

Úvod

U každé fertilní ženy, v období mezi menarche a menopauzou, dochází k cyklickému střídání produkce hormonů. Menstruační cyklus probíhající v endometriu dělohy a ovariální cyklus probíhající ve vaječnících jsou pod stálou kontrolou nadřazeného hypothalamo-hypofyzárního systému. Ovariální cyklus obsahuje dvě fáze, v první fázi folikulárního dochází pod vlivem FSH adenohipofýzy (přičemž sám je ovlivňován LH-RH hypothalamu) k růstu ovariálních folikulů, rostoucí folikuly produkují estrogény a vyplavují se do krve. Jejich hlavní funkce spočívá v přípravě ženského organismu na oplození vajíčka, v děloze působí na navození proliferační fáze menstruačního cyklu. Stoupající hladina estrogenu v krvi inhibuje produkci FSH a podnítí v adenohipofýze tvorbu LH, který vyvolá ovulaci, působí na konečné dozrání oocyty a řídí funkci žlutého tělíska. Tím nastává po ovulaci druhá fáze folikulárního cyklu (fáze luteální), při níž corpus luteum produkuje gestageny. Funkce gestagenů spočívá v přípravě a udržení těhotenství. S ovariálním cyklem úzce souvisí cyklus menstruační, který začíná menstruační fází 1.-4 den cyklu, po ní následuje fáze proliferační/folikulární/estrogenová 5.-14 den ukončena ovulací, 15.-27. den je při fázi sekreční/luteální endometrium pod vlivem progesteronu, pokud nedojde k oplození oocyty, nastává 28. den fáze ischemická, po ní následuje nová menstruační fáze a menstruační cyklus de novo [1]. Jednotlivé fáze menstruačního cyklu mohou udávat rozdílné podmínky pro trénink i výsledný výkon. Během prvních dní menstruační fáze mohou ženy pociťovat únavu, obtěžující bolesti podbřišku, křeče nebo zvracení, tyto symptomy trvají v průměru první tři dny, poté může trénink pod vlivem vyplaveným endorfinů některé projevy zmírnit. Udává se, že nejlepších výkonů dosahují ženy ke konci menstruační fáze a začátku proliferační. Proliferační fáze cyklu se považuje za nejvhodnější z hlediska tréninku, žena podává nejlepší výkony, ke konci proliferační fáze v období plodných dní nemusí být psychická kondice v souladu s fyzickou, objevuje se nedostatek chuti závodit, posouvat osobní rekordy, chuť na běh může být snížena. Sekreční fáze cyklu je pod vlivem progesteronu, žena může zaznamenat nárůst hmotnosti, zadržování vody, zvýšené pocení. Ke konci sekreční fáze mnoho žen obtěžuje premenstruační syndrom zahrnující prudké výkyvy nálad, bolesti a křeče v podbřišku, migrény a zvýšenou únavu. Během tohoto období se doporučuje

trénink nižší intenzity, který může působit proti fyzickým i psychickým projevům PMS [2].

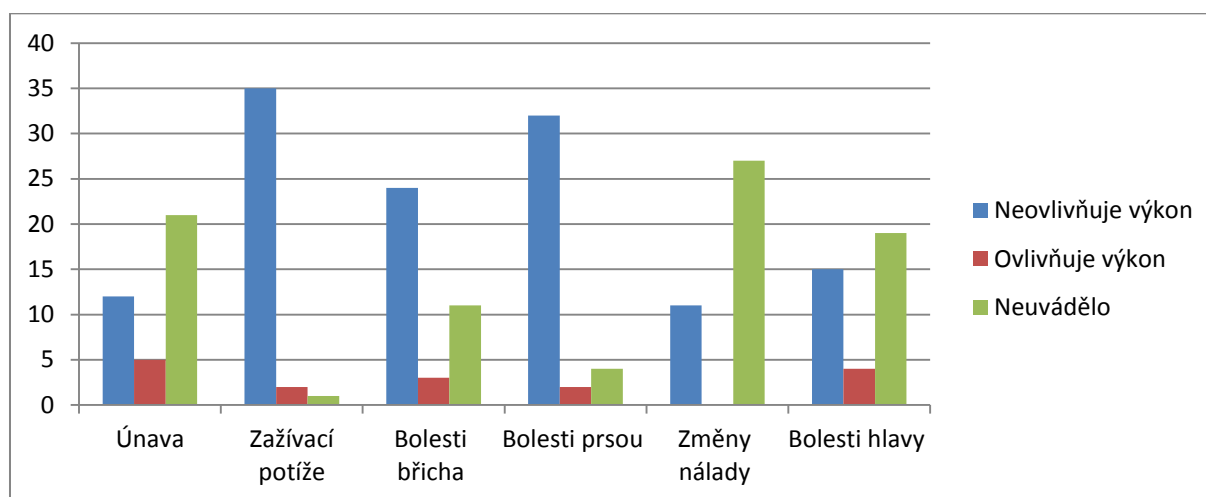
Materiál a metodika

Pro výzkum byla použita data 53 vytrvalostních rekreačních běžkyň v rozmezí věku 19 - 46 let. První z podmínek byla reprodukční aktivita, nebyly přijímány ženy před menarche ani po menopauze. Dále byly vybírány pouze ženy běžající rekreačně. Poslední byla četnost provozované aktivity, minimálně 10 km 3x týdně. Po splnění podmínek byly ženy sledovány po dobu tří menstruačních cyklů. Průměrná délka menstruačního cyklu byla 29 \pm 3 dny, Průměrná délka menstruační fáze byla 5 \pm 2 dny. Zkoumána byla kvalita tréninku, průměrná rychlost během výběhu a emoční stav ženy, vše vztažené na den menstruačního cyklu. Při vyhodnocování bylo 53 běžkyň rozděleno na skupinu užívající hormonální antikoncepci (n=15) a na skupinu bez hormonální antikoncepce (m=38). U m- skupiny byla hodnocena sekreční fáze menstruačního cyklu, období ovulace a menstruační fáze menstruačního cyklu. U n- skupiny byla hodnocena pouze druhá polovina menstruačního cyklu (rozmezí mezi 14. a posledním dnem cyklu).

Výsledky

Skupina žen neužívajících hormonální antikoncepci: Sekreční fáze menstruačního cyklu

38 žen bylo dle uváděných potíží rozděleno do tří skupin. V první se nacházely ženy pociťující dané obtíže, nicméně ty jim působily pouze dyskomfort, ve výsledku neovlivňovaly negativně výkon. V druhé byly počty žen, kdy potíže natolik ovlivňovaly výkon, že došlo k objektivnímu zhoršení (vztaženo na průměrnou rychlost za kilometr) nebo kvůli nim bylo v extrémním případě nutné trénink ukončit. V poslední skupině byly ženy, které danou obtíž během sekreční fáze nepociťovaly. Z potíží byl zájem o pocity zvýšené únavy, gastrointestinální potíže, bolesti prsou a podbřišku, bolesti hlavy včetně migrenózních a v neposlední řadě změny nálady.

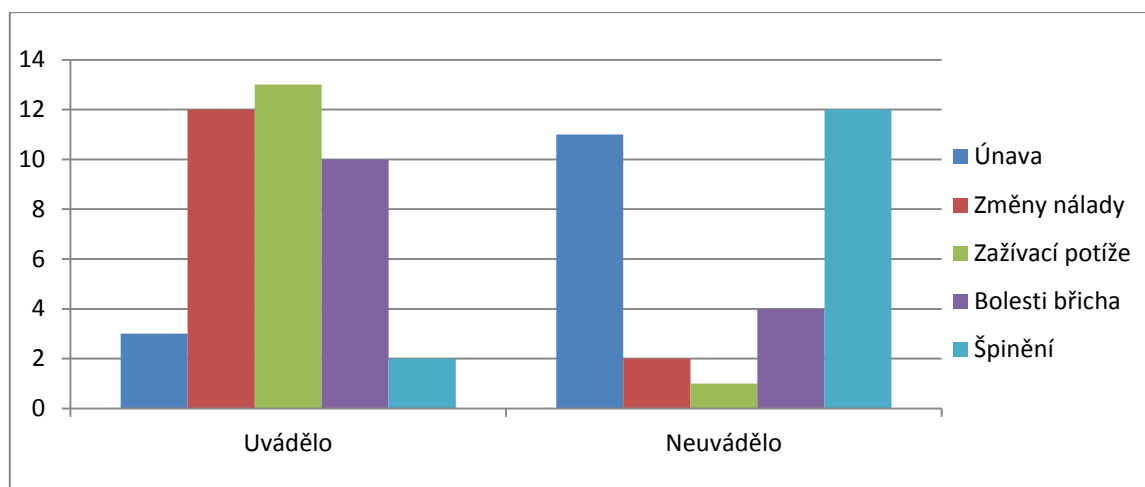


K největšímu ovlivňování výkonu docházelo u pocitů zvýšené únavy, kdy u 5 žen ze 17 tento problém limitoval výkon. Další v pořadí byly bolesti hlavy včetně migrenózních, které limitovaly výkon u 4 subjektů z 19. Nejzávažněji ovlivňovaly trénink bolesti podbřišku, při kterých musely 3 subjekty z 27 trénink ukončit pro špatně snesitelnou bolest, která nemizela ani po několika minutovém odpočinku. Bolest u všech tří žen přicházela v rozmezí 2-3. km běhu a přetrvávala od začátku sekreční fáze a po počátek ischemické fáze menstruačního cyklu. Mezi poslední zajímavost v této fázi cyklu patřily změny nálady, které uvádělo 11 žen.

Neovlivňovaly v negativním tréninku, pouze působily dyskomfort, nicméně po ukončení tréninku uváděly všechny ženy zmírnění nebo vymizení obtíží.

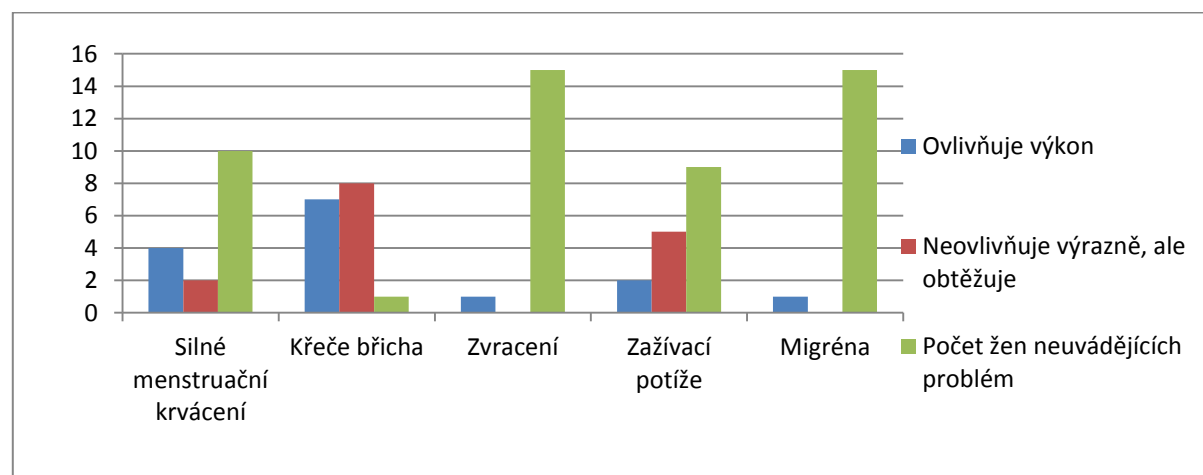
Skupina žen bez hormonální antikoncepce: Období poloviny cyklu

V období poloviny cyklu byly zkoumány pocity zvýšené únavy, negativní změny nálady zahrnující úzkost, agresi, zhoršení nálady, apatie a nechuť k činnosti, gastrointestinální potíže, bolesti podbřišku a oproti sekreční fázi menstruačního cyklu přibyl podbod intermenstruačního krvácení. Období poloviny cyklu se hodnotilo mezi 14.-16. dnem cyklu. Aspoň jeden z uvedených problémů pociťovalo 14 subjektů z 38. A žádný z problémů nebyl natolik závažný, aby negativně ovlivňoval fyzický výkon nebo jej přerušoval. Mezi nejčastěji uváděné problémy patřily gastrointestinální potíže.



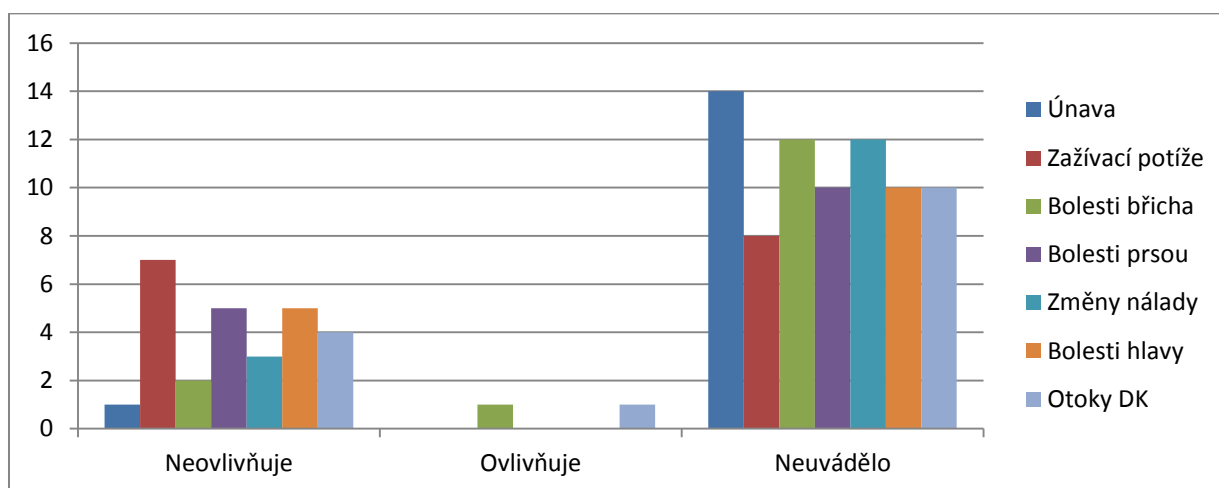
Skupina žen bez hormonální antikoncepce: Menstruační fáze menstruačního cyklu

Výrazné obtíže během menstruační fáze menstruačního cyklu uvádělo 16 žen z 38. Po prvních třech dnech menstruační fáze se zmírňovaly nebo vymizely. Oproti zbývajícím zkoumaným fázím bylo navíc hodnoceno velké menstruační krvácení, jež hned u 4 žen z 16 výrazně ovlivňovalo výkon. Velkým problémem se zdály být menstruační bolesti podbřišku, které limitovaly výkon u 7 žen a u dalších 8 jej sice neovlivňovaly, nicméně působily výrazný dyskomfort.



Skupina žen s hormonální antikoncepcí: Druhá polovina cyklu

Z celkového počtu 15 subjektů bylo 9 žen užívajících kombinovanou hormonální antikoncepci, 6 žen užívalo čistě gestagenní/ progestinovou hormonální antikoncepci [3]. Všechny ženy měly daný typ antikoncepce nasazený minimálně rok. Oproti předchozím skupinám byl výrazně menší počet problémů ovlivňujících závažným způsobem výkon. Nejčastěji ženy pociťovaly bolesti prsou, celkem 5 žen z 15, které ovšem působily pouze dyskomfort, kvalitu tréninku neovlivňovaly. Navíc byl popisován problém otoku dolních končetin, který ženy v ostatních skupinách nepociťovaly; ten popisovaly 4 subjekty jako nezávažný, pouze obtěžující, u jedné ženy výkon ovlivňoval.



Závěr

V proliferační fázi cyklu popisovaly ženy výbornou výkonnost i chuť trénovat, průměrná rychlost v počtu minut na kilometr byla průměrně o 30 sekund nižší než v fázi sekreční (od 12 s po 57 s). V polovině cyklu (období ovulace) popisovaly ženy větší počet negativních symptomů působících dyskomfort, ani jeden z problémů nebyl natolik závažný, aby negativně ovlivňoval výkon. Větší množství symptomů limitujících výkon jsme zaznamenali v sekreční a dále v menstruační fázi cyklu. Některé z nich, zvláště změny nálady, pozitivně ovlivňoval trénink. Po výběhu docházelo ke zmírnění nebo vymizení potíží. U žen s hormonální antikoncepcí jsme zaznamenali menší počet výkonostních výkyvů v tréninku během první i druhé poloviny cyklu. Ke změnám průměrné rychlosti téměř nedocházelo (± 10 s). U žádné ženy jsme během tří měsíců sledování nezaznamenali vymizení menstruačního cyklu (amenorrhea).

Literatura

- [1] Barrett, 24th ed. New York: McGraw-Hill Medical. 2012, ISBN 978-1-259-00962-4.
- [2] Gaudlová, Brno: CPRESS. 2015, ISBN 978-80-264-0851-2
- [3] Křepelka, Praha: Mladá fronta. Edice postgraduální medicíny. 2013, ISBN 978-80-204-2991-9.

Odber a fixácia materiálu určeného na histologické vyšetrenie

Kocianová Z.¹, Adamkov M.¹, Drahošová S.²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin; ² Hermes LabSystems, Bratislava
kocianova12@jlf.uniba.sk

Abstract

The purpose of the histological examination is to determine or confirm/refute a diagnosis. However, to determine the final result of a histological examination and thus to determine the correct diagnosis of the patient and its treatment, the tissue samples have to undergo a complicated laboratory process. This process is influenced by a several factors, beginning with biopsy, through the fixation to the final diagnosis.

Key words: biopsy, tissue sample, fixation

Úvod

Príprava histologických preparátov prebieha v histologickom laboratóriu. Z veľkej časti ide stále o manuálnu prácu, ktorá si vyžaduje určité nároky a špecifiká od laboratórnych pracovníkov. Je však potrebné dodať, že laboratórna technika sa najmä v posledných dvoch desaťročiach dynamicky rozvíja a do praxe sa dostávajú rôzne automatizované farbiace systémy [1]. Súčasná histológia však nie je obmedzená len na štúdium tkanív pomocou rôznych farbiacich techník. Objavujú sa stále nové a sofistikovanejšie metódy, ktoré ďalej vo veľkej miere prispievajú k detailnejšiemu pochopeniu funkčnej morfológie buniek. Umožňujú nám tiež spoľahlivé rozlíšenie jednotlivých typov buniek aj v takých prípadoch, kedy je ich morfológia veľmi podobná [2,3]. V diagnostickom procese je cieľom histologického vyšetrenia určiť, respektíve potvrdiť alebo vyvrátiť diagnózu, na ktorú má podozrenie klinický lekár [4]. Aby však bolo možné určiť konečný výsledok histologického vyšetrenia, a teda určiť správnu diagnózu pacienta a jeho liečbu, tkanivové vzorky musia prejsť zložitým laboratórnym procesom spracovania, ktorý v sebe zahŕňa viacero na seba nadväzujúcich postupov [3,5]. Celý tento proces je po celý čas ovplyvňovaný viacerými faktormi, počnúc odberom samotnej vzorky tkaniva až po interpretáciu výsledkov patológom [4,6]. Celkové spracovanie bolo rozdelené do troch hlavných fáz - na preanalytickú, analytickú a postanalytickú fázu [7]. Najrozsiahlejšou fázou je práve preanalytická fáza, ktorá v sebe zahŕňa viacero krokov spracovania materiálu, preto je tu aj vyššia možnosť výskytu chýb pri spracovaní, čo môže následne ovplyvniť nasledujúce dve fázy, a v konečnom dôsledku kvalitu preparátu určeného na diagnostiku [6]. Medzi dôležité kroky patria najmä odber materiálu a jeho správna fixácia.

Odber materiálu

Ak má klinický lekár podozrenie na závažné ochorenie, je potrebné, aby pacient podstúpil zákrok, ktorého cieľom je odobrať tkanivo s pravdepodobnou patologickou zmenou [8]. Spôsob akým bude materiál odobraný na vyšetrenie závisí na rozhodnutí vyšetrujúceho lekára [9]. Odobrané vzorky delíme do troch základných skupín: cytologické vzorky, malé bioptické a veľké bioptické vzorky [8, 9].

1. Cytodiagnostika (cytologická biopsia). Predmetom vyšetřovania sú samotné, patologicky pozmenené bunky izolované z určitého typu tkaniva alebo orgánu.

Najčastejšie sa touto metódou diagnostikujú gynekologické ochorenia. Vzorky určené na cytodiagnostiku možno získať:

a.) exfoliatívnou cytológiou, pri ktorej sa hodnotia bunky odlúčené z povrchových epitelových štruktúr. Materiál sa získava odtlačkom, sterom alebo odberom exkrétov. Táto metóda sa najčastejšie využíva pri odbere gynekologického materiálu, a to sterom z endo- a exocervixu krčka maternice a ďalších ženských reprodukčných orgánov [8,9]. S vývojom laboratórnej techniky však nastal posun v oblasti detekcie rakoviny krčka maternice. Potupne sa zavádza technika „liquid based cytology“ (tenkovrstvová cytológia), pri ktorej sa vzorka odoberá sterom, rovnako ako pri bežnom skríningu. Rozdiel je však v tom, že zo vzorky nie je bezprostredne po odbere zhotovený náter. V tomto prípade sa vzorka vkladá do „vialky“ s fixačným roztokom. Fixované vzorky sa potom nanášajú na sklíčka, a to pomocou systémov, ktoré zabezpečujú separáciu cervikálnych buniek od krvi, hlienu alebo iných možných prímiesí a zabezpečia tak adekvátne tenký a hodnotiteľný náter [10]. Technika zhotovovania sterov sa tiež využíva pri ochoreniach respiračného systému. Preparáty sú v tomto prípade zhotovované zo spúta, patologických pleurálnych výpotkov a bronchoalveolárnych laváží. Lavážnou technikou sa získavajú tiež vzorky orgánov brušnej dutiny [8].

b.) punkčnou aspiračnou cytológiou a odberom telových tekutín sa materiál získava pomocou tenkej ihly (fine-needle aspiration), ktorá aspiruje obsah z cýst, pseudocýst a ascitov lokalizovaných napr. na štítnej žľaze, prostate, prsníku, pankrease, lymfatických uzlinách, atď. Touto metódou sa môžu tiež získavať telesné tekutiny, ako napr. synoviálna tekutina, pleurálny a perikardiálny výpotok, atď. Z takto získaných vzoriek sa zhotovujú cytologické nátery [8,9].

2. Biopsia malých bioptických vzoriek. Malé bioptické vzorky reprezentujú veľmi malú časť konkrétneho tkaniva a môžeme ich získať tromi základnými spôsobmi:

a.) menším chirurgickým zákrokom formou excízie z povrchových alebo hlbších štruktúr vyšetrovaných orgánov alebo kyretážou. Povrchové excízie sa získavajú najmä z kožných a podkožných lézií. Týmto spôsobom sa odoberajú tiež pľuzgiere a vredy [11]. V prípade hlbšie uložených štruktúr je odber možný len laparoskopicky. Týmto spôsobom získavame vzorky z tráviaceho (najmä zo sliznice) a urogenitálneho systému, ale tiež vzorky z pľúc. Kyretážou sa odoberáme vzorky zo sliznice maternice [8,9].

b.) endoskopickými metódami, vďaka ktorým je možné vyšetriť a odobrať vzorky z dutín a orgánov bez výrazného narušenia integrity organizmu. Existuje množstvo typov endoskopií, v závislosti od vyšetrovaného orgánu, ako napr. gastroscopia, bronchoskopia, kolonoskopia, cystoskopia, atď. [9].

c.) punkčnou biopsiou pomocou hrubej ihly, kedy sa získava menší kus tkaniva vyšetrovaného orgánu vo forme punkčného valčeka. Je to dôležitá súčasť diagnostiky ochorenia mnohých orgánov, napr. pečene, štítnej žľazy, lymfatických uzlín, obličiek, prostaty, prsníkov (core – cut biopsia), kostnej drene a ďalších. Pri diagnostike kožných ochorení je dôležitá špeciálna punkčná biopsia – „punch“ biopsia, pri ktorej sa ako odberový nástroj nepoužíva ihla, ale priebojník (nástroj rúrkovitého tvaru). Vzorky získané „punch“ biopsiou sú určené na imunofluorescenciu [8,9,11].

3. Biopsia veľkých bioptických vzoriek. Veľké bioptické vzorky sa odoberajú v prípade, že na orgáne alebo jeho častiach sú viditeľné veľké patologické zmeny. Vtedy musí pacient podstúpiť operáciu, pri ktorej mu lekár odoberie celý orgán alebo resekuje jeho časť [12].

Špeciálnym typom biopsie je trepanobiopsia, pri ktorej sa odoberá vzorka z kostnej drene, zvyčajne z bedrovej kosti, pomocou špeciálnych Yamshidiho ihli vo forme trepanobiopického valčeka [8].

Medzi špecifické vyšetrenie patrí peroperačná biopsia, ktorá poskytuje informácie chirurgovi už počas operačného zákroku. Tieto informácie sú dôležité z hľadiska ďalšieho priebehu operácie [8].

Možné chyby pri odbere materiálu

Pri odbere sa kladie veľký dôraz na kvalitu odoberaného materiálu. Ak by bolo tkanivo zle odobrané alebo poškodené, mohlo by sa skomplikovať alebo dokonca úplne znemožniť vyhodnotenie biopsie a v konečnom dôsledku by to mohlo oddialiť adekvátnu liečbu. Najčastejšími chybami pri odberoch tkanivových vzoriek sú malý objem biopického vzorky, jej mechanické poškodenie používaním kovových inštrumentov alebo vkladáním tkaniva do nevhodných prepravných nádob, poškodenie tkaniva vysychaním alebo oneskorené ponorenie tkaniva do fixačného roztoku [8].

Fixácia materiálu

Po odobratí vzorky dochádza v tkanive k prerušeniu všetkých životne dôležitých procesov v bunke, čo má za následok dezorganizáciu bunkového metabolizmu, ktorého funkčnosť zabezpečujú vlastné enzýmy bunky. Ak dôjde k nekoordinovanej aktivite týchto enzýmov, nastáva autolýza buniek. Preto najdôležitejším krokom bezprostredne po odbere vzorky je fixácia, ktorá zabraňuje samonatraveniu bunky inaktiváciou vlastných enzýmov bunky. Na základe spôsobu ako pracujú jednotlivé enzýmy v bunkách a tkanivách, existujú dva základné typy fixácie: fyzikálna a chemická [1,2,8].

Fyzikálny typ fixácie nie je používaný často. Medzi metódy fyzikálnej fixácie zaraďujeme zmrazovanie, techniku „freezing drying“ a najjednoduchšiu formu, fixáciu teplom. Asi najbežnejšie používanou je práve technika zmrazovania vzoriek, napr. pri peroperačnej biopsii. Keďže všetky reakcie v bunke prebiehajú vo vodnom prostredí, podstatou zmrazovania je ovplyvniť transportnú funkciu vody. Je potrebné, aby zmrazenie prebehlo čo najrýchlejšie, aby sa zabránilo tvorbe kryštálikov vody. Na zmrazenie sa môže použiť tekuté médium glycerín, kyselina uhličitá vo forme suchého ľadu (-75°C) alebo kvapalný plyn - tekutý dusík (-180°) [1,2,4,8]. Obmedzene používanou je technika „freezing drying“, a to z dôvodu časovej náročnosti. Okrem toho pri tejto technike dochádza k menšej zmene štruktúry buniek a ich chemického zloženia. Princípom techniky je rýchle zmrazenie vzoriek tekutým dusíkom, a následne ich sušenie sublimáciou pri zníženom tlaku [13].

Najbežnejším postupom používaným pri uchovávaní vzoriek pre svetelnú a elektrónovú mikroskopiu je chemická fixácia. V tomto prípade sú vzorky jednoducho ponorené do vhodnej fixačnej tekutiny. Fixačné roztoky sú tradične klasifikované do dvoch základných kategórií – koagulanty (denaturačné činidlá, napr. etanol, metanol, acetón, kyselina pikrová, chlorid ortuťnatý, sulfát železitý) spôsobujúce denaturáciu bielkovín a nekoagulanty (napr. formaldehyd, glutaraldehyd, oxid osmičelý), tvoriace priečne väzby s proteínmi. Nakoľko ale neexistuje ideálny fixačný roztok, dané látky sa používajú skôr v kombinácii, podľa ich vlastností [2,14]. Bezpochyby najbežnejšie používaným fixatívom je formaldehyd, známy ako formalín. V klasickej histochemii sa využíva formalín riedený s pufrovací roztokom (10% NBF – neutral buffered formaldehyde). Je to najuniverzálnejšie fixatívum, ktoré poskytuje konzistentnú a adekvátnu morfológickú ochranu [7,9].

Pre elektrónovú mikroskopiu je významným fixačným roztokom glutaraldehyd, a to vďaka jeho schopnosti zachovať ultraštruktúru tkaniva. Glutaraldehydom sa fixujú napr. punktáty obličiek a vzorky kože odobrané „punch“ biopsiou [8].

Medzi fixatíva s dlhou tradíciou patrí aj jedovatý oxid osmičelý, ktorý ako jeden z málo fixatív stabilizuje lipidy. Patrí medzi roztoky najlepšie fixujúce membránové organely bunky [4,14].

Z fixatív na báze alkoholu sa najviac používajú etanol a metanol. Etanol je využívaný najmä v neurohistológii, na fixáciu Nisslovej konštanty a na dôkaz niektorých minerálnych látok, napr. vápnik a železo. Metanol sa zasa bežne používa pri fixácii krvných náterov [14]. Na báze alkoholu funguje aj Carnayovo fixatívum, ktoré okrem 100% etanolu obsahuje chloroform a ľadovú kyselinu octovú. Je najoptimálnejším fixatívom nukleových kyselín (RNA) a pri dôkaze glykogénu [4].

Ako už bolo spomenuté vyššie, väčšinou sa fixačné roztoky nepoužívajú samostatne, ale v kombinácii s viacerými inými roztokmi, čo umožňuje fixáciu viacerých látok prítomných v bunke.

Patrí sem napríklad Bouinova tekutina, ktorej hlavnými zložkami sú kyselina pikrová, ľadová kyselina octová a formalín. Dobre zachováva polysacharidy, hlavne glykogén, ale tiež výborne zachováva jadrové detaily bunky [4].

Základom niektorých fixačných tekutín je chlorid ortuťnatý. Medzi takéto fixatíva patria B-5 a Znekerov fixačný roztok. Roztok B-5 okrem chloridu ortuťnatého obsahuje tiež formaldehyd, octan sodný a vodu. Využíva sa najmä na fixáciu krvotvorných tkanív, napr. kostnej drene, lymfatického tkaniva a sleziny [4].

V podstate rovnaké zloženie ako roztok B-5 má aj Zenkerovo fixatívum, ktoré obsahuje navyše aj dvojchróman draselný. Zenkerova tekutina je vhodná na fixáciu v prípade, že je potrebné zachovať štruktúru bunkových jadier [4].

Pri fixácii tkanív, tak ako pri ostatných krokoch spracovania vzoriek, je potrebné dodržiavať isté pravidlá. Najdôležitejším pravidlom pri fixácii je najmä jej množstvo. Objem fixatíva by mal predstavovať 10x až 20x väčší objem ako je objem vzorky. Okrem toho by malo mať fixatívum prístup k tkanivu z každej strany [4,8,14].

Literatúra

- [1] Jirkovská, *Nakladatelství Galén, Praha*. **2006**, 80 s. ISBN 9788072622634
- [2] Maňáková, *Nakladatelství Karolinum, Praha*. **2001**, 54 s. ISBN NO-240-0230-X
- [3] Mohammedsaleh, *J Cytol Histol*. **2014**, 5:1-5
- [4] Polák, *Vydavatelstvo UK Bratislava*. **2010**, 115 s. ISBN 978-80-223-2817-3
- [5] Karki, *J Pathol Nepal*. **2015**, 5:859-864.
- [6] Rao, *JCDR*. **2016**, 10:EC07-EC11.
- [7] Taylor, *DAKO Denmark*. **2013**, s.218
- [8] Dvořák, *Praha*. **2008**, 119 s.
- [9] Kliment, *Osveta, Martin*. **2014**, s. 40-43, ISBN 978-80-8063-430-8
- [10] Denton, *BMJ*. **2007**, 335:1-2.
- [11] Adamicová, *Libuša Chrástková – VYDAVATELSTVO*. **2008**, 104 s., ISBN 978-80-969952-6-4
- [12] Hoskovec, *Onkologie*. **2015**, 9:272-276.
- [13] Mujumdar, *CRC Press*. **2015**, 1303 s., ISBN 978-1-4665-9666-5
- [14] Hueng, *Springer*, **2015**, 576 s., ISBN 978-3-319-19943-6
- [15] Howat, *Methods*. **2014**, 70:12-19.

Použitie histologických metód vo forenzej antropológii

Marcinková, M., Straka, Ľ.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine a Univerzitná nemocnica Martin, Ústav súdneho lekárstva a medicínskych expertíz, Martin
marcinkova.mar@gmail.com

Abstract

Forensic anthropology as a part of forensic medicine deals with skeletonized or partially skeletonized human remains. In some cases, it is not easy question to answer whether the bone findings are actually human, not mentioning establishing complete biological profile (age, sex, height of deceased person) for positive identification. Apart of metrical methods used in everyday athropological practice, other methods such as histology or molecular biology can be applied. Histological methods for distinguishing animal and human bone, for estimating age at death, even for recognizing peri-mortem trauma or diseases are presented.

Keywords: histology in forensic anthropology, age determination from bones, identification from burned bones

Úvod

Kosť je jedným z najtvrdších tkanív v ľudskom tele a po chrupavke je najodolnejším tkanivom schopným vzdorovať mechanickej záťaži. Jej úlohou je poskytovať oporu mäkkým tkanivám, chrániť životne dôležité orgány, prechovávať vo svojej dreni krvotvorný orgán, zároveň slúži ako zásobáreň kalcia, fosfátov a iných iónov, ktoré sú uvoľňované a skladované v kontrolovanom režime tak, aby sa nemenilo iónové zloženie telesných tekutín [1]. Ľudské kosti sú tvorené prevažne lamelárnou kosťou, ktorá má dve formy – hubovitú (spongióznú) a hutnú (kompaktnú). Odlišný typ kosti, vláknitá (fibrilárna) kosť, nemá vrstevnaté usporiadanie a nie sú v nej vyvinuté Haversove kanáliky. Medzibunková nemineralizovaná hmota sa skladá zo zväzkov kolagénových fibríl, medzi ktorými sú rozvetvené osteocyty s početnými výbežkami. U dospelých jedincov tento typ kosti tvorí kostné drsnatiny [2]. Fibrilárna kosť sa bežne vyskytuje počas ontogenézy [3]. Hubovitá kosť je tvorená trojrozmernou sieťou rôzne hrubých a rôzne dlhých trámecov, medzi ktorými sú navzájom spolu komunikujúce priestory. Jednotlivé trámce obsahujú niekoľko lamiel, ktoré sú obvykle usporiadané do rovnobežných koncentrických vrstiev, priestory medzi trámcami sú vyplnené kostnou dreňou [3]. Usporiadanie trámecov zložených z kostných lamiel zodpovedá výslednici síl maximálneho zaťaženia na tlak a ťah [2]. Lamelárna (vrstevnatá) kosť je najdiferencovanejší typ kostného tkaniva, skladá sa z neho väčšina kostí ľudského skeletu [2]. Už voľným okom možno rozlíšiť dva typy – kompaktnú a spongióznú kosť. Základnou štruktúrnou jednotkou kompaktnej kosti sú osteóny (Haversove systémy), útvary cylindrického tvaru s centrálne uloženým kanálikom, ktorého lumen je široký 20-100 µm. Osteón sa skladá z koncentricky usporiadaných kostených lamiel, ktoré tvorí základná medzibunková hmota zložená zväzkami kolagénových vlákien spojených amorfnou hmotou inkrustovanou minerálnymi látkami. Minerálnu zložku predstavujú kryštáliky minerálnych solí apatitového radu, predovšetkým hydroxyapatitu, citrátové a uhličitanové ióny, ióny horčíka a sodíka. Minerálna zložka predstavuje 65% hmoty kostného tkaniva. Odvápnením v kyselinách dochádza k rozpusteniu minerálnych zložiek, kosť stráca svoju tvrdosť, no jej mikroskopická štruktúra ostáva zachovaná [2]. To je dôležité brať

do úvahy pri výbere spôsobu spracovania kostrového materiálu. Osteoblasty sú zodpovedné za tvorbu a kalcifikáciu základnej kostnej hmoty, ktorú produkujú. Osteoblasty sú bunky s priemerom 15-20 μm , ktoré sa navzájom sa spájajú medzibunkovými mostíkmi [3]. Osteoklasty sú mnohoadrové gigantické bunky nepravidelného tvaru a veľkosti, sú prítomné pri regeneratívnom alebo rekonštrukčnom procese. Priemerný počet jadier sa pohybuje od 12-20, ale môže byť zvýšený na 100. Proteolytickým pôsobením osteoklastov je rozkladaná organická zložka medzibunkovej hmoty, čím začína resorpcia kosti [1]. Nachádzajú sa v Howshipových lakúnach v blízkosti miest, kde sa resobuje kosť [2].

Možnosti použitia histologického vyšetrenia kostí v antropológii

Spracovanie kostí

Na spracovávanie kosti sa, vzhľadom na jej tvrdosť, používajú špeciálne techniky. Pri vybrusovaní plátkov kostí do tenkých priesvitných doštičiek nebývajú zachované bunky, ale možno tak skúmať komôrky a kanáliky v nich, ktoré sa vo výbruse kosti zobrazujú ako čierne. Ak je cieľom skúmania organická zložka kostného tkaniva a bunky, anorganická zložka kosti sa odstráni slabým roztokom kyseliny (napr. dusičnej) alebo roztokom obsahujúcim chelatačné činidlo (EDTA), následne sa zaleje, nareže a ofarbí [1]. Vo forenznej antropológii má veľký význam možnosť hodnotiť histomorfológiu kostného tkaniva aj zo suchej kosti [4].

Určovanie veku

Fyziologická prestavba kostí v dospelosti je užitočná v určovaní veku z kostrového materiálu. Prestavba je sekvenčné odstraňovanie a nahrádzanie starej lamelárnej kosti novou a prebieha počas celého života [5]. Histologická analýza tkanív z vybraných miest kostry (vrátane rebier a kľúčnej kosti [6]) dokázala vzťah medzi vekom v čase smrti a počtom pozorovateľných osteónov na jednotku na priečnom reze. Počet neporušených a fragmentárnych osteónov na jednotku priestoru je vyrátaný pre každú kosť (z minimálne 2 rezov z každej kosti) a výsledok je dosadený do regresnej rovnice, pomocou ktorej je vyrátaný vek. Všetky tieto metódy sú kvantitatívne a závislé od remodelácie osteónov a zmnožených populácií osteónov. Prvýkrát bola táto metodika použitá na rezoch z diafýz stehnovej kosti, písťaly a ihlice v 60. rokoch minulého storočia [7]. Pfeiffer a kol. [8] došli k záveru, že histologický profil kosti závisí od lokalizácie odberu vzorky, nakoľko histomorfologické determinanty záhľadnej kosti boli pri určovaní veku menej spoľahlivé v porovnaní s dlhými kosťami [9].

Určovanie druhej príslušnosti

Napriek veľkej pozornosti, ktorej sa histologickým metódam určovania veku v literatúre dostalo, sú tieto metódy najčastejšie používané v prípade, kedy nemožno iné metódy použiť, prípadne na odlíšenie ľudských a zvieracích kostí z fragmentov kostí [10]. Pri zlomkovom materiáli možno priemer Haversových kanálov použiť na určovanie druhej príslušnosti. U človeka je ich priemer približne 60 μm , zriedkakedy je menší ako 40 [3]. Rozdielmi v mikroštruktúre kostí človeka a hospodárskych zvierat sa zaoberal Morales a kol. [11]. Výsledky skúmania rozdielov priemeru Haversových kanálov u najbežnejšie sa vyskytujúcich živočíchov sú zhrnuté v tabuľke.

Druh	Minimálna hodnota [μm]	Maximálna hodnota [μm]	Priemerná hodnota [μm]
Človek	33,9	38,9	35,92
Pes	10,94	15,02	12,37
Mačka	9,78	11,97	10,60
Ošípaná	29,61	61,24	40,09
Krava	21,66	30,50	26,24
Sliepka	27,34	33,15	29,49

Aj kostrový materiál vystavený ohňu bol podrobený histologickému vyšetreniu za účelom zistenia veku v čase smrti. Porovnaním mikroštruktúry (priemer osteónov, priemer osového kanálika a podiel medzi nimi, plocha osteónu, plocha kanálika a rozdiel medzi nimi) spálenej a nespálenej kosti bolo zistené, že pôsobením vysokej teploty sa všetky rozmery významne zmenšujú [11]. Harsányi [13] zastáva názor, že pri teplote vyššej ako 700°C už nemožno jednotlivé štruktúry kompaktnej kosti rozlíšiť. Aj napriek týmto zisteniam Stloukal [3], berúc ohľad na nedostatok makroskopických morfológických znakov, považuje histologické vyšetrenie obhoreného kostrového materiálu s cieľom určenia veku za najvhodnejšie.

Detekcia chorobných a úrazových zmien

Pomer jednotlivých typov kostných buniek možno prakticky využiť na zhodnotenie zdravotného stavu jedinca, ktorého kostné tkanivo mikroskopicky skúmame. Vysoký pomer resorpcie kosti na tvorbu osteónov poukazuje na vysoký nutričný deficit, výskyt infekčných ochorení a prítomnosť mnohých stresových faktorov [14]. Nepomer medzi hrúbkou kompaktnej a veľkosťou dreňovej dutiny môže okrem osteoporózy poukazovať tiež na diabetes mellitus 1. typu [15]. Veľmi perspektívne sa ukazuje aj histomorfologické vyšetrenie úrazových zmien. Na reze kostným tkanivom farbeným hematoxylín-eozínom možno dokázať známky krvácania v mieste zlomeniny kosti, ku ktorej došlo 14 dní pred úmrtím vyšetrovanej osoby [16]. Na základe tejto pilotnej štúdie možno usudzovať, že vitálne známky sú detegovateľné aj v spracovanom kostnom tkanive (kostnom tkanive macerovanom a zbavenom mäkkých štruktúr) tesne po smrti.

Diskusia

Metódy forenzej antropológie sa využívajú v prípade nálezu kostrových zvyškov a v prípadoch identifikácie osôb, na ktorých tele už nastúpili neskoré posmrtné zmeny. Na určovanie pohlavia a na výpočet výšky sa využívajú morfometrické antropológické metódy, pri ktorých sa na kostiach merajú určité rozmery (najčastejšie dĺžky dlhých kostí v prirodzenej polohe), ktoré môžu byť následne dosadené do regresných rovníc alebo výpočtov za použitia tabuliek. Pri práci s kostrovým materiálom bez mäkkých tkanív je prvým krokom určenie druhovej príslušnosti, tzn. či ide o kosti zvierat alebo človeka. Na to sa v praxi používajú morfognostické metódy, čo znamená hodnotenie kostrového materiálu voľným okom. V prípade nepoškodených kostí to pri znalosti osteológie nemusí činiť problém, avšak v prípade obhorených kostrových ostatkov alebo úlomkov kosti sú tieto metódy nepoužiteľné. To isté platí aj pre určovanie veku z podobne posmrtné zmeneného materiálu, kedy nemožno posúdiť robustnosť kostí a vekom podmienené degeneratívne zmeny, v prípadoch deformácie dlhých kostí pôsobením vysokej teploty meranie dĺžky a následný výpočet strácajú svoje opodstatnenie. Pomoc pri zostavovaní tzv.

biologického profilu, ktorého základnými časťami je určenie druhovej príslušnosti a veku osoby v čase smrti, sa ponúka najmä využitím dnes často opomínaných histologických metód.

Záver

Napriek všeobecnému trendu masového využívania zobrazovacích metód vo všetkých odvetviach medicíny si tradičné diagnostické metódy zaslúžia našu pozornosť. Vďaka svojej nízkej cenovej náročnosti v porovnaní s vybavením, ktoré nie je bežné na pracoviskách súdneho lekárstva, môžu pomôcť nájsť odpovede aj na ťažké otázky, ktoré nález kostrových ostatkov niekedy prinesie.

Literatúra

- [1] Junqueira, H&H. **1999**, s. 133.
- [2] Klika, *Osveta/Avicenum*. **1988**, ss. 95-100.
- [3] Stloukal, *Národní muzeum Praha*. **1999**, 345-349.
- [4] García-Donas, *HOMO - Journal of Comparative Human Biology*. **2017**, 68 /4:283-288.
- [5] White and Folkens, *Elsevier*. **2005**, 381.
- [6] Stout and Paine, *Am J Phys Anthropol*. **1992**, 87:111-115.
- [7] Kerley, *Am J Phys Anthropol*. **1965**, 23:149-164.
- [8] Pfeiffer, *Am J Phys Anthropol*. **1995**, 96:89-92.
- [9] Cool, *J For Sci*. **1995**, 40 /5:789-96.
- [10] Blau and Uberlaker, *CRC Press*. **2009**, s. 222.
- [11] Morales, *Int J Morphol*. **2012**, 30/3:1035-1041.
- [12] Nelson, *J Forensic Sci*. **1992**, 37/4:1055-60.
- [13] Harsányi, *Methods and Diagnosis*. **1993**, 79-94.
- [14] Martin, *Am J Phys Anthropol*. **1987**, 74:255-264.
- [15] Michael, *J Forensic Leg Med*. **2018**, 53:58-61.
- [16] Cattaneo, First Meeting of the Forensic Anthropology Society of Europe (FASE), Frankfurt, October 22-23, **2004**.

Ako z nízkeho množstva vstupnej DNA získať kvalitné výsledky – SureSelectXT HS Target Enrichment NGS Kit

Ďurišová, D.

Hermes LabSystems s.r.o., Bratislava
dominika.durisova@hermeslab.sk

Abstract

Next Generation Sequencing (NGS) is becoming a common and versatile tool for biological and medical research. NGS, with its rapidly decreasing costs and increasing applications, is replacing many other technologies. SureSelect^{XT HS} joins the SureSelect library preparation reagent family as Agilent's highest sensitivity hybrid capture-based library prep and target enrichment solution for NGS. In most cases, sensitivity is limited by the input amount, performance of the assay, and PCR and sequencing error rates [1].

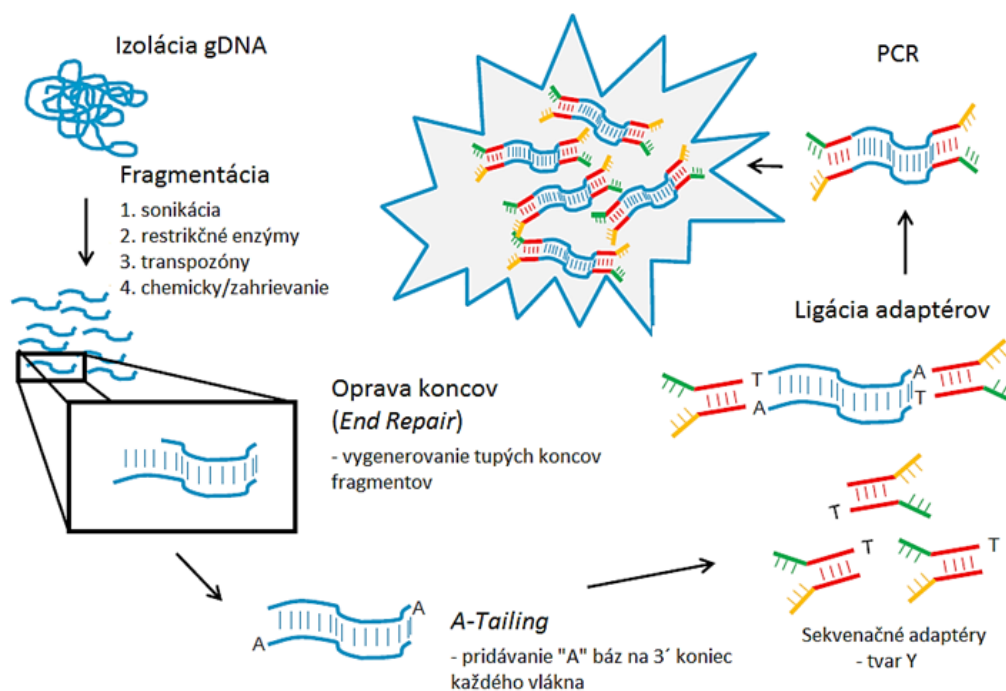
Key words: Next Generation Sequencing, target enrichment, FFPE samples, SureSelect

Úvod

Sangerovo sekvenovanie (metóda publikovaná v roku 1977) predstavuje prvú generáciu sekvenovania s využitím rádioaktívne značených nukleotidov. Ide o dideoxynukleotidové sekvenovanie založené na elektroforetickej separácii a komplexnom počítačovom spracovaní dát. NGS alebo masívne paralelné sekvenovanie je technologická inovácia umožňujúca sekvenovanie miliónov malých fragmentov DNA v rovnakom čase, čo vedie k masívnemu zvýšeniu množstva sekvenovaných párov báz v porovnaní so štandardnou Sangerovou metódou sekvenovania. Táto nová technológia bola založená na technologickom vývoji od polovice do konca 90. rokov, ktorý od roku 2000 spustil prvú vlnu sekvenovania novej generácie, resp. druhú generáciu sekvenovania [2]. NGS zahrnuje niekoľko rôznych metód a v porovnaní so Sangerovou metódou sa vyznačuje vysokou výkonnosťou (*throughput*) a stále sa znižujúcimi cenami za sekvenovanie DNA. Môže produkovať viac ako jednu miliardu krátkych sekvenačných čítaní (*read*) na jeden beh, čo prináša rýchle, lacné a presné informácie o genóme [2]. NGS technológie umožňujú sekvenovanie cielených oblastí (génových panelov), sekvenovanie celého exómu, sekvenovanie celého genómu alebo sekvenovanie transkriptómu [3].

Metodika

Každá NGS metóda spočíva v predsekvenačnej príprave DNA templátu, v samotnom sekvenovaní a následnej bioinformatickej analýze. Predsekvenačné kroky zahŕňujú: prípravu fragmentovanej sekvenačnej knižnice (*library*) fyzikálnym (sonikácia) alebo enzymatickým spôsobom (nukleáza, transpozóny) s ligáciou adaptorových primerov (*indexov*) na jednotlivé fragmenty; podľa potreby aj vrátane cieleného obohatenia (*target enrichment*); a klonálnu amplifikáciu vytvorenej knižnice prostredníctvom špecifických typov PCR (Obr. 1).



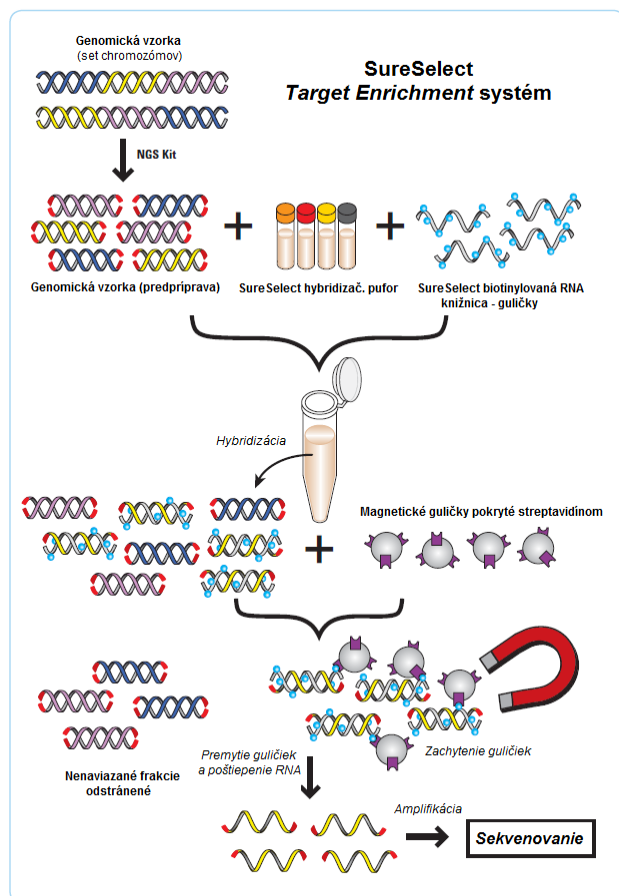
Obr. 1 Všeobecná schéma predsekvenčných krokov prípravy knižnice určenej na sekvenovanie novej generácie (upravené podľa internej prezentácie spoločnosti Agilent Technologies).

Cielené obohatenie je špecifická selekcia cieľových fragmentov DNA, ktorá sa vykonáva v prípade potreby sekvenovať iba určité oblasti genómu/zájmu (napr. len niektoré exóny alebo súbory génov) a najčastejšie je realizovaná pomocou hybridizácie so špecifickými oligonukleotidovými sondami korešpondujúcimi s cieľovými oblasťami genómu (Obr. 2) alebo pomocou PCR so súborom primerov pre vybrané gény (Obr. 3). Posekvenačná bioinformatická analýza zahŕňa spracovanie nasnímaných biochemických signálov; stanovenie báz (*base-calling*), čiže konvertovanie signálov do čiastkových sekvencií, tzv. čítaní (*read*) určitej dĺžky (*read length*); porovnanie (*alignment*) „poskladanej“ DNA sekvencie s referenčnou; identifikácia variantných nukleotidov a ich anotácia [4, 5].

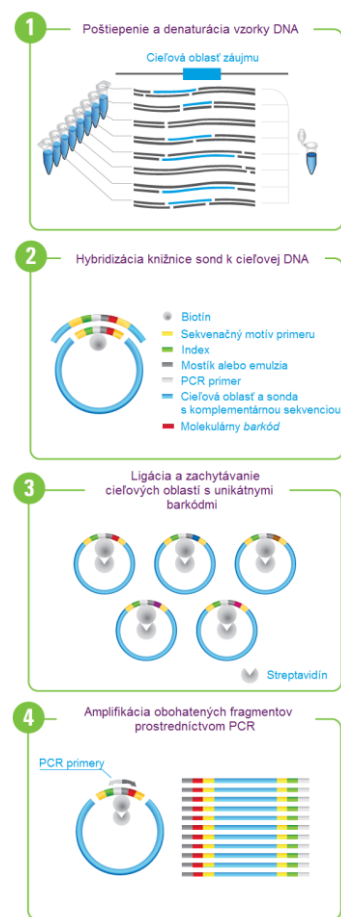
Kvalita vzoriek

Kvalita a typ vzorky zohrávajú dôležitú úlohu v kvalite NGS sekvenovania. Mnohé faktory môžu ovplyvniť kvalitu a/alebo množstvo DNA extrahovanej zo vzoriek vrátane predanalytických faktorov, ako je doba trvania fixácie tkaniva a spracovanie (napr. čerstvo zmrazené vzorky verzus FFPE vzorky, prítomnosť alebo neprítomnosť odváňovania), dĺžka a stav sklíčka a blokov určených na uskladnenie, veľkosť nádoru a celularita, stupeň proliferácie frakcie nádoru a viabilita nádoru [6, 7]. Je veľmi dôležité, aby anatomický patológ vyhodnotil sekciu a potvrdil diagnostiku, kvalitu vzorky a iné morfológické znaky spomenuté pred extrakciou (veľkosť nádoru, celularnosť, frakcia a životaschopnosť).

Molekulárne profilovanie nádorov sa zvyčajne uskutočňuje z DNA extrahovanej zo vzoriek tkaniva fixovaných formalínom a zaliatych v parafíne (FFPE) kvôli logistickej komplexnosti prípravy a skladovania čerstvého alebo zmrazeného tkaniva v klinickom laboratóriu. Formalínová fixácia spôsobuje fragmentáciu a zosieťovanie (*cross-linking*) DNA a uskladnenie bloku môže časom ďalej poškodzovať DNA [6-8]. Napriek týmto problémom však štúdie ukázali použitie FFPE vzoriek tkanív v klinickom laboratóriu ako vhodné [9].



Obr. 2 Schéma pracovného postupu Agilent SureSelect Target Enrichment systému (upravené podľa 6).



Obr. 3 Schéma pracovného postupu Agilent HaloPlexHS Target Enrichment systému (upravené podľa 1).

Vysoká senzitivita

Zatiaľ čo FFPE vzorky poskytujú cenný zdroj rôznych genetických informácií, jednou z prekážok pri izolácii DNA z FFPE tkaniva je získanie DNA dostatočnej molekulárnej hmotnosti a kvality pre amplifikáciu a detekciu. Preto je nevyhnutné optimalizovať prípravu knižnice a minimalizovať počet krokov na zníženie degradácie či straty vzoriek a získať vysokokvalitné knižnice z aj náročných typov vzoriek.

Agilent SureSelect^{XT HS} produkuje komplexnejšie knižnice s vyšším percentom čítaní v cieľových oblastiach pre širokú škálu jednotlivých typov tkanív – v čerstvých aj FFPE vzorkách – len s 10 až 200 ng vstupného materiálu. Pre zabezpečenie lepších výsledkov a konzistencie vzoriek rôznej kvality vyvinula spoločnosť Agilent kompletné riešenie pracovného postupu, ktoré zahŕňa predkvalifikáciu DNA (FFPE QC Kit, kat. č. G9700A a G9700B, 2100 Bioanalyzer alebo 4200 TapeStation System) a prípravu knižnice pomocou reagentov z jednej skúmavky [1].

Senzitivita sa vzťahuje na percento pravých variantov, ktoré sú správne identifikované. Vo väčšine prípadov je citlivosť obmedzená množstvom vstupnej vzorky, výkonnosťou testu a chybami PCR a sekvenovania. V dôsledku toho úroveň chýb pozorovaná pri tradičných NGS testoch typicky zasahuje do dôvery detekcie variantov nízkej frekvencie v dôsledku heterogénnosti nádoru.

Agilent SureSelect^{XT HS} obsahuje molekulárne čiarové kódy (*molecular barcodes*), ktoré umožňujú užívateľovi odfiltrovať artefakty produkované počas prípravy knižnice, obohatenia vzorky a sekvenovania, čo má za následok vznik falošne pozitívnych

variantov. Molekulárne čiarové kódovanie so systémom SureSelect^{XT HS} dosahuje špičkové metriky, čo umožňuje detekciu zriedkavých variantov až na $\leq 1\%$, pričom väčšina užívateľov používa prah spoľahlivosti (*confidence threshold*) a označuje varianty nad alelovou frekvenciou 3-5%.

Chyby vzniknuté počas PCR amplifikácie a sekvenovania zvyšujú celkovú chybovosť. Tieto chyby alebo falošne pozitívne výsledky vedú k zníženiu senzitivity voči skutočným mutáciám, ktoré sa vyskytujú v nízkej hladine vo vzorke. Tento problém je obzvlášť závažný v prípade heterogénnych bunkových populácií, ako sú napríklad určité subpopulácie nádorov. Inkorporované molekulárne čiarové kódy umožňujú detegovať v DNA templáte mutácie s nízkou frekvenciou, a to odstránením falošne pozitívnych výsledkov a poskytovaním korekcie chýb pre presnejšiu analýzu variantov [1].

Agilent SureSelect^{XT HS} riešenie má znížený počet jednotlivých enzymatických krokov, krokov čistenia a prenosu vzoriek počas pracovného postupu prípravy knižnice, čo zabezpečuje komplexnosť knižnice najmä pri nižších vstupných množstvách vzorky (len 10 ng). Iba 90-minútová hybridizácia v kombinácii s efektívnejším spracovaním vzorky umožňuje prípravu knižnice počas jedného dňa. Pracovný postup navyše podporuje multiplexné sekvenovanie až 32 vzoriek v jednom sete (*pooling*) [1].

Záver

Neustály vývoj nových molekulárnych cielených terapeutík, ako aj rastúci počet užitočných molekulárnych biomarkerov pomáhajúcich v diagnostike a prognóze, zvýšili dopyt po testovaní. Znižovanie veľkosti biopsie, respektíve množstva vstupnej vzorky má za následok požiadavku na stále viac a viac testov s vyššou senzitivitou. Techniky, ktoré merajú iba jeden alebo niekoľko biomarkerov naraz, nie sú v takýchto prípadoch užitočné. Sekvenovanie novej generácie (NGS) umožňuje sekvenovanie väčších panelov génov zodpovedných za rakovinové ochorenia s menším množstvom tkaniva a ako viesť k uspokojeniu tejto požiadavky [3].

Literatúra

- [1] Agilent Technologies, Inc., SureSelect^{XT HS} Target Enrichment. **2017**, 5991-8014EN.
- [2] Barba, *Viruses*. **2014**, 6:106-136.
- [3] <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/types-of-molecular-tumor-testing/>; Updated February 8. **2016**.
- [4] Bujalková, *newsLab*. **2015**, 1:15.
- [5] Metzker, *Nat Rev Genet*. **2010**, 11/1:31-46.
- [6] Bass, *Arch Pathol Lab Med*. **2014**, 138:1520-1530.
- [7] Chen, *Cancers*. **2015**, 7:1699-1715.
- [8] Gilbert, *PLoS ONE*. **2007**, 6:e537.
- [9] Spencer, *J Mol Diagn*. **2013**, 15:623-633.
- [10] Ernani and LeProust, *Agilent Technologies, Inc.* **2009**, 3:5990-3532EN.
- [11] Agilent Technologies, Inc., *Get to Know Your DNA. Every Single Fragment*. **2015**, 5:5991-5727EN.

Nové pohľady na bunkovú smrť a prehľad menej známych typov bunkovej smrti

Adamkov, M., Tupá, V., Klinerová, B., Kocianová, Z., Škuciová, V., Dzuracký, J.

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Martin
adamkov@jfmmed.uniba.sk

Abstract

Cell death is a key process during human development and tissue homeostasis of multicellular organisms. Abnormalities in its regulation are associated with wide range of clinico-pathological entities. Apoptosis (type I cell death), autophagy (type II cell death), and necrosis (type III cell death) are major types of cell death. At present, we can distinguish about 30 types of cell death that occur in human tissues. In this review, we discuss less common types of cell death.

Keywords: cell death, new insight

Úvod

V súčasnosti je plne akceptovaný názor, že bunková smrť je dôležitý fenomén v normálnej histogenéze orgánov, v nepretržitej kinetike zdravých tkanív, v patogenéze poškodenia a chorobných stavoch a tiež v liečbe širokého spektra ochorení. Štúdium a pochopenie bunkovej smrti je jedným zo základov v ľudskej patobiológii a v terapii chorôb.

Bunky môžu odumrieť viacerými spôsobmi [1]. Bunková smrť je zväčša klasifikovaná do troch najznámejších základných typov:

- apoptóza (typ I)
- autofágia (typ II)
- nekróza (typ III)

Organizované odstraňovanie vybraných buniek apoptózou sa líši od lytickej deštrukcie buniek nekrozou. Autofágia je zase intracelulárny katabolický proces, ktorý sa vyskytuje pri lyzozomálnej degradácii poškodených organel. Je však známe, že morfológický obraz jednotlivých typov bunkovej smrti sa môže sčasti prekrývať. Preto sa v súčasnosti akceptuje tiež názor, že bunková smrť môže predstavovať jeden kontinuálny proces s nekrozou na jednom konci morfológického spektra a s apoptózou na druhom konci. Rozvojom poznatkov sa postupne stávajú známe molekulové mechanizmy jednotlivých foriem bunkovej smrti, čo môže osvetliť ďalšie nejasnosti vyplývajúce z morfológického obrazu [1].

Rozličné typy bunkovej smrti boli donedávna definované hlavne na základe morfológických kritérií, pričom sa jednoznačne nezohľadňovali žiadne molekulové a biochemické aspekty. Nové pohľady na procesy súvisiace s bunkovou smrťou prezentuje medzinárodná skupina NCCD (The Nomenclature Committee on Cell Death) [1, 2]. V uvedených článkoch podrobne opisujú molekulové pozadie jednotlivých typov bunkovej smrti a navrhujú tiež novú terminológiu, ktorá sa opiera o najnovšie poznatky v tejto oblasti. Napr. NCCD navrhuje nahradiť názvy typu „percento apoptotických buniek“, „percento nekrotických buniek“, „percento mŕtvych buniek“ a „percento prežívajúcich buniek“ inými presnejšími a viac výstižnými názvami. Doporučuje používať novú terminológiu pre procesy súvisiace s bunkovou smrťou, napr. „percento buniek s kondenzovaným chromatínom“, „percento buniek

s fragmentáciou DNA“, „percento buniek s nízkym transmembránovým potenciálom mitochondrií“, „percento pozitívnych buniek na PI“ (propidium iodide), „percento pozitívnych buniek na kaspázu-3“ a „percento TUNEL pozitívnych buniek“. NCCD tiež navrhuje nahradiť termín „percento autofagických buniek“ novým názvom „percento vakuolizovaných buniek“, a pod. NCCD ďalej doporučuje diagnostikovať bunkovú smrť viac než jednou metódou, aby sa tak predišlo hodnoteniu prípadných artefaktov [1].

Enormný vedecký progres prináša stále nové poznatky vo všetkých aspektoch štúdia bunkovej smrti. Preto NCCD doporučuje precízne definovať všetky typy bunkovej smrti na molekulovej, biochemickej, farmakologickej a funkčnej báze. Morfologické prejavy bunkovej smrti nepokladajú z tohto pohľadu za podstatné [2].

Proces zomierania bunky je reverzibilný, pokiaľ sa nedosiahne prvá ireverzibilná fáza, tzv. „point-of-no-return“. Tento krok by mohol byť reprezentovaný výraznou aktiváciou kaspáz, stratou mitochondriálneho transmembranového potenciálu, úplnou permeabilizáciou vonkajšej mitochondriálnej membrány a fosfatidylserinom na povrchu bunky. Pri absencii jednoznačných biochemických kritérií pre ireverzibilnú fázu možno podľa NCCD považovať za mŕtvu bunku takú, keď je prítomný aspoň jeden z nasledujúcich molekulových alebo morfologických znakov:

- strata integrity bunkovej membrány, ktorá je dokázaná inkorporáciou vitálnych farbív, napr. PI in vitro,
- bunka, vrátane jadra vykazuje zreteľnú fragmentáciu na apoptotické telieska,
- fagocytóza apoptotických buniek / fragmentov okolitými bunkami in vivo.

Dôležité je však odlíšiť „mŕtve bunky“ od „buniek odumierajúcich“, ktoré sa môžu vyskytnúť v širokom spektre rôznych biochemických procesov, napr. senescentné bunky. Tieto sú považované stále ešte za živé bunkové elementy [1].

Okrem troch základných typov bunkovej smrti, ktoré sú uvedené vyššie, sú v literatúre čoraz častejšie diskutované aj menej známe formy, ktoré prehľadne uvádzame v nasledujúcom texte.

Kornifikácia (Rohovatenie)

Kornifikácia predstavuje veľmi špecifickú formu programovanej bunkovej smrti v epidermis kože. Morfologicky, ale aj biochemicky sa odlišuje od klasickej apoptózy. Výsledkom tejto formy bunkovej smrti je tvorba korneocytov, ktoré sú v podstate mŕtve keratinocyty. Korneocyty obsahujú zmes špecifických proteínov (napr. keratin, lorikrin, involukrin, trichohyalin) a lipidov (napr. mastné kyseliny a ceramidy). Tieto sú nevyhnutné pre fyziologickú funkciu zrohovatej vrstvy epidermis (mechanická odolnosť, elasticita, nepriepustnosť pre vodu, štrukturálna stabilita). Proces kornifikácie prebieha pomaly, bunky v zrohovatej vrstve sú navzájom pevne ku sebe fixované adherujúcimi medzibunkovými spojmi a medzibunková hmota je tvorená filaggrinovou matrix [3].

Proces kornifikácie je tiež označovaný ako keratinizácia, v podstate ide o finálnu fázu tzv. konceptu epidermálnej proliferačnej jednotky. Je teda výsledkom epitelovej diferenciácie v epidermis, pri ktorej zohráva podstatnú úlohu interakcia viacerých enzýmov (napr. transglutaminázy 1, 3 a 5) a mnohých ďalších substrátov (napr. lorikrin, involukrin, SPR), vrátane lipidov, ktoré sú dôležitou zložkou v extracelulárnej lokalizácii [3].

Mitotická katastrofa

Mitotická katastrofa je cesta bunkovej smrti, ktorá je vyvolaná mitotickým zlyhávaním. Zlyhávanie je spôsobené defektnými mechanizmami jednotlivých fáz bunkového cyklu a tvorbou aneuploidných buniek, ktoré sú odsúdené na zánik. Morfologické abnormality sú charakterizované najmä multinukleáciami a mikronukleáciami. Mitotická katastrofa môže byť indukovaná rôznymi typmi cytokínov. Vznik abnormálnych mitóz závisí na pôvode induktora a na aktuálnej fáze bunkového cyklu. NDCC navrhuje používať pre tento typ bunkovej smrti názov „bunková smrť v priebehu metafázy“ alebo „bunková smrť po multinukleácii“ [4]. Stále je diskutované, či mitotická katastrofa reprezentuje kaspázovo-nezávislý typ programovanej bunkovej smrti [1].

Anoikis

Grécke slovo „anoikis“ znamená v preklade „strata domova“ alebo vo voľnom preklade „bezdomovec“. Anoikis predstavuje formu programovanej bunkovej smrti, kedy je bunka uvoľnená od medzibunkovej matrix alebo z konglomerátu okolitých buniek a dostáva sa do lokalizácie, ktorá je pre ňu cudzia. Anoikis bola prvýkrát opísaná na epitelových a endotelových bunkách. Svojou podstatou predstavuje formu obrannej reakcie organizmu, ktorá zabraňuje adhézii uvoľnených buniek na nesprávnom mieste a prípadne aj ich následným dysplastickým zmenám [5].

Excitotoxicita

Ide o formu bunkovej smrti neurónov, ktoré sú vystavené excitačnému účinku aminokyselín, čo vedie k otvoreniu N-metyl-D-asparate Ca^{2+} permeabilných kanálov s následným influxom Ca^{2+} a aktiváciou letálnych dráh. V závislosti na iniciačných stimuloch môže „Excitotoxicita“ vykazovať črty tak apoptózy ako aj nekrózy [4].

Wallerianova degenerácia

Tento názov neoznačuje typ bunkovej smrti sensu stricto. Vyskytuje sa v nervovom systéme, kedy degeneruje len časť neurónu alebo axon, ale neurón ako celok ostáva živý [6].

Paraptóza

Paraptóza je charakterizovaná cytoplazmovou vakuolizáciou, ktorá sa začína progresívnym zdurením mitochondrií a endoplazmatického retikula. Tento geneticky programovaný proces vo väčšine prípadov nebýva asociovaný s kaspázovou aktivitou, formáciou apoptotických teliesok, intranukleozomálnou fragmentáciou DNA a ani inou morfológickou črtou typickou pre apoptózu. Nie je však celkom isté, či paraptóza a autofágia predstavujú dva nezávislé typy programovanej smrti bunky [7].

Pyroptóza

Pyroptóza alebo na kaspáze-1 závislá bunková smrť je spúšťaná rozličnými patologickými stimulmi (napr. *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*), najčastejšie je asociovaná so zápalovými stavmi a jej výsledkom je lýza poškodenej bunky [8].

Pyronekróza

Nekrotická smrť makrofágov, ktoré sú infikované *S. flexneri* pri vysokom pomere bakteria / makrofágy, sa označuje ako pyronekróza. Pyronekróza a pyroptóza sú si veľmi podobné, ale pyroptóza je závislá na kaspáze-1 [9].

Entóza

Pôvodne bola „Entóza“ opísaná ako „bunkový kanibalizmus“ v lymfocytoch pri Huntingtonovej chorobe, pričom jedna bunka pohltí susednú bunku, ktorá potom zomiera vo fagozóme. Entóza sa vyskytuje v bunkách, v ktorých absentuje tak kaspáza-3 ako aj beclin-1 (sú teda neschopné podliehať apoptóze a autofágii). Entóza je najčastejšie spúšťaná uvoľnením epitelových buniek z extracelulárnej matrix. Je však stále otáznе, či môžeme entózu považovať naozaj za nový spôsob bunkovej smrti [10].

MPT – riadená nekróza

Zvýšenie permeability mitochondriálnej membrány sa považuje za jeden z kľúčových momentov v mechanizmoch bunkovej smrti. Porušenie permeability vedie k zmenám vnútrobunkového prostredia, k zmenám osmotických pomerov, k porušeniu oboch mitochondriálnych membrán a k opuchu mitochondrií. Anti-apoptotické Bcl-2 proteíny majú schopnosť zablokovať MPT a tým môžu zabrániť MPT – dependentnej nekróze [11].

Nekroptóza

Ide o formu regulovanej bunkovej smrti, ktorá je vyvolaná zmenami extracelulárneho alebo intracelulárneho mikroprostredia, ktoré sú detekované špecifickými receptormi smrti, napr. FAS alebo TNFR1. Nekroptóza zohráva dôležitú úlohu vo vývinových programoch organizmu, zúčastňuje sa odstraňovania defektných buniek a udržiava homeostázu T-lymfocytov [12]. Prejavuje sa nekrotickým morfológom.

Ferroptóza

Predstavuje typ regulovanej bunkovej smrti, iniciovaná je špecifickým poškodením vnútrobunkového prostredia, najmä lipidov pri tvorbe ROS a prítomnosti železa. Ferroptóza je nezávislá na kaspázovom systéme. Manifestuje sa nekrotickou morfológiou [13].

Parthanatóza

Ide o regulovanú bunkovú smrť pri hyperaktivácii špecifických komponentov poškodenia DNA, hlavne PARP1. Môže sa však vyskytnúť aj ako odpoveď bunky na oxidačný stres, hypoxiu, hypoglykémiu alebo zápalové stavy. Dôležitú úlohu zohráva väzba PARP s AIF a uvoľnenie AIF do cytoplazmy bunky a následnou translokáciou do jadra, kde spôsobuje fragmentáciu DNA a kondenzáciu chromatinu [14].

NETotická bunková smrť

Predstavuje dosť kontroverzný typ regulovanej bunkovej smrti, ktorý bol opísaný pôvodne pri neutrofiloch. Asociovaný je s vylučovaním zhlukov vlákien, ktoré obsahujú chromatin a históny a sú naviazané na cytoplazmové antimikrobiálne proteíny. Tento komplex sa nazýva ako „NET“ [15]. NETs sú produkované ako odpoveď na rozličné mikrobiálne a iné aktivačné stimuly a v podstate predstavujú extracelulárnu platformu pre uchytenie a degradáciu mikróbov [16]. NET podobné štruktúry však môžu vylučovať aj iné bunky, napr. mastocyty a eozinofily [17].

Lyzozóm – dependentná bunková smrť

Tento typ bunkovej smrti je pokladaný za regulovanú bunkovú smrť, ktorá je vyvolaná porušením vnútrobunkovej homeostázy pri poškodení permeabilizácie lyzozomálnych membrán. Ide o zaujímavý typ bunkovej smrti, vyskytuje sa pri viacerých

patofyziologických a fyziologických stavoch, napr. pri zápaloch, pri involúcii žliazok prsníka po laktácii, pri starnutí, ďalej pri neurodegeneratívnych stavoch, kardiovaskulárnych ochoreniach, a pod. [18].

Imunogénna bunková smrť

Pokladá sa za zvláštny typ regulovanej bunkovej smrti. Vzniká aktiváciou adaptačných imúnnych odpovedí bunky na špecifické endogénne (bunkové) alebo exogénne (vírusy) antigény. Inciovaná môže byť aj niektorými chemoterapeutikami (napr. anthracyklíny, bortezomid), radiačnou terapiou a fototerapiou [19]. Imunogénna bunková smrť je charakterizovaná produkciou DAMPs, pričom niektoré z nich sa exprimujú na povrchu bunky (napr. calreticulin, HSPs). Tieto majú imunostimulačný efekt, ktorý je založený na ich reakcii s antigén-prezentujúcimi bunkami a v konečnom dôsledku dochádza k aktivácii cytotoxických T-buniek [20].

Záver

Bunková smrť odjakživa pútala pozornosť vedeckej komunity a doslova fascinovala celé generácie vedcov, ktorí sa snažili preniknúť hlbšie do podstaty tohto tajomného deja. Úspechy, či neúspechy boli limitované rozvojom vedy v celej svojej šírke v tej ktorej historickej etape výskumu bunkovej smrti. S odstupom času však možno konštatovať, že najväčšia pozornosť bola predsa len zameraná na výskum apoptózy.

Literatúra:

- [1] Galluzzi, *Cell Death Differ.* **2015**, 22:58-73.
- [2] Galluzzi, *Cell Death Differ.* **2018**, 25:486-541.
- [3] Candi, eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. Nov **2016**, <http://www.els.net>.
- [4] Kroemer, *Cell Death Differ.* **2009**, 16/1:3-11.
- [5] Wazir, *Cancer Cell International.* **2015**, DOI: 10.1186/s12935-015-0187-z.
- [6] Luo, *Annu Rev Neurosci.* **2005**, 28:127-156.
- [7] Sperandio, *Cell Death Differ.* **2004**, 11:1066-1075.
- [8] Miao, *Immunol Rev.* **2011**, 243/1:206-214.
- [9] Ting, *Nat Rev Immunol.* **2008**, 8:372-379.
- [10] Mason, *Trends Cancer.* **2017**, 3:475-481.
- [11] Izzo, *Trends Cell Biol.* **2016**, 26:655-667.
- [12] Dara, *Cell Death Discov.* **2016**, 2:16089.
- [13] Dixon, *Immunol Rev.* **2017**, 277:150-157.
- [14] Fatokun, *Br J Pharmacol.* **2014**, 171:2000-2016.
- [15] Lauková, *J Applied Biomed.* **2018**, 16:1-9.
- [16] Branzk, *Nat Immunol.* **2014**, 15:1017-1025.
- [17] Wartha, *Sci Signal.* **2008**, 1/21, pe25. doi: 10.1126/stke.121pe25
- [18] Gómez-Sintes, *Ageing Res Rev.* **2016**, 32:150-168.
- [19] Galluzzi, *Nat Rev Immunol.* **2017**, 17:97-111.
- [20] Panaretakis, *EMBO J.* **2009**, 28:578-590.

**Príspevky zborníka boli podporené projektom BIOMED
Martin (ITMS 26220220187)**



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja



Agentúra
Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR
pre štrukturálne fondy EÚ

Vydanie zborníka bolo podporené projektami

VEGA 1/0129/16 a VEGA 1/0171/18.