

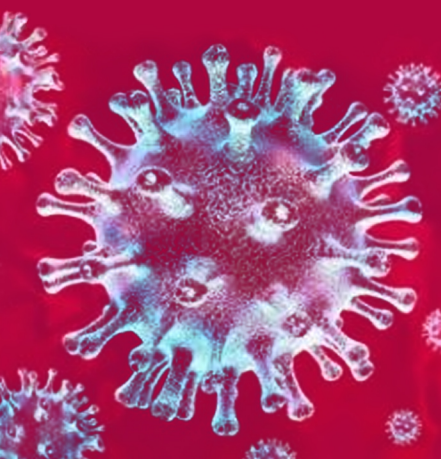


SPOMIENKA NA LADZIANSKEHO V ČASE COVID-19

**Eliška Kubíková
Peter Weismann
Jana Jakimová**



**Anatomický ústav LF UK v Bratislave
Slovenská anatomická spoločnosť
Dekan LF UK v Bratislave**



UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
LEKÁRSKA FAKULTA

Eliška Kubíková
Peter Weismann
Jana Jakimová

SPOMIENKA NA LADZIANSKEHO
V ČASE COVID-19

2020
UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

© Vydavateľstvo: Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, 2020

Editori: doc. MUDr. Eliška Kubíková, PhD.
 doc. RNDr. Peter Weismann, PhD.
 MUDr. Bc. Jana Jakimová

Recenzenti: prof. RNDr. Ivan Varga, PhD. et PhD.
 prof. MUDr. Oto Masár, PhD

Vytlačilo Polygrafické stredisko UK

ISBN: 978-80-223-5081-5
EAN: 9788022350815

Milé kolegyne, kolegovia, vážení čitatelia

Každoročne sme si v novembri zvykli pripomínať nestora a prvého prednostu slovenskej anatómie profesora MUDr. Júliusa Ledényi - Ladzianskeho.

Vzhľadom na súčasnú pandemickú situáciu nie je možné usporiadať pamätný deň pri tejto príležitosti. Avšak aj napriek tomu, tak ako každý rok vydávame zborník. Tohto roku s témou Súčaná veda v období COVID-19.

Verím, že ďalší Ladzianskeho deň už bude taký ako býval po minulé roky.

Prajem Vám všetkým pevné zdravie

Eliška Kubíková

OBSAH

PREDSLOV	3
----------------	---

KAPITOLA I. ANATÓMIA A PEDAGOGIKA

Boleková A. 350. výročie úmrtia učiteľa národov	8
Breza A., Kubíková E. Bolesti tváře, neuralgia n. trigeminus.....	11
Haviarová Z., Kachlík D. Processus supracondylaris.....	15
Korim F., Kuricová M. Variabilita odstupu <i>aa. renales</i> psov	20
Maretta M., Leško N., Gdovinová Z. Význam hypoplázie vertebrálnej artérie na vznik ischemickej cievnej mozgovej príhody	25
Výbohová D., Adamicová K., Hešková G., Mellová Y. Morfometrické hodnotenie krvnej a lymfatickej mikrocirkulácie v léziách lichen ruber planus vo vzťahu k zápalovej infiltrácii a epidermálnej hyperplázii	29

KAPITOLA II. COVID-19

Paduchová Z. Probiotiká a COVID-19	36
Svoboda M., Gergely L., Klimová D., Repiská V., Gbelcová H., Priščáková P. Spôsobuje COVID-19 preklampiú?	42

KAPITOLA III. KARDIOLÓGIA

Horváthová M. Adipokíny a ich úloha v patogenéze aterosklerózy u diabetických pacientov.....	46
Laubertová L., Dvořáková M., Bališ P., Žitňanová I., Bernátová I. Vplyv akútneho stresu a nanočastíc SPIONs na antioxidačný status spontánne hypertenzných potkanov	50
Sedlák M., Žitňanová I. Omega-3 mastné kyseliny a kardiovaskulárne ochorenia	56
Zohdi V., Adameová A., Griecsova-Kindernay L., Lonek L., El Falougy H., Kubíková E., Ravíngerová T. Ischémia myokardu a mechanizmy bunkovej smrti - minireview	61

KAPITOLA IV. ONKOLÓGIA

Dovalová D., Zohdi V., Kubíková E.

Karcinóm obličky a jeho chirurgická terapia - minireview.....67

Hutník J., Gbelcová H.

PH-dependentný účinok atorvastatínu na ľudské bunky melanómu 72

Koňariková K., Olejníková P., Víglaš J., Gbelcová H., Žitňanová I.

Krátké peptidy fungálneho pôvodu ako nové bioaktívne látky.....78

Styk J., Klimová D., Saade R., Krasničanová L., Pös O., Szemes T., Repiská V.

Enteropatogénne Escherichia coli a kolorektálny karcinóm 82

KAPITOLA V. UROLÓGIA

Novotná O., Zaťkuliaková S., Ďubjaková P., Polák M., Breza J., Bartoň P.

Epidemiológia, incidencia a diagnostika urolitiázy u detí 89

Novotná O., Zaťkuliaková S., Ďubjaková P., Polák M., Breza J., Bartoň P.

Typy konkrementov močových ciest 92

Novotná O., Polák M., Zaťkuliaková S., Ďubjaková P., Breza J., Bartoň P.

Manažment liečby urolitiázy 97

Novotná O., Zaťkuliaková S., Polák M., Ďubjaková P., Breza J., Bartoň P., Siváček M.

Akútne skrótum 101

KAPITOLA VI. VARIA

Andrežalová L., Lištiak M., Chrappová J., Rakovský E.

Interakcia DNA s Cu(II) komplexami obsahujúcimi 1,10 - fenantrolín 109

Bútorová B., Šimaljaková M., Weismann P., El Falougy H., Záborská M.

Autovakcíny v imunomodulačnej terapii vaginálnych infekcií 115

Dvořáková M., Rollerová E., Žitňanová I., Scsuková S.

Vplyv nanočastíc oxidu titaničitého na celkovú antioxidačnú kapacitu plazmy infantilných a dospelých samíc potkanov..... 120

Gajdošová L., Muchová J.

Zmeny lipidového profilu u pacientov s alkoholovým ochorením pečene 125

Jakuš V.

Význam pokročilých produktov glykácie a ich receptoru RAGE pri viacerých ochoreniach 130

Janubová M., Žitňanová I.

Vplyv γ -tokotrienolu a δ -tokotrienolu na senescentné ľudské fibroblasty..... 136

Koňariková K., Chomová M., Janubová M., Muchová J., Ďuračková Z., Žitňanová I. Neuroprotektívne účinky vitamínu D.....	142
Pös O., Styk J., Szemes T. Črevný mikrobióm ovplyvňuje závažnosť Alzheimerovej choroby	146
Tóth Š., Urda M., Kalpakidis T., Pribula M., Kušnier M., Mareta M., Mechírová E. Vplyv betanínu na imunoreaktivitu katalázy v cytoplazme hepatocytov pri ischemicko- reperfúznom poškodení jejúna	151
Žitňanová I., Paduchová Z., Katrenčíková B., Koňariková K., Janubová M., Klobučníková K., Šiarnik P., Hlucháňová A., Kollár B. Poruchy metabolizmu lipidov u pacientov so syndrómom spánkového apnoe	155

I. ANATÓMIA A PEDAGOGIKA

350. VÝROČIE ÚMRTIA UČITEĽA NÁRODOV

(350th anniversary of the death of the teacher of nations)

Boleková Adriana

*Ústav anatómie UPJŠ LF v Košiciach, Šrobárova 2, 041 80 Košice
adriana.bolekova@upjs.sk*

Súhrn

Jan Amos Komenský je významnou osobnosťou v oblasti pedagogiky, výchovy a filozofie. Bol spisovateľ, teológ, jazykovedec, mysliteľ, humanista a filozof a predovšetkým tvorca novej pedagogiky. Je známy svojimi výrokmi: Opakovanie je matkou vzdelanosti a Škola hrou. Tento veľikán predbehol dobu svojim myslením, jeho historicky významné názory nesú nadčasový prístup k vzdelávaniu. Mnohé súčasné princípy efektívneho (mozgovo-kompatibilného) učenia sa stotožňujú s myšlienkami jeho učenia. S úctou na neho spomíname pri príležitosti 350. výročia jeho úmrtia.

Kľúčové slová

Jan Amos Komenský, učenie, vzdelávanie

Summary

John Amos Comenius is a significant figure in the field of pedagogy, education, and philosophy. He was a writer, theologian, linguist, thinker, humanist, philosopher, and above all a creator of new pedagogy. He is known for his statements: Repetition is the mother of education and Learning through play. This great man preceded his time by his thinking, his historically significant views carry a timeless approach to education. Many current principles of effective (brain-compatible) learning are based on the ideas of his learning. We remember him with respect on the 350th anniversary of his death.

Keywords

John Amos Comenius, study, education

Úvod

Jan Amos Komenský (Iohannes Amos Comenius) sa narodil 28.3.1592, presné miesto doteraz nie je známe, viaceré moravské obce sa pýšia jeho „pravým“ rodným domom (v tom čase sa miesto narodenia nezaznamenávalo). Bol najmladší z piatich detí a jediný syn v sedliackej rodine (1). Študoval v Nemecku, v 24 rokoch bol vysvätený za kňaza Jednoty bratskej. V tom čase bola Rímskokatolícka cirkev vyhlásená za jediné právoplatné náboženstvo na Morave. Jan konvertovať nechcel, radšej sa do konca života zdržiaval v zahraničí. Odišiel so svojou rodinou do poľského Lešna, strediska činnosti Jednoty bratskej, kde pôsobil ako učiteľ latinčiny na gymnáziu. Školy ovládala cirkev, bohoslužby prebiehali v latinčine, takže výučba spočívala hlavne v tom, že sa študenti učili naspamäť latinské slová a vety, čím sa pripravovali prednostne na kňazské povolanie. Komenský si uvedomoval žalostný stav, nedostatky a nedokonalosti vzdelávacieho systému v 17. storočí. Školy nazval mrzačením mysle. Vzdelávať sa smeli iba bohatí chlapci, chudobné deti nedostali žiadnu možnosť a disciplína bola zbytočne prísna (2).

Reformy v školstve

Komenský bol znechutený nevhodnými metódami výučby, čo ho priviedlo k rozhodnutiu uskutočniť v školstve výrazné zmeny. Zastával názor, že metódy učenia sa memorovaním sú zastaralé a že vzdelávanie by malo byť praktické, príjemné, tak, aby sa škola stala miestom, kam by žiaci aj učitelia chodili radi. Jeho cieľom bolo zaviesť progresívny systém výučby pre všetkých, v ktorom by sa pristupovalo od základných pojmov k zložitejším. Študenti nemajú byť zaťažovaní učivom, ktoré je neprimerané ich chápaniu. Vyzdvihoval učenie hrou, používanie predstavivosti, zdôrazňoval nutnosť rozvíjať zmyslové schopnosti. Presadzoval, aby sa počas prvých školských rokov vyučovalo v materinskom jazyku (nie v latinskom), navrhol znížiť počet žiakov v triedach (bolo ich 80 až 100). Komenský sa pričínal o revolučné zmeny aj v organizácii školstva. Definoval pojem školský týždeň, školský rok, školské prázdniny. Výchova detí spočiatku prebiehala doma, do šiestich rokov sa deťom venovali rodičia. Deti od 6 do 12 rokov sa v *obecnej škole* učili čítať, písať, počítať, náboženstvo, spev, ručné práce a reálie (o prírode a spoločnosti). Do 12 rokov bola škola spoločná pre chlapcov a dievčatá, vyučovanie prebiehalo dve hodiny doobeda a dve poobede. Mládež od 12 do 18 rokov navštevovala *gymnasium*, latinskú školu, ktorá doplnila vzdelanie o sedem slobodných učení (gramatika, rétorika, dialektika, aritmetika, geometria, astronómia a muzika), o prírodné vedy (zemepis, dejepis, matematiku) a jazyky. Mladí ľudia od 18 do 24 rokov študovali na *academii*, vysokej škole, kde sa učili katechizmus, právo alebo medicínu. Po ukončení škôl mali ľudia cestovať po vlasti či cudzine, takúto forma učenia sa nazýval *apodemia*. Komenský zdôrazňoval, že vzdelávanie človeka sa nikdy nekončí a trvá celý život (3).

Niektoré pedagogické názory Jána Amosa Komenského

- Učiteľ by mal učiť nie toľko, koľko sám sa môže naučiť, ale koľko žiak môže pochopiť.
- Správne vyučovať znamená spôsobiť, aby sa žiak učil s chuťou a dôkladne.
- Nadaný učiteľ vie pokojne znášať nevedomých žiakov a vie nevedomosť účinne zaplašiť.
- Vyučovať nie je takmer nič iného, než ukazovať, ako sa jedna vec odlišuje od druhej majú rôzny účel, formy a pôvod. Kto teda dobre rozlišuje, dobre vyučuje.
- Ak niečo žiadny zmysel nemá, alebo ak podrobnosti chýbajú, tomu nemožno ani porozumieť, ani posúdiť, a teda to nemožno do pamäti vštepiť.
- Pochopenie vecí spočíva v zistení, k čomu a akým spôsobom náleží vec ktoroukoľvek svojou časťou a ako sa líši od iných vecí príbuzných.
- Pristane sa čítať nejakú vec raz, aby sme vedeli, čo obsahuje; po druhé, aby sme ju pochopili; po tretie, aby sme si ju vtlačili do pamäti; po štvrté ticho si ju opakovať, aby sme zistili, či sme ju pevne obsiahli (4).

Najznámejšie diela Jána Amosa Komenského

Kniha *Brána jazykov otvorená* spôsobila prevrat vo výučbe latinčiny. Text bol usporiadaný do dvoch stĺpcov, z ktorých jeden bol v češtine a druhý v latinčine, porovnávaním oboch jazykov sa uľahčilo učenie. Táto učebnica bola preložená do 16 jazykov. *Orbis pictus* (*Svet v obrazoch*), ilustrovaná čítanka pre deti, bola medzníkom v dejinách pedagogiky, skoro dvesto rokov sa používala ako predškolská učebnica, v ktorej miesto slov boli používala obrázky. Komenský opísal všetky svoje pedagogicko-didaktické názory, vyučovacie metódy a princípy vo svojom najvýznamnejšom diele *Didactica magna*. Stanovuje v nej nutnosť vyučovania pre každého, už od mala a dosiahnutie určitého stupňa vzdelania, pričom školská dochádzka má byť povinná a zadarmo. Učivo musí byť primerané veku a individuálnym schopnostiam študentov, malo by nadväzovať v rámci jedného predmetu, ale aj k ostatným predmetom. Vyzdvihol nutnosť ustavičného opakovania. Zastával názor, že vyučovanie má byť názorné a zábavné, a že sa žiak najviac naučí, ak vysvetľuje iným, pretože priama skúsenosť umožní lepšie zapamätanie učiva a že všetko naučené sa má prevádzať do praxe. Komenský odmietal

telesné tresty za nevedomosť učebnej látky, ale pripúšťal ich za porušenie disciplíny. K udržaniu pozornosti sa musí prispieť pestrejšou výučbou a zaujímavým prístupom k výkladu učiva (5).

Súčasnosc' a Komenský

Komenského názory boli na jeho dobu tak revolučné, že ani v súčasnosti sa na neho nezabudlo. V polovici 19. storočia vznikla *komeniológia*, moderný vedný odbor, ktorý sa zaoberá systematickým výskumom prínosu Komenského do svetovej kultúry, vedeckým skúmaním jeho života, činnosti, diela a pôsobenia. Komenský všetky svoje projekty prakticky odskúšal, dodnes sa používajú sa jeho systematické vyučovacie metódy a obrazové pomôcky. Niekedy sa zdá, že pedagogika už nič také prevratné ako Komenský neobjavila (5). Keby Komenský žil, určite by si všimol paradox vysokých škôl: najváženejšie osobnosti vo vzdelávaní (profesori, docenti) získali akademické tituly za vedeckú činnosť a zvyčajne nemajú pedagogické vzdelanie. Každý absolvent lekárskej fakulty musí písať diplomovú prácu, pričom iba zlomok z nich sa bude venovať vede alebo výskumu vo svojej kariére.

Komenský veril v úctu k človeku, v jeho dobrú a vychovateľnú povahu, v rozum a filozofiu. Jeho filozofiou bola *pansofia* – vševeda, ucelený systém poznania, harmónia ovládajúca kozmos. Učenci z celej Európy ho pokladali za vodcovskú osobnosť a vyhľadávali jeho rady. Komenský pokladal vzdelanie za zjednocujúcu silu ľudstva. Bol presvedčený, že všeobecné vzdelanie môže pomôcť zaistiť mier na svete (6).

Záver

Zásluhou Komenského sa pedagogika stala vedným odborom. Jeho genialita sa prejavila v tom, že mnohé jeho princípy vzdelávania sú súčasťou mozgovovo-kompatibilného učenia, modernej vedy o efektívnom učení, ktorá využíva vedecké poznatky o fungovaní mozgu, o čom on vo svojej dobe nemohol mať ani tušenia (7, 8). V histórii školstva má Komenský výlučné postavenie, jeho vzdelávacie metódy znamenali zmeny v spôsobe vyučovania, zaviedol moderný trend na poli vzdelania. Zomrel 15.11.1670 vo veku 78 rokov v Amsterdame. Zanechal významný odkaz pre ďalšie generácie a mnohé jeho myšlienky platia doteraz. Jana Amosa Komenského nazývame aj otcom modernej pedagogiky.

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantom KEGA 019UPJS-4-2018.

Literatúra

1. **Velan L.** Dohady o rodišti Komenského trvajú už štyri stolytí http://www.bystricepodlopekem.cz/e_download.php?file=data/editor/73cs_5.pdf&original=f47.pdf (10.11.2020)
2. Jan Amos Komenský - Otec moderní pedagogiky. <https://wol.jw.org/cs/wol/d/r29/lp-b/101999326#h=2> (10.11.2020)
3. **Hudáčová A.** Filozofické úvahy Jana Amosa Komenského o človeku a výchove. *Espes*, 2017; 6:1.
4. <https://citaty-slavyh.sk/autori/jan-amos-komensky/> (29.05.2020)
5. **Čapek JB.** Několik pohledů na Komenského. Praha; Karolinum, 2004.
6. Comenius and Pansophia. An international conference to commemorate Ioannes Amos Comenius (1592-1670) and the 350th anniversary of his death. In: *H-Soz Kult*, 2019, <www.hsozkult.de/event/id/event-91489> (10.11.2020)
7. <http://studyhealthy.org/the-most-effective-ways-to-study-according-to-science/admin/> (06.06.2020)
8. **Boleková A a kol.** Ako sa učiť a nezabúdať - Princípy mozgovovo-kompatibilného učenia, Košice; UPJŠ, 2020.

BOLESTI TVÁRE, NEURALGIA N. TRIGEMINUS

(Facial pain, trigeminal neuralgia)

Breza Andrej, Kubíková Eliška

*Anatomický ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava
andrej.breza@fmed.uniba.sk, eliska.kubikova@fmed.uniba.sk*

Súhrn

Veľá bolestí tváre je spôsobené trojklanným nervom n. trigeminus, ale nie každá bolesť na tvári, ktorá nie je symptómom špeciálneho orgánového ochorenia (napr. chorý zub) môže byť označená ako neuralgia trigeminu. Na to je potrebná existencia celkom určitých symptómov. Pri výskyte bolesti tváre musia byť najprv vylúčené ochorenia očí, prínosových dutín, a zubov, predtým ako sa vôbec čo len pomyslí na ochorenie tvárového nervu.

Kľúčové slová

n. trigeminus, neuralgia, lézia

Summary

Many facial pains are caused by the trigeminal nerve n. trigeminus, but not every pain in the face that is not a symptom of a special organ disease (e.g., a diseased tooth) can be termed trigeminal neuralgia. This requires the existence of quite certain symptoms. When facial pain occurs, diseases of the eyes, beneficial teeth, and teeth must first be ruled out before any facial nerve disease is thought of.

Keywords

trigeminal nerve, neuralgia, lesion

Úvod

Bolesť je najčastejším a navyše obťažujúcim príznakom trigeminálnej lézie. Ďalším príznakom patrí porucha citlivosti alebo oslabenie žuvacích svalov.

Termín lézie u senzitivného nervu je pomerne komplikovaný, pretože sa môže prejavovať bolesťivou či parestéziou v štádiu iritácie či anestézie v štádiu kompresie.

Neuralgia n. trigeminus je charakterizovaná poruchou citlivosti kože či slizníc v inervačnej oblasti n. trigeminus (8). Bolesť býva dominujúcim problémom, ale ak proces progreduje, dochádza k deštrukcii neurónov a k vývoju zóny necitlivosti.

Príčiny postihnutia trojklanného nervu sú rôzne. Môže to byť napríklad trauma, zápaly, demyelinizácia, nádory a iné.

Prevalencia a incidencia neuropatie n. trigeminus nie sú známe. V literatúre ako najčastejšie príčiny sú uvádzané jatrogénne poškodenia (po zubnom ošetrení), trauma ale aj tumory mozog či lebečnej bázy. Celosvetovo asi ako najčastejšia príčina postihnutia trigeminu býva uvádzaná lepra.

Anatómia

Nervus trigeminus (n.V) je zmiešaný senzitivný a motorický nerv. Má 3 vetvy : n.opthalmicus (V1), n.maxilaris (V2), a n.mandibularis (V3). Tieto vetvy sprostredkujú snímanie kožnej

a slizničnej citlivosti z oblasti tváre, vlasatej časti hlavy, ústnej dutiny, nosnej a paranazálnych dutín oka.

Senzitívna aferentácia je cez talamus do primárnej senzitívnej kôrovej oblasti. Motoricky n.trigeminus inervuje žuvacie svaly. Senzitívna inervácia je veľmi dôležitou funkciou trigeminu (1).

Etiológia

Lézia v klasickom zmysle môže vzniknúť v ktorejkoľvek časti systému.

Podľa anatomickej klasifikácie sa dajú deliť:

- a) supranukleárne syndrómy
- b) preganglionárne syndrómy

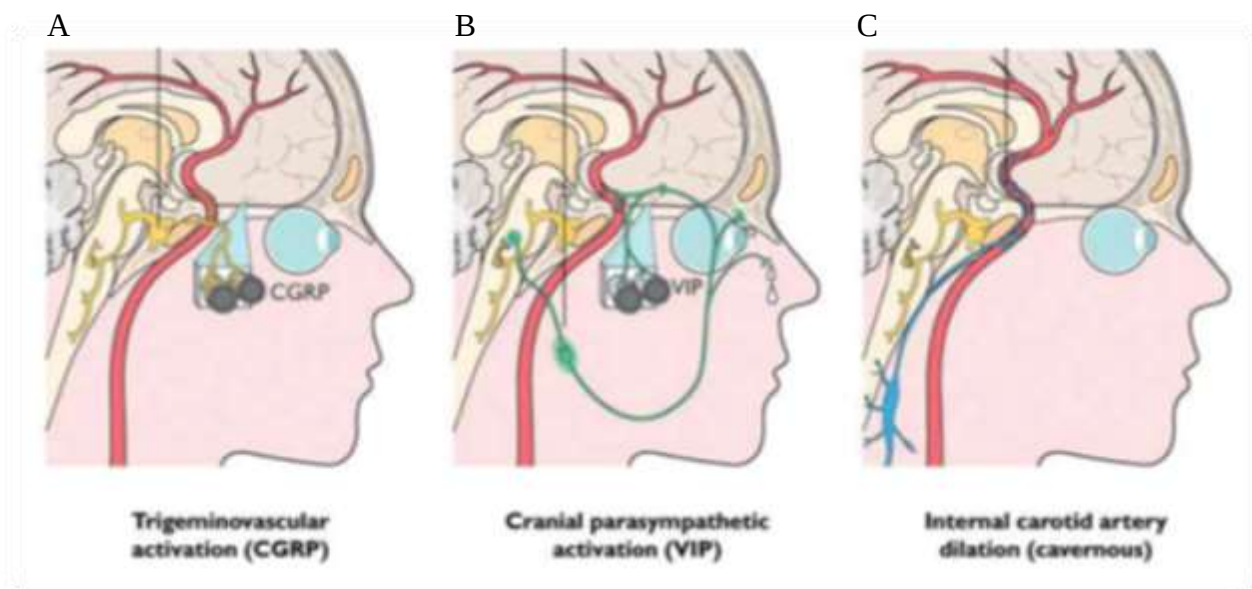
Najčastejšou príčinou, ktoré vedú k poškodeniu n. trigeminus je poranenie.

Poranenie môže byť jatrogénne, ku ktorému dochádza pri zubných zákrokoch, pri úrazoch napríklad zlomenine bázy lebečnej, onkologických (nádorových) ochoreniach, kedy dochádza ku kompresie intra a extrakraniálnej časti trigeminu.

Intrakraniálne môže byť postihnutý trigeminus n. rôznych úrovniach, od oblasti kmeňa prepontinovej cisterny, trigeminálneho ganglia alebo kavernózneho sínusu. Ďalej sa môže objaviť karcinomatóza menig, ktorá sa vyskytuje najčastejšie pri karcinóme pľúc, pri lymfóme alebo melanóme. Pri stanovení tejto diagnózy sú kraniálne nervy postihnuté v 80%.

Medzi ďalšie nádory, ktoré postihujú trigeminus patrí neurinóm, meningeóm, epidermoidný karcinóm. Ku klinickým prejavom priradujeme parestézie a necitlivosť v tvári. Môže sa vyskytnúť i bolesť alebo dyzestézia.

Metabolické postihnutie sa týka zvlášť lebečnej brány, ktorá sa prejaví nebolestivou poruchou citlivosti v tvári (3).



Obr. 1 Cluster headache schéma patofyziologických dejov

A trigemonovaskulárny komplex, B kraniálny parasymptický systém, C Sympatická inervácia a. carotica interna (7)

Cievne príčiny

Malformácie (kavernózne hemangióm) môže byť príčinou neuropatie trigeminu (6).

Zápaly a autoimunitné ochorenia

Sem patrí sklerodermia a Sjögrenov syndróm. Neuropatia u Sjögrenovho syndrómu sa vyskytuje až u 93% pacientov. Takisto roztrúsená skleróza býva príčinou tvárovej bolesti alebo poruchy citlivosti v oblasti tváre. Aj demyelinizačný proces v oblasti mozgového kmeňa sa relatívne často prejaví neuropatiou trigeminu. Ďalšou možnou príčinou môže byť sarkoidóza s granulomatóznou infiltráciou bazálnych mening (4).

Infekcie

Medzi najčastejšie infekcie patrí lepra, ktorá spôsobuje viacnásobnú kraniálnu neuropatiu, zvlášť n. facialis a n. trigeminus. Medzi ďalšie infekcie patria vírus herpes simplex a varicella zoster. Rizikovými faktormi je vek a intenzita akútnej bolesti. Bolesti bývajú páľčivé, veľmi intenzívne a niekedy ťažko ovplyvniteľné. Zoster ophthalmicus zasahuje zas očný bulbus a niekedy spôsobuje aj léziu okoohybných nervov a očného nervu (5).

Toxické a metabolické príčiny

Sem patrí poškodenie trichlóretylénom (2) ale aj chemoterapia napr. cisplatinom.

Kongenitálne poruchy

Ide čisto len o senzitivne príznaky poškodenia n. trigeminu.

Neuralgia trigeminu

Jedná sa o typický neuralgický charakter. Bolest' je významná, intermitentná. Poznáme 2 základné typy:

- 1) neuralgiu esenciálnu (klasickú)
- 2) neuralgiu symptomatickú (sekundárnu)

Klasická neuralgia je relatívne vzácna, (najčastejšie je postihnutá 2. vetva). Vyskytuje sa najčastejšie okolo 40. roku života, .maximum 6-7 dekáda.

Tolosa - Huntov syndróm

Ide o bolestivú oftalmoplégiu. Postihnutá býva I. a II. vetva n. trigeminus.

Migréna

Patrí medzi primárnu bolesť hlavy. Pri nej dôležitú úlohu hrajú mediatory (neurotinus-miterg). Jedným z najdôležitejších je serotonín (5HT-hydroxytryptamín), ďalej GABA (gabaaminomaslová kyselina), VP (vazoaktívny intestinálny polypeptid), substancia P či oxid dusný (NO). Migréne vzhľadom k častému rodinnému výskytu sa pripisuje aj genetický multifaktoriálny základ (7).

Trigeminové autonómne bolesti hlavy

Cluster headache (CH) patria medzi nie príliš časté primárne bolesti hlavy. Viac sú postihnutí muži v pomere 6-8:1. Pacienti mávajú konštantné jednostranné záchvaty, veľmi silné bolesti páľčivého charakteru. Bolest' býva lokalizovaná orbitálne či periorbitálne. Ďalej sa objavuje aj slzenie oka, kongescia nosnej sliznice na príslušnej strane. Bolesti počas záchvatu sú tak silné, že pacienti nedokážu ani ležať ani stáť. V priebehu 24 hodín sa záchvat môže niekoľkokrát zopakovať. Provokujúcim faktorom býva aj alkohol, alebo pobyt vo vysokej nadmorskej výške. Diagnózu stanovujeme na základe klinického obrazu, anamnézy, a negatívnych výsledkoch zobrazovacích metód.

Paroxysmálne hemikranie

Vyskytuje sa častejšie u žien okolo 20. roku života. Je charakterizovaná častými veľmi krátko trvajúcimi atakmi. Bolesť sa objavuje v okolí oka a zasahuje aj temporálnu a supraorbitálnu oblasť. V terapii zaberie Indometacín, ktorý zároveň slúži aj ako diagnostický test.

SUNCT syndrom („shortlasting unilateral neuralgiform headaches with conjunctival injection and tearing“)

Autonómna zriedka bolesť hlavy, ktorá je charakterizovaná krátko trvajúcimi epizódami jednostrannej ostrej bodavej alebo prebehujúcej bolesti, ktorá trvá 2-4 minúty. Frekvencia záchvatu však môže byť 3-200 za deň.

Bolesť je sprevádzaná vegetatívnymi prejavmi ako začervenanie spojivky na strane bolesti, slzenie, kongescia nosnej sliznice, sekrécia z nosa alebo potenie čela. Výskyt viac u mužov. Pre pacientov so SUNCT symptómom môže byť prevencia MR mozgu.

Záver

Trigeminálna lézia sa väčšinou manifestuje poruchou citlivosti v tvári alebo slizníc, či parestéziami alebo bolesťou v inervačnej oblasti nervu. Niekedy je sprevádzaný oslabením žuvacieho svalstva. Rozpoznanie etiológie tejto poruchy je vzhľadom na vysoký počet sekundárnych príčin založené na dôkladnom klinickom vyšetrení za pomoci zobrazovacích metód (MR,CT).

Liečba po určení príčiny je cielená na problém. U neuralgických pacientov je vždy aj symptomatická.

Literatúra

1. **Bednařík J, Ambler Z, Ružicka E, a kol.** Hlavové nervy. In Klinická neurologie—časť obecná. Triton 2004; 310–313.
2. **Feldman RG, Niles C, Proctor SP, Jabre J.** Blink reflex measurement of effects of trichloroethylene exposure on the trigeminal nerve. Muscle Nerve 1992; 15: 490–495.
3. **Galan GS, Penarrocha DM.** Malignant mental nerve neuropathy :systematicreview. Med Oral Patol Oral CirBucal 2008; 13: E616–E621.
4. **Jefferson G, Schorstein J.** Injuries of the trigeminal nerve, its ganglion and its divisions. Br J Surg 1955; 42: 561–581.
5. **Marková J, Ambler Z.** Bolesti hlavy a kranialní neuralgie in Klinická neurologie - časť špeciálna. Bednařík J, Ambler Z, Ružicka E, a kol. Triton 2010.
6. **Puca A, Colosimo C, Tirpakova B, Lauriola L, Di Rocco F.** Cavernous hemangioma extending to extracranial, intracranial, and orbital regions. Case report. J Neurosurg 2004; 101: 1057–1060.
7. **Silberstein SD, Stiles MA, Young WB.** Atlas of migraine and other headaches. Second edition on CD-ROM. 2005.
8. **Smith JH, Cutrer FM.** Numbness matters: A Clinical review of trigeminal neuropathy. Cephalalgia, July 2011; 31(10): 1131–1144.

PROCESSUS SUPRACONDYLARIS

(Supracondylar process)

Haviarová Zora¹, Kachlík David²

¹Anatomický ústav LFUK, Bratislava, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovenská republika
zora.haviarova@fmed.uniba.sk

²Ústav anatómie 2. LF Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, Česká republika

Súhrn

Processus supracondylaris je vrodená kostná variácia distálneho konca ramennej kosti, obvyčajne vybiehajúca približne 5 cm nad mediálnym epikondylom, jeho tvar a dĺžka môžu rôzne variovať. Z hrotu výbežku môže vybiehať krátky väz- Struthersovo ligamentum, k mediálnemu epikondylu humeru. Tieto dve variabilné štruktúry často spôsobujú útlak nervus medianus a treba ich mať na pamäti.

Kľúčové slová

humerus, processus supracondylaris

Summary

The supracondylar process is an inherited bony variation of the distal end of the humerus, usually extending approximately 5 cm above the medial epicondyle, its shape and length may vary. A short ligament, the Struthers' ligament, may extend from the tip of the protrusion to the medial epicondyle of the humerus. These two variable structures are often causes of the median nerve compression syndrome and should be kept in mind.

Keywords

humerus, supracondylar process

Úvod

Processus supracondylaris ramennej kosti je zriedkavá kostná anomália vyskytujúca sa približne u 1% -2,7% ľudskej populácie a zvyčajne býva detekovaná náhodne (1, 2). Tento vrodený kostný výčnelok sa nachádza na anteromediálnej ploche distálnej časti humeru, približne 5cm proximálne nad mediálnym epikondylom ramennej kosti a najčastejšie dosahuje veľkosť 2- 20mm zahýbajúc distálnym smerom (2). Vo väčšej časti prípadov je jeho výskyt asymptomatický. Môže však viesť aj k tzv. syndrómu processus supracondylaris, ak dôjde k útlaku neurovaskulárnych štruktúr týmto výbežkom alebo Struthersovým väzom: ligamentum Struthers je aberantný väz prebiehajúci od distálneho humeru k jeho mediálnemu epikondylu, vyskytuje sa u 2,7% populácie, relatívne často môže spôsobiť útlak pod ním prebiehajúceho nervu, býva príčinou až 0,5% kompresívnych neuropatií nervus medianus.(5) Na ramene sa nachádza viacero možných miest, kde môže dochádzať k útlaku nervus medianus vedúc tak k jeho „úžinovej“ neuropatii (útlakovému poškodeniu). Jednou zo zriedkavejších príčin je jeho útlak v oblasti processus supracondylaris a vo foramen supracondylaris. Zriedkavo sa tento útlak môže prejaviť aj ako „klaudikácia“ predlaktia. Zlomenina tohto kostného výbežku môže viesť k bolestivému opuchu na mediálnej strane ramena (1).

Materiál a metódy

Túto kostnú anomáliu sme pozorovali na historickom kostnom materiáli Anatomického ústavu Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, ktorý je vystavený v sklenených vitrínach pozdĺž chodieb Ústavu. Tento kostný materiál neslúži k výuke, je však dôkazom starostlivosti našich predchodcov s úmyslom rozšírenia našich anatomických vedomostí. Pre charakteristiku tejto kostnej anomálie sme najprv zmerali niektoré rozmery ramennej kosti: jej dĺžku v pozdĺžnej osi (mm), vzdialenosť medzi oboma epikondylmi (mm), šírku a výšku jej hlavice (mm). Nájdenný anomálny kostný výčnelok sme potom charakterizovali týmito rozmermi a vzdialenosťami: A) rozmery popisujúce vzťah výbežku k okoliu: vzdialenosť vrcholu zdola (zvyčajne 48 – 85 mm), vzdialenosť vrcholu od mediálneho epikondylu (zvyčajne 27 – 68 mm), vzdialenosť vrcholu od linea lateralis (zvyčajne 33 – 51 mm) a B) rozmery výbežku: dĺžka (zvyčajne 4-25 mm), výška (zvyčajne 1,5 – 12 mm), šírka (zvyčajne 1,5 – 8 mm), hrúbka (zvyčajne 1 – 5,5 mm), šírka bázy (zvyčajne 8 – 29 mm), vzdialenosť vrcholu od dolného okraja bázy (zvyčajne 1 – 12 mm). Merania sme robili posuvným meradlom.



Obr. 1 Vystavený historický kostný materiál Anatomického ústavu LFUK, Bratislava (kde sa nachádzajú obe ramenné kosti s uvedenými anomáliami). Meranie posuvným meradlom.

Výsledky

Processus supracondylaris sme pozorovali na 2 vystavených ramenných kostiach historického kostného materiálu Anatomického ústavu LFUK. V jednom prípade to bol hákovitý výbežok smerujúci distálne (humerus 1) a v druhom prípade (humerus 2) len menší hrbolček. Rozmery a vzdialenosti sme pre prehľadnosť zobrazili v tabuľke.



Obr. 2 Vystavená (ľavá) ramenná kosť s väčším anomálnym výčnelkom (humerus 1)



Obr. 3 Vystavená (tiež ľavá) ramenná kosť s menším anomálnym kostným výbežkom (humerus 2)

	charakteristika ramennej kosti				rozmery popisujúci vzťah výbežku k okoliu			rozmery výbežku					
	dĺžka [mm]	vzdialenosť medzi oboma epikondylmi [mm]	šírka hlavice [mm]	výška hlavice [mm]	vzdialenosť vrcholu zdola [mm]	vzdialenosť vrcholu od mediálneho epikondylu [mm]	vzdialenosť vrcholu od linea lateralis [mm]	dĺžka [mm]	výška [mm]	šírka [mm]	hrúbka [mm]	šírka bázy [mm]	vzdialenosť vrcholu od dolného okraja bázy [mm]
humerus 1	333	69,7	45,3	50,2	86	72	43	7	3	2	2,1	7,2	2,9
humerus 2	314	55,2	42,1	46,9	80,6	66,3	34	3,9	3,5	-	1,1	7	-

Tab. Charakteristika ramenných kostí a ich anomálnych výbežkov

Diskusia a záver

V roku 1998 Sener E. so spolupracovníkmi (3) popísali kazuistiku 35-ročnej ženy s 2-ročnou anamnézou bolesti a parestézie v oblasti pravého lakťa. Bola praváčka a pracovala ako učiteľka. Jej symptómy sa zvyrazňovali pri dvíhaní ruky hore počas písania na tabuľu a počas aktívnej extenzie v lakti a pronácii predlaktia. Vyšetrenie oblasti pravého lakťa odhalilo citlivosť nad mediálnou stranou distálneho humeru, kde bol hmatný kostný výbežok

6–8 cm proximálne nad mediálnym epikondylom. Tinelov aj Phalenov test boli negatívne a testy svalovej sily boli tiež v norme, rovnako ako aj senzitívne a motorické funkcie nervov. Pronácia vystretého lakťa spôsobovala bolesti v okolí lakťa. Dopplerovské vyšetrenie vretennej a lakťovej tepny v rôznych polohaách nezaznamenalo pokles pulzácie. Priamy rádiogram pravého lakťa odhalil processus supracondylaris vo výške 7cm nad mediálnym epikondylom humeru a vyčnievajúci šikmo dole v anterio-posteriornom pohľade, pričom z laterálneho pohľadu nebol badateľný. Keďže konzervatívna liečba zlyhala, chirurgická explorácia odhalila kostný výčnelok a Struthersovo ligamentum utláčajúce nervus medianus a arteriu brachialis pod väzom- oba boli resekované spolu s okosticou. Postoperatívne bola pacientka bez symptómov a po 2 týždňoch sa vrátila k svojej práci. (3)

Naopak, relatívne nedávno, brazílski autori Caetano EB a spolupracovníci (4) realizovali anatomickú štúdiu na 60 horných končatinách (26 mužov, 4 ženy- obe horné končatiny), pričom processus supracondylaris nenašli ani na jednom ramene, zato v Struthersovo ligamentum našli v 6 prípadoch (z toho 2 obojstranne), pričom v týchto prípadoch vždy našli aj vysoký odstup musculus pronator teres.(4)

Processus supracondylaris je kongenitálna variácia distálneho konca ramennej kosti- kostný výbežok vyvstávajúci z anteromediálneho povrchu humeru približne 5 cm nad mediálnym epikondylom smerujúc dole, dopredu a dovnútra k mediálnemu epikondylu. Z hrotu výbežku môže vybiehať fibrózny oblúkový pruh (v zriedkavých prípadoch môže byť osifikovaný) - Struthersovo ligamentum (spájajúce suprakondylárny výbežok s mediálnym epikondylom). (3) Tieto dve anomálne štruktúry treba tiež vziať v úvahu ako možné príčiny pri podozrení na útlak nervus medianus a citlivosť v oblasti lakťa.

Literatúra

1. **Suresh SS:** Fracture of Supracondylar Process of the Humerus. Sultan Qaboos University Medical Journal, 2008; 8 (2): 223-225.
2. **Shon HCh, Park JK, Kim DS, Kang SW, Kim KJ, Hong SH:** Supracondylar process syndrome: two cases of median nerve neuropathy due to compression by the ligament of Struthers. Journal of Pain Research 2018; 11: 803–807.
3. **Sener E, Takka S, Cila E:** Supracondylar process syndrome. Arch Orthop Trauma Surg 1998; 117: 418–419.
4. **Caetano EB, Sabongi Neto JJ, Vieira LA, Caetano MF, Bona JE, Simonatto TM:** Struthers' ligament and supracondylar humeral process: an anatomical study and clinical implications. Acta Ortop Bras. 2017; 25(4): 137-42. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.
5. **Kaiser R a kol.:** Chirurgie hlavových a periferních nervů s atlasem přístupů. Grada Publishing a.s., 2016: 232 str.

VARIABILITA ODSUPU AA. RENALES PSOV

(The variability in origin of the renal arteries in dogs)

Korim Filip¹, Kuricová Mária²

¹Klinika koní, Univerzitná veterinárna nemocnica, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, filkorim@gmail.com

²Klinika malých zvierat, Univerzitná veterinárna nemocnica, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

Súhrn

Cieľom tejto práce bolo popísať variabilitu odstupu *aa. renales* psov. Štúdia bola realizovaná na korozívnych preparátov 10 krížencov psov. Obličkové artérie u všetkých psov odstupovali z brušnej aorty kaudálne od *a. mesenterica cranialis*. V práci popisujeme dve možnosti odstupu obličkových artérií u psov, a to vo väčšine prípadov laterálny odstup *aa. renales* z brušnej aorty a v menšom počte prípadov ventrálny odstup z brušnej aorty. Zároveň, sa v práci popisuje duplikácia *a. renalis sinistra* u jedného psa. Výsledky našej štúdie môžu prispieť k novým poznatkom o arteriálnom systéme psov a to môže byť využité v biomedicínskom výskume, experimentálnej chirurgii a klinických disciplínach.

Kľúčové slová

oblička, pes, angiologia, *a. renalis*, tepna

Summary

The aim of this study was to describe variability in the origin of the renal arteries in dogs. The study was performed on 10 mix-breed dog's carcasses and corrosion casting technique was used as an appropriate method. The renal arteries were formed from the abdominal aorta beyond the cranial mesenteric artery in all cases. We described two vascular patterns in the origin of the renal arteries in dogs. The lateral vascular origin pattern was described in the majority of cases and the ventral vascular origin pattern was described in the rest of the cases. We found duplication of the left renal artery originated from the ventral wall of the abdominal aorta in one case. The results of our study can contribute as a new basic knowledge on arterial system in dogs and it can be used in biomedical research, experimental surgery and clinical sciences.

Keywords

kidney, dog, angiology, renal arteries, artery

Úvod

Obličkové tepny (*aa. renales*) ako párové vetvy brušnej aorty zásobujúce obličky odstupujú z laterálnej steny brušnej aorty (3,6). Počas embryogenézy sa z aorty vyvíjajú ventrálne, dorzálne a laterálne vetvy ciev, a práve *aa. renales* sa vyvíjajú z laterálnych vetiev (ciev) aorty (2). Po odstupe *aa. renales* z brušnej aorty nastáva ich bifurkácia pred *hilus renalis* na *ramus dorsalis* a *ramus ventralis* (3).

Variácie obličkových artérií sú u psov pomerne časté. Intenzívnym výskumom sa počas niekoľkých dekád zistilo, že obličku môže zásobovať niekoľko samostatných vetiev súčasne.

Podobne, ako u psov, takéto variácie v arteriálnom zásobení obličky boli popísané u morčiat, králikov, ošípanej, oviec, norkov a človeka (1,4,5,7).

Poznanie anatomických variácií cievneho zásobenia orgánov je mimoriadne dôležité a môže výrazne redukovať komplikácie počas chirurgických zákrokov na obličkách, ako sú parciálne alebo totálne nefrektómie a iné zákroky (terapeutického alebo experimentálneho charakteru) na obličkách a príľahlých orgánoch a cievach psov.

Cieľom našej práce je zamerať sa na variabilitu v odstupe obličkových artérií a popísať možné vzory priebehu extraparenchymálnej (extrahilárnej) časti obličkových tepien u krížencov psov v rámci slovenskej populácie.

Materiál a metodika

V práci sme použili 10 krížencov psov, priemerného veku 6,5 roka a hmotnosti 3 kg. Psy boli na základe súhlasu majiteľov použité v štúdiu po humánnej eutanázii vykonanej pre nepriaznivú prognózu ochorenia na žiadosť majiteľov. Ihneď po eutanázii bola vykonaná laterálna torakotómia za účelom perfúzie arteriálneho systému cez ľavú komoru srdca. Ako perfúzne médium sme použili 0,9% fyziologický roztok (Mikrochem Trade spol. s r.o., Pezinok, Slovenská republika) vždy čerstvo pripravený pre tento účel. Po perfúzii sme cez ľavú komoru srdca aplikovali samopolymerizujúcu dentálnu živicu Duracryl Plus (SpofaDental a.s., Jičín, Česká republika) za účelom vizualizácie arteriálneho systému. Po uplynutí času potrebného na polymerizáciu živice boli kadavéry psov macerované v 2% roztoku hydroxidu sodného (Mikrochem Trade spol. s r.o., Pezinok, Slovenská republika) pri teplote 65°C po dobu 2 dní. Po macerácii mäkkých tkanív boli korozívne preparáty psov umyté vodou a sušené pri laboratórnej teplote. Preparáty boli prehliadnuté makroskopicky a aj pod operačným mikroskopom ZEISS Movena S7 (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Nemecko) pre detailnejšie pozorovanie tepien.

Pri manipulácii so zvieratami počas eutanázie a pri následnej manipulácii s kadaveróznym materiálom boli dodržané etické normy zaobchádzania so zvieratami.



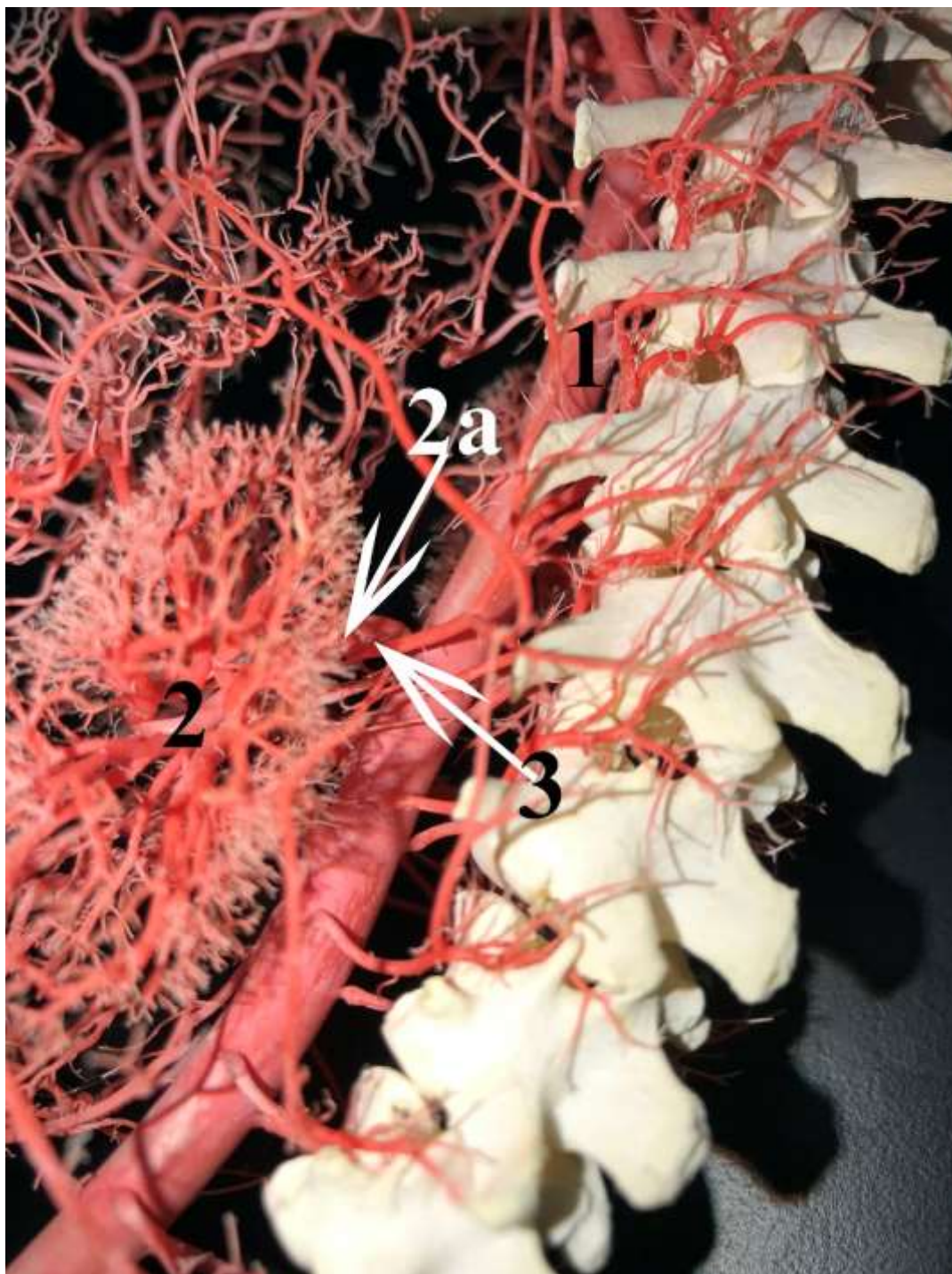
Obr. 2 Korozívny preparát arteriálneho zásobenia ľavej obličky psa (laterálny pohľad)

Výsledky

U všetkých jedincov *aa. renales* odstupovali z brušnej aorty kaudálne od *a. mesenterica cranialis*. Pravostranná *a. renalis* odstupovala v 6 prípadoch z laterálnej steny brušnej aorty. V 4 prípadoch bol odstup *a. renalis* z ventrálnej steny brušnej aorty. V dvoch prípadoch z pravostrannej *a. renalis* odstupovala *a. abdominalis cranialis*. Ľavostranná *a. renalis* v 5 prípadoch odstupovala z laterálnej steny brušnej aorty a u 5 jedincov z ventrálnej steny brušnej aorty. V jednom prípade boli pozorované dve ľavostranné *aa. renales*, ktoré odstupovali z ventrálnej steny brušnej aorty a možno ich pomenovať ako *a. renalis sinistra cranialis* a *a. renalis sinistra caudalis*, zároveň samostatne tvorili *ramus dorsalis* a *ramus ventralis*. *Ramus dorsalis* tvorila *a. renalis caudalis* a *ramus ventralis* tvorila *a. renalis cranialis*. V jednom prípade z ľavostrannej *a. renalis* odstupovala *a. abdominalis cranialis* a samostatne *a. phrenica caudalis*. V 7 prípadoch boli *aa. renales* samostatné tepny zásobujúce výhradne obličky. Iné signifikantné variácie v odstupe a formovaní *aa. renales* u psov sme nezaznamenali.



Obr. 3 Ventrálny pohľad na dvojité *a. renalis sinistra* - fotografia z operačného mikroskopu
Popis: 1- aorta abdominalis, 2 - *a. renalis dextra*, 3. *ren sinister*, 3a - *a. renalis sinistra cranialis*, 3b - *a. renalis sinistra caudalis*, 4. *a. mesenterica cranialis*



Obr. 4 Šikmý pohľad na odstup *a. abdominalis cranialis* z *a. renalis dextra*

Popis: 1 – *aorta abdominalis*, 2 – *ren dexter*, 2a – *a. renalis dextra*, 3 – *a. abdominalis cranialis*

Diskusia

V súčasnosti existuje mnoho štúdií zaoberajúcich sa vaskularizáciou obličiek u domácich a laboratórnych zvierat.

Sajjarengpong (4) realizoval štúdiu na 144 psoch, v ktorej popisuje samostatný vznik *aa. renales* u 130 psov. U 14 psov bol zistený dvojité odstup *a. renalis sinistra*. Pravá obličková tepna nevykazovala žiadne variácie. Podobná formácia dvoch ľavých obličkových tepien bola zistená u jedného nášho prípadu. Štúdia Sajjarengpong (2006) však nepopisuje variácie v odstupe tepien a neboli tiež popísané presné miesta odstupu obličkových tepien z brušnej aorty.

U králikov Supuka a kolektív (7) popisujú podobné vzory odstupu *aa. renales* ako v našej štúdii. Zároveň v jednom prípade bola popísaná aj *a. renalis accessoria*. Autori popisujú u dvoch prípadov vznik *a. renalis dextra* v úrovni *a. mesenterica cranialis*, ale nejednalo sa o odstupy z ventrálnej steny brušnej aorty. Zároveň autori konštatujú prítomnosť dvojitej *a. renalis sinistra* u 10% prípadov.

Maženský a Flešárová (1) popisovali variácie obličkových artérií u morčiat. Vo väčšine prípadov odstupovala *a. renalis* ako samostatná vetva pre obličku. V niektorých prípadoch autori popisujú dvojité *aa. renales* pre pravú a ľavú obličku, a v jednom prípade trojitú *a. renalis dextra*, terminologicky definovanú ako *a. renalis dextra cranialis*, *a. renalis dextra media*, *a. renalis dextra caudalis*

Autori taktiež popisujú u niektorých jedincov (morčatá a králiky) vznik *a. abdominalis cranialis* z *a. renalis* podobne ako my, ale v štúdii Sajjarengponga (2006) nebol tento odstup popísaný. Z uvedených informácií vychádza aj to, že u týchto zvierat nebol popísaný vznik *a. phrenica caudalis* z *a. renalis*, ako v našom jednom prípade (1,4,7).

U jedincov použitých v našej štúdii sa uplatňuje najčastejšie laterálny odstup *aa. renales* z brušnej aorty a následne ventrálny odstup *aa. renales* z brušnej aorty. V 3 prípadoch sme zistili z *aa. renales* odstupujúce iné cievy a to v dvoch prípadoch *a. abdominalis cranialis* a v druhom prípade *a. phrenica caudalis*. Prítomnosť viacnásobnej *a. renalis* sme zaznamenali len u jediného psa. Podľa literatúry viacnásobné *aa. renales* boli v minulosti popísané u psov, ošípaných, človeka a morčatá (1,4,7).

Chirurgické riešenie patologických stavov obličiek u psov sa dostáva na úroveň humánnej medicíny a z našich skúseností pri chirurgických zákrokoch, ako je radikálna nefrektómia, boli pozorované značné odlišnosti v arteriálnom zásobení u psov podstupujúcich tento zákrok. Práve preto sme sa rozhodli vykonať túto štúdiu na dostupnej vzorke psov, bez plemennej príslušnosti, teda „krížencov“, ktoré tvoria najväčšie percento psey populácie na Slovensku.

V súčasnosti pes stále slúži ako dôležité experimentálne a modelové zviera v biomedicínskom výskume, neurovedách, kardiochirurgii a urogenitálnej chirurgii. Krížence psov sú veľmi heterogénna a žiaľ dynamicky sa rozširujúca populácia. Možné genetické odchýlky fenotypovo prejavujúce sa u daných jedincov môžu meniť zaužívané a doposiaľ popísané anatomické pomery v organizme. Zároveň si uvedomujeme limity našej štúdie najmä v počte jedincov. Jedná sa však o našu pilotnú štúdiu. V budúcnosti sa chceme komplexnejšie venovať danej problematike s väčším počtom jedincov a s použitím zobrazovacích metód.

Pod'akovanie

Práca bola podporená grantom CEF a Slovnaft a.s., a Nadáciou M- MARKET.

Literatúra

1. **Mazensky D, Flesarova S.** Arrangement of Renal Arteries in Guinea Pig. *Anat Rec* 2017; 300: 556 – 559.
2. **Noden DM, de Lahunta A.** The Embryology of Domestic Animals. Baltimore; Williams & Wilkins, 1985: 219.
3. **Popesko P.** Anatomia hospodárskych zvierat. Bratislava; Príroda, 1992: 410.
4. **Sajjarengpong K, Adirektaworn A.** The variations and patterns of renal arteries in dogs. *Thai J Vet Med* 2006; 36 (1): 39-46.
5. **Shively MJ.** Origin and branching of renal arteries in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978; 173: 986-989.
6. **Smith BJ.** Canine Anatomy. Philadelphia; Lippincott Williams, 199: 441-446.
7. **Supuka P, Mazensky D, Danko J, Supukova A, Petrovova E.** Anatomical description of the renal arteries and veins in the European rabbit. *Biologia* 2014; 69 (8): 1059—1064.

VÝZNAM HYPOPLÁZIE VERTERBÁLNEJ ARTÉRIE NA VZNIK ISCHEMICKEJ CIEVNEJ MOZGOVEJ PRÍHODY

(The importance of vertebral artery hypoplasia for the development of ischemic stroke)

Maretta Milan, Leško Norbert, Gdovinová Zuzana

*Neurologická klinika, UPJŠ LF a UN LP Košice, Tr.SNP 1, 040 11 Košice
milan.maretta@gmail.com*

Súhrn

Ischemické cievne mozgové príhody vo vertebrobasilárnom povodí predstavujú približne pätinu všetkých mozgových príhod. Častým nálezom na cievach v zadnej mozgovej cirkulácii sú anatomické variácie ktoré ovplyvňujú hemodynamické prúdenie krvi, čím prispievajú v prípade trombózy alebo embolizácie k rozvoju ischemického poškodenia. Hypoplázia a.vertebralis je častým a asymptomatickým nálezom v populácii. Viacero prác poukázalo práve na vyšší výskyt tejto cievnej anomálie v spojitosti s rozvojom ischemického poškodenia štruktúr vertebrobasilárnej cirkulácie. Zistený bol signifikantne vyšší výskyt hypoplázie arteria vertebrales u pacientov ktorí prekonalí ischemickú CMP v zadnej cirkulácii. Cieľom našej práce je poukázať na význam hypoplázie a.vertebralis v každodennej praxi vo vzťahu ku vzniku ischemickej cievnej mozgovej príhody.

Kľúčové slová

hypoplázia arteria vertebrales, ischemická cievna mozgová príhoda

Summary

Ischemic strokes in the vertebrobasilar territory account for one-fifth of all ischemic strokes. A common finding on vessels within posterior circulation are anatomical variations that affect hemodynamic blood flow, thus contributing to the development of ischemic damage in the event of thrombosis or embolization. Vertebral artery hypoplasia is a common and asymptomatic finding in the population. Several studies have pointed to a higher incidence of this vascular anomaly with regard to the development of ischemic damage to structures of posterior circulation. A significantly higher incidence of vertebral artery hypoplasia was found in patients who suffered from posterior circulation ischemic stroke. The aim of our work is to point out the challenges of hypoplasia of the vertebral artery in everyday practice in relation to the onset of ischemic stroke.

Keywords

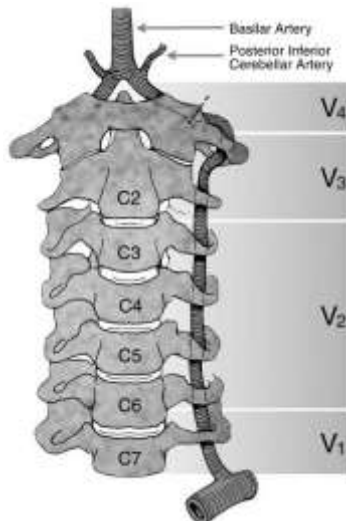
vertebral artery hypoplasia, ischemic stroke

Úvod

Ischemické cievne mozgové príhody (iCMP) v súčasnosti predstavujú nielen závažný medicínsky, ale aj socioekonomický problém. Podľa výsledkov z registrov cievnych

mozgových príhod iCMP v zadnej cirkulácii (vertebrobazilárne;VB povodie) predstavujú celkovo približne 23-26% (1,2), avšak vyšší výskyt (40%) bol zaznamenaný v Ázijských krajinách (3).

Ischemické poškodenie štruktúr VB povodia je spojené s vyššou miernou mierou recidívy iCMP, hlavne v prvých siedmych dňoch, v porovnaní s iCMP v karotickom povodí. Hlavným prediktorom recidívy bola ateroskleróza ciev VB povodia (4). V prípade stenózy ciev VB povodia bolo zistené až 24.6% riziko recidívy iCMP v prvých 90 dňoch v porovnaní so 7.2% rizikom pri absencii stenotických zmien (5). Aterosklerotické postihnutie ciev (tzv. Large artery disease, LAD) vo VB cirkulácii sa najčastejšie vyskytuje v proximálnom (V0) a distálnom (intrakraniálnom) úseku arteria vertebralis (AV), v priebehu proximálneho a stredného úseku a. basilaris a v odstupovom segmente a.cerebri posterior (tzv. P1-PCA) (6). Mechanizmy vzniku iCMP na podklade LAD môžu zahŕňať distálnu embolizáciu aterosklerotického plátu (tzv.artery to artery embolizm), ruptúru plátu v mieste zúženia s nasadajúcou trombózou (in situ thrombosis) a oklúziu perforantov. Práve anatomické variácie vertebrálnych artérií majú vplyv nielen na rozvoj iCMP vo VB povodí, ale významne vplývajú aj na mozgovú cirkuláciu. Podľa priebehu AV popisujeme štyri úseky. V prvom segmente (V1) AV prebieha od odstupov a.subclavia až po vstup do foramen transversi C6. Vo V2 segmente AV pokračuje až do úrovne C2. Úsek (V3) sa točí laterálne z úrovne C2 do vstupu do foramen transversi C1 kde perforuje dura mater. Intrakraniálny segment (V4) prebieha od vstupu do foramen magnum až po spojenie s druhostrannou AV formujúc arteria basilaris. Toto anatomické delenie má aj klinický význam. Odstup AV (niekedy označovaný ako V0 úsek) je najčastejším miestom vzniku aterosklerotických zmien v priebehu AV. Nasledujúcim častým miestom aterosklerotických (stenotických, okluzívnych) zmien je intrakraniálny, V4, segment. Úsek V2 a V3 je častým miestom vzniku disekcie cievnej steny. Práve odstupový úsek (V0) ako hlavný zdroj distálnej embolizácie je častokrát ultrasonografickým vyšetrením ťažko zobraziteľný (7).



Obr.1 Segmenty v priebehu arteria vertebralis (8)

Hypoplázia AV (HAV) je častý nález pri zobrazení ciev VB povodia. Priemer AV môže do značnej miery variovať, pričom za hypopláziu sa všeobecne považuje priemer cievky pod 2 mm (9). Okrem hypoplázie je častým a náhodným nálezom aj asymetria AV, zistená u 68.9% pacientov bez anamnézy ischemickej CMP, s dominanciou ľavostrannej AV (46.5% vs. 22.4%; 0.323 ± 0.057 cm vs. 0.297 ± 0.052 cm, $p < 0.001$) (9). Výskyt HAV sa pohybuje v širokom rozmedzí, 15.6% (potvrdené CT angiografiou) až 26.5% s použitím MR angiografie (MRA-TOF) čo je dané hlavne typom použitej metodiky (USG, CT angiografia, MR angiografia) (8 - 10). Zriedkavým nálezom (3.4%) je aplázia AV (12).

Hypoplázia AV výrazne ovplyvňuje aj hemodynamické prúdenie krvi v cievach VB povodia. V prítomnosti HAV dochádza k poklesu prietokového objemu a nárastu prietokovej rezistencie v ipsilaterálnej AV a kompenzačným vzostupom prietokového objemu na kontralaterálnej strane (13, 14). Rozsiahla metaanalýza zahrňujúca viac ako 3800 pacientov s prekonanou ischemickou CMP, potvrdila výskyt HAV na úrovni 18.6%, so signifikantne vyšším výskytom v prípade iCMP vo vertebrobasilárnej cirkulácii (29.2% vs. 15.0%; RR 1.81; $p < 0.001$) (14). Je potrebné podotknúť heterogenitu medzi jednotlivými štúdiami vychádzajúcu z rôznych vyšetrovacích metodík. Podobne ako predchádzajúce štúdie, aj Park a kol. (9) poukázali na vysoký výskyt HAV. U neselektovanej kohorty pacientov s iCMP bola HAV zistená v 35.2% (častejšie vpravo, 19.3% vs. 12.5%). Takisto signifikantne vyšší výskyt HAV bol dokázaný

v prípade iCMP v zadnej cirkulácii (45.6% vs 27.1%, $p < 0.001$). Výskyt HAV sa signifikantne neodlišoval (26.5% vs. 27.1%) medzi zdravou kohortou pacientov a tými s anamnézou iCMP z karotického povodia. Skoro u polovice pacientov (45.1%) s iCMP vo VB povodí, bola zistená stenóza/oklúzia AV a u väčšiny z nich (89.1%) tento nález bol na strane hypoplastickej AV. Práve v prípade HAV je pozorovaný nižší prietok a pokles prietokových rýchlostí čo sa môže podieľať na akcelerácii protrombotického a aterosklerotického procesu v týchto cievach. Vyšší výskyt HAV bol pozorovaný na pravej strane (66.1%) a zároveň jej prítomnosť zvýšila pravdepodobnosť hypoperfúzie a.cerebelli posterior inferior (42.4% vs. 7.6%, $p < 0.001$). Predpokladá sa, že vyšší pravostranný výskyt HAV je spojený s anatomicou lokalizáciou ľavostrannej AV, odstupujúcej z a.subclavia ktorá počas embryonálneho vývoj podlieha vyššiemu tlakovému gradientu (11).

Viacero prác poukázalo na rizikové faktory spojené s HAV a vznikom iCMP v oblasti VB povodia. Hypoplázia AV bola signifikantne menej častá u pacientov s kardioembolickou príčinou CMP a zároveň nebol zistený signifikantný rozdiel vo výskyte HAV medzi týmito pacientmi a asymptomatickými (33.3% vs. 31.3%; $p > 0.05$). Podobne HAV nemala vplyv (61 % vs. 57 %; $p > 0.05$) na charakter neurologickej symptomatológie (TIA vs. iCMP). Častejší výskyt TIA na podklade HAV bol pozorovaný u pacientov mladších ako 50 rokov (68.2 % vs. 50 %; OR = 1.32, $p = 0.047$). V prípade pacientov vyššieho veku (> 50 rokov) táto korelácia potvrdená nebola (51.9 % vs. 58.8 %; $p > 0.05$). Výsledky týchto autorov (16) poukazujú na fakt, že iCMP nekardioembolickej etiológie sa častejšie vyskytovali (viac ako 60%) v proximálnej časti VB povodia, zatiaľ čo kardioembolizmus bol spojený s distálnou lokalizáciou trombózy. Taktiež zistili koreláciu medzi stupňom hypoplázie a stenózou/oklúziou AV. U pacientov s iCMP vo VB povodí a priemerom AV menej ako 2.2 mm autori zistili 22.9% výskyt stenózy/oklúzie AV v porovnaní s pacientami s vyšším priemerom AV (> 3 mm) kde výskyt stenózy/oklúzie bol iba 5.6% ($p = 0.015$) (15). Rizikové faktory ako sú hypertenzia, diabetes mellitus, fajčenie a hyperlipidémia nemali vplyv na vyšší výskyt HAV (17). Dokumentovaná bola aj asociácia HAV a iných anatomických variácií vo VB povodí. Prítomnosť HAV bola spojená s vyšším výskytom tzv.fetálnej cirkulácie Willisovho okruhu (FCW) pri ktorej je prítomná hypoplázia ev. aplázia P1 úseku a.cerebri posterior a zároveň okcipitálny lalok a príľahlé štruktúry sú zásobované prostredníctvom mohutne vyvinutej a. communicans posterior. Táto anatomická variácia má význam pri embolizácii z karotického do VB povodia. Gaigalaite a kol. (18) zistili, že výskyt FCW bol častejší u pacientov s HAV (28.8% vs. 13.5%, $p < 0.001$). Podobne vyšší výskyt FCW (50% vs.13.5%, $p < 0.005$) bol pozorovaný u pacientov v prípade že hypoplastická AV ústila priamo do a.cerebelli posterior inferior a absentovala jej komunikácia s a.basilaris. Tento nález, vyššieho výskytu FCW v prítomnosti hypoplázie AV, podporuje hypotézu, že pokles perfúzie cez VB povodie je kompenzovaný z karotického povodia prostredníctvom fetálnej cirkulácie Willisovho okruhu.

Hypoplázia vertebrálnej artérie je častým nálezom pri neurozobrazovacom vyšetrení ktorá spôsobuje hemodynamické zmeny vo vertebrobasilárnom povodí. Mnoho prác zároveň poukázalo na vyššiu mieru rizika vzniku ischemickej cievnej mozgovej príhody, hlavne v zadnej mozgovej cirkulácii pri náleze HAV. Preto znalosti významu tejto cievnej anomálie by mali byť zvažované v klinickej praxi pri diagnostike príčiny vzniku ischemickej cievnej mozgovej príhody.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore projektu VEGA 1/0380/19.

Literatúra

1. **Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F.** The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke*. 1988;19(9):1083–92. *Eur Neurol* 1997;38(1):10-20.
2. **Paciaroni M, Silvestrelli G, Caso V, Corea F, Ventì M, Milia P, Gallai V.** Neurovascular territory involved in different etiological subtypes of ischemic stroke in the Perugia Stroke Registry. *Eur J Neurol* 2003; 10(4), 361-365.
3. **Lee BI, Nam HS, Heo JH, Kim DI.** Yonsei Stroke Registry. Analysis of 1,000 patients with acute cerebral infarctions. *Cerebrovasc Dis* 2001;12(3):145-151.
4. **Gulli G, Khan S, Markus HS.** Vertebrobasilar stenosis predicts high early recurrent stroke risk in posterior circulation stroke and TIA. *Stroke* 2009;40(8):2732–2737.
5. **Flossmann E, Rothwell PM.** Prognosis of vertebrobasilar transient ischaemic attack and minor stroke. *Brain* 2003;126(Pt 9):1940-1954.
6. **Kim JS, Nah HW, Park SM, Kim SK, Cho KH, Lee J.** Risk factors and stroke mechanisms in atherosclerotic stroke: intracranial compared with extracranial and anterior compared with posterior circulation disease. *Stroke* 2012;43(12): 3313–3318.
7. **Škoda MO.** Detekce a klasifikace stenóz ve vertebrálním řečišti. *Neurol praxi* 2017;18(4),233-237.
8. **Jenkins JS, Stewart M.** Endovascular treatment of vertebral artery stenosis. *Prog Cardiovasc Dis* 2017; 59(6), 619-625.
9. **Park JH, Kim JM, Roh JK.** Hypoplastic vertebral artery: frequency and associations with ischaemic stroke territory. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78(9), 954-958.
10. **Jeng JS, Yip PK.** Evaluation of vertebral artery hypoplasia and asymmetry by color-coded duplex ultrasonography. *Ultrasound Med Biol* 2004; 30(5), 605-609.
11. **Thierfelder KM, Baumann AB, Sommer WH, et al.** Vertebral artery hypoplasia: frequency and effect on cerebellar blood flow characteristics. *Stroke* 2014; 45(5), 1363-1368.
12. **Min JH, Lee YS.** Transcranial Doppler ultrasonographic evaluation of vertebral artery hypoplasia and aplasia. *J Neurol Sci*; 2007; 260(1-2), 183-187.
13. **Chuang YM, Huang YC, Hu HH, Yang CY.** Toward a further elucidation: role of vertebral artery hypoplasia in acute ischemic stroke. *Eur Neurol*. 2006; 55:193-199
14. **Chen YY, Chao AC, Hsu HY, Chung CP, Hu HH.** Vertebral artery hypoplasia is associated with a decrease in net vertebral flow volume. *Ultrasound Med Biol* 2010; 36(1), 38-43.
15. **Katsanos AH, Giannopoulos S.** Increased risk for posterior circulation ischaemia in patients with vertebral artery hypoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Eur stroke J* 2017; 2(2),171-177.
16. **Gaigalaite V, Vilimas A, Ozeraitiene V, Dementaviciene J, et al.** Association between vertebral artery hypoplasia and posterior circulation stroke. *BMC Neurol* 2016; 16(1), 1-9.
17. **Szárázová AS, Bartels E, Bartels S, Turčáni P.** Possible morphological pathomechanisms of ischemic stroke in the posterior circulation of patients with vertebral artery hypoplasia. *J Neuroimaging* 2015; 25(3), 408-414.
18. **Gaigalaite V, Dementaviciene J, Vilimas A, Kalibatiene D.** Association between the posterior part of the circle of Willis and the vertebral artery hypoplasia. *PloS one* 2019; 14(9), e0213226.

MORFOMETRICKÉ HODNOTENIE KRVNEJ A LYMFATICKEJ MIKROCIRKULÁCIE V LÉZIÁCH LICHEN RUBER PLANUS VO VZŤAHU K ZÁPALOVEJ INFILTRÁCIÍ A EPIDERMÁLNEJ HYPERPLÁZII

(Morphometric evaluation of the blood and lymphatic microcirculation within the lesions of lichen ruber planus in relation to the inflammatory infiltration and epidermal hyperplasia)

Výbohová Desanka¹, Adamicová Katarína², Hešková Gabriela¹, Mellová Yvetta¹

¹ Ústav anatómie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin, vybohova@jfmed.uniba.sk

² Ústav patologickej anatómie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Kollárova 2, 036 01 Martin

Súhrn

Cieľom predkladanej štúdie je kvantitatívne hodnotenie zmien krvnej a lymfatickej mikrocirkulácie vzhľadom k stupňu zápalovej infiltrácie a k hyperplázii epidermis. Na súčasnú detekciu krvných aj lymfatických mikrociev sme použili dvojité imunohistochemiu s protilátkami anti CD34 a anti D2-40. Morfometrické vyhodnotenie sme realizovali pomocou softvéru QuickPhoto Micro Version 2.3, pričom sme merali plochu krvných (BVA), a lymfatických mikrociev (LVA), bunkovú infiltráciu (CIA) a hrúbku epidermis (EPIA). Štatistická analýza hodnôt BVA a LVA nepotvrdila signifikantný nárast so zvyšujúcou sa zápalovou infiltráciou. V léziách so slabou, miernou a silnou zápalovou infiltráciou sa hodnoty BVA pohybovali od 1,06%, 1,19% po 1,21%, hodnoty LVA od 0,76 %, 0,76% po 0,91%. Pri korelačnej analýze sme zistili miernu pozitívnu koreláciu medzi hodnotami CIA a BVA ($r=0,326$, $p=0,255$), a podobne medzi EPIA a BVA ($r=0,413$, $p=0,142$). Miernu pozitívnu koreláciu sme potvrdili aj medzi EPIA a LVA ($r=0,460$, $p=0,098$) a medzi CIA a LVA ($r=0,442$, $p=0,114$).

Kľúčové slová

krvná a lymfatická mikrocirkulácia, lichen ruber planus, zápalová infiltrácia, epidermálna hyperplázia

Summary

The objective of the present study was quantitative evaluation of the blood and lymphatic microvessel area within the lichen planus lesions in relation to the inflammatory infiltration and epidermal hyperplasia. Double immunohistochemistry with monoclonal anti CD34 and anti D2-40 was used for the detection of the blood and lymphatic microvessel, respectively. Blood vessel area (BVA), lymphatic vessel area (LVA), epidermal thickness (EPIA) and cellular infiltration area (CIA) were evaluated by the morphometric software QuickPhoto Micro Version 2.3. Statistical analysis did not confirm significant increase in BVA with

increased level of the inflammation (BVA 1.06%, 1.19% and 1.21% in the lesions with weak, mild and strong CIA, respectively). Similarly LVA values increased but insignificantly (LVA 0.76%, 0.76%, 0.91% in the lesions with weak, mild and strong CIA, respectively). Correlation analysis confirm only mild relation between CIA and BVA ($r=0.326$, $p=0.255$), and between EPIA and BVA ($r=0.413$, $p=0.142$). Mild positive correlation was confirm between EPIA and LVA ($r=0.460$, $p=0.098$) and between CIA and LVA ($r=0.442$, $p=0.114$).

Keywords

blood and lymphatic microcirculation, lichen ruber planus, inflammatory infiltration, epidermal hyperlasia

Úvod

Lichen ruber planus je relatívne časté subakútne až chronické zápalové ochorenie kože, ktoré sa môže vyvíjať aj na slizniciach (1, 2). Podľa najnovších zistení sa lichen ruber planus zaraďuje k ochoreniam sprostredkovanými T-lymfocyty. Predpokladá sa, že ide o autoimunitné ochorenie, sprostredkované autoreaktívnymi T-lymfocyty, ktoré skrížene reagujú voči epidermálnym keratinocytom, a to najmä bazálnym. K aktivácii cytotoxického potenciálu T-lymfocytov dochádza zvyčajne po expozícii antigénu prostredníctvom antigén prezentujúcich buniek. Z exogénnych antigénov sú to najčastejšie vírusy, baktérie, kontaktné alergény ale aj lieky. Ako autoantigény sa chovajú najmä nádorové bunky (1, 2).

V histopatologickom obraze lichen ruber planus je zjavné typické zhrubnutie epidermis s akantózou a ortokeratózou. Keratinocyty v stratum spinosum sú zväčšené a majú bledú cytoplazmu. Bazálne bunky charakterizuje hydropická vakuolárna degenerácia. Dermálne papily sú často balónovito rozšírené, prítomný je hustý epidermotropne orientovaný lymfocyt - histiocytový infiltrát. V epidermis a v oblasti dermoepidermálnej junkcie sa objavujú koloidné telieska (1-4). Je predpoklad, že tak ako u iných chronických dermatóz aj u lichen planus hrá mikrocirkulácia významnú úlohu. Prevažná väčšina dostupných štúdií sa venovala sledovaniu krvných ciev v slizničných léziách lichen planus, nakoľko tie sú z terapeutického hľadiska torpídnejšie. Ich výsledky potvrdili zvýšenú angioproliferačnú resp. nárast plochy krvného mikrocirkulačného riečiska v slizničných léziách (5-10), pričom niektorí autori potvrdzujú predpoklad, že kapilárna hustota je indikátorom progresie ochorenia (10).

Štúdiom zmien mikrocirkulácie v kožných léziách sa zaoberal Hussein (11) a Salem (12). Rovnako ako my v našej predchádzajúcej štúdii (13) potvrdili nárast plochy krvných mikrociev v kožných léziách lichen ruber planus. V spomínanej predchádzajúcej štúdii sme navyše hodnotili aj lymfatickú mikrocirkuláciu a rovnako potvrdili jej nárast v léziách lichen ruber planus oproti zdravej koži (13).

V predkladanej štúdii sme sa zamerali na kvantitatívne hodnotenie zmien krvnej a lymfatickej mikrocirkulácie vzhľadom k stupňu resp. miere bunkovej zápalovej infiltrácie a vzhľadom k hyperplázii (hrúbke) epidermis.

Materiál a metódy

Súbor pozostával zo vzoriek zdravej kože (10) a z kožných lézií lichen ruber planus (14) odobratých z oblasti trupu. Na súčasnú detekciu krvných aj lymfatických mikrociev sme použili dvojité imunohistochemiu s nasledovnými protilátkami: Monoclonal Mouse CD 34 Class II Clone QBEnd 10 Code N° M7165 (Dako A/S, Denmark) pre krvné mikrociev a Monoclonal Mouse Anti-Human D2-40 (Clone D2-40, Dako, Denmark A/S) pre lymfatické mikrociev. Pracovali sme s vizualizačným systémom 2G EnVision Doublestain kit (code No. K5361 alebo K1395 Dako, Denmark A/S) presne podľa odporúčaní výrobcu. Ako chromogény boli použité diaminobenzidín a permanentná červená. Morfometrické hodnotenie sme realizovali použitím softvéru QuickPhoto Micro Version 2.3 (Promicra, Praha, Česká republika). Kvantitatívne

zmeny krvnej a lymfatickej cirkulácie sme hodnotili nasledovnými parametrami, BVA, LVA, plocha bunkovej infiltrácie (CIA) v pars papillaris dermis a jednotková plocha epidermis (EPIA).

Plocha endotelových buniek krvných kapilár (BVA) bola definovaná ako percento plochy endotelií detekovaných pomocou monoklonálnej protilátky Anti-Human CD34 v štandardnej ploche pars papillaris dermis (14-16).

Plocha endotelových buniek lymfatických kapilár (LVA) bola definovaná ako percento plochy endotelií detekovaných pomocou monoklonálnej protilátky Anti-Human CD34 v štandardnej ploche pars papillaris dermis (14-16). Plocha infiltrovaná bunkami (CIA) bola definovaná ako percento plochy prítomných buniek v štandardnej ploche pars papillaris dermis (15,16). Štandardná plocha pars papillaris dermis, v ktorej bola hodnotená BVA a aj LVA a CIA predstavovala plochu cca 0,1 mm². Jednotková plocha epidermis (EPIA) bola definovaná ako podiel plochy epidermis nad hotspot oblasťou v dermis a dĺžky vonkajšieho okraja epidermis nad meranou plochou. Tento prepočet plochy na jednotku dĺžky povrchu sa označuje aj ako priemerná hrúbka epidermis. Uvedené parametre sme vyhodnocovali vždy z minimálne 5 tzv. hotspot oblastí (17).

Výsledky

Hodnoty CIA vo vzorkách sa pohybovali od 3,25% do 12,87% a boli samozrejme signifikantne vyššie ako v zdravej koži (0,70% ± 0,11). Vzorky sme podľa stupňa infiltrácie rozdelili do troch skupín (viď tabuľka 25): slabá (CIA do 4%), stredná (CIA od 4% - 8%) a silná skupina (CIA nad 8%). Hodnoty CIA mierne pozitívne korelovali s BVA ($r=0,328$, $p=0,252$) a LVA ($r=0,444$, $p=0,112$).

Hypertrofia epidermis bola v hodnotení lichen ruber planus trochu špecifický parameter. Vykazovala totiž signifikantnú individuálnu variabilu v skupinách aj keď celkovo rozdiel signifikantný nebol (viď tabuľka 1). V skupine so slabým stupňom infiltrácie sa EPIA pohybovala od 74,62 µm do 135,84 µm, v strednej skupine od 90,74 µm do 159,89 µm a v skupine s najvyššou infiltráciou od 88,44 µm do 198,66 µm. Pri hodnotení skupín ako celku sme zistili, že nárast oproti hodnotám v zdravej koži bol iba v skupine so stredným ($p=0,011$) a silným stupňom infiltrácie ($p=0,010$). Rozdiel medzi hodnotami EPIA v zdravej koži a v léziách so slabým stupňom zápalu nebol signifikantný ($p=0,220$). Hodnoty EPIA pozitívne ale iba mierne korelovali s hodnotami CIA ($r=0,339$, $p=0,236$), BVA ($r=0,326$, $p=0,255$) a LVA ($r=0,442$, $p=0,114$).

Pri vyhodnocovaní výsledkov hodnôt BVA, sme nezaznamenali signifikantný nárast s nárastom infiltrácie. Hodnoty sa pohybovali od 1,06%, 1,19% a 1,21% v léziách so slabou, miernou a silnou zápalovou infiltráciou. Hodnoty LVA síce rástli od 0,76 % v léziách so slabou infiltráciou až k 0,91% so silnou infiltráciou, ale rozdiel medzi skupinami bol opäť insignifikantný.

Pri korelačnej analýze sme zistili miernu pozitívnu koreláciu medzi hodnotami CIA a BVA ($r=0,326$, $p=0,255$), a trochu vyššiu koreláciu medzi EPIA a BVA ($r=0,413$, $p=0,142$). Miernu pozitívnu koreláciu sme potvrdili aj medzi hrúbkou epidermis a LVA ($r=0,460$, $p=0,098$) a medzi CIA a LVA ($r=0,442$, $p=0,114$) (tabuľka 1).

		CIA v %	EPIA v μm	BVA v %	LVA v %
zdravá koža n=10		$0,70 \pm 0,11$	$72,64 \pm 3,61$	$0,77 \pm 0,11$	$0,32 \pm 0,08$
zdravá koža vs lézie lichen ruber planus T test - hodnota p		< 0,0001	slabý 0,220 stredný 0,011 silný 0,010	< 0,0001	< 0,0001
lézie lichen ruber planus n=14					
slabý stupeň zápalovej infiltrácie v dermis		$3,46 \pm 0,45$	$105,46 \pm 32,37$	$1,06 \pm 0,24$	$0,76 \pm 0,09$
stredný stupeň zápalovej infiltrácie v dermis		$7,25 \pm 0,52$	$128,83 \pm 28,83$	$1,19 \pm 0,16$	$0,76 \pm 0,20$
silný stupeň zápalovej infiltrácie v dermis		$11,42 \pm 1,15$	$137,49 \pm 40,39$	$1,21 \pm 0,15$	$0,92 \pm 0,25$
ANOVA hodnota p		< 0,0001	spolu 0,385 slabý stupeň 0,032 stredný stupeň <0,0001 silný stupeň <0,0001	0,460	0,398
Student Neuman Keuls test Hodnota p	slabý vs stredný	0,0001	0,391	0,344	0,999
	stredný vs silný	0,0001	0,555	0,825	0,444
	Slabý vs silný	< 0,0001	0,354	0,469	0,303

Tab. 1 Plocha bunkovej infiltrácie (CIA), jednotková epidermálna plocha resp. priemerná hrúbka epidermis (EPIA), plocha krvných a lymfatických endotelií (BVA a LVA) v kožných léziách lichen ruber planus.

Diskusia a záver

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 (18). Hypoxia je zároveň jedným z hlavných stimulov angiogenézy a akumulácie zápalových buniek (19). Na druhej strane novotvorené krvné cievy udržiavajú chronický zápal tým, že umožňujú transport zápalových buniek a zabezpečujú prísun výživy a kyslíka do miesta zápalovej proliferácie tkaniva. Zväčšenie endotelovej plochy má súčasne aj vyššiu kapacitu na tvorbu adhézných molekúl a zápalových cytokínov (18). Tento spätnoväzobný mechanizmus medzi chronickým zápalom a angiogenezou potencuje oba procesy (9,19,20). Je preto možné predpokladať, že novotvorba ciev sprevádzajúca chronický zápal zvyšuje intenzitu zápalového procesu a aj jeho trvanie. Doposiaľ však nie je jasné, ktorý z týchto dejov je príčina a ktorý následok (9,18-20). Lymfatické cievy regulujú zápalový proces transportom tekutín, leukocytov a antigén-prezentujúcich buniek z miesta zápalu do regionálnych lymfatických uzlín a sekundárnych orgánov lymfatického systému (21). Predpokladá sa, že niektoré zápalové cytokíny negatívne ovplyvňujú kontraktilitu lymfatických ciev, ktorá vyúsťuje do ich insuficiencie a následne do kompenzačnej lymfangiogenézy (22,23). Novotvorené lymfatické cievy v mieste chronického zápalu pomáhajú redukovať zápalový edém a podporujú imunitné procesy transportom makrofágov a dendritických buniek (24,25).

Epidermálna hyperplázia alebo priemerná hrúbka epidermis vykazovala vo vzorkách lichen ruber planus variabilitu vo vnútri skupín, ale nie medzi skupinami navzájom. Pri celkovom hodnotení rozdielov medzi skupinami sme zistili, že priemerná hrúbka epidermis v léziách

so slabou zápalovou infiltráciou sa signifikantne nelíšila od priemernej hrúbky epidermis v zdravej koži. K signifikantnému nárastu hrúbky dochádzalo až v léziách so stredným stupňom infiltrácie (o 70% oproti zdravej koži) a silným stupňom infiltrácie (o 90% oproti zdravej koži). Ich vzájomný rozdiel však nebol štatisticky významný.

Vysvetlením môže byť teória Rubin et al. (26), ktorí udávajú, že epidermálny turnover je v léziách lichen ruber planus najskôr spomalený. Deštrukcia a apoptóza v stratum basale vedie najskôr k zníženej proliferácii, následne však dochádza ku kompenzačnej a reaktívnej epidermálnej hyperproliferácii, výsledkom čoho je zhrubnuté stratum granulosum a stratum spinosum je variabilne zhrubnuté (26). Hodnoty priemernej hrúbky epidermis pozitívne mierne korelovali s mierou zápalovej infiltrácie. Parihar et al. (27) vo svojej štúdii potvrdili u pacientov s klasickou formou lichen ruber planus hyperpláziu epidermis v 96% vzoriek, atrofiu epidermis v tomto type nepotvrdili.

Morfometrické hodnotenie mikrocirkulačného riečiska v léziách lichen ruber planus s rôznym stupňom zápalu ukázalo, že plocha krvných kapilár v pars papillaris dermis má tendenciu rásť so vzrastajúcou infiltráciou aj keď ich nárast nebol štatisticky významný. Z korelačnej analýzy vyplynulo, že korelácia medzi plochou krvných kapilár v pars papillaris dermis a infiltráciou je mierne nižšia ako korelácia medzi plochou krvných kapilár a priemernou hrúbkou epidermis. Plocha lymfatických kapilár v pars papillaris dermis korelovala porovnateľne so stupňom infiltrácie a s priemernou hrúbkou epidermis.

Hoci dostupné štúdie potvrdzujú významný vzťah medzi zápalom a angio/lymfangiogénou a epidermálnou hyperpláciou, detailné patofyziologické a molekulárne mechanizmy nie sú úplne objasnené a vyžadujú si ďalšie štúdium. Vzájomný vzťah a ovplyvňovanie uvedených procesov by mohol byť benefit pre terapeutické stratégie, keďže inhibíciou angiogenézy prípadne aktiváciou lymfangiogenézy by pravdepodobne mohlo dôjsť k potlačeniu zápalových reakcií.

Literatúra

1. **Braun-Falco O, Plewig G et Wolf HH.** Dermatológia a venerológia. Martin; Osveta, 2001.
2. **Bolognia J, Jorizzo JL et Schaffer JV.** Dermatology. Philadelphia; Elsevier Saunders, 2012.
3. **Murphy GF.** Dermathopathology. Philadelphia; W.B. Saunders Company, 1995.
4. **Joshi R.** Interface dermatitis. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2013; 79: 349-359.
5. **Scardina GA, Cacioppo A, Carini F et al.** Periodontal morphological microcirculation in oral lichen planus. Ital J Anat Embryol 2007; 112: 281-291.
6. **Scardina GA, Picone V, Cacioppo, A et Messina P.** Study of microcirculation in oral lichen planus by videocapillaroscopy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007; 103: 30-34.
7. **Tao X, Huang Y, Li R et al.** Assessment of local angiogenesis and vascular endothelial growth factor in the patients with atrophic-erosive and reticular oral lichen planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007 103: 661-669.
8. **Scardina GA, Ruggieri A, Mares IE et Messina P.** Angiogenesis in oral lichen planus: an in vivo and immunohistological evaluation. Arch Immunol Ther Exp 2011; 59: 457-462.
9. **Mittal N, Shankari GM et Palaskar S.** Role of angiogenesis in the pathogenesis of oral lichen planus. J Oral Maxillofac Pathol 2012; 16: 45-48.
10. **Scardina AG et Messina P.** Morphological characteristics of microcirculation in oral lichen planus involving the lateral border of the tongue. J Oral Sci 2009; 51:193-197.
11. **Hussein MR.** Evaluation of angiogenesis in normal and lichen planus skin by CD34 protein immunohistochemistry: Preliminary findings. Cell Biol Int 2007; 31: 1292- 95.
12. **Salem SA, Aly DG et Youssef NS.** Immunohistochemical assessment of angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in cutaneous lichen planus: relation to the degree of inflammation. Eur J Dermatol 2001; 21: 197-202.

13. **Výbohová D, Mellová Y, Adamicová K et al.** Quantitative immunohistochemical assessment of blood and lymphatic microcirculation in cutaneous lichen planus lesions. *Histol Histopathol* 2015;30: 697-706.
14. **Mylona E, Nomikos A, Alexandrou P et al.** Lymphatic and blood vessel morphometry in invasive breast carcinomas: relation with proliferation and VEGF-C and -D proteins expression. *Histol Histopathol* 2007; 22: 825-835.
15. **Deb P, Boruah, D et Dutta, V.** Morphometric study of microvessels in primary CNS tumors and its correlation with tumor types and grade. *Microvasc Res* 2012; 84: 34-43.
16. **Boruah D, Deb P, Srinivas V et Mani NS.** Morphometric study of nuclei and microvessels in gliomas and its correlation with grades. *Microvasc Res* 2014; 93:52-61.
17. **Weidner N.** Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 169-180.
18. **Jackson JR, Seed MP, Kircher CH et al.** The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 1997; 11:457-465.
19. **Costa C, Incio J et Soares, R.** Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 2012; 10:149-166.
20. **Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S et al.** T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004;3: 35-42.
21. **Zraggen S, Ochsenbein AM et Detmar M.** An Important Role of Blood and Lymphatic Vessels in Inflammation and Allergy. *Journal of Allergy* 2013, ID 672381, 9 pages Dostupné online <http://dx.doi.org/10.1155/2013/672381> Prevzaté 10.3. 2014
22. **Alitalo K, Tammela T et Petrova TV.** Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005; 438: 946-953.
23. **Tammela T et Alitalo K.** Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 2010; 140: 460-476.
24. **Baluk P, Tammela T, Ator E et al.** Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest* 2005; 115: 247–257.
25. **Kataru RP, Jung K, Jang C et al.** Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. *Blood* 2009; 113(22): 5650-5659.
26. **Rubin R, Strayer DS, Rubin E et McDonald, JM.** Rubin's Pathology: clinicopathologic foundations of medicine. Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins. 2008.
27. **Parihar A, Sharma S, Bhattacharya SN et al.** A clinicopathological study of cutaneous lichen planus, *J Dermatol Surg* 2015; 19: 21-26.

II. COVID-19

PROBIOTIKÁ A COVID-19

(Probiotics and COVID-19)

Paduchová Zuzana

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, zuzana.paduchova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Koronavírusové ochorenie 2019 (COVID-19) primárne postihuje pľúca a dýchacie cesty, avšak prejavuje sa aj hyperimunitnou odpoveďou, zápalom a symptómami spojenými s dysfunkciou mikrobioty. Mikrobiota zohráva dôležitú úlohu v metabolizme, imunitných reakciách a ochrane hostiteľa pred patogénmi. Zmena fyziologickej homeostázy mikrobioty - dysbióza sa spája so stratou druhovej diverzity a koreluje s rôznymi ochoreniami alebo stavmi. Existujú dôkazy o tom, že v patogenéze COVID-19 hrá úlohu narušenie epitelovej bariéry čreva, zápal a dysbióza. Existuje mnoho dôkazov o prospešnosti probiotík pri prevencii a liečbe infekcií horných a dolných dýchacích ciest, dysbióze, či pri zvýšení imunity čriev a pľúc selektívnou stimuláciou určitými bakteriálnymi kmeňmi. K dnešnému dňu existuje málo priamych dôkazov o prospešnom účinku probiotík v prevencii a liečbe COVID-19, avšak doposiaľ publikované výsledky nám dávajú pozitívny signál o možnosti ich využitia. Terapeutický účinok probiotík v prevencii a liečbe COVID-19 sa predpokladá len na základe nepriamych dôkazov. Potrebne sú preto ďalšie dôkazy týkajúce sa validácie probiotík vo vzťahu ku COVID-19.

Kľúčové slová

probiotiká, COVID-19, mikrobiota, cytokíny, dysbióza

Summary

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) primarily affects the lungs and respiratory track, but is also manifested by a hyperimmune response, inflammation, and symptoms associated with intestinal microbiota dysfunction. The microbiota plays an important role in metabolism, immune responses, protection of the host against pathogens. Altered microbiota physiological homeostasis - dysbiosis is associated with loss of species diversity and correlates with various diseases or conditions. There is evidence that intestinal disruption, inflammation and dysbiosis play a role in the pathogenesis of COVID-19. There is much evidence of the benefit of probiotics in the prevention and treatment of upper and lower respiratory tract infections, dysbiosis, or in increasing intestinal and lung immunity by selective stimulation with certain bacterial strains. To date, there is little direct evidence for the use of probiotics in the prevention and control of COVID-19, but the results published so far give us a positive signal for their use in COVID-19 infection. The therapeutic effect of probiotics on the prevention and treatment of COVID-19 is only expected on the basis of indirect evidence. Therefore, further evidence is needed regarding the validation of probiotics in relation to COVID-19.

Keywords

probiotics, COVID-19, microbiota, cytokins, dysbiosis

Úvod

Koronavírusové ochorenie 2019 (COVID-19) bolo Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) oficiálne označené za chorobu, ktorá je spôsobená ťažkým akútnym respiračným syndrómom koronavírusu 2 (SARS-CoV-2) vo februári 2020 (1). Ochorenie primárne postihuje pľúca a dýchacie cesty, ale môže sa tiež prejavovať symptómami spojenými s gastrointestinálnym traktom (GIT), ako je dysfunkcia čreva u niektorých pacientov so závažnejším klinickým priebehom ochorenia (2) a hyperimunitnou odpoveďou označovanou ako „cytokínová búrka“ (3,4). Medzi skoré klinické prejavy pacientov s COVID-19 na začiatku ochorenia sú horúčka (98%), kašeľ (82%), únava a dýchavičnosť, ktoré môžu rýchlo prechádzať do zápalu pľúc (5). Respiračné príznaky sú heterogénne a sprevádza ich slabosť a únava. Vyskytujú sa tiež bolesti hlavy, žalúdka a svalov (myalgia), bolesti v hrudnom koši, strata chuti a vône, kožné problémy (žihľavka), neurologické problémy a GIT príznaky, ako sú hnačka, zvracanie, nevoľnosť, strata chuti do jedla, gastrointestinálne krvácanie a bolesti brucha (5,6,7,8).

Kľúčovú úlohu pri ovplyvňovaní výskytu týchto klinických príznakov majú cytokíny, ktoré sú tiež zdrojom zápalu (9,10). U pacientov s ťažkým priebehom COVID-19 boli stanovené významne zvýšené hladiny cytokínov (napr. IL-2, IL-7, IL-10, MCP-1, MIP1A, TNF- α a iné). Zápalová odpoveď po infikovaní SARS-CoV-2 má protivírusovú úlohu, avšak silná „cytokínová búrka“ v dôsledku nevyváženej odpovede môže byť pre pacientov veľmi škodlivá (3,5). Preto je dôležité hľadať rôzne stratégie na účinné potlačenie „cytokínovej búrky“ nevyhnutné na prevenciu, ako aj liečbu pacientov s COVID-19.

Mikrobiota človeka a jej funkcie

Normálnu mikrobiotu ľudského tela predstavujú mikroorganizmy osídľujúce kožu, ústnu dutinu, dýchacie cesty, urogenitálny a GI trakt, schopné koexistencie s hostiteľom (11). Najväčšie množstvo mikroorganizmov sa nachádza v GIT a ovplyvňujú tak náš život v zdraví a chorobe (12). Črevná mikrobiota predstavuje zložitý ekosystém tvorený z viac ako 100 biliónov mikroorganizmov. Dominantné sú kmene *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, v menšom zastúpení sú prítomné kmene *Proteobacteria*, *Actinobacteria* a *Verrucomicrobia* (13,14,15), pričom jednotlivé kmene obsahujú mnoho rôznych druhov (16). Bakteriálne kmene žijú v dokonalej harmónii a zohrávajú dôležitú úlohu v metabolizme, imunitných reakciách, ochrane hostiteľa pred patogénmi, obojsmerne komunikujú medzi GITom a centrálnym nervovým systémom (17,18) a pľúcami (19). Probiotiká súťažia s patogénmi o receptory na sliznici dýchacieho a GI traktu, syntetizujú proteíny, ktoré im umožňujú adherovať k proteínom vírusových buniek a/alebo k slizničnej výstelke hostiteľa, čím zabráňujú kolonizácii vírusov. Prijem probiotík dokáže zlepšiť zdravie buniek hrubého čreva, zvýšiť celistvosť sliznice a zabrániť prechodu toxínov alebo vírusov/baktérií do krvi (20).

Zmena fyziologickej homeostázy črevnej mikrobioty, známa ako dysbióza, sa spája so stratou jej druhovej diverzity a koreluje s rôznymi ochoreniami alebo stavmi, ako sú napr. hnačky spojené s užívaním antibiotík, diabetes 2. typu, bežné infekčné choroby (21), infekcie dýchacích ciest (19), niektoré ochorenia pľúc, vrátane alergie, astmy a cystickej fibrózy (22). Pacienti infikovaní COVID-19 vykazovali tiež mikrobiálnu dysbiózu, so zníženým obsahom probiotických kmeňov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (23). Patogenéza sa spája aj s narušením epitelovej bariéry a zápalom, čo sa dá zmierniť suplementáciou probiotikami. Samotný koronavírus spúšťa tvorbu zápalových cytokínov, čo môže spolu so zápalom vyvolať syndróm akútnej respiračnej tiesne, arytmiu, šok až multiorgánové poškodenie (5,24).

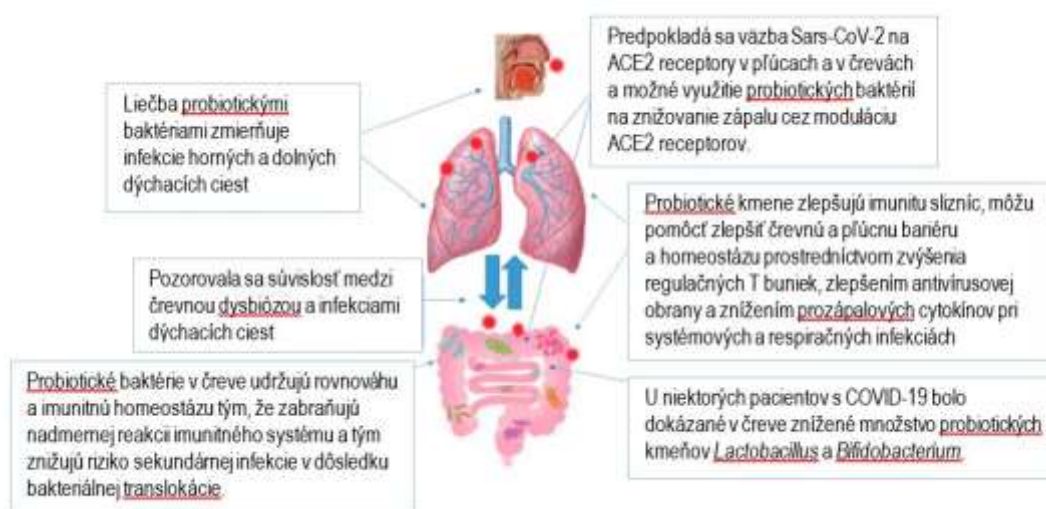
Pretože v súčasnosti nie je zatiaľ k dispozícii vakcína alebo špecifická, účinná, klinicky overená liečba COVID-19, najlepšou stratégiou je prevencia udržiavaním vysokej hygieny, vyhýbaním sa kontaktu s infikovanými ľuďmi a posilňovaním nášho imunitného systému. U pacientov infikovaných COVID-19 bola navrhnutá výživová suplementácia prebiotikami a/alebo

probiotikami zameraná na reguláciu rovnováhy črevnej mikrobioty a na zníženie rizika sekundárnej infekcie v dôsledku bakteriálnej translokácie (25).

Probiotiká v prevencii a liečbe COVID-19

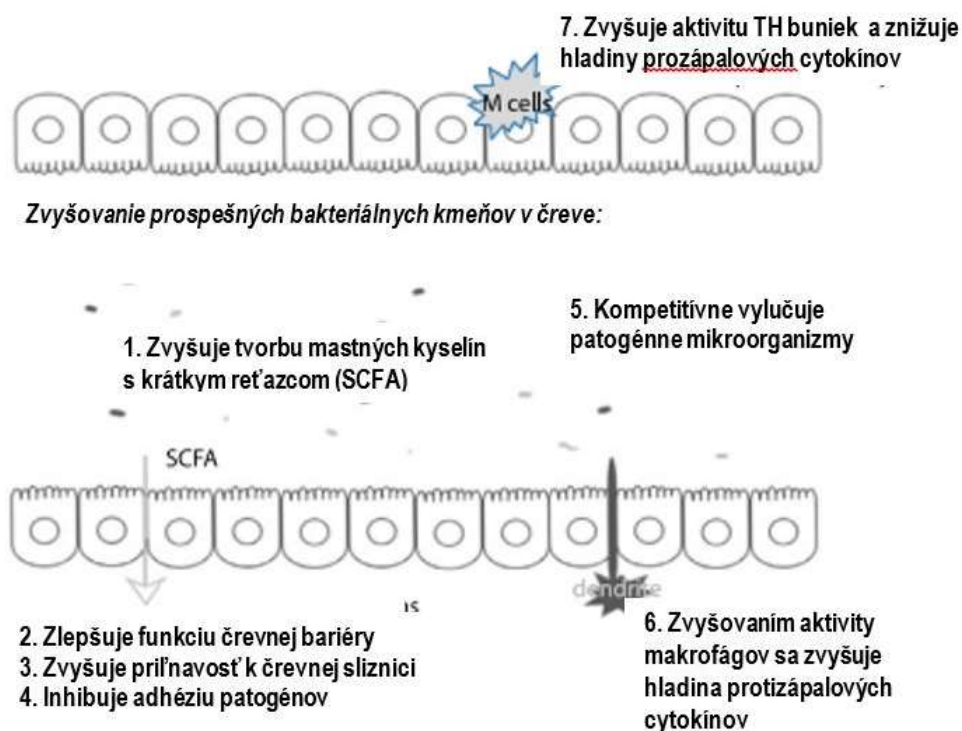
Podľa WHO, Organizácie pre výživu a poľnohospodárstvo (FAO) a Medzinárodnej vedeckej asociácie pre probiotiká a prebiotiká (ISAPP) sú probiotiká definované ako „živé mikroorganizmy, ktoré pri správnom podaní poskytujú hostiteľovi zdravotný prínos,“ (26). Najbežnejšie používanými kmeňmi sú *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacteria* a *Saccharomyces* (27,28). Probiotiká, prebiotiká a fermentované potraviny môžu zvyšovať aktivitu mikrobioty a črevnú imunitu prostredníctvom ich silných imunomodulačných a protizápalových účinkov (29). Priaznivý vplyv probiotík alebo symbiotík na prevenciu horných dýchacích ciest dokázalo mnoho štúdií (19,30,31,32,33). Probiotiká v kombinácii s vitamínmi by mohli byť tiež vhodnou stratégiou na všeobecnú moduláciu imunitného systému (34).

Keďže sa COVID-19 stal pandémiou veľmi rýchlo, podávanie probiotík sa na základe nepriamych dôkazov, ale aj štúdií zameraných na črevnú mikrobiotu a probiotiká vo vzťahu ku COVID-19, javí ako možný nástroj v prevencii a liečbe (35,36). V súčasnosti je registrovaných niekoľko klinických štúdií zameraných na zistenie úlohy probiotík v prevencii a liečbe COVID-19 (36), ktoré by nám mohli poskytnúť viacero dôkazov o možnom špecifickom a bezpečnom použití probiotík pri manažmente pacientov s COVID-19 (obrázok 1). Metaanalýza autorov Liu a kol. (2020) dokázala, že je možné klinicky použiť probiotiká u pacientov s hnačkami vyvolanými COVID-19, ktorí nemajú kontraindikácie pre použitie probiotík (37).



Obr. 1 Predpokladané terapeutické ciele pôsobenia probiotík pri znižovaní záťaž a závažnosti infekcií COVID-19 (35)

Mechanizmy pôsobenia probiotík v boji proti COVID-19 sú prezentované na obrázku 2. Zvyšovaním hladín prospešných mikroorganizmov v čreve môžeme vplývať na celý rad ďalších reakcií a to prostredníctvom priamej interakcie s črevnými bunkami (účinnosť na vrodenú a adaptívnu imunitu, vplyv na produkciu cytokínov bunkami črevného epitelu a znižovanie zápalovej reakcie, stimulácia sekrécie IgA na zlepšenie imunity slizníc, produkcia antimikrobiálnych látok, modulovanie imunitnej odpovede pri znižovaní replikácie vírusu), alebo nepriamo cez moduláciu črevnej mikrobioty (zlepšenie črevnej epitelovej bariéry, zvýšenie priľnavosti k črevnej sliznici, súťaž s patogénmi o živiny a adhéziu k črevnému epitelu). Podporou imunitných funkcií a potláčaním zápalového stavu môže byť črevná mikrobiota nástrojom, ktorý pomáha telu brániť sa pred COVID-19 (35,36,38,39,40).



Obr. 2 Mechanizmus pôsobenia probiotík v tráviacom trakte (40)

Záver

K dnešnému dňu prebieha niekoľko klinických štúdií, ale zatiaľ neexistuje veľa priamych dôkazov, ktoré by jednoznačne preukázali prospešný účinok použitia probiotických kmeňov pri infekcii COVID-19. Existuje však množstvo štúdií, ktoré dokazujú priaznivý vplyv probiotík pri udržiavaní zdravej mikrobiálnej diverzity, prevencii pred črevnou dysbiózou, pri zvýšení imunity čriev selektívnou stimuláciou určitými bakteriálnymi kmeňmi, posilnení imunity slizníc čriev aj pľúc, pri prevencii infekcie horných dýchacích ciest, s čím súvisí schopnosť lepšie čeliť infekcii cez zníženie závažnosti alebo trvania epizód infekcie (41). Kombinácia zdravej a vyváženej stravy spolu s prebiotikami, probiotikami a suplementáciou vitamínmi by nám mohla pomôcť posilniť náš imunitný systém a tým nás lepšie chrániť pred infekciou COVID-19.

Literatúra

1. **World Health Organization**, Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports, P. Song, et al. Clinica Chimica Acta 509 (2020) 280–287 285 <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>, 2020 (accessed 15 May 2020).
2. **Wong SH, Lui RN, Sung JJ.** Covid-19 and the digestive system. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2020;35(5):744–748.
3. **Song P, Li W, Xie J, Hou Y, You CH.** Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. Clinica Chimica Acta 2020;509:280–287.
4. **Zhao M.** Cytokine storm and immunomodulatory therapy in COVID-19: Role of chloroquine and anti-IL-6 monoclonal antibodies. International Journal of Antimicrobial Agents 2020;55(6):105982.
5. **Huang C, Wang Y, Li X a kol.** Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 2020;10223:497-506.
6. **Shi H, Han X, Jiang N a kol.** Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study Lancet Infect Dis 2020;4:425-434.

7. **Guan WJ, Ni ZY, Hu Y a kol.** Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(18):1708-1720.
8. **Smyk W, Janik MK, Portincasa P a kol.** COVID-19: focus on the lungs but do not forget the gastrointestinal tract. *Eur. J. Clin. Invest.* 2020;50,e13276.
9. **Peiris JS, Chu CM, Cheng VC a kol.** Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 2003;9371:1767-1772.
10. **Nassar MS, Bakhrebah MA, Meo SA, Alsuabeyl MS, Zaher WA.** Middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection: epidemiology, pathogenesis and clinical characteristics. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;15:4956-4961.
11. **Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA.** Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* 2006;21:517-523.
12. **Kovatcheva-Datchary P, Tremaroli V, Bäckhed F.** The gut microbiota. In: E. Rosenberg et al. (eds.) *The Prokaryotes – Human Microbiology*, 2013. DOI 10.1007/978-3-642-30144-5_87,3-24.
13. **Costello EK, Lauber CL, Hamady M a kol.** Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009;326:1694-1697.
14. **Wu GD, Chen J, Hoffmann C a kol.** Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011;334:105-108.
15. **Pflughoeft KJ, Versalovic J.** Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol-Mech Dis* 2012;7:99-122.
16. **Tremaroli V, Backhed F.** Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012;489:242-249.
17. **Qin J, Li R, Reas J a kol.** A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65.
18. **Chen VL, Surana NK, Duan JY a kol.** Role of murine intestinal interleukin-1 receptor 1-expressing lymphoid tissue inducer-like cells in salmonella infection. *PLoS ONE* 2013;8,e65405.
19. **Chan CKY, Tao J, Chan OS a kol.** Preventing respiratory tract infections by synbiotic interventions: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Adv Nutr.* 2020; 11(4):979-988.
20. **Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S. a kol.** Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* 2012;61:160-174..
21. **Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J a kol.** Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013;500(7464):541-6.
22. **Anand S, Mande SS.** Diet, microbiota and gut-lung connection. *Frontiers in Microbiology* 2018;9:2147.
23. **Zuo T, Zhang F, Lui GCY a kol.** Alterations in gut microbiota of patients with COVID-19 during time of hospitalization. *Gastroenterology* 2020;159(3):944-955.e8.
24. **Yang J, Zheng Y, Gou X a kol.** Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2020;94:91-95.
25. **Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J a kol.** Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* 2020;8(4):420-422.
26. **Hill C, Guarner F, Reid G, a kol.** Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:506-514.
27. **Zendeboodi F, Khorshidian N, Mortazavian AM, Da Cruz AG.** Probiotic: conceptualization from a new approach. *Curr Opin Food Sci* 2020;32:103-123.
28. **Guimariães JT, Balthazar CF, Silva R, a kol.** Impact of probiotics and prebiotics on food texture. *Curr Opin Food Sci* 2020;33:38-40.
29. **Ashraf R, Shah NP.** Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2014;54(7):938-956.

30. **Cohen R, Martin E, De La Rocque F, a kol.** Probiotics and prebiotics in preventing episodes of acute otitis media in high-risk children: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(8):810–814.
31. **Garaiova I, Muchová J, Nagyová Z a kol.** Probiotics and vitamin C for the prevention of respiratory tract infections in children attending preschool: a randomised controlled pilot study. *Eur J Clin Nutr* 2015;69(3):373-9.
32. **Gerasimov SV, Ivantsiv VA, Bobryk LM a kol.** Role of shortterm use of *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 and *Bifidobacterium lactis* UABLA-12 in acute respiratory infections in children: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2016;70(4):463–469.
33. **Panigrahi P, Parida S, Nanda NC a kol.** A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. *Nature.* 2017;548(7668):407–412.
34. **Aranow C.** Vitamin D and the immune system. *J Investig Med* 2011;59(6):881-6.
35. **Bottari B, Castellone V, Neviani E.** Probiotics and Covid-19, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2020;DOI:10.1080/09637486.2020.1807475.
36. **Din AU, Mazhar M, Wasim M a kol.** SARS-CoV-2 microbiome dysbiosis linked disorders and possible probiotics role *Biomed Pharmacother* 2020;11;133:110947.
37. **Liu M, Zhu H, He Y a kol.** Probiotics for treating novel coronavirus with diarrhea: A protocol for systematic review and meta analysis. *Medicine* 2020;99:38(e21617).
38. **Baud D, Agri VD, Gibson GR a kol.** Using probiotics to flatten the curve of coronavirus disease COVID-2019 pandemic. *Frontiers in Public Health* 2020;8:186.
39. **Bozkurt HS, Quigley EMM.** The probiotic *Bifidobacterium* in the management of Coronavirus: A theoretical basis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2020;34:1–5.
40. **Walton GE, Gibson GR, Hunter KA.** Mechanisms linking the human gut microbiome to prophylactic and treatment strategies for COVID-19. *Br J Nutr* 2020;9:1-9.
41. **Antunes AEC, Vinderola G, Xavier-Santos D, Sivieri K.** Potential contribution of beneficial microbes to face the COVID-19 pandemic *Food Res Int* 2020;136:109577.

SPÔSOBUJE COVID-19 PREEKLAMPSIU?

(Does COVID-19 cause preeclampsia?)

Svoboda Michal, Gergely Lajos, Klimová Daniela, Repiská Vanda, Gbelcová Helena, Priščáková Petra

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta UK, Sasinkova, Bratislava, Slovenská republika, svoboda22@uniba.sk

Súhrn

Od marca roku 2020 je ochorenie COVID-19, spôsobené vírusom SARS-CoV-2 (z angl. *Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2*), vyhlásené za pandémiu. Toto ochorenie, hlavne u mladých pacientov, sa klinicky často prejavuje symptómami podobnými chrípke. Závažný (až fatálny) priebeh je frekventovanejší u seniorov. Najnovšie výskumy naznačujú zvýšené riziko závažného priebehu ochorenia u tehotných žien. Tehotné ženy sú náchylnejšie na infekciu SARS-CoV-2 z dôvodu nadprodukcie receptora ACE2 počas tehotenstva, ktorý tento vírus používa na preniknutie do bunky. Symptómy objavujúce sa u tehotných žien pozitívnych na COVID-19 sú veľmi podobné ženám s preeklampiou.

Kľúčové slová

COVID-19, preeklampsia, ACE2, tehotenstvo

Summary

COVID-19, a disease induced by virus SARS-CoV-2, is since march of 2020 marked as pandemic. This disease is clinically manifesting itself with flu alike symptoms among young patients. More severe (sometimes lethal) course is typical mainly for seniors. Newest research suggests higher risk also for pregnant women. Pregnant women are more susceptible to infection caused by SARS-CoV-2 because of overproduction ACE2 receptor during pregnancy, which this virus uses for cell invasion. Symptoms found in pregnant women positive for COVID-19 are very similar to ones with preeclampsia.

Keywords

COVID-19, preeclampsia, ACE2, pregnancy

Úvod

Ochorenie COVID-19, ktoré sa stalo pandémiou, sa typicky prejavuje horúčkou, suchým kašľom, únavou, myalgiou, artralgiou, stratou čuchu a stratou chuti. Okrem týchto bežných príznakov, 14 % prípadov sa komplikuje pneumóniou a u 5 % pacientov sa rozvíja ťažký akútny respiračný syndróm (1). Aj keď COVID-19 postihuje primárne respiračný trakt, vyznačuje sa aj multisystémovými prejavmi zahŕňajúcimi hypertenziu, poškodenie obličiek a pečene či trombocytopéniu (2). Zaujímavým fenoménom COVID-19 je vysoká variabilita symptómov a príznakov medzi jednotlivými pacientami. Infikovaný jedinec môže byť úplne asymptomatický, s miernymi príznakmi alebo mať ťažký priebeh, pozorovaný prevažne pri staršej populácii alebo pri pacientoch s inými chronickými komorbiditami.

Najnovšie výskumy poukazujú aj na ďalšiu potenciálne rizikovú skupinu – tehotné ženy. Podľa výsledkov najväčšej metaanalýzy skúmajúcej dopad ochorenia COVID-19 na priebeh tehotenstva sa zistilo, že až takmer 50 % žien (n = 48) porodilo predčasne a navyše bola v tejto skupine zvýšená aj frekvencia cisárskych rezov (91 %) a incidencia gestačného hypertenzného ochorenia – preeklampsie (3,4). Preeklampsia (PE) je závažné multifaktoriálne ochorenie objavujúce sa počas tehotenstva. Medzi hlavné prejavy PE patrí hypertenzia a proteinúria vzniknutá počas tehotenstva. Aj napriek vysokej incidencii (5 až 8 prípadov na 100 tehotenstiev), PE nemá ani v dnešnej dobe efektívnu liečbu, či markery pre včasnú diagnostiku. Vznik PE je spojený s nesprávnym formovaním placenty a je druhou najčastejšou príčinou úmrtia gravidných žien (5).

Prečo tehotné ženy?

Homeostáza organizmu je počas tehotenstva udržiavaná širokým spektrom hemodynamických, imunologických a metabolických adaptácií, ktoré môžu vytvoriť predispozíciu na infekciu SARS-CoV-2 (6). SARS-CoV-2 sa dostáva do bunky interakciou s receptorom nazývaným angiotenzín konvertujúci enzým 2 (ACE2), ktorý je počas fyziologického tehotenstva upregulovaný. Enzým ACE2 zohráva dôležitú úlohu pri konverzii angiotenzínu I na angiotenzín (1-9) a angiotenzínu II na angiotenzín (1-7), ktorý má vazodilatačný, antitrombotický a protizápalový účinok. Hormonálny profil zdravého tehotenstva je charakterizovaný zvýšením všetkých komponentov renín-angiotenzín-aldosterónového systému (RAAS), ktorého regulátorom je aj spomínaný ACE2. Tento fenomén zvyšuje množstvo receptorov ACE2 na povrchu buniek, a teda aj zvyšuje pravdepodobnosť, že tehotná žena bude infikovaná vírusom SARS-CoV-2. Zaujímavé je, že po vniknutí vírusu do bunky je prítomnosť ACE2 znížená jeho degradáciou klatrínom sprostredkovanou endocytickou dráhou. Tento dej má za následok zníženú produkciu angiotenzínu (1-7), a tak aj zníženú vazodilataciu, za ktorú je tento peptid zodpovedný. Infekcia endoteliálnych buniek vírusom SARS-CoV-2 je špecifická aj dysfunkciou endotelu, a tak vytvorenou predispozíciou k neskoršej vazokonstrikcii, zápalu alebo trombóze (7).

Preeklampsia je gestačné hypertenzné ochorenie, ktoré sa prejavuje po 20. gestačnom týždni a sprevádza ho proteinúria. Medzi tehotnými ženami s ochorením COVID-19 a ženami s PE je viacero podobností v symptomatológii. Pri ochorení COVID-19 je často prítomné zvýšenie krvného tlaku, poškodenie pečene či obličiek a poškodenie endotelu, čo môže mať za následok proteinúriu. Tieto prekrývajúce sa prejavy môžu spôsobiť diagnostickú dilemu, ktorá by mohla ohroziť matku aj dieťa. V súčasnosti je jediným riešením PE a jej symptómov pôrod. Mendoza a kol. vo svojej práci tvrdia, že u tehotných žien s ťažkým typom COVID-19 sa môže rozvíjať tzv. preeklampsii podobný syndróm. Ide o stav, kedy symptómy pacientky napodobňujú symptómy PE, avšak bez abnormálnej placentácie. Túto hypotézu podporuje aj fakt, že u väčšiny žien v tejto štúdii (4 z 5), PE podobné symptómy vymizli ešte pred pôrodom, čo sa v prípade pravej PE nedeje (2).

Pomoc pri vyriešení tejto diagnostickej dilemy by mohlo priniesť rutinné použitie metódy predstavenej v práci Zeislera a kol., ktorý navrhuje detegovanie pomeru rozpustnej tyrozín kinázy-1 podobnej fms (sFlt-1) a placentárneho rastového faktoru (PlGF) pre presnejšiu diagnostiku PE (8).

Záver

Ťažký priebeh ochorenia COVID-19 u tehotnej ženy môže napodobniť preeklampsiu pri použití základných diagnostických metód preeklampsie. Tento fenomén je obzvlášť nebezpečný, keďže niektoré prípady COVID-19 a PE môžu vyžadovať protichodné spôsoby manažmentu. Potenciálna potreba vyvolávania predčasného pôrodu si môže vyžadovať fetálnu maturáciu

podávaním kortikosteroidov. Pričom by tento postup mohol mať možný negatívny efekt na pacientov s COVID-19. Určenie pomeru sFlt-1 a PlGF je v súčasnosti jedna z najpresnejších metód na potvrdenie PE a mala by byť použitá pri diagnostike tohto ochorenia. Počet COVID-19 prípadov neustále narastá a s nimi pravdepodobne rastie aj počet preeklampsii podobných prípadov, čo iba podčiarkuje súrnosť zavedenia spoľahlivej metódy na vyriešenie týchto diagnostických dilem.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky (MZSR 2018/40-LFUK-14), ako aj Ministerstvu školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky (VEGA 1/0168/18).

Literatúra

1. **Wu Z, McGoogan JM.** Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 23(13):1239-1242.
2. **Mendoza M, Garcia-Ruiz I, Maiz N, Rodo C, Garcia-Manau P, Serrano B, Lopez-Martinez RM, Balcells J, Fernandez-Hidalgo N, Carreras E, Suy A.** Preeclampsia like syndrome induced by severe COVID-19: a prospective observational study. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 2020; 127(11):1374-1380.
3. **Zaigham M, Andersson O.** Maternal and perinatal outcomes with COVID-19: a systematic review of 108 pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2020;99(7):823-829.
4. **Di Mascio D, Khalil A, Saccone G, Rizzo G, Buca D, Liberati M, Vecchiet J, Nappi L, Scambia G, Berghella V, D'Antonio F.** Outcome of coronavirus spectrum infections (SARS, MERS, COVID-19) during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;2(2):100107.
5. **Carty, D.M., Delles, C., Dominiczak, A.F.** Preeclampsia and future maternal health. *J Hypertens*. 2010; 28(7):1349-1355.
6. **Nath KA.** In the Limelight: August 2020. *Mayo Clinic Proceedings*. 2020; 95(8):1559-1561.
7. **Narang K, Enninga EAL, Gunaratne MDSK, Ibiroga ER, Trad ATA, Elrefaei A, Theiler RN, Ruano R, Szymanski LM, Chakraborty R, Garovic VD.** SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 During Pregnancy: A Multidisciplinary Review. *Mayo Clin Proc*. 2020;95(8):1750-1765.
8. **Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, Olovsson M, Brennecke SP, Stepan H, Allegranza D, Dilba P, Schoedl M, Hund M, Verlohren S.** Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med*. 2016;374(1):13-22.

III. KARDIOLÓGIA

ADIPOKÍNY A ICH ÚLOHA V PATOGENÉZE ATEROSKLERÓZY U DIABETICKÝCH PACIENTOV

(Adipokines and their role in the pathogenesis of atherosclerosis
in diabetic patients)

Horváthová Martina

*Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2,
811 08 Bratislava; martina.horvathova@fmed.uniba.sk*

Súhrn

Diabetes mellitus (DM) je nevyliciteľné ochorenie často sprevádzané rôznymi diabetickými komplikáciami, ktoré sú príčinou zvýšenej chorobnosti a úmrtnosti diabetických pacientov. Kardiovaskulárne ochorenia (KVO) sa považujú za najčastejšiu príčinu smrti diabetikov. Riziko vzniku KVO je u diabetikov 2x až 4x vyššie ako u bežnej populácie. Hlavnou príčinou KVO je endotelová dysfunkcia, ktorá sa následne vyvíja do aterosklerózy. Diabetes mellitus je ochorenie, ktoré sa spája nielen so zvýšeným oxidačným stresom, ale aj s aktiváciou zápalových procesov, a spoločne sa uplatňujú v patogenéze aterosklerózy. Významnú úlohu v zápalových procesoch zohráva tukové tkanivo a adipokíny.

Kľúčové slová

ateroskleróza, zápal, tukové tkanivo, adipokíny, diabetes mellitus

Summary

Diabetes mellitus (DM) is an unhealthy disease often accompanied by various diabetic complications that are the cause of increased morbidity and mortality in diabetic patients. Cardiovascular diseases (CVD) are considered the most common cause of death in diabetic patients. The risk of CVD is 2 to 4 times higher in diabetic patients than in the normal population. The main cause of CVD is endothelial dysfunction, which subsequently develops into atherosclerosis. Diabetes mellitus is a disease that is associated not only with increased oxidative stress but also with the activation of inflammatory processes, and they are together applied in the pathogenesis of atherosclerosis. Adipose tissue and adipokines play an important role in inflammatory processes.

Keywords

atherosclerosis, inflammation, adipose tissue, adipokines, diabetes mellitus

Úvod

Diabetes mellitus (DM) je nevyliciteľné ochorenie často sprevádzané rôznymi diabetickými komplikáciami, ktoré sú príčinou zvýšenej chorobnosti a úmrtnosti diabetikov. Kardiovaskulárne ochorenia (KVO) sa považujú za najčastejšiu príčinu smrti diabetikov. Riziko vzniku KVO je u diabetikov 2x až 4x vyššie ako u bežnej populácie (1). Hlavnou príčinou KVO je endotelová dysfunkcia, ktorá sa následne vyvíja do aterosklerózy. Diabetes

mellitus je ochorenie, ktoré sa spája nielen so zvýšeným oxidačným stresom, ale aj s aktiváciou zápalových procesov, a spoločne sa uplatňujú v patogenéze aterosklerózy (2).

Zápal je odpoveď imunitného systému na infekciu alebo poškodenie a zohráva významnú úlohu v patogenéze viacerých chronických ochorení, ako sú artritída, neurodegeneratívne a KVO. Zápal je prospešná reakcia, ktorá vedie k odstráneniu škodlivých faktorov a zabezpečuje obnovenie tkanivovej štruktúry a fyziologických funkcií. Ak zápal pretrváva, prechádza do chronického zápalu a spôsobuje nadmerné poškodenie tkaniva (3). Významnú úlohu v zápalových procesoch zohráva tukové tkanivo a adipokíny.

Adipokíny

Tukové tkanivo je komplexný orgán, ktorý neslúži iba ako zásobný orgán na uskladnenie TAG, ale má aj funkciu endokrinného orgánu a syntetizuje rôzne bioaktívne proteíny súhrnne nazývané adipokíny alebo adipocytokíny. Tukové tkanivo okrem preadipocytov a adipocytov obsahuje ešte aj monocyty/makrofágy.

Adipocyty prostredníctvom adipokínov komunikujú s ďalšími orgánmi v tele (mozog, pečeň, β -bunky pankreasu) a účinkujú na autokrinnej, parakrinnej a endokrinnej úrovni. Zabezpečujú predovšetkým reguláciu metabolických, imunitných a zápalových procesov za fyziologických aj patologických podmienok. Ďalej sa podieľajú na lipidovom metabolizme, metabolizme glukózy, regulácii krvného tlaku, inzulínovej citlivosti a angiogenéze. Narušená regulácia syntézy adipokínov v tukovom tkanive vedie k vzniku chronického zápalu, ktorý sa uplatňuje v patogenéze viacerých ochorení, ako je ateroskleróza, hypertenzia a DM 2. typu. Medzi adipokíny syntetizované v tukovom tkanive patrí adiponektín, leptín, rezistín a ďalšie cytokíny – TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ (4 - 7).

Adiponektín

Adiponektín je 30-kDa proteín, ktorý sa syntetizuje predovšetkým v tukovom tkanive, ale tvorí sa tiež v pečeni, obličkách, slezine, kostrovom svalstve a kardiomyocytoch. Existuje v troch hlavných formách: trimér, hexamér a ako vysokomolekulárny (HMW – high molecular weight) oligomér. V plazme sa nachádza predovšetkým vo forme HMW oligoméru, ktorý je aj najúčinnjší.

Adiponektín účinkuje na cieľové tkanivá a orgány prostredníctvom svojich dvoch receptorov, ktoré sa označujú ako AdipoR1 a AdipoR2. Tieto receptory sú exprimované na rôznych bunkách (monocyty a makrofágy) a orgánoch (kostrové svalstvo, pečeň a tukové tkanivo). Po väzbe adiponektínu na tieto receptory sa aktivujú viaceré intracelulárne signálne dráhy – AMPK (AMP-activated protein kinase), PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor- α) a MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase). Adiponektín sa vyznačuje rôznorodými účinkami, predovšetkým však reguluje metabolizmus glukózy, má protizápalové a anti-aterogénne účinky.

Adiponektín znižuje hladinu glukózy v plazme viacerými mechanizmami. Predovšetkým prostredníctvom aktivácie AMPK zvyšuje inzulínovú citlivosť kostrového svalstva a vstrebávanie glukózy z plazmy. Ďalej znižuje tvorbu glukózy v pečeni prostredníctvom inhibície dvoch kľúčových enzýmov glukoneogenézy: fosfoenolpyruvát karboxykinázy a glukóza-6-P fosfatázy.

Viaceré experimentálne štúdie dokazujú, že adiponektín má protizápalové účinky. Prostredníctvom inhibície NF- κ B znižuje expresiu a syntézu viacerých prozápalových proteínov (adhezívne molekuly, „scavenger“ receptory, IL-6, IL-1 β , C-reaktívny proteín (CRP), IFN γ) a znižuje fagocytovú aktivitu makrofágov. Súčasne indukuje expresiu a sekréciu protizápalových proteínov (IL-10, IL-1RA (receptorový antagonistu)).

Adiponektín má však dôležitú úlohu aj v prevencii aterosklerózy. Anti-aterogénne účinky spočívajú predovšetkým v protizápalových účinkoch adiponektínu, schopnosti stimulovať

produkciu NO[•] a znižovať účinok proaterogénnych mediátorov (TNF- α , oxLDL). V endotelových bunkách znižuje tvorbu prozápalových cytokínov, chemokínov a znižuje ich schopnosť aktivovať sa pri pôsobení rôznych zápalových signálov. V makrofágoch znižuje expresiu tzv. „scavenger“ receptorov a potláča diferenciáciu makrofágov na penové bunky. Prostredníctvom stimulácie tvorby NO[•] podmieňuje vazodilatáciu, inhibuje agregáciu trombocytov, adhéziu leukocytov na povrch endotelových buniek a proliferáciu hladkých svalových buniek ciev.

Hladina adiponektínu v plazme negatívne koreluje s množstvom tukového tkaniva a u pacientov s inzulínovou rezistenciou, obezitou a DM 2. typu sa zistila jeho znížená koncentrácia. Hladina adiponektínu v plazme je regulovaná rôznymi mechanizmami. Na jednej strane je to hmotnosť organizmu a množstvo tukového tkaniva, keď nižšia telesná hmotnosť indukuje zvýšenú expresiu a sekréciu adiponektínu, a obezita naopak znižuje tvorbu adiponektínu. Expresia je výrazne inhibovaná aj účinkom prozápalových cytokínov (IL-6 a TNF- α), ktoré sú tvorené aj tukovým tkanivom. Preto sa u ľudí s obezitou pozoruje v dôsledku zvýšenej tvorby prozápalových cytokínov znížená hladina adiponektínu. Keďže adiponektín má predovšetkým protizápalové a anti-aterogénne účinky, jeho znížená hladina je rizikovým faktorom aterosklerózy a poukazuje na zvýšené riziko vzniku aterosklerózy a kardiovaskulárnych ochorení, predovšetkým u ľudí s obezitou, inzulínovou rezistenciou a DM 2. typu (5, 7 - 12).

Leptín

Leptín je 16-kDa peptid, ktorý je syntetizovaný predovšetkým v tukovom tkanive, ale v malom množstve sa tiež tvorí aj v placentе, žalúdku, kostrovom svalstve a kostnej dreni.

Leptín svoje účinky na cieľové tkanivá a orgány sprostredkúva prostredníctvom leptínového receptora (LepR), ktorý je exprimovaný na rôznych bunkách a tkanivách (hypotalamus, tukové tkanivo, pankreas). Leptín predovšetkým reguluje telesnú hmotnosť protredníctvom modulácie metabolických procesov a príjmu potravy, ale podieľa sa tiež na regulácii imunitných a zápalových procesov.

Hladina leptínu v plazme pozitívne koreluje s BMI (body mass index) a množstvom tukového tkaniva. Pri nadmernom príjme potravy sa leptín vylučuje do krvi a pôsobí na bunky v hypotalame, kde dáva signál na zníženie apetítu a zvýšenie výdaju energie. Zároveň reguluje metabolické procesy prostredníctvom inhibície anabolických dráh a aktivácie katabolických dráh.

Popri regulácii metabolických dráh má leptín významnú úlohu aj v zápalových procesoch. Na rozdiel od adiponektínu sa leptín vyznačuje prozápalovými účinkami. V makrofágoch stimuluje expresiu a sekréciu viacerých prozápalových cytokínov (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α), aktivuje chemotaxiu neutrofilných granulocytov a prostredníctvom zvýšenia RMO stimuluje fagocytovú aktivitu makrofágov a sekréciu prozápalových eikozanoidov.

Expresia leptínu nie je regulovaná iba príjmom potravy, ale aj rôznymi hormónmi a zápalovými mediátormi. Inzulín zvyšuje expresiu a sekréciu leptínu, glukokortikoidy naopak znižujú jeho hladinu v plazme. Expresia je stimulovaná aj viacerými prozápalovými cytokínmi (TNF- α , IL-6, IL-1 β), ktoré spôsobujú pozitívnu spätnú väzbu a podporujú vznik chronického zápalu. Hyperleptinémia sa pozoruje u ľudí s obezitou, inzulínovou rezistenciou a DM 2. typu a poukazuje na chronický zápal a zvýšené riziko vzniku aterosklerózy (5 – 7, 9, 13).

Tumor nekrotizujúci faktor- α

Tumor nekrotizujúci faktor- α (TNF- α) je cytokín, ktorý syntetizujú predovšetkým makrofágy v tukovom tkanive. Jeho expresia a syntéza v tukovom tkanive a kostrovom svalstve je výrazne zvýšená u obeznych ľudí, ako aj u ľudí s inzulínovou rezistenciou. Predpokladá sa, že TNF- α môže byť jedným z molekulárnych mechanizmov, ktoré sa podieľajú na vzniku inzulínovej rezistencie u ľudí s obezitou (10).

Interleukín-6

Interleukín-6 (IL-6) je prozápalový cytokín, ktorý popri iných účinkoch tiež môže ovplyvňovať inzulínovú citlivosť. IL-6 preukazuje zo všetkých adipokínov najsilnejšiu koreláciu s inzulínovou rezistenciou, ako aj s komplikáciami s ňou spojenými. Hladina IL-6 v plazme pacientov s obezitou a DM 2. typu je 2 až 3-krát vyššia v porovnaní so zdravými jedincami. Zvýšená hladina IL-6 sa vzťahuje na zvýšenú koncentráciu glukózy v plazme, zníženú glukózovú toleranciu a zníženú inzulínovú citlivosť (10).

Literatúra

1. **Shen GX.** Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88: 241-248.
2. **Cheung BMY, Li Ch.** Diabetes and hypertension: is there a common metabolic pathway? *Curr Atheroscler Rep* 2012; 14: 160-166.
3. **Ricciotti E, FitzGerald GA.** Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 986-1000.
4. **Hong SJ, Jin JP, Buck DW, Galiano RD, Mustoe TA.** Impaired response of mature adipocytes of diabetic mice to hypoxia. *Exp Cell Res* 2011; 317: 2299-2307.
5. **Carbone F, La Rocca C, Matares G.** Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* 2012; 94: 2082-2088.
6. **Matarese G, Procaccini C, De Rosa V.** At the crossroad of T cells, adipose tissue, and diabetes. *Imunol Rev* 2012; 249: 116-134.
7. **Miehle K, Stepan H, Fasshauer M.** Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin Endocrinol* 2012; 76: 2-11
8. **Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt CH, Blouin R, Bordignon V, Murphy BD, Palin MF.** Adiponectin action from head to toe. *Endocr* 2010; 37: 11-32.
9. **Moreno-Aliaga MJ, Lorente-Cebrián S, Martínez JA.** Regulation of adipokines secretion by n-3 fatty acids. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 324-332.
10. **Padilha HG, Crispim CA, Zimberg IZ, De-Souza DA, Waterhouse J, Tufik S, de-Mello MT.** A link between sleep loss, glucose metabolism and adipokines. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 992-999.
11. **Lin H, Li Z.** Adiponectin self-regulates its expression and multimerization in adipose tissue: A autocrine/paracrine mechanism? *Med Hypotheses* 2012; 78: 75-78.
12. **Villarreal-Molina MT, Antuna-Puente B.** Adiponectin: Anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie* 2012; 94: 2143-2149.
13. **Baban RS, Kasar KAK, Al-Karawi IN.** Fasting glucose to leptin ratio as a new diagnostic marker in patients with diabetes mellitus. *Oman Med J* 2010; 25: 269-275.

VPLYV AKÚTNEHO STRESU A NANOČASTÍC SPIONs NA ANTIOXIDAČNÝ STATUS SPONTÁNNÉ HYPERTENZNÝCH POTKANOV

(Effects of acute stress and SPIONs nanoparticles on antioxidative status in spontaneously hypertensive rats)

Laubertová Lucia¹, Dvořáková Monika¹, Bališ Peter², Žitňanová Ingrid¹, Bernátová Iveta²

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovenská republika, lucia.laubertova@fmed.uniba.sk

²Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Centrum experimentálnej medicíny SAV, Sienkiewiczova 1, 813 71 Bratislava, Slovenská republika

Súhrn

Superparamagnetické nanočastice oxidov železa (SPIONs) sú súčasťou rôznych biomedicínskych a klinických aplikácií. Niekoľko štúdií ukázalo, že podávanie nanočastíc oxidov železa môže zvýšiť oxidačný stres. Interakcie medzi nimi sa však zriedka študovali a to najmä v podmienkach akútneho stresu. Keďže oxidačný stres zohráva významnú úlohu v patogenéze viacerých ochorení, je preto potrebné dôkladne poznať všetky mechanizmy, ktoré úzko súvisia s používaním nanočastíc v medicínskych aplikáciách. Táto štúdia bola navrhnutá za účelom sledovania vplyvu akútneho stresu a SPIONs na antioxidačný status spontánne hypertenzných potkanov (SHR). Antioxidačný status bol sledovaný pomocou stanovenia antioxidačnej kapacity plazmy.

Kľúčové slová

akútny stres, superparamagnetické nanočastice oxidov železa, SPIONs, antioxidačný status, hypertenzia

Summary

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) can be used in various biomedical and clinical applications. Several studies have shown that the administration of iron oxide nanoparticles may trigger oxidative stress. However, the interactions between them have rarely been studied, especially under the condition of acute stress. Because oxidative stress plays a critical role in the pathophysiology of several diseases and disorders, therefore it is necessary to understand thoroughly all the mechanisms that are closely related to the use of nanoparticles in medical applications. This study was designed to investigate the effect of acute stress and SPIONs on antioxidative status in spontaneously hypertensive rats (SHR). Antioxidative status was studied by determination of antioxidant capacity in plasma.

Keywords

acute stress, superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs, antioxidative status, hypertension

Úvod

Nanočastice oxidov železa sú v posledných rokoch objektom viacerých výskumov, najmä kvôli ich vlastnostiam využiteľným v biomedicíne. V biomedicínskych aplikáciách sa používajú najčastejšie ako kontrastné látky pri magnetickej rezonancii. Avšak v súčasnosti sa uvažuje aj o ich využití pri liečbe nádorových ochorení a cielenom transporte liečiv. Problém pri začlenení rôznych typov nanočastíc oxidov železa do biomedicínskych aplikácií môže predstavovať ich potenciálna toxicita súvisiaca najmä s oxidačným stresom (1).

Pojem oxidačný stres je často spájaný s viacerými biochemickými, fyziologickými a patofyziologickými dejmi. Oxidačný stres je často definovaný ako nerovnováha medzi oxidantmi a antioxidantmi. Za normálnych podmienok je v organizme resp. bunke ustálená rovnováha medzi aktivitou ako aj množstvom oxidantov a antioxidantov (2).

Toxicita nanočastíc je najčastejšie prisudzovaná najmä ich schopnosti prispievať k tvorbe reaktívnych zlúčenín kyslíka (ROS) (3). Zvýšený oxidačný stres, a s tým súvisiaci znížený antioxidačný status, je kľúčovým hráčom v patogenéze diabetes mellitus, ako aj kardiovaskulárnych ochorení vrátane hypertenzie (4).

Superparamagnetické nanočastice oxidov železa (SPIONs) vďaka ich fyzikálno-chemickým vlastnostiam, majú veľký potenciál byť súčasťou biomedicínskych aplikácií. Superparamagnetické nanočastice oxidov železa (SPIONs) sú syntetické častice maghemitu (γ -Fe₂O₃) alebo magnetitu (Fe₃O₄) s veľkosťou jadra medzi 10 nm a 100 nm, pričom magnetit je zmesou oxidov FeO a Fe₂O₃. Tieto magnetické nanočastice sú obalené polyetylénglykolom (PEG), ktorý zabezpečuje ich fyzikálno-chemickú stabilitu a biokompatibilitu, zlepšuje ich distribúciu a znižuje ich vychytávanie mononukleárnym fagocytárnym systémom (5).

Našou úlohou bolo sledovať vplyv akútneho stresu a superparamagnetických nanočastíc oxidov železa (SPIONs) na antioxidačný status spontánne hypertenzných potkanov (SHR).

Materiál a metódy

Laboratórne zvieratá

Pri štúdií boli použité spontánne hypertenzné potkany (SHR - spontaneously hypertensive rats) a normotenzné potkany (WKY, Wistar Kyoto) z firmy Velaz s.r.o., Česká republika. Potkany Wistar-Kyoto (WHY) boli použité ako kontrola reprezentujúca rozdielny vplyv fenotypu na sledovaný parameter. Išlo o SHR a WKY zvieratá vo veku 12 až 16 týždňov. Kŕmené boli granulovaným krmivom vyrábaným firmou Altromin, konkrétne zmesou 1320-variant P, so zníženým obsahom fytoestrogénov, s obsahom železa 192,51 mg/kg zmesi a mali voľný a neobmedzený prístup ku krmivu a vode. Potkany boli držané v štandardných podmienkach s pravidelným striedaním svetla a tmy (12/12 h). Všetky potkany mali implantované katétre do karotickej artérie pre meranie krvného tlaku a do jugulárnej vény pre infúzne podávanie nanočastíc vo fyziologickom roztoku alebo samotného fyziologického roztoku. Kanylácia bola urobená v celkovej anestéze izofluranom (3%) deň pred samotným experimentom, v prítomnosti látky meloxicam (2 mg/kg hmotnosti tela) na prevenciu pooperačnej bolesti. Všetky experimenty boli schválené štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR.

Model akútneho stresu

Akútny stres bol u laboratórnych zvierat navodený metódou air-jet (prúd vzduchu do hornej časti hlavy potkana) podľa modifikovaného protokolu (6). V našich pokusoch sme použili 5 s prúd vzduchu 10 min pred, 10 a 75 min po podaní SPIONs.

Testované nanočastice

Superparamagnetické nanočastice oxidov železa (SPIONs) (Sigma-Aldrich, UK) boli pokusným zvieratám podávané intravenózne počas 10 min infúzie do jugulárnej vény. Nanočastice magnetitu (Fe₃O₄) o veľkosti jadra 30 nm (1mg Fe/ml) boli obalené

biokompatibilným obalom z polyetylénglykolu. Po 100 minútach od ich podania bola zvieratám odobraná krv a následne boli zvieratá dekapitované v bezvedomí po krátkej narkóze CO₂.

Rozdelenie laboratórnych zvierat a dizajn experimentu

V každej testovanej skupine bolo 6 - 8 laboratórnych zvierat. Podrobný dizajn experimentu je uvedený v Tabuľke 1.

Rozdelenie laboratórnych zvierat:

WKY-Kontrola – potkanom bol infundovaný iba fyziologický roztok

SHR-Kontrola – potkanom bol infundovaný iba fyziologický roztok

SHR-Stres – potkanom bol infundovaný fyziologický roztok a boli vystavené akútnemu stresu

SHR-SPIONs – potkanom boli infundované SPIONs v dávke 1 mg/kg telesnej hmotnosti

SHR-SPIONs + stres – potkanom boli infundované SPIONs v dávke 1 mg/kg telesnej hmotnosti a boli vystavené akútnemu stresu

Skupina	Stabilizácia 20-30 min	5 s	Stabilizácia 10 min	10 min i.v. infúzia	Stabilizácia 10 min	5 s	Stabilizácia 70 min	5 s	Stabilizácia 10 min
Kontrola				Fyziol. roz.					
Stres		Air-jet		Fyziol. roz.		Air-jet		Air-jet	
SPIONs				SPIONs					
SPIONs+ Stres		Air-jet		SPIONs		Air-jet		Air-jet	

Tab. 1 Dizajn experimentu

Stanovenie antioxidačnej kapacity TEAC metódou

Stanovenie celkovej antioxidačnej kapacity metódou TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) je založené na schopnosti hydrofilných, ale aj lipofilných antioxidantov eliminovať stabilný ABTS radikálový kation (ABTS^{•+}). Modro-zelený radikálový kation (ABTS^{•+}) je produkovaný počas reakcie ABTS (2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát)) a persíranu draselného K₂S₂O₈ vo vode. Pridaním antioxidantov k vytvorenému radikálu ABTS^{•+} dochádza k jeho redukcii na ABTSH. Množstvo zredukovaného ABTSH je závislé od času pôsobenia, antioxidačnej aktivity a koncentrácie antioxidantov. Stupeň redukcie ABTS^{•+} radikálového kationu sme vyjadrili ako percento inhibície, dané koncentráciou antioxidantov a časom ich pôsobenia, vzťahnuté k aktivite troloxu použitého ako štandard pri vlnovej dĺžke 734 nm (7).

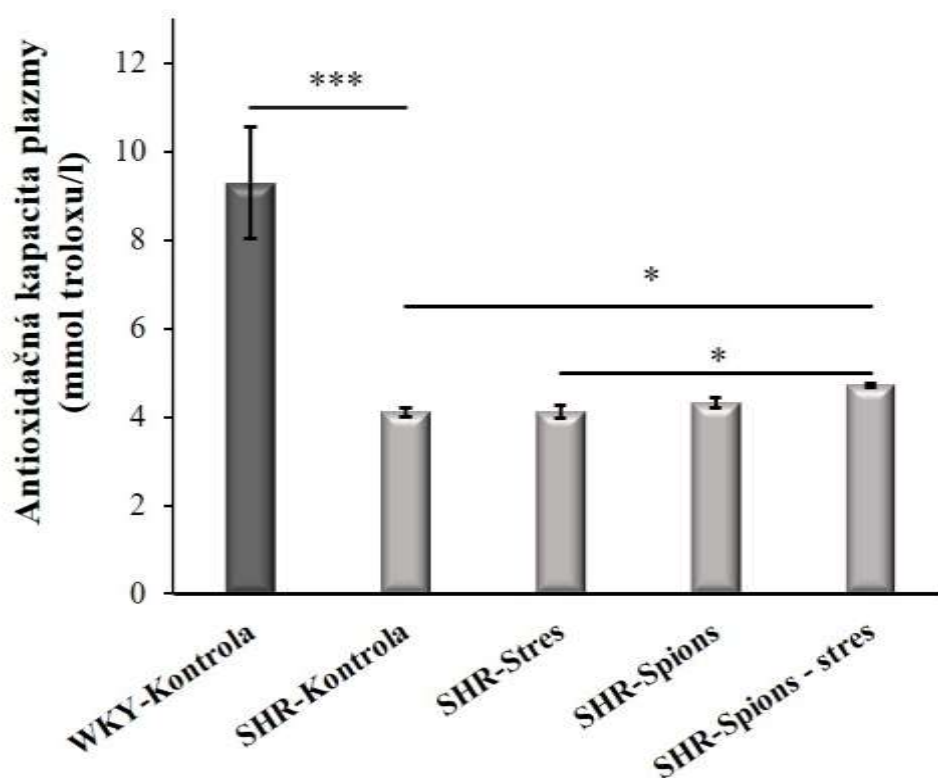
Štatistická analýza

Výsledky sú uvedené ako priemer ± stredná chyba priemeru (SEM). Štatistické testy boli vykonané pomocou štatistického programu IBM SPSS Statistic 22. Normalitu nameraných dát sme posudzovali pomocou Shapiro-Wilkovho testu. Údaje boli analyzované pomocou parametrického One-way ANOVA testu s použitím Tukey post hoc testu. Hladina významnosti bola definovaná ako P < 0,05.

Výsledky

Pomocou TEAC metódy sme sledovali vplyv akútneho stresu a superparamagnetických nanočastíc oxidov železa (SPIONs) na antioxidačný status plazmy spontánne hypertenzných

potkanov (SHR) (Obrázok 1). Ako kontrolu na porovnanie rozdielov v antioxidačnej kapacite plazmy u normo- a hypertenzných potkanov sme použili kontrolnú skupinu normotenzných potkanov Wistar-Kyoto (WHY), pričom sme zistili signifikantné rozdiely v antioxidačnej kapacite medzi týmito fenotypmi. Porovnaním všetkých skupín hypertenzných potkanov (SHR) navzájom sme zistili, že samotný krátkodobý akútny stres, ani samotné podávanie superparamagnetických nanočastíc oxidov železa (SPIONs) nemalo vplyv na antioxidačnú kapacitu. Signifikantné zvýšenie antioxidačnej kapacity plazmy sme zaznamenali pri porovnaní skupín SHR-kontrola ako aj SHR-stres so skupinou SHR-SPIONs-stres.



Obr. 1 Vplyv akútneho stresu a superparamagnetických nanočastíc oxidov železa (SPIONs) na antioxidačný status plazmy spontánne hypertenzných potkanov (SHR) a normotenzných potkanov (WKY). WKY/SHR - Kontrola – potkanom bol infundovaný iba fyziologický roztok. SHR-Stres – potkanom bol infundovaný fyziologický roztok a boli vystavené akútnemu stresu. SHR-SPIONs – potkanom boli infundované SPIONs v dávke 1 mg/kg telesnej hmotnosti. SHR-SPIONs + stres – potkanom boli infundované SPIONs v dávke 1 mg/kg telesnej hmotnosti a boli vystavené akútnemu stresu. Hodnoty sú udané ako priemer $\pm$ SEM. * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$.

Diskusia

Hypertenzia je hlavným rizikovým faktorom pre viaceré vážne kardiovaskulárne komplikácie vrátane infarktu myokardu, zlyhania srdca, mŕtvce, ochorenia periférnych artérií a je príčinou chronického ochorenia obličiek. Práve oxidačný stres si získal pozornosť ako jeden zo základných mechanizmov zodpovedných za hypertenziu. Reaktívne formy kyslíka (ROS) majú dôležitú úlohu v homeostáze cievnej steny, a preto by mohli prispievať k mechanizmu vzniku a rozvoju hypertenzie (4). Preto je dôležité sa v prevencii ako aj liečbe hypertenzie zamerať na zníženie vplyvu oxidačného stresu a elimináciu jeho vzniku.

Superparamagnetické nanočastice oxidov železa SPIONs sú v súčasnosti často študované v rôznych biologických systémoch. Dávka nanočastíc SPIONs podávaných laboratórnym zvieratám (1mg /kg hmotnosti) bola podobná dávkam, ktoré sa používajú v klinickej praxi. Kombinácia s akútnym stresom bola zvolená najmä preto, že stres môže výrazne ovplyvňovať

antioxidačný status organizmu. Zároveň je známe, že pacienti sú počas intravenózneho aplikácie nanočastíc, ako aj v dôsledku svojho ochorenia, tak aj samotného vyšetrenia vystavení stresu, ktorý následne môže ovplyvniť fyziologické a biochemické procesy v organizme (8).

Použitím kontrolnej normotenznej skupiny potkanov WKY sa nám podarilo porovnať antioxidačný status normo- a hypertenzných potkanov. Pozorovali sme významné zníženie antioxidačnej kapacity plazmy spontánne hypertenzných potkanov SHR, pričom toto zistenie nám potvrdilo správnosť použitia oboch fenotypov na štúdium vplyvu akútneho stresu a superparamagnetických nanočastíc oxidov železa SPIONs na antioxidačný status potkanov.

Zistili sme, že samotný akútny stres, ako aj samotné podávanie nanočastíc SPIONs, nevyvolali významné zmeny v antioxidačnej kapacite plazmy SHR potkanov. Vplyv akútneho stresu, ako aj podávanie nanočastíc SPIONs je závislé od viacerých faktorov. Jedným z faktorov je dĺžka pôsobenia, či už akútneho stresu alebo nanočastíc SPIONs (9). Predpokladáme, že akútny stres sa vzhľadom k jeho krátkemu času pôsobenia nestihol prejaviť zmenami v antioxidačnom stave potkanov. Viaceré štúdie zistili, že aj dĺžka expozície nanočasticami je veľmi podstatným faktorom (10). Okrem tohto faktoru zohráva podstatnú úlohu použitá koncentrácia a stabilita použitých nanočastíc, ako aj stabilita ich povrchov (11).

Na druhej strane, kombinácia akútneho stresu s podaním nanočastíc SPIONs (skupina SHR-SPIONs-stres) vyvolala významné zvýšenie antioxidačnej kapacity plazmy SHR potkanov v porovnaní s SHR-kontrolnou skupinou (SHR-Kontrola), ako aj SHR-skupinou vystavenou akútnemu stresu (SHR-Stres). Predpokladáme, že zvýšenie antioxidačnej kapacity bolo spôsobené aktiváciou antioxidačných obranných systémov indukovaných práve spolupôsobením akútneho stresu a nanočastíc SPIONs. Naše výsledky potvrdzujú zistenia viacerých *in vivo* a *in vitro* štúdií, ktoré popisovali nízku mieru toxicity rôznych typov nanočastíc oxidov železa (12-15). Tieto výsledky ponúkajú nové otázky ohľadne mechanizmu pôsobenia, ako aj dlhodobiejšieho vplyvu testovaných nanočastíc na organizmus, ktoré majú veľký potenciál byť súčasťou biomedicínskych aplikácií.

Podakovanie

Táto práca vznikla na základe finančnej podpory grantu APVV-16-0263.

Literatúra

1. **Wilkinson K, Ekstrand-Hammarstrom B, Ahlinder L, Guldevall K a kol.** Visualization of custom-tailored iron oxide nanoparticles chemistry, uptakes, and toxicity. *Nanoscale* 2012; 4: 7383-7393.
2. **Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard J, Lorgis L, Cottin Y a kol.** Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacology and Therapeutics* 2013; 140: 239-257.
3. **Manke A, Wang L, Rojanasakul Y.** Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int* 2013; 2013:942916.
4. **Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M.** Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J Res Med Sci* 2014; 19(4): 358–367.
5. **Wahajuddin A, Arora S.** Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomed* 2012; 7: 3445-3471.
6. **Nakamoto M, Ohya A, Sakima A, Yamazato M, Takishita S.** Azelnidipine attenuates cardiovascular and sympathetic responses to air-jet stress in genetically hypertensive rats. *Hypertens Res* 2007; 30: 359-366.
7. **Re R, Pellegrini N, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1991; 26: 1231-1237.

8. **Stefánsson BV, Haraldsson B, Nilsson U.** Acute oxidative stress following intravenous iron injection in patients on chronic hemodialysis: a comparison of iron-sucrose and iron-dextran. *Nephron Clin Pract* 2011;118(3):c249-c256.
9. **Airapetyants M.** Involvement of cerebral hypoxia in the pathogenesis of neuroses. A new concept. *Zh Vyssh Nerv Deyat* 1997; 47: 412-416.
10. **Park Y, Smith J, Pham T, Whitaker R, Sucato C, Hamilton J, et al.** Effect of PEG molecular weight on stability, T2 contrast, cytotoxicity, and cellular uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014; 119: 106-114.
11. **Naqvi S, Samim M, Abdin M, Ahmed FJ, Maitra A, Prashant C, Dinda AK.** Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int J Nanomedicine* 2010; 16(5):983-9.
12. **Jeng HA, Swanson J.** Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2006;41:2699–711.
13. **Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ.** In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro.* 2005;19:975–83.
14. **Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW a kol.** Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol Sci.* 2006;89:338–47.
15. **Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Moller L.** Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett.* 2009;188:112–18.

OMEGA-3 MASTNÉ KYSELINY A KARDIOVASKULÁRNE OCHORENIA

(Omega-3 fatty acids and cardiovascular diseases)

Sedlák Martin, Žitňanová Ingrid

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, ingrid.zitnanova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Táto práca popisuje dôležitý protizápalový, kardio- a neuroprotektívny potenciál omega-3 mastných kyselín (MK) a zároveň ich dôležitý regulačný vplyv na lipidový metabolizmus. V práci podrobne sumarizujeme závery observačných štúdií, ktoré na veľkom množstve pacientov dospeli k výsledkom, ktoré jednoznačne indikujú protektívny a preventívny vplyv omega-3 MK na rozvoj neurokognitívnych a kardio – cerebro – vaskulárnych ochorení. Tieto výsledky konfrontujeme s realizovanými klinickými štúdiami, na základe čoho spresňujeme postavenie suplementácie týmito významnými bioaktívnymi látkami v terapii rôznych ochorení. Taktiež sa venujeme možnostiam ďalšieho výskumu a navrhujeme, na ktoré aspekty by sa mohli v budúcnosti odborné štúdie zamerať.

Kľúčové slová

omega-3 mastné kyseliny, kardiovaskulárne ochorenia, infarkt myokardu, cievna mozgová príhoda

Summary

This article describes the important anti-inflammatory, cardio- and neuroprotective potential of omega-3 fatty acids (FA) and also their important regulatory effects on lipid metabolism. In this article we summarize the results of observational studies, which in a large number of patients have reached results that clearly indicate a protective and preventive effect of omega-3 FA on the development of neurocognitive and cardio - cerebrovascular diseases. We confront these results with realized clinical studies, based on which we specify the position of supplementation with these important bioactive substances in the therapy of various diseases. We also look at the possibilities of further research and suggest which aspects could be the focus of professional studies in the future.

Keywords

omega-3 fatty acids, cardiovascular disease, myocardial infarction, stroke

Úvod

Kardiovaskulárne ochorenia patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce chronické ochorenia v starobe. Dôležitú úlohu v ochrane organizmu pred rozvojom týchto ochorení hrajú aj omega-3 mastné kyseliny (MK). Obzvlášť zaujímavou metabolickou dráhou je premena EPA (kyselina eikozapentaénová) a DHA (kyselina dokozahexaénová) pomocou enzýmu cyklooxygenázy. Metabolickou kaskádou vznikajú z týchto kyselín látky nazývané špecializované proresolvíny (specialized proresolving mediators), kam patria resolvíny, maresíny

a protektíny (1). Tieto metabolity majú antiinflamačné účinky, zabráňujú prechodu akútneho zápalu do chronickej fázy, zvyšujú klírens imunitných buniek zo zápalového ložiska, inhibujú aktiváciu NF- κ B a pôsobia protektívne na kardiomyocyty a steny ciev, čím znižujú riziko rozvoja patologických zmien spoluzodpovedných za vznik srdcových a cievnych ochorení (1, 2).

Omega-3 mastné kyseliny a infarkt myokardu

Vedúcou príčinou rozvoja kardiovaskulárnych komplikácií je ateroskleróza, ktorá môže viesť k vzniku ischemickej choroby srdca. Tá môže byť komplikovaná akútnym infarktom myokardu až srdcovým zlyhávaním. Veľmi dôležitú úlohu zohrávajú omega-3 MK v redukcii hladín TAG, ktoré majú pri vysokých hodnotách proaterogénny efekt (3). Taktiež zvyšujú hladiny HDL-cholesterolu, ktoré pôsobia antiaterogénne, čo dokázala najmä štúdia EVOLVE (4). Z výsledkov tejto štúdie tiež vyplýva, že omnoho signifikantnejšie zvyšujú hladiny LDL-cholesterolu, čo môže pôsobiť naopak proaterogénne. Avšak dostatočný prísun omega-3 mastných kyselín nemá protektívny efekt na kardiovaskulárnu morbiditu a mortalitu iba vďaka úprave sérových lipidov, ale aj prostredníctvom aditívneho pôsobenia na kardiovaskulárny systém (2, 3).

Dôležité zistenia o význame omega-3 mastných kyselín priniesla metaanalýza (5), ktorá hodnotila benefit konzumácie rybieho mäsa v porovnaní s rizikom otráv ťažkými kovmi, ktoré sa môžu potenciálne akumulovať v morských živočíchoch. Autori konštatujú, že konzumácia 2 porcií rýb týždenne viedla k redukcii celkovej mortality o 17% a k redukcii mortality na akútne koronárne syndrómy o 36%. Japonská prospektívna štúdia (6) skúmala na veľkom počte jedincov vplyv dostatočného príjmu omega-3 MK v podobe rýb na kardiovaskulárnu mortalitu. Japonsko je krajina s jednou z najvyšších očakávaných dĺžok života a je tiež známe vysokou mierou konzumácie morských plodov a rýb. Autori prišli k záveru, že štvrtina participantov s najvyšším príjmom omega-3 MK s dlhým a veľmi dlhým reťazcom mala o 20% nižšie riziko úmrtia na kardiovaskulárne ochorenie.

Ešte sľubnejšie výsledky priniesla štúdia (7), ktorá sledovala multietnickú populáciu v USA a hodnotila množstvo a zastúpenie omega-3 a omega-6 MK v plazme a pomocou dotazníka zisťovala týždenný príjem potravín s rôznym obsahom týchto látok. Prvým zistením bolo, že štvrtina pacientov s najvyšším príjmom mala aj najvyšší obsah plazmatických omega-3 MK. Štúdia rozdelila pacientov na štvrtiny podľa množstva a zastúpenia jednotlivých omega-3 MK a štvrtina ľudí s najvyššími hladinami EPA v plazme mala o 51% nižšie riziko kardiovaskulárnej mortality na koronárne syndrómy oproti štvrtine s najnižšími hladinami a štvrtina s najvyššími hladinami DHA mala až o 61% nižšie riziko oproti štvrtine s najnižšími hladinami.

Metaanalýza viacerých randomizovaných štúdií (8) poukázala na fakt, že suplementácia rybím olejom viedla k redukcii kardiálnej mortality o 9%, hoci sa nepreukázal priaznivý vplyv suplementácie na riziko vzniku infarktu myokardu, ani náhlej cievnej mozgovej príhody. Ďalšia metaanalýza (9) nepreukázala dokonca žiadny benefit suplementácie omega-3 MK. Na druhej strane klinická štúdia DART (10) randomizovala pacientov po prekonanom infarkte myokardu na 2 skupiny: skupinu s „mediteránnou“ diétou bohatou na zeleninu a morské plody a na skupinu s tzv. „západnou“ diétou bohatou na nasýtené tuky a sacharidy. Skupina s mediteránnou diétou mala až o 73% nižšie riziko kardiovaskulárneho úmrtia oproti druhej skupine. Prehľadové články (2, 11) sa zaoberajú možnosťami, prečo boli výsledky uvedených metaanalýz a štúdií také inkonzistentné. Ako možné dôvody boli identifikované: súbežne užívaná antihypertenzívna medikácia (najmä ACEi a betablokátory), antiarytmická liečba či terapia statínmi, poprípade rôzne dávkovanie suplementov. Ako dôležitý krok do budúcnosti by bolo treba uskutočniť kvalitne dizajnovanú a placebom kontrolovanú štúdiu s dávkou EPA a DHA aspoň 4g denne, aby sa falošne negatívne výsledky nevyskytli v dôsledku poddávkovania.

Omega-3 masné kyseliny a srdcové zlyhávajú

Vďaka zvyšujúcej sa incidencii a prevalencii a taktiež kvôli výraznému vplyvu na kvalitu života sa téme srdcového zlyhávajú venuje mnoho prác. Prínos omega-3 MK bol dokumentovaný viacerými observačnými štúdiami a staršími aj novými klinickými štúdiami. Pre pomerne priaznivé výsledky dokonca AHA (American Heart Association) a ESC (European Society of Cardiology) zahrnuli pravidelný a dostatočný prívod omega-3 MK do svojich odporúčaní pre terapiu chronického srdcového zlyhávajú (2).

Veľmi jednoznačné výsledky prináša prospektívna štúdia (12), ktorá porovnávala množstvo skonzumovaných rybích porcií vo vzťahu k rozvoju srdcového zlyhávajú. Ako kontrolnú skupinu si autori zvolili jedincov s menej ako jednou skonzumovanou porciou za mesiac. Skupina s 1 – 2 porciami týždenne mala o 20% nižšie riziko rozvoja srdcového zlyhávajú, skupina s 3 – 4 porciami týždenne o 31% nižšie riziko a skupina s 5 a viac skonzumovanými porciami o 32% nižšie riziko. K veľmi podobným výsledkom prišla druhá štúdia (13), ktorá porovnávala referenčnú skupinu (s konzumáciou rýb menej ako 1 krát za mesiac) so skupinami konzumujúcimi rôzne upravené rybie pokrmy (varené, dusené a vyprážané). Skupina, ktorá skonzumovala 5 a viac porcií varených alebo dusených rýb týždenne, mala o 30% nižšie riziko rozvoja srdcového zlyhávajú v porovnaní s kontrolnou skupinou. Avšak skupina konzumujúca vyprážané ryby mala o 48% vyššie riziko vzniku srdcového zlyhávajú oproti referenčnej skupine, čo znamená, že nie je jedno, v akej forme sa ryby konzumujú a najmä treba dbať na spôsob úpravy.

Prvou klinickou štúdiou zaoberajúcou sa suplementáciou omega-3 MK v súvislosti s úmrtnosťou na srdcové zlyhávajú bola GISSI – Heart Failure (14). Boli do nej zahrnutí pacienti s chronickým srdcovým zlyhávajú, pričom asi 40% z nich prekonal v minulosti infarkt myokardu. U pacientov suplementovaných 1g denne rybieho oleja došlo k poklesu mortality o 9% a k poklesu frekvencií hospitalizácií tiež o 9%. Nevýhodou tejto štúdie je nedostatočná dávka suplementácie, pričom tento nedostatok mohol maskovať inak veľmi priaznivé pôsobenie suplementácie na prežívanie. Ďalšia štúdia (15) nadväzovala na zistenia GISSI – Heart Failure, pričom objektivizovala vplyv suplementácie pomocou echokardiografických ukazovateľov funkcie ľavej komory. Pacienti v skúmanej aj v placebovej skupine dostávali štandardnú terapiu srdcového zlyhávajú. Ejekčná frakcia ľavej komory bola na začiatku priemerne 30% a počas 3 rokov sa každý rok sledovala jej hodnota. V prvom roku stúpila jej hodnota v suplementovanej skupine o 8,1% a v placebovej iba o 6,3%, v druhom roku v suplementovanej skupine o 11,1% a v placebovej o 8,2% a v treťom roku o 11,5% v suplementovanej skupine a o 9,9% v placebovej skupine. Vzostup ejekčnej frakcie aj v placebovej skupine bol zapríčinený priaznivým efektom štandardnej farmakologickej liečby srdcového zlyhávajú, pričom ale jasne badať trend, že suplementácia mala aditívny efekt na toto zlepšenie.

Omega-3 masné kyseliny a cievne mozgové príhody

Cievne mozgové príhody (či už ischemické alebo hemoragické) patria medzi veľmi významné príčiny smrti v populácii, rovnako tak sa významne podieľajú na miere disability, práceneschopnosti a zhoršenej kvalite života. Pre doposiaľ náročnú terapiu (v dôsledku úzkeho terapeutického časového okna) mnohí biomedicínski vedci začali skúmať možnosti zlepšenej prevencie, ktoré by zlepšili výsledok a zvýšili kvalitu života pacientov po prekonanom ikte (3). Už experimentálne štúdie poukázali na priaznivý vplyv EPA a DHA na reparáciu mozgového tkaniva po ischemickom ikte (16). V tejto práci autori skúmali vplyv omega-3 MK na mozgy myši po vyvolanom ikte. Dokázali, že EPA a DHA zvyšujú hladiny proangiogénneho faktora angiopoetínu 2 v astrocytoch, ktorý je dôležitý pre proliferáciu endotelových buniek a vytváranie nových ciev v mieste lézie. Štúdia ponúkla dôležitý dôkaz o možnosti terapeutického zásahu u pacientov s cievnu mozgovou príhodou.

V prehľadovom článku (2) autori konštatujú, že observačné prierezové, ani prospektívne štúdie nepreukázali efektivitu omega-3 MK na vznik, prevenciu, ani na zlepšenie prežívania po hemoragickej cievnej mozgovej príhode.

Veľmi dôležitú informáciu o vplyve omega-3 MK na kardiovaskulárnu mortalitu priniesla rozsiahla prospektívna štúdia (17). Štúdia hodnotila obsah DHA, DPA (kyselina dokosapentaénová), EPA a celkových hladín všetkých omega-3 MK plazmatických fosfolipidov a podľa ich hladín rozdelila sledované subjekty na 5 skupín. V tejto štúdii sa autori venujú aj celkovej mortalite, celkovej kardiovaskulárnej mortalite, mortalite na infarkt myokardu aj na ischemickú chorobu srdca. Nakoľko sú tieto výsledky konzistentné s nami už vyššie citovanou literatúrou (6, 7, 12), zameriame sa na to, čo táto štúdia zistila o úmrtiach na cievne mozgové príhody. Autori nezistili signifikantný rozdiel medzi skupinami vo výskyte hemoragickej mozgovej príhody, ale zistili protektívny vplyv na výskyt ischemických iktov. Skupina s najvyššími plazmatickými hladinami všetkých omega-3 MK mala o 40% nižšie riziko rozvoja ischemického iktu oproti skupine referenčnej (ako referenčná bola označená pätina s najnižšími plazmatickými hladinami). Skupina s najvyššími hladinami EPA a DHA mala o 16%, resp. o 38% nižšie riziko oproti referenčnej skupine. Zaujímavý je fakt, že skupina s najvyššími hladinami DPA mala až o 47% nižšie riziko. Na záver autori konštatujú, že jedinci v skupine s najvyššími celkovými hladinami omega-3 MK žili v priemere o 2,22 roku dlhšie oproti jedincom z referenčnej skupiny (17).

Prehľadový článok (3) sumarizuje aj iné doposiaľ publikované observačné štúdie. Autori článku konštatujú heterogénnosť výsledkov jednotlivých štúdií, kedy rozdiely vo výsledkoch dosahujú rozmedzie od jednoznačného protektívneho vplyvu na cievne mozgové príhody, až po štatisticky nesignifikantný vplyv. Preto sa uskutočnilo viacero randomizovaných štúdií s cieľom overiť doposiaľ rozporné dáta.

Veľmi jednoznačné výsledky z klinických štúdií sa však nedostavili. V metaanalýze (18) autori zosumarizovali výsledky 29 randomizovaných klinických štúdií, ktoré mali odhaliť, či suplementácia prípravkami omega-3 MK má nejaký pozitívny efekt na veľkosť ložiska, mentálne schopnosti, rekurenciu mozgovej príhody, prežívanie a mobilitu. Metaanalýza však konštatuje, že mnohé štúdie mali dizajnové chyby (príliš málo pacientov, nízka dávka suplementu) a príliš heterogénnu metodiku (nejednoznačný začiatok podávania, prípadne príliš neskoré podanie, rôzne dlhá suplementácia, krátky čas sledovania, rôzne spôsoby podávania, rôzne typy prípravkov). Preto pre relevantné overenie observačných štúdií treba uskutočniť klinickú štúdiu na zistenie optimálnej dávky, optimálneho spôsobu (perorálne versus parenterálne) podania najlepšie v prvých hodinách od vzniku iktu, aby sa maximalizovala šanca odhaliť naozaj prospešné účinky omega-3 MK na ľudský mozog po cievnej príhode. Na základe vyššie uvedených observačných štúdií však možno konštatovať, že dostatočný prívod omega-3 MK môže vykazovať preventívny potenciál na vznik cievnej mozgovej príhody a iných kardiovaskulárnych príhod, čím môže veľmi veľkým podielom prispieť k udržaniu zdravia a kvality života v starobe.

Záver

Randomizované klinické štúdie dokázali jednoznačný benefit suplementácie omega-3 MK pri ovplyvnení hladín triacylglycerolov, čím sa suplementácia omega-3 MK dostala do štandardných terapeutických odporúčaní AHA (American Heart Association) a ESC (European Society of Cardiology) ako liek prvej línie. Štúdie však nepriniesli konzistentné výsledky ohľadom suplementácie v akútnej fáze ischemickej ani hemoragickej cievnej mozgovej príhody, avšak metaanalýza dospela k záveru, že príčinou mohla byť prílišná heterogenita vo veľkosti skúmaných skupín a v dizajne, a preto by na potvrdenie alebo vyvrátenie týchto hypotéz bolo treba uskutočniť jednu dobre dizajnovanú a dostatočne veľkú štúdiu. Naopak, u pacientov s chronickým srdcovým zlyhávaním suplementácia viedla

k signifikantnému predĺženiu života a štúdia OMEGA – REMODEL popísala redukciiu patologickej remodelácie ľavej komory po prekonanom infarkte myokardu. Práve vďaka zisteniam o prínose bioaktívnych látok sa zvyšuje záujem o ich vplyv na podporu zdravia, prevenciu a priaznivé ovplyvnenie rozvoja ochorení v starobe. Klinické štúdie budú skúmať ďalšie nové aspekty a stavy, pri ktorých sa budú dať bioaktívne látky využiť a rozšíriť sa poznanie o ich úlohách v organizme.

Pod'akovanie

Táto práca bola finančne podporená grantom EU z programu CBC, Interreg V-A-NutriAging V-0014.

Literatúra

1. **Bäck, M.** Omega-3 fatty Acids in Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. Future Science OA. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5674268/> (27.8.2019)
2. **Watanabe, Y., Tatsuno, I.** Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids for Cardiovascular Diseases: Present, Past and Future. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2017;10 (8): 865–873.
3. **Sokola – Wysoczańska, E. et al.** Polyunsaturated Fatty Acids and Their Potential Therapeutic Role in Cardiovascular System Disorders – A Review. *Nutrients* 2018; 10 (10): 1561.
4. **Kastelein, J. J. et al.** Omega-3 Free Fatty Acids for the Treatment of Severe Hypertriglyceridemia: the Epanova for Lowering Very High Triglycerides (EVOLVE) Trial. *J Clin Lipid* 2014; 8 (1), 94–106.
5. **Mozaffarian, D., Rimm, E. B.** Fish Intake, Contaminants, and Human Health: Evaluating the Risks and the Benefits. *JAMA* 2006; 296 (15), 1885–1899.
6. **Miygawa, N. et al.** Longchain Polyunsaturated Fatty Acids Intake and Cardiovascular Disease Mortality Risk in Japanese: a 24 year Follow up of nippondata80. *Atherosclerosis* 2014;232(2),384–389.
7. **De Oliveira, O. M. C. et al.** Circulating and Dietary Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids and Incidence of CVD in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2013; 2 (6):
8. **Rizos, E. C. et al.** Association Between Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Risk of Major Cardiovascular Disease Events: a Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 2012;308(10),1024–1033.
9. **Abdelhamid, A. S. et al.** Omega-3 fatty Acids for the Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; (7): CD003177
10. **De Logeril, M. et al.** Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction: Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99 (6), 779–785.
11. **Weitz, D. et al.** Fish Oil for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Cardiol in Rev* 2010;18(5), 258–263.
12. **Mozaffarian, D. et al.** Fish Intake and Risk of Incident Heart Failure. *J Am College Cardiol.* 2005; 45(12), 2015–2021.
13. **Belin, R. J. et al.** Fish Intake and the Risk of Incident Heart Failure: The Women's Health Initiative. *Circulation. Heart Fail* 2011; 4(4), 404–413.
14. **Tavazzi, L. et al.** Effect of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Patients with Chronic Heart Failure (the GISSI-HF Trial): a Randomised, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Lancet* 2008; 372(9645), 1223–1230.
15. **Ghio, S. et al.** Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and of Rosuvastatin on Left Ventricular Function in Chronic Heart Failure: a Substudy of GISSI-HF Trial. *Eu J Heart Fail* 2010;12(12),1345–1353.
16. **Wang, J. et al.** Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enhance Cerebral Angiogenesis and Provide Long-term Protection After Stroke. *Neurobiol Dis* 2014; 68: 91–103.
17. **Mozaffarian, D. et al.** Plasma Phospholipid Long-Chain Omega-3 Fatty Acids and Total and Cause-Specific Mortality in Older Adults: the Cardiovascular Health Study. *An Int Med* 2013; 58 (7): 515–525.
18. **Alvarez Campano, C.G. et al.** Marine-derived n-3 Fatty Acids Therapy for Stroke. *Cochrane Database Syst Rev* <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD012815.pub2/full> (28.8.2019)

MYOCARDIAL ISCHEMIA AND MECHANISMS OF CELL DEATH – MINIREVIEW

(Ischémia myokardu a mechanizmy bunkovej smrti - minireview)

**Zohdi Vladislava¹, Adameová Adriana^{2,3}, Griecsova-Kindernay Lucia²,
Lonek Lubomír², El Falougy Hisham¹, Kubíková Eliška¹,
Ravingerová Tatiana²**

¹ Department of Anatomy, Medical Faculty, Comenius University in Bratislava, Špitálska 24, 813 72 Bratislava

² Institute for Heart Research, Centre of Experimental Medicine, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava

³ Faculty of Pharmacy, Comenius University in Bratislava, Odbojárov 10, 813 72 Bratislava
vladislava.zohdi@fmed.uniba.sk

Súhrn

Ischémia myokardu spôsobuje z dlhodobého hľadiska zhoršenie srdcových funkcií a štruktúry vedúce k srdcovému zlyhaniu. Reperfúzia ischemického srdca, ak nie je zahájená správne a včas, vedie k zhoršeniu poškodenia myokardu, rozvoju infarktu myokardu a k srdcovému zlyhaniu. Mechanizmy srdcového zlyhávania zahŕňajú rôzne bunkové dráhy vedúce k smrti kardiomyocytov. Okrem už známych mechanizmov bunkovej smrti (apoptóza, nekróza) existujú nové dôkazy o účasti ďalších foriem, ako je nekroptóza, pyroptóza, ferroptóza. Toto minireview sa zaoberá niektorými z týchto foriem a ich úlohou v mechanizmoch bunkovej smrti a pri kardioprotekcii.

Kľúčové slová

kardioprotekcia, srdcové zlyhávanie, infarkt myokardu, bunkové dráhy

Summary

Myocardial ischemia causes deterioration of heart function and structure leading to the heart failure in the long term. Reperfusion of the ischemic heart, if not initiated properly and in time, leads to aggravation of myocardial injury and development of myocardial infarction and heart failure. Mechanisms of heart failure involve different cellular pathways resulting in the death of cardiomyocytes. In addition to already known mechanisms of cell death (apoptosis, necrosis), there is an emerging evidence of participation of other forms, such as necroptosis, pyroptosis, ferroptosis. This minireview is dealing with some of these forms and their role in the mechanisms of cell death and in cardioprotection.

Keywords

cardioprotection, heart failure, myocardial infarction, cellular pathways

Introduction

Ischemia is defined as a disproportion between oxygen and substrate delivery in a certain organ (myocardium) and an amount required to perform its normal function (1). Reduction of blood flow through the coronary vessels belongs to the most common reasons of ischemia. Since

coronary arteries are from the functional point of view non-anastomotic arteries (2), any reason of flow reduction may potentially lead to myocardial ischemia. If not treated, ischemia will lead to gradual development of myocardial dysfunction, malignant arrhythmias and most severe injury - acute myocardial infarction (AMI). Early restoration of blood flow in the ischemic myocardium is a prerequisite for its salvage. However, revascularization may paradoxically induce ischemia - reperfusion injury and accelerate cardiomyocyte death in terms of greater myocardial infarction and post - AMI myocardial dysfunction later progressing into heart failure (3).

As shown in Figure 1 there is a complex of multifactorial pathological processes of cell death involved in the ischemia - reperfusion injury (4-6).

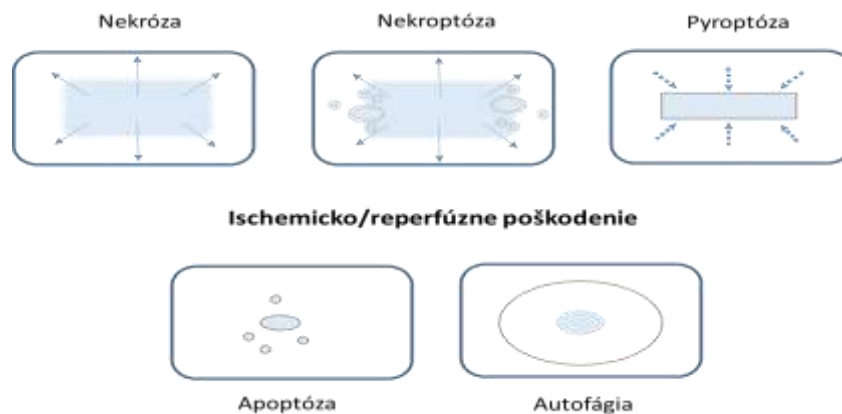


Fig. 1. Various forms of cell death in the ischemic reperfusion injury; adapted from (7)

Besides well-known forms of cell death (apoptosis, necrosis, autophagy), other forms (necroptosis, pyroptosis, ferroptosis) have been recently proposed to participate in the pathophysiological mechanisms of AMI and post-AMI developing heart failure (8).

Apoptosis serves to adapt the tissue to altered load, to eliminate excess cells and, in particular, to remove harmful cells such as tumor cells and virus-infected cells (9). Apoptosis is activated only in cells that are genetically predisposed to extinction. Uncontrolled cell death causes unexpected cell destruction. Although each cell has homeostatic mechanisms, environmental fluctuations can activate necrosis (10). For many years, apoptosis was considered the only regulated cell death. Necrosis was a process of unregulated cell death. The discovery of specific chemical inhibitors of necrosis has redefined this process, which is molecularly controlled (11). During apoptosis, cytochrome c is released from mitochondria. This leads to a series of biochemical reactions, resulting in caspase activation and subsequent cell death (12).

During necrosis, mitochondria swell in the cell, the pH of the cytoplasm decreases, chromatin is lost (karyolysis) and cell lysis occurs by rupture of the cell membrane. The concentration of insoluble Ca^{2+} -containing phospholipid complexes increase, leading to calcium overload of the cell by Ca^{2+} channels IP3 and intranuclear ryanodine receptors, which triggers phospholipase and endonuclease enzymes. In addition to inhibiting oxidative phosphorylation, Ca^{2+} -induced calpain proteases are activated. This leads to degradation of the cytoskeleton proteins. Necrotic cells are later removed by phagocytes. After the release of the contents of damaged cells into the intercellular space, strong inflammation occurs with a complete loss of energy balance, in contrast to apoptosis (6,13).

The process of autophagy involves the sequential formation of three unique membrane structures, namely the phagophore, autophagosome, and autolysosome. Over 40 autophagy-related genes/proteins (ATGs) play key roles in autophagic membrane dynamics and processes (14).

As a dynamic recycling system, the bulk and nonselective autophagy process is generally considered as a pro-survival mechanism in response to multiple types of cellular stresses. Nevertheless, autophagy can selectively degrade pro-survival proteins related to other types of regulated cell death, thereby tipping the balance from life to death (15).

Reactive oxygen species (ROS) and Ca^{2+} overload

Under physiological conditions, especially in biochemical processes in mitochondria, the formation of free radicals as natural intermediates for the reduction between oxygen and water is natural. Therefore, the cell has mechanisms of protection against oxidative damage to the free radicals trap, the so-called "scavengers", non-enzymatic substances known as antioxidants. (9). Oxidative stress as well as increased Ca^{2+} entry into the cell or damage to the cell by other influences leads to the activation of sphingomyelinase, which cleaves ceramide from sphingomyelin. Ceramide is important in signal transduction affecting apoptosis (9). With prolonged oxygen depletion after ischemia and subsequent myocardial reoxygenation, reactive oxygen species (ROS) are increasingly formed. ROS result in disruption of sarcolemma integrity as well as in decline of important proteins (16).

After ischemia and subsequent reperfusion, ROS are formed in myocardial tissues in the form of superoxide anions (O_2^-), hydroxyl radicals ($\text{OH}\cdot$), as well as hydrogen peroxide (H_2O_2), in addition to a significant increase in adhesive molecules, which induce leukocytes, further deepening cell damage. Ca^{2+} overload occurs in cardiomyocytes, resulting in a decreased myofilament response to Ca^{2+} (9, 17). When the blood supply to an organ is reduced, the cells in the affected region switch to anaerobic glycolysis to generate ATP. This leads to lactate, H^+ , and NADH^+ accumulation and cytosolic pH decreases. In an attempt to reestablish acid-base balance, the plasmolemmal NHE is activated and transports H^+ ions out of the cytosol in exchange for Na^+ . The influx of Na^+ ions in turn activates the plasmolemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger which exchanges Na^+ for Ca^{2+} (18).

Development of cell death mechanisms (necroptosis, pyroptosis, ferroptosis) during ischemia

Necroptosis is a newly discovered pathway of regulated necrosis that requires the proteins RIPK3 and MLKL and is induced by death receptors, interferons, toll-like receptors, intracellular RNA and DNA sensors, and probably other mediators. RIPK1 has important kinase-dependent and scaffolding functions that inhibit or trigger necroptosis and apoptosis (6). The process of necroptosis has been found to be dependent on the activation of RIP1-RIP3-MLKL axis, which induces changes leading to the rupture of cell membrane. This pathway is activated by $\text{TNF-}\alpha$, which has also been implicated in the cardioprotective signaling pathway of ischemic preconditioning (19). Similarly Zhe-Wei and colleagues have reported that myocardial ischemia reperfusion injury can trigger two kinds of necroptosis pathways, RIP3-CaMKII and RIP1-RIP3-MLKL. These necroptosis pathways take part in the initial loss of myocytes as well as possibly contribute to an increase in oxidative stress and additional ischemia reperfusion injury from spreading throughout the myocardium, followed by the inflammatory response. They also report that Necrostatin-1, an inhibitor of RIP1, can provide a new target to treat myocardial ischemia reperfusion injury. This way the spreading of ischemia reperfusion injury is prevented, which then leads to a reduction in the infarct size and preservation of left ventricular function (20).

Adameova and colleagues have reported that the presence of necroptosis has been revealed in the heart exposed to ischemia, however, it is not clear yet whether it is necroptotic death of cardiomyocytes or other cardiac cells (fibroblasts and endothelial cells) (19). Zhe-Wei and colleagues have shown that RIP3 mediates inflammation, ROS generation and adverse remodeling and that the RIP1 is critically involved in the pathophysiology of myocardial

infarction. Thus, the necroptosis pathway can be regarded as a therapeutic target for the improvement of left ventricular recovery and the reduction of myocardial infarct size after myocardial infarction (20). Number of diseases and disorders associated with ischemic injury has been found to be positive for necroptosis (21).

Pyroptosis is a form of regulated cell death driven by the activation of inflammasomes, a cytosolic multiprotein complex responsible for the release of interleukin (IL) 1 family members (e.g., interleukin-1 β [IL1 β] and IL18), the formation of ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, also called PYCARD or PYRIN and CARD domain-containing) specks, and the activation of pro-inflammatory caspases (22).

Ferroptosis is a non-apoptotic form of regulated cell death driven by iron accumulation and lipid peroxidation, which can also involve autophagic processes, depending on the trigger. Excessive ferroptosis is likely to occur in certain human diseases; especially neurodegenerative and iron overload disorders, calling for its therapeutic suppression (22, 23, 24). The likelihood of ferroptosis is determined by the balance between iron accumulation-induced ROS production and the antioxidant system that avoids lipid peroxidation. Increased iron uptake by transferrin receptor (TFRC, also known as TFR1) and reduced iron export by ferroportin favor oxidative damage and ferroptosis. Lipid peroxidation is influenced by several lipids and enzymes. The morphology of ferroptotic cells is characterized by dysmorphic small mitochondria with decreased cristae, ruptured outer membranes that might be under control of the pro-apoptotic BCL2 family members. Mechanistically, these dying cells do not display any hallmarks of apoptosis or necroptosis (22).

The fact that ferroptosis is a significant form of cell death in cardiomyocytes has been reported by Kobayashi and colleagues. Moreover, myocardial hemorrhage, a major event in the pathogenesis of heart failure, could trigger the release of free iron into cardiac muscle and is an independent predictor of adverse left ventricular remodeling after myocardial infarction (23). This is also supported by the evidence showing that ferroptosis can accompany necroptosis and pyroptosis in the heart (24).

Conclusions

Although necroptosis plays an important role in the loss of cardiomyocytes subjected to various forms of ischemic insults, it is crucial to find factors that are responsible for mechanisms leading to necroptosis in various pathological settings. Also, more research is needed to better understand the relationship between cardiac remodeling and necroptosis in order to find a target gene that can delay the process of cardiac remodelling as well as to explore further what exact role play pyroptosis and ferroptosis in myocardial ischemia.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants of the Slovak Grant Agency VEGA SR 2/0141/18, APVV-15-0607, APVV-16-0263, and APVV-19-0540.

References

1. **Eltzschig HK, Eckle T.** Ischemia and reperfusion – from mechanism to translation (review). *Nat Med* 2011; 17(11): 1391-1401.
2. **Čihák, R.** 2004. *Anatomie. 2. upravené a doplněné vydání.* Praha: Grada Publishing, 2004. 692 s. ISBN 978-80-247-1132-4
3. **Bulluck H, Yellon DM, Hausenloy DJ.** Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities (review). *Heart* 2016; 102: 341–348.

4. **Chen-Scarabelli C, Agrawal PR, Saravolatz L, Abuniat C, Scarabelli G, Stephanov A, Loomba L, Narula J, Scarabelli TM, Knight R.** The role and modulation of autophagy in experimental models of ischemia-reperfusion injury. *J Geriatr Cardiol* 2014; 11: 338-348.
5. **Cho YS.** Perspectives on the therapeutic modulation of an alternative cell death, programmed necrosis (review). *Int J Mol Med* 2014; 33: 1401-1406.
6. **Pasparakis M and Vandenabeele P.** Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 2015; 517: 311-320.
7. **Bell RM, Botker HE, Carr RD, Davidson SM, Downey JM, Dutka DP, Heusch G, Ibanez B, Malcallister R, Stoppe C, Ovize M, Redington A, Walker JM.** 9th Hatter Biannual Meeting: position document on ischemia/reperfusion injury, conditioning, and the ten commandments of cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 2016; 111: 41.
8. **Adameova A, Goncalvesova E, Szobi A, Dhalla NS.** Necroptotic cell death in failing heart: relevance and proposed mechanisms (review). *Heart Fail Rev* 2016; 21(2): 213-221.
9. **Silbernagl S and Lang F.** Atlas Patofyziologie, 2. České vyd. Praha: Grada publishing 2012. 416 pp.
10. **Dobrota D, Brechtova M, Drgova A.** Lekarska biochemia, 2. Vyd. Osveta 2016, Martin, pp.799.
11. **Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhoutet S, Walczak H, Vandenabeele P.** Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(2): 135-147.
12. **Jiang X and Wang X.** Cytochrome c-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 87-106.
13. **Babal P.** Apoptoza a jej etiopatogeneticky vyznam. In: Hulin I. et al (Eds). *Patofyziologia*. 7. vyd. SAP, Bratislava, 78-82.
14. **Dikic I and Elazar Z.** Mechanisms and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 349-364.
15. **Liu Y and Levine B.** Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ* 2015; 22: 367-376.
16. **Simko F.** Patomechanizmus reperfuzneho poskodenia srdca. In: Hulin I. et al (Eds). *Patofyziologia*. 7. vyd. SAP, Bratislava, 85-588.
17. **Bolli R and Marban E.** Molecular and cellular mechanism of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79: 609-634.
18. **Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ.** Ischemia/ Reperfusion (review). *Compr Physiol* 2017; 7(1): 113-170.
19. **Adameova A, Hrdlicka J, Szobi A, Dhalla NS.** Evidence of necroptosis in hearts subjected to various forms of ischemic insult (review). *Can J Physiol Pharmacol* 2017; 95(10): 1163-1169.
20. **Zhe-Wei S, Li -Sha G, Yue-Chun L.** The role of necroptosis in cardiovascular disease. *Front Pharmacol* 2018; 9: 721-726.
21. **Linkermann A, Bräsen J, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller JO, De Zen F, Weinlich R, Ortiz A, Walczak H, Weinberg JM, Green DR, Kunzendorf U, Krautwald S.** Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013; 110(29): 12024-12029.
22. **Tang D, Kang R, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Kroemer G.** The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research* 2019; 29: 347-364.
23. **Kobayashi M, Suhara T, Baba Y, Kawasaki N, Higa JK, Matsui T.** Pathological roles of iron in cardiovascular disease. *Curr Drug Targets*, 2018; 19(9): 1068-1076.
24. **Ravingerová T, Kindernay L, Barteková M, Ferko M, Adameová A, Zohdi V, Bernátová I, Ferenczyová K, Lazou A.** The Molecular Mechanisms of Iron Metabolism and Its Role in Cardiac Dysfunction and Cardioprotection. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 7889; doi:10.3390/ijms21217889

IV. ONKOLÓGIA

KARCINÓM OBLIČKY A JEHO CHIRURGICKÁ TERAPIA - MINIREVIEW

(Kidney carcinoma and its surgical therapy - minireview)

Dovalová Daniela, Zohdi Vladislava, Kubíková Eliška

*Anatomický ústav, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava
daniela.dovalova@fmed.uniba.sk*

Súhrn

Obličkový karcinóm tvorí asi 4% zo všetkých zhubných nádorov a zároveň je tretím najčastejším malígnym ochorením v urológii. Najčastejšie býva diagnostikovaný medzi 40.- 60. rokom života a jeho incidencia stále stúpa. Používanie zobrazovacích metód ako počítačová tomografia a sonografia zlepšili možnosť detekcie asymptomatického tumoru obličky. Na základe rozšírenia diagnostických metód a zavedenia nových technológií do operačnej liečby sa za posledné roky zmenila paradigma v operačnej liečbe tohto ochorenia.

Kľúčové slová

karcinóm obličky, chirurgická liečba, diagnostika

Summary

Kidney cancer accounts for about 4% of all malignancies and is also the third most common malignant disease in urology. It is most often diagnosed between 40 and 60 years of age and its incidence is still rising. The use of imaging methods such as computed tomography and sonography have improved the ability to detect an asymptomatic kidney tumor. Due to the expansion of diagnostic methods and the introduction of new technologies in surgical treatment, the paradigm in surgical treatment of this disease has changed in recent years.

Keywords

kidney carcinoma, surgical treatment, diagnostics

Úvod

Karcinóm obličky (RCC- renal cell carcinoma) je v súčasnosti desiaty najčastejšie diagnostikovaný nádor u žien a šiesty u mužov. Incidencia nádoru stále narastá, čo spôsobuje najmä diagnostika tzv. incidentálnych nádorov, ktoré sú zistené u pacientov pri vyšetrení inom ako obličkovom (1). Prudší nárast ochorenia sa pozoruje u žien a taktiež u černochoch (2,3). Vysoké hodnoty incidence sa viackrát zaznamenali v oblasti strednej Európy ale aj v Severnej Amerike a Austrálii. Naopak hodnoty s nízkou incidenciou sú pozorované najmä v Ázii a Afrike (4). Karcinóm obličky môže byť klinicky manifestovaný hematúriou, bolesťou, chudnutím alebo aj palpovateľnou masou. U pacientov môže byť prítomná anémia, teplota, kachexia, hyperkalcémia a iné (5). Klasifikačný systém označovaný ako TNM je odporúčaný vo vedeckej ale aj klinickej praxi. V dnešnej dobe sú často používané na opis nádoru obličky aj anatomické klasifikačné systémy. Tieto systémy opisujú veľkosť nádoru, jeho rast ale aj vzťah nádoru k panvičkovému - kalichovému systému a cievnemu zásobeniu obličky. Najviac využívaný je systém PADUA alebo aj ABC skórovací systém.

Oba tieto systémy sa používajú pri rozhodovaní o type operačného výkonu – nefrektómia radikálna vs. nefrektómia parciálna (6,7). Tabuľka 1 uvádza poslednú klasifikáciu z roku 2017(8) a tabuľka 2 klinický klasifikačný systém (8).

T štádium	
TX	primárny nádor nie je možné hodnotiť
T0	primárny nádor nie je dokázaný
T1	tumor < 7 cm v najväčšom rozmere, obmedzený na obličku
T1a	tumor < 4 cm v najväčšom rozmere, obmedzený na obličku
T1b	tumor > 4 cm ale menší ako 7 cm v najväčšom rozmere
T2	nádor > 7 cm v najväčšom rozmere, limitovaný na obličku
T2a	nádor > 7 cm v najväčšom rozmere ale menší ako 10 cm v najväčšom rozmere
T2b	nádor > 10 cm limitovaný na obličku
T3	tumor šíriaci sa do perinefritického tuku alebo do veľkých vén
T3a	tumor sa šíri do obličkových ciev a ich vetiev
T3b	tumor sa šíri do vena cava pod bránicou
T3c	tumor sa šíri do vena cava nad diafragmou alebo invaduje stenu dolnej dutej žily
T4	tumor sa šíri za Gerotovu fasciu (alebo do ipsilaterálnej nadobličky)
N štádium	
NX	regionálne lymfatické uzliny nemožno hodnotiť
N0	bez prítomnosti metastáz v regionálnych lymfatických uzlinách
N1	prítomnosť metastáz v regionálnych lymfatických uzlinách
M štádium	
M0	bez prítomných vzdialených metastáz
M1	potvrdenie vzdialených metastáz

Tab. 1 Systém klasifikácie TNM pre stanovenie štádia nádoru obličky

Klinické štádium	Štádium I	Štádium II	Štádium III	Štádium IV
T kategória	T1	T2	T3 T1, T2, T3	T4 Akékoľvek T
N kategória	N0	N0	N0 N1	Akékoľvek N Akékoľvek N
M kategória	M0	M0	M0 M0	Akékoľvek M M1

Tab. 2 Systém klasifikácie pre karcinóm obličky – klinický

Rizikové faktory

Vysoký krvný tlak, obezita ale aj fajčenie sa radia medzi faktory, ktoré zvyšujú riziko vzniku a vývoja karcinómu obličky. Fajčenie zvyšuje riziko RCC odhadom o približne 54 % u mužov a o 22 % u žien. Pri oboch pohlaviach platí priama korelácia medzi denným počtom cigariet, dobou trvania fajčenia a incidenciou nádoru obličky. Zvýšenie rizika RCC bolo zaznamenané najmä pri vzostupe telesnej hmotnosti a to o 5 kg/m². Pacienti s renálnou insuficienciou, ktorí sú v terminálnom štádiu majú štvornásobne vyššie riziko vzniku karcinómu obličiek. Medzi najvýznamnejšie faktory primárnej prevencie RCC sa zaraďuje eliminácia fajčenia, redukcia BMI ale aj kontrola hypertenzie. Pozitívna rodinná anamnéza sa vyskytuje približne u 5 až 10% pacientov s RCC. Tí, u ktorých vzniklo podozrenie na RCC s dedičným základom by mali absolvovať aj vyšetrenie genetického charakteru (9-15).

Diagnostika

Veľmi veľké množstvo tumoru obličiek je zistené na základe neinvazívnych zobrazovacích postupov, medzi ktoré patrí počítačová tomografia – CT alebo ultrasonografia – USG. Makroskopická hematuria, bolesti v boku a hmatateľná rezistencia patria medzi nálezy, ktoré sa v súčasnosti môžu považovať za veľmi vzácne. Určitá skupina symptomatických pacientov sa môže prejavovať príznakmi spôsobenými metastatickým ochorením, ako je napr. dlhotrvajúci kašeľ alebo bolesť kostí. U pacientov, pri ktorých je pozorovaný primárny RCC treba predoperačne zhodnotiť, či je vhodné urobiť CT vyšetrenie, na základe ktorého sa stanoví staging na prípadne plánovanú nefrón šetriacu chirurgiu (14,15). Pacienti s RCC a zároveň s podozrením na postihnutie nádoru renálnej vény a/alebo dolnej dutej žily by mali absolvovať magnetickú rezonanciu (MRI). Ak sú asymptomatickí pacienti s tumorom obličky väčším ako 3 cm odporúča sa vykonať aj CT hrudníka. U pacientov s podozrením na mozgové metastázy býva indikované kontrastné MRI hlavy (9-12). Pri podozrení na tumor bez metastáz sa považuje tkanivová biopsia za kontraindikovanú. Hrozba šírenia nádoru pri odbere renálneho tkaniva nebola potvrdená a je veľmi zanedbateľná.

Biopsia obličky sa vykonáva najmä:

- 1) u pacientov, pri ktorých sa pozoruje obličková masa „neistej povahy“ pretože je schopná ovplyvniť spôsob a výber liečby
- 2) u pacientov pred ablačnou terapiou
- 3) u pacientov s metastatickým RCC pred systémovou terapiou alebo cytoredukčnou nefrektómiou
- 4) u osôb, ktoré sú aktívne sledované pre RCC

Dôležité je odobrať minimálne dve vzorky tkaniva pod CT kontrolou alebo USG kontrolou (14).

Chirurgická liečba

Do konca 20. storočia bola štandardom chirurgickej liečby otvorená radikálna nefrektómia (ORN) (16). Princípom radikálnej nefrektómie je transabdominálny prístup k obličke, umožňujúci identifikáciu a primárny podváz ciev obličky pred samotnou manipuláciou s obličkou. Týmto sa predíde diseminácií nádorových buniek do systémovej cirkulácie. Oblička je odstránená aj s tukovou kapsulou ohraničenou Gerotovou fasciou, spolu s nadobličkou a regionálnymi paraaortálnymi, parakaválnymi a inter-aorto-kaválnymi lymfatickými uzlinami. Postup opísaný vyššie je odlišný od jednoduchej nefrektómie, pretože pri nej sa postihnutá oblička odstraňuje bez perirenálneho tukového tkaniva a nadoblička ostáva zachovaná. Súčasťou radikálnej nefrektómie je adrenalectómia, ktorá je indikovaná v prípade ak pomocou zobrazovacích metód sa dokáže metastatické postihnutie nadobličky. Taktiež môže byť indikovaná v prípade, ak nádor obličky postihuje horný pól prípadne veľkú časť celej obličky (17,18,19).

Radikálna nefrektómia sa považuje za štandardnú metódu liečby pri karcinóme obličky.

Konkrétny prístup aj technika operácie závisí od:

- A) lokalizácie a veľkosti tumoru
- B) metastatického postihnutia brušných orgánov

Jednou z nevýhod transabdominálneho prístupu je dlhšie obdobie pooperačnej paralýzy čriev. Pri postihnutí tumoru hornej časti obličky môžeme použiť thorakoabdominálny prístup, ktorý je však používaný iba zriedkavo. Pri menších nádoroch je vhodný lumbotomický prístup. Približne u 20% prípadov pacientov sa vyskytujú komplikácie pri radikálnej nefrektómii.

Prežívanie pacientov po radikálnej nefrektómii pre karcinóm obličky závisí od patologického štádia ochorenia. V nasledujúcej tabuľke je zobrazená percentuálna hodnota prežívania pacientov 5 rokov po ich liečbe.

5 rokov po liečbe bez postihnutia lymfatických uzlín a vzdialených metastáz	70 - 90 %
Bez postihnutia lymfatických uzlín a metastáz – nádor menší ako 4 cm	90 – 100 %
5 ročné prežitie pacientov s nádorom väčším ako 7 cm	70 – 80 %

Tab. 3 Percentuálna hodnota prežívania pacientov 5 rokov po liečbe EUA Guidelines

Chirurgická operácia, pri ktorej sa odstraňuje iba tumor obličky s ponechaním zvyšku zdravého parenchýmu sa nazýva parciálna nefrektómia. Túto operáciu možno pomenovať aj ako nefrón šetriacu operáciu (NSS – nephron sparing surgery). Na základe náročnosti operácie ale aj vysokej morbidity bola PNF kedysi vykonávaná iba pri imperatívnych indikáciách ako napríklad bilaterálne nádory alebo chronické obličkové ochorenia. Na základe rozvoja diagnostických metód (MR a CT) ale aj zlepšenia operačnej techniky sú indikácie pre PNF v súčasnej dobe rozšírené na nádory štádia T1 a T2. Veľa štúdií porovnáva výsledky parciálnej a radikálnej nefrektómie. Pri výsledkoch, ktoré sú onkologicky porovnateľné vykazujú pacienti po PNF zlepšenie celkového prežívania (20,21).

Pri parciálnej nefrektómii je zvyčajne odstránený nádor s lemom zdravého parenchýmu a je nutné dočasne prerušiť prietok krvi obličkou nato, aby sa zachovala dobrá vizualizácia v operačnom poli. Je výhodou pre posúdenie kompletného posúdenia nádoru ale aj posúdenie cievnych štruktúr. Operáciu je možné vykonať bez oklúzie ciev obličky v teplej respektíve studenej ischémii. V prípade malých nádorov lokalizovaných v oblasti kôry obličky je indikovaná parciálna nefrektómia bez ischémie. V takýchto prípadoch je možné odstrániť nádor bezpečne a rekonfigurovať povrch obličky. Teplá ischémia by nemala presiahnuť 20 - 25 minút (22). V takomto prípade nedôjde k nezvratnému poškodeniu parenchýmu obličky. Väčšinou stačí uzatvoriť hlavnú tepnu a žilu nechať voľnú. Ak by resekcia nádoru trvala dlhšie ako 35 minút je nutné prerušiť prietok krvi úplne a obličku ochladiť. Zavedením roboticky asistovanej chirurgie, ale aj rozvojom laparoskopickej techniky do urológie dochádza k zavedeniu týchto technológií do operačnej liečby nádorov obličky práve pri parciálnej nefrektómii. Štúdie porovnávanie medzi robotickou, laparoskopickou a otvorenou PNF poukazujú na výhody práve robotickej chirurgie, na základe zníženia celkových komplikácií ale aj morbidít. Znížený je aj čas hospitalizácie a spotreba krvných transfúzií (23,24).

Záver

Veľkosť nádoru, štádium ochorenia ale aj skúsenosť operátora sa radí medzi základné faktory, ktoré ovplyvňujú výber optimálnej liečebnej metódy. Štandardný otvorený operačný prístup je postupne nahradený roboticky asistovanou parciálnou nefrektómiou a otvorený chirurgický prístup je stále vyhradený pre lokálne pokročilé ochorenie ako je invázia do lymfatických uzlín alebo žilového systému. V súčasnej dobe sa skúmajú nové prognostické a prediktívne markery, ktoré v budúcnosti môžu byť pomocné pri rozhodovaní sa v rámci manažmentu pacientov s RCC.

Literatúra

1. Siegl RL., Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2018;68:7-30
2. McLaughlin JK, Lipworth L, Tarone RE et al. Renal Cancer, kapit.57. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr (eds). Cancer Epidemiology & prevention. Oxford: Oxford University Press 2006:1087-1100.

3. **Wiklund F, Tretli S, Choueiri TK et al.** Risk of bilateral renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(23):3737-3741. doi:10.1200/JCO.2008.20.6524
4. **Weikert S, Ljungberg B.** Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: perspectives of primary prevention. *World J Urol* 2010; 28 (3): 247-252. doi: 10.1111/j.1464410x.2008.07451.x.
5. **Gudbjartsson T, Thoroddsen A, Putursdottir V. et al.** Effect of incidental detection for survival of patients with renal cell carcinoma: results of population-based study of 701 patients. *Urology*, 2005;66: 1186
6. **latte, T, et al.** A literature review of renal surgical anatomy and surgical strategies for partial nephrectomy. *Eur Urol.* 2015;68(6):980-992.
7. **Hakky TS, et al.** Zonal NePhRO scoring system: a superior renal tumor complexity classification model. *Clin Genitourin Cancer.* 2014;12(1):e13-18.
8. **Brierley JD, et al.** TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Brierley JD, Gospodariwicz M, Wittekind C. (eds). Wiley-Blackwell, 2009.
9. **Ljungberg B, Bensalen K, Bex A et al.** Chronic pelvic pain. In: EAU guidelines on chronic pelvic pain. Arnheim: European Association of Urology 2016: 1-54
10. **Ljungberg B, Bensalen K, Bex A et al.** EAU guidelines on renal cell carcinoma (limited text update March 2016). EAU pocket guidelines, Arnheim: European Association of Urology 2016: 77-97.
11. **Campbell S, Lane B.** Malignant renal tumors. In: Wein A, Kavoussi L, Partin A et al (eds.) *Campbell – Walsh Urology*. 11th ed. Saunders Elsevier 2016: 1315-1364
12. **Doehn C, Grüwald V, Steiner T et al.** The diagnosis, treatment, and follow-up of renal cell carcinoma. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113(4): 590-596. doi: 10.3238/arz-tebl.2016.0590
13. **Srigley JR, Delahunt B, Eble J et al.** The International Society of Urological Patology (ISUP) Vancouver Classification of renal neoplasia. *Am J Surg Patol* 2013;37(10): 1469-1489. doi: 10.1097/PAS.0b013e318299f2d1
14. **Marenčák J.** Diagnostika karcinómu obličky a stanovenie rozsahu ochorenia. *Lek.listy* 2010; 15(26): 3-5
15. **Breza J, Marenčák J, Minčík I et al.** (eds). *Nádory obličiek*. 1.vyd. Bratislava: Poľana 2008: 1-386
16. **Robson CJ, Churchill BM, Anderson W.** The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol.* 1969;101(3):297-301.
17. **Kliment J.** Chirurgická liečba karcinómu obličky. Kapitola 7.1. s. 129 – 139. In: Breza, J., Marenčák, J., Minčík, I.: *Nádory obličiek*. Vydavateľstvo OG-POLANA, s.r.o., Bratislava, 2008, 368 s.6.
18. **Ljungberg B, Cowan N, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PFA, Patard JJ, Sinescu IC.** Guidelines on renal cell carcinoma. 48 s. In: *European Association of Urology Guidelines*, 2010 Edition
19. **Łupták J.** Laparoskopická nefrektómia. Kapitola 7.3 , s. 153 – 173. In: Breza, J., Marenčák, J., Minčík, I.: *Nádory obličiek*. Vydavateľstvo OG-POLANA, s.r.o., Bratislava, 2008, 368 s
20. **Janek J, Kminiak R, Necpal, R, et al.** Chirurgická liečba nádorov dolnej dutej žily. *Vasc med.* 2016;8(1):28-30.
21. **Sun M, et al.** Management of localized kidney cancer: calculating cancer-specific mortality and competing risks of death for surgery and nonsurgical management. *Eur Urol.* 2014;65(1):235-241
22. **Wood EL, et al.** Local tumor bed recurrence following partial nephrectomy in patients with small renal masses. *J Urol.* 2018;199(2):393-400. 28.
23. **Thompson RH, Lane BR, Lohse CM, et al.** Renal function after partial nephrectomy: effect of warm ischemia relative to quantity and quality of preserved kidney. *Urology.* 2012;79(2):356-360.
24. **Peyronnet B, et al.** Comparison of 1800 robotic and open partial nephrectomies for renal tumors. *Ann Surg Oncol.* 2016;23(13):4277-4283

PH-DEPENDENTNÝ ÚČINOK ATORVASTATÍNU NA ĽUDSKÉ BUNKY MELANÓMU

(PH-dependent effect of atorvastatin on human melanoma cell line)

Hutník Juraj, Gbelcová Helena

*Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 4,
811 08 Bratislava, hutnikjuraj@gmail.com*

Súhrn

Melanóm je jednou z najnebezpečnejších foriem rakoviny kože a na väčšinu terapeutických prístupov nereaguje. Statíny, najmä pravastatín a lovastatín, vykazovali zvýšený cytotoxický účinok na bunky kultivované v *in vitro* podmienkach v kultivačnom médiu s pH = 6,7. My sme sa rozhodli sledovať cytotoxický účinok atorvastatínu, ďalšieho liečiva zo skupiny statínov. Bunkovú líniu ľudského melanómu sme kultivovali v prítomnosti atorvastatínu v mierne kyslom prostredí, ktoré odpovedá mikroprostrediu mnohých nádorov. Testy cytotoxicity preukázali významne vyšší cytotoxický účinok atorvastatínu, najmä v nižších koncentráciách, v mierne kyslom prostredí v porovnaní s fyziologicky normálnym. Naša štúdia ďalej naznačuje, že lieky s vyššou účinnosťou v mierne kyslom pH môžu byť nie len účinnejšie pri znižovaní proliferácie buniek melanómu, ale aj menej toxické pre okolité tkanivá.

Kľúčové slová

melanóm, statíny, mierne kyslé pH, atorvastatín, cytotoxicita

Summary

Melanoma is one of the most dangerous forms of skin cancer and contradicts most of the therapeutic approaches. Statins, in particular pravastatin and lovastatin, have shown an increased cytotoxic effect on cells in *in vitro* conditions when cultured in medium with pH=6,7. We decided to study the cytotoxic effect of atorvastatin, another drug from the group of statins. Human melanoma cell line was cultured in a mildly acidic medium, which responds to the microenvironment of many tumours, with a range of concentrations of atorvastatin. Cytotoxicity assays demonstrated significantly higher cytotoxic effect of atorvastatin, especially in the lower concentrations, in acidic condition, when compared to physiologically normal. Furthermore, our study implicates, that drugs with higher effectiveness in acidic pH could be less harmless to the surrounding tissues and more effective in reducing proliferation of melanoma cells.

Keywords

melanoma, statins, mildly acidic pH, atorvastatin, cytotoxicity

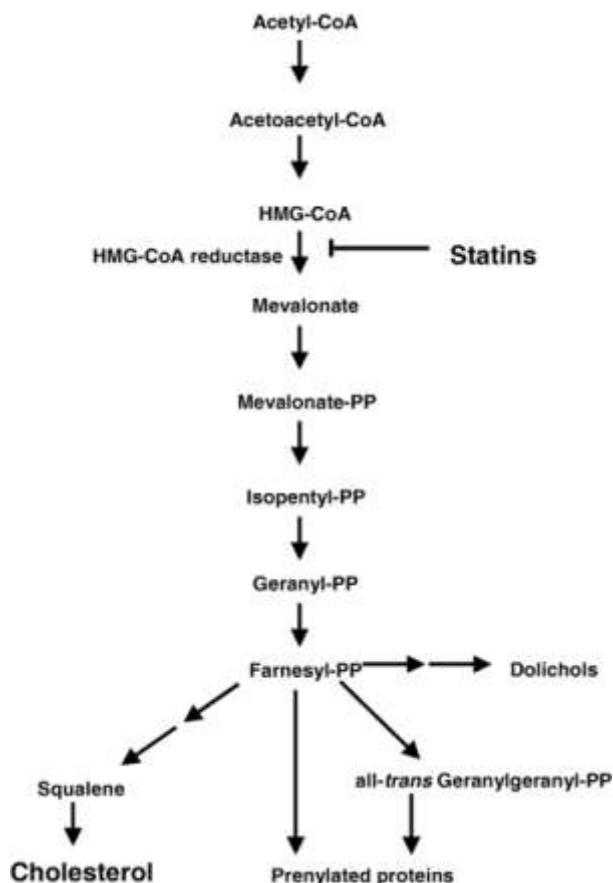
Úvod

Rakovina kože je jedným z najbežnejšie sa vyskytujúcich neoplastických ochorení. Melanóm tvorí iba 1 % z celkového počtu rakovín kože, no napriek tomu je zodpovedný za väčšinu úmrtí. Najvýznamnejším rizikovým faktorom je vystavenie pokožky UV žiareniu najmä pri opaľovaní

za súčasného zanedbania ochrany pokožky. *American Cancer Society* odhaduje, že v roku 2020 bude diagnostikovaných v USA vyše 100000 nových prípadov melanómu a 6850 ľudí v roku 2020 tomuto ochoreniu podľahne. Najväčšie ochorenie z tejto skupiny predstavuje metastatický melanóm. Priemerná doba prežitia pacientov s diagnostikovaným metastatickým melanómom je 8,5 mesiaca, v závislosti od miesta výskytu metastáz. (1,2) Štandardne sa metastatický melanóm lieči alkylačným činidlom dakarbazín, ktorý je od roku 1975 až do dnes jediným schváleným liekom organizáciou *Food and Drug Administration*. (3) Dakarbazín je metylačné činidlo, ktoré spôsobuje zlomy v DNA, zastavenie bunkového cyklu a navodenie apoptózy. Napriek týmto faktom, iba 2 % pacientov podstupujúcich liečbu preukazujú signifikantné zmeny. (4) Nízka účinnosť dostupných chemoterapeutík vyžaduje nové postupy pri liečbe a prevencii melanómu.

Statíny sú inhibítory 3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzým A (HMG-CoA) reductázy, ktorá zabezpečuje premenu HMG-CoA na mevalonát, prekursor biosyntetickej dráhy izoprenoidov. Sú účinné pri znižovaní koncentrácie LDL častíc, a preto sa široko používajú nie len na liečbu hypercholesterolémie, ale aj k primárnej prevencii u ľudí s vysokým rizikom kardiovaskulárnych chorôb, a taktiež k sekundárnej prevencii u ľudí s už vyvinutým kardiovaskulárnym ochorením. (5-7)

Statíny inhibujú *de novo* syntézu cholesterolu a zvyšujú katabolizmus LDL častíc. Inhibícia tohto procesu taktiež vedie k deplécii niekoľkých ďalších dôležitých medziproduktov mevalonátovej dráhy zodpovedných za prenyláciu proteínov, konkrétne farnezylpyrofosfátu (FPP) a geranylgeranylpyrofosfátu (GPP). FPP a GPP sú lipidové pripojenia, ktoré sú kľúčové v procese posttranslačnej úpravy signálnych proteínov rodín GTP-áz *Ras*, *Raf* a *Rho*. Izoprenylácia FPP a GGPP je základom aktivácie a intracelulárneho transportu uvedených proteínov, ktoré slúžia ako molekulárne „vypínače“ signálnych dráh, zodpovedných za bunkový tvar, diferenciáciu, motilitu a proliferáciu. (8-11)



Obr. 1 Mechanizmus účinku statínov (12)

Inhibícia farnezylácie / geranylgeranylácie sa preto stala sľubným prístupom k modifikácii proliferácie nádorových buniek skúmanej v mnohých *in vitro* aj *in vivo* štúdiách na rôznych nádorových bunkových línii vrátane melanómu, karcinómu pľúc, kolorektálneho karcinómu a rakoviny pankreasu. (13-16)

V klinickej štúdií preukázali u pacientov užívajúcich chemoterapiu a pravastatín pomalé, ale signifikantné zmenšenie priemeru nádoru jeden rok od začiatku liečby. (17) Metaanalýza 26 štúdií, vykonaná na viac ako troch miliónoch ľudí a 170 000 pacientoch s rakovinou pankreasu, preukázala preventívny účinok statínov v súvislosti s rakovinou pankreasu. (18) Jedna klinická štúdia odhalila, že fluvastatín znižoval proliferáciu a podporoval proapoptotickú aktivitu u pacientov v prvom štádiu rakoviny prsníka. (19)

Statíny v predklinických štúdiách preukázali významné antiproliferatívne a proapoptotické účinky aj na rôzne bunkové línie melanómu. (20-23) Veľké metaanalýzy randomizovaných kontrolovaných klinických štúdií však nedokázali nájsť signifikantnú súvislosť medzi užívaním statínov a nižším výskytom melanómu. (24-26) Populačné štúdie však preukázali, že výskyt melanómu bol o niečo častejší u pacientov, ktorí statíny neužívali. (27)

Kyslé prostredie hrá významnú úlohu pri odumieraní buniek v rôznych patologických stavoch, tak ako aj pri rakovine. Nedostatočná vaskulatúra, prevaha glykolýzy a slabá krvná cirkulácia zapríčiňujú kyslejšie hodnoty pH mikroprostredia nádoru, ktoré môžu dosahovať hodnotu pH až šesť. (28) Acidifikáciou cytosólu bunky dochádza k zmene metabolických ciest, čo vysvetľuje mnohé zmeny v metabolizme nádorových buniek v porovnaní so zdravými bunkami. Na základe štúdií zameraných na expresiu proteínov v kyslejšom pH bolo v cicavčích bunkách identifikovaných množstvo génov, ktorých expresia od pH skutočne závisí. Medzi tieto gény patria gény pre regulačné proteíny, signálne proteíny a externé ligandy. Mnohé zo sledovaných proteínov sa podieľajú na regulácii proliferácie buniek. (29,30)

Nedávno boli identifikované lieky so zvýšenou účinnosťou inhibície proliferácie rakovinových buniek HeLa v kyslých podmienkach. Medzi liekmi, ktorých účinnosť bola zvýšená acidifikáciou, bol aj statín, konkrétne lovastatín (31). My sme sa rozhodli preskúmať účinky ďalšieho lipofilného statínu, konkrétne atorvastatínu na bunkovej línii ľudského melanómu.

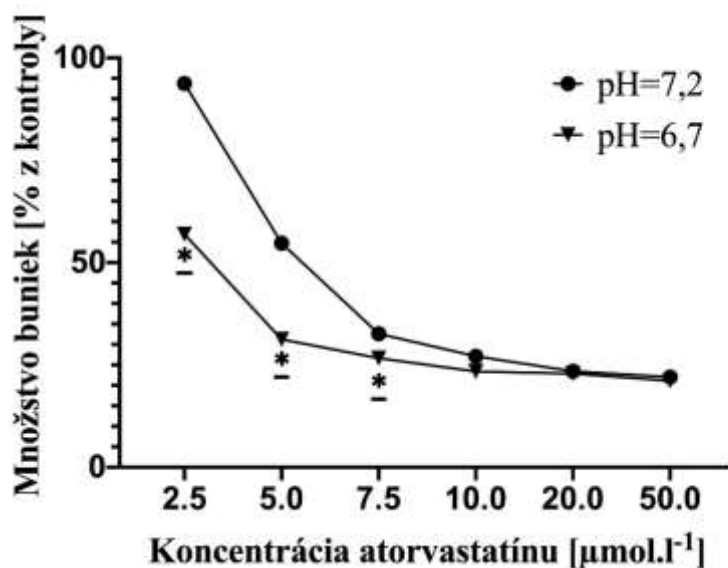
Materiál a metódy

Bunková línia A375 rástla adherentne v médiu DMEM (Sigma-Aldrich) doplnenom 10 % fetálnym bovinným sérom (Sigma-Aldrich) v termostate pri 37 °C vo zvlhčenej atmosfére s 5 % CO₂. Bunky línie A375 sme inokulovali do 96-jamkových kultivačných platní v množstve 5 x 10³ buniek / jamka 24 hodín pred ovplyvnením. Bunky boli ovplyvnené roztokmi atorvastatínu v konečnej koncentrácii 5 – 50 µmol.l⁻¹ a zníženie pH sme zabezpečili pridaním kyseliny mliečnej v konečnej koncentrácii 12 mmol.l⁻¹. MTT skúšku cytotoxicity sme vykonali po 48 hodinách kultivácie podľa odporúčaní výrobcu. Absorbanciu sme merali pri 490 nm pomocou spektrofotometra BioTek EL800 a výsledky sme dokumentovali softvérom BioTek Gen 5.

Štatistickú analýzu údajov sme vykonali pomocou dvojvzorkového T-testu v programe Microsoft Excel 2020. Za štatisticky významnú sme považovali hodnotu $p < 0,05$. Graf bol zostrojený pomocou softvéru GraphPad Prism 9.0.0.

Výsledky

Atorvastatín (IC₅₀: 2,214 µmol.l⁻¹) preukázal štatisticky významne zvýšený antiproliferačný účinok pri zníženom pH. Najvýraznejšiu zmenu v účinku atorvastatínu sme zaznamenali pri najnižších testovaných koncentráciách, konkrétne 2,5 a 5 µmol.l⁻¹. Pri vyšších testovaných koncentráciách atorvastatínu bola zmena menej významná. (Obr. 2) Domnievame sa, že zvýšená účinnosť je spôsobená zmenou metabolických dráh pri acidifikácii cytosólu buniek.



Obr. 2 Vplyv atorvastatínu na viabilitu buniek ľudského melanómu v mierne kyslom prostredí
Bunková línia ľudského melanómu A375, atorvastatín – konečná koncentrácia 2,5 –50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, kultivačné médium DMEM s / bez kyseliny mliečnej (konečná koncentrácia 12 mmol.l^{-1}). Výsledky sú uvedené ako percento z kontrolných buniek. Štatisticky významná hodnota $p < 0,05$ je označená*.

Diskusia

Metastatický melanóm je agresívne ochorenie, ktoré je v mnohých prípadoch identifikované v neskorých štádiách a neodpovedá na väčšinu terapeutických prístupov. Viac ako 80 % pacientov neprejavuje žiadne zmeny pri štandardnej liečbe. (32) Potreba nových liečebných postupov je teda priam nevyhnutná.

Statíny preukázali v predklinických a klinických štúdiách ich výhodné vlastnosti z hľadiska regulácie proliferácie nádorových buniek, ktorá je sprostredkovaná inhibíciou produktov mevalonátovej dráhy, zodpovedných za prenyláciu proteínov. (13-16) Napriek veľkému množstvu výhod užívania statínov, vedľajšie účinky liečby sú v mnohých prípadoch nepríjemné, hlavne pre rizikové skupiny, preto považujeme za dôležité zmenšiť koncentrácie dennej dávky a zároveň zvýšiť ich účinnosť. (33) Fukamachi s kolektívom poukázali na zvýšený anti-proliferačný efekt lovastatínu, simvastatínu a pravastatínu pri $\text{pH} = 6,8$. Collison s kolektívom dokázali, že atorvastatín inhibuje RhoC a RhoA izoprenyláciu, nakoľko biologická funkcia týchto GTPáz je založená na ich posttranslačnej geranylgeranylácii, ktorú atorvastatín inhibuje. (34) Ďalšia štúdia preukázala, že nadmerná expresia *RhoC* proteínu dramaticky zvyšuje metastatický potenciál melanómu *in vivo*. (35) Nami skúmaný atorvastatín má výhodnejšie vlastnosti oproti pravastatínu a lovastatínu, ktoré boli skúmané v štúdiu Fukamachiho a kolektívu. (31,36,37) Naša štúdia preukázala štatisticky významný rozdiel v proliferácii bunkovej línie melanómu účinkom atorvastatínu pri fyziologickom a mierne kyslom pH v *in vitro* podmienkach. Tento jav je pravdepodobne spôsobený fyziologickými zmenami metabolizmu pri acidifikácii, nakoľko Fukamachi a kolektív zaznamenali nižšie koncentrácie lipofilného statínu v cytosóle buniek v kultivačnom médiu s $\text{pH}=6,7$. Na základe dát ich štúdie je pravdepodobné, že funkcia prenylovaných proteínov je závislá od hodnoty pH . (36) Naša štúdia implikuje, že mierne kyslé pH kultivačného média, ktorého hodnota je blízka tej v oblasti nádorov, potencieje účinnosť atorvastatínu. Takéto lieky môžu mať v danej koncentrácii menší vplyv na zdravé tkanivá, ktorých pH je mierne zásadité. Klinické použitie statínov ako chemoadjuvantov je však stále obmedzené, nakoľko presné molekulárne mechanizmy dodnes nie sú známe. Skrining ďalších liekov, ktorých účinok je závislý od pH mikroprostredia, preto považujeme za dôležitý krok pre zvýšenie účinnosti liečby pacientov s rakovinou.

Literatúra

1. <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html> (8.12.2020)
2. **Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al.** Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3635–3648.
3. **Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA.** Treatment of metastatic melanoma: An overview. *Oncology (Williston Park)* 2009; 23: 488-496.
4. **Lui P, Cashin R, Machado M, Hemels M, et al.** Treatments for metastatic melanoma: Synthesis of evidence from randomized trials. *Cancer Treat Rev* 2007; 33:665-680.
5. **Alenghat FJ, Davis AM.** Management of Blood Cholesterol. *JAMA.* 2019; 321 (8): 800-801.
6. **Taylor F, Huffman MD, Macedo AF, et al.** Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; (1): CD004816.
7. **Endo A.** The origin of the statins. *Atheroscler Suppl.* 2004; 5 (3): 125-130.
8. **Nigović B, Mornar A, Sertić M.** A Review of Current Trends and Advances in Analytical Methods for Determination of Statins: Chromatography and Capillary Electrophoresis. 385-428. In: Calderon L. *Chromatography: The Most Versatile Method of Chemical Analysis.* IntechOpen, 2012.
9. **Stancu C, Sima A.** Statins: mechanism of action and effects, *J. Cell. Mol. Med.* 2001; 5: 378–387.
10. **Gazzerro P, Proto MC, Gangemi G, Malfitano AM, Ciaglia E, Pisanti S, Santoro A, Laezza C, Bifulco M.** *Pharmacological Reviews* January 1, 2012; 64 (1): 102-146.
11. **Chow SC.** Immunomodulation by statins: mechanisms and potential impact on autoimmune diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2009; 57: 243–25.
12. **Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F.** New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther.* 1999Dec; 84(3):413-28.
13. **Gbelcová H, Leníček M, Zelenka J, Knejzlík Z, Dvůřáková G. et al.** Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2008 Mar 15; 122 (6): 1214-21.
14. **Maj M, Czajkowski R, Zegarska B, Kowaliszyn B, Pokrywczynska M, Drewa T.** Anti-proliferative and cytotoxic activity of rosuvastatin against melanoma cells. *Postepy Dermatol Alergol.* 2016; 33 (4): 257-262.
15. **Chou CW, Lin CH, Hsiao TH. et al.** Therapeutic effects of statins against lung adenocarcinoma via p53 mutant-mediated apoptosis. *Sci Rep.* 2019; 9: 20403.
16. **Bardou M, Barkun A, Martel M.** Effect of statin therapy on colorectal cancer. *Gut* 2010; 59: 1572-1585.
17. **Kawata S, Yamasaki E, Nagase T. et al.** Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer* 2001; 84: 886–891.
18. **Zhang Y, Liang M, Sun C, Qu G, Shi T, Min M, Wu Y, Sun Y.** Statin Use and Risk of Pancreatic Cancer: An Updated Meta-analysis of 26 Studies. *Pancreas.* 2019 Feb; 48 (2): 142-150.
19. **Garwood ER, Kumar AS, Baehner FL, Moore DH, Au A, Hylton N, Flowers CI, Garber J, Lesnikoski BA, Hwang ES, Olopade O, Port ER, Campbell M, Esserman LJ.** Fluvastatin reduces proliferation and increases apoptosis in women with high grade breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jan; 119 (1): 137-44.
19. **Favero GM, Otuki MF, Oliveira KA, Bohatch MS, Jr, Borelli P, Barros FE, et al.** Simvastatin impairs murine melanoma growth. *Lipids Health Dis.* 2010; 9: 142.
20. **Glynn SA, O'Sullivan D, Eustace AJ, Clynes M, O'Donovan N.** The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. *BMC Cancer.* 2008 Jan 16; 8: 9.
21. **Minichsdorfer C, Hohenegger M.** Autocrine amplification loop in statin-induced apoptosis of human melanoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 2009; 157: 1278–1290.
22. **Saito A, Saito N, Mol W, Furukawa H, Tsutsumida A, Oyama A, et al.** Simvastatin inhibits growth via apoptosis and the induction of cell cycle arrest in human melanoma cells. *Melanoma Res.* 2008; 18: 85–94.

23. **Freeman SR, Drake AL, Heilig LF, Graber M, McNealy K, Schilling LM, et al.** Statins, fibrates, and melanoma risk: a systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98: 1538–1546.
24. **Bonovas S, Nikolopoulos G, Filioussi K, Peponi E, Bagos P, Sitaras NM.** Can statin therapy reduce the risk of melanoma? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Epidemiol.* 2010; 25: 29–35.
25. **Dellavalle RP, Drake A, Graber M, Heilig LF, Hester EJ, Johnson KR, McNealy K, Schilling L.** Statins and fibrates for preventing melanoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Oct 19; (4): CD003697.
27. **Jagtap D, Rosenberg CA, Martin LW, Pettinger M, Khandekar J, Lane D, et al.** Prospective analysis of association between use of statins and melanoma risk in the Women's Health Initiative. *Cancer.* 2012; 118: 5124–5131.
28. **Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4; 144 (5): 646-74.
29. **Fukamachi T, Ikeda S, Wang X, Saito H, Tagawa M, Kobayashi H.** Gene Expressions for Signal Transduction under Acidic Conditions. *Genes (Basel).* 2013 Mar 8; 4 (1): 65-85.
30. **Kobayashi H.** Cancer Chemotherapy Specific to Acidic Nests. *Cancers (Basel)* 2017 Apr 20; 9(4) 36.
31. **Fukamachi T, Chiba Y, Wang X, Saito H, Tagawa M, Kobayashi H.** Tumor specific low pH environments enhance the cytotoxicity of lovastatin and cantharidin. *Cancer Lett.* 2010 Nov 28; 297 (2): 182-9.
32. **Lui P, Cashin R, Machado M, Hemels M, Corey-Lisle PK and Einarson TR.** Treatments for metastatic melanoma: Synthesis of evidence from randomized trials. *Cancer Treat Rev* 2007; 33: 665-680.
33. **<https://www.uptodate.com/contents/statins-actions-side-effects-and-administration>** (9.12.2020)
34. **Collisson EA, Kleer C, Wu M, De A, Gambhir SS, Merajver SD, Kolodney MS.** Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2003 Oct; 2 (10): 941-8.
35. **Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO.** Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature.* 2000 Aug 3; 406 (6795): 532-5.
36. **Fukamachi T, Wang X, Mochizuki Y, Maruyama C, Saito H, Kobayashi H.** Acidic environments enhance the inhibitory effect of statins on proliferation of synovial cells. *Int Immunopharmacol.* 2013 Sep; 17 (1): 148-53.
37. **Schachter M.** Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2005; 19: 117-125.

KRÁTKE PEPTIDY FUNGÁLNEHO PÔVODU AKO NOVÉ BIOAKTÍVNE LÁTKY

(Short peptides of fungal origin as new bioactive substances)

**Koňariková Katarína¹, Olejníková Petra², Víglas Ján², Gbelcová Helena³,
Žitňanová Ingrid¹**

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, katarina.konarikova@fmed.uniba.sk

²Ústav Biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, STU, Radlinského 2101/9, 812 37 Bratislava

³Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Sasinkova 4, 813 72 Bratislava

Súhrn

Vzhľadom na stúpajúci trend rezistencie buniek voči pôvodne účinným štruktúram je nevyhnutné venovať sa hľadaniu nových látok, ktoré by mohli predstavovať účinný nástroj v boji proti nádorovým a infekčným ochoreniam. V súčasnosti sa do popredia dostávajú rôzne trendy hľadania účinných alternatívnych prostriedkov, no ich spektrum je limitované či už rýchlym nárastom rezistencie buniek, prípadne vysokou hladinou toxicity voči zdravým bunkám. Táto práca sa zaoberá aktuálnou problematikou hľadania nových aktívnych zlúčenín s protinádorovými účinkami. Naším cieľom je overiť ich potenciál aj v boji s patogénnymi mikroorganizmami. Biologicky aktívne sa javia štruktúry, ktoré predstavujú sekundárne metabolity vláknitých húb rodu *Trichoderma* sp. Konkrétne ide o krátke peptidy neribozomálneho pôvodu, tzv. peptaiboly.

Kľúčové slová

peptaibiotiká, *Trichoderma* sp., rakovina

Summary

Given the growing trend of cell resistance to originally active structures, it is necessary to look for new substances that could be an effective tool in the fight against cancer and infectious diseases. At present, various trends in the search for effective alternative agents are coming to the fore, but their spectrum is limited either by a rapid increase in cell resistance or a high level of toxicity to healthy cells. This manuscript deals with the current issue of finding new active compounds with antitumor effects. Our goal is to verify their potential also in the fight against pathogenic microorganisms. Structures that represent secondary metabolites of filamentous fungi of the genus *Trichoderma* sp. appear to be biologically active. Specifically, these are short peptides of non-ribosomal origin, so-called peptaibiotics.

Keywords

peptaibiotics, *Trichoderma* sp., cancer

Úvod

Od roku 2010 bolo opísaných približne pol milióna prírodných produktov, z ktorých sa 60 000 až 80 000 odhaduje na mikrobiálny pôvod. Asi polovica z nich vykazuje istý druh biologickej aktivity (1). Fungálna ríša, ktorá v súčasnosti zahŕňa viac ako 98 000 opísaných druhov (2), prispieva asi 30 000 prírodnými produktmi, z ktorých je 15 000 - 16 000 bioaktívnych. Z toho asi 11 250 pochádza z vláknitých húb (3). Peptidové antibiotiká tvoria značnú časť týchto metabolitov vrátane terapeuticky dôležitých β -laktámových antibiotík (penicilíny, cefalosporíny), ktoré tvoria viac ako 65% svetového trhu s antibiotikami. Na trhu stále dominuje neribozomálne biosyntetizovaný cyklosporín A (4).

Charakteristika krátkych peptidov

Peptaiboly sú triedou metabolitov produkovaných niekoľkými druhmi húb. Zvyčajne sú definované ako krátke peptidy, ktoré obsahujú 4–21 aminokyselinových zvyškov, sú bohaté na neproteinogénne aminokyseliny vrátane kyseliny α -aminoizomaslovej (Aib) a kyseliny izovalerovej (Iva), s C-koncovým alkoholom a obsahujú N-terminálnu acetylovú skupinu. Významným producentom neribozomálnych peptidov s vysokou variabilitou štruktúr je vláknitá huba *Trichoderma* sp., ktorú môžeme nájsť v mnohých ekosystémoch. Niektoré druhy sú saprofyty, t.j. živia sa celulóзовými substrátmi (*Trichoderma reesie*), kým iné sú mykoparazity (*Trichoderma virens*, *T. atroviride*) dominantne obývajúce koreňový systém rastlín, kde parazitujú na fytopatogénnych vláknitých hubách a súčasne podporujú rast rastlín a stimulujú ich rezistenciu voči fytopatogénom. Preto sa niektoré druhy týchto húb používajú ako biofungicídy. Predpokladá sa, že antagonistickej aktivite *Trichoderma* sp. dopomáhajú aj (neribozomálne peptidy) NRP, z ktorých časť tvoria peptaiboly (5).

Miesto syntézy krátkych peptidov

Väčšina peptidov je syntetizovaná na ribozómoch, bunkových organelách zodpovedných aj za syntézu proteínov, pričom sa využíva 22 proteinogénnych aminokyselín. Existuje však aj skupina antimikrobiálnych peptidov, ktoré sa označujú ako neribozomálne peptidy (NRP), pretože sú produkované aktivitou syntetáz neribozomálnych peptidov. Na túto syntézu sa využíva celá škála neproteinogénnych aminokyselín (6). Významným producentom antimikrobiálnych peptidov je práve už spomínaná *Trichoderma* sp.

Mechanizmus účinku

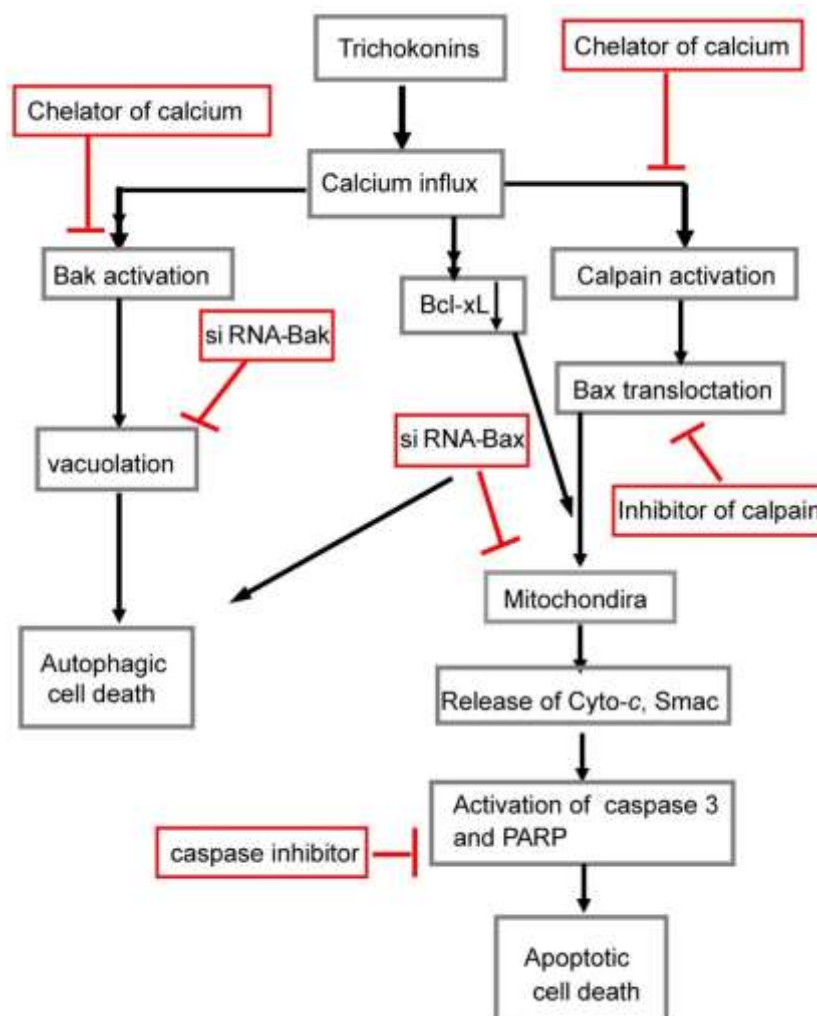
V posledných rokoch sa výskum upriamuje na objasnenie mechanizmu účinku peptaibolov. Ako modelový zástupca sa používa peptid zo skupiny alameticínov (Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phol). Z hľadiska štruktúry bola popísaná helikálna štruktúra, a síce α -helix medzi N-koncom a prolínom 14, kým zvyšok reťazca je sformovaný do 3/10-helixu. (7). Mechanizmus účinku je penetrácia do cytoplazmatickej membrány cieľových buniek a vytváranie pórov (8). Výsledkom schopnosti tvorby pórov je, že väčšina zlúčenín v tejto triede vykazuje špecifické, receptorovo nezávislé cytotoxické vlastnosti voči bakteriálnym a cicavčím bunkám (9). Tvorba pórov v biologických membránach sa všeobecne považuje za základný princíp antibiotickej aktivity membránovo aktívnych peptidov, akými sú aj opisované peptaiboly. V tejto súvislosti sú peptaiboly obzvlášť zaujímavé, pretože mnohé z nich dokážu ovplyvniť membránové napätie, čo je zaujímavé z hľadiska toho, že ide o takmer elektricky neutrálne zlúčeniny. Ešte zaujímavejšie je, že sú schopné penetrovať do membrány nezávisle od ovplyvnenia, alebo neovplyvnenia membránového napätia (10). Exaktný prejav interakcie závisí od pomeru medzi množstvom peptidu a lipidov biologickej membrány. Predpokladá sa, že lipopolysacharid, súčasť vonkajšej membrány bunkovej steny Gram-negatívnych (G-) baktérií interaguje s peptaibolmi a znemožňuje kontakt s cytoplazmatickou membránou (11). V eukaryotických

bunkách sú peptaiboly schopné inhibovať mitochondriálnu ATPázu a odpojiť oxidatívnu fosforyláciu (12).

Účinok peptaibolov na nádorové bunky

V súčasnej dobe je málo štúdií o účinkoch peptaibolov na ľudské zdravé bunky alebo rakovinové bunky. Peltola a kol. uviedli, že peptaiboly z *Trichoderma harzianum* potlačili rast ľudských nádorových buniek pľúc A549 a narušili potenciál mitochondriálnej membrány ($\Delta\Psi_m$) (13). Presný mechanizmus signálnej bunkovej dráhy smrti však nie je známy (14).

Mei Shi a kol. študovali biologický účinok peptaibolov izolovaných z *Trichoderma* spp. a opísali možnú signálnu dráhu bunkovej smrti HepG2. Výsledky poskytli molekulárne dôkazy dvoch typov bunkovej smrti: apoptózy sprostredkovanej vápnikom-kalpainom-Bax a autofágie sprostredkovanej vápnikom-Bak. Bunková smrť indukovaná peptaibolmi môže predstavovať prepletený typ autofágie a apoptózy, ktorý bol predtým neznámy. Peptaiboly spočiatku pôsobili na bunkovú membránu a potom viedli k zvýšeniu hladiny Ca^{2+} z extracelulárneho priestoru. To spustilo aktiváciu Bak proteínu, ktorý sa podieľal hlavne na autofágii, ako aj indukovanú aktiváciu μ -kalpainu. Po aktivácii Bax calpainom sa Bax zase translokoval do mitochondrií, kde podporoval stratu mitochondriálneho membránového potenciálu ($\Delta\Psi_m$) a uvoľňovanie cytochrómu c a Smac / DIABLO. Nakoniec sa aktivovala kaspáza-3 a PARP, čo viedlo k apoptóze. Špecifické vyčerpanie exprese Bak by mohlo čiastočne utlmiť autofágiu indukovanú peptaibolom. Blokovanie Bax proteínu však viedlo k zvýšenej autofágii (14).



Obr. 1 Mechanizmus účinku peptaibolov v bunkách HepG2

Záver

Záverom môžeme povedať, že nové peptaiboly, izolované z *Trichoderma* sp. predstavujú potenciálne významnú skupinu bioaktívnych látok v boji proti nádorovým ochoreniam, najmä pre ich nízku toxicitu, nezávislosť od bunkových receptorov a rýchlu penetráciu. V posledných rokoch sa zvýšil záujem vedeckých tímov o tieto bioaktívne látky v súvislosti so snahou objasniť ich mechanizmus účinku. Tieto antimikrobiálne peptidy vykazujú zvýšenú cytotoxickú aktivitu voči rakovinovým bunkám, ktorá sa vyrovná ich antimikrobiálnej aktivite. Vyššie uvedené štúdie naznačujú, že peptaiboly môžu byť novou triedou kandidátov na protinádorové látky.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla s podporou grantu STU pre mladých vedeckých pracovníkov: Alternatívne prostriedky v boji proti mikrobiálnym infekciám.

Literatúra

1. **Bérđi J.** Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. The Journal of Antibiotics volume 2012; 65: 385–395.
2. **Kirk PM, Stalpers JA, Braun U.** A without-prejudice list of generic names of fungi for protection under the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants. Ima Fungus 2013;4(2):381–443.
3. **Harwani D, Barupal S, Begani J.** Chapter 2 - Genetic diversity of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases in fungi. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, Press, 2020: 11-21.
4. **Rohrich CR, Iversen A, Jaklitsch WM.** Hypopulvins, novel peptaibiotics from the polyporiculous fungus *Hypocrea pulvinata*, are produced during infection of its natural hosts. Fungal Biology 2012; 116 (12): 1219-1231.
5. **Han KY, Azar D, Sabri A.** Characterization of the Interaction Between Endostatin Short Peptide and VEGF Receptor 3. Protein and Peptide Letters 2012; 19 (9): 969-974.
6. **Adhikari B, Banerjee A.** Short-Peptide-Based Hydrogel: A Template for the In Situ Synthesis of Fluorescent Silver Nanoclusters by Using Sunlight. Chemistry aEuropean Journal 2010;16:13698– 13705.
7. **Nagao T, Mishima D, Javkhilantugs N.** Structure and orientation of antibiotic peptide alamethicin in phospholipid bilayers as revealed by chemical shift oscillation analysis of solid state nuclear magnetic resonance and molecular dynamics simulation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes 2015; 1848 (11): 2789-2798.
8. **Degenkolb T, Berg A, Gams W.** The Occurrence of Peptaibols and Structurally Related Peptaibiotics in Fungi and their Mass Spectrometric Identification via Diagnostic Fragment Ions. Journal of Peptide Science 2003; 9: 666-678.
9. **Du L, Risinger AL,** Unique amalgamation of primary and secondary structural elements transform peptaibols into potent bioactive cell-penetrating peptides chemistry 2017,114(43): 8957-8966.
10. **Milov AD, Tsvetkov YD, Raap J.** Review conformation, self-aggregation, and membrane interaction of peptaibols as studied by pulsed electron double resonance spectroscopy. Peptide Science 2015; 106 (1): 6-19.
11. **Raetz CRH, Whitfield C.** Lipopolysaccharide Endotoxins. Annual Review of Biochemistry 2002; 71: 635-700.
12. **Andersson MA, Mikkola R, Raulio M.** Acrebol, a novel toxic peptaibol produced by an *Acremonium exuviarum* indoor isolate. Journal of Applied Microbiology 2009; 106: 909-923.
13. **Peltola J, Ritieni A, Mikkola R.** Biological Effects of *Trichoderma harzianum* Peptaibols on Mammalian Cells. Applied and Environmental Microbiology 2004; 70: 4996-5004.
14. **Shi M, Wang HN, Xie ST.** Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. Molecular Cancer 2010; 9 (26): 1476-4598.

ENTEROPATOGENNÉ *ESCHERICHIA COLI* A KOLOREKTÁLNY KARCINÓM

(Enteropathogenic *Escherichia coli* and Colorectal Cancer)

**Styk Jakub^{1,2}, Klimová Daniela¹, Saade Rami¹, Krasničanová Lucia¹,
Pös Ondrej^{2,3,4}, Szemes Tomáš^{2,3,4}, Repiská Vanda¹**

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, jakub.styk@gmail.com

²Vedecký park Univerzity Komenského, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava

³Geneton s.r.o., Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava

⁴Katedra Molekulárnej Biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, 841 04 Bratislava, Slovensko

Súhrn

Je všeobecne akceptované, že kompozícia črevnej mikrobioty môže vďaka jej úzkemu kontaktu s intestinálnym epitelom ovplyvňovať etiológiu kolorektálneho karcinómu. Intestinálna mikrobiota pozostáva z miliónov mikroorganizmov, asymptomaticky kolonizujúcich ľudské črevo. Jednou z komenzálnych a zdraviu prospešných črevných baktérií je *Escherichia coli*. Niektoré jej kmene však nadobudli v priebehu evolúcie schopnosť spôsobovať u ľudí závažné ochorenia gastrointestinálneho traktu, vrátane indukcie zápalových reakcií čreva a/alebo poškodení DNA. Mnohé štúdie potvrdzujú, že *E. coli* je najbežnejším typom baktérie asociovaným so zápalovými ochoreniami čriev, ktoré sú jedným z predpokladov vzniku kolorektálneho karcinómu. Predložená práca sumarizuje aktuálnu epidemiologickú situáciu kolorektálneho karcinómu, spolu s doterajšími poznatkami o úlohe enteropatogénnych *E. coli* pri rozvoji sporadického kolorektálneho karcinómu.

Kľúčové slová

kolorektálny karcinóm, črevná mikrobiota, *Escherichia coli*

Summary

It is generally accepted that the composition of the gut microbiota may affect the etiology of colorectal cancer due to its close contact with the intestinal epithelium. The intestinal microbiota consists of millions of microorganisms asymptotically colonizing the human gut. One of the commensal and healthy intestinal bacteria is *Escherichia coli*. However, some of its strains have acquired the ability to cause serious gastrointestinal diseases in humans during evolution, including the induction of inflammatory bowel reactions and/or DNA damage. Many studies confirm that *E. coli* is the most common type of bacterium associated with inflammatory bowel disease, which is one of the predispositions for colorectal cancer. In this review summarize the current epidemiological situation of colorectal cancer, together with previous knowledge about the role of enteropathogenic *E. coli* in the development of sporadic colorectal cancer.

Keywords

colorectal carcinoma, gut microbiota, *Escherichia coli*

Úvod

Kolorektálny karcinóm (KRK) patrí medzi jednu z najbežnejšie sa vyskytujúcich malignít vôbec. V celosvetovom meradle sa radí na tretie miesto, s počtom novo-diagnostikovaných prípadov takmer 1.9 milióna (Tabuľka 1), pričom v Európe obsadzuje druhú priečku, ktorá atakuje hranicu 500 000 nových prípadov za rok 2018 (1). KRK predstavuje 10.2 % všetkých prípadov zhubných nádorov na svete, pričom úmrtnosť dosahuje u oboch pohlaví hranicu 880 000 prípadov ročne (1). Uvádza sa, že medzi rokmi 1990 až 2012 vzrástla incidencia ochorenia o viac než 570 000 nových prípadov ročne (2). Táto skutočnosť robí z KRK druhú najbežnejšiu príčinu úmrtia spojenú s onkologickým ochorením vôbec (3). Na Slovensku predstavuje KRK najčastejšie malígne ochorenie u mužov a druhé u žien po rakovine prsníka, a najčastejšie malígne ochorenie vôbec u oboch pohlaví. Tieto údaje umiestňujú Slovenskú republiku v medzinárodnom porovnaní medzi krajiny s najvyšším výskytom KRK (1).

Typ rakoviny	Počet nových prípadov	[%]	Mortalita	[%]	*ASR na 100 000
Pľúca	2 093 876	11.6	1 761 007	18.4	22.5
Prsník	2 088 849	11.6	626 679	6.6	46.3
Kolorektálny karcinóm	1 849 518	10.2	880 792	9.2	19.7
Prostata	1 276 106	7.1	358 989	3.8	29.3
Žalúdok	1 033 701	5.7	782 685	8.2	11.1
Pečeň	841 080	4.7	781 631	8.2	9.3
Pažerák	572 034	3.2	508 585	5.3	6.3
Cervix uteri	569 847	3.2	311 365	3.3	13.1
Štítna žľaza	567 233	3.1	41 071	0.43	6.7
Močový mechúr	549 393	3.0	199 922	2.1	5.7

*ASR (age-standardized incidence rates) – počet novo diagnostikovaných nádorov na 100 000 osôb, vekovo štandardizovaný na svetový vekový štandard (celosvetovo)

Tab. 1 Nové prípady, mortalita a incidencia najčastejších malignít na svete u oboch pohlaví (1)

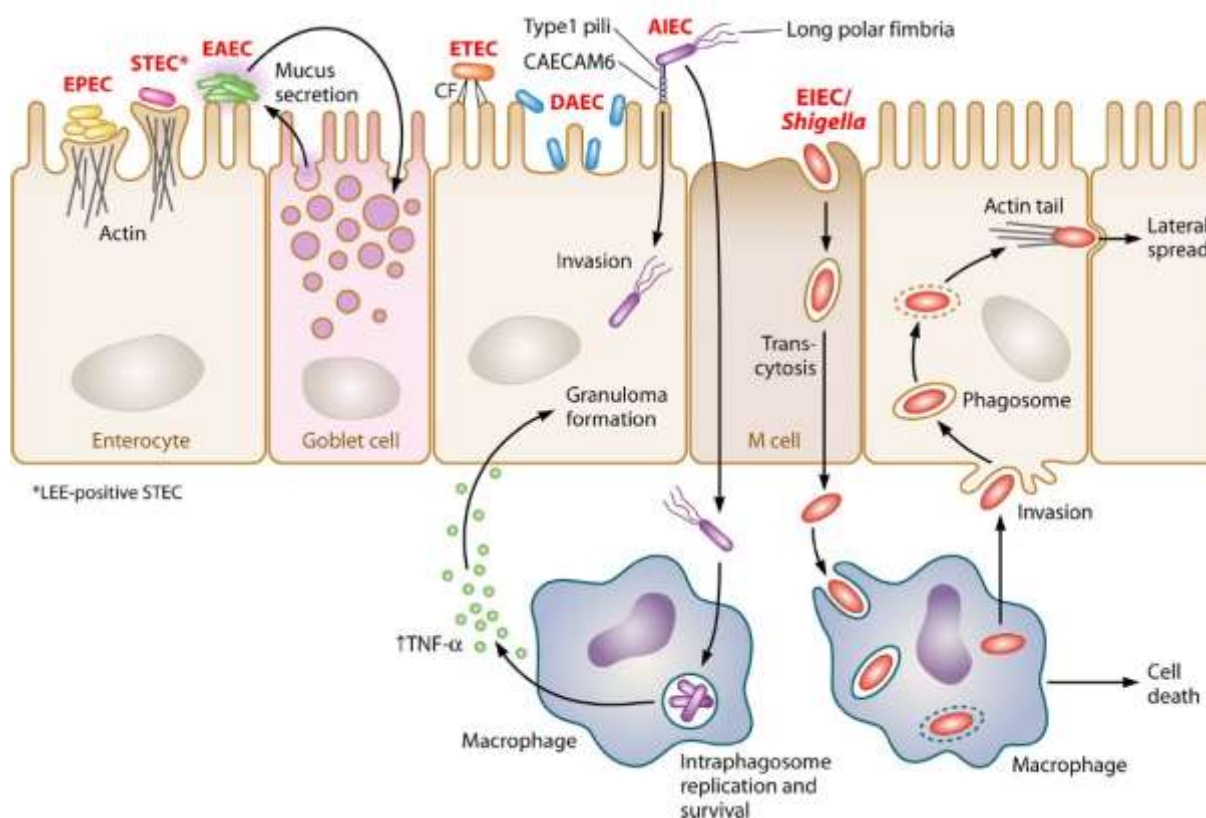
Črevná mikrobiota a IBD

Je všeobecne akceptované, že takmer 70 – 80 % KRK vzniká sporadicky, ako odpoveď na široké spektrum environmentálnych faktorov (5-7). Uvádza sa, že 80 % všetkých prípadov KRK môžeme pripísať zlým stravovacím návykom ovplyvňujúcim zloženie črevnej mikrobioty. Väčšina mikroorganizmov, ktoré sa nachádzajú v tráviacom trakte človeka sú baktérie, s hustotou 10^{13} až 10^{14} buniek na gram fekálnej hmoty. Veľmi rôznorodá a hustá mikrobiota sa vyskytuje predovšetkým v dolných častiach GI traktu. Až 70 % z celkového množstva mikróbov kolonizuje práve hrubé črevo (8). Je všeobecne známe, že zápalové reakcie hrubého čreva, ktoré sú jedným z predpokladov vzniku KRK, sú sprevádzané narušením rovnováhy črevnej mikrobioty. Dramatické zmeny mikrobiálnej kompozície v oblasti nádoru kolorekta a príľahlých slizníc sú označované ako mikrobiálna dysbióza. Bolo zistené, že zápalové ochorenia čriev akými sú Crohnova choroba a Ulcerózna kolitída, sú asociované s patogenicitou istého typu enterovirulentných *Escherichia coli* (9,10). Viaceré klinické štúdie zaznamenali vyššiu prevalenciu týchto baktérií u pacientov s Crohnovou chorobou v porovnaní so zdravými jedincami, čím bol potvrdený ich pro-zápalový potenciál (11,12).

Evolúcia intestinálnych *Escherichia coli*

Baktérie z rodiny *Enterobacteriaceae*, ktoré tvoria približne 0.1 % mikrobiálnej komunity, sú jedným z prvých kolonizátorov ľudského čreva (13). K zástupcom patriacich do tejto rodiny,

dosahujúcich v čreve novorodenca vysoké hustoty je zaradovaná aj *Escherichia coli*, ktorej početnosť sa počas života stabilizuje a to až do staroby, kedy dochádza k jej postupnému poklesu (14). *E. coli*, ako všadeprítomná baktéria, do veľkej miery asymptomaticky kolonizujúca ľudské črevo, je rozšíreným intestinálnym komenzálom (16). Slúži ako dokonalý model pre štúdium prechodu z neškodného komenzálneho stavu na závažného patogéna (16). Komenzálne kmene *E. coli* sú v tráviacom trakte lokalizované predovšetkým v slepom a hrubom čreve, nachádzajú sa v hlienovej vrstve. Jednou z hlavných úloh stabilnej črevnej mikrobioty *E. coli* je predchádzať kolonizácii patogénmi. Táto funkcia je sprostredkovaná pomocou špecifických látok - bakteriocínov (14). Avšak na druhej strane, *E. coli* je zaradovaná k všestranným patogénom, spôsobujúcim u ľudí závažné ochorenia (17). Bolo zistené, že prepojenie medzi baktériou a jej hostiteľom môže kolísať medzi mutualistickým komenzálom a oportunistickým, či dokonca špecializovaným patogénom (14).



Obr. 1 Schéma adhérencie a invazivity enterovirulentných patogénnych *E. coli*

Enteropatogénne *E. coli* (EPEC) a LEE-pozitívne Shiga toxín produkujúce *E. coli* (STEC) sú extracelulárnymi patogénmi, ktoré formujú charakteristické A/E lézie. Enterotoxické *E. coli* (ETEC) využívajú na pripojenie k intestinálnym bunkám kolonizačný faktor (CF). Enteroagratívne *E. coli* (EAEC) formujú na povrchu intestinálnej mukózy biofilm, adherujú k sebe navzájom a rovnako aj k bunkovému povrchu a vytvárajú agregatívnu adhérenciu (AA). Difúzne adherentné *E. coli* (DAEC) sú rozptýlené na povrchu črevných buniek, čo vedie k ich difúznej adhérencii. Adherentne-invazívne *E. coli* (AIEC) kolonizujú sliznicu pacientov s Crohnovou chorobou a sú schopné atakovať črevný epitel a replikovať sa v makrofágoch. AIEC používajú na príľnutie k enterocytom pilusy typu I a dlhé polárne fimbrie, ktoré prispievajú k ich invázii. Enteroinvazívne *E. coli* (EIEC)/*Shigella* sú intracelulárne patogény, ktoré cez M bunky prenikajú črevným epitelom až k submukóze. EIEC/*Shigella* unikajú makrofágom vďaka indukcii ich bunkovej smrti. Po následnej bazolaterálnej invázii kolonocytov, dochádza k ich laterálnemu šíreniu. Upravené podľa (18).

Mobilné genetické elementy hrajú v evolúcii *E. coli* dôležitú úlohu (19). Plazmidy, ktoré nesú jednotlivé faktory virulencie, sa v procese konjugácie prenášajú medzi baktériami a donorovi poskytujú nové vlastnosti (20). Na základe spôsobu intestinálnej patogenézy a prítomnosti faktorov virulencie existuje niekoľko patogénnych variantov (patotypov) *E. coli*. Sú to: enteropatogénne *E. coli* (EPEC), Shiga toxín produkujúce *E. coli* (STEC), ku ktorým zaradujeme enterohemorragické *E. coli* (EHEC), enteroinvazívne *E. coli* (EIEC), enteroagregatívne *E. coli* (EAEC), difúzne adherentné *E. coli* (DAEC), enterotoxické *E. coli* (ETEC) a adherentne-invazívne *E. coli* (AIEC) (Obrázok 1) (18). Už v roku 1998 Swidsinski et al. (21) ako prví poukázali na kolonizáciu intestinálnej mukózy intracelulárnymi baktériami *E. coli* u pacientov s kolorektálnym karcinómom, ako aj adenómom, na rozdiel od asymptomatických kontrol. Tieto invadujúce EPEC boli detegované až u 87 % pacientov. Rovnako Martin et al. (22) potvrdili prítomnosť týchto patogénov aj u pacientov s Crohnovou chorobou. Preukázali, že *E. coli* spájané s Crohnovou chorobou adherujú a invadujú epitelové bunky *in vitro*. Najpočetnejšou skupinou spomedzi črevných patogénov *E. coli* sú EPEC, ktoré nesú 35.6 kb ostrov patogenicity LEE (*locus of enterocyte effacement*) Tento génový klaster je zodpovedný za formovanie charakteristického fenotypu A/E (*attaching and effacing*) na povrchu intrstinálneho epitelu (Obrázok 1). McDaniel a Kapper (23) zároveň poukázali na samostatnosť ostrova LEE jeho klonovaním z EPEC do pôvodne nepatogénneho kmeňa *E. coli*, ktorý následne vytváral A/E fenotyp. Okrem EPEC, aj AIEC, indukujú lokálny zápal u jedincov so zápalovými ochoreniami čriev, vrátane Crohnovej choroby a Ulceróznej kolitídy (9, 24).

Úloha črevných patogénov v kolorektálnej tumorigenéze

Narastajúci počet štúdií potvrdzuje asociáciu medzi mikrobiálnou dysbiózou a kolorektálnou karcinogénou (25-27). Boli opísané rôzne druhy baktérií s ich pro-karcinogénnymi vlastnosťami, vrátane indukcie zápalových reakcií čreva a/alebo produkcie karcinogénnych metabolitov. Gagnière et al. (28) preukázali, že istý typ patogénnych *E. coli* produkujúci genotoxín colibaktín, kódovaný komplexnou multienzymovou polyketid syntázou, lokalizovanou na ostrove patogenicity *pks* (*polyketide synthetase*), ktorý napomáha tvorbe dvojlákových zlomov DNA prejavujúcich sa chromozomálnou instabilitou, môže v kolorektálnej karcinogénou plniť úlohu *driver* baktérie. Zvýšená prítomnosť colibaktín produkujúcich *E. coli* bola v rámci KRK zaznamenaná vo viacerých štúdiách (29,30). To podporuje model označovaný ako *driver-passenger* (31), ktorý hovorí o úlohe črevných baktérií v kolorektálnej karcinogénou. Ten tvrdí, že *driver* baktérie, pôvodne kolonizujúce črevo hostiteľa, iniciujú vznik KRK prostredníctvom indukcie DNA poškodení v epitelových bunkách čreva. Takouto baktériou by mohli byť napríklad enteropatogénne a/alebo colibaktín produkujúce *E. coli*. Predpokladá sa, že tieto zmeny podporujú proliferáciu *passenger* baktérií, ktorým práve nádorové mikroprostredie poskytuje vhodné rastové podmienky. Na druhej strane, model nazývaný *alpha-bug* (32) hovorí, že členovia mikrobiálnej komunity (*alpha-bug* baktérie) disponujú faktormi virulencie a pro-karcinogénnymi vlastnosťami. Takéto baktérie majú schopnosť remodelovať črevný mikrobióm na takú mikrobiálnu kompozíciu, ktorá indukuje pro-zápalové imunitné odpovede a spôsobuje transformáciu črevných epitelových buniek, vyúsťujúcu k rakovine. Okrem iného, *alpha-bug* baktérie selektívne vytlačujú také druhy baktérií, ktoré svojou prítomnosťou chránia črevný epitel. Je známe, že najčastejšie identifikovanými baktériami u pacientov s KRK v porovnaní so zdravými kontrolami sú so sliznicou asociované *E. coli*. Predchádzajúce štúdie preukázali, že tento typ intestinálnych *E. coli* je v porovnaní s kontrolami často prítomný v tkanivových vzorkách hrubého čreva u pacientov s KRK, ako aj adenómom (21,22,33). Swidsinski et al. uvádza, že len 3 % biopsií získaných zo zdravej črevnej sliznice vykazovali prítomnosť intestinálnych *E. coli*. Naproti tomu, až 92 % biopsií pacientov s rakovinou hrubého čreva vykazovalo prítomnosť baktérií, s dominantným zastúpením *E. coli* u 70 % pacientov (21).

Záver

Rakovina je po srdcovocievnych chorobách druhou najčastejšou príčinou úmrtia. Celosvetovo stúpajúca incidencia KRK dosahuje alarmujúce čísla. Je známe, že symbiotické interakcie medzi mikroorganizmami a GI traktom človeka prispievajú k udržiavaniu intestinálnej homeostázy. Zmeny v kompozícii črevnej mikrobioty však môžu viesť k narušeniu tohto vzťahu a vyústiť do mikrobiálnej dysbiózy, ktorá spolu s bakteriálnou infekciou považovaná za dôležitý faktor v etiológii mnohých ľudských ochorení, vrátane KRK. Klinické štúdie zamerané na identifikáciu bakteriálnej kompozície u zdravých ľudí a pacientov s kolorektálnym adenómom alebo karcinómom potvrdzujú, že dysbióza črevnej mikrobioty môže prispieť

k rozvoju KRK. Je preto nesmierne dôležité aby sme ani v čase celosvetovej pandémie ochorenia COVID-19 nezabúdali na skutočnosť, že KRK má na svedomí takmer milión ľudských životov ročne. Prevencia rizikovej skupiny obyvateľstva a včasná diagnostika rakoviny hrubého čreva, doplnená o zdravé stravovacie návyky vedúce k stabilnej črevnej mikrobiote, môže spolu so špičkovým vedeckým výskumom prispieť k zníženiu tejto alarmujúcej bilancie ako vo svete, tak na Slovensku.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená projektom ITMS2014: 313011V578.

Literatúra

1. <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers> (28. 10. 2020)
2. **Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al.** Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136 (5): E359-386.
3. **Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Yoldi MJR.** Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future perspective in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18 (1): 197.
4. **Whiffin N, Hosking FJ, Farrington SM, et al.** Hum Mol Genet. Identification of susceptibility loci for colorectal cancer in genome-wide meta-analysis. 2014; 23 (17): 4729-4737.
5. **Bishehsari F, Mahdavinia M, Vacca M, Malekzadeh R, Costantini RM.** Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: Environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (20): 6055-6072.
6. **Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, et al.** Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* 2016; 352 (6285): 565-569.
7. **Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, et al.** Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; 334 (6052): 105-108.
8. **Rosenbaum M, Knight R, Leibel RL.** The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2015; 26 (9): 493-501.
9. **Barnich N, Darfeuille-Michaud A.** Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23(1):16-20.
10. **Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, et al.** Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 2009; 206 (10): 2179-2189.
11. **Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, et al.** Culture independent analysis of ilea mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of clostridiales in Crohn's disease involving ileum. *ISME J* 2007; 1 (5): 403-418.
12. **Dogan B, Scherl E, Bosworth B, Yantiss R, et al.** Multidrug resistance is common in *Escherichia coli* associated with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19 (1): 141-150.
13. **Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, et al.** Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308 (5728): 1635-1638.

14. **Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E.** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8 (3): 207-217.
15. **Kaas RS, Friis C, Ussery DW, Aarestrup FM.** Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics* 2012; 13 (1): 577.
16. **Pinheiro da Silva F, Aloulou M, Skurnik D, et al.** CD16 promotes *Escherichia coli* sepsis through and FcR gamma inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. *Nat Med* 2007; 13 (11): 1368-1374.
17. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2014; 2(2): 123-140.
18. **Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB.** Recent in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26 (4): 822-880.
19. **Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, et al.** Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 2016; 60 (5): 1136-1151.
20. **Breibart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, et al.** Matagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol* 2003; 185 (20): 6220-6223.
21. **Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, et al.** Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998; 115 (2): 281-286.
22. **Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, et al.** Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004; 127 (1): 80-93.
23. **McDaniel, TK, Kaper JB.** A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* 1997; 23 (2): 399-407.
24. **Barnich N, Darfeuille-Michaud A.** Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23 (1):16-20.
25. **Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, et al.** Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One* 2011; 6 (1): e16393.
26. **Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang Ch.** Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota patients with colorectal cancer. *PLoS One* 2012; 7 (6): e39743.
27. **Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H.** Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol* 2015; 6 (20). 10.3389/fmicb.2015.00020.
28. **Gagnière J, Bonnin V, Jarrousse AS, Cardamone E, et al.** Interaction between microsatellite instability and human gut colonization by *Escherichia coli* in colorectal cancer. *Clin Sci (Lond)* 2017; 131 (6): 471-485.
29. **Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, et al.** Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*; 2012; 338 (6103): 120-123.
30. **Prorok-Hamon M, Friswell MK, Alswied A, Roberts CL, et al.** Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing IpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut* 2014; 63 (5): 761-770.
31. **Tjalsma H, Boleij A, Marchesi, J. R., Dutilh, B. E.** A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10 (8): 575-582.
32. **Sears CL, Pardoll DM.** Perspective: Alpha-Bugs, Their Microbial Partners, and the Link to Colon Cancer. *J Infect Dis* 2011; 203 (3): 306-311.
33. **Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, Darcha C, et al.** Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal risk. *Clin Cancer Res* 2014; 20 (4): 859-867.

V. UROLÓGIA

EPIDEMIOLOGIA, INCIDENCIA A DIAGNOSTIKA UROLITIÁZY U DETÍ

(Epidemiology, incidence and diagnosis of urolithiasis in children)

*Novotná Oľga, Zatkuliaková Simona, Ďubjaková Petra, Polák Michal,
Breza Ján, Bartoň Peter*

*Klinika pediatrickej urológie LFUK a NÚDCH, Limbová 1, 833 40 Bratislava
olli.novotna@gmail.com*

Súhrn

Urolitiáza v detskom veku je závažným problémom so stúpajúcou incidenciou. Primárnou snahou terapeutického manažmentu je ochrana obličiek pred sekundárnym poškodením. U detí sú recidívy ochorenia veľmi časté, nakoľko v detskom veku sa často pod urolitiázou podpisujú dedičné metabolické ochorenia.

Kľúčové slová

urolitiáza, incidencia, dedičné metabolické ochorenia, diagnostika

Summary

Urolithiasis in children is serious medical condition with increasing incidence. Therapy of urolithiasis deserves special effort due to prevent secondary renal damage. Recurrence of urolithiasis in children are frequent because urolithiasis in children is caused by inherited metabolic disorder.

Keywords

urolithiasis, incidence, inherited metabolic disorder, diagnostics

Urolitiáza v detskom veku je závažnou klinickou jednotkou, najmä v dôsledku častých recidív, vysokého rizika obštrukcie a náročnosti chirurgickej. Z tohto dôvodu by úsilie malo byť zamerané na odhaľovanie metabolických porúch s príslušnou liečbou. Dosiahnutie tzv. stone-free rate (SFR) je prioritným cieľom, v určitých situáciách (oxalóza, nefrokalcinóza) sa nepodariť dosiahnuť očakávaný efekt.

Konkrementy v močovom mechúri sa v rozvojových krajinách vyskytujú pomerne často, príčinou bývajú nutričné faktory. Za posledné desaťročia stúpol ich výskyt signifikantne. V súčasnosti sa pohybuje približne 14,5 prípadov na 100 000 detí. Mnohí autori upozorňujú, že akútna hospitalizácia pre urolitiázu je omnoho častejšia, ako v minulosti. Nie je však úplne jasné, či ide o skutočný vzrast incidence, alebo o lepšiu diagnostiku. Postihuje všetky vekové kategórie a je mierne častejšia u chlapcov. Incidencia a charakteristika vzniku litiázy poukazuje na geografické odlišnosti. Aj keď sa všeobecne považuje urolitiáza v detskom veku za pomerne zriedkavé ochorenie, pomerne často sa vyskytuje v určitých svetových oblastiach. Je zriedkavejšia, ako v dospelom veku, pričom protektívny význam sa pripisuje vyššej koncentrácii inhibítorov kryštalizácie v moči, najmä citrátu a magnézia. Jej endemický výskyt prevažuje hlavne v Turecku, Pakistane, južných častiach Ázie, Afrike a štátoch južnej Ameriky. Nedávne epidemiologické štúdie dokazujú stúpajúcu incidenciu urolitiázy v západných

krajinách, najmä u dievčat kaukazskej etniky, afroameričanov a celkovo u starších detí. Najväčší význam v rozdieloch podmienených geografickými dátami má stravovanie a diétne návyky. Zvýšená konzumácia živočíšnych bielkovín a solí a nárast obezity v detskom veku sa jednoznačne podpisujú na zvýšenej tvorbe konkrementov. Ukazuje sa, že určitý vplyv má aj zloženie pitnej vody. Viac než 70% konkrementov je zložených z kalcium-oxalátu, pričom infekčné konkrementy sa častejšie vyskytujú u mladších jedincov. Ich zloženie pozostáva najmä z kryštálov kyseliny močovej. Pacienti s augmentovaným močovým mechúrom tvoria ďalšiu dôležitú skupinu s 15% rizikom vzniku urolitiázy. Priamou príčinou vzniku konkrementu je nepomer medzi saturáciou minerálnych solí a látok, ktoré limitujú rast a agregáciu kryštálov. Ďalším predispozičným faktorom je dlhodovo znížený objem moču, nefyziologické pH moču, anatomická obštrukcia a infekcia. Mnohé lieky taktiež napomáhajú kryštalizácii. Platí však, že ak je prítomná dedičná metabolická porucha, konkrementy sa vytvárajú aj bez uplatňovania litogénnych faktorov.

Diagnostika

Kvalitná diagnostika jednoznačne prispieva eliminácii sekundárneho poškodenia obličiek. U detí sa stretávame s pomerne častými recidívami, za ktoré sú zodpovedné rôzne metabolické abnormality. Čím mladšie je dieťa, u ktorého je urolitiáza potvrdená, tým je podozrenie na metabolickú abnormalitu vyššie. Vo väčšine prípadov je podrobná anamnéza nevyhnutná pre stanovenie rýchlej a správnej diagnózy. Je popísaný familiárny výskyt urolitiázy u členov rodiny, preto by otázky mali byť nasmerované aj týmto smerom (hematúria, konkrementy, renálne zlyhanie). Zvlášť sa informujeme o špeciálnych atribútoch výživy dieťaťa, pitnom režime, užívaných liekoch a doplnkoch výživy. Rôzne chronické ochorenia čriev môžu vytvárať predisponujúce faktory na vznik konkrementov (Crohnova choroba, cystická fibróza). V dojčenskom veku môže byť konkrement prvým príznakom autozómovo dominantnej formy polycystických obličiek. Klinické príznaky sú vekovo závislé, s častým nálezom hematúrie a bolestivosťou v boku u starších detí. Konkrementy môžu byť aj dlhodobo asymptomatické. Nešpecifické príznaky (nepokoj, zvracanie) sa nezriedka objavujú u malých detí. K obvyklejším symptómom patrí bolesť brucha a kolika, čo môže spôsobovať diferenciálno-diagnostické ťažkosti pri odlíšení od apendicitídy. Makrohematúria prezentujúca sa s/bez bolestivosti sa vyskytuje zriedkavejšie. Non-glomerulárna mikrohematúria sa zaznamenáva frekventovane a neraz býva jediným príznakom. V niektorých prípadoch, infekcia v moči býva jediným nálezom, ktorý vedie k rádiologickým zobrazovacím vyšetreniam, pri ktorých sa konkrement identifikuje. Z ďalších príznakov sa objavuje sterilná leukocytúria, retencia moču, gastrointestinálne príznaky (vracanie, plynatosť, obštipácia). Ak dôjde k uviaznutiu konkrementu v distálnej lokalizácii, prevládajú príznaky v zmysle dysúrie, retencie moču, častého močenia, či pomočovania, hematúria a horúčka. U dojčiat môže byť konkrement v uretre aj hmatný. Konkrement lokalizovaný v obličke býva často asymptomatický, najmä u najmenších detí. K príznakom patrí znížená koncentračná schopnosť tubulov, renálna kolika, sterilná leukocytúria a hematúria.

Zobrazovacie metódy

Vo všeobecnosti, USG býva iniciálnym vyšetrením. Pomocou USG sa prehľadne zobrazujú konkrementy v obličke. Výsledok sonografického vyšetrenia môže byť ovplyvnený zložením konkrementu. Výhodou sonografie je jeho široká dostupnosť, nulová radiačná záťaž a včasné posúdenie stázy v dutom systéme. Nevýhodou je nižšia senzitivita najmä drobných konkrementoch, ktorých meranie pomocou USG je menej reprodukovateľné a je ovplyvnené skúsenosťami vyšetrujúceho lekára. Mnoho rádioopacitných konkrementov sa znázorní na natívnej snímke brucha. Najsenzitívnejšou metódou na detekciu urolitiázy je nekонтрастné špirálovité CT vyšetrenie. Je bezpečné a rýchle, s 97% senzitivitou a 96% špecificitou. Napriek vysokej diagnostickej

presnosti a radiálnej záťaži sa CT vyšetrenie používa iba pri nejasných nálezoch pri USG vyšetrení/RTG snímke brucha. Nízkodávkové protokoly boli vyvinuté na zníženie radiačnej záťaže. Intravenózna pyelografia sa zriedkavo využíva u detí, ale môže byť potrebná na zobrazenie kalichopanvičkového systému pri perkutánnej extrakcii konkrémentu, ev. otvorenom prístupe. Fosfátové a oxalátové konkrémenty sú na RTG a CT vysoko denzné. Struvitové a cystínové kamene majú strednú denzitu. Podanie kontrastnej látky vyžadujú konkrémenty kyseliny močovej, pre svoju nízku denzitu na RTG. U novorodencov a predčasne narodených detí bývajú depozity Tamm-Horsfallovho proteínu na základe sonografického vyšetrenia mylne pokladané za nefrokalcinózu. Tieto depozity vymiznú počas prvých dvoch týždňov života.

Metabolické zhodnotenie

Kvôli vysokej miere recidív a incidencii predisponujúcich faktorov spôsobujúce urolitiázu, každé dieťa s verifikovaným konkrémentom by malo podstúpiť kompletné metabolické vyšetrenie.

Metabolické vyšetrenie zahŕňa:

- rodinná a osobná anamnéza metabolických odchýliek and diétnych zvyklostí
- analýza zloženia konkrémentu
- elektrolyty, krvný obraz/urea/dusík, kreatinín, kalcium, fosfor, alkalická fosfatáza, kyselina močová, celkové bielkoviny, uhľičitany, albumín a parathormón (ak je prítomná hyperkalcémia)
- rozbor moču a kultivácia, zahrňujúc pomer kalcium-kreatinín
- objem moču, merná hmotnosť a pH
- mikroskopické vyšetrenie moču, zahrňujúc 24-hodinový moč na kalcium, fosfor, magnézium, oxalát, citráty v moči a klírens kreatinínu
- 24-hodinová analýza moču na cystín, ak sa predpokladá cystinúria (pozitívny nitroprusidový test, cystínový konkrément, cystínové hexagonálne kryštály v moči).

Už prvotné biochemické vyšetrenia môžu byť nápomocné pri zisťovaní príčiny. Vylúčiť, resp. potvrdiť dedičné metabolické ochorenie je dôležité z hľadiska nastavenia špecifickej liečby, bez ktorej dochádza k recidívam a poškodeniu obličiek. Výsledky môžu byť skreslené prítomnou infekciou, obštrukciou alebo prítomnosťou fragmentov konkrémentu po litotripsii. Jednou z najdôležitejších diagnostických metód je kvalitatívna analýza konkrémentu, ktorý je získaný po spontánnej pasáži alebo po intervencii. Len jedna tretina konkrémentu obsahuje len jednu zložku. Popísané by mali byť všetky zložky konkrémentu, aj množstvá menšie ako 1 mg, lebo to má vplyv na liečebný režim. Analýze by mali byť podrobené aj konkrémenty pri recidivujúcej urolitiáze, lebo ich zloženie sa môže meniť. Chemická analýza konkrémentu je v súčasnosti obsolétna. Kryštalickú štruktúru konkrémentu využívajú analytické metódy založené na RTG žiarení. Infračervená spektroskopia je založená na strate energie v infračervenom spektre. Presnú analýzu sprostredkuje graf oboch metód (fingerprints).

Literatúra

1. **Lupták, J.** Urolitiáza. Martin : Osveta, 2012
2. **Brennerová, K., Podracká, I.** Diferenciálna diagnostika nefrolitiázy u detí. In *Pediatrica pre prax*, č. 3, roč. 17, 2017, s. 98-101
3. **Šťastná S., Vacková M.** Urolitiáza a dedičné metabolické poruchy. In *Urologie pri praxi* č. 4, 2004
4. **Muntau, C., A.** *Pediatric*. Praha : Grada, 2009
5. **Horn, F.** *Detská chirurgia*. Bratislava : SAP, 2014
6. **Tanagho, E., McAninch, J. W.** *Všeobecná urológia*. Martin : Osveta, 2006
7. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2020. ISBN 978-94-92671-07-3. Dostupné na : <https://uroweb.org/guideline/paediatric-urology/#6>

TYPY KONKREMENTOV MOČOVÝCH CIEST

(Types of urinary stones)

***Novotná Oľga, Zaf'kuliaková Simona, Ďubjaková Petra, Polák Michal,
Breza Ján, Bartoň Peter***

*Klinika pediatrickej urológie LFUK A NÚDCH, Limbová 1, 833 40 Bratislava,
olli.novotna@gmail.com*

Súhrn

Proces vzniku konkrementov je komplexným dejom vzniknutým na podklade metabolických a anatomických porúch, v mnohých prípadoch s pridruženou infekciou. Tri najčastejšie príčiny nefrokalcinózy v detstve sú: hyperkalciurické stavy, distálna tubulárna acidóza a hyperoxalúria. Nález kameňov z oxalátu vápenatého u starších detí a dospelých často nie je spojený s hyperoxalúriou. Kalciové konkrementy sú tvorené poväčšine z kryštálov kalcium–oxalátu a kalcium–fosfátu. K ďalším typom konkrementov u detí patria urátové a cystínové konkrementy, ktoré môžu vznikať na základe metabolického ochorenia. V detskom veku sa však stretávame aj s konkrementmi infekčnými, v tomto prípade treba pátrať aj po prítomnosti obštrukčnej uropatie.

Kľúčové slová

kalciové konkrementy, hypocitrátúria, hyperkalciúria, hyperoxalúria, metabolické vyšetrenie

Summary

Urinary stone formation is the result of the complex process involving metabolic, anatomical factors and the presence of infection. In childhood, the three most common causes of nephrocalcinosis are hypercalciuric states, distal renal tubular acidosis, and the hyperoxalurias. The finding of calcium oxalate stones in older children and adults is often not associated with hyperoxaluria. Calcium stones are usually made from calcium oxalate and calcium phosphate. Uric acid stones and cystine stones are another types of stones, which can be caused by metabolic illness. We can see also infection stones in children's age, it is important to search for obstructive uropathy in this case.

Keywords

calcium stones, hypocitraturia, hypercalciuria, hyperoxaluria, metabolic evaluation

Kalciové konkrementy sú tvorené poväčšine z kryštálov kalcium–oxalátu a kalcium–fosfátu. Supersaturácia vápnika (hyperkalciúria) a oxalátu (hyperoxalúria), alebo znížená koncentrácia inhibítorov litiázy, ako je citrát (hypocitrátúria) a magnézium (hypomagnezémia) zohrávajú zásadnú rolu v procese formovania kalcium-oxalátových konkrementov. (1)

Hyperkalciúria: Je definovaná zvýšeným 24-hodinovým vylučovaním vápnika v moči - viac ako 4 mg/kg/deň (0.1 mmol/kg/deň) u dieťaťa s hmotnosťou < 60 kg. U detí mladších ako 3 mesiace, horný limit normálneho vylučovania vápnika je 5 mg/kg/deň (0.125 mmol/kg/deň) (2)

Hyperkalciúria sa rozdeľuje na idiopatickú a sekundárnu. Idiopatická hyperkalciúria sa diagnostikuje v prípade, že laboratórne, klinické a rádiologické vyšetrenia nepoukážu na základnú príčinu vedúcu k hyperkalcémii. Exkrécia kalcia v moči sa môže zvyšovať u pacientov s vysokým príjmom natriumckonhloridu. U sekundárnej (hyperkalcémickej) hyperkalciúrii, vysoké sérové hodnoty vápnika sú spôsobené buď nadmernou kostnou resorpciou (hyperparathyroidizmus, hyperthyroidizmus, imobilizácia, acidóza, metastatické ochorenie) alebo gastrointestinálnou hyperabsorpciou (hypervitaminóza D). (3)

Vhodným skriningovým testom na dôkaz hyperkalciúrie je pomer kalcia a kreatinínu v moči. Normálny pomer kalcia-kreatinínu je menej než 0,2. V prípade, že kalkulovaný pomer je vyšší ako 0,2, vyžaduje sa opakovanie testu. (2,3) U novorodencov a batoliat sa zisťujú vyššie hodnoty vylučovaného kalcia a nižší kreatinín v moči ako u starších detí.

Ak pretrváva zvýšený pomer, 24-hodinový zber moču dokáže zhodnotiť exkréciu kalcia.

24-hodinový test zameraný na exkréciu kalcia močom je štandardným vyšetrením na stanovenie diagnózy hyperkalciúrie. Ak exkrécia kalcia prevyšuje 4 mg/kg/deň (0.1 mmol/kg/deň), diagnóza hyperkalciúrie je potvrdená a nie je nutné ďalšie vyšetrenie: hladiny bikarbonátu v sére, kreatinínu, alkalické fosfatázy, kalcia, fosfátu, magnézia, pH a parathormónu. (2, 4) Čerstvo vymočený objem sa meria na stanovenie pH moču. 24-hodinová analýza moču by mala zahŕňať aj vyšetrenie fosfátu, sodíka, magnézia, kyseliny močovej, citrátov a oxalátov.

Prvotným terapeutickým krokom je zvýšenie príjmu tekutín. Diétne opatrenia sú nevyhnutnou zložkou efektívnej terapie. Dieťa sa má konzultovať u dietológa na rozpis odporúčaného príjmu kalcia, živočíšnych bielkovín a sodíka. Diétne úpravy príjmu sodíka a vápnika sa majú udržiavať podľa potreby dieťaťa. Nízkokalciová diéta sa môže vyskúšať na posúdenie, či prijatý vápnik alebo jeho hyperabsopcia je prispievajúcim faktorom vysokej hladiny kalcia v moči. Príjem vápnika by nemal klesať pod dennú hladinu normy. A navyše, nízkokalciová diéta môže prispievať aj k vzniku iných konkrementov.

Hydrochlorothiazid a iné thiazidové diuretiká sa užívajú na liečbu idiopatickej hyperkalciúrie, v iniciálnej dávke 0.5-1 mg/kg/deň. Pri dlhotrvajúcom užívaní tiazidových diuretík môže nastať zníženie hypokalciúrie najmä po 3. mesiaci s následnou hypokaliémiou, hypocitraturiou, hyperurikémiou a hypomagnézémiou. Preto sa odporúča skontrolovať v pravidelných intervaloch krvný obraz spolu s vnútorným prostredím. Terapia citrátovými prípravkami je vhodná pri nízkych hladinách citrátov alebo pri pretrvávaní hyperkalciúrie. (5)

Hyperoxalúria

Iba 10-15% oxalátov pochádza z diéty

V priemere dieťa vylúči menej ako 50 mg(0.57 mmol)/1.73 m²/deň, kým batola vylúči 4-násobne viac oxalátov. Hyperoxalúria môže vzniknúť pri zvýšenom diétnom príjme, enterálnej hyperabsopcii (syndróm krátkeho čreva) alebo pri vrodenej poruche metabolizmu.

V zriedkavo sa vyskytujúcej primárnej hyperoxalúrii, jeden z dvoch enzýmov, ktoré zohrávajú úlohu v metabolizme oxalátov, je deficientný. Obličkové zlyhanie môže nastať po nadmernom ukladaní kalcium-oxalátu v obličkách s jeho následným ukladaním v iných tkanivách (oxalóza). Diagnostika je založená na laboratórnych nálezoch významne zvýšenej hyperoxalúrie a klinických príznakoch. Definitívna diagnóza sa určí po stanovení enzýmovej aktivity

po biopsii pečene.

Iné formy hyperoxalúrie môžu byť spôsobené hyperabsorpciou oxalátu pri zápalovom črevnom ochorení, pankreatitíde a syndróme krátkeho čreva. U väčšiny detí sa zisťuje ľahká idiopatická hyperoxalúria, oxaláty v moči bývajú iba mierne zvýšené. Liečba hyperoxalúrie pozostáva so navodenia zvýšeného vylučovania moču, reštrikcie oxalátov v diéte a pravidelného prísunu vápnika. Pyridoxín môže byť prínosný v znižovaní hladín oxalátov v moči, najmä pri primárnej hyperoxalúrii. Citrátové prípravky zvyšujú inhibičný vplyv. (6)

Hypocitrátúria

Citrát je inhibítorom litiázy. Viaže sa na vápnik a vytvára s ním nerozpustné soli, čím zabraňuje ďalšiemu rastu a agregácii kalcium-oxalátových ako aj kalcium-fosfátových kryštálov. Nízka hladina citrátov v moči môže indukovať tvorbu kalciových konkrementov. U dospelých, hypocitrátúria značí znížené vylučovanie citrátov pod hladinu 320 mg/deň (1.5 mmol/deň). Táto hodnota musí byť u detí upravená podľa veľkosti tela. (7)

Hypocitrátúria sa obvyčajne vyskytuje bez pridružených symptómov a známej metabolickej poruchy. Môže sa vyskytovať v spojení s metabolickou acidózou, distálnou tubulárnou acidózou alebo hnačkovitým syndrómom.

K environmentálnym faktorom znižujúcich hladinu citrátov patrí vysoký príjem bielkovín a soli. Percento hypocitrátúrie varíruje od 30% do 60% u detí s kalciovou urolitiázou. (7)

Úprava normálnej hladiny citrátov redukuje tvorbu konkrementov, aj keď v súčasnosti existuje málo štúdií u detí dosvedčujúcich ich efekt. Na liečbu hypocitrátúrie sa využíva kaliumcitrát v iniciálnej dávke 1 mEq/kg, rozdelené do dvoch dávok. Vedľajšie účinky kaliumcitrátu sú veľmi zriedkavé a najčastejšie sa vyskytujú gastrointestinálne nevoľnosti. Káliumcitrát sa musí užívať s opatrnosťou pri hyperkaliémii a chronickej renálnej insuficiencii.

Urátové konkrementy

Konkrementy z kyseliny močovej tvoria 4-8% z celkového množstva konkrementov u detí. Kyselina močová je konečným produktom purínového metabolizmu. Hyperurikozúria je hlavnou príčinou tvorby kameňov u detí. Denný výdaj kyseliny močovej viac ako 10 mg/kg/deň (0,6 mmol/kg/deň) je považovaný za hyperurikozúriu.(8)

Formovanie urátových konkrementov je závislé zvýšenom vylučovaní kyseliny močovej. Rozpúšťanie kyseliny močovej je výrazne znížené pri pH < 5.8. Čím je pH alkalickéjšie, tým sa zvyšuje rozpustnosť kryštálov kyseliny močovej a znižuje sa riziko vzniku urátových konkrementov.

U familiárnej alebo idiopatickej formy hyperurikozúrie deti vykazujú normálne sérové hladiny kyseliny močovej. U iných detí môže nastať zvýšená produkcia kyseliny močovej následkom vrodenej poruchy metabolizmu, myeloproliferatívneho procesu, alebo vzniká pri zlyhaní bunkového metabolizmu. Hyperurikozúria býva spôsobená taktiež nadmerným príjmom purínov a bielkovín. Aj keď hyperurikozúria sa môže podieľať na vzniku kalcium-oxalátových konkrementov u dospelých, u detí nebýva významným faktorom.

Urátové konkrementy bývajú RTG–nekontrastné. Na natívnej snímke brucha sa urátové konkrementy nezobrazujú. USG a nekontrastné CT patria medzi diagnostické vyšetrenia.

Alkalizácia moču patrí k hlavným terapeutickým krokom, je prevenciou vzniku urátových konkrementov. Citrátové prípravky sa využívajú na alkalizáciu moču. Udržiavanie alkalického pH moču v rozmedzí 6-6,5 postačuje na prevenciu vzniku konkrementov. V prípade zlyhania konzervatívnej liečby s pretrvávajúcim hyperurikozúrie a hyperurikémiie, rekurencie konkrementov alebo myeloproliferatívneho ochorenia, môže sa podávať Allopurinol v dávke (10mg/kg). Táto liečba môže mať nežiadúce účinky (vyrážky, hnačky, eozinofília) a má sa užívať s opatrnosťou pri chronickom obličkovom zlyhaní.

Cystínové konkrementy

Cystinúria sa podieľa na vzniku cystínových konkrementov v 2-6%. Je to inkompletná recesívna autozomálna porucha charakterizovaná poruchou renálnych tubulov reabsorbovať 4 základné aminokyseliny: cystín, ornitín, lyzín a arginín.

Cystín má najnižšiu rozpustnosť v moči zo všetkých 4 aminokyselín, preto iba cystínové konkrementy sa vytvárajú pri ich nadmernom vylučovaní. Rozpustnosť cystínu je pH závislá, precipitácia kryštálov začína pri pH < 7.0. Iné metabolické odchýlky, ako hyperkalcúria, hypocitrátúria a hyperurikozúria môžu sprevádzať cystinúriu a tým formovať konkrementy

zmiešanej konzistencie. Cystínové konkrementy sú RTG slabo opacitné a ťažšie vizualizovateľné na RTG snímke. Sú tvrdé a pomocou ESWL(extracorporeal shockwave lithotripsy) sa cystínové konkrementy ťažšie dezintegrujú.

Liečba smeruje k zníženiu saturácie cystínov v moči a zvýšeniu jej rozpustnosti. Iniciálna liečba pozostáva z vysokého príjmu tekutín a alkalizujúcich prípravkov, ako napr. káliumcitrát, ktorý udržiava pH nad 7,0 (optimálne nad 7,5). Ak táto liečba zlyháva, užívanie alphasmercaptopropionyl glycínu alebo D-penicilaminu môže zvýšiť rozpustnosť cystínu, redukuje hladinu cystínu v moči a zabraňuje vzniku konkrementu. Vedľajšie účinky týchto liekov sú mierne a zahŕňujú gastrointestinálne ťažkosti(chuťové zmeny a zápach), teploty, vyrážky, môžu sa vyskytnúť aj závažnejšie vedľajšie účinky ako útlm kostnej drene, nefrotický syndróm a epidermolýza. (9)

Infekčné konkrementy (struvity)

Struvitovité konkrementy tvoria približne 5% urolitiázy u detí. Incidencia sa zvyšuje nad 10% v mladších vekových skupinách (10) a ne-endemických oblastiach (11, 12). Baktérie štiepiace ureu pomocou enzýmu ureázy (Proteus, Klebsiella, Pseudomonas) sú zodpovedné za vznik infekčných konkrementov.

Ureáza štiepi ureu na amoniak a bikarbonát, pričom sa zvyšuje pH moču. Z zásaditom prostredí sa strojnásobuje formovanie fosfátov s následnou supersaturáciou magnéziomamóniofosfátom s karbonatitom, ktorý vedie k tvorbe kameňov.

Terapeutickým postupom je nielen odstránenie konkrementu, ale aj súčasná antibiotická liečba. Odporúčaným krokom je aj zhodnotenie obštrukčnej uropatie spôsobujúcu poruchu odtoku moču a samotnú infekciu.



Obr. 1 Typy konkrementov

Literatúra

1. **Saitz, T.R., et al.** 24 Hour urine metabolic differences between solitary and multiple stone formers: Results of the Collaboration on Urolithiasis in Pediatrics (CUP) working group. J Pediatr Urol, 2017. 13: 506.e1 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28526618/>
2. **Kruse, K. et al.** Reference values for urinary calcium excretion and screening for hypercalciuria in children and adolescents. Eur J Pediatr, 1984. 143: 25 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6510426/>
3. **Sargent, J.D., et al.** Normal values for random urinary calcium to creatinine ratios in infancy. J Pediatr, 1993. 123: 393 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8355114/>
4. **Stapleton, F.B., et al.** Urinary excretion of calcium following an oral calcium loading test in healthy children. Pediatrics, 1982. 69: 594 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7079015/>
5. **Curhan, G.C., et al.** A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. N Engl J Med, 1993. 328: 833 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8441427/>

6. **Bartosh, S.M.** Medical management of pediatric stone disease, *Urol. Clin. North Am*, 2004. 31: 575. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15313066/>
7. **Defoor W., et al.** Results of a prospective trial to compare normal urine supersaturation in children and adults. *J. Urol.* 2005, 174: 1708. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16148687/>
8. **Bartosh, S.M.** Medical management of pediatric stone disease. *Urol Clin North Am*, 2004. 31: 575. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313066>
9. **Tekin, A., et al.** Cystine calculi in children: the results of a metabolic evaluation and response to medical therapy. *J Urol*, 2001. 165: 2328. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11371943>
10. **Gabrielsen, J.S., et al.** Pediatric urinary stone composition in the United States. *J Urol*, 2012. 187: 2182. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503021>
11. **Kirejczyk, J.K., et al.** An association between kidney stone composition and urinary metabolic disturbances in children. *J Pediatr Urol*, 2014.10: 130.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23953243>
12. **Rellum, D.M., et al.** Pediatric urolithiasis in a non-endemic country: a single center experience from The Netherlands. *J Pediatr Urol*, 2014. 10: 155. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23981680>

MANAŽMENT LIEČBY UROLITIÁZY

(Management of urolithiasis treatment)

***Novotná Oľga, Polák Michal, Zatlík Simona, Ďubjaková Petra,
Brezina Ján, Bartoň Peter***

*Klinika pediatrickej urológie LFUK A NÚDCH, Limbová 1, 833 40 Bratislava,
olli.novotna@gmail.com*

Súhrn

Litotripsia rázovými vlnami je v prevažnej miere metódou voľby v liečbe nefrolitiázy. Ureterorenoskopia zohráva kľúčovú rolu pri liečbe ureterolitiázy. Na našom pracovisku najprv zavádzame stent do obličky na zabezpečenie pasívnej dilatácie močovodu. U pacientov s kongenitálnou obštrukčnou uropatiou sa odstraňujú konkrementy súčasne s korekciou obštrukcie v močovode alebo obličkovej panvičke. Konkrementy v močovom mechúri sa poväčšine odstraňujú cystoskopicky, zriedkavo pri objemných konkrementoch sa využíva otvorená cesta odstránenia konkrementov.

Kľúčové slová

ureterorenoskopia, ESWL, otvorená/laparoskopická cesta odstraňovania konkrementov, dezintegrácia litiázy.

Summary

Extracorporeal shock wave lithotripsy is the method of choice in treatment of nephrolithiasis in paediatric patients. Ureteroscopy has a predominant role in patients with ureterolithiasis. We use to place a ureteral stent before endoscopic correction for passive enhancement of ureter. In patients with congenital obstructive uropathy of ureter or pelvis, we use to correct obstruction by open/laparoscopic surgical correction with extraction of calculi simultaneously. Bladder stones are extracted via cystoscopy, rarely via open procedure in a large calculus.

Keyword

ureterorenoscopy, ESWL, open/laparoscopic correction, disintegration of calculus

Dostatočný príjem tekutín (2,5 – 3 l/24hod) a reštrikcia soli v dennom príjme patria k všeobecným opatreniam. Samozrejmosťou býva špecifická liečba metabolickej poruchy. Zdokonalením technického vybavenia sa liečba posunula z otvorených operácií k endoskopickým postupom odstraňovania konkrementov, ktoré sú menej invazívne ako klasický otvorený chirurgický prístup. Rozhodnutie o spôsobe liečby závisí najmä od počtu, veľkosti, lokalizácie, zloženia konkrementu a morfológie odtokových močových ciest. U konkrementov do veľkosti 4-5 mm, ktoré sú asymptomatické, sa môže očakávať ich spontánny odchod. Neexistuje konsenzus medzi veľkosťou konkrementu pre danú vekovú kategóriu a trvaním sledovania odchodu konkrementu. V literatúre sa udáva benefit medikamentoznej expulznej terapie (MET) využívajúcej α -blokátory, avšak u detí sú skúsenosti s expulznou terapiou limitované.

V súčasnosti sa u detských pacientov preferuje ESWL terapia (Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy), vďaka ktorej sa dá odstrániť veľká väčšina konkrementov. Liečba sa môže aplikovať na obličkové konkrementy, ďalej konkrementy uložené v močovode a taktiež

aj v močovom mechúri. Perkutánný prístup umožňuje odstránenie konkrementov nachádzajúce sa v obličke. Iba malé percento pacientov vyžaduje klasický otvorený chirurgický prístup odstraňovania konkrementov. Snaha by mala byť zameraná na elimináciu všetkých zvyškov konkrementu, lebo iba u 20-25% pacientov dôjde k spontánnemu odchodu zvyšných rezíduí v následnom pooperačnom období. Kongenitálna obštrukčná uropatia by sa mala korigovať simultánne s odstránením konkrementu na prevenciu recidívy vzniku.

Extrakorporálna litotripsia rázovými vlnami (ESWL)

Priemerný počet rázových vln sa pohybuje okolo 1,800, 2,000 (až do 4,000) a priemerná sila sa pohybuje medzi 14 kV a 21 kV. Použitie USG a RTG zobrazenia významne znížilo radiačnú expozíciu a ukázalo sa, že deti sú vystavené signifikantne nižšej radiačnej záťaži ako dospelí. Preferovaná je celková anestézia u pacientov mladších ako 10 rokov, konvenčná intravenózna sedácia alebo kontrolovaná analgézia je ďalšou možnosťou pri spolupracujúcich starších detí. Úspešnosť (Stone-free rate - SFR) je ovplyvnená viacerými faktormi. Odhliadnuc od lokalizácie, pri progresii konkrementu, SFR sa významne znižuje a zvyšuje sa pravdepodobnosť opakovanej liečby. Úspešnosť liečby klesá s narastajúcou veľkosťou konkrementu: < 1 cm, 1-2 cm, > 2 cm - 90%, 80%, 60%, postupne.

Lokalizácia konkrementu je významným faktorom ovplyvňujúci úspech liečby. Kamene uložené v panvičke a hornom močovode, odpovedajú lepšie na ESWL. Pre tieto lokalizácie, úspešnosť odstránenia kameňov (SFR) sa pohybuje okolo 90%. Všeobecne platí, že ESWL je menej efektívna pri nefrolitiáze lokalizovaná v dolnej kalichovej skupine. Niekoľko štúdií demonštrovalo 50 – 62% úspešnosť liečby kameňov dolnej kalichovej skupiny pomocou ESWL.

Extrakorporálna litotripsia rázovými vlnami sa môže použiť aj na liečbu ureterolitiázy. Názory na liečbu sa rozchádzajú. Úspešnosť liečby klesá pri lokalizácii konkrementu v distálnom úseku močovodu, navyše môžu nastať aj technické problémy so zamierením konkrementu v tejto lokalite.

Zavedenie ureterálnej endoprotézy neovplyvňuje efekt liečby, no celkové komplikácie sa častejšie vyskytovali u pacientov bez stentu. Endoprotéza je potrebná u pacientov so solitárnou obličkou podstupujúca ESWL liečbu. U pacientov s veľkými alebo odliatkovými konkrementami je zvýšená pravdepodobnosť vzniku tzv. Steinstrasse (kameňová cesta) s následným vznikom obštrukcie po ESWL terapii. Po litotripsii rázovými vlnami pri vzniku obštrukcie močových ciest nahromadenými zvyškami konkrementu je potrebné zavedenie stentu alebo punkčnej nefrostómie.

Rozbor Hounsfieldových jednotiek (HU) konkrementu pri nekontrastnom CT vyšetrení sa ukázal ako prediktívny faktor úspešnosti liečby. Úspešnosť liečby pomocou ESWL sa zvyšuje pri konkrementoch s menej ako 600 HU. Zistilo sa, že mužské pohlavie, mladší vek, menšia veľkosť konkrementu, solitárny konkrement, lokalizácia mimo dolný pól a negatívna anamnéza intervencie sú priaznivými faktormi úspešnosti liečby u detí pomocou ESWL procedúry.

Komplikácie spôsobené ESWL u detí bývajú mierne a prechodné.

Medzi najčastejšie komplikácie patrí:

- obličková kolika
- prechodná hydronefróza
- dermálna ekchymóza
- IMC
- vznik Steinstrasse
- sepsa
- hemoptýza (zriedkavo)

U detí so sterilným pôdy pri kultivácii moču, antibiotická profylaxia sa neodporúča. Úsilie by malo byť zamerané na sterilizáciu moču pred samotným ESWL, URS alebo perkutánnou nefrolitotómiou – PCNL

Perkutánná nefrolitotómia (PCNL)

Litotripsia rázovými vlnami je v prevažnej mierne metódou voľby v liečbe nefrolitiázy. Pre väčšie a odliatkové konkrementy sa môže využiť aj perkutánná forma liečby. Predoperačné vyšetrenia, indikácie a samotná chirurgická technika je rovnaká ako u dospelých. Vo väčšine prípadov, PCNL sa využíva ako monoterapia, ale býva aj doplnkovou liečbou.

U detí (hlavne u malých detí), PCNL poskytuje určité výhody, ako napríklad menšia rana, jednoduchá dilatácia kanála a uloženie nefroskopu, primeraný pracovný kanál a v neposlednom rade znížená cena.

Ako monoterapia, PCNL je efektívnou a bezpečnou metódou. Úspešnosť (SFR) liečby sa pohybuje medzi 86,9 a 98,5% po prvej dobe. Táto miera sa zvyšuje po tzv. second look, či už je to opakovaná PCNL, URS alebo ESWL. Dokonca aj pri kompletných odliatkových konkrementoch, SFR sa blíži k 89% po prvej dobe.

Najčastejšou komplikáciou PCNL u detí býva krvácanie, pooperačné febrility a infekcia, perzistujúci únik moču. Krvácanie vyžadujúce transfúziu sa udáva v 10% prípadov a úzko súvisí s veľkosťou konkrementu, operačným časom, veľkosťou pracovnej pošvy a počtom punkcií. V nedávnych štúdiách, pooperačné infekčné komplikácie, ako febrility s alebo bez dokumentovanej IMC, sa vyskytujú v menej ako 15%. Príčinou febrilných stavov nie vždy býva infekcia. Moderné príslušenstvo (13-14F pracovnej pošvy) umožňuje vykonať miniatúrnu PCNL(‘miniperc’) alebo ultramini PCNL (UMP) s významne nižšími krvnými stratami. Nedávna štúdia odhalila, že microperc poskytuje podobné SFR a mieru komplikácií a znižuje percento pridružených liečebných metód v porovnaní ESWL v liečbe urolitiázy u detí.

Pre konkrementy od 10-20 mm, mikro-PCNL ukázalo porovnateľné výsledky s menšími krvnými stratami ako pri mini-PCNL. Táto technika sa využíva pri konkrementoch < 2 cm, so zavedeným permanentným katétrom alebo „double pigtailom“. A navyše, ďalšou možnosťou je aj použitie USG na vytvorenie prístupu v supinačnej polohe.

Priemerný pooperačný čas hospitalizácie je podobný ako u dospelých. Odhaduje sa na 3-4 dni a je výrazne kratší ako pri otvorenom prístupe. Táto miniinvazívna metóda liečby nefrolitiázy u detí sa javí ako sľubná metóda.

Ureterorenoskopia

Zvyšujúce sa množstvo endourologických prístrojov menších rozmerov umožňuje liečbu ureterolitiázy u detských pacientov.

Technika ureterorenoskopie detí je podobná ako u dospelých. Odporúča sa použiť vodiaci drôt a celú procedúru vykonať pod optickým dohľadom. Dilatácia ureterovezikálneho spojenia a zavedenie stentu je kontroverzné. Na našom pracovisku poväčšine pred ureterorenoskopiou zavádzame v prvom kroku stent do močovodu na pasívne rozšírenie lúmenu močovodu, následne o niekoľko týždňov sa v tzv. „second step“, vykonáva ureterorenoskopia s extrakciou/dezintegráciou konkrementu. Vo všeobecnosti, dilatácia ureteru sa vykonáva iba vo vybraných prípadoch. Existujú rôzne techniky litotripsie, či už ultrazvuková (sonotróda), pneumatická alebo laserová. Všetky sa ukázali ako bezpečné a efektívne.

Všetky štúdie poukazujú, že ureterorenoskopia ako endoskopická liečba ureterolitiázy nemá vplyv na vznik striktúry či vezikoureterálneho refluxu. Pooperačná striktúra závisí od prítomnosti zaklíneneho konkrementu alebo poranenia močovodu počas operácie. Úspešnosť ureterorenoskopie u detí s použitím semirigidného prístroja sa odhaduje na 90%.

V poslednom období sa čoraz častejšie využívajú na odstránenie konkrementov flexibilné ureterorenoskopy. Touto metódou sa dajú odstrániť intrarenálne a ureterálne konkrementy.

U pacientov pri flexibilnej ureterorenoskopii sa nezvyklo dilatovať orifícium, dôraz sa kládol na používanie ureterálnej pošvy. Pri nemožnosti retrográdneho zavedenia ureterorenoskopu do močovodu sa v prvom kroku ponechá stent v močovode na pasívnu dilatáciu močovodu, v druhom kroku sa pokračuje ureterorenoskopiou. Úspešnosť liečby sa pohybuje od 60-100% so zanedbateľným počtom komplikácií. Potreba doplňujúcich zákrokov sa zvyšovala s veľkosťou konkrémentu. Porovnávacia štúdia poukázala, že retrográdna ureterorenoskopia ma podobné výsledky ako ESWL po troch mesiacoch, s menším počtom doplňujúcich procedúr. Pre konkrémenty väčšie ako 2 cm, retrográdna ureterorenoskopia dosahovala nižší SFR oproti mini-PCNL, výhodami boli najmä nižšia radiačná záťaž, menšie množstvo komplikácií, kratší čas hospitalizácie. Na druhej strane, pri konkrémentoch veľkosti od 10-20 mm, sa pomocou retrográdnej ureterorenoskopie podarilo dosiahnuť podobné percento SFR a komplikácií, s kratšou hospitalizáciou a nižšou radiačnou záťažou oproti micro-PCNL.

Otvorené alebo laparoskopické odstránenie konkrémentu

Mnoho konkrémentov u detských pacientov sa odstraňuje pomocou ESWL alebo pomocou endoskopických metód. V niektorých situáciách je potrebná klasická chirurgická otvorená cesta odstránenia konkrémentu. Vhodnými kandidátmi sú veľmi malé deti s veľkými konkrémentami, s/bez pridružených kongenitálnych obštrukčných uropatií vyžadujúce chirurgickú korekciu. Je taktiež potrebná u detí s ťažkými deformitami kostí limitujúce polohovanie pacienta na endoskopickú liečbu.

V niektorých prípadoch sa laparoskopická technika môže použiť ako alternatívna liečba otvorenej chirurgii. Vhodnými kandidátmi sú pacienti pri predchádzajúcej neúspešnej endoskopickej korekcii, komplexné anatomické anomálie (ektopicky uložený črevný segment), prítomná obštrukcia v ureteropelvickej junkcii, divertikel kalicha, megaureter alebo veľký zaklíněný konkrémentom. Môže sa použiť laparoskopický alebo roboticko-asistovaný transperitoneálny a retroperitoneálny prístup. S týmito metódami sú limitované skúsenosti a nemali by sa používať ako rutinná terapeutická modalita.

Konkrémenty v močovom mechúri sa obvykle odstraňujú endoskopicky. Otvorený chirurgický prístup sa využíva iba pri rozsiahlych konkrémentov alebo pri vzniku anatomickej prekážky konkrémentom.

Literatúra

1. **Alken P, Hutschenreiter G, Gunther R, et al.** Percutaneous stone manipulation. J Urol 1981;125:463–6.
2. **Assimos DG, Boyce WH, Harrison LH, et al.** The role of open stone surgery since extracorporeal shock wave lithotripsy. J Urol 1989;142(Pt. 1): 263–7.
3. **Chaussy C, Fuchs G.** [Extracorporeal lithotripsy in the treatment of renal lithiasis. 5 years' experience.]. J Urol (Paris) 1986;92:339–43, [in French].
4. **Sabnis RB, Ganesamoni R, Doshi A, et al.** Micropercutaneous nephrolithotomy (microperc) vs retrograde intrarenal surgery for the management of small renal calculi: a randomized controlled trial. BJU Int 2013;112: 355–61.
5. **Schuster TG, Hollenbeck BK, Faerber GJ, et al.** Ureteroscopic treatment of lower pole calculi: comparison of lithotripsy in situ and after displacement. J Urol 2002;168:43–5.
6. **Segura JW, Patterson DE, LeRoy AJ, et al.** Percutaneous removal of kidney stones: preliminary report. Mayo Clin Proc 1982;57:615–9.

AKÚTNE SKRÓTUM

(Acute scrotum)

***Novotná Oľga, Zatlík Simona, Polák Michal, Ďubjaková Petra,
Breza Ján, Bartoň Peter, Siváček Matúš***

*Klinika pediatrickej urológie LFUK A NÚDCH, Limbová 1, 833 40 Bratislava,
olli.novotna@gmail.com*

Súhrn

V detskej urológii je akútne skrótum naliehavý stav najčastejšie spôsobený torziou testis, torziou appendix testis alebo epididymitídou prípadne epididymo-orchitídou. Prejavuje sa bolestivosťou, opuchom a začervenaním skróta. Neadekvátne vyšetrenie a oneskorenie v diagnostike a liečbe môže mať za následok ireverzibilné poškodenie až stratu testis. Preto je potrebné urýchlene posúdiť stav a vylúčiť podmienky ohrozujúce plodnosť a v prípade potreby urgentne naplánovať chirurgické riešenie. Ultrazvuk je vyšetrovací nástroj nevyhnutný na vyhodnotenie akútneho skróta, umožňuje rýchle zobrazenie bez radiačného žiarenia a možnosť hodnotiť centrálny arteriálny prívod krvi a venóznú drenáž testis pomocou farebného Dopplerovho zobrazovania. Fyzické vyšetrenie a správne vykonaná Doppler ultrasonografia umožňuje adekvátne vyhodnotiť akútne skrótum u detí a dospievajúcich. V zriedkavých prípadoch, kedy nie je diagnostika jasná je metódou voľby chirurgické riešenie. Torzia testis predstavuje približne 25% prípadov akútneho skróta.

Kľúčové slová

testis, torzia, skrótum, ultrazvuk, chirurgické riešenie

Summary

Acute scrotum is a paediatric urological emergency, most commonly caused by torsion of the testis or appendix testis, or epididymitis/epididymo-orchitis. It is manifested by pain, swelling and redness of the scrotum. Inadequate examination and delays in diagnosis and treatment can result in irreversible damage or loss of testis. Therefore, it is necessary to urgently review the condition and exclude conditions threatening fertility and, if necessary, urgently plan a surgical treatment. Ultrasound is an examination tool necessary for the evaluation of acute scrotum, it enables fast imaging without radiation and the possibility to evaluate the central arterial blood supply and venous drainage of the testis using color flow Doppler. Physical examination and properly performed Doppler ultrasonography allows adequate evaluation of acute scrotum in children and adolescents. In the rare cases where the diagnosis is not clear, the surgical treatment is the method of choice. Torsion of the testis accounts for approximately 25% of cases of acute scrotum.

Keywords

testis, torsion, scrotum, ultrasonography, surgical treatment

Úvod

Epidemiológia, etiológia a patofyziológia

V detskej urológii je akútne skrótum naliehavý stav najčastejšie spôsobený torziou testis, torziou appendix testis alebo epididymitídou prípadne epididymo-orchitídou. (1) Ďalšími príčinami akútnej bolesti skróta sú idiopatický skrotálny edém, orchitída pri zápale príušných žliaz (mumps), varikokéla, hydrokéla, hematóm v skrotálnej oblasti, inkancerovaná hernia, appendicitída alebo systémové ochorenia ako napr. Henoch-Schnönlein purpura. (2) Trauma môže byť príčinou akútneho skróta, pretože môže súvisieť s post-traumatickými hematómami, testikulárnou kontúziou. (3)

Torzia testis sa vyskytuje hlavne v neonatálnom období a počas puberty, zatiaľ čo torzia appendix testis sa vyskytuje v širšom vekom rozmedzí. Epididymitída postihuje 2 vekové skupiny: menej ako jeden rok a dvanásť až pätnásť rokov. (4)

Štúdiá predpovedala ročný výskyt epididymitídy približne 1,2 na 1000 chlapcov. (5) Perinatálna torzia testis najčastejšie vznikne prenatálne. Bilaterálna torzia zahŕňa 11-21% všetkých perinatálnych prípadov. (6) Rozlišuje sa intravaginálna a extravaginálna torzia. Za normálnych podmienok testis pokrýva tunica vaginalis, je pripevnená k posterolaterálnemu povrchu testis, pričom neumožňuje veľkú pohyblivosť testis. U pacientov s vysokým úponom tunica vaginalis (tzv. bell clapper deformita) môže dôjsť k rotácii testis na úrovni spermatického povrazca v cavum serosum scroti. Dlhé mezentérium medzi testis a epididymis vedie zriedkavo k torzii testis. Extravaginálna torzia sa vyskytuje prevažne v perinatálnom období. Súvisí s nedokonalým úponom testis na úrovni gubernakula. Väčšina prípadov je extravaginálna torzia v porovnaní s obvyklou intravaginálnou torziou, ku ktorej dochádza počas puberty.

Diagnostické vyšetrenie

Pacienti majú bolesti v skrotálnej oblasti, okrem novorodeneckej torzie. Náhlý nástup bolesti v kombinácii s vracaním je typický pre torziu testis alebo torziu appendix testis. (7) Vo všeobecnosti je trvanie príznakov kratšie pri testikulárnej torzii (69% je prítomných do 24 hodín) a torzii appendix testis (62%) v porovnaní s epididymitídou (31%). (1)

Vo včasnej fáze vyšetrenia môže viesť lokalizácia bolesti k správnej diagnostike. Pacienti s akútnou epididymitídou majú citlivý až bolestivý nadsemenník, zatiaľ čo torziou testis majú bolestivý semenník a pacienti s torziou appendix testis pociťujú izolovanú bolestivosť na hornom póle semenníka. (8) Abnormálna (horizontálna) poloha testis je častejšia pri testikulárnej torzii ako pri epididymitíde. (1)

Chýbanie Kremasterového reflexu je jednoduchou vyšetrovacou metódou so 100% senzitivitou a 66% špecificitou svedčiacou pre torziu testis (7) Elevácia skróta môže spôsobiť vymiznutie bolesti pri epididymitíde, ale nie pri torzii testis. Febrilita sa objavuje častejšie pri epididymitíde (11-19%). Klasické znamenie tzv. „blue dot“ môžeme nájsť u 10-23% pacientov s torziou appendix testis a torziou testis.

V mnohých prípadoch nie je jednoduché určiť príčinu akútneho skróta na základe anamnézy a samotného fyzikálneho vyšetrenia. (1) Pozitívny močový sediment je len u pár pacientov s epididymitídou. (9) Treba si pamätať, že normálny nález v moči nevylučuje epididymitídu. Podobne pozitívny nález v moči nevylučuje testikulárnu torziu. Doppler ultrasonografia je užitočná pre vyšetrovanie akútneho skróta s 63,6-100% senzitivitou a 97-100% špecificitou, pozitívnu prediktívnu hodnotou 100% a negatívnou prediktívnu hodnotou 97,5% (10) Použitie Doppler ultrasonografie môže znížiť počet pacientov, ktorí by podstúpili chirurgický zákrok. (10) Tiež môže ukázať mylný arteriálny tok vo včasnej fáze torzie a pri čiastočnej alebo intermitentnej torzii. Pretrvávajúci arteriálny tok nevylučuje testikulárnu torziu. Vždy musí byť vykonané porovnanie s druhou stranou.

Lepšie výsledky boli zaznamenané s použitím vysoko-rozlišiteľného ultrazvuku na priamu vizualizáciu otočenia spermatického reťazca s 97,3% senzitivitou a 99% špecificitou (10)

Diagnostika akútneho skróta u chlapcov je hlavne založená na klinickom obraze a doplnkových vyšetrení. (11)

U chlapcov pred pubertou s akútnou epididymitídou sa vyskytuje základná urogenitálna abnormalita v 25- 27,6%. Kompletné urologické vyšetrenie u všetkých detí s akútnou epididymitídou je stále diskutabilné.

Manažment terapie

Epididymitída

U prepubertálnych chlapcov je zvyčajne etiológia nejasná, so základnou patológiou približne 25%. Močový sediment je zvyčajne negatívny, a na rozdiel od starších chlapcov je sexuálne prenosná choroba zriedkavá.

Antibiotická liečba, hoci je často prvou voľbou nie je vo väčšine prípadov indikovaná, pokiaľ vyšetrenie moču nepreukáže bakteriálnu infekciu. Epididymitída sa dá zvládnuť bez antibiotickej liečby na podpornej terapii (minimálna fyzická aktivita a analgetiká) a lieči sa bez akýchkoľvek následkov. Avšak bakteriálna epididymitída môže byť komplikovaná abscesom a nekrózou testis a vtedy je nutné chirurgické riešenie. (12)



Obr. 1 Peroperačný nález epididymitis acuta

Testikulárna torzia

Manuálna detorzia testis sa vykonáva bez anestézie. Spočiatku by malo byť testis otáčané smerom von, pokiaľ sa nezvyšuje bolestivosť alebo pokiaľ nie sú prítomné známky rezistencie. Úspešnosť je definovaná ako okamžité odstránenie všetkých príznakov a normálny nález pri fyzikálnom vyšetrení (13) Po úspešnej detorzii je nutné vykonať bilaterálnu orchiopexiu. Tento výkon by sa nemal vykonávať elektívne, ale hneď po manuálnej detorzii. (14) Torzia appendix testis môže byť liečená použitím protizápalových analgetík a teda bez chirurgickej intervencie. Počas 6- týždňového sledovania klinického stavu a ultrasonografiesa neobjavila žiadna atrofia testis. Chirurgická intervencia sa vykonáva aj pri neustupujúcich bolestiach a pri ojedinelých prípadoch.



Obr. 2 Peroperačný nález torsio app. testis

Chirurgická liečba

Testikulárna torzia je naliehavý stav, ktorý si vyžaduje rýchlu chirurgickú liečbu. Najdôležitejšie determinanty určujúce včasnú záchranu semenníkov sú čas medzi nástupom príznakov a detorziou a stupňom otočenia. (15) Závažná testikulárna atrofia nastáva po torzii o 4 hodiny pri torzii o 360°. V prípadoch kedy je torzia inkompletná (180- 360°) s trvaním symptómov až 12 hodín nebola pozorovaná žiadna atrofia. Avšak ťažká atrofia testis bola nájdená u všetkých prípadov s torziou viac ako 360° a trvaní symptómov viac ako 24 hodín. (16) Včasná chirurgická intervencia s detorziou (priemerný čas torzie trvajúci menej než 13 hodín) (17) má dobrú prognózu pre zachovanie plodnosti. Urgentná chirurgická intervencia je nutná vo všetkých prípadoch testikulárnej torzie v rozsahu 24 hodín od začatia príznakov.



Obr. 3 Peroperačný nález torsio testis

Doba torzie v priemere 70 hodín nasledovaná orchiektómiou ohrozuje plodnosť. Počas chirurgického výkonu je vykonaná fixácia kontralaterálneho testis. Opakovaná torzia po predchádzajúcej fixácii testis býva zriedkavá a môže sa objaviť o niekoľko rokov neskôr. U pacientov s testikulárnou torziou > 24 hodín je potrebný semi-elektívny prieskum. (15, 16) Existuje kontroverzná otázka, či sa má vykonať detorzia so zachovaním testis alebo vykonať orchiektómiu, aby sa zachovala funkcia kontralaterálneho semenníka a plodnosť po testikulárnej torzii s dlhým trvaním (> 24 hodín).

Externé chladenie pred chirurgickou intervenciou a medikamentózna liečba sa zdajú byť účinné pri redukcii ischemicko-reperfúzneho poškodenia a zachovaní životaschopnosti torkvovaného a kontralaterálneho semenníka. (18, 19) Dobrou klinickou praxou je fixácia kontraleterálneho semenníka u prenatálnych a neonatálnych torzií (avšak nie je literatúra, ktorá by to potvrdila) a odstránení atrofovaného semenníka.

Záver

Sledovanie

Pacienti potrebujú sledovanie hlavne kvôli problémom s fertilitou a hormonálnym následkom. Napriek včasnej a adekvátnej detorzii a fixácii semenníka sa môže až u polovice pacientov vyvinúť testikulárna atrofia, dokonca aj keď bol peroperačný nález v norme. (20)

Plodnosť

Subfetrilita sa nachádza u 36-39% pacientov po torzii testis. (15) V dlhodobom sledovaní analýza spermií môže byť normálna len u 5-50%. Včasná chirurgická intervencia s detorziou (priemerný čas torzie trvajúci menej než 13 hodín) má dobrú prognózu pre zachovanie plodnosti. (17) Doba torzie v priemere 70 hodín nasledovaná orchiektómiou ohrozuje plodnosť. Subfetrilita a infetrilita sú dôsledkami priameho poškodenia semenníkov po torzii. Je to spôsobené prerušením prívodu krvi, ale aj post-ischemicko-reperfúznym poškodením po detorzii kedy voľné radikály odvodené od kyslíka rýchlo cirkulujú v testikulárnom parenchýme. (15)

Hladina androgénu

Napriek tomu, že hladiny FSH, luteinizačného hormónu (LH) a testosterónu sú vyššie u pacientov po testikulárnej torzii v porovnaní s normálnymi kontrolami, endokrinná funkcia semenníkov zostáva v normálnom rozmedzí po testikulárnej torzii. (21)

Nezodpovedané otázky

Hoci je testikulárna torzia bežný problém, mechanizmus neonatálnej a prenatalnej torzie zatiaľ nie je presne jasný, ako aj či je fixácia kontralaterálneho semenníka v týchto prípadoch naozaj nutná. Vplyv atrofovaného semenníka na plodnosť tiež nie je jasná.

Literatúra

1. **Klin, B., et al.** Epididymitis in childhood: a clinical retrospective study over 5 years. *Isr Med Assoc J*, 2001. 3: 833. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11729579>
2. **Dayanir, Y.O., et al.** Epididymoorchitis mimicking testicular torsion in Henoch-Schonlein purpura. *Eur Radiol*, 2001. 11: 2267. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11702171>
3. **Davis, J.E., et al.** Scrotal emergencies. *Emerg Med Clin North Am*, 2011. 29: 469. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21782069>
4. **Sakellaris, G.S., et al.** Acute epididymitis in Greek children: a 3-year retrospective study. *Eur J Pediatr*, 2008. 167: 765. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786475>
5. **Yerkes, E.B., et al.** Management of perinatal torsion: today, tomorrow or never? *J Urol*, 2005. 174: 1579. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148656>
6. **Boettcher, M., et al.** Clinical and sonographic features predict testicular torsion in children: a prospective study. *BJU Int*, 2013. 112: 1201. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23826981>
7. **Nelson, C.P., et al.** The cremasteric reflex: a useful but imperfect sign in testicular torsion. *J Pediatr Surg*, 2003. 38: 1248. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12891505>
8. **Somekh, E., et al.** Acute epididymitis in boys: evidence of a post-infectious etiology. *J Urol*, 2004. 171: 391. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665940>
9. **Mushtaq, I., et al.** Retrospective review of paediatric patients with acute scrotum. *ANZ J Surg*, 2003. 73: 55. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12534742>
10. **Karmazyn, B., et al.** Clinical and sonographic criteria of acute scrotum in children: a retrospective study of 172 boys. *Pediatr Radiol*, 2005. 35: 302. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15503003>
11. **Lau, P., et al.** Acute epididymitis in boys: are antibiotics indicated? *Br J Urol*, 1997. 79: 797. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9158522>

12. **Cornel, E.B., et al.** Manual derotation of the twisted spermatic cord. *BJU Int*, 1999. 83: 672.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10233577>
13. **Garel, L., et al.** Preoperative manual detorsion of the spermatic cord with Doppler ultrasound monitoring in patients with intravaginal acute testicular torsion. *Pediatr Radiol*, 2000. 30: 41.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10663509>
14. **Pepe, P., et al.** Does color Doppler sonography improve the clinical assessment of patients with acute scrotum? *Eur J Radiol*, 2006. 60: 120. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730939>
15. **Visser, A.J., et al.** Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU Int*, 2003. 92: 200. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887467>
16. **Tryfonas, G., et al.** Late postoperative results in males treated for testicular torsion during childhood. *J Pediatr Surg*, 1994. 29: 553. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8014814>
17. **Anderson, M.J., et al.** Semen quality and endocrine parameters after acute testicular torsion. *J Urol*, 1992. 147: 1545. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1593686>
18. **Akcora, B., et al.** The protective effect of darbepoetin alfa on experimental testicular torsion and detorsion injury. *Int J Urol*, 2007. 14: 846. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17760753>
19. **Aksoy, H., et al.** Dehydroepiandrosterone treatment attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion in rats. *J Pediatr Surg*, 2007. 42: 1740. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1793206>
20. **Haj, M., et al.** Effect of external scrotal cooling on the viability of the testis with torsion in rats. *Eur Surg Res*, 2007. 39: 160. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17341878>
21. **Arap, M.A., et al.** Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion. *J Androl*, 2007. 28: 528. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287456>

VI. VARIA

INTERAKCIA DNA S Cu(II) KOMPLEXAMI OBSAHUJÚCIMI 1,10 - FENANTROLÍN

(Interaction of DNA with copper(II) complexes containing
1,10 - phenantroline)

Andrežálová Lucia^{1,2}, Lištiak Matúš², Chrappová Jana², Rakovský Erik²

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava

²Katedra anorganickej chémie, Prírodovedecká fakulta UK, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava
lucia.andrezalova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Vzhľadom na množstvo informácií, ktoré sú zakódované v molekule DNA a úlohu, ktorú zohráva v rozhodujúcich bunkových procesoch, stala sa táto makromolekula atraktívnym cieľom rôznych terapeuticky významných molekúl ako sú napríklad koordinačné zlúčeniny prechodných kovov. Práca sa zaoberá štúdiom interakcie ctDNA s dvomi Cu(II) komplexami $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{D-phengly})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**) a $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{D-val})\text{Cl}] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**), kde phen = 1,10 - fenantrolín, phengly = fenylglycín a val = valín, s využitím UV-Vis spektrofotometrie. Hodnoty väzbových konštánt týchto komplexov s ctDNA zistených zo spektrofotometrických titrácií boli $K_b = 0,47 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ pre komplex **1** a $K_b = 0,97 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ pre komplex **2**.

Kľúčové slová

Cu(II) komplexy, DNA interakcie, väzbová konštanta

Summary

The quantity of information encoded in DNA and its role in critical cellular processes have made DNA a very attractive target for therapeutically important molecules such as transition metal complexes. This study is focused on the investigation of interaction between ctDNA and two Cu(II) complexes using UV-Vis spectroscopy. The complexes under study were $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{D-phengly})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**) and $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{D-val})\text{Cl}] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**), where phen = 1,10 - phenantroline, phengly = phenylglycine and val = valine. The binding constants K_b were calculated from the spectroscopic titrations and were found to be $K_b = 0,47 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ for complex **1** and $K_b = 0,97 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ for complex **2**.

Keywords

Cu(II) complexes, DNA interactions, binding constant

Úvod

Molekula DNA je významným cieľom rôznych terapeuticky významných molekúl ako sú antivirotiká, antibiotiká a protinádorové liečivá. Perspektívnou skupinou látok sú koordinačné zlúčeniny prechodných kovov, ktoré sú predmetom intenzívneho bioanorganického výskumu od objavenia protinádorového účinku *cisplatiny* a jej derivátov. Unikátne vlastnosti koordinačných zlúčenín, dané charakterom centrálného atómu, jeho oxidačným číslom, typom

koordinovaných ligandov a veľkosťou a tvarom koordinačného polyédra, umožňujú vysoký stupeň selektivity voči DNA, ako aj iným biologickým cieľom (1).

Významnou skupinou látok z hľadiska ich biologickej aktivity sú kasiopeíny. Ide o skupinu koordinačných zlúčenín Cu(II) typu $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{A}-\text{A})]\text{NO}_3$, kde (N-N) je bidentátny diimínový ligand, napríklad bipyridín alebo fenantrolín a (A-A) sú N-O, prípadne O-O donorové atómy α -L-aminoacidáto- alebo acetylacetonátového typu, patentované a registrované pod názvom Casiopeinas®. Antiproliferatívne účinky kasiopeínov boli pozorované napríklad pri myšacích nádorových bunkách L-1210, ľudských nádorových bunkových líniiach CH1 (karcinóm vaječníkov), HeLa (karcinóm krčka maternice), SiHa (spinocelulárny karcinóm krčka maternice), MCF-7 (karcinóm prsníka) a HCT-15 (karcinóm hrubého čreva) (2-6).

Do tejto skupiny látok patria aj študované komplexy $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{D} - \text{phengly})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{D} - \text{val})\text{Cl}] \cdot \text{H}_2\text{O}$, preto je z hľadiska predikcie ich potenciálnej biologickej aktivity zaujímavé preskúmať spôsob ich interakcie s molekulou DNA.

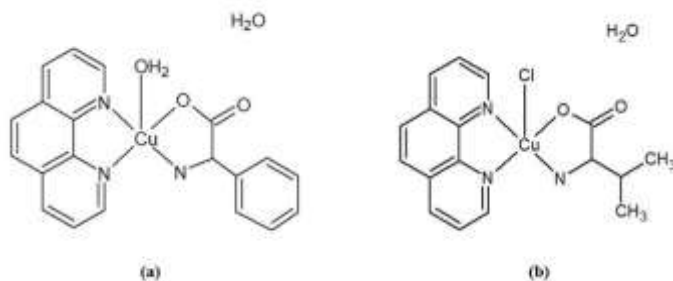
Materiál a metódy

Cu(II) komplexy:

$[\text{Cu}(\text{phen})(\text{D} - \text{phengly})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1)

$[\text{Cu}(\text{phen})(\text{D} - \text{val})\text{Cl}] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2)

Z vyriešenej štruktúry komplexov 1 a 2 vyplýva, že oba Cu(II) komplexy majú deformovanú štvorcovo-pyramidálnu geometriu (7,8). Základňu koordinačného polyédra tvoria N,N donorové atómy 1,10-fenantrolínu a N,O donorové atómy aminokyseliny D-fenylglycínu, resp. D-valínu. V apikálnej pozícii je na centrálny atóm medi v prípade komplexu 1 naviazaná molekula vody a v prípade komplexu 2 chloridový anión (obr.1).



Obr. 1 Schématické znázornenie štruktúry komplexu 1 (a) a komplexu 2 (b)
(bez vodíkových väzieb)

Interakcia s DNA

Pri interakčných štúdiách sa použila DNA z teľacieho týmusu (ctDNA). Všetky merania sa uskutočnili v tlmivom roztoku Tris-HCl ($c = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) pri pH 7,4 v kremennej kyvete s $d = 1 \text{ cm}$ a pri 25°C .

Spektrofotometrická titrácia Cu(II) komplexov:

Sledovala sa zmena v absorpčnom spektre Cu(II) komplexov v rozsahu vlnových dĺžok 200 nm – 340 nm vplyvom rastúcej koncentrácie ctDNA. Koncentrácia Cu(II) komplexov v reakčnej zmesi bola $c = 25 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentrácia DNA sa pohybovala v rozsahu 0 – $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Spektrofotometrická titrácia ctDNA:

Sledovala sa zmena v absorpčnom spektre ctDNA v rozsahu vlnových dĺžok 210 nm – 330 nm vplyvom rastúcej koncentrácie Cu(II) komplexov. Koncentrácia ctDNA v reakčnej zmesi bola $c = 50 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentrácia komplexov sa pohybovala v rozsahu 0 – $50 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Výpočet väzbovej konštanty K_b

Zo zmien hodnôt $A_{\max}$ pri spektrofotometrickej titrácii Cu(II) komplexov sa vypočítala väzbová konštantá K_b , vychádzajúc z nasledovnej rovnice, podľa (9):

$$\frac{[DNA]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[DNA]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} - \frac{1}{K_b - (\varepsilon_b - \varepsilon_f)}$$

ε_a = molárny absorpčný koeficient Cu(II) komplexu po pridaní DNA

ε_f = molárny absorpčný koeficient Cu(II) komplexu pred pridaním DNA

ε_b = molárny absorpčný koeficient plne viazaného Cu(II) komplexu

$[DNA]$ = koncentrácia DNA v mol.dm⁻³

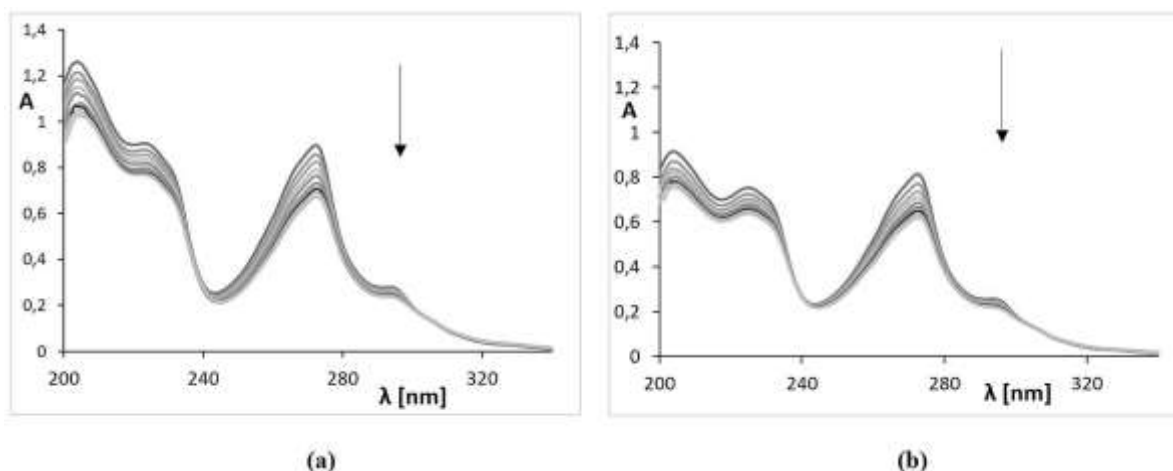
K_b = väzbová konštantá v mol⁻¹.dm³

Po zostrojení závislosti $[DNA]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ od koncentrácie DNA sa K_b vypočítala z rovnice priamky $y = ax + b$ ako podiel smernice priamky a ypsilonovej súradnice priesečníka priamky s osou y:

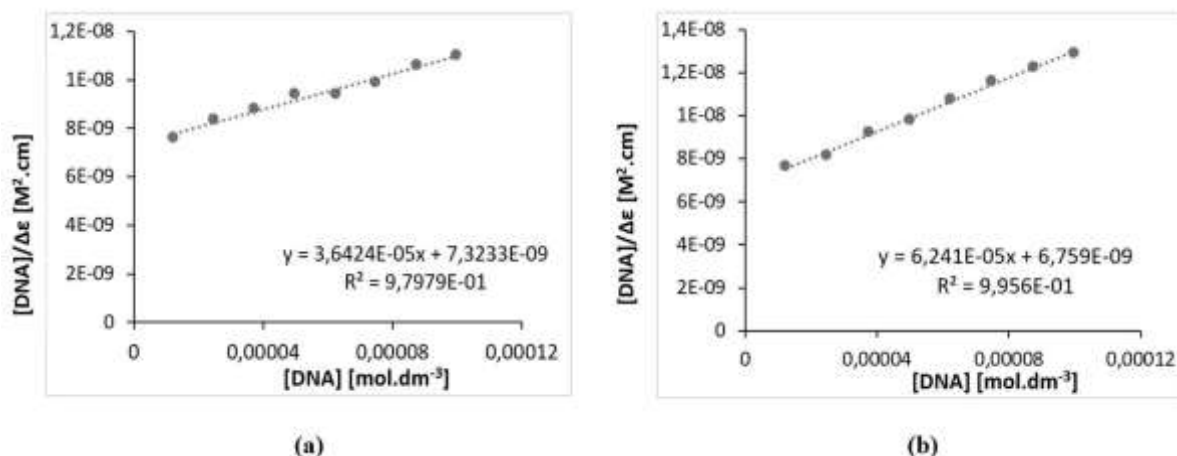
$$K_b = \frac{a}{b}$$

Výsledky

Pri štúdiu interakcie komplexov **1** a **2** s DNA sa sledovali zmeny v ich absorpčnom spektre v závislosti od rastúcej koncentrácie DNA (obr. 2), ako aj zmeny v absorpčnom spektre ctDNA v závislosti od rastúcej koncentrácie komplexov (obr. 4). V spektrách komplexov možno vplyvom rastúcej koncentrácie ctDNA pozorovať pokles intenzity absorpčných maxim (hypochrómny efekt). V prípade komplexu **1** intenzita absorpčného maxima pri vlnovej dĺžke $\lambda_{\max} = 272$ nm poklesla o 25,2 % a v prípade komplexu **2** o 23,9 %. Okrem toho možno v absorpčnom spektre komplexu **1** pozorovať posun vlnovej dĺžky absorpčného maxima pri 272 nm o 1 nm smerom k infračervenej oblasti spektra (batochrómny posun). V prípade komplexu **2** nedochádza ku žiadnym posunom vlnových dĺžok absorpčných maxim smerom do infračervenej alebo ultrafialovej oblasti. Na obr. 3 je znázornená závislosť $[DNA]/\Delta\varepsilon$ od koncentrácie DNA pri $\lambda_{\max} = 272$ nm. Z rovnice priamky sa podľa postupu uvedeného v kapitole Materiál a metódy vypočítali väzbové konštanty K_b pre oba Cu(II) komplexy. Ich hodnoty sú $K_b = 0,47 \cdot 10^4$ mol⁻¹.dm³ pre komplex **1** a $K_b = 0,97 \cdot 10^4$ mol⁻¹.dm³ pre komplex **2**.



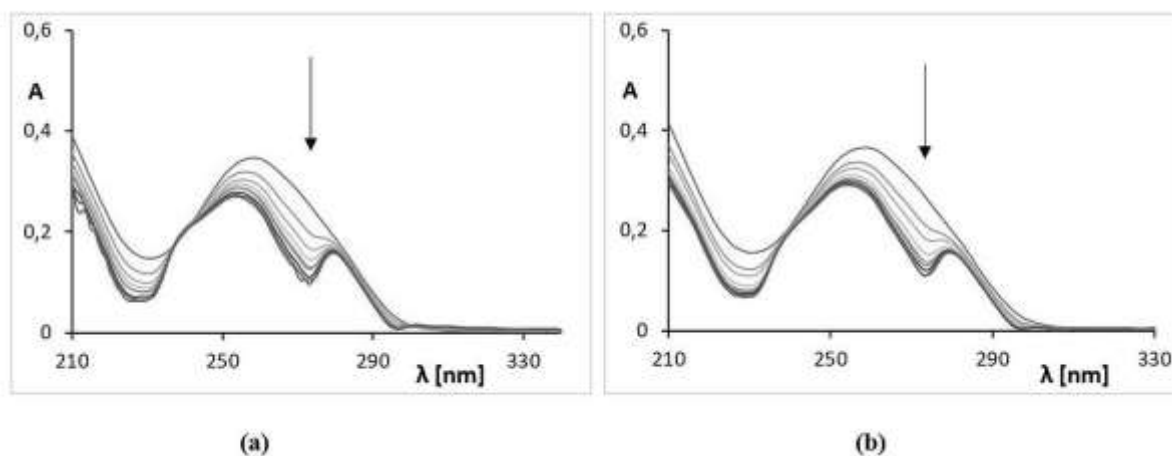
Obr. 2 Elektrónové absorpčné spektrum komplexu **1** (a) a komplexu **2** (b) titrovaných roztokom ctDNA. Koncentrácia Cu(II) komplexov $c = 25 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Koncentrácia ctDNA bola v intervale $c = 0 - 100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Merania sa uskutočnili v tlmivom roztoku Tris-HCl ($c = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 7,4) pri 25°C. Šípka označuje zmenu $A_{\max}$ po pridaní ctDNA do roztoku Cu(II) komplexu.



Obr. 3 Závislosť $[DNA]/\Delta\epsilon$ od koncentrácie DNA pre komplex 1 (a) a pre komplex 2 (b)

$$\Delta\epsilon = \epsilon_a - \epsilon_f$$

Na obr. 4 sú znázornené zmeny v elektrónových absorpčných spektrách ctDNA, ktorá bola titrovaná komplexami **1** a **2**. Absorpčné maximum DNA sa nachádza pri vlnovej dĺžke 260 nm. Vplyvom rastúcej koncentrácie Cu(II) komplexov dochádzalo k hypochrómnu efektu a zároveň k posunu vlnovej dĺžky absorpčného maxima na hodnotu 254 nm (hypsochrómny posun). Zároveň so zvyšujúcou sa koncentráciou Cu(II) komplexov vznikalo nové absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke 279 nm.



Obr. 4 Elektrónové absorpčné spektrum ctDNA titrovaného komplexom 1 (a) a komplexom 2 (b)
 Koncentrácia ctDNA $c = 50 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentrácia Cu(II) komplexov bola v intervale $c = 0 - 50 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Merania sa uskutočnili v tlmivom roztoku Tris-HCl ($c = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 7,4) pri 25°C. Šípka označuje zmenu A_{max} po pridaní Cu(II) komplexu do roztoku ctDNA.

Diskusia a záver

Kovalentné alebo nekovalentné interakcie koordinačných zlúčenín s DNA sú podstatou ich potenciálneho biomedicínskeho využitia (10). V prvom prípade sa vytvára koordinačná väzba medzi iónom kovu a niektorým z donorových atómov molekuly DNA, najmä s N7 atómami imidazolového kruhu guanínu alebo adenínu. Nekovalentné interakcie zahŕňajú elektrostatické interakcie medzi kladne nabitou komplexnou časticou a záporne nabitou sacharidovo-fosfátovou kostrou, vodíkové väzby, van der Waalsove interakcie a hydrofóbne interakcie. Na základe týchto nekovalentných interakcií rozlišujeme tri hlavné typy spôsoby viazania koordinačných zlúčenín na DNA: väzba na povrch molekuly DNA, interkalácia

a väzba do malého/veľkého žliabku. Na štúdium interakcie molekúl s DNA sa využívajú rôzne analytické metódy, pričom jednou z najjednoduchších a najčastejšie využívaných je UV-Vis spektrofotometria. Komplexy **1** a **2** obsahujú vo svojej molekule ligand 1,10 - fenantrolín, ktorý má vďaka svojmu kondenzovanému aromatickému systému potenciál interkalovať medzi páry báz v molekule DNA. Pri interkalácii malých molekúl medzi páry báz možno pozorovať v ich absorpčných spektrách vplyvom zvyšujúcej sa koncentrácie DNA hypochrómny efekt. Hypochromizmus je zvyčajne sprevádzaný batochrómny posunom. S využitím absorpčnej spektroskopie je možné zistiť aj pevnosť väzby medzi malou molekulou a DNA, ktorú kvantitatívne vyjadruje väzbová konštanta K_b (11).

V absorpčných spektrách komplexov **1** a **2** sme pri zvyšujúcej sa koncentrácii ctDNA pozorovali výrazný hypochromizmus pri všetkých A_{max} . Jeho rozsah bol v prípade oboch komplexov približne rovnaký. Okrem hypochromizmu sme v absorpčnom spektre komplexu **1** pozorovali nevýrazný batochrómny posun A_{max} pri 272 nm o 1 nm. V prípade komplexu **2** sme nepozorovali žiadny posun vlnových dĺžok absorpčných maxim. Z údajov získaných spektrofotometrickou titráciou sme vypočítali väzbové konštanty K_b komplexov s ctDNA. Ich hodnoty sú $K_b = 0,47 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ pre komplex **1** a $K_b = 0,97 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ pre komplex **2**. Z daných hodnôt väzbových konštánt vyplýva, že oba Cu(II) komplexy majú k ctDNA strednú afinitu.

Keďže sme so zvyšujúcou sa koncentráciou ctDNA pozorovali v spektrách Cu(II) komplexov len malý (komplex **1**), prípadne žiadny (komplex **2**) batochromizmus, sledovali sme priebeh absorpčného spektra DNA vplyvom rastúcej koncentrácie Cu(II) komplexov. Molekula DNA má v dôsledku aromatického charakteru dusíkových báz absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke 260 nm. Zmena konformácie DNA vplyvom interkalátora vedie k výraznému hyperchrómnemu efektu (12). Hyperchromizmus v spektre DNA vplyvom komplexov **1** a **2** sme nepozorovali. Veľmi zaujímavé však bolo zistenie, že vplyvom rastúcej koncentrácie komplexov **1** a **2** vznikal nový absorpčný pás s maximom pri vlnovej dĺžke 279 nm. Toto nové absorpčné maximum by mohlo reprezentovať vznik nového komplexu. Komplex **1** má v apikálnej pozícii koordinačného polyédra naviazanú molekulu vody a komplex **2** má na tomto mieste koordinovaný chloridový anión, ktoré by mohli byť substituované niektorým z donorových atómov molekuly DNA. Tvorba kovalentnej väzby medzi centrálnym atómom medi a donorovými atómami DNA bola zistená aj v prípade niektorých kasiopeínov (13).

Na základe získaných výsledkov je možné predpokladať, že pri interakcii študovaných Cu(II) komplexov s molekulou DNA dochádza k čiastočnej interkalácii 1,10 - fenantrolínu medzi páry báz, pričom zároveň dochádza ku vytvoreniu koordinačnej väzby medzi Cu(II) a molekulou DNA. Na potvrdenie týchto predpokladov je potrebné pokračovať v štúdiu interakcií komplexov s DNA s využitím ďalších spektroskopických, prípadne iných vhodných analytických metód.

Literatúra

- Pages BJ, Ang DL, Wright EP, Aldrich-Wright JR.** Metal complex interactions with DNA. Dalton Trans 2015; 44(8): 3505-3526.
- Serment-Guerrero J, Bravo-Gomez ME, Lara-Rivera E, Ruiz-Azuara L.** Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action. J Inorg Biochem 2017; 166: 68-75.
- Serment-Guerrero J, Cano-Sanchez P, Reyes-Perez E, Velazquez-Garcia F, Bravo-Gomez ME, Ruiz-Azuara L.** Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas. Toxicol In Vitro 2011; 25(7): 1376-1384.
- Alemón-Medina R, Breña-Valle M, Muñoz-Sánchez JL, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L.** Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®). Cancer Chemoth Pharm 2007; 60(2): 219-228.

5. **Becco L, García-Ramos JC, Ruiz-Azuara L, Gambino D, Garat B.** Analysis of the DNA interaction of copper compounds belonging to the Casiopéinas[®] antitumoral series. *Biol Trace Elem Res* 2014; 161(2): 210-215.
6. **Bravo-Gomez ME, García-Ramos JC, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L.** Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopéinas[®]). *J Inorg Biochem* 2009; 103(2), 299-309.
7. **Hlaváč R.** Heteroligandové komplexy Cu(II) ako chirálne templáty pre syntézu chirálnych dekavanadičnanov. Bratislava, 2017. Bakalárska práca. Univerzita Komenského v Bratislave.
8. **Jakubičková A.** Komplexy medi ako biokatalyzátory. Bratislava, 2019. Bakalárska práca. Univerzita Komenského v Bratislave.
9. **Anjomshoa M, Torkzadeh-Mahani M.** In vitro DNA and BSA-binding, cell imaging and anticancer activity against human carcinoma cell lines of mixed ligand copper(II) complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2015; 150: 39-402.
10. **Erxleben A.** Interactions of copper complexes with nucleic acids. *Coord Chem Rev* 2018; 360: 92-121.
11. **Barone G, Terenzi A, Lauria A, Almerico AM, Leal JM, Busto N, García B.** DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: Structure–affinity relationships. *Coord Chem Rev* 2013; 257: 2848-2862.
12. **Shahabadi N, Kashanian S, Fatahi A.** Identification of binding mode of a platinum (II) complex, PtCl₂(DIP), and calf thymus DNA. *Bioinorg Chem Appl* 2011; 1-7.
13. **Rodríguez-Mercado JJ, Florín-Ramírez D, Álvarez-Barrera L, Altamirano-Lozano MA.** In vitro DNA damage by Casiopéina II-gly in human blood cells. *Drug Chem Toxicol* 2017; 40(2):164-170.

AUTOVAKCÍNY V IMUNOMODULAČNEJ TERAPII VAGINÁLNYCH INFEKCIÍ

(Autovaccines in immunomodulatory therapy of vaginal infections)

**Bútorová Benedikta¹, Šimaljaková Mária¹, Weismann Peter²,
El Falougy Hisham², Záborská Magdaléna³**

¹*Dermatovenerologická klinika LF UK a UNB, Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava, butorova8@uniba.sk*

²*Anatomický ústav, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava*

³*Mikrobiologický ústav Lekárska fakulta UK a UNB, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava*

Súhrn

V ostatnej dobe sa čoraz častejšie stretávame so zlyhávaním antimikróbnej terapie. Problémom bývajú najmä chronické, recidivujúce infekcie. Na Dermatovenerologickej klinike LF UK sa často stretávame s problémom recidivujúcich vaginálnych infekcií najmä u žien vo fertilnom veku, kde opakovane dochádza k zlyhávaniu antimikróbnej terapie. Preto sme sa na našej klinike rozhodli pristúpiť k alternatívnej liečbe autovakcínami, ktorej počiatky siahajú až k roku 1904. Liečba autovakcínami používaná už vyše 100 rokov je imunomodulačná liečba určená na terapiu chronických a recidivujúcich infekcií, ktoré sú ťažko liečiteľné antibiotikami a chemoterapeutikami, a taktiež na preventívnu stimuláciu imunity. Cieľom nášho výskumu je zistiť efektivitu tejto liečby na súbore pacientok s chronickou, recidivujúcou vaginálnou infekciou. Tento výskum realizujeme v spolupráci s Mikrobiologickým ústavom LF UK a UNB, kde sa autovakcíny pripravujú a tiež v spolupráci s Anatomickým ústavom LF UK, vďaka ktorému máme možnosť realizovať aj vyšetrenie PCR.

Kľúčové slová

autovakcíny, imunomodulačná terapia, vaginálne infekcie, chronické infekcie

Summary

Recently, we are increasingly encountering the failure of antimicrobial therapy. The problem are chronic, recurrent infections in particular. At the Department of Dermatovenereology, Faculty of Medicine, Comenius University, we often encounter the problem of recurrent vaginal infections, especially in fertile women, where the antimicrobial therapy repeatedly fails. Therefore, we decided at our clinic to approach an alternative treatment with autovaccines, which dates back to 1904. Autovaccine treatment, used for more than 100 years, is an immunomodulatory treatment designed to treat chronic and recurrent infections that are difficult to treat with antibiotics and chemotherapeutics, as well as preventive stimulation of immunity. The aim of our research is to determine the effectiveness of this treatment in a group of patients with chronic, recurrent vaginal infection. We carry out this research in cooperation with the Institute of Microbiology LF UK and UNB, where autovaccines are being prepared, and also in cooperation with the Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University, thanks to which we also have the opportunity to perform PCR testing.

Keywords

autovaccines, immunomodulatory therapy, vaginal infections, chronic infections

Úvod

Imunomodulačná terapia autovakcínami prežívala svoju zlatú éru v 30. - 50. rokoch minulého storočia, kedy ešte neboli k dispozícii účinné antimikróbne látky. V dobe antibiotík sa však táto liečba dostala do úzadia. V ostatnom čase ale stúpajúca bakteriálna rezistencia na antibiotiká vzbudzuje záujem o alternatívne spôsoby liečby chronických a recidivujúcich infekcií (1). Čoraz častejší problém zlyhávania antimikróbnej terapie (2) nás podnecuje k hľadaniu ďalších, účinných spôsobov liečby týchto infekcií. V rámci dermatovenerológie ale aj v gynekológii sa čoraz častejšie stretávame s recidivujúcimi vaginálnymi infekciami kvasinkovej (3), alebo bakteriálnej etiológie (4) a to najmä u žien vo fertilnom veku. Preto sme sa na Dermatovenerologickej klinike LF UK a UNB rozhodli s v spolupráci s Mikrobiologickým ústavom a Anatomickým ústavom UK preskúmať potenciál autovakcín v liečbe týchto infekcií bližšie.

Cieľom našej práce je monitorovanie klinickej účinnosti perorálnych autovakcín v súbore pacientok pri liečbe chronických a recidivujúcich vaginálnych infekcií. Účinnosť liečby budeme monitorovať na základe kultivačných a mikroskopických nálezov a subjektívnych príznakov pacientok v stanovenom časovom horizonte.

Mykotické vulvovaginitídy

Dysbalancia fyziologickej vaginálnej mikroflóry môže viesť k mikrobiálnej infekcii, ktorú spôsobujú ako baktérie tak aj kvasinkovité mikroorganizmy endogénneho alebo exogénneho pôvodu (5). V ostatnej dobe sa u žien vo fertilnom veku najčastejšie uplatňuje infekcia kvasinkovými mikroorganizmami rodu *Candida*. Klinicky sa v akútnej fáze prejavuje hustým, belavým výtokom krémovej farby až tvarohovitej konzistencie. V chronickom štádiu je výtok redší. Subjektívne môže byť prítomné svrbenie až pálenie vulvy. Pri recidívach je často prítomná aj bakteriálna flóra. Vznik chronickej infekcie je podmienený ako poruchou imunitného systému hostiteľa, tak aj faktormi patogenity virulencie pôvodcu infekcie (6). Predispozičnými faktormi na strane hostiteľa sú porucha glukózovej tolerancie, tehotenstvo, hormonálna antikoncepcia, antibiotiká, striedanie sexuálnych partnerov, nedostatočná hygiena. (7). Určitú úlohu tu zohráva aj dedičnosť (8). Uplatňovať sa môže aj hypersenzitivita na mikrobiálne antigény a znížená bunková imunita. Kľúčovým faktorom virulencie kvasinkových mikroorganizmov je schopnosť tvoriť biofilm (9). Biofilm ich chráni pred obrannými mechanizmami hostiteľa a umožňuje im efektívne prežívať v tele hostiteľa. Taktiež sa stáva rezervoárom infekcie, čo umožňuje šírenie kvasiniek ďalej do organizmu. Zrelý biofilm je tiež zodpovedný za rezistenciu na flukonazol a ďalšie antimykotiká (10). Tvorba biofilmu je známym problémom aj pri bakteriálnych vulvovaginitídach (11).

V priebehu života postihne vulvovaginálna kandidóza aspoň raz približne 75 % ženskej populácie (12). Rekurentná infekcia (viac ako 3 epizódy ročne) postihuje celosvetovo takmer 8 % žien (13).

Liečba mykotických vulvovaginitíd sa skladá z niekoľkých vzájomne sa prekrývajúcich krokov:

- 1 eradikácia alebo zníženie počtu patogénov
- 2 obnova mikrobioty
- 3 imunomodulačná liečba
- 4 režimové opatrenia na prevenciu recidív

Charakteristika autovakcín

Jednou z možností účinnej liečby chronických, recidivujúcich ochorení by mohli byť aj autovakcíny, ktorých potenciál sa v dnešnej dobe využíva menej. Autovakcíny sú preparáty s imunomodulačným účinkom (14, 15).

Prvý krát ich použil Sir Dr. Almroth E. Wright (bakteriológ a imunológ) v r. 1904 na liečbu chronickej furunkulózy, kde použil inaktivovanú kultúru kmeňa *S. aureus* izolovaného z ložiska chorého.

Autovakcíny sú preparáty s imunomodulačným účinkom patriace do skupiny bakteriálnych imunomodulátorov. Sú pripravované vo forme roztokov obsahujúcich zmes bakteriálnych alebo kvasinkových antigénov a sú cielene zhotovené z kmeňa baktérií alebo kvasiniek vyizolovaných priamo z ložiska chronickej alebo recidivujúcej infekcie pacienta. Naproti tomu, existujú aj iné prípravky označované ako vakcíny, ale na rozdiel od autovakcín, ktoré sú situované na konkrétneho pacienta, sú vyrábané komerčne.

Medzi komerčne vyrábané imunomodulátory patrí:

1) Broncho-vaxom, Uro-vaxom, Luivac, Ribomunyl,

2) GS-imunostim, Olimunovac, Candivac, Urivac, Acnevac/ Acnevac Neo

pričom prvé 4 uvedené sú viazané na lekársky predpis, ostatné sú distribuované len ako potravinové doplnky. Jediný rozdiel tejto odlišnej kategorizácie komerčne vyrábaných imunomodulátorov je ten, že prvá skupina má doložené početné kontrolované štúdie. Na základe toho sú schválené ako liečivá s čiastočnou úhradou zdravotnej poisťovne. Tie ostatné z druhej skupiny sú na trhu kratšiu dobu a neboli s nimi zatiaľ robené rozsiahle kontrolované štúdie, ktoré sú vyžadované pri schvaľovaní prípravku ako liečiva. Majú však overenú bezpečnosť a je možné ich zakúpiť bez predpisu ako potravinové doplnky.

Liečba autovakcínami má viacero výhod:

- výrazne znižuje počet atakov a skracuje a zmierňuje ich priebeh
- znižuje spotrebu antibiotík
- zlepšuje zdravotný stav pacienta
- má minimum vedľajších účinkov - ich efekt a bezpečnosť bola potvrdená mnohými klinickými a experimentálnymi štúdiami
- znáša sa s inou medikáciou
- sú plne hrazené ZP

Mechanizmus účinku

Presný mechanizmus účinku autovakcín nie je doposiaľ úplne známy. Mikrobiálne antigény sú pre imunitný systém človeka najprirodzenejšími antigénymi podnetmi a sú potentnými stimulátormi imunitnej odpovede (16). Mechanizmus účinku po orálnom podaní mikrobiálnych antigénov sa zakladá na stimulácii lymfatického tkaniva tráviaceho traktu (GALT, Peyerove plaky) (17). Tu dochádza k rozpoznaniu ich štruktúr s následnou aktiváciou imunitných buniek (hl. T lymfocytov a dendritických buniek), ktoré recirkulujú do rôznych častí celého lymfatického tkaniva asociovaného s mukózou (MALT) – napr. sliznica dýchacieho/ močového traktu, vaginálna sliznica (18). Súčasné štúdie ukazujú, že pravidelné užívanie antigénneho komplexu patogénneho mikroorganizmu aktivuje prirodzené obranné mechanizmy, a to stimuláciou tvorby prozápalových cytokínov (IL-1 β , IFN γ , TNF α , IL-17A) periférnymi monocytmi, makrofágmi a dendritickými bunkami, čím sa zlepšuje komunikácia medzi bunkovými elementami vrodenej a špecifickej imunity a posilňujú sa slizničné a celkové imunitné mechanizmy. Predpokladá sa, že liečba autovakcínami posúva imunitný systém smerom k Th1 odpovedi (19), čo by mohlo byť prospešné pre alergikov, u ktorých prevláda Th1 odpoveď, avšak porucha rovnováhy Th1/Th2 môže vyprovokovať autoimunitné ochorenia. Aj preto je veľmi dôležité dôsledne zvažovať kontraindikácie a indikácie tejto liečby.

Indikácie, kontraindikácie liečby

Celý proces preskripcie autovakcíny individuálnemu pacientovi začína správnou indikáciou ošetrojúcim lekárom. Vzhľadom na fakt, že autovakcína má viacero kontraindikácií, musí byť pacient pred zahájením liečby vyšetrený imunoalergológom. Imunologické vyšetrenie je zamerané najmä na odhalenie deficitu špecifickej bunkovej imunity a na vylúčenie autoimunitného ochorenia. Následne je potrebné zrealizovať odber materiálu z ložiska infekcie (ster na kultiváciu – z pošvy, z hnisavého ložiska a pod.), ktorý sa v rámci bratislavského kraja realizuje na Mikrobiologickom ústave LF UK a UNB v Bratislave, kde sa zároveň uskutočňuje aj výroba autovakcín. Pacient si musí priniesť vyplnený „Sprievodný list na prípravu autovakcíny“, na ktorom okrem ošetrojúceho lekára musí byť aj odporúčenie od imunoalergológa. Na odber materiálu sa treba dostaviť v aktívnej fáze ochorenia a to aspoň 1 až 2 týždne po vysadení antibiotickej liečby. Odber materiálu je možné realizovať aj na iných pracoviskách. Spracovaný materiál treba adekvátnym spôsobom odoslať a priložiť vyplnený sprievodný lístok na prípravu autovakcíny. Následne sa začne príprava autovakcíny vo forme perorálnych kvapiek, ktorá trvá 5 týždňov. Dávkovacia schéma sa stanovuje individuálne podľa klinického stavu pacienta. Vakcína sa podáva po kvapkách ráno nalačno s pravidelnými intervalmi prestávok po dobu niekoľkých mesiacov.

Indikácie na liečbu autovakcínou sú chronické, recidivujúcich infekcie:

- kože a podkožných tkanív: hnisavé infekcie kože, zápalové ochorenia kostí, vrede predkolenia, akné a iné (20)
- infekcie urogenitálneho systému - v tomto prípade je jednou z najčastejších diagnóz vulvovaginálna kandidóza
- infekcie respiračného systému - tieto tvoria 80 % všetkých diagnóz
- chronický zápal priedušiek - chronická bronchitída, priedušková astma
- infekčno-alergické stavy - kedy infekcia nasadá na atopický terén (atopický ekzém, priedušková astma atď.) a telo reaguje na prítomnosť patogénnych baktérii precitlivo.

Kontraindikáciami sú: reaktívna TBC, obehové zlyhávanie, imunosupresívna terapia, hepatopatia, neoplastické ochorenie, nefropatia, neuropatia, ťažšie formy tyreopatie, kachexia, cytopénia. Zvýšenú pozornosť treba venovať pri: ťažké alergické ochorenie, chronické ochorenia vnútorných orgánov, hypokalcémia, akútne exacerbácie ochorení alebo iné akútne stavy, autoimunitné choroby, spazmofília, atopická dermatitída (21).

Príprava a dávkovanie autovakcíny

Príprava autovakcíny je zdĺhavá a trvá päť týždňov, pričom dva týždne prebieha kontrola sterility. Skladá sa z viacerých krokov. Základom je odber materiálu z ložiska infekcie v štádiu exacerbácie alebo recidívy, a to aspoň 1-2 týždne po vysadení antibiotík. Následne prebieha kultivácia patogénnej baktérie. Po kultivácii sa na povrchu celofánu namnoží čistá kultúra bakteriálneho kmeňa, povrch celofánu sa následne opláchne sterilným fyziologickým roztokom, čím získame bakteriálnu suspenziu. Inaktiváciou suspenzie 3,6 % roztokom formaldehydu získame mikrobiálny antigénny komplex (MAK). V závere prebieha dva týždne trvajúca kontrola sterility a následná príprava autovakcíny. Mikrobiálny antigénny komplex sa scentrifuguje, zriedi sa riediacim roztokom a následne sa hotová autovakcína plnení do liekoviek s kvapkadlom (tzv. bralenky). Koncentrácia aj dávkovacia schéma hotovej autovakcíny sa stanovuje individuálne podľa klinického stavu pacienta. Vakcína sa podáva po kvapkách ráno nalačno – najviac 10 kvapiek počas desiatich dní v mesiaci. Liečba sa opakuje 3 mesiace po sebe, následne má pacient jeden mesiac pauzu. Po jednomesačnej pauze nasleduje ďalší trojmesačný cyklus liečby s následnou pauzou trvajúcou dva mesiace. Liečbu môže individuálne upravovať ošetrojúci lekár.

Záver

Záverom možno skonštatovať, že liečba perorálnymi hyposenzibilizačnými autovakcínami má svoje opodstatnenie a prínos ako doplnková terapia chronických a recidivujúcich infekcií (22). Je to hlavne v prípadoch, kedy opakovaná antimikrobiálna liečba nepriniesla zlepšenie. Posúdenie potreby a vhodnosti tejto formy liečby pre konkrétne prípady je nielen na odbornom lekárovi ale aj na imunológovi, ktorý po zhodnotení priebehu liečby a celkového zdravotného stavu pacienta môže túto liečbu indikovať.

Literatúra

1. **Nathan, C.** Antibiotics at the crossroads. In *Nature* . 2004. Vol. 431, no. 7011, s. 899–902.
2. **Cohen, M.L.** Changing patterns of infectious disease. In *Nature* . 2000. Vol. 406, no. 6797, s. 762–767.
3. **Belayneh, M. et al.** Recurrent vulvovaginal candidiasis. In *Canadian Family Physician*. 2017. Vol. 63, no. 6, s. 455.
4. **Wilson, J.** Managing recurrent bacterial vaginosis. In *Sexually Transmitted Infections*. 2004. s. 8–11.
5. **White, B.A. et al.** The vaginal microbiome in health and disease. In *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* . 2011. Vol. 22, no. 10, s. 389–393. .
6. **Nyirjesy, P.** Management of persistent vaginitis. In *Obstetrics and Gynecology* . 2014. Vol. 124, no. 6, s. 1135–1146.
7. **Larsson, P.-G. et al.** Predisposing factors for bacterial vaginosis, treatment efficacy and pregnancy; results from a preterm delivery study. In *BMC Women's Health*. 2007. Vol. 7, s. 20.
8. **Giraldo, P.C. et al.** Mannose-binding lectin gene polymorphism, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. In *Obstetrics and Gynecology* . 2007. Vol. 109, no. 5, s. 1123–1128.
9. **Cavalheiro, M. - Teixeira, M.C.** Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. In *Frontiers in Medicine* [online]. 2018. Vol. 5
10. **Dun, E.** Antifungal resistance in yeast vaginitis. In *The Yale Journal of Biology and Medicine* . 1999. Vol. 72, no. 4, s. 281–285.
11. **Machado, D. et al.** Bacterial Vaginosis Biofilms: Challenges to Current Therapies and Emerging Solutions. In *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016. Vol. 6. [cit. 2020-12-14].
12. **Denning, D.W. et al.** Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. In *The Lancet Infectious Diseases* . 2018. Vol. 18, no. 11, s. e339–e347.
13. **Schalkwyk, J. Van et al.** Vulvovaginitis: Screening for and Management of Trichomoniasis, Vulvovaginal Candidiasis, and Bacterial Vaginosis. In *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 2015. Vol. 37, no. 3, s. 266–274.
14. **Bystroň J.** Perorální bakter. imunomodulátory. *Alergie* 2003;5:284-289.
15. **Bystroň J.** Bakt. a kvasinkové lyzáty v dermatologii. *Derma. prax* 2013;7(4): 175–179.
16. **Kaplan, J.L. et al.** The Role of Microbes in Developmental Immunologic Programming. In *Pediatric Research* . 2011. Vol. 69, no. 6, s. 465–472.
17. **Gebert, A. et al.** Antigen Transport into Peyer's Patches. In *The American Journal of Pathology* . 2004. Vol. 164, no. 1, s. 65–72.
18. **Czirfusová M.** Autovakcíny v liečbe chronických a recidivujúcich infekcií dolných močových ciest a chronických prostatitíd. *Zdravotníctví a sociální práce* 2014; 9 (2): 16.
19. **Szymanowski, K. et al.** An Influence of Immunomodulation on Th1 and Th2 Immune Response in Endometriosis in an Animal Model. In *BioMed Research International*. 2013. Vol. 2013.
20. **Šimaljaková M, Buchvald D.** Dermatovenerológia. Bratislava; Univerzita Komenského v Bratislave, 2019: 544 s.
21. **M.S.Farber.,** Medication Safety Concerns Surrounding Immunomodulators. In [online]. *US Pharmacist*, 2016; 41(6): HS2-HS8 <https://www.uspharmacist.com/article/medication-safety-concerns-surrounding-immunomodulators>.
22. **Czirfusová M., Bertaová G.** Využitie autovakcín v liečbe chronických a recidivujúcich kolpitíd. *NewsLab* 2017; 8 (2): 83 – 84.

VPLYV NANOČASTÍC OXIDU TITANIČITÉHO NA CELKOVÚ ANTIOXIDAČNÚ KAPACITU PLAZMY INFANTILNÝCH A DOSPELÝCH SAMÍC POTKANOV

(The effect of titanium dioxide nanoparticles on the plasma total antioxidant capacity of infantile and adult female rats)

Dvořáková Monika¹, Rollerová Eva², Žitňanová Ingrid¹, Scsuková Soňa³

¹ Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, monika.dvorakova@fmed.uniba.sk

² Oddelenie toxikológie, Fakulta verejného zdravotníctva, Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 12, 833 03 Bratislava

³ Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05, Bratislava

Súhrn

Veľmi rýchly vývoj nanotechnológií a rozsiahle použitie nanomateriálov majú za následok zvýšené vystavenie organizmov nanočasticiam (NČ), ako je napr. oxid titaničitý (TiO₂) a s tým aj predpokladaný nárast negatívnych účinkov NČ na ľudský organizmus.

Cieľom našej štúdie bolo zistiť možný vzťah medzi redoxným stavom organizmu reprezentovaným celkovou antioxidačnou kapacitou (TEAC) plazmy a expozíciou 1% alebo 10% LD50 TiO₂ v dvoch rôznych životných fázach (infantilné a dospelé jedince) samíc potkanov.

Naše merania nepotvrdili vekovo závislú zmenu v celkovej antioxidačnej kapacite plazmy. Napriek tomu, zníženie TEAC v závislosti od podanej dávky sme zistili u infantilných jedincov. U dospelých potkanov sme v prípade 1% LD50 TiO₂ pozorovali signifikantný nárast, ale v prípade 10% LD50 TiO₂ aj následný pokles TEAC v plazme.

Naše výsledky ukazujú, že neonatálne vystavenie potkanov TiO₂ NČ môže modulovať redoxnú rovnováhu u samíc potkanov v závislosti od veku, čo môže viesť až k zmenám fyziologických funkcií organizmu.

Kľúčové slová

nanočastice oxidu titaničitého, oxidačný stres, celková antioxidačná kapacita (TEAC)

Summary

The very rapid development of nanotechnologies and the widespread use of nanomaterials result in increased exposure of organisms to nanoparticles (NPs), such as e.g. titanium dioxide (TiO₂) and with it the expected increase in the negative effects of NPs on the human body.

The aim of our study was to determine the possible relationship between the redox state of the organism represented by the plasma total antioxidant capacity (TEAC) and the exposure of 1% or 10% LD50 TiO₂ in two different life stages (infantile and adult individuals) of female rats.

Our measurements did not confirm an age-dependent change in total antioxidant capacity of plasma. Nevertheless, a dose-dependent decrease in TEAC was observed in infantile

individuals. In adult rats, we observed a significant increase in 1% LD50 TiO₂, but also a subsequent decrease in plasma TEAC with increased dose (10% LD50 TiO₂).

Our results show that neonatal exposure of rats to TiO₂ NPs can modulate the redox balance in female rats with age, which can lead to changes in the physiological functions of the body.

Keywords

titanium dioxide nanoparticles, oxidative stress, total antioxidant capacity (TEAC)

Úvod

Rovnaké vlastnosti, vďaka ktorým sú NČ výnimočné v ich používaní, spôsobujú, že sú späté aj so zvýšeným výskytom nepriaznivých účinkov na životné prostredie a zdravie ľudí. Vďaka svojej veľkosti sú nerozpustné NČ schopné prechádzať biologickými membránami vrátane hematoencefalickej bariéry (1; 2). Spravidla platí, že čím je nanočastica menšia, tým má toxickejšie účinky (3).

Viacere štúdie poukazujú na nízku toxicitu TiO₂ NČ, čo ich predurčuje na použitie v kozmetickom (zubné pasty, krémy na opaľovanie) a v potravinárskom priemysle (prídavné látky), ale aj v biomedicíne (systémy pre doručenie liečiv) (4; 5). Napriek nepopierateľným pozitívnym účinkom existuje množstvo štúdií, ktoré potvrdzujú vysokú absorpciu TiO₂, jeho akumuláciu v tkanivách a s tým spojený aj nárast negatívnych účinkov (6; 5).

Medzi negatívne účinky aplikácií NČ TiO₂ patrí aj redoxná nerovnováha charakterizovaná oxidačným stresom (4). Oxidačný stres je jednou z hlavných akceptovaných hypotéz vedľajších účinkov spojených s toxicitou NČ na bunkovej úrovni. Reakcie oxidačného stresu by mohli viesť k toxickým účinkom v rámci bunky a mohli by byť jednou z príčin bunkovej smrti, chorôb a starnutia. Tvorba reaktívnych metabolitov kyslíka a z toho vyplývajúca redoxná nerovnováha nás núti študovať potenciálne riziko aplikácie TiO₂ NČ na redoxnú nerovnováhu plazmy samíc potkanov. Je dokázané, že v systémovom obehu môžu TiO₂ NČ interagovať so zložkami plazmy (7). Naším cieľom bolo preskúmať účinky intraperitoneálneho neonatálneho podávania TiO₂ NČ samiciam potkanov na antioxidačnú kapacitu plazmy metódou TEAC a to v dvoch rôznych životných fázach (infantilné a dospelé jedince) samíc potkanov.

Materiál a metódy

TiO₂ NČ (1% alebo 10% LD50 TiO₂) sa intraperitoneálne (i.p.) podávali samiciam potkanov Wistar od 4. dňa po narodení (PND4) do PND7. Potkany sa utratili na PND15 (infantilné potkany) alebo na PND220 (dospelé potkany). Antioxidačná kapacita (TEAC) bola meraná v plazme potkanov.

Experiment 1: Infantilné samice potkanov

Novonarodeným samiciam potkanov Wistar boli i.p. injekčne podané denne rôzne dávky TiO₂ NČ: 10% LD50 TiO₂ = 592 µg / kg hmotnosti (n = 10) a 1% LD50 TiO₂ = 59,2 µg / kg hmotnosti (n = 11) v 10% (v./ v.) fyziologickom roztoku séra alebo nosič (10% fyziologický roztok séra potkana, v / v, n = 11) od 4. dňa po narodení (PND 4) do PND 7 v dávke 10 ml / kg telesnej hmotnosti. Infantilné samice potkanov boli usmrtené na PND 15 dekapitáciou v ketamín / xylazínovej anestézii.

Pokus 2: Dospelé samice potkanov

Novonarodeným samiciam potkanov z rodu Wistar boli i.p. injekčne podávané denne rôzne dávky TiO₂ NČ: 10% LD50 TiO₂ = 592 µg / kg telesnej hmotnosti (n = 20) a 1% LD50 TiO₂ = 59,2 µg / kg telesnej hmotnosti. (n = 19) v 10% (v / v) fyziologickom roztoku séra potkana alebo nosiča (10% fyziologický roztok séra potkana, v / v, n = 20) od PND 4 do PND 7 v objeme dávky 10 ml / kg telesnej hmotnosti. Neonatálne exponované dospelé samice potkanov boli usmrtené v deň prvého výskytu estra po PND 220 dekapitáciou v ketamín / xylazínovej anestézii.

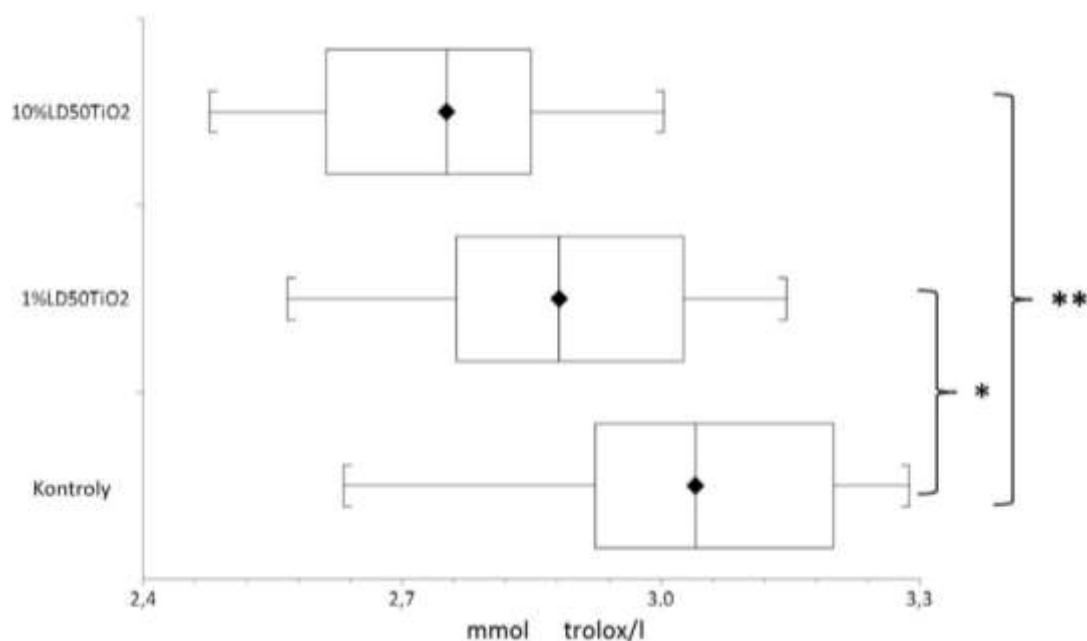
Po dekapitácii sa odobrali vzorky krvi do komerčných skúmaviek s Li-Heparínom ako antikoagulantom. Následne boli vzorky centrifugované (1 200xg, 5 min, 4 ° C), separovaná plazma bola rozdelená na alikvoty, zmrazená a skladovaná až do ďalšej analýzy (pri -80 ° C). Celkový antioxidačný status (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) bol stanovený podľa Re a kol. (8). Ako štandard sa používal trolox (hydrofilná forma vitamínu E). Hodnoty TEAC sú vyjadrené v mmol troloxu / l plazmy.

Výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou programu StatsDirect3 Statistical Software, verzia 2.3.7. (StatsDirect® Ltd., UK). Výsledky sú vyhodnotené ako median s interkvartilovým rozmedzím. Hladina signifikancie bola nastavená ako $p < 0,05$.

Výsledky

V prípade kontrolných samíc potkanov sme nezistili žiadne zmeny celkovej antioxidačnej kapacity súvisiace s vekom ($p > 0,05$) [2,942 (2,899 - 3,195) nmol trolox / l u infantilných potkanov vs 2,85 (2,76 - 3,004) nmol troloxu / l u dospelých jedincov].

U infantilných potkanov (PND15) vyvolalo podanie 1% LD50 TiO₂ [2,881 (2,727 - 2,93) nmol troloxu / l] signifikantný pokles TEAC v porovnaní s kontrolnou skupinou [2,942 (2,889 - 3,195) nmol troloxu / l], ($p < 0,05$). V porovnaní s kontrolami bolo zníženie TEAC ešte zreteľnejšie po podaní 10% LD50 TiO₂ [2,724 (2,588 - 2,843) nmol trolox / l] ($p < 0,01$) (obr. 1).

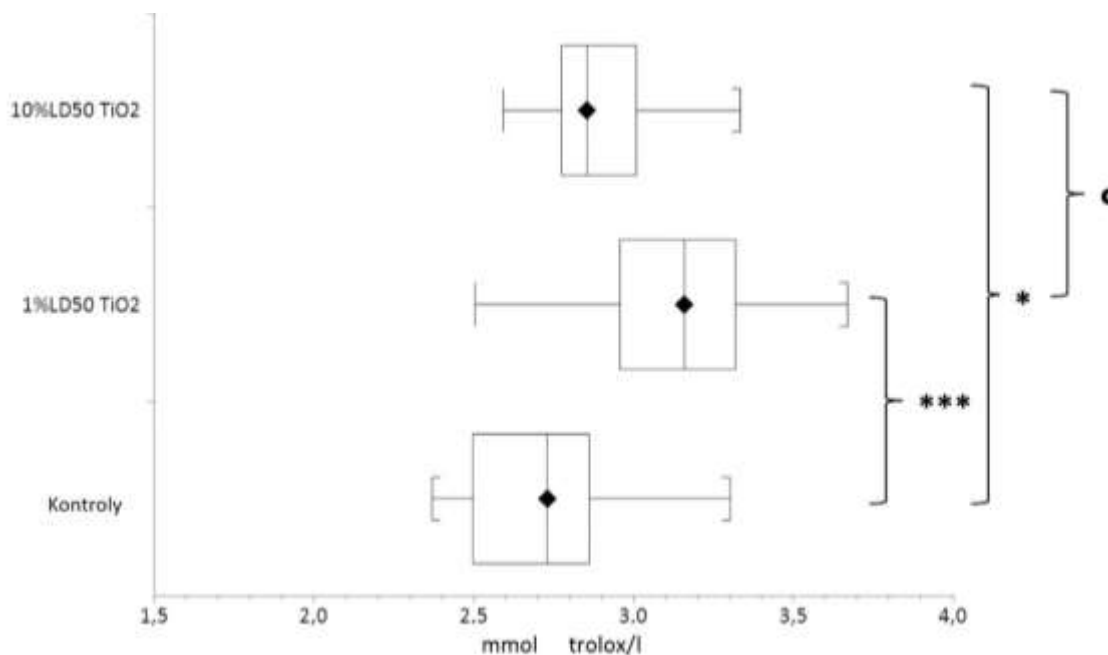


Obr. 1 Celková antioxidačná kapacita (TEAC) plazmy infantilných potkanov ovplyvnených nanočasticami TiO₂ (1% alebo 10% LD50 TiO₂). Výsledky sú uvedené ako medián s interkvartilovým rozmedzím.

* – signifikancia medzi kontrolou a testovanou nanočasticou, $p < 0,05$

** – signifikancia medzi kontrolou a testovanou nanočasticou, $p < 0,01$

Naopak, u dospelých potkanov v porovnaní s kontrolami [2,85 (2,76 - 3,004) nmol trolox / l], podanie 1% LD50 TiO₂ významne zvýšilo TEAC [3,124 (2,935 - 3,298) nmol trolox / l] ($p < 0,001$). Naproti tomu po podaní 10% LD50 TiO₂ v porovnaní s kontrolnou skupinou sa zistil signifikantný pokles antioxidačnej kapacity [2,721 (2,479 - 2,835) nmol trolox / l] ($p < 0,05$) (obr. 2).



Obr. 2 Celková antioxidačná kapacita (TEAC) plazmy dospelých potkanov ovplyvnených nanočasticami TiO₂ (1% alebo 10% LD₅₀ TiO₂). Výsledky sú uvedené ako medián s interkvartilovým rozmedzím.

* – signifikancia medzi kontrolou a testovanou nanočasticou, $p < 0,05$

*** - signifikancia medzi kontrolou a testovanou nanočasticou, $p < 0,001$

° - signifikancia medzi dvoma dávkami nanočastíc, $p < 0,05$

Diskusia a záver

Cieľom našej štúdie bolo zistiť vplyv intraperitoneálneho podávania TiO₂ nanočastíc na celkovú antioxidačnú kapacitu plazmy potkanov v závislosti od dávky (1% alebo 10% LD₅₀ TiO₂) a súčasne v závislosti od veku potkana (infantilné a dospelé jedince).

Pretože NČ sú schopné prechádzať biologickými membránami a vstupovať do cytoplazmy a jadra buniek, existuje veľká pravdepodobnosť vzniku oxidačného stresu v bunkách. To, že NČ majú vplyv na oxidačný stres buniek, bolo dokázané niekoľkými štúdiami (6; 11; 12). Naše výsledky takisto poukazujú na možnosť ovplyvnenia oxidačného statusu plazmy (TEAC) potkanov komerčne využívanými NČ oxidu titaničitého.

Výsledky mnohých štúdií (9; 10) naznačujú pokles antioxidačnej kapacity súvisiaci s vekom. Pokles môže súvisieť s tvorbou oxidačného stresu, ktorý sa prejavuje poškodením biologicky dôležitých molekúl. Na rozdiel od týchto zistení, naše výsledky vekovo závislú zmenu (pokles) v celkovej antioxidačnej kapacite plazmy potkanov nepotvrdili.

V porovnaní s kontrolami rovnakého veku vykazovali infantilné potkany pokles antioxidačnej kapacity charakterizovaný TEAC so zvyšujúcou sa koncentráciou TiO₂ NČ. Tieto výsledky sú v súlade so zistením Meena a kol. (13), ktorí uvádzali nárast reaktívnych foriem kyslíka v mozgu samcov potkanov Wistar po liečbe NČ TiO₂, čo by mohlo byť dôvodom na redukciiu TEAC.

Pretože sa TiO₂ NČ a nanomateriály stali neoddeliteľnou súčasťou nášho života v podobe potravinových aditív, kozmetiky a látok doručujúcich lieky, je zrejmé, že toxicita a potenciálne škodlivé účinky týchto NČ sa stali predmetom ľudského záujmu. Aj keď počet publikovaných prác na túto tému rastie, vplyv NČ na ľudské zdravie je nejasný a vyžaduje si ďalšie skúmanie.

Podakovanie

Projekt vznikol na základe podpory slovenskej agentúry pre výskum a vývoj na základe zmlúv č. APVV-15-0296 (skratka ENDONANOSAFE).

Literatúra

1. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29:1912–1919, 2008.
2. Lankveld DP, Oomen AG, Krystek P, Neigh A, Troost-de Jong A, Noorlander CW, Van Eijkeren JC, Geertsma RE, De Jong WH. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials*, 31:8350–8361. 2010.
3. Park, M.V.D.Z., Neigh, A.M., Vermeulen, J.P., Fonteyne, L.J.J., Vergaren, H.W., Briedé, J.J., Loveren, H., Jong, W.H. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 36(32), 9810 – 9817, 2011.
4. Falck G. C. M., H. K. Lindberg, S. Suhonen et al., “Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂,” *Human & Experimental Toxicology*, vol. 28, no. 6-7, pp. 339–352, 2009.
5. Tada – Oikawa, S., Ichihara, G., Fukatsu, H., Shimanuki, Y., Tanaka, N., Watanabe, E., Suzuki, Y., Murakami, M., Izuoka, K., Chang, J., Wu, W., Yamada, Y., Ichihara, S. Titanium dioxide particle type and concentration influence the inflammatory response in Caco – cells. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 576, 2016.
6. Hanot-Roy A., Tubeuf E., Guilbert A., Bado-Nilles A., Vigneron P., Trouiller B., Braun A., Lacroix G. Oxidative stress pathways involved in cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on cells constitutive of alveolo-capillary barrier in vitro. *Toxicology in Vitro*, Volume 33, 125-135, ISSN 0887-2333, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.013>, 2016.
7. Deng ZJ, Mortimer G, Schiller T, Musumeci A, Martin D, Minchin RF: Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology* 20, 455101. doi: <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/20/45/455101>. 2009.
8. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, pp. 1231–1237, 1999.
9. Adiga U., Adiga S. Total antioxidant activity in old age. *Biomedical Research*. 19 (3), 2008.
10. Muralidharan N., Bhat T., Kumari S. N. A study on effect of ageing on the levels of total antioxidant and lipid peroxidation. *International Journal of Contemporary Medical Research*;4(12):8-10. 2017.
11. Khanna P., Ong C., Bay BH., Baeg GH. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. *Nanomaterials*, 5, 1163-1180, 2015.
12. Dvořáková, M., Rollerová, E., Scsuková, S., Bujňáková Mlynářčiková, A., Laubertová, L. Žitňanová, I. Effect of neonatal exposure to poly(ethylene glycol)-block-poly (lactic acid) nanoparticles on oxidative stress in infantile and adult female rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017.
13. Meena, R., Kumar, S., Paulraj, R. Titanium oxide (TiO₂) nanoparticles in induction of apoptosis and inflammatory response in brain. *J Nanopart Res.*, 17:49. doi: 10.1007/s11051-015-2868-x. 2015.

ZMENY LIPIDOVÉHO PROFILU U PACIENTOV S ALKOHOLOVÝM OCHORENÍM PEČENE

(Changes in the lipid profile in patients with alcoholic liver disease)

Gajdošová Lívia, Muchová Jana

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava, jana.muchova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Alkohol predstavuje súčasť ľudskej kultúry už tisíce rokov. Už u starovekých civilizácií sa potýkali s poškodením pečene, ktoré súviselo s nadmernou konzumáciou alkoholických nápojov. V súčasnej dobe predstavuje globálny zdravotný problém, ktorý vo väčšine spoločností predstavuje značné sociálno-ekonomické zaťaženie. Pojem alkoholové ochorenie pečene zahŕňa celé spektrum pečeňových lézií vrátane steatózy, steatohepatitídy až cirrhózy, ktorá môže prejsť až do konečného štádia - hepatocelulárneho karcinómu. V patogenéze týchto ochorení hrá svoju úlohu aj oxidačný stres, ktorý súvisí s narušením rovnováhy medzi produkciou reaktívnych kyslíkových metabolitov a antioxidačným systémom ľudského tela. Pečeň je hlavným miestom tvorby a klírensu lipoproteínov. Pri poškodení pečene sú prítomné zmeny hladín lipidov v sére, pričom existuje korelácia medzi rozsahom zmien lipidového profilu a závažnosťou tohto ochorenia.

Kľúčové slová

alkoholové ochorenie pečene, lipidový profil, lipoproteíny

Summary

Alcohol has been part of human culture for thousands of years. Already in ancient civilizations they had to deal with liver damage associated with excessive consumption of alcoholic beverages. It is currently a global health problem, which in most companies is a significant socio-economic burden. The term alcoholic liver disease encompasses the full spectrum of liver lesions, including steatosis, steatohepatitis to cirrhosis, which may progress to end-stage hepatocellular carcinoma. Oxidative stress also plays a role in the pathogenesis of these diseases, which is related to the disruption of the balance between the production of reactive oxygen metabolites and the antioxidant system of the human body. The liver is a major site of lipoprotein production and clearance. In liver damage, changes in serum lipid levels are present, with a correlation between the extent of changes in lipid profile and the severity of the disease.

Keywords

alcoholic liver disease, lipid profile, lipoproteins

Úvod

Alkohol je legálna psychoaktívna látka, ktorej požívanie patrí v mnohých krajinách k zvykom tradičnej kultúry. Z tohto dôvodu je primárna prevencia často podceňovaná, čo značne komplikuje snahu lekárov vysvetliť pacientovi, že nadmerná konzumácia alkoholu môže viesť

k vážnym zdravotným problémom, medzi ktoré patria psychické poruchy, ako aj fyzické úrazy a ochorenia (1). Na základe údajov Svetovej zdravotníckej organizácie je spotreba alkoholu na Slovensku porovnateľná s ostatnými krajinami. Začiatkom 90. rokov bola spotreba na obyvateľa vyššia ako 10 litrov. V roku 2017 bola spotreba alkoholu 8,2 litra na obyvateľa, pričom v roku 2016 to bolo 8,4 litra. V súčasnosti došlo k zníženiu konzumácie destilátov a vín, avšak zvýšila sa konzumácia piva (2). Svetové štatistiky mapujúce konzumáciu alkoholu a úmrtnosť na cirhózu pečene naznačujú alarmujúci trend v konzumácii alkoholu a zvyšovanie prevalencie a mortality súvisiacej s cirhózou. Zvyšuje sa tiež výskyt a prevalencia iných etyltoxických chorôb. Tento trend je markantný od 50. rokov 20. storočia (3). V krajinách s najvyššou konzumáciou alkoholu sú ochorenia pečene tretím najčastejším ochorením po kardiovaskulárnych a onkologických ochoreniach (4).

Definícia alkoholového ochorenia pečene

Spektrum alkoholom indukovaných ochorení pečene (ALD) je široké a zahŕňa alkoholom indukovanú steatózu, steatohepatitídu, hepatitídu, fibrózu, cirhózu a hepatocelulárny karcinóm. Primárnou príčinou ALD nie je podvýživa, ako sa predpokladalo niekoľko desaťročí, hoci podvýživa môže okrajovo prispievať k zhoršeniu choroby; vzniká v dôsledku metabolizovania alkoholu po jeho požití. Etanol sa metabolizuje v pečeni na veľmi reaktívny acetaldehyd prostredníctvom dvoch dráh – pomocou alkoholdehydrogenázy a cytochrómu P450 izoformy 2E1 mikrozomálneho systému oxidácie etanolu (MEOS). Poškodenia, ktoré vzniknú, modifikujú nielen pečenné parenchýmové bunky, ale aj neparenchýmové bunky, ako sú Kupfferove bunky, hviezdicové bunky a sínusoidné endotelové bunky. Aktivujú sa acetaldehydom, reaktívnymi metabolitmi kyslíka a endotoxínmi, ktoré produkujú baktérie v tenkom čreve a do tela sa dostávajú v dôsledku ich úniku z čreva. Diskutuje sa o rôznych intrahepatálnych signálnych cestách a vrodených alebo získaných imunitných reakciách, ktoré prispievajú k patogenéze ALD prostredníctvom päťkrokovej sekvencie poškodenia pečene, ktorá je zodpovedná za zhoršenie ochorenia. Klinické rizikové faktory zahŕňajú množstvo alkoholu požívaného denne po dobu viac ako desať rokov, rozdiely medzi pohlaviami s vyššou citlivosťou na alkohol u žien, genetická predispozícia a už existujúce ochorenie pečene. V posledných rokoch sa realizovali rôzne experimentálne štúdie s cieľom lepšie pochopiť patogenézu ALD, v ktorých sa získali mnohé nové poznatky. Zostáva však otáznе, do akej miery sú výsledky získané v experimentálnych štúdiách relevantné pri pochopení patogenézy u človeka (5).

Rozdiely vzniku ALD medzi pohlaviami

Pri pôsobení alkoholu na ľudský organizmus existujú medzi pohlaviami rozdiely; ženský organizmus reaguje na alkohol citlivejšie a následky jeho užívania sú u žien oveľa závažnejšie. Napríklad, ženy majú zväčša vyššie percento telesného tuku, nižšiu telesnú hmotnosť, nižší obsah vody, ako aj menšiu pečeň, ktorá je zaťažovaná spracovávaním hormónov – vyšší metabolizmus hormónov a menej pečenných enzýmov. Abúzus alkoholu vedie u žien k mnohým alergiám, psoriáze, predčasnej menopauze, ako aj rakovine prsníka. Častokrát má vplyv na vývoj pridružených psychologických problémov, bulímiu, pričom kombinovaná konzumácia alkoholu a drog môže prispievať k rýchlejšiemu vzniku poškodení mozgu. Vplyv alkoholu na vývoj pridružených chorôb je medzi pohlaviami taktiež odlišný. Za nebezpečnú sa považuje konzumácia 60 gramov čistého alkoholu denne u muža a 20 gramov čistého alkoholu denne u ženy. Ak muž a žena rovnakej hmotnosti vypijú rovnaké množstvo alkoholu, vplyvom menej výkonného metabolizmu bude mať žena o 1/3 vyššiu alkoholémiu. Alkoholom indukovaná cirhóza pečene sa u mužov vyskytuje po približne 10–20 rokoch konzumácie 132 gramov čistého alkoholu denne, u žien približne po 5 rokoch užívania 52 gramov čistého alkoholu denne (6).

Lipidové parametre v patogenéze ALD

Pečeň zohráva významnú úlohu v metabolizme lipidov, ako aj vo viacerých fázach syntézy, transportu a odbúravania lipoproteínov (7,8). Pečeň je považovaná za fundamentálne miesto tvorby a klirensu lipoproteínov, prispieva k exogénnym aj endogénnym cyklom metabolizmu lipidov a transportu lipidov v plazme. Chronické ochorenie pečene môže teda ovplyvňovať hladinu lipidov v plazme. ALD signifikantne prispieva k morbidite a mortalite na celom svete. Tieto ochorenia sú často spojené s výrazným znížením plazmatických triglyceridov a hladín cholesterolu v dôsledku zníženej kapacity biosyntézy lipoproteínov (9).

Zníženú koncentráciu sérového cholesterolu u pacientov s cirhózou potvrdili mnohé štúdie. Kackar a kol. zistili, že hladina cholesterolu v sére klesá postupne v súvislosti s progresiou alkoholovej cirhózy (10). Miller a kol. pozorovali znížené hladiny cholesterolu a apolipoproteínu (apo) B u pacientov s cirhózou bez prítomnej cholestázy (11). Aktivita lecitín-cholesterol acyltransferázy (LCAT) a podiel esterifikovaného cholesterolu v plazme boli tiež výrazne znížené. D'Arienzo a kol. vo svojej štúdii uviedli, že nízka hladina cholesterolu je spojená s vyššou úmrtnosťou u cirhotických pacientov (12). Ďalšie porovnanie hodnôt celkového cholesterolu podľa Child-Pugh skórovacieho systému úmrtnosti na cirhózu ukázalo priamy vzťah medzi závažnosťou poškodenia pečene a zníženou hladinou cholesterolu (13-16). V štúdii ktorú uskutočnil Cicognani a kol. došlo k zjavnému poklesu hladiny celkového cholesterolu u pacientov s chronickým ochorením pečene v porovnaní s kontrolami (17).

Taktiež sa v sére pacientov s cirhózou vyskytovali významne nižšie hladiny triglyceridov v porovnaní s hodnotami u zdravých jedincov (13-17). Mechanizmom zodpovedným za zníženie hladiny triglyceridov u pacientov s cirhózou môže byť nesprávna výživa a znížený metabolizmus voľných mastných kyselín v cirhóze z dôvodu zníženej rezervy pečeneového parenchýmu (7).

U pacientov s cirhózou bol pozorovaný signifikantný pokles hladín LDL v sére v porovnaní so zdravými jedincami (14,16,18,19). Zníženie hladiny LDL bolo úmerné závažnosti poškodenia pečene u cirhotikov, ako bolo zistené skórovacím systémom Child-Pugh (20).

HDL cholesterol (HDL) je považovaný za hlavný ochranný faktor pred srdcovo-cievnyimi ochoreniami (21), pričom mierna konzumácia alkoholických nápojov je spájaná so zvýšením koncentrácie HDL (23-29), keďže hlavné miesto syntézy apoA-I je pečeň a alkohol zvyšuje produkciu tohto apolipoproteínu v transformovaných hepatocytoch (22-24). Toto zvýšenie je teda výsledkom zvýšenej rýchlosti transportu hlavných HDL apolipoproteínov apoA-I a -II (30). Avšak u pacientov s rozvinutou cirhózou je prítomné rozsiahle poškodenie hepatocytov; dochádza k významnému zníženiu hladiny HDL v sére v porovnaní so zdravými kontrolami. Subhan a kol. pozorovali, že u pacientov s chronickým ochorením parenchýmu pečene bez cholestázy hladiny HDL klesajú a zhoršujú sa s progresiou ochorenia (20). Zníženie HDL u pacientov s cirhózou možno pripísať zníženej syntéze HDL v pečeni, čo môže byť spôsobené nedostatkom LCAT. Pečeň je jediným zdrojom tohto enzýmu a jeho sérové hladiny sú pri poruchách pečene znížené. Znížená LCAT má tak za následok zhoršenie premeny nascentného diskoidného HDL na zrelý sférický HDL (14-16, 18, 20). Selimoglu zistil, že hladina HDL je nižšia u pacientov v triede B podľa Child-Pugh (stredne závažné ochorenie pečene) ako v triede A (menej závažné ochorenie pečene) a hladina apoA je považovaná za najviac ovplyvnený faktor u pacientov s poškodením pečene (31).

Hladiny VLDL sú pri cirhóze znížené v porovnaní so zdravými jedincami, pričom toto zníženie tiež koreluje so závažnosťou ochorenia pečene (32). Väčšina štúdií preukázala, že všetky lipidové fragmenty pri cirhóze boli nižšie ako pri kontrolnej vzorke. Tieto štúdie poukázali na významné zmeny hladiny lipidov u pacientov s cirhózou a ich negatívny vzťah k rozsahu poškodenia pečene. Ochorenie pečene má teda za následok zníženie celkového cholesterolu, VLDL, LDL a HDL (32-34). Podobne Perales a kol. pri chronickom ochorení pečene bez cholestázy potvrdil výrazný pokles hladín lipidov s progresiou chorobného procesu (22).

Podľa Som a kol. mala väčšina pacientov s alkoholovou cirhózou, ktorý vo vyhodnotení Child-Pugh skóre patrili do triedy C (závažnejšie ochorenie), znížených všetkých päť parametrov lipidového profilu v sére a nižší index telesnej hmotnosti (BMI) ako tí, ktorí patrili do Child-Pugh skóre triedy B alebo A. Preto možno dospieť k záveru, že závažnosť chronického alkoholom indukovaného ochorenia pečene má inverzný vzťah k lipidovému profilu v sére, ako aj k BMI (32).

Záver

Nadmerná konzumácia alkoholu je dnes považovaná za globálny problém v oblasti zdravia. V získavaní poznatkov o mechanizmoch a patológii ALD sa dosiahol podstatný pokrok, avšak mnoho znakov ALD nie je známych a vyžaduje si ďalšie skúmanie. Keďže pečeň hrá kľúčovú úlohu v syntéze a metabolizme lipoproteínov, pri závažnej hepatálnej insuficiencii sú často pozorované zmeny v hladinách lipidov a lipoproteínov v sére. Tento jav môžeme označiť ako sekundárna hypolipidémia. Výsledky uvedených klinických štúdií ukázali, že všetky pozorované premenné lipidového profilu (celkový sérový cholesterol, triglyceridy, VLDL, LDL a HDL) majú u pacientov s ALD významne nižšie koncentrácie v porovnaní s kontrolnou skupinou, pričom závisí od stupňa závažnosti ochorenia. Tieto zmeny sa pripisujú zníženej syntéze lipoproteínov, LCAT, deficitu pečeňových lipáz, nedostatku apolipoproteínu A aj B, ako aj abnormalitám v klírense lipoproteínových častíc. Nízka hladina cholesterolu a ostatných lipidových parametrov je spojená s vyššou mortalitou u pacientov s cirhózou pečene, pretože hrá úlohu pri klinických prejavoch cirhózy, vrátane bakteriálnych infekcií, hematologických komplikácií, malnutrícií a funkcie nadobličiek. Nízke hladiny HDL môžu tiež viesť k vyššiemu riziku vzniku srdcovo-cievnych ochorení. Hypolipidémia môže súvisieť so zmenami lipidov bunkovej membrány, avšak nie je známe, ako veľmi nízke hladiny cholesterolu ovplyvňujú zloženie a funkciu membrány. V súčasnosti sa potenciálne riziko zníženia lipidov na veľmi nízku hladinu nepotvrdilo a jeho spojenie s určitými zdravotnými rizikami je stále predmetom diskusií. Priama liečba tohto stavu je v súčasnosti neznáma, dôraz sa kladie na primárnu liečbu alkoholových ochorení pečene, ako je úplná abstinencia a spomaľovanie progresie ochorení pečene. Detekcia hladín lipidov v sére má však v budúcnosti predpoklad predstavovať pomocný nástroj na stratifikáciu stupňa poškodenia pečene.

Literatúra

1. <https://www.npz.sk/sites/npz/Stranky/NpzArticles/201306/Zavislostodalkoholualiecba.aspx> 1.11.2020
2. https://www.idnes.cz/ekonomika/domaci/alkohol-cesi-piji-alkohol-oecd.A180720_150136_ekonomika_kuce 1.11.2020
3. **Szántová M, Kupčová V, Bada V, Goncalvesová E.** Trends in alcohol consumption in relation to liver diseases in Slovakia 1973-1994. Bratisl Lek Listy 1997; 98(1): 12-6.
4. **Richter G.** Alkoholsmissbrauch und seine medizinischen Folgen. Pharmedicum 1994; (3): 18-20
5. **Teschke R.** Alcoholic Liver Disease: Current Mechanistic Aspects with Focus on Their Clinical Relevance. Biomedicines 2019; 7(3): 68.
6. <https://docplayer.cz/34461261-Alkohol-a-zeny-mgr-miriam-bobrovsk.html> 2.11.2020
7. **McIntyre N.** Plasma lipids and lipoproteins in liver disease. Gut. 1978; 19: 526-30.
8. **Kroon PA, Powell EE.** Liver, lipoproteins and disease: I. Biochemistry of lipoprotein metabolism. J Gastroenterol Hepatol 1992; 7: 214-24.
9. **Som K, Swaika BC, et al.** Lipid Profile in Alcoholic and Non Alcoholic Patients of Chronic Liver Disease - A Comparative and Analytical Study in a Rural-based Tertiary Care Centre. J Assoc Physicians India 2019; 67(4): 22-24.
10. **Kackar RR, Desai HG.** Serum cholesterol in cirrhosis of liver. J Assoc Physicians India 2004; 52: 1007.
11. **Miller JP.** Dyslipoproteinaemia of liver disease. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1990; 4: 807-32.

12. **D'Arienzo A, Manguso F, Scaglione G, Vicinanza G, Bennato R, Mazzacca G.** Prognostic value of progressive decrease in serum cholesterol in predicting survival in Child-Pugh C viral cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 1213-8.
13. **Sposito AC, Vinagre CG, Pandullo FL, Mies S, Raia S, Ramires JA.** Apolipoprotein and lipid abnormalities in chronic liver failure. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 1287-90.
14. **Ahaneku JE, Taylor GO, Olubuyide IO, Agbedana EO.** Abnormal lipid and lipoprotein patterns in liver cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma. *J Pak Med Assoc* 1992; 42: 260-3.
15. **Jarikre AE, Momoh JA.** Plasma total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol and low density lipoprotein cholesterol levels in liver cirrhosis in Nigerians. *Nig Qt J Hosp Med* 1996; 6: 157-9.
16. **Mandal SK, KoelinaSil, et al.** A Study on Lipid Profiles in Chronic Liver Diseases. *Natl J Med Res* 2013; 3: 70-72.
17. **Cicognani C, Malavolti M, et al.** Serum lipid and lipoprotein patterns in patients with liver cirrhosis and chronic active hepatitis. *Arch Intern Med* 1997; 157: 792-796.
18. **Varghese JS, Krisnaprasad K, et al.** Lipoprotein profile in cirrhosis of Liver. *Euro J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 521-522.
19. **Brier C, Lisch HJ, Braunsteiner H.** Lipoproteins, HDL- Apolipoproteins, activities of hepatic lipase and lecithin- cholesterol acyltransferase in the plasma of patients with post alcoholic end stage liver cirrhosis. *Klin Wochenschr* 1983; 61: 929-31.
20. **Subhan F, Khan I, Arif R, Khan A.** Serum lipid profile as an indicator of the severity of liver damage in cirrhotic patients. *Rawal Medical Journal* 2012; 37: 4.
21. **Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al.** High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79: 8-15.
22. **Perales J, Angel Lasuncion M, Cano A, et al.** Changes in the lipid profile in chronic hepatopathies. *Med Clin (Barc)* 1994; 102: 364-8.
23. **Gaziano JM, Manson JE.** Diet and heart disease: the role of fat, alcohol, and antioxidants. *Cardiol Clin* 1996; 14: 69-83.
24. **Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al.** A prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke in women. *N Engl J Med* 1988; 319: 267-273.
25. **Rimm EB, Giovannucci EL, Willett WC, et al.** Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet* 1991; 338: 464-468.
26. **Gaziano JM, et al.** Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 329: 1829-1834.
27. **Pearson TA.** Alcohol and heart disease. *Circulation* 1996; 94: 3023-3025.
28. **Suh I, Shaten BJ, Cutler JA, et al.** Alcohol use and mortality from coronary heart disease: the role of high-density lipoprotein cholesterol: the Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Ann Intern Med* 1992; 116: 881-887.
29. **Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Ordovas JM, et al.** Factors associated with low and elevated plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels in the Framingham Offspring Study. *J Lipid Res* 1994; 35: 871-882.
30. **De Oliveira E Silva ER, Foster D, et al.** Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II. *Circulation* 2000; 102(19): 2347-52.
31. **Selimoglu MA, Aydogdu S, Yagci RV.** Lipid parameters in childhood cirrhosis and chronic liver disease. *Pediatr Int* 2002; 44: 400-03.
32. **Som K, Swaika BC, Pramanik S, Chakraborty P, Gantait K.** Lipid Profile in Alcoholic and Non Alcoholic Patients of Chronic Liver Disease - A Comparative and Analytical Study in a Rural-based Tertiary Care Centre. *J Assoc Physicians India* 2019; 67(4): 22-24.
33. **Okeke EN, Daniyam CA, Akanbi M, Ugoya SO, Emmanuel I.** Lipid profile of patients with liver cirrhosis in Jos, Nigeria. *Journal of Medicine in the Tropics* 2010; 12: 56-59.
34. **Ghadir MR, Riahin AA, Havaspour A, Nooranipour M, Habibinejad AA.** The relationship between lipid profile and severity of liver damage in Cirrhotic patients. *Hepat Mon* 2010; 10: 285-8.

VÝZNAM POKROČILÝCH PRODUKTOV GLYKÁCIE A ICH RECEPTORU RAGE PRI VIACERÝCH OCHORENIACH

(The importance of advanced glycation end products and their receptor RAGE in many diseases)

Jakuš Vladimír

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 81372 Bratislava, vladimir.jakus@fmed.uniba.sk

Súhrn

Konečné produkty pokročilej glykácie (AGEs) a ich receptor RAGE hrajú významnú úlohu v patogenéze chronických metabolických, zápalových a autoimunitných chorôb. AGEs modifikujú proteíny, menia ich fyzikálno-chemické vlastnosti a tiež interagujú s RAGE s následnou aktiváciou rôznych signálnych ciest, vrátane indukcie oxidačného stresu a aktivácie nukleárneho faktoru kappa-B a následnou zápalovou reakciou. Solubilný receptor pre AGEs (sRAGE) neutralizuje tieto nežiadúce interakcie kompetitívnou väzbou s AGEs. Hladiny sérových sRAGE môžu byť zvýšené pri diabetes mellitus a ochorení obličiek alebo znížené pri ďalších chorobách pri súčasnom zvýšení hladín AGEs. Viaceré výskumné práce sa zaoberajú možným využitím sRAGE, esRAGE, ligandov EN-RAGE (S100A12), S100B a HMGB1 v diagnostike, prípadne terapeutickom ovplyvnení zápalovej odpovede. Na základe sľubných experimentálnych výsledkov RAGE môže byť terapeutickým cieľom pre prevenciu neskorších diabetických vaskulárnych komplikácií. Zvýšený pomer sérových AGEs/sRAGE môže byť univerzálnym alebo rizikovým biomarkerom rozvoja rôznych chorôb. Zvýšené sérové hladiny S100B proteínu korelujú so závažnosťou ochorenia COVID-19 a zápalovými procesmi a môžu reprezentovať nový biomarker klinickej závažnosti u pacientov infikovaných vírusom SARS-COV-2.

Kľúčové slová

AGEs, RAGE, COVID-19, oxidačný stres, zápal, endotelová dysfunkcia, hypertenzia, starnutie, obezita, diabetes mellitus, neurogeneratívne a autoimunitné ochorenia

Summary

Advanced glycation end products and their receptor RAGE play an important role in the pathogenesis of chronic metabolic, inflammation and autoimmune diseases. AGEs can modify proteins and so change their physico-chemical properties and also interact with RAGE with subsequent activation of variety signal pathways including oxidative stress and activation of nuclear factor kappa-B and subsequent inflammation reaction. Soluble receptor for AGEs (sRAGE) neutralize these adverse interactions by competitive bond with AGEs. Serum sRAGE levels can be elevated in diabetes mellitus and renal disease or reduced in other various diseases together with increased levels of AGEs. Many investigators are concerned with the possible application of sRAGE, esRAGE, ligands EN-RAGE (S100A12), S100B and HMGB1 as a diagnostic biomarker or as a potential therapeutic target in the inflammatory response.

On the basis of promising experimental results RAGE can be a therapeutic target for prevention of late diabetic vascular complications. The enhanced ratio of serum AGEs/sRAGE could be an universal or risk biomarker for various diseases development.

Increased serum levels of S100B protein correlate with the severity of COVID-19 and inflammatory processes and can represent a novel biomarker of clinical severity in SARS-COV-2 infected patients.

Keywords

AGEs, RAGE, COVID-19, oxidative stress, inflammation, endothel dysfunction, aging, hypertension, obesity, diabetes mellitus, neurodegenerative and autoimmune reactions

Úvod

Konečné produkty pokročilej glykácie (AGEs) je heterogénna skupina ireverzibilných aduktov tvoriacich sa neenzýmovou glykáciou a glykooxidáciou proteínov, lipidov a nukleových kyselín s redukujúcimi sacharidmi. Táto Maillardova reakcia bola objavená už v r. 1912 v rámci výskumu v potravinárskej chémii. Medzi AGEs patrí napr. karboxymetyllyzín, pentozidín, vesperlyzín, imidazolóny a ďalšie. Výskum AGEs *in vivo* sa zintenzívnil až v 80. rokoch minulého storočia predovšetkým v diabetológii a pokračuje stále intenzívne dodnes. AGEs hrajú významnú úlohu v patogenéze celého radu chronických ochorení a ich komplikácií, predovšetkým diabetických mikro- a makrovaskulárnych komplikácií (1). Hyperglykémia je príčinný faktor pre rozvoj chronických diabetických komplikácií, ktoré sprevádza zvýšená tvorba AGEs. Ukázalo sa, že hladiny AGEs sa zvyšujú pri starnutí (2), u pacientov so zlyhaním obličiek, ďalej sa akumulujú v nervovom tkanive pri Alzheimerovej chorobe, ďalších neurodegeneratívnych ochoreniach a degeneratívnych ochoreniach kostí.

Os AGEs-RAGE

V r. 1992 Schmidt a Neeper objavili transmembránový signálny receptor pre AGEs tzv. RAGE, ktorý sprostredkuje časť patologických účinkov AGEs (ako ligandy) (3,4). Naviazaním ligandu na receptor RAGE (os AGEs-RAGE) sa aktivuje celý rad signálnych ciest, pričom dochádza k vyššej produkcii voľných radikálov kyslíka (zvýšený oxidačný stres), príp. k aktivácii zápalu cestou NF-kappaB (5).

Os AGEs-RAGE má vzťah k chronickým metabolickým (6, 7, 8) a zápalovým ochoreniam (9), ďalej kardiovaskulárnym chorobám (10), autoimunitným chorobám (napr. reumatoidnej artritíde) (11), degeneratívnym ochoreniam kĺbov, neurodegeneratívnym chorobám, osteoporóze (12), k rozvoju nealkoholovej tukovej choroby pečene (NAFLD) (13), ochoreniam ústnej dutiny, k patologickým stavom v tehotenstve tzv. preeklampsii ako aj k nádorovým ochoreniam (14, 15). RAGE je však multiligandový receptor, kódovaný vysokopolymorfickým AGER génom, ktorý môže byť zodpovedný za rozvoj choroby. Napríklad rs2070600 SNP polymorfizmus môže byť spojený s diabetickými komplikáciami, autoimunitným ochorením, rakovinou a ochorením pľúc ako obštrukčnej pľúcnej choroby alebo akútneho respiračného syndrómu (16). RAGE viaže okrem AGEs tiež HMGB1, S100 proteíny alebo amyloidové fibrily. Hoci od objavu RAGE uplynulo už 27 rokov jeho význam sa stále rozširuje. V organizme sa vyskytuje RAGE ako kompletný transmembránový receptor s extracelulárnou i intracelulárnou doménou, ďalej ako endogénne secernovaný RAGE (esRAGE) a solubilný RAGE (sRAGE). esRAGE vzniká alternatívnym zostrihom pre-mRNA transkriptov RAGE a následne je uvoľnený do plazmy. esRAGE má len extracelulárnu doménu, pričom pre signálnu transdukciu chýba potrebná intracelulárna doména. sRAGE, ktorý sa odštiepuje z kompletného transmembránového receptora pôsobením proteáz ako napr. matrix metaloproteáz (MMPs) alebo ADAM-10 má podobne ako esRAGE schopnosť čiastočne neutralizovať efekt RAGE ligandov, pretože ich naviazaním neaktivuje intracelulárne deje.

Hladiny cirkulujúcich AGEs, sRAGE, pomery AGEs-sRAGE a EN-RAGE-sRAGE

Hladiny cirkulujúcich AGEs sú zvýšené u pacientov s koronárnou artériovou chorobou, aterosklerózou. Veľmi vysoký nárast hladín sérových AGEs sa pozoroval u pacientov s diabetes mellitus a pri ochorení obličiek (17). Hladiny sRAGE sú zvýšené pri diabetes mellitus oboch typov a pri zníženej funkcii obličiek. Zvýšené hladiny sRAGE môžu byť dôsledkom zvýšenej hladiny MMPs. AGEs zvyšujú expresiu a tvorbu MMPs, v dôsledku čoho sa zvýši štiepenie sRAGE z povrchu bunky.

Na druhej strane hladiny cirkulujúcich sRAGE sú znížené zasa u obéznych detí, adolescentov a dospelých, u žien s centrálnou obezitou, u pacientov s koronárnou artériovou chorobou, aterosklerózou, esenciálnou hypertenziou, s reumatickou artritídou, s hypertyroidizmom, s chronickým obštrukčným poškodením pľúc, ochorením srdca a hypercholesterolémií (17, 18). Znížené hladiny sRAGE a zvýšené hladiny AGEs môžu byť rizikovým faktorom pre tieto choroby a ich komplikácie.

V najnovšej práci autori demonštrovali prvýkrát signifikantne vyššie hodnoty pomeru AGEs/sRAGE u detí s nadváhou alebo obezitou a znížené hodnoty sRAGE (19). Nadváha s následným zvýšeným oxidačným stresom u detí môže prispievať k patogenéze kardiovaskulárnych a metabolických zmien.

Najnovšia klinická štúdia pružnosti ciev u dospelých v závislosti od veku ukazuje, že vyššie hladiny cirkulujúcich sRAGE majú ochrannú úlohu pred starnutím ciev (20).

U dospelých pacientov s hypertenziou sa skúmala súvislosť medzi AGEs, sRAGE a endotelovou dysfunkciou (21). Zistili sa znížené hladiny sRAGE a zvýšený pomer AGEs-sRAGE u pacientov s hypertenziou v porovnaní so zdravou kontrolou. Autori navrhli AGEs ako nezávislý prediktor podmienok a funkcie endotelu. sRAGE môže byť klasifikovaný ako potenciálny biomarker zápalu a endotelovej dysfunkcie.

Vyššie hodnoty sérových ENRAGE a znížené hodnoty sRAGE teda zvýšený pomer ENRAGE-sRAGE sa zistil u pacientov s autoimunitnou hepatitídou, ktorý bol navrhnutý ako potenciálny biomarker tejto choroby (22).

Cirkulujúce AGEs a sRAGE ako potenciálne biomarkery mnohých chorôb

Serové resp. plazmové hladiny AGEs a s RAGE môžu byť potenciálnymi biomarkermi rozvoja choroby. Na druhej strane u ľudí s pokročilým vekom môžu hladiny AGEs a sRAGE odrážať zasa „celkovú sumu“ chorôb prítomných u pacienta.

Unifikovaný pomer AGEs/sRAGE resp. AGEs/esRAGE sa zdá byť lepším biomarkerom než samotné AGEs, sRAGE a esRAGE pre mnohé ochorenia spojené s osou AGEs/RAGE vrátane diabetes mellitus a ochorení obličiek (18).

Terapeutické možnosti ovplyvnenia osi AGEs-RAGE pri diabetes mellitus a ich vaskulárnych komplikáciách

Terapeuticky je možné pri diabetes mellitus znižovať endogénnu tvorbu AGEs, ovplyvniť prísun AGEs do organizmu stravou (10) a ich absorpciou resp. stimulovať ich degradáciu. Centrálna úloha RAGE v patogenéze diabetických vaskulárnych zmien robí z tohto receptora sľubné miesto budúceho terapeutického alebo preventívneho zásahu. RAGE, ktorý je pravdepodobne kľúčovým hráčom diabetickej angiopatie môže byť novým terapeutickým cieľom pre diabetické vaskulárne komplikácie. Výsledky experimentálnych štúdií poukazujú na sľubné využitie sRAGE ako návnady (decoy), anti-RAGE protilátok, malých molekúl-RAGE antagonistov (inhibítorov), longistatínu, AGE a RAGE aptamérov na blokádu osi AGEs-RAGE, inhibítorov cytoplazmovej domény RAGE (ctRAGE) a genetickej supresie RAGE pomocou RAGE si RNA (si RAGE) (23, 24, 25, 26).

RAGE ako potenciálny biomarker a terapeutický cieľ viacerých patologických stavov

RAGE ako všadeprítomný, transmembránový receptor podobajúci sa imunoglobulínu, viaže rôzne endogénne extracelulárne ligandy a vnútrobunkové efekty. Väzba ligandu na extracelulárnej doméne RAGE iniciuje komplex intracelulárnych signálnych ciest vedúcich k zvýšenému oxidačnému stresu, imunozápalovým efektom, bunkovej proliferácii alebo apoptóze (27, 28, 29, 30). V súčasnosti sa výskum koncentruje na súvislosť medzi aktivitou RAGE a patologickými podmienkami ako sú nielen diabetes mellitus, ale aj rakovina, kardiovaskulárne choroby, neurodegeneratívne a autoimunitné ochorenia. Pretože RAGE hrá úlohu vo viacerých patologických stavoch, stáva sa atraktívnym cieľom pre vývoj inhibítorov na extracelulárnych a intracelulárnych doménach. Práca Bongarzzoneho a kol. (31) podrobne popisuje úlohu endogénnych RAGE ligandov a extracelulárnych efektorov pri normálnych a patofyziologických stavoch, ako i biochemické cesty modulované aktiváciou RAGE ako i malé molekuly-RAGE inhibítory a ich potenciálne využitie pre liečbu rakoviny, kardiovaskulárnych a neurodegeneratívnych chorôb.

Úloha RAGE a jeho ligandov pri SARS-COV-2 infekcii

Nové COVID-19 ochorenie spôsobené koronavírusom SARS-COV-2 prebieha pod obrazom rôzne závažnej respiračnej infekcie/akútneho respiračného syndrómu, až rozvinutého zápalu pľúc, ev. ARDS s nedostatočným zásobením kyslíkom, ktoré môže viesť až k smrti (32, 33, 34, 35). Zatiaľ čo 80 percent pacientov ma mierne príznaky alebo sú asymptomatickí u zvyšných 20 percent sa vyvinie pneumónia, pričom tretina z nich má ARDS. Práve „cytokínová búrka“ sa považuje za jeden z hlavných príčin ARDS a multiorgánového zlyhania (36). Cytokínová búrka odráža hyperzápalovú endotelovú dysfunkciu. Autori (37) zistili u týchto COVID-19 pacientov štatisticky významnú dysreguláciu IFN-gama, IL-1RA, IL-6, IL-10, IL-19, proteínov-MCP-1, MCP-2, MCP-3, CXCL9, CXCL10, CXCL5, ENRAGE a poly (ADP) ribózy. Ukazuje sa, že RAGE receptor sa exprimuje vo vysokých koncentráciách v pľúcnom tkanive a je hlavným mediátorom zápalovej odpovede. Viaceré štúdie ukazujú, že RAGE je dôležitým mediátorom pri astme, alergickom vzdušnom zápale (AAI), rakovine pľúc (15), chronickej obštruktívnej chorobe pľúc, akútnom poškodení pľúc, cystickej fibróze a bronchopulmonálnej dysplázii. Riziko ARDS a zvýšenej mortality je v prítomnosti ostatných komorbidít ako vyššieho veku (38), metabolického syndrómu resp. diabetes mellitus (34, 35). U pacientov s metabolickým syndrómom prozápalové prostredie môže prispievať ku COVIDOM-19 sprostredkovanvej imunitnej dysregulácii, vrátane suboptimálnej imunitnej odozvy, hyperzápalu, mikrovaskulárnej dysfunkcie a trombóze (39). RAGE a jeho ligandy môžu hrať dôležitú úlohu pri COVID-19 pneumónii a ARDS práve u pacientov s metabolickým syndrómom resp. s diabetes mellitus (40). Z tohto hľadiska zameranie sa na RAGE signálny systém môže mať potenciál pri klinickom manažmente týchto COVID-19 pacientov. RAGE sa tu ukazuje ako atraktívny a perspektívny terapeutický cieľ. Využitie sRAGE ako RAGE blokujúcej protilátky alebo malej molekuly inhibítora, ktorý interferuje s RAGE signálnou dráhou môže sa stať novou terapeutickou cestou vedúcou k inhibícii zápalu sprostredkovaného RAGE pri pľúcnych chorobách. Úloha aktivácie RAGE a zápalovej odozvy v pľúcach nediabetikov infikovaných vírusom SARS-COV-2 sa diskutuje v týchto najnovších prácach (41, 42). V práci (43) bola však teoreticky navrhnutá úloha signálnej dráhy sprostredkovanvej pomocou angiotenzín II receptoru typu 1 pri RAGE transaktivácii vedúcej k zápalu. Aceti a kol. 2020 (44) zasa zistili zvýšené sérové hladiny ligandu S100B, ktoré mali asociáciu so zápalovými markermi a markermi poškodenia tkanív u COVID-19 pacientov. Sérové S100B hrajú takto úlohu pri COVID-19 a môžu reprezentovať marker klinickej závažnosti u pacientov infikovaných vírusom SARS-COV-2. Ďalší extracelulárny HMGB1 ligand môže byť sľubným terapeutickým cieľom pri závažnom zápale pľúc vrátane COVID-19 (45,46), kde hrá hlavnú úlohu signálna dráha HMGB1/RAGE/TLR4.

Pod'akovanie

Štúdia bola podporená grantom Vega 1/3014/19, Vega 2/0115/19 a APVV-15-0308.

Literatúra

1. **Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS.** Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18: 1-14.
2. **Moldogazieva NT, et al.** Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. *Oxid Med Cell Longevity* 2019; 308756: 1-14.
3. **Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM.** Receptor for AGE (RAGE): signalling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1243: 88-102.
4. **Ott CH, Jacobs K, Haucke E, Santos AN, Grune T, Simm A.** Role of advanced glycation end products in cellular signalling. *Redox Biology* 2014; 2: 411-429.
5. **Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP.** RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infection* 2004; 6: 1219-1225.
6. **Schmidt AM.** Soluble RAGEs – Prospects for treating & metabolic and inflammatory disease. *Vasc Pharmacol* 2015; 72: 1-8.
7. **Oliveira MIA, deSouza EM, Pedrosa FO, et al.** RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications. *J Brasil Med Lab*, 2013; 49(2): 97-108.
8. **Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM.** The diverse ligand repertoire of the receptor for advanced glycation endproducts and pathways to the complications of diabetes. *Vasc Pharmacol* 2012; 57: 160-167.
9. **Reynaert NL, Gopal P, Rutten EPA, Wouters EFM, Schalkwijk CG.** Advanced glycation end products and their receptor in age-related, non-communicable chronic inflammatory diseases; Overview of clinical evidence and potential contribution to disease. *Int J Biochem & Cell Biol* 2016; 81: 403-418.
10. **Yamagishi S.** Role of advanced glycation endproducts (AGE)-receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) axis in cardiovascular disease and its therapeutic intervention. *CircJ* 2019; 1822-1828.
11. **Eichhorst A, Daniel C, Rzepka R, et al.** Relevance of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in murine antibody mediated autoimmune diseases. *Int J Mol Sci* 2019; Jul 1, 20(13). pii: E3234.
12. **Asadipooya K, Uy EM.** Advanced glycation end products (AGEs), receptor for AGEs, diabetes and bone: review of the literature. *J Endocrin Soc* 2019; 3(10): 1799-1818.
13. **Asadipooya K, Lankarani KB, Raj R, Kalantarhormozi M.** RAGE is a potential cause of onset and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Endocrinol* 2019; 20151302:1-11.
14. **Chhipa, AS, Borse SP, Baksi R, Lalotra S, Nivsarkar M.** Targeting receptors of advanced glycation end products (RAGE): Preventing diabetes induced cancer and diabetic complications. *Pathol-Res Practice* 2019; 215: 1526-1543.
15. **Ahmad S, Khan H, Siddiqui Z, Khan, et al.** AGEs, RAGEs and sRAGE; friend or foe for cancer. *Sem Cancer Biol* 2018; 49: 44-55.
16. **Serveaux-Dancer M, Jabaudon M, et al.** Pathological implications of receptor for advanced glycation end-product (AGER) gene polymorphism. *Dis Markers* 2019; 2067353: 1-17.
17. **Prasad K.** Low levels of serum soluble receptors for advanced glycation end products, biomarkers for disease state: Myth or reality. *Int J Angiol* 2014; 23: 11-16.
18. **Prasad K.** Is there any evidence that AGE/sRAGE is a universal biomarker-risk marker for diseases? *Mol Cel Biochem* 2019; 451: 139-144.
19. **Corica D, Aversa T, et al.** Could AGE/RAGE-Related oxidative homeostasis dysregulation enhance susceptibility to pathogenesis of cardio-metabolic complications in childhood obesity. *Frontiers in Endocrinology* 2019; 28 June, 10: 426.
20. **Gelžinský J, Mayer O, et al.** Soluble receptor for advanced glycation end-products independently influences individual age-dependent increase of arterial stiffness. *Hypertens Res* 2019; 8 (11): 841-852.
21. **Gryszynska B, Budzyn M, et al.** Association between advanced glycation end products, soluble RAGE receptor, and endothelium dysfunction, evaluated by circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in patients with mild and resistant hypertension. *Int J Mol Sci* 2019; 20(16). pii: E3942.

22. **Wu R, Liu Y, Liu X, Duan L.** Assessment of EN-RAGE, sRAGE and EN-RAGE/sRAGE as potential biomarkers in patients with autoimmune hepatitis. *J Transl Med* 2020; Oct 9, 18(1): 384.
23. **Yamagishi S, Matsui T.** Therapeutic potential of DNA-aptamers raised against AGE-RAGE axis in diabetes – related complications. *Curr Pharm Des* 2018; 24: 2802-2809.
24. **Yamagishi S, Taguchi K, Fukami K.** DNA-aptamers raised against AGEs as a blocker of various aging-related disorders. *Glycoconj J* 2016; 33: 683-690.
25. **Litwinoff E, Hurtado DC, et al.** Emerging targets for therapeutic developments in diabetes and its complications: the RAGE signaling pathway. *Clin Pharmacol Ther* 2015; 98(2): 135-144.
26. **Manigrasso MB, Pan J, Rai V, et al.** Small molecule inhibition of ligand-stimulated RAGE-DIAPH1 signal transduction. *Sci Rep* 2016; 6(1): 22450.
27. **Senatus LM, Schmidt AM.** The AGE-RAGE axis: Implications for age-associated arterial disease. *Frontiers in Genetics*, 2017; 8: 1-10.
28. **Zuo L, Prather, ER, Stetskiy V, M et al.** Inflammaging and oxidative stress in human diseases: from molecular mechanisms to novel treatments. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 1-39.
29. **Hudson, BI, Lippman, ME.** Targeting RAGE signaling in inflammatory disease. *Annu Rev Med* 2018; 69: 349-364.
30. **Zol'áková, B, Zol'ák, V, Zibolen, M.** Receptor pre produkty pokročilej glykácie a jeho úloha počas zápalovej odpovede. *Lek Obzor (Med Horizon)*, 2015; 64(5): 181-185.
31. **Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee A D.** Targeting the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE): A medicinal chemistry perspective. *J Med Chem* 2017; 60: 7213-7232.
32. **Hirano T, Murakami M.** COVID-19: A new virus, but a familiar receptor and cytokine release syndrome. *Immunity* 2020; 52:731-733.
33. **Callender LA, Curran M, Bates, SM et al.** The impact of pre-existing comorbidities and therapeutic interventions on COVID-19. *Frontiers in Immunology* 2020; 11 (1991): 1-16.
34. **Singh AK, Gupta R, et al.** Diabetes in COVID-19: Prevalence, pathophysiology, prognosis and practical considerations. *Diabetes & Metab Syndrome: Clin Res & Reviews*, 2020; 14: 303-310.
35. **Doničová V.** COVID-19: téma dňa. *Diabetes a obezita* 2020; 20 (39): 47-50.
36. **Ye Q, Wang B, Mao J.** The pathogenesis and treatment of the „cytokine storm“ in COVID-19. *J. Infect* 2020; 80(6): 607-613.
37. **Sims JT, Krishnan V, Chang CY et al.** Characterization of the cytokine storm reflects hyperinflammatory endothelial dysfunction in COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*, Epub 2020 Sep 10
38. **Oczypok EA, Perkins TN, Oury TD et al.** All the „RAGE“ in lung disease: The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a major mediator of pulmonary inflammatory responses. *Paediatr Respir Rev* 2017; 23 (40-49): 1-23.
39. **Bansal R, Gubbi S, Muniyappa R.** Metabolic Syndrome and COVID-19: Endocrine-Immune-vascular interactions shapes clinical course. *Endocrinology* 2020; 11(526): 112.
40. **De Francesco EM, Vella V, Belfiore A.** COVID-19 and Diabetes: The importance of controlling RAGE. *Frontiers in Endocrinology* 2020; 11(526): 1-6.
41. **Kerkeni M, Gharbi J.** RAGE receptor may be a potential inflammatory mediator for SARS-COV-2 infection? *Medical Hypotheses* 2020; 144 (109950): 1-3.
42. **Rojas, A, Gonzalez I, Morales M.** SARS-COV-2 mediated inflammatory response in lungs: should we look at RAGE? *Inflammation Research* 2020; 69: 641-643.
43. **Stilhano RS, Costa AJ, Nishino MS et al.** SARS-CoV-2 and the possible connection to ERs, ACE2, and RAGE: Focus on susceptibility factors. *The FASEB Journal* 2020; 00: 1-17.
44. **Aceti A, Margarucci L M, Scaramucci E et al.** Serum S100B protein as a marker of severity in Covid-19 patients. *Scientific Reports* 2020; 10: 18665.
45. **Andersson U, Ottestad W, Tracey K.** Extracellular HMGB1: a therapeutic target in severe pulmonary inflammation including COVID-19? *Molecular Medicine* 2020; 20 (42): 1-13.
46. **Street M.** HMGB1: A possible crucial therapeutic target for COVID-19? *Hormone Res in Pediatrics* 2020; 93(2): 73-75.

VPLYV γ -TOKOTRIENOLU A δ -TOKOTRIENOLU NA SENESCENTNÉ ĽUDSKÉ FIBROBLASTY

(Effect of γ -tocotrienol and δ -tocotrienol on senescent human fibroblasts)

Janubová Mária, Žitňanová Ingrid

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave maria.janubova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Bunková senescencia je ireverzibilné zastavenie bunkového cyklu sprevádzané zmenami v bunkovej morfológii a fyziológii. Nárast senescentných a teda nesprávne fungujúcich buniek v tkanivách a orgánoch vedie k postupnému zhoršovaniu ich funkcií. Je preto dôležité hľadať spôsoby ako senescentné bunky z organizmu eliminovať alebo zabrániť ich tvorbe. Tokotrienoly sú bioaktívne látky s rôznymi pozitívnymi biologickými účinkami. V našej práci sme sa zamerali na sledovanie účinku γ - a δ -tokotrienolu na senescentné ľudské pľúcne fibroblasty. Naše experimenty ukázali, že γ - a rovnako aj δ -tokotrienol znižuje viabilitu senescentných buniek a zároveň aj viabilitu/proliferáciu nesenescenčných buniek, ktoré prekonali stresové podmienky.

Kľúčové slová

γ -tokotrienol, δ -tokotrienol, bunková senescencia, MRC-5 ľudské pľúcne fibroblasty

Summary

Cell senescence is an irreversible cell cycle arrest accompanied by changes in cell morphology and physiology. The growth of senescent and thus malfunctioning cells in tissues and organs contributes to a gradual deterioration of their functions. It is therefore important to find out ways that eliminate senescent cells from the body or prevent the formation of senescent cells in the body. Tocotrienols are bioactive compounds with various positive biological effects. In our work, we focused on monitoring the effect of γ - and δ -tocotrienol on senescent human lung fibroblasts. Our experiments have shown that γ - as well as δ -tocotrienol reduces the viability of senescent cells as well as the viability/proliferation of non-senescent cells that overcame stress conditions.

Keywords

γ -tocotrienol, δ -tocotrienol, cell senescence, MRC-5 human lung fibroblasts

Úvod

Bunková senescencia je definovaná ako ireverzibilné zastavenie bunkového cyklu sprevádzané zmenami v bunkovej morfológii a fyziológii (1). Senescencia môže byť odpoveďou bunky na skracovanie telomér alebo rôzne formy stresu (DNA poškodenie, oxidačný stres atď.) (2-4).

Medzi najčastejšie znaky senescentných buniek patrí ich zväčšený a menej pravidelný tvar, zväčšené jadro, produkcia zvýšeného množstva reaktívnych foriem kyslíka a zvýšená aktivita lyzozomálnej β -galaktozidázy pri pH 6, ktorá je známa ako β -galaktozidáza asociovaná so senescenciou (SA- β -galaktozidáza) (1, 5, 6).

V senescentných bunkách ďalej dochádza k zvýšeniu expresie proteínov inhibujúcich progresiu bunkového cyklu ako je p21 a p16 (1).

Senescentné bunky boli detegované *in vitro* a aj *in vivo* (7). Navyše bolo zistené, že so zvyšujúcim sa vekom jedinca stúpa množstvo senescentných buniek v organizme (1). Zároveň bola prítomnosť senescentných buniek dokázaná aj v tkanivách a orgánoch postihnutých ochoreniami asociovanými so starnutím (8-10). Nárast senescentných a teda nefunkčných buniek v tkanivách a orgánoch vedie k postupnému zhoršovaniu ich funkcií (11). Tokotrienoly sú podskupinou vitamínu E. Podľa ich štruktúry sa rozdeľujú na α -, β -, γ - a δ -tokotrienoly. Tokotrienoly na rozdiel od tokoferolov nájdeme v semenách väčšiny jednoklíčnolistových rastlín (12). Bolo zistené, že tokotrienoly môžu vplývať aj na bunkovú senescenciu, konkrétne dokázali potlačiť rozvoj replikatívnej senescencie ľudských dermálnych fibroblastov a myoblastov (13, 14). Vplyv tokotrienolov na stresom indukovanú senescenciu nebol doteraz preskúmaný. V našej práci sme sa zamerali na sledovanie účinku γ -tokotrienolu a δ -tokotrienolu na senescentné ľudské fibroblasty, v ktorých bola senescencia indukovaná pôsobením stresora peroxidu vodíka alebo etopozidu. γ - a δ -tokotrienol sme zvolili kvôli ich lepšej biodostupnosti u ľudí v porovnaní s aplikáciou všetkých tokotrienolov naraz (15).

Materiál a metódy

Kultivácia bunkovej línie MRC-5

Bunkovú líniu MRC-5 (ľudské pľúcne fetálne fibroblasty) sme kultivovali v MEM médiu, ktoré obsahovalo L-glutamín, neesenciálne aminokyseliny a 10% fetálne teľacie sérum. Bunky sme pasážovali 1x týždenne pomocou 0,25% trypsín-EDTA roztoku.

Indukcia senescencie v bunkách

Bunky sme nasadili na kultivačné platne a po 24 hodinovej kultivácii pri 37°C a 5% CO₂ sme k nim pridali 100 μ M peroxid vodíka na 0,5 hodinu alebo 80 μ M etopozid (VP16) na 1 hodinu. Po uplynutí uvedenej doby sme bunkám vymenili médium a kultivovali ich v termostate pri 37°C a 5% CO₂ do 5. dňa od nasadenia buniek, kedy sme uskutočnili experimentálne analýzy.

Sledovanie viability/proliferácie zdravých buniek

Vplyv γ - a δ -tokotrienolu na viabilitu/proliferáciu zdravých buniek sme sledovali pomocou metyltiazol tetrazoliového (MTT) testu. Bunky sme vysievali na 96-jamkové platničky v množstve 10 000 buniek/cm². Po 24 hodinovej kultivácii pri 37°C a 6% CO₂ sme k bunkám pridali γ -tokotrienol v koncentrácii 5, 10, 25, 40 a 50 μ M na 24 hodín alebo δ -tokotrienol v koncentrácii 5, 10, 15 a 25 μ M na 24 hodín. Po 24 hodinách sme bunkám vymenili médium za čerstvé. MTT test sme uskutočnili po uplynutí 3 dní od výmeny média. K bunkám sme pridali 20 μ l MTT roztoku (5 mg/ml v 1 x PBS) do každej jamky a inkubovali sme 4 hodiny pri 37°C a 6% CO₂. Po skončení inkubácie sme odsali médium a do každej jamky sme pridali 200 μ l DMSO a platničku sme na 5 minút umiestnili na trepačku. Absorbanciu sme merali pomocou mikropatničkového spektrofotometra pri 490 nm.

Sledovanie vplyvu γ - a δ -tokotrienolu na viabilitu/proliferáciu senescentných buniek

Vplyv γ - a δ -tokotrienolu na viabilitu/proliferáciu senescentných buniek sme sledovali pomocou metyltiazol tetrazoliového (MTT) testu. Bunky sme vysievali na 96-jamkové platničky v množstve 10 000 buniek/cm². Po 4 dňoch od indukcie senescencie sme k bunkám pridali 25 μ M γ -tokotrienol na 24 hodín alebo 10 μ M δ -tokotrienol na 24 hodín. Po 24 hodinách od pridania tokotrienolov k bunkám sme uskutočnili MTT test. K bunkám sme pridali 20 μ l MTT roztoku (5 mg/ml v 1 x PBS) do každej jamky a inkubovali sme 4 hodiny pri 37°C a 6% CO₂. Po skončení inkubácie sme odsali médium a do každej jamky sme pridali 200 μ l DMSO a platničku sme na 5 minút umiestnili na trepačku. Absorbanciu sme merali pomocou mikropatničkového spektrofotometra pri 490 nm.

Sledovanie vplyvu γ - a δ -tokotrienolu na aktivitu SA- β -galaktozidázy v senescentných bunkách
Na 24-jamkovú platničku sme vysievali buď 5 000 buniek/cm² (kontrolné bunky) alebo 38 000 buniek/cm² (bunky, v ktorých bola indukovaná senescencia).

Po 4 dňoch od indukcie senescencie sme k bunkám pridali 25 μ M γ -tokotrienol na 24 hodín alebo 10 μ M δ -tokotrienol na 24 hodín. Po 24 hodinách od pridania tokotrienolov k bunkám sme uskutočnili analýzu aktivity SA- β -galaktozidázy pomocou komerčného kitu *Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich)*, podľa návodu.

Bunky sme farbili cez noc a na druhý deň sme farbiacu zmes nahradili roztokom 70% glycerolu, aby sme mohli farbené bunky dlhšie skladovať. Na 1 jamku na 24-jamkovej platničke sme použili 200 μ l 70% glycerolu. Farbené bunky zaliate glycerolom sme skladovali pri 4-6 °C. Bunky sme pozorovali inverzným mikroskopom *Microskop inverzal MBL 3200- KRUSS*, Nemecko. Bunky sme odfotografovali fotoaparátom *Olympus C-5060, Olympus*, Anglicko pri mikroskopickom zväčšení 100x a následne vypočítali množstvo senescentných buniek. Množstvo senescentných buniek sme stanovili na základe počítania buniek v 15 obrázkoch z troch rôznych experimentov.

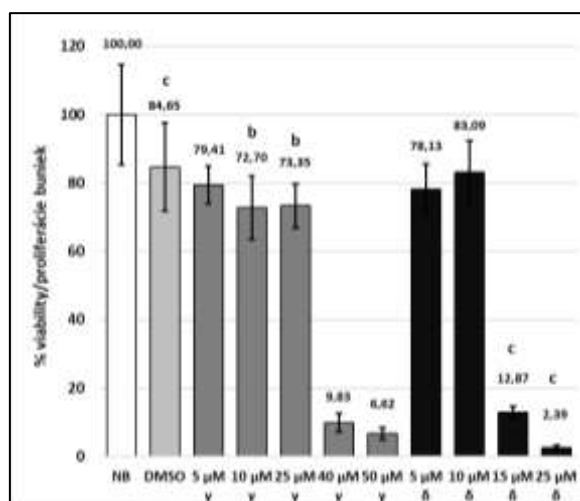
Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Štatistická analýza bola uskutočnená pomocou jednosmernej ANOVY s Bonferroniho korekciou. Hodnota $p < 0,05$ bola považovaná za štatisticky významnú.

Výsledky

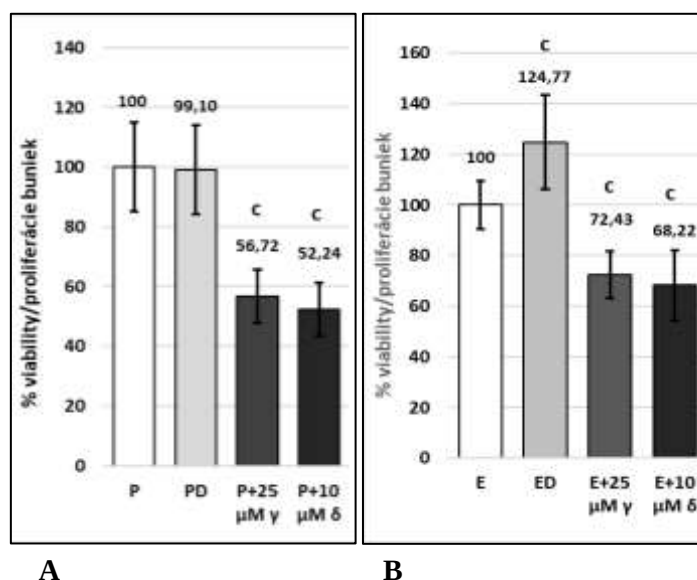
Vplyv γ -tokotrienolu a δ -tokotrienolu na viabilitu/proliferáciu zdravých buniek

MRC-5 ľudské pľúcne fibroblasty, v ktorých nebola indukovaná senescencia boli inkubované s γ -tokotrienolom (5, 10, 25, 40 a 50 μ M/24 hod) alebo δ -tokotrienolom (5, 10, 15 a 25 μ M/24 hod), aby sme detegovali vplyv týchto tokotrienolov na viabilitu/ proliferáciu zdravých buniek. Ovplynvenie buniek so 40 alebo 50 μ M γ -tokotrienolom viedlo k výraznému poklesu viability/ proliferácie buniek (na $9,83 \pm 2,76\%$ a $6,62 \pm 1,84\%$) (Obr. 1). Podobne, ovplynvenie buniek s 15 alebo 25 μ M δ -tokotrienolom bolo sprevádzané výrazným poklesom viability/ proliferácie buniek (na $12,87 \pm 1,84\%$ a $2,39 \pm 0,83\%$) (Obr. 1). Na základe uvedených zistení sme sa rozhodli pre ďalšie experimenty použiť γ -tokotrienol v koncentrácii 25 μ M a δ -tokotrienol v koncentrácii 10 μ M.



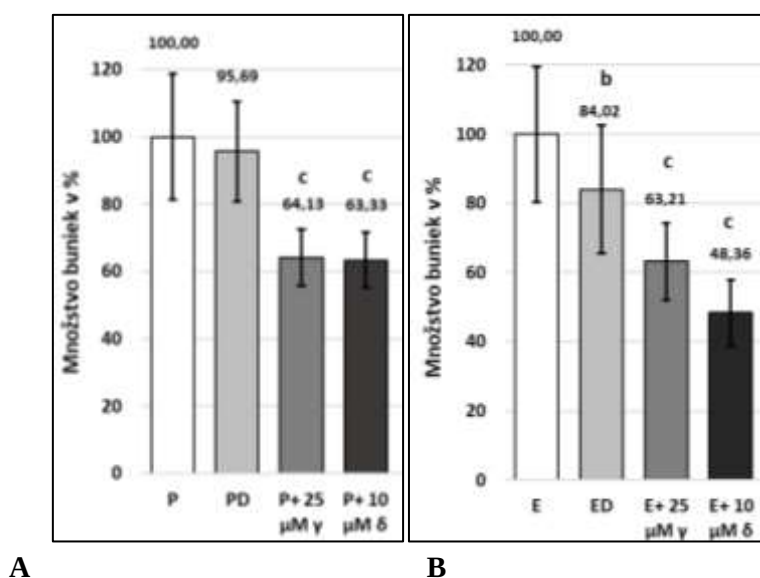
Obr. 1 Detekcia viability/proliferácie buniek po ovplyvnení γ - tokotrienolom a δ -tokotrienolom
NB – normálne bunky neovplyvnené tokotrienolmi; **DMSO** – bunky ovplyvnené 1000x riedeným DMSO/24 hod; Výsledky sú priemer $\pm$ SD 3 nezávislých experimentov, každý experiment bol robený v 4-6 jamkách; jednosmerná ANOVA s *Bonferroniho* korekciou; NB vs. DMSO; DMSO vs. γ ; DMSO vs. δ ; **b** - $p < 0.01$; **c** - $p < 0.001$

Vplyv γ -tokotrienolu a δ -tokotrienolu na viability/proliferáciu populácie buniek s prevahou senescentných buniek - V našej práci sme ďalej sledovali účinok γ - alebo δ -tokotrienolu na populáciu buniek s prevahou senescentných buniek. V tomto type experimentu sme k bunkám na 4. deň po indukcií senescencie pridali 25 μ M γ -tokotrienol alebo 10 μ M δ -tokotrienol na 24 hodín. Ovplyvnenie buniek oboma tokotrienolmi malo za následok silný pokles viability/ proliferácie buniek pri peroxidom indukovanej senescencii ($56,72 \pm 8,92\%$ a $52,24 \pm 8,9\%$) (Obr. 2A) a aj pri etopozidom indukovanej senescencii ($72,43 \pm 9,35\%$ a $68,22 \pm 14,02\%$) (Obr. 2B).



Obr. 2 Vplyv γ -tokotrienolu a δ -tokotrienolu na viability/proliferáciu senescentných buniek
A - peroxidom indukovaná senescencia **B** - etopozidom indukovaná senescencia **P** – bunky ovplyvnené 100 μ M peroxidom vodíka/0,5 hod; **E** - bunky ovplyvnené 80 μ M etopozidom/1 hod; **PD/ED** – bunky ovplyvnené 2000x riedeným DMSO/24h; Výsledky sú priemer $\pm$ SD 3 nezávislých experimentov, každý experiment bol robený v 4-6 jamkách; jednosmerná ANOVA s *Bonferroniho* korekciou; P vs. PD; PD vs. P γ ; PD vs. P δ ; E vs. ED; ED vs. E γ ; ED vs. E δ ; **c** - $p < 0.001$

Vplyv γ -tokotrienolu a δ -tokotrienolu na aktivitu SA- β -galaktozidázy v populácii buniek s prevahou senescentných buniek - Cieľom bolo stanoviť aktivitu SA- β -galaktozidázy, v populácii buniek s prevahou senescentných buniek, ktoré sme ovplyvnili 25 μ M γ -tokotrienolom/24 hodín alebo 10 μ M δ -tokotrienolom/24 hodín. SA- β -galaktozidáza je lyzozomálna β -galaktozidáza, ktorá je aktívna v senescentných bunkách pri pH 6. Aktivita SA- β -galaktozidázy pri pH 6 je v senescentných bunkách zvýšená a slúži ako marker pri určovaní senescencie buniek. Senescentné bunky sa pri tomto experimente sfarbia do modra. Po ovplyvnení buniek s 25 μ M γ -tokotrienolom alebo 10 μ M δ -tokotrienolom klesalo celkové množstvo buniek (Obr. 3A, 3B), čo koreluje s výsledkami, ktoré sme získali MTT testom. Percento senescentných buniek sa však po ovplyvnení buniek γ - alebo δ -tokotrienolom významne nemenilo v porovnaní s percentom senescentných buniek v kontrole neovplyvnenej tokotrienolmi. (Tab. 1; Obr. 3C a Obr. 3D).



Obr. 3 Vplyv γ -tokotrienolu a δ -tokotrienolu na aktivitu SA- β -galaktozidázy v senescentných bunkách A - peroxidom indukovaná senescencia B- etopozidom indukovaná senescencia P – bunky ovplyvnené 100 μ M peroxidom vodíka/0,5 hod; E - bunky ovplyvnené 80 μ M etopozidom/1 hod; PD/ED – bunky ovplyvnené 2000x riedeným DMSO/24h; Výsledky sú priemer $\pm$ SD 3 nezávislých experimentov, každý experiment zahŕňa 5 obrázkov; jednosmerná ANOVA s Bonferroniho korekciou; P vs. PD; PD vs. P γ ; PD vs. P δ ; E vs. ED; ED vs. E γ ; ED vs. E δ ; **b** - $p < 0.01$ **c** - $p < 0.001$;

Ovplyvnenie buniek	Senescentné bunky % $\pm$ SD	Signifikancia
100 μ M Peroxid vodíka /0,5 hod	94.26 $\pm$ 3.06	
100 μ M Peroxid vodíka/0,5 hod+DMSO 2000x/24 hod	93.84 $\pm$ 2.96	n
100 μ M Peroxid vodíka /0,5 hod+25 μ M γ - tokotrienol/24 hod	95.40 $\pm$ 1.87	n
100 μ M Peroxid vodíka/0,5 hod+10 μ M δ - tokotrienol/24 hod	92.84 $\pm$ 3.86	n
80 μ M Etopozid /1 hod	94.59 $\pm$ 2.44	
80 μ M Etopozid /1 hod+DMSO 2000x/24 hod	93.71 $\pm$ 3.27	n
80 μ M Etopozid /1 hod+25 μ M γ - tokotrienol/24 hod	96.66 $\pm$ 1.6	**
80 μ M Etopozid /1 hod+10 μ M δ - tokotrienol/ 24 hod	92.76 $\pm$ 3.28	n

Tab. 1 Vplyv γ -tokotrienolu a δ -tokotrienolu na aktivitu SA- β -galaktozidázy v senescentných bunkách Výsledky sú priemer $\pm$ SD 3 nezávislých experimentov, každý experiment zahŕňa 5 obrázkov; Jednosmerná ANOVA s Bonferroniho korekciou; Peroxid vodíka vs. Peroxid vodíka+DMSO; Peroxid vodíka+DMSO vs. Peroxid vodíka+ γ -tokotrienol; Peroxid vodíka+DMSO vs. Peroxid vodíka+ δ -tokotrienol; Etopozid vs. Etopozid+DMSO; Etopozid+DMSO vs. Etopozid+ δ -tokotrienol; n – nesignifikantné; ** - $p < 0.01$

Diskusia

Naše experimenty ukázali, že γ - a aj δ -tokotrienol dokáže redukovať viabilitu/proliferáciu buniek v populácii s prevahou senescentných buniek, zatiaľčo ani jeden z nich nespôsobuje výrazný pokles viability/proliferácie zdravých buniek. Je známe, že α -tokoferol pôsobí aj ako prooxidant cez α -tokoferylový radikál (16). Je preto možné, že podobne pôsobia aj tokotrienoly. Sprievodným javom senescencie je tvorba reaktívnych foriem kyslíka, ktorých negatívny vplyv na bunku by mohol byť v prítomnosti tokotrienolov zvýšený. Sledovanie aktivity SA- β -galaktozidázy v senescentných bunkách po pridaní γ - a δ -tokotrienolu nám odhalilo, že množstvo senescentných buniek po pridaní γ - a δ -tokotrienolu sa výrazne nemenilo v porovnaní s kontrolou neovplyvnenou tokotrienolmi, čo poukazuje na to, že γ - a ani δ -tokotrienol pravdepodobne nepôsobia selektívne voči senescentným bunkám. Iné štúdie však prišli k záverom, že tokotrienoly dokážu zlepšiť rast senescentných ľudských dermálnych fibroblastov a myoblastov (13, 14). Uvedené štúdie sa však zaoberali vplyvom tokotrienolov na bunky, ktoré sa do stavu senescencie dostali v dôsledku replikatívnej senescencie. Navyše, bunky boli ovplyvňované zmesou tokotrienolov, nie tokotrienolmi jednotlivo (13, 14).

Záver

Z našich experimentov vyplýva, že γ - a aj δ -tokotrienol znižuje viabilitu senescentných buniek a zároveň aj viabilitu/proliferáciu nesenescenčných buniek, ktoré prekonal stresové podmienky.

PodĎakovanie

Práca je podporená z grantu EU, z programu CBC, Interreg V-A-NutriAging V-0014.

Literatúra

1. **Campisi J, d'Adda di Fagagna F.** Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8 (9): 729–740.
2. **Harley CB, et al.** Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345:458–460.
3. **Chen QM, Bartholomew JC, et al.** analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J* 1998; 332: 43–50.
4. **DiLeonardo A, Linke SP, et al.** DNA damage triggers a prolonged p53- dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 1994; 8: 2540–2551.
5. **Passos JF, Nelson G, Wang C, et al.** Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol.* 2010; 6: 1–14.
6. **Dimri GP, Lee X, Basile G, et al.** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 9363–7.
7. **van Deursen JM.** The role of senescent cells in ageing, *Nature* 2014; 509: 439–446.
8. **Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, et al.** Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 105: 1541–1544.
9. **Price JS, Waters JG, et al.** role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 2002; 1: 57–65.
10. **Bhat R, Crowe EP, Bitto A, et al.** Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2012; DOI: 10.1371/ journal.pone.0045069.
11. **Jeyapalan, JC, et al.** Cellular senescence and organismal aging. *Mech. Ageing* 2008; 129: 467–474.
12. **Sen CK, Khanna S, et al.** Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols. *Life Sci.* 2006; 78: 2088–2098.
13. **Khor SC, et al.** The Tocotrienol-Rich Fraction Is Superior to Tocopherol in Promoting Myogenic Differentiation. *PLoS One* 2016; DOI: 10.1371/ journal.pone.0149265.
14. **Makpol S, et al.** Tocotrienol-Rich Fraction Prevents Cell Cycle Arrest and Elongates Telomere Length in Senescent Human Diploid Fibroblasts. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; DOI: /2011/506171
15. **Meganathan P, et al.** A new formulation of γ , δ tocotrienol has superior bioavailability compared to existing tocotrienol rich fraction in healthy human subjects. *Scient. Rep.* 2015; DOI: 10.1038/srep13550.
16. **Bowry VW, Mohr D, Cleary J, Stocker R.** Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (11): 5756–5763.

NEUROPROTEKTÍVNE ÚČINKY VITAMÍNU D

(Neuroprotective effects of vitamin D)

Koňariková Katarína, Chomová Mária, Janubová Mária, Muchová Jana, Ďuračková Zdenka, Žitňanová Ingrid

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, katarina.konarikova@fmed.uniba.sk

Súhrn

Zvýšené riziko vzniku kognitívnych porúch, demencie a Alzheimerovej choroby (AD) v populácii postihnutej diabetes mellitus (DM) je výsledkom kumulatívneho účinku porušenej glukózovej a inzulínovej homeostázy, chronickej povahy ochorenia a prirodzeného procesu starnutia. Bunkové mechanizmy zodpovedné za zvýšenú senzitivitu mozgových štruktúr k neurodegenerácii u pacientov s DM nie sú detailne známe. Viacúrovňová analýza umožňuje získať komplexnejší pohľad o molekulárnych cestách prebiehajúcich v mozgových bunkách za glykemických podmienok. Najnovšie štúdie naznačujú, že vitamín D hrá dôležitú úlohu v patogenéze diabetes mellitus a Alzheimerovej choroby. Suplementácia vitamínom D môže pozitívne ovplyvniť súvisiace metabolické a imunitné procesy zapojené do patogenézy diabetes mellitus na molekulovej aj genetickej úrovni.

Kľúčové slová

astrocyty, diabetes mellitus, Alzheimerova choroba, neuropatie, vitamín D

Summary

The increased risk of cognitive disorders, dementia and Alzheimer's disease (AD) in the diabetes mellitus (DM) population is the result of the cumulative effect of impaired glucose and insulin homeostasis, the chronic character of the disease and the character aging process. The cellular mechanisms responsible for the increased sensitivity of brain structures to neurodegeneration in patients with DM are not known in detail. Multilevel analysis provides a more comprehensive view of the molecular pathways occurring in brain cells under glycemic conditions. Recent studies suggest that vitamin D plays an important role in the pathogenesis of diabetes mellitus and Alzheimer's disease. Vitamin D supplementation can positively affect the related metabolic and immune processes involved in the pathogenesis of diabetes mellitus at both the molecular and genetic levels.

Keywords

astrocytes, diabetes mellitus, Alzheimer's disease, neuropathy, vitamin D

Úvod

Vitamín D získaný slnečným žiarením, potravinami a potravinovými doplnkami je biologicky inertný a pre aktiváciu musí prejsť dvoma hydroxyláciami v tele. Prvá hydroxylácia, prebieha v pečeni, premieňa vitamín D na 25-hydroxyvitamín D (25(OH)D₃), tiež známy ako „kalcidiol“. Druhá hydroxylácia sa vyskytuje primárne v obličkách a tvorí fyziologicky aktívny 1,25-dihydroxyvitamín D (1, 25(OH)D₃), tiež známy ako „kalcitriol“ (1).

Nedostatok vitamínu D sa okrem chorôb kostí podieľa ako faktor alebo kofaktor na etiológii diabetes mellitus typu 2, diabetes mellitus typu 1 a ďalších autoimunitných ochorení, srdcových chorôb a rakoviny. Bolo tiež zistené, že pacienti s Alzheimerovou chorobou majú vysokú prevalenciu nedostatku vitamínu D (2). Suplementácia vitamínu D u pacientov s diabetes mellitus trpiacich nedostatkom tohto vitamínu, môže zabrániť alebo oddialiť vznik diabetických komplikácií. Uvádza sa tiež, že prahové hodnoty bolesti pri viacerých etiológiách sa znižujú s nedostatkom vitamínu D a zvyšujú sa pri úprave tohto nedostatku (3).

Vitamín D a diabetes mellitus

Nedostatok vitamínu D je spájaný s diabetes mellitus 1. aj 2. typu a s ich mikrovaskulárnymi a makrovaskulárnymi komplikáciami. Ukázalo sa, že nedostatok vitamínu D je častejší u diabetických pacientov, ktorí majú príznaky distálnej symetrickej polyneuropatie. Forouhi a kol. (4) zistili súvislosť medzi hladinou 25(OH)D₃ a incidenciou diabetes mellitus. Suplementácia vitamínu D tiež zlepšuje HbA_{1c} (glykovaný hemoglobín). Presné mechanizmy, pomocou ktorých suplementácia vitamínom D a vápnikom uplatňujú svoje priaznivé účinky, však nie sú úplne objasnené a je potrebné ich ďalej skúmať (5).

Vitamín D a diabetické neuropatie

Neuropatia sa v určitej forme vyskytuje u 60–70% diabetických pacientov, pričom u 50% týchto pacientov sa vyskytuje rôzny stupeň neuropatickej bolesti, čo má za následok vždy zníženie kvality života (6).

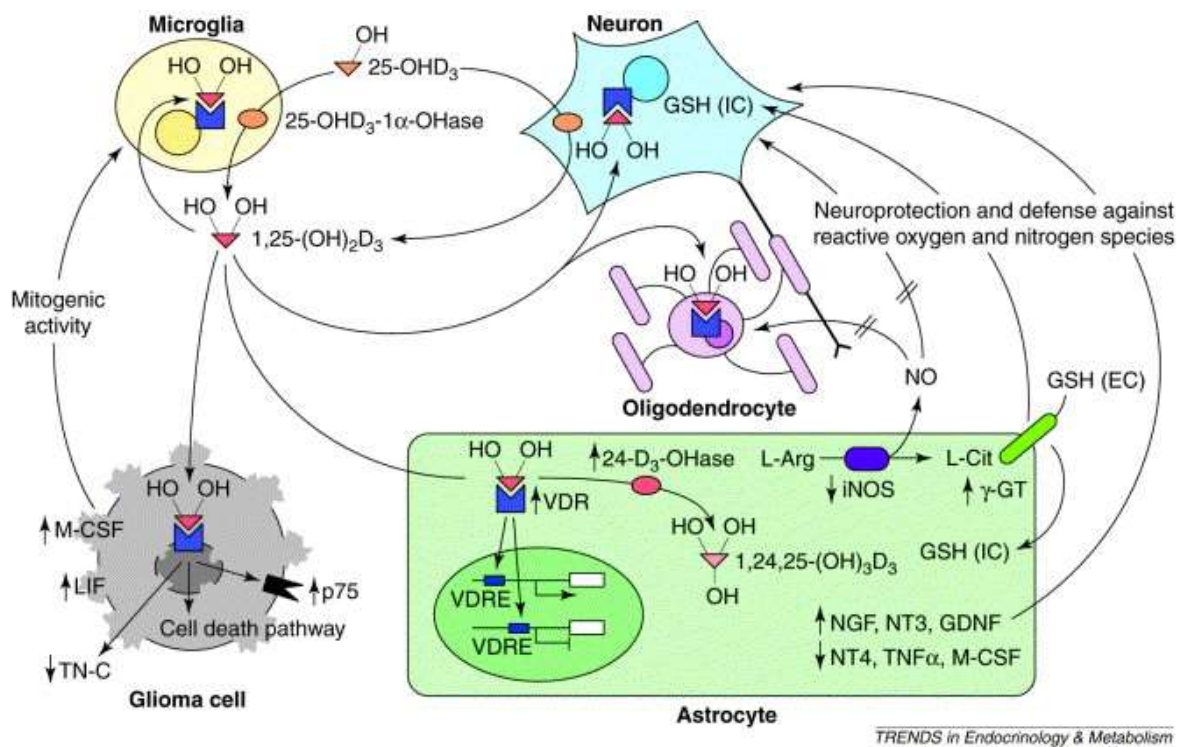
Štúdie na zvieratách preukázali, že nedostatok vitamínu D je spojený s nízkou hladinou neurotrofinov (najmä nervového rastového faktora) a defektnou neuronálnou homeostázou vápnika. Okrem toho vitamín D prostredníctvom svojho receptora moduluje diferenciáciu neurónov, ako aj ich rast a funkciu. U potkanov sa pri nedostatku vitamínu D znižuje produkcia nervového rastového faktora, ktorý je potrebný pre vývoj a prežitie neurónov. U diabetických zvierat s nedostatkom vitamínu D v skutočnosti korekcia nedostatku vitamínu D viedla k zlepšeniu produkcie nervového rastového faktora. Pokles neurotrofinov a narušená homeostáza vápnika spôsobuje, že nerv je náchylný na toxíny a hyperglykémiu. Výsledkom je, že nedostatok vitamínu D zhoršuje funkciu nociceptorov, zhoršuje poškodenie nervov a znižuje prah bolesti (7).

Vitamín D a Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je najbežnejšou formou demencie u starších osôb a je spojená s progresívnou neurodegeneráciou ľudského neokortexu. Pacienti s AD majú vysokú prevalenciu nedostatku vitamínu D, čo je tiež spojené s horšou náladou a zhoršenou výkonnosťou u starších ľudí (8). Genetické štúdie naznačujú, ktoré proteíny spájajú vitamín D s patológiou AD. Sú to hlavné molekuly histokompatibilného komplexu triedy II, receptor vitamínu D, renín-angiotenzínový systém, apolipoproteín E, pečeňový X receptor, Sp1 promótorový gén a poly Gén (ADP-ribóza) polymerázy-1. Vitamín D tiež účinkuje na AD prostredníctvom negenomických faktorov, to znamená vápnikových kanálov, nervového rastového faktora, prostaglandínov, cyklooxygenázy 2, reaktívnych foriem kyslíka a syntázy oxidu dusnatého. Ďalej sa zdá, že suplementy vitamínu D majú priaznivý klinický účinok na AD reguláciou mRNA, zvyšovaním receptorov, moduláciou expresie vaskulárneho endoteliálneho faktora, moduláciou angiogenínu a koncovými produktmi pokročilej glykácie proteínov. Vitamín D tiež uplatňuje svoje účinky na AD reguláciou expresie receptora citlivého na vápnik, zvyšovaním klirensu amyloid- β peptidov, interleukínom 10, down-reguláciou matrixových metaloproteináz, up-reguláciou hemoxygenázy 1 a potlačením redukovanej formy expresie nikotínamidadenínindinukleotidfosfátu (9).

Neuroprotektívne účinky vitamínu D v astrocytoch

Na základe prvýkrát popísanej regulácie syntézy nervového rastového faktora (NGF) 1,25-(OH)₂D₃, rôzne iné štúdie preukázali, že 1,25-(OH)₂D₃ môže pôsobiť na bunky nervového systému produkciou neurotrofinov. Napríklad syntéza NGF, neurotrofinu 3 (NT3) a neurotrofického faktora odvodeného od gliálnych bunkových línií (GDNF) bola zvýšená, zatiaľ čo neurotrofin 4 (NT4) bol down-regulovaný. V tejto súvislosti je pozoruhodné, že sa nedávno ukázalo, že 1,25-(OH)₂D₃ môže zoslabiť hypokinézu a neurotoxicitu vyvolanú 6-hydroxydopamínom u potkanov. Tieto údaje naznačujú, že 1,25-(OH)₂D₃ alebo jeho syntetické analógy môžu byť cenné pri liečbe neurodegeneratívnych ochorení. Okrem svojho vplyvu na syntézu neurotrofinov môže 1,25-(OH)₂D₃ sprostredkovať svoje neuroprotektívne účinky moduláciou neuronálnej Ca²⁺ homeostázy. Ďalším spôsobom, ako môže 1,25-(OH)₂D₃ sprostredkovať svoj neuroprotektívny účinok, je indukcia syntézy proteínov viažucich Ca²⁺, ako je parvalbumín. Uvádza sa tiež, že 1,25-(OH)₂D₃ inhibuje syntézu indukovateľnej syntázy oxidu dusnatého (iNOS), enzýmu indukovaného v neurónoch CNS a v neuronálnych bunkách počas rôznych ochorení, ako je napríklad ischemia, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, AIDS, infekcie, roztrúsená skleróza a experimentálna autoimunitná encefalomyelitída (EAE). iNOS produkuje oxid dusnatý, ktorého jedným z biologických účinkov je poškodenie neurónov aj oligodendrocytov, keď sa produkuje vo vysokých hladinách. Uvádza sa tiež, že 1,25-(OH)₂D₃ zvyšuje aktivitu γ-glutamyltranspeptidázy a expresiu zodpovedajúceho génu v mozgu potkana. Pretože γ-glutamyltranspeptidáza je vo veľkej miere zapojená do glutatiónového cyklu mozgu medzi astrocytmi a neurónmi, predpokladá sa, že 1,25-(OH)₂D₃ môže riadiť procesy detoxikácie mozgu. Zvýšenie hladín glutatiónu spojené s neuroprotektívnym účinkom 1,25-(OH)₂D₃, bol pozorovaný u mezencefalických dopaminergných neurónov ovplyvnených inhibítorom syntézy glutatiónu, l-butionín sulfoximínom a neurotoxínom l-metyl-4-fenylpyridínom (9, 10, 11).



Obr. 1 Predpokladaný molekulový mechanizmus vitamínu D v mozgových bunkách

Lokálna syntéza 1,25-(OH)₂D₃ sa môže okrem aktivovaných mikroglií uskutočniť aj bunkami exprimujúcimi 25-OHD₃-1 α -OHÁzu, ako sú neuróny. Táto lokálna syntéza 1,25-(OH)₂D₃ pomocou mikroglií by mohla predstavovať protinádorovú odpoveď centrálného nervového systému, pretože 1,25-(OH)₂D₃ indukuje bunkovú smrť a / alebo programy rediferenciácie v gliómových bunkách. 1,25-(OH)₂D₃ prítomný v mozgu sa môže ďalej metabolizovať bunkami exprimujúcimi 24-D₃-OHÁzu, ako sú astrocyty. Gliálne a neuronálne bunky, ktoré exprimujú gén VDR, sú cieľovými bunkami pre 1,25-(OH)₂D₃. V astrocytoch zvyšuje 1,25-(OH)₂D₃ syntézu niekoľkých neurotrofinov vrátane NGF, NT3 a GDNF a γ -glutamyltranspeptidázy, ktoré by sa mohli podieľať na neuroprotektívnych účinkoch 1,25-(OH)₂D₃. Inhibícia syntézy iNOS pomocou 1,25-(OH)₂D₃ je ďalším spôsobom, ako sprostredkovať 1,25-(OH)₂D₃ neuroprotektívne účinky. Veľké množstvo NO je toxické pre neuróny aj oligodendrocyty (bunky myelinizujúce CNS). NO môže rýchlo reagovať s kyslíkovými formami a vytvárať vysoko škodlivé produkty, ako sú hydroxylové a oxidové radikály. Intracelulárny glutatión (GSH), získaný z extracelulárneho GSH viacerými enzymatickými reakciami v astrocytoch, by sa potom mohol použiť na zabránenie tvorby reaktívnych dusíkových alebo kyslíkových radikálov v týchto bunkách (11).

Záver

Vitamín D je nielen regulátorom metabolizmu kostí a minerálov, ale aj účinným imunomodulátorom spojeným s mnohými ľudskými ochoreniami, homeostázy glukózy, a Alzheimerovej choroby (AD). Taktiež sa ukázalo, že nedostatok vitamínu D ovplyvňuje vylučovanie inzulínu u ľudí a zvieracích modeloch. Hromadiace sa dôkazy naznačujú významnú úlohu vitamínu D v patogenéze diabetes mellitus. Zároveň možno povedať, že vitamín D má zjavne priaznivú úlohu pri AD a zlepšuje kognitívne funkcie u pacientov s týmto ochorením.

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená grantom EU z programu CBC, Interreg V-A-NutriAging V-0014 a grantom VEGA 1/0314/19.

Literatúra

1. **Kulda V.** Vitamin D metabolism. Vnitřní lékařství 2012; 58 (5): 400-404.
2. **Savastano S, Barrea L, Savanelli MC.** Low vitamin D status and obesity: Role of nutritionist. Reviews in endocrine and metabolic disorders 2017; 18 (2): 215-225.
3. **Chiang CM, Ismael A, et al.** Effects of Vitamin D Supplementation on Muscle Strength in Athletes: A Systematic Review. Journal of strength and conditioning research 2017; 31 (2): 566-574.
4. **Dupuis J, Langenberg C.** New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. Nature Genetics 2010; 42: 105-116.
5. **Danescu LG, Levy S, Levy J.** Vitamin D and diabetes mellitus 2009; 35: 11-17.
6. **Agashe S, Petak S.** Cardiac Autonomic Neuropathy in Diabetes Mellitus. Methodist Debakey Cardiovasc 2018; 14 (4): 251-256.
7. **Cui GS, Zeng JY, Zhang J, Lu R.** Effect of nerve growth factor on osteogenic potential of type 2 diabetic mice bone marrow stromal cell in vitro. National Library of Medicine 2018; 53 (2): 97-102.
8. **Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D.** Drug treatments in Alzheimer's disease. Clinical medicine 2016; 16 (3): 247-253.
9. **Landel V, Annweiler C, Millet P.** Vitamin D, Cognition and Alzheimer's Disease: The Therapeutic Benefit is in the D-Tails. Journal of Alzheimer's disease 2016; 53 (2): 419-444.
10. **Gil Á, Plaza-Díaz J, Mesa MD.** Vitamin D: Classic and Novel Actions. Annals of nutrition and metabolism 2018; 72(2): 87-95.
11. **Garcion E, Barbot NW, Menei CNM.** New clues about vitamin D functions in the nervous system. Trends in Endocrinology & Metabolism 2002; 13 (3): 100-105.

ČREVNÝ MIKROBIÓM OVPLYVŇUJE ZÁVAŽNOSŤ ALZHEIMEROVEJ CHOROBY

(Gut microbiome affects the severity of Alzheimer's disease)

Pös Ondrej^{1,2,3}, Styk Jakub^{3,4}, Szemes Tomáš^{1,2,4}

¹*Katedra Molekulárnej Biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, 841 04 Bratislava, Slovensko, pos1@uniba.sk*

²*Geneton s.r.o., 841 04 Bratislava, Slovensko*

³*Vedecký park Univerzity Komenského, 841 04 Bratislava, Slovensko*

⁴*Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska Fakulta, Univerzita Komenského, 811 08 Bratislava, Slovensko*

Súhrn

Súčasné metódy liečby a moderné liečivá udržujú ľudí nažive čoraz dlhšie, avšak s tým prichádzajú aj ďalšie s vekom spojené ochorenia. Typickým ochorením tohto typu je demencia. Najčastejšou príčinou demencie je Alzheimerova choroba, multifaktoriálne ochorenie, takže okrem genetiky majú významný vplyv na jej vývoj aj faktory životného prostredia. Viaceré štúdie naznačujú, že jedným z týchto faktorov je črevný mikrobióm. V tomto prehľade sa zameriame na potenciálny vplyv črevného mikrobiómu pri rozvoji Alzheimerovej choroby a mechanizmy, ktorými môžu baktérie iniciovať neurodegeneratívne procesy.

Kľúčové slová

Alzheimerova choroba, mikrobióm, neurodegeneratívne procesy

Summary

Current treatment methods and modern medicines keep people alive ever longer, however the longer we live, the more age-related diseases we can face to. A typical disease of such type is dementia. The most common cause of dementia is Alzheimer's disease a multifactorial disease, thus environmental factors, in addition to genetics, have a significant impact on its development. Several studies suggest, that one of such factors is the gut microbiome. In this review we discuss the potential impact of gut microbiota in the development of Alzheimer's disease and the mechanisms of bacteria related neurodegenerative processes.

Keywords

Alzheimer's disease, microbiome, neurodegenerative processes

Úvod

Neurologické poruchy sú štvrtou najčastejšou príčinou smrti na Slovensku, ktorá spôsobila cez 2530 úmrtí v roku 2019. Podľa databázy GHDx je Alzheimerova choroba spolu s inými demenciami zodpovedná za 77,4% tejto úmrtnosti (1). Odhaduje sa, že na svete pribudne nový prípad každé tri sekundy (2). Väčšina opatrovateľov, ktorí sa starajú o pacientov s Alzheimerovou chorobou sú rodinný príslušníci trpiaci značnými emočnými a fyzickými ťažkosťami, a to má na tieto osoby ničivý vplyv. Zdravotná starostlivosť o pacientov

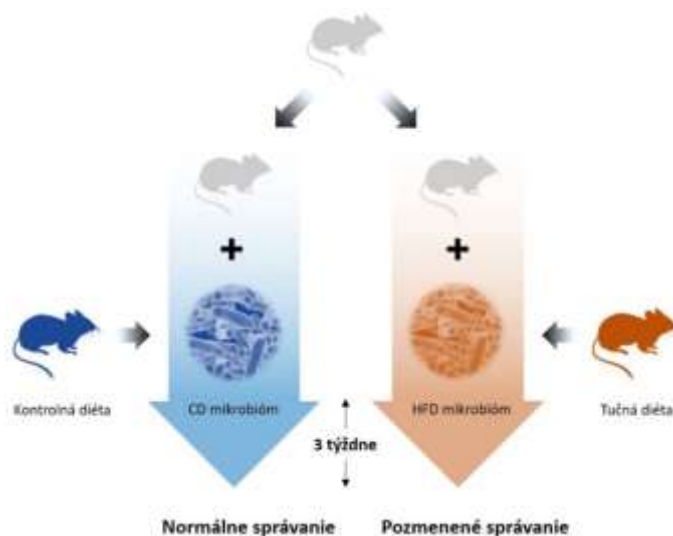
s Alzheimerovou chorobou je navyše veľmi nákladná, preto sa považuje za jednu z najdrahších chorôb na svete (3).

Alzheimerova choroba je neurodegeneratívne ochorenie s multifaktoriálnou etiológiou, založené na genetických aj environmentálnych rizikových faktoroch, ktoré ovplyvňuje mozog. Mnoho epidemiologických štúdií naznačuje, že jedným z faktorov, ktoré významne zvyšujú riziko Alzheimerovej choroby, je obezita (4). Obézni pacienti majú nedostatky v učení, pamäti a kognitívnom vnímaní v porovnaní s pacientmi, ktorí nie sú obézni (5). Aj keď existuje niekoľko štúdií, ktoré sú v rozpore s týmito zisteniami (6), väčšina publikácií naznačuje, že obezita má negatívny vplyv na neurodegeneratívne choroby.

Vplyv črevného mikrobiómu na centrálny nervový systém

Existujú zistenia, že obezita zvyšuje riziko Alzheimerovej choroby nezávisle od sprievodných javov, ako je hypertenzia, dyslipidémia, cukrovka a iné (4). Toto naznačuje existenciu ďalších mechanizmov, pomocou ktorých obezita ovplyvňuje vývoj ochorenia. Je známe, že špecifický typ črevného mikrobiómu je spojený s obezitou, a stále narastá počet štúdií, ktoré skúmajú potenciálny vplyv črevných mikrobiómov na centrálny nervový systém (CNS) (7). Štúdie na zvieratách preukázali, že bezmikróbové (GF; angl. *germ-free*) myši mali v porovnaní s myšami s normálnym črevným mikrobiómom zvýšenú motorickú aktivitu a znížené úzkostné správanie. Okrem toho sa tento fenotyp normalizoval po kolonizácii GF myši normálnymi mikróbmami. Po kolonizácii GF myši bolo ich správanie viac podobné myšiam s normálnym mikrobiómom. Tento experiment potvrdzuje, že črevná mikroflóra môže ovplyvniť vývoj mozgu cicavcov a následne ich správanie v dospelosti (8).

Štúdia Bruce-Keller a kol. poskytla jasnejšiu odpoveď na to, ako črevný mikrobióm asociovaný s obezitou poškodzuje CNS (Obr. 1). Boli pripravené dve skupiny myši rovnakého pôvodu. Jedna skupina myši bola kolonizovaná črevnou mikroflórou od jedincov chovaných na diéte s vysokým obsahom tukov (HFD; angl. *High-Fat Diet*). Druhú skupinu tvorili myši kolonizované mikrobiómom získaným od jedincov chovaných na kontrolnej diéte. Po 3 týždňoch sa sledovali fenotypické rozdiely, medzi týmito dvoma skupinami. Ukázalo sa, že myši kolonizované s HFD asociovanou mikroflórou mali významne poškodené prieskumnícke, kognitívne a stereotypné správanie. Toto je prvý experiment, ktorý demonštruje, že črevná mikroflóra asociovaná s HFD diétou poškodzuje fyziológiu a funkciu mozgu nezávisle od obezity. Myšiam totiž nebola nijakým spôsobom pozmenená strava a nebola u nich prítomná adipozita, či metabolický syndróm (9).



Obr. 1 Schéma experimentu so štúdie Bruce-Keller a kol.

Transplantácia mikrobiómu asociovaného so stravou s vysokým obsahom tukov (HFD; angl. *High-Fat Diet*) spôsobila významné narušenie prieskumného, kognitívneho a stereotypného správania myší v porovnaní s myšami, ktoré boli chované na kontrolnej diéte (CD; angl. *Control Diet*).

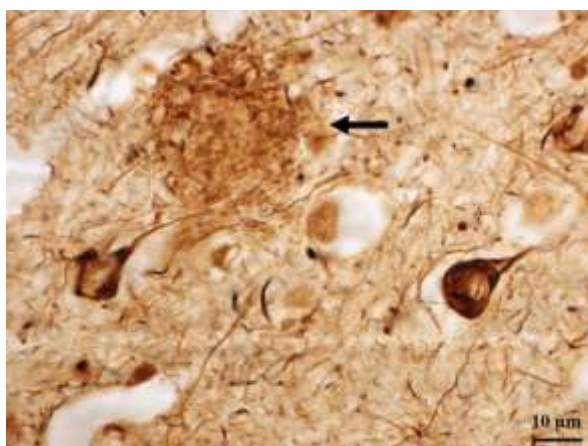
Aj keď sa potvrdilo, že črevný mikrobióm ovplyvňuje CNS, mechanizmus, ktorým baktérie ovplyvňujú správanie hostiteľa, je stále nejasný. V tejto súvislosti bolo popísaných niekoľko teórií, na ich overenie sú však potrebné ďalšie štúdie.

Priama interakcia s CNS

Jednou z teórií je, že dochádza k priamej interakcii črevnej mikroflóry s CNS hostiteľa prostredníctvom nervus vagus, ktorý priamo spája časť čreva s mozgom. Zistilo sa, že baktérie syntetizujú neuroaktívne látky, ako katecholamíny, histamín a iné zložky, ktoré dokážu uvedenou dráhou stimulovať neurofyziológiu hostiteľa. Baktérie však dokážu tieto látky nielen produkovať, ale aj rozpoznávať, čo naznačuje že by mohlo dochádzať k obojsmernej komunikácii medzi hostiteľom a mikroflórou. To by znamenalo, že mikroflóra ovplyvňuje hostiteľa, a hostiteľ môže ovplyvniť mikroflóru (10).

Extracelulárne amyloidové proteíny

Amyloidy sú proteínové agregáty, so štruktúrou β -skladaného listu. Sú tvorené amyloidnými vláknami, ktoré vznikli ako dôsledok nevhodného poskladania proteínov. Bolo popísaných viac než 60 proteínov, ktoré vytvárajú amyloidné vlákna (11). Ukázalo sa, že viaceré z nich majú v ľudskom organizme určitú funkciu, ako napríklad ochrana melanocytov pred toxicitou. Taktiež aj niektoré peptidové hormóny majú amyloidom podobnú štruktúru počas ich uskladňovania v sekrčných granulách (12). Vo viacerých štúdiách bola akumulácia amyloidných vlákien v niektorých orgánoch, asociovaná s neurodegeneratívnymi poruchami, vrátane Alzheimerovej choroby (Obr. 2) (12–14). Zistilo sa, že aj baktérie, ktoré sa vyskytujú v ľudskom tráviacom trakte, produkujú extracelulárne amyloidné proteíny, ktoré sú biochemicky podobné amyloidným štruktúram asociovaným s neurodegeneratívnymi ochoreniami. Zistilo sa, že baktérie, ktoré sa vyskytujú v ľudskom zažívacom trakte, tiež produkujú extracelulárne amyloidné proteíny, ktoré sú biochemicky podobné amyloidným štruktúram asociovaným s neurodegeneratívnymi chorobami. Amyloidy boli detekované v prirodzene sa vyskytujúcich bakteriálnych populáciách *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* a *Firmicutes* (13). V baktériách tieto proteíny slúžia ako molekulárne lešenia, ktoré držia baktérie pohromade a hrajú úlohu pri tvorbe biofilmu, napr. extracelulárny amyloidový proteín zvaný Curli, produkovaný v *Escherichia coli* (15).



Obr. 2 Neuropatologické znaky Alzheimerovej choroby. Post-mortem

Bielschowského sfarbenie strieborného frontálneho kortexu od pacienta s Alzheimerovou chorobou, ktoré ukazuje prítomnosť neuritického amyloidového plaku (šípka) (14).

Zdá sa, že bakteriáln amyloidy by mohli indukovať neurodegeneráciu v ľudskom organizme viacerými mechanizmami. Jedným z nich je tzv. cross-seeding (16). Ide o schopnosť amyloidov vytvárať akési semienka, pomocou ktorých sa dokážu šíriť do nových tkanív a tu sa následne množia. Takýmto spôsobom by mohli amyloidy indukovať misfolding neurálnych proteínov a následne rozvoj Alzheimerovej choroby (17).

Zápal

Aktivácia imunity a vznik zápalu sú asociované takmer so všetkými neurodegeneratívnymi ochoreniami. Mnohé štúdie dokonca naznačujú, že zápal má kauzálnu úlohu v patogenéze Alzheimerovej choroby (18). V štúdií Bruce-Keller a kol. kde sa skúmal vplyv HFD asociovaného mikrobiómu na myšiach, sa ukázalo, že tento typ mikrobiómu zvyšuje systémový a mozgový zápal. Zistilo sa, že došlo k nadexpresii Toll-Like Receptora 2 (TLR2) v lymfocytoch (9). TLR má dôležitú úlohu pri ochrane hostiteľa pred inváziou mikróbov. Štúdie naznačujú, že komplex TLR2/TLR1 dokáže rozpoznať amyloidy produkované zástupcami z rodov *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Proteobacteria*. Aktivácia mikrogliálneho TLR2 indukuje produkciu cytokínov, zápal, fagocytózu a vrodenú imunitnú odpoveď, ktoré priamo ovplyvňujú homeostázu CNS a spúšťajú neuropatológiu (19). Je pozoruhodné, že sa zvyšujú práve hladiny prozápalových cytokínov IL-17A a IL-22, čo sú rovnaké cytokíny, aké sú často asociované s Alzheimerovou chorobou (20).

Protektívny účinok diéty pri prevencii Alzheimerovej choroby

V súčasnosti je dobre známe, že strava má dôležitú úlohu pri tvarovaní črevného mikrobiómu. Rôzne stravovacie návyky, respektíve prístup k potravinám, spôsobujú významné rozdiely v taxonomickej kompozícii črevného mikrobiómu medzi niektorými populáciami (21). Viaceré epidemiologické štúdie naznačujú, že určité typy diéty majú protektívny účinok na kognitívne vnímanie a znižujú riziko demencie. Zistilo sa, že diéta znižujúca krvný tlak (DASH; angl. *Dietary Approaches to Stop Hypertension*) a diéta stredomorského typu boli asociované s menším stupňom rozpadu kognitívneho vnímania u starších pacientov (22). Preto bola vytvorená hybridná diéta (MIND; angl. *Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay*), ktorá kombinuje stredomorskú a DASH diétu. MIND diéta obsahuje zložky, ktoré boli asociované s neuroprotektívnym účinkom a prevenciou demencie. Výsledkom bolo, že MIND diéta významne znížila výskyt kognitívnych porúch a riziko AD (23). Zatiaľ nebol popísaný mikrobióm asociovaný s MIND diétou, no viaceré štúdie sa zameriavajú na štúdium stredomorskej diéty, ktorá bola tiež spojená s nižším rizikom Alzheimerovej choroby. Tieto štúdie naznačujú, že stredomorská diéta podporuje vznik mikrobiómu, ktorý má pre ľudský organizmus zdravotné benefity (21). Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že aj MIND diéta podporuje zloženie mikrobiómu, ktorý určitým spôsobom znižuje riziko Alzheimerovej choroby.

Záver

Alzheimerova choroba je pomerne časté ochorenie, ktoré prináša mnoho komplikácií nielen pre samotných pacientov, ale aj pre rodinných príslušníkov a ich finančný rozpočet. Preto sa tomuto ochoreniu venuje veľká pozornosť a vedci sa pokúšajú vyvinúť nové terapeutické prístupy. Z poznatkov uvedených v tejto práci vyplýva, že určité typy stravovania sú spojené s konkrétnym črevným mikrobiómom, ktorý môže mať vplyv na CNS. Bolo opísaných viacero mechanizmov, ako môžu baktérie zapríčiniť neuropatológiu, napr. priama interakcia s hostiteľským CNS, produkcia amyloidných proteínov alebo stimulácia zápalu. Na základe týchto zistení by modulácia črevnej mikrobioty prostredníctvom stravovacích prístupov, intervencie probiotík alebo antibiotík či transplantácia fekálneho mikrobiómu mohli znížiť prevalenciu a závažnosť Alzheimerovej choroby.

Literatúra

1. <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool> (1.11. 2020)
2. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2019.pdf> (1.11. 2020)
3. <https://alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures> (14.6. 2019)
4. **Prickett C, Brennan L, Stolwyk R.** Examining the relationship between obesity and cognitive function: a systematic literature review. *Obes Res Clin Pract.* 2015; 9 (2): 93–113.
5. **Kharabian Masouleh S, Arélin K, Horstmann A, et al.** Higher body mass index in older adults is associated with lower gray matter volume: implications for memory performance. *Neurobiol Aging.* 2016; 40: 1–10.
6. **Kim S, Kim Y, Park SM.** Body Mass Index and Decline of Cognitive Function. *PLoS One.* 2016; 11 (2): e0148908.
7. **Scheperjans F.** Can microbiota research change our understanding of neurodegenerative diseases? *Neurodegener Dis Manag.* 2016; 6 (2): 81–85.
8. **Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, et al.** Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (7): 3047-3052.
9. **Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, et al.** Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry.* 2015; 77 (7): 607-615.
10. **Lyte M.** Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLoS Pathog.* 2013; 9 (11): e1003726.
11. **Mok KH, Pettersson J, Orrenius S, et al.** HAMLET, protein folding, and tumor cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354 (1): 1–7.
12. **Rapsinski GJ, Newman TN, Oppong GO, et al.** CD14 protein acts as an adaptor molecule for the immune recognition of Salmonella curli fibers. *J Biol Chem.* 2013; 288 (20): 14178-14188.
13. **Schwartz K, Boles BR.** Microbial amyloids--functions and interactions within the host. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16 (1): 93-99.
14. **Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, et al.** Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol.* 2016; 15 (5): 455-532.
15. **Hufnagel DA, Tükel C, Chapman MR.** Disease to dirt: the biology of microbial amyloids. *PLoS Pathog.* 2013; 9 (11): e1003740.
16. **Friedland RP.** Mechanisms of Molecular Mimicry Involving the Microbiota in Neurodegeneration *J Alzheimers Dis.* 2015; 45 (2): 349-62.
17. **Oskarsson ME, Paulsson JF, Schultz SW, et al.** In vivo seeding and cross-seeding of localized amyloidosis: a molecular link between type 2 diabetes and Alzheimer disease. *Am J Pathol.* 2015; 185 (3): 834-846.
18. **Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, et al.** Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2015; 14 (4): 388-405.
19. **Hill JM, Lukiw WJ.** Microbial-generated amyloids and Alzheimer's disease (AD). *Front Aging Neurosci.* 2015; 7: 9.
20. **Zhang J, Ke KF, Liu Z, et al.** Th17 cell-mediated neuroinflammation is involved in neurodegeneration of A β 1-42-induced Alzheimer's disease model rats. *PLoS One.* 2013; 8 (10): e75786.
21. **De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, et al.** High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut.* 2016; 65 (11): 1812-1821.
22. **Tangney CC, Li H, Wang Y, et al.** Relation of DASH- and Mediterranean-like dietary patterns to cognitive decline in older persons. *Neurology.* 2014; 83 (16): 1410-1416.
23. **Morris MC, Tangney CC, Wang Y, et al.** MIND diet associated with reduced incidence of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2015; 11 (9): 1007–1014.

VPLYV BETANÍNU NA IMUNOREAKTIVITU KATALÁZY V CYTOPLAZME HEPATOCYTOV PRI ISCHEMICKO-REPERFÚZNOM POŠKODENÍ JEJÚNA

(Effect of betanin on the catalase-immunoreactivity of hepatocytes after jejunal ischemia-reperfusion injury)

Tóth Štefan¹, Urda Martin¹, Kalpakidis Theodoros¹, Pribula Martin¹, Kušnier Matúš¹, Mareta Milan², Mechírová Eva¹

¹Ústav histológie a embryológie, UPJŠ LF, Šrobárova 2, 040 01 Košice
stefan.toth1@upjs.sk

²Neurologická klinika, UPJŠ LF a UNLP, Trieda SNP 1, 040 11 Košice

Súhrn

Ischemicko-reperfúzne poškodenie (IRP) jejúna vedie ku priamemu poškodeniu jeho morfológie, ale môže indukovať zmeny aj vo vzdialených orgánoch ako je pečeň. Cieľom našej imunohistochemickej štúdie bolo posúdenie vplyvu prírodného antioxidantu betanínu na populáciu imunoreaktívnych kataláza-pozitívnych (CAT) hepatocytov po IRP jejúna. Potkany kmeňa Wistar (n=42) boli rozdelené do 2 skupín – B skupina s aplikáciou betanínu pred IRP a skupina A bez aplikácie betanínu s IRP. Po navodení 1 h ischemie nasledovala reperfúzna perióda s odberom bioptických vzoriek pečene po 1,4 a 24 h reperfúzie. Výsledky našich analýz preukázali kvantitatívne signifikantné zvýšenie počtu CAT-pozitívnych imunoreaktívnych hepatocytov vo všetkých A skupinách s IRP jejúna bez aplikácie betanínu, pričom signifikantne najvýraznejší kvantitatívny rozdiel sme detegovali pri vzájomnom medziskupinovom porovnaní oboch sledovaných experimentálnych skupín po 4 hodinách reperfúzie ($p < 0.01$). Na základe výsledkov našich analýz usudzujeme, že parenterálna i.p. aplikácia antioxidantu betanínu pred ischemiou a reperfúziou jejúna popri protektívnom efekte na mikroskopickú štruktúru pečenevého parenchýmu, má potenciál pozitívnej modulácie a pravdepodobne stabilizácie antioxidantnej kapacity hepatocytov s ohľadom na cytoplazmatickú expresiu katalázy.

Kľúčové slová

ischemicko-reperfúzne poškodenie, potkan, pečeň, betanín, kataláza

Summary

Ischemia-reperfusion injury (IRI) of jejunum leads to direct damage of its structure along with pathological changes in vital distant organs, such as liver. The aim of our immunohistochemical study was to determine effect of betanin antioxidant on catalase CAT-positive immunoreactive hepatocytes after jejunal IRI. Wistar rats (n=42) were used and divided into 2 groups - B group with betanin pretreatment before IRI and group A without pretreatment with IRI. After 1 hour of ischemia ensued reperfusion period with collection of liver biopsies after 1st, 4th and 24th h of reperfusion. Selective immunohistochemical parameters were evaluated and then statistically analyzed. The results of our analyzes showed a quantitatively significant increase in the number

of CAT-positive immunoreactive hepatocytes in all A groups with jejunal IRP without betanin application. The most prominent significant quantitative difference was detected in the intergroup comparison of both experimental groups after 4 hours of reperfusion ($p < 0.01$). Based on the results of our analyzes, we conclude that parenteral *i.p.* application of the antioxidant betanin before ischemia and reperfusion of jejunum in addition to a protective effect on the liver parenchyma architecture had the potential to positively modulate as well as possibly stabilize the antioxidant capacity of hepatocytes with respect to cytoplasmic expression of catalase.

Keywords

ischemia-reperfusion injury, rat, liver, betanin, catalase

Úvod

Ischemicko-reperfúzne poškodenie (IRP) tenkého čreva za experimentálnych podmienok má potenciál indukovať zmeny aj vo vzdialených vitálne dôležitých orgánoch. Primárne poškodený orgán – tenké črevo je z patofyziologického hľadiska významným spúšťačom systémovej zápalovej odpovede, pričom v poškodených orgánoch sa spúšťajú zákonite náležité regeneračné príp. reparačné procesy ako snaha o obnovu tkanivovej homeostázy (1,2,3). Rôzne experimentálne postupy obmedziť celkové poškodenie indukované ischémiou a následnou reperfúziou sa zameriava predovšetkým na periódu reperfúzie, počas ktorej dochádza k nadprodukcii reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a dusíka (RNS), pričom sa výraznou mierou uplatňuje aj aktivita antioxidantných enzýmov ako napr. katalázy. Kataláza (CAT) je kľúčovým antioxidantným enzýmom a dôležitým mediátorom reakcií v obrane proti starnutiu, pred oxidačným stresom, toxickými zlúčeninami a poškodeniu jadrovej DNA. Cieľom našej imunohistochemickej štúdie bolo posúdenie vplyvu betanínu, prírodného antioxidantu na imunoreaktivitu enzýmu katalázy v cytoplazme pečenej buniek po IRP jejúna.

Materiál a metódy

V experimente boli použité potkany kmeňa Wistar ($n=42$) ♂ s hmotnosťou 250-350 g. Zvieratá boli rozdelené do 2 skupín - skupina, ktorej bol aplikovaný betanín (skupina B) a kontrolná skupina bez aplikácie betanínu (skupina A). Skupine B bol aplikovaný parenterálne vodný roztok betanínu (50 mg/kg v sterilnom fyziologickom roztoku ako vehikula *i.p.*) 30 min pred 1 h ischémiou. Ischémia bola navodená oklúziou *a.mesenterica cranialis* atraumatickou cievnu svorkou. Po jej odstránení nasledovala reperfúzna perióda v trvaní 1, 4 a 24 h. Rovnaký postup bol vykonaný na skupine A, s použitím sterilného fyziologického roztoku bez betanínu. Po uplynutí času reperfúzie boli odobraté bioptické vzorky parenchýmu pečene (*lobus hepatis dexter medialis*). Biopsie boli fixované v 4% paraformaldehyde, zaliate do paraplastu a narezané na 4-5 μm hrubé rezy.

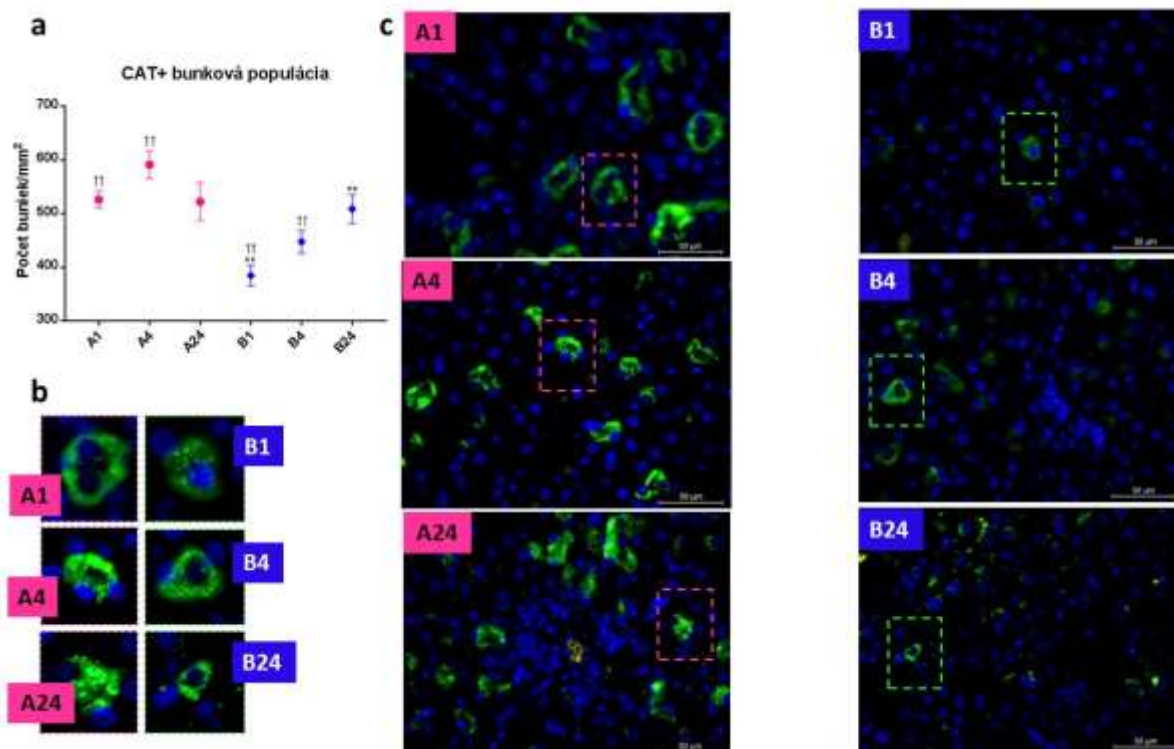
Populácie buniek pozitívnych na katalázu (anti-CAT, Thermo Scientific, 1:100) boli ofarbené metódou fluorescenčného imunofarbenia použitím sekundárnej protilátky značenej pomocou fluoresceín izotiokyanátu – FITC (Alexa Fluor 488, Abcam, 1:300). Vzorky boli následne trikrát prepláchnuté vo fosfátovom pufri a prekryté fluorescenčným médiom (H-1200, VECTASHIELD s DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Pozitívne bunky boli hodnotené na 1 mm^2 pečenej parenchýmy z 10 náhodne vybraných klasických pečenej lalôčikov (*lobulus hepaticus*) v jednom histologickom reze. Na fluorescenčnom mikroskope Leica DM2500 s ultrafialovým a FITC filtrom bolo pri hodnotení použité zväčšenie 400 $\times$. Všetky bunky s pozitívnou cytoplazmou (vo forme jemného granulátu so žltou-zelenou fluorescenciou) boli počítané s použitím softvéru Leica Industrial analyzujúceho snímky.

Štatistická analýza bola vykonaná pomocou programu GraphPad In-Stat verzia 3.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). Kvantitatívne výsledky boli hodnotené pomocou one-way ANOVA

testu a Tukey-Kramer *post-hoc* testom. Semikvantitatívne výsledky boli hodnotené pomocou neparametrického ANOVA testu Kruskal-Wallis a neparametrickým Dunnovým *post-hoc* testom. Výsledky boli vyjadrené ako aritmetický priemer (M) $\pm$ štandardná chyba merania (SEM). Hodnoty p menšie ako 0,05 sa považovali za štatisticky významné.

Výsledky

Pozitivita na katalázu v cytoplazme hepatocytov mala v obraze fluorescenčného mikroskopu mala konštantne charakter jemného fluoreskujúceho žlto-zeleného granulátu s homogénnou distribúciou v okolí bunkového jadra (Obr.1b). Analyzovaná populácia CAT-pozitívnych hepatocytov (Obr.1a-c) naznačuje, že *i.p.* podaný antioxidant betanín signifikantne zredukoval kvantitatívne celkovú úroveň positivity cytoplazmy tejto populácie buniek v parenchýme pečene v prvej (A1 vs. B1 $**p<0.01$) a štvrtej (A4 vs. B4 $**p<0.01$) postreperfúznej hodine. Aj po 24. hodinách od spustenia reperfúzie bola v B skupine populácia CAT-pozitívnych pečevných buniek numericky stále nižšia ako v skupine A (508.6 ± 26.9 vs. 522.2 ± 35.27). Vnútroskupinovo bol pozorovaný signifikantný rozdiel v experimentálnej B skupine (B1 vs. B24 $**p<0.01$), kedy boli hodnoty CAT-pozitívnych buniek v prvej hodine výrazne nižšie. To, spolu so signifikantnými interskupinovými rozdielmi v skorších hodinách reperfúzie, naznačuje, že betanín mal pravdepodobne imunoatenuačný efekt práve v skorej fáze postreperfúzneho procesu, čo sme potvrdili našou analýzou celkovej CAT-imunoreaktivity cytoplazmy hepatocytov.



Obr. 1 Grafický panel zobrazujúci imunocytofluorescenčnú analýzu CAT-pozitívnej populácie buniek v parenchýme pečene. Reprezentatívne mikrofotografie zobrazujúce CAT-pozitívne bunky v pečevnom lalôčiku v jednotlivých experimentálnych skupinách v jednotlivých sledovaných časových intervaloch (mierka: 50 μ m, zväčšenie: 400x). V pravom rohu - výrez s detailom CAT-pozitívnych buniek v sledovaných experimentálnych skupinách (zväčšenie: 1000x). Imunofluorescenčné značenie primárnou protilátkou anti-CAT a bunkové jadrá boli dofarbené fluorescenčným jadrovým farbivom DAPI.

Diskusia

Do celkového obrazu protektívneho ako aj protizápalového efektu betanínu, ktorý sme zaznamenali v našich predchádzajúcich analýzach (2,3,4) prispievajú aj kvantitatívne zmeny v bunkovej populácii obsahujúcej antioxidantný enzým kataláza (CAT). Úlohou CAT, ako jedného z hlavných endogénnych antioxidantov, je rozklad H_2O_2 na vodu a oxid uhličitý, čím znižuje oxidačnú záťaž pečene parenchýmu po reperfúzii. Antioxidačný efekt tohto enzýmu v procese IRP pečene bol v minulosti preukázaný po experimentálnom podaní u myší (5). V našom experimentálnom modeli sa ukázalo, že v skorších fázach reperfúzie (1. a 4. hodina) zmiernil betanín prozápalovú odpoveď natoľko, že produkcia enzýmu, a tým pádom CAT-pozitívnych buniek, bola výrazne znížená oproti skupine bez aplikácie betanínu s IRP. Tieto dáta korelujú aj s výsledkami prezentovanými Chen a kol. (6), ktorí preukázali, že po IRP pečene dochádza až ku trojnásobnému zvýšeniu transkripcie a dvojnásobnému zvýšeniu translácie katalázy. To je viditeľné v skupine A, kde je počet CAT-pozitívnych buniek výrazne zvýšený oproti skupine B, kde betanín ako potentný antioxidant pravdepodobne vychytil vzniknuté reaktívne intermediáty kyslíka príp. aj dusíka.

Záver

Na základe výsledkov našich analýz usudzujeme, že *i.p.* aplikácia antioxidantu betanínu pred spustením ischemie a reperfúzie jejúna popri protektívnom efekte na štruktúru pečene, stabilizácie úrovne bunkovej proliferácie, modulácii úrovne zápalovej odpovede má potenciál výrazne „šetriť“ kapacitu antioxidačných enzýmov v cytoplazme hepatocytov.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore projektu VEGA 1/0386/17.

Literatúra

- Toth S, Jonecova Z, Maretta M, Curgali K, Kalpakidis T, Pribula M, Kusnier M, Fagova Z, Fedotova J, La Rocca G, Rodrigo, L.** The effect of Betanin parenteral pretreatment on Jejunal and pulmonary tissue histological architecture and inflammatory response after Jejunal ischemia-reperfusion injury. *Experimental and molecular pathology* 2019; 110, p.104292. doi.org/10.1016/j.yexmp.2019.104292
- Tóth S, Urda M, Kalpakidis T, Pribula M, Kušnier M, Maretta M, Mechírová E.** Vplyv betanínu na populáciu profilujúcich a zápalových buniek pečene parenchýmu pri ischemicko-reperfúznom poškodení jejúna. *Anatómia 100 rokov LF UK, Trebišov:k-PRINT*, 2019; 173-177.
- Urda M, Tóth S, Kalpakidis T, Pribula M, Kušnier M, Maretta M, Mechírová E.** Pozitívny efekt betanínu na morfológické zmeny v komplexe ischemicko-reperfúzneho poškodenia tenkého čreva potkana. *Anatómia 100 rokov LF UK, Trebišov:k-PRINT*, 2019; 178-183.
- Urda M, Kalpakidis T, Pribula M, Kušnier M, Tóth S, Mechírová E, Maretta M.** Vplyv parenterálnej aplikácie betanínu na histologickú štruktúru a zápalovú odpoveď parenchýmu pečene po ischemii-reperfúzii jejúna. *22.Košický morfológický deň: imunohistochemia - každodenný partner v morfológii: zborník vedeckých prác. Košice: UPJŠ*, 2019; 257-263.
- Yabe Y, Koyama Y, Nishikawa M, Takakura Y, & Hashida M.** Hepatocyte-specific distribution of catalase and its inhibitory effect on hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Free Rad Res* 1999; 30(4): 265-274.
- Chen CF, Hsueh CW, Tang TS, Wang D, Shen CY, Pei JS.** Reperfusion liver injury—induced superoxide dismutase and catalase expressions and the protective effects of N-acetyl cysteine. *Transplant Proc* 2007; 39(4): 858-860.

PORUCHY METABOLIZMU LIPIDOV U PACIENTOV SO SYNDRÓMOM SPÁNKOVÉHO APNOE

(Disorders of lipid metabolism in patients with sleep syndrome apnea)

Žitňanová Ingrid¹, Paduchová Zuzana¹, Katrenčíková Barbora¹, Koňariková Katarína¹, Janubová Mária¹, Klobučníková Katarína², Šiarnik Pavel², Hlucháňová Alžbeta³, Kollár Branislav²

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, ingrid.zitnanova@fmed.uniba.sk

²I. neurologická klinika LFUK a UNB, Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava

³Neurologická klinika SZU a UNB, Ružinovská 6, 826 06 Bratislava

Súhrn

Spánkové apnoe predstavuje významný rizikový faktor vaskulárnych ochorení. Dyslipidémiu je možné považovať za jeden z najvýznamnejších mechanizmov spájajúcich spánkové apnoe so vznikom cievnych ochorení. Cieľom našej štúdie bolo vyhodnotiť prevalenciu lipidových abnormalít u pacientov so spánkovými poruchami dýchania so zameraním sa na malé denzné HDL subfrakcie využitím analýzy pomocou Lipoprint HDL systému. Do štúdie bolo zahrnutých 15 pacientov so spánkovými poruchami dýchania a 16 zdravých kontrol. Zistili sme, že pacienti mali hladiny celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu a triacylglycerolov signifikantne vyššie oproti zdravým kontrolám. Hladiny HDL cholesterolu boli u nich naopak signifikantne nižšie. Z HDL subfrakcií mali pacienti signifikantne nižšie hladiny anti-aterogénnych veľkých HDL subfrakcií a signifikantne vyššie hladiny aterogénnych malých denzných HDL subfrakcií. Abnormality v hladinách lipoproteínov u pacientov so syndrómom spánkového apnoe môžu viesť u predisponovaných jedincov k urýchleniu aterosklerotického procesu a predstavujú tak významný rizikový faktorov vzniku vaskulárnych ochorení.

Kľúčové slová

spánkové apnoe, dyslipoproteinémia, HDL subfrakcie

Summary

Sleep apnea is a significant risk factor for vascular disease. Dyslipidemia can be considered as one of the most important mechanisms linking sleep apnea with the development of vascular diseases. The aim of our study was to evaluate the prevalence of lipid abnormalities in patients with sleep-disordered breathing, focusing on small dense HDL subfractions using analysis of the Lipoprint HDL system. The study included 15 subjects with sleep-disordered breathing and 16 healthy controls. We found that patients had significantly higher total cholesterol, LDL-cholesterol and triacylglycerols compared to healthy controls. HDL cholesterol was significantly lower in patient's group. Of the HDL subfractions, patients had significantly lower levels of anti-atherogenic large HDL subfractions and significantly higher levels of atherogenic small dense HDL subfractions. Abnormalities in lipoprotein levels in patients with sleep apnea

syndrome can lead to an acceleration of the atherosclerotic process in predisposed individuals and thus represent a significant risk factor for vascular disease.

Keywords

sleep apnoe, dyslipoproteinemia, HDL subfractions

Úvod

Obštrukčné spánkové apnoe (OSA), predstavuje najčastejšiu poruchu spánku, ktorá sa spája so zvýšeným rizikom vzniku kardiovaskulárnych ochorení a zvýšenou vaskulárnou morbiditou (1). Počas OSA sa opakovane čiastočne alebo kompletne uzatvárajú horné dýchacie cesty, čo vedie ku hypopnoickým alebo apnoickým pauzám. Vzhľadom na obštrukciu dýchacích ciest sa počas respiračného úsilia zvyšuje intratorakálny tlak. Uvedené mechanizmy majú za následok fragmentáciu spánku a intermitentnú hypoxiu (2). Doposiaľ nebolo jednoznačne vysvetlené akými patofyziologickými mechanizmami vedie OSA k vzniku cievnych ochorení. Z doteraz publikovaných prác je známa asociácia intermitentnej hypoxie so širokým spektrom patologických procesov, akými sú endoteliálna dysfunkcia, aktivácia sympatikového nervového systému, systémová zápalová reakcia, porucha metabolizmu glukózy a lipidov (3). Dyslipidémia, definovaná ako nadmerné zvýšenie hladiny celkového cholesterolu alebo triglyceridov, s alebo bez súčasného zníženia hladiny lipoproteínov s vysokou denzitou (HDL), vedie u predisponovaných jedincov k urýchleniu aterosklerotického procesu a predstavuje tak jeden z najvýznamnejších rizikových faktorov vzniku vaskulárnych ochorení (4,5). Dodnes síce nie je známe, akú úlohu zohráva OSA pri vzniku dyslipidémie, z najnovších štúdií však pribúdajú dôkazy o nezávislej asociácii intermitentnej hypoxie s dyslipidémiou. To vedie k názoru, že zvýšené riziko vzniku vaskulárnych ochorení u pacientov s OSA by mohlo byť sčasti spôsobené práve poruchami metabolizmu lipidov v dôsledku intermitentnej hypoxie (6,7).

Rizikovým faktorom vzniku aterosklerózy môžu byť aterogénne subpopulácie lipoproteínov v plazme. Napriek tomu, že sa aterogénne lipoproteínové subfrakcie objavujú v krvi vo veľmi nízkych koncentráciách, môžu viesť k narušeniu integrity steny cievy a endotelovej dysfunkcii (8). Identifikovať a kvantifikovať aterogénne a neaterogénne lipoproteínové subfrakcie v plazme, vrátane malých denzných HDL subfrakcií umožňuje elektroforéza na polyakrylamidovom géli (systém Lipoprint, Quantimetrix corp., Redondo Beach, CA, USA). Systém Lipoprint HDL identifikuje 10 subfrakcií HDL cholesterolu: veľké subfrakcie HDL1-3; stredné subfrakcie HDL4-7 a malé subfrakcie HDL8-10 (aterogénne) (9,10). Malé denzné HDL subfrakcie sú aterogénne kvôli nízkemu rozpoznaníu receptormi, zvýšenej schopnosti oxidácie a acetylácie, ľahšiemu prenikaniu do subendotelového priestoru a tvorbe cholesterolových depozitov (11). Lipoproteíny HDL sa všeobecne považujú za ochrannú antiaterogénnu súčasť plazmatických lipoproteínov, avšak nie všetky HDL subfrakcie vykazujú túto protektívnu funkciu.

Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť prevalenciu lipidových abnormalít u pacientov so spánkovými poruchami dýchania so zameraním sa na malé denzné HDL subfrakcie využitím analýzy pomocou Lipoprint HDL systému.

Materiál a metódy

Vzorky krvnej plazmy sme získali od 16 zdravých dobrovoľníkov (priemerný vek $30,44 \pm 5,7$ rokov) a 15 pacientov s polysomnograficky potvrdenou spánkovou poruchou dýchania (priemerný vek $41,13 \pm 12,21$ rokov). Exklúznym kritériom bolo u pacientov akékoľvek iné známe chronické ochorenie a užívanie akejkoľvek medikácie. Všetci jedinci zahrnutí do štúdie podpísali informovaný súhlas s projektom.

Plazma

Vzorky krvi s antikoagulantom EDTA (etyléndiamíntetraoctová kyselina) boli centrifugované po dobu 5 min. pri 1200 x g, pri 4°C. Plazma bola uskladnená pri -80°C a použitá na stanovenie HDL-subfrakcií.

Stanovenie lipoproteínových subfrakcií

HDL subfrakcie lipoproteínov v plazme sme analyzovali elektroforézou na polyakrylamidovom géli systémom Lipoprint (Quantimetrix corp., Redondo Beach, CA, USA) podľa inštrukcií výrobcu.

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Štatistická analýza bola vykonaná pomocou SPSS ver. 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Naše výsledky sú vyjadrené ako priemer $\pm$ štandardná odchýlka (SD). Na porovnanie skupín parametrov sme použili Studentov nepárový t test. Hladina významnosti bola nastavená na hodnotu $P < 0,05$.

Výsledky

V našej práci sme sa zamerali na jeden z patomechanizmov, ktoré potenciálne spájajú syndróm spánkového apnoe so vznikom cievnych ochorení. V skupine pacientov - jedincov s potvrdenou spánkovou poruchou dýchania, sme sledovali hladiny malých denzných HDL subfrakcií, o ktorých sa predpokladá, že majú aterogénne vlastnosti.

Dobrovoľníci v kontrolnej skupine mali všetky sledované lipidové parametre signifikantne nižšie oproti jedincom v skupine pacienti, okrem HDL cholesterolu, ktorý bol v kontrolnej skupine signifikantne vyšší (Tab.1).

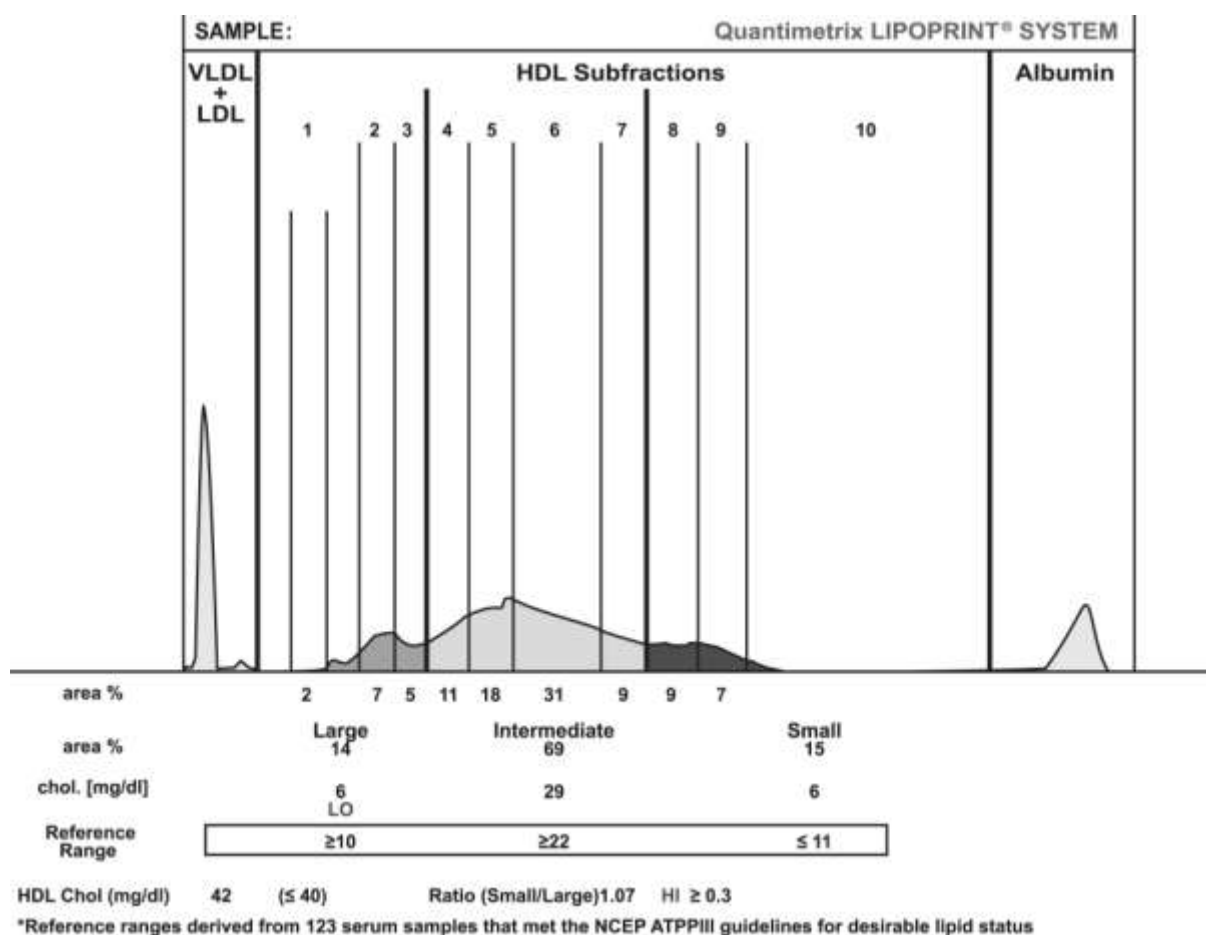
mmol/l	Kontroly (n=16)	Pacienti (n=15)	P
TCH	4,37 $\pm$ 0,64	5,30 $\pm$ 0,98	0,0017
LDL	2,73 $\pm$ 0,65	4,01 $\pm$ 0,82	>0,0001
HDL	1,65 $\pm$ 0,27	1,21 $\pm$ 0,39	0,0009
TAG	0,89 $\pm$ 0,38	1,97 $\pm$ 0,58	0,0000
vek (roky)	30,44 $\pm$ 0,64	42,13 $\pm$ 12,21	0,0017

Tab.1 Lipidové parametre a vek dobrovoľníkov v skupine kontrol a v skupine pacientov

Výsledky sú vyjadrené ako priemer $\pm$ štandardná odchýlka (SD); P – štatistická hladina významnosti; TCH – celkový cholesterol, LDL – lipoproteíny s nízkou hustotou, HDL – lipoproteíny s vysokou hustotou, TAG – triacylglyceroly

Na analýzu HDL subfrakcií sme použili ich elektroforetické delenie systémom Lipoprint (Quantimetrix, Ca, USA) (obr.1). Veľké HDL subfrakcie 1-3 sú považované za anti-aterogénne subfrakcie a malé denzné HDL subfrakcie 8-10 sú považované za pro-aterogénne subfrakcie. O vlastnostiach stredne veľkých HDL subfrakcií 4-7 sa stále vedie diskusia.

Porovnaním hladín jednotlivých HDL subfrakcií medzi kontrolami a pacientami (Tab.2) sme zistili signifikantné zníženie protektívnych veľkých HDL subfrakcií v skupine pacientov so spánkovými poruchami dýchania oproti kontrolám. Na druhej strane, hladina aterogénnych, malých, denzných subfrakcií HDL-10 bola u pacientov so syndrómom spánkového apnoe signifikantne zvýšená. Hladina stredných subfrakcií nebola signifikantne odlišná medzi oboma skupinami.



Obr. 1 Reprezentatívny graf HDL subfrakcií analyzovaných Lipoprintovým systémom (Quantimetrix, Ca, USA). Subfrakcie 1-3 Large – ateroprotektívne, subfrakcie 4-7 Intermediate - suspektné, subfrakcie 8-10 Small – aterogénne subfrakcie.

mg/dl	Kontroly (n=16)	Pacienti (n=15)	P
HDL-1	5,67 ± 2,55	1,33 ± 0,29	0,0014
HDL-2	10,00 ± 3,44	3,73 ± 1,89	0,0000
HDL-3	9,4 ± 3,67	4,07 ± 1,08	0,0010
HDL-4	8,27 ± 3,28	4,47 ± 2,00	0,0007
HDL-5	6,27 ± 1,44	5,47 ± 1,77	0,1847
HDL-6	11,73 ± 2,02	11,67 ± 3,62	0,9507
HDL-7	4,67 ± 0,98	5,07 ± 1,62	0,4205
HDL-8	4,00 ± 0,93	4,47 ± 1,55	0,3259
HDL-9	2,93 ± 0,96	3,67 ± 1,72	0,1602
HDL-10	1,2 ± 0,37	3,17 ± 1,36	0,0104

Tab. 2 HDL subfrakcie analyzované systémom Lipoprint (Quantimetrix, Ca, USA) v skupine kontrol a pacientov. Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± štandardná odchýlka (SD); P - štatistická hladina významnosti

Diskusia

Napriek faktu, že HDL lipoproteínové častice sa považujú za ochranné častice pred aterogenézou, nejde o homogénnu lipoproteínovú skupinu. Elektroforézou sa dajú rozdeliť na 10 rôznych subfrakcií. Oravec a kol. (12) navrhli, že malé HDL subfrakcie (HDL8-10) môžu mať narušenú funkčnosť, a že existuje korelácia medzi vyššími hladinami malých HDL 8-10 subfrakcií a aterogénnym lipidovým profilom. V našom projekte sme zistili, že práve najmenšie z týchto subfrakcií - HDL subfrakcie 10 sú signifikantne zvýšené u jedincov so spánkovým apnoe, čo môže významnou mierou prispievať k zvýšenému riziku vzniku aterosklerózy u predisponovaných jedincov. Dôkazy z klinických štúdií o asociácii obštrukčného spánkového apnoe (OSA) s dyslipidémiou sú do značnej miery limitované. Neexistujú konzistentné údaje, ktoré by naznačovali, že OSA je rizikovým faktorom pre dyslipidémiu. Protichodné výsledky boli skutočne pozorované v prierezových a intervenčných štúdiách (13). V súlade s našimi výsledkami, niektoré štúdie zistili zvýšené hladiny triacylglycerolov (14-17) a znížené hladiny lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL) u pacientov s OSA (16-18), zatiaľ čo iné štúdie podobné asociácie nenašli (19-20). Za zmienku takisto stojí, že väčšina štúdií nebola špeciálne navrhnutá na vyhodnotenie lipidového profilu, a že žiadna štúdia doteraz nesledovala hladiny HDL subfrakcií u jedincov so spánkovými poruchami dýchania. Na stanovenie jednoznačnejších záverov o vzájomných vzťahoch medzi uvedenými chorobnými procesmi sú preto potrebné ďalšie štúdie, ktoré by mali priniesť nové informácie a dôkazy.

Záver

Abnormality v hladinách lipoproteínov u pacientov so syndrómom spánkového apnoe môžu viesť u predisponovaných jedincov k urýchleniu aterosklerotického procesu a predstavujú tak významný rizikový faktor vzniku vaskulárnych ochorení u týchto pacientov.

Literatúra

1. **Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, et al.** Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med* 2009; 6: e1000132. doi: 10.1371/journal.pmed.. Epub 2009 Aug 18.
2. **Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'donnell CP.** Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 2010; 90: 47-112. doi: 10.1152/physrev.00043.2008.
3. **Drager LF, Polotsky VY, O'donnell CP, et al.** Translational approaches to understanding metabolic dysfunction and cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 309: H1101-11. doi: 10.52/aipheart.00094.2015. Epub 2015 Jul 31.
4. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-421.
5. **Juhasz J.** Dyslipidemia: another brick in the wall. A feasible link in the OSA-cardiovascular disease axis. *Sleep Breath* 2014; 18: 5-6. doi: 10.1007/s11325-013-0852-1. Epub 2013 May 16.
6. **Savransky V, Nanayakkara A, LI J, et al.** Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 1290-7. doi: 10.1646/rccm.200612-1771OC. Epub 2007 Mar 1.
7. **Drager LF, Jun J, Polotsky VY.** Obstructive sleep apnea and dyslipidemia: implications for atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17: 161-5. doi: 10.1097/MED.0b013e3283373624.
8. **Zhao ChX, Cui YH, Fan Q, et al.** Small dense low-density lipoproteins and associated risk factors in patients with stroke. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27:99-104.
9. **Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, et al.** Small dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Québec Cardiovascular Study. *Circulation* 1997;95(1):69-75.

10. **Kasko M, Gaspar L, Dukat A, et al.** High-density lipoprotein profile in newly-diagnosed lower extremity artery disease in Slovak population without diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett* 2014;35(6):531-535.
11. **Oravec S, Dukat A, Gavornik P, et al.** Contribution of the atherogenic lipoprotein profile to the development of arterial hypertension. *Bratisl Lek Listy* 2011;112(1):4-7.
12. **Oravec S, Dukat A, Gavornik P, et al.** Atherogenic versus non-atherogenic lipoprotein profiles in healthy individuals. Is there a need to change our approach to diagnosing dyslipidemia? *Curr Med Chem* 2014;21:2892–901.
13. **Drager LF, Jun J, Polotsky VY.** Obstructive sleep apnea and dyslipidemia: implications for atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17:161–5.
14. **Togeiro SM, Carneiro G, Ribeiro Filho FF, et al.** Consequences of Obstructive Sleep Apnea on Metabolic Profile: A Population-Based Survey. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21:847–51. <https://doi.org/10.1002/oby.20288>.
15. **Coughlin SR, Mawdsley L, Mugarza JA.** Calverley PM, Wilding JP. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur Heart J.* 2004;25:735–41. <https://doi.org/10.1016/j.ehj.2004.02.021>
16. **Roche F, Sforza E, Pichot V, et al.** PROOF Study Group. Obstructive sleep apnoea/hypopnea influences high-density lipoprotein cholesterol in the elderly. *Sleep Med.* 2009;10:882–6. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2008.07.017>.
17. **Newman AB, Nieto FJ, Guidry U, et al.** Sleep Heart Health Study Research Group. Relation of sleep-disordered breathing to cardiovascular disease risk factors: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol.* 2001;154:50–9. <https://doi.org/10.1093/aje/154.1.50>.]
18. **Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, et al.** The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS One.* 2010;5:e12065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012065>.]
19. **Tan KC, Chow WS, Lam JC, et al.** HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis.* 2006;184:377–82. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.04.024>.
20. **Tokuda F, Sando Y, Matsui H et al.** Serum levels of adipocytokines, adiponectin and leptin, in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med.* 2008;47:1843–9. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.47.1035>.



Anatomický ústav LF UK v Bratislave
Slovenská anatomická spoločnosť
Dekan LF UK v Bratislave