prof. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

BIOMEDICÍNSKY VÝSKUM VIII.

ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC

Bratislava 2026

Biomedicínsky výskum VIII.

Editor: prof. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

Vydal: © CEBM Slovakia spol. s r. o., Bratislava, 2026

Recenzenti: doc. MUDr. Martin Boháč, PhD., MHA, MPH
doc. MUDr. Radoslav Zamborský, PhD.

Publikácia neprešla jazykovou korektúrou a za odbornú stránku zodpovedajú autori.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani žiadnu jeho časť nemožno reprodukovať, ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez písomného súhlasu majiteľa autorských práv.

Obsah

1. Chovanec M.: Molekulárne mechanizmy neskorej neurotoxicity po liečbe testikulárnych germinatívnych nádorov..... 4

2. Rejleková K., Vlková B., Oláh P, Pokrivčák T., Alzeer R, Escherová E., Chovanec M., Lesko P., Obertová J., Országhová Z., Palacka P., Sýčová-Milá Z., Mego M., Celec P.: Longitudinálne hladiny SP-D a sRAGE v plazme a moči počas chemoterapie BEP pri germinatívnych nádoroch..... 8

3. Bečka E., Hudecová L, Pastorek M.: Trénovaná imunita, pohlavný dimorfizmus a perzistencia NET pri myšom modeli sepsy 26

Molekulárne mechanizmy neskorej neurotoxicity po liečbe testikulárnych germinatívnych nádorov

Michal CHOVANEC

II. onkologická klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Národného onkologického ústavu, Bratislava
Prijaté na posúdenie: 14.5.2026, zverejnené: 26.6.2026

Abstrakt

Testikulárne germinatívne nádory predstavujú model úspešne liečiteľného zhubného ochorenia mladých dospelých, avšak následky liečby môžu ovplyvňovať zdravie preživších počas niekoľkých desaťročí. Medzi klinicky významné neskoré komplikácie patria periférna neuropatia, kognitívne ťažkosti, ototoxicita, kardiometabolické poruchy a chronická únava. Longitudinálne pozorovania ukazujú, že kognitívne poškodenie môže pretrvávať bez významného zlepšenia mnoho rokov po liečbe. Súčasne boli opísané dlhodobé zmeny imunofenotypu periférnej krvi, asociácie medzi aktiváciou vrodenej imunity a periférnou neuropatiou a vzťah vyšších plazmatických hladín sérového amyloidu A4 ku kognitívnym ťažkostiam. Tieto nálezy podporujú integrovaný mechanistický model, podľa ktorého neskorá neurotoxicita nie je iba následkom jednorazového priameho poškodenia neurónov počas liečby. Môže predstavovať dlhodobo udržiavaný proces zahŕňajúci reziduálnu cisplatinu, poškodenie DNA a mitochondrií, poruchu črevnej bariéry, mikrobiálnu translokáciu, remodeláciu imunitného systému, chronický nízkostupňový zápal a zmeny metabolizmu lipidov. Kognitívne poškodenie a periférna neuropatia tak môžu byť rozdielnymi klinickými prejavmi spoločného systémového mechanizmu neskorej toxicity

Kľúčové slová: testikulárne germinatívne nádory, cisplatina, kognitívne poškodenie, periférna neuropatia, mikrobiálna translokácia, neuroinflamácia

Úvod

Testikulárne germinatívne nádory sú najčastejšie zhubné nádory mladých mužov. Vďaka vysokej citlivosti na cisplatinovú chemoterapiu možno vyliečiť väčšinu pacientov vrátane približne 90 % pacientov s metastatickým ochorením a celkové dlhodobé prežívanie naprieč štádiami presahuje 95 % [1]. Výsledkom tohto terapeutického úspechu je rastúca populácia mužov, ktorí po ukončení liečby prežijú ďalšie desaťročia.

Dlhodobá prognóza však nie je určená iba rizikom recidívy. Cisplatina, rádioterapia a kombinovaná liečba sú spojené s periférnou neuropatiou, ototoxicitou, renálnym poškodením, hypogonadizmom, kardiovaskulárnymi a metabolickými ochoreniami, sekundárnymi malignitami, chronickou únavou a poruchami kognitívneho fungovania [2,3]. Tieto komplikácie môžu ovplyvniť pracovné uplatnenie, rodinný život a kvalitu života v období, keď sú preživší spoločensky a ekonomicky najaktívnejší.

Kognitívne poškodenie súvisiace s nádorovým ochorením a jeho liečbou zahŕňa subjektívne alebo objektívne zhoršenie pamäti, pozornosti, rýchlosti spracovania informácií, exekutívnych funkcií a schopnosti sústrediť sa. Jeho etiológia je multifaktoriálna a nemožno ho automaticky vysvetliť iba psychologickým stresom alebo bezprostrednými účinkami chemoterapie [4]. U dlhodobých preživších testikulárnych nádorov boli kognitívne ťažkosti dokumentované približne desať rokov po liečbe, pričom horšie výsledky sa pozorovali najmä po kombinácii chemoterapie a rádioterapie a po vyššej kumulatívnej dávke cisplatiny [5,6].

Súbor publikovaných klinických a translačných pozorovaní dnes umožňuje rozvinúť hypotézu, podľa ktorej neskorá neurotoxicita nevzniká pôsobením jediného mechanizmu. Pravdepodobnejší je viacstupňový model vzájomne prepojených biologických zmien, ktoré sa po skončení liečby môžu dlhodobo udržiavať alebo navzájom zosilňovať.

Pretrvávanie kognitívneho poškodenia

V longitudinálnej štúdii bolo hodnotených 151 preživších pomocou validovaného dotazníka FACT-Cog. Medián času od ukončenia liečby po prvé hodnotenie bol osem rokov a pacienti následne absolvovali

každoročné vyšetrenia počas ďalších piatich rokov [6]. V celej kohorte sa počas sledovania nepreukázalo významné zlepšenie kognitívnych skóre. Pacienti, ktorí absolvovali chemoterapiu aj rádioterapiu, dosahovali opakovane najhoršie výsledky, najmä v oblasti vnímaných kognitívnych schopností a celkového kognitívneho skóre. Horšie výsledky sa pozorovali aj u pacientov liečených kumulatívnou dávkou cisplatiny najmenej 400 mg/m².
Tieto pozorovania ukazujú, že kognitívne ťažkosti nemožno považovať iba za krátkodobý stav bezprostredne po chemoterapii. Spojenie s kombinovanou liečbou a dávkou cisplatiny podporuje biologický vzťah medzi intenzitou liečebnej expozície a neskorou neurotoxicitou. Retroperitoneálna rádioterapia pritom priamo nezasahuje mozgové tkanivo. Horšie kognitívne výsledky po kombinovanej liečbe preto podporujú účasť systémových procesov, napríklad poškodenia cievneho endotelu, črevnej bariéry, metabolickej dysregulácie alebo chronickej imunitnej aktivácie.

Od priamej toxicity k dlhodobému systémovému procesu

Reziduálna cisplatina, poškodenie DNA a mitochondriálna dysfunkcia

Cisplatina vytvára vnútroreťazcové a medzireťazcové väzby v DNA. Následkom je aktivácia odpovede na poškodenie DNA, zastavenie bunkového cyklu, oxidatívny stres a apoptóza. Tieto účinky sú základom protinádorovej účinnosti, ale poškodenie nie je obmedzené iba na nádorové bunky. Platina môže zostať v organizme merateľná mnoho rokov po ukončení chemoterapie [2]. Tkanivové zásobníky a dlhodobé uvoľňovanie malých množstiev platiny by mohli spôsobovať opakovanú nízkoúrovňovú expozíciu buniek a prispievať k oxidatívnemu stresu, mitochondriálnemu poškodeniu, endotelovej dysfunkcii a narušeniu opravných mechanizmov DNA.
Neuróny a senzorické gangliá sú zvlášť citlivé na mitochondriálnu dysfunkciu, pretože majú vysoké energetické nároky a obmedzenú schopnosť regenerácie. Dlhé periférne axóny sú navyše závislé od efektívneho axonálneho transportu. Poškodenie mitochondrií, mikrotubulov a intracelulárneho transportu preto môže prispievať k typickému distálnemu senzorickému charakteru cisplatinou indukovanej periférnej neuropatie. Samotná priama neurotoxicita však nevysvetľuje rozdiely v imunofenotype, asociácie s biomarkermi vrodenej imunity ani vzťah k proteínom metabolizmu lipidov. Priamy účinok cisplatiny je preto pravdepodobne prvou súčasťou širšieho procesu.

Črevná bariéra a mikrobiálna translokácia

Chemoterapia a rádioterapia poškodzujú rýchlo sa deliace bunky črevného epitelu, menia zloženie mikrobioty a môžu zvýšiť priepustnosť črevnej bariéry. Mikrobiálne produkty sa následne môžu dostať do systémovej cirkulácie. U dlhodobých preživších boli preukázané asociácie medzi kognitívnym poškodením a biomarkermi mikrobiálnej translokácie [5]. Podobný mechanizmus sa javí relevantný aj pre periférnu neurotoxicitu.
V kohorte 170 preživších s mediánom sledovania desať rokov boli analyzované plazmatické hladiny sCD14, HMGB1, lipopolysacharidu a D-laktátu vo vzťahu k symptómom periférnej neuropatie. Vyššie hladiny sCD14 boli spojené s vyšším celkovým skóre neuropatie a výraznejšími senzorickými príznakmi. Pacienti po chemoterapii mali zároveň významne vyššie hladiny sCD14 než pacienti liečení iba orchiektómiou. V skupine po chemoterapii bolo zvýšené sCD14 spojené s približne 3,5-násobne vyšším rizikom motorickej neuropatie. Vyššie hodnoty sCD14 a HMGB1 súviseli aj s autonómnou dysfunkciou vo vybraných liečebných skupinách [8].
sCD14 je markerom aktivácie monocytov a vrodenej imunitnej odpovede na bakteriálne produkty, najmä lipopolysacharid. Výsledky preto podporujú model, podľa ktorého porucha črevnej bariéry nemusí byť iba prechodnou komplikáciou akútnej liečby. U časti pacientov môže viesť k dlhodobej stimulácii vrodenej imunity a k vytvoreniu prozápalového prostredia podporujúceho poškodenie nervových štruktúr.

Dlhodobá remodelácia imunitného systému

Imunofenotyp periférnej krvi bol analyzovaný u 202 preživších s mediánom sledovania 13 rokov. Prietokovou cytometriou bolo hodnotených 27 populácií imunitných buniek. Rozdiely sa identifikovali v zastúpení B-lymfocytov, eozinofilov, dvojito negatívnych T-lymfocytov, konvenčných dendritických buniek a ďalších populácií v závislosti od liečebnej modality a kumulatívnej dávky cisplatiny [7].

Jednotlivé rozdiely nemožno interpretovať ako jednoduchý stav všeobecnej imunosupresie. Skôr naznačujú dlhodobú remodeláciu imunitného systému. Liečba môže zmeniť rovnováhu medzi vrodenou a adaptívnou imunitou, medzi naivnými a pamäťovými populáciami a medzi prozápalovými a regulačnými mechanizmami. Súčasťou tohto procesu môže byť zrýchlené imunitné starnutie. Senescentné bunky zostávajú metabolicky aktívne a môžu produkovať cytokíny, chemokíny a ďalšie mediátory, ktoré dlhodobo ovplyvňujú endotel, periférne nervy aj centrálny nervový systém.
Periférna imunitná aktivácia môže zasiahnuť mozog prostredníctvom cirkulujúcich cytokínov, aktivácie endotelu, zmeny permeability hematoencefalickej bariéry, stimulácie aferentných nervových dráh alebo sekundárnej aktivácie mikroglie. Neuroinflamácia môže následne ovplyvniť synaptickú plasticitu, neurogenézu a funkciu neurónových sietí potrebných pre pamäť a pozornosť [4].

SAA4, metabolizmus lipidov a neuroinflamácia

Sérový amyloid A4 bol analyzovaný u 177 preživších s mediánom sledovania deväť rokov. SAA4 je konštitutívne exprimovaný apolipoproteín zapojený do transportu a metabolizmu lipidov. Pacienti s horším celkovým kognitívnym skóre mali vyššie plazmatické hladiny SAA4 než pacienti s lepším skóre. Vyššie hodnoty boli pozorované aj u pacientov s výraznejším vnímaným kognitívnym poškodením; podobný trend bol prítomný pri hodnotení vplyvu kognitívnych ťažkostí na kvalitu života [10].
Tieto výsledky nepreukazujú kauzálny účinok SAA4 na nervový systém. SAA4 môže byť biomarkerom spoločného biologického procesu zahŕňajúceho chronický zápal, dyslipidémiu, vaskulárne poškodenie alebo zmeny funkcie hematoencefalickej bariéry. Lipoproteíny sú dôležité pre transport lipidov, obnovu bunkových membrán, myelinizáciu a synaptickú funkciu. Ich dlhodobá dysregulácia by preto mohla prepájať metabolické a zápalové komplikácie liečby s kognitívnym poškodením.
Rozšírené proteomické analýzy identifikovali aj vzťahy kumulatívnej dávky cisplatiny k SAA4, apolipoproteínu A1, apolipoproteínu E a kininogénu 1. Ide o exploratívne nálezy, ktoré podporujú hypotézu širšej siete proteínov spojených so zápalom, koaguláciou, cievnou homeostázou a metabolizmom lipidov, vyžadujú však nezávislú validáciu**.**

Integrovaná hypotéza neskorej neurotoxicity

Dostupné výsledky umožňujú formulovať viacúrovňový model neskorej toxicity. Prvým zásahom je protinádorová liečba. Cisplatina vyvoláva poškodenie DNA, mitochondrií a neurónových štruktúr, zatiaľ čo chemoterapia a rádioterapia narúšajú epitelové a cievne bariéry. U väčšiny pacientov dôjde k postupnej reparácii, jej rozsah však môže byť ovplyvnený dávkou, kombináciou liečebných modalít, genetickou predispozíciou, metabolickým stavom a ďalšími faktormi.
Druhou úrovňou je pretrvávanie biologických následkov. Reziduálna platina, mitochondriálna dysfunkcia, poškodené alebo senescentné bunky a zmenená črevná bariéra môžu vytvárať dlhodobé stimuly aj po skončení liečby. Treťou úrovňou je systémová odpoveď organizmu. Mikrobiálne produkty, molekuly uvoľnené z poškodených buniek a metabolické zmeny aktivujú vrodenú imunitu. Postupne môže vzniknúť chronický nízkostupňový zápal, imunitná remodelácia a endotelová dysfunkcia.
Štvrtou úrovňou je poškodenie cieľových orgánov. Periférne nervy, autonómny nervový systém a mozgové siete môžu byť vystavené kombinácii priameho poškodenia, nedostatočnej regenerácie, vaskulárnych zmien a chronickej zápalovej signalizácie. Kognitívne poškodenie a periférna neuropatia preto nemusia predstavovať dve nezávislé komplikácie, ale rozdielne prejavy spoločného systémového procesu.
Vzniká tak potenciálny spätnoväzbový mechanizmus: poškodenie tkaniva podporuje zápal, zápal zhoršuje regeneráciu a bariérové funkcie a ďalšia mikrobiálna translokácia udržiava aktiváciu vrodenej imunity. Tento model vysvetľuje, prečo u časti preživších ťažkosti pretrvávajú aj desaťročia po ukončení liečby. Zároveň ponecháva priestor pre individuálne rozdiely: rovnaká dávka liečby nemusí viesť k rovnakej toxicite, pretože rozhoduje aj schopnosť reparácie, východiskový metabolický stav, genetické determinanty detoxikácie a neuroregenerácie, životný štýl a ďalšie expozície.

Klinické a výskumné dôsledky

Doterajšie výsledky neumožňujú odporučiť SAA4, sCD14 ani konkrétny imunofenotyp ako rutinné klinické biomarkery. Ide prevažne o observačné asociácie a niektoré liečebné podskupiny boli relatívne malé. Kognitívne fungovanie bolo navyše hodnotené predovšetkým pacientom uvádzaným dotazníkom, ktorý zachytáva klinicky relevantnú skúsenosť, ale nenahrádza komplexné neuropsychologické vyšetrenie.

Výsledky však určujú smer ďalšieho výskumu. Potrebné je longitudinálne prepojenie kognitívnych a neurologických výsledkov s meraním reziduálnej platiny, poškodenia DNA, mitochondriálnej funkcie, črevnej permeability, mikrobiomu, zápalových mediátorov a proteomických profilov. Dôležitá bude externá validácia v nezávislých kohortách a rozlíšenie biomarkerov expozície, biologického poškodenia a klinickej vnímavosti.

Integrovaný model otvára priestor aj pre preventívne a terapeutické intervencie. Potenciálne ovplyvniteľnými oblasťami sú fyzická aktivita, metabolické zdravie, cievne rizikové faktory, zloženie stravy, črevná bariéra, mikrobiota a chronická zápalová aktivácia. Ich účinnosť však musí byť overená v prospektívnych intervenčných štúdiách. Z klinického hľadiska je podstatné, aby sledovanie preživších nebolo zamerané iba na recidívu nádoru. Systematické zisťovanie neuropatie, kognitívnych ťažkostí, únavy, kardiometabolických rizík a kvality života môže umožniť skoršiu podpornú intervenciu. Najvyššiu pozornosť môžu vyžadovať pacienti po kombinovanej chemoterapii a rádioterapii a pacienti vystavení vyšším kumulatívnym dávkam cisplatiny.

Záver

Kognitívne poškodenie u časti preživších testikulárnych germinatívnych nádorov predstavuje dlhodobý a pretrvávajúci klinický problém. Pozorované zmeny imunofenotypu, asociácia sCD14 a HMGB1 s periférnou neuropatiou a vzťah vyšších hladín SAA4 ku kognitívnemu poškodeniu podporujú koncept systémovej neskorej neurotoxicity.

Najpravdepodobnejším vysvetlením nie je jediný izolovaný mechanizmus, ale prepojenie reziduálnej cisplatiny, poškodenia DNA a mitochondrií, črevnej mikrobiálnej translokácie, vrodenej imunitnej aktivácie, chronického zápalu a porúch lipidového a cievneho metabolizmu. Tento model vytvára východisko pre biomarkerovo orientované sledovanie pacientov a pre vývoj intervencií zameraných nielen na liečbu symptómov, ale aj na biologické mechanizmy, ktoré ich udržiavajú.

Táto práca bola finančne podporená v rámci schémy Štipendiá pre excelentných výskumníkov a výskumníčky kód projektu 09I03-03-V04-00248, financovaná z prostriedkov Plánu obnovy a odolnosti SR a Európskej únie cez mechanizmus NextGenerationEU.

Literatúra

1. Chovanec M, Cheng L. Advances in diagnosis and treatment of testicular cancer. BMJ. 2022;379:e070499. doi:10.1136/bmj-2022-070499.
2. Chovanec M, Abu Zaid M, Hanna N, El-Kouri N, Einhorn LH, Albany C. Long-term toxicity of cisplatin in germ-cell tumor survivors. Ann Oncol. 2017;28(11):2670-2679. doi:10.1093/annonc/mdx360.
3. Chovanec M, Lauritsen J, Bandak M, et al. Late adverse effects and quality of life in survivors of testicular germ cell tumour. Nat Rev Urol. 2021;18(4):227-245. doi:10.1038/s41585-021-00440-w.
4. Orszaghova Z, Mego M, Chovanec M. Long-term cognitive dysfunction in cancer survivors. Front Mol Biosci. 2021;8:770413. doi:10.3389/fmolb.2021.770413.
5. Chovanec M, Kalavska K, Obertova J, et al. Cognitive impairment and biomarkers of gut microbial translocation in testicular germ cell tumor survivors. Front Oncol. 2023;13:1146032. doi:10.3389/fonc.2023.1146032.
6. Orszaghova Z, Svetlovska D, Vasilkova L, et al. Longitudinal assessment of cognitive function in survivors of testicular germ cell tumor. Eur Urol Oncol. 2025;8(2):460-468. doi:10.1016/j.euo.2024.12.003.
7. Kilikova K, Mlcakova A, Sestakova Z, et al. Immune cell profiling of peripheral blood in long-term testicular germ cell tumor survivors. Front Immunol. 2025;16:1697087. doi:10.3389/fimmu.2025.1697087.
8. Rychtarikova D, Kalavska K, Obertova J, et al. Cisplatin-induced peripheral neuropathy and biomarkers of gut microbial translocation in testicular germ cell tumor survivors. Front Immunol. 2026;17:1827640. doi:10.3389/fimmu.2026.1827640.
9. Chovanec M, Vasilkova L, Setteyova L, et al. Long-term cognitive functioning in testicular germ-cell tumor survivors. Oncologist. 2018;23(5):617-623. doi:10.1634/theoncologist.2017-0457.
10. Orszaghova Z, Vidova V, Benesova E, et al. Serum amyloid A4 and cognitive functioning in long-term testicular germ cell tumor survivors. ASCO Genitourinary Cancers Symposium 2026; Abstract 606.

Longitudinálne hladiny SP-D a sRAGE v plazme a moči počas chemoterapie BEP pri germinatívnych nádoroch

Katarína REJLEKOVÁ[1], Barbora VLKOVÁ[2], Patrik OLÁH[1], Tomáš POKRIVČÁK[3], Rateb ALZEER[1], Eva ESCHEROVÁ[1], Michal CHOVANEC[1], Peter LESKO[1], Jana OBERTOVÁ[1], Zuzana ORSZÁGHOVÁ[1], Patrik PALACKA[1], Zuzana SÝČOVÁ-MILÁ[1], Michal MEGO[1], Peter CELEC[2]

[1] II. onkologická klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Národného onkologického ústavu, Bratislava, Slovensko; [2] Ústav molekulárnej biomedicíny Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, Slovensko; [3] Masarykův onkologický ústav, Brno, Česká republika.
Prijaté na posúdenie: 8.6.2026, zverejnené: 10.7.2026

Korešpondenčný autor: Katarína Rejleková, II. onkologická klinika LF UK a Národný onkologický ústav, Bratislava, Slovensko. E-mail: k.rejlekova@gmail.com

Abstrakt

Východiská: Bleomycínom indukovaná pľúcna toxicita zostáva významnou komplikáciou kuratívnej chemoterapie BEP pri germinatívnych nádoroch, pričom doposiaľ nie je dostupný validovaný cirkulujúci biomarker umožňujúci individuálnu predikciu rizika alebo včasnú detekciu poškodenia pľúc.
Metódy: Do tejto exploratívnej kohortovej štúdie realizovanej v dvoch centrách bolo zaradených 60 pacientov s germinatívnymi nádormi liečených terapeutickými tromi alebo štyrmi cyklami chemoterapie bleomycín, etopozid a cisplatina (BEP). Samostatne bola analyzovaná kohorta 18 pacientov s germinatívnymi nádormi liečených adjuvantným jedným cyklom chemoterapie BEP. Hladiny surfaktant proteínu D (SP-D) a solubilného receptora pre konečné produkty pokročilej glykácie (sRAGE) v plazme a moči boli hodnotené pred liečbou, počas nej a po ukončení chemoterapie BEP vo vzťahu k pľúcnej toxicite, difúznej kapacite pľúc pre oxid uhoľnatý (DLCO), pľúcnym metastázam, renálnej funkcii, zápalovým indexom, neutropénii stupňa ≥3, febrilnej neutropénii a ďalšej nepľúcnej toxicite a odpovedi na liečbu.
Výsledky: U trinástich pacientov sa počas chemoterapie BEP alebo po jej ukončení rozvinula dokumentovaná pľúcna toxicita. Vstupné plazmatické SP-D a sRAGE samostatne nepredikovali pľúcnu toxicitu (OR na zdvojnásobenie 0,60 [95 % CI 0,27–1,37]; p=0,230, resp. OR 1,20 [95 % CI 0,55–2,62]; p=0,640). Longitudinálna dynamika plazmatického SP-D počas chemoterapie BEP bola štatisticky signifikantná (p=0,00018; n=30 s kompletnými meraniami), pričom výraznejší nárast bol asociovaný s pľúcnou toxicitou potvrdenou HRCT. Vstupné močové SP-D štatisticky signifikantne predikovalo nižšie DLCO po liečbe (Spearmanov koeficient rho=−0,609; p=0,001; FDR q=0,014). Trajektórie plazmatického SP-D sa signifikantne líšili podľa prítomnosti pľúcnych metastáz (interakcia čas × metastázy: p=0,012; korigované p=0,027). Maximálne plazmatické sRAGE bolo štatisticky signifikantne asociované s neutropéniou a/alebo febrilnou neutropéniou počas chemoterapie BEP (OR na zdvojnásobenie 12,13 [95 % CI 2,59–56,93]; p=0,0016; FDR q=0,013), pričom táto asociácia zostala signifikantná aj po korekcii na viacnásobné testovanie.
Závery: U pacientov s germinatívnymi nádormi liečených chemoterapiou BEP sa SP-D ukázalo ako vedúci kandidátny biomarker bleomycínom podmieneného pľúcneho poškodenia. Signifikantná longitudinálna dynamika plazmatického SP-D identifikovala rádiologicky dokumentovanú pľúcnu toxicitu, zatiaľ čo vstupné močové SP-D štatisticky signifikantne predikovalo zhoršenú difúznu kapacitu pľúc po ukončení liečby. Liečbou navodené zvýšenie plazmatického sRAGE bolo štatisticky signifikantne asociované s neutropéniou a/alebo febrilnou neutropéniou (OR na zdvojnásobenie 12,13; 95 % CI 2,59–56,93; p=0,0016; FDR q=0,013). Tieto výsledky podporujú prospektívnu validáciu kompartmentovo špecifického monitorovania SP-D a sRAGE počas chemoterapie BEP.
Kľúčové slová: germinatívne nádory; chemoterapia BEP; bleomycín; surfaktant proteín D; sRAGE; pľúcna toxicita; neutropénia a/alebo febrilná neutropénia; DLCO; močový biomarker.

1. Úvod

Chemoterapia BEP predstavuje základ kuratívnej liečby metastatických germinatívnych nádorov. Keďže väčšina pacientov je mladá a očakáva sa dlhodobé prežívanie, prevencia závažnej pľúcnej morbidity patrí medzi hlavné klinické priority [1–3, 15].
Klinické hodnotenie bleomycínovej pľúcnej toxicity vychádza zo symptómov, zobrazovacích vyšetrení, funkčného vyšetrenia pľúc, kumulatívnej expozície, veku a funkcie obličiek. Neexistuje však validovaný biomarker, ktorý by spoľahlivo identifikoval rizikového pacienta ešte pred liečbou alebo zachytil alveolárne poškodenie dostatočne včas na rozhodnutie o vynechaní bleomycínu [1–3, 14, 17].
SP-D je glykoprotéin produkovaný prevažne alveolárnyými bunkami II. typu, ktorý reguluje homeostázu surfaktantu a moduluje vrodenú pľúcnu imunitu; jeho plazmatické koncentrácie sú zvýšené pri difúznom alveolárnom poškodení a fibrotizujúcich pľúcnych ochoreniach [4–6]. sRAGE je solubilná ektodoména receptora RAGE prednostne exprimovaného alveolárnyými bunkami I. typu a slúži ako systémový indikátor integrity alveolárneho epitelu; zvýšené plazmatické hladiny sRAGE sú nezávisle asociované s horším klinickým výsledkom pri syndróme akútnej respiračnej tiesne (ARDS) [10, 11]. Napriek biologickej plausibilite oboch markerov ako cirkulujúcich indikátorov bleomycínom podmieneného alveolárneho poškodenia, ich longitudinálna kinetika počas chemoterapie BEP, prediktívna hodnota pre klinicky relevantné endpointy a vzťah medzi plazmatickými a močovými koncentráciami v tejto populácii neboli doteraz systematicky charakterizované [4–6, 12].
Hodnotili sme vstupné aj longitudinálne hladiny SP-D a sRAGE v plazme a moči počas terapeutického BEP, pričom adjuvantný jeden cyklus BEP bol analyzovaný samostatne. Posudzovali sme pľúcnu toxicitu, DLCO, pľúcne metastázy, renálne a zápalové faktory, odpoveď na liečbu a zhodu medzi plazmatickými a močovými hodnotami.

2. Materiál a metódy

2.1 Dizajn štúdie a populácia

Celkový súbor zahŕňal 78 pacientov. Terapeutickú kohortu tvorilo 60 pacientov s germinatívnymi nádormi liečených terapeutickými tromi alebo štyrmi cyklami BEP v Národnom onkologickom ústave v Bratislave a v Masarykovom onkologickom ústave v Brne. Adjuvantnú kohortu tvorilo 18 pacientov liečených jedným cyklom BEP, ktorí boli z hlavnej terapeutickej kohorty vylúčení a analyzovaní samostatne. Traja pacienti boli z analýzy vylúčení, keďže zomreli počas prvého cyklu chemoterapie na septický šok; tieto príhody boli klasifikované ako závažné nežiaduce udalosti (SAE — serious adverse events).

2.2 Odber, spracovanie a uchovávanie biologického materiálu

Vzorky periférnej krvi boli odobrané do skúmaviek s obsahom kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (EDTA). Plazma bola oddelená centrifugáciou a uchovávaná pri -80 °C až do analýzy. Vzorky moču boli odoberané pri príslušných dostupných kontrolných návštevách štúdie a uchovávané zamrazené až do stanovenia biomarkerov. Pred analýzou boli vzorky a všetky komponenty súpravy temperované na izbovú teplotu. Plazmatické a močové koncentrácie solubilného receptora pre konečné produkty pokročilej glykácie (sRAGE) a surfaktant proteínu D (SP-D) boli stanovené pomocou komerčne dostupných sendvičových ELISA súprav (BioVendor - Laboratorní medicína a.s., Brno, Česká republika) podľa pokynov výrobcu. Štandardy, kontroly a vzorky pacientov boli analyzované na mikrotitračných platniach potiahnutých protilátkou a koncentrácie boli vypočítané z príslušných kalibračných kriviek.

2.3 Laboratórne stanovenie sRAGE

Príprava vzoriek. Vzorky EDTA plazmy boli rozmrazené bezprostredne pred analýzou a zriedené v pomere 1:3 pomocou dodaného riediaceho pufra (Dilution Buffer). Vzorky moču boli analyzované bez riedenia.
Príprava reagencií. Všetky zložky kitu a vzorky boli pred začatím analýzy temperované na 20-25 °C. Premývací roztok bol pripravený zriedením dodaného koncentrátu destilovanou vodou. Lyofilizovaný štandard sRAGE bol rekonštituovaný a sériovo zriedený na vytvorenie kalibračnej krivky.
Inkubácia vzoriek. Do jamiek mikrotitračnej platne s naviazanou polyklonálnou anti-sRAGE protilátkou bolo napipetovaných 100 µl jednotlivých štandardov, kontrol, trojnásobne zriedenej EDTA plazmy alebo neriedeného moču. Platňa bola inkubovaná 2 hodiny pri izbovej teplote na orbitálnej trepačke pri približne 300 ot./min.
Premývanie a detekcia. Obsah jamiek bol odsatý a platňa bola päťkrát premytá 350 µl premývacieho roztoku na jamku. Po poslednom premytí bola platňa dôkladne vysušená na absorpčnom papieri. Následne

bolo do každej jamky pridaných 100 µl biotinylovanej detekčnej protilátky, s inkubáciou 1 hodinu pri 25 °C na orbitálnej trepačke pri 300 ot./min. Premývací cyklus bol následne zopakovaný. Do každej jamky bolo pridaných 100 µl konjugátu streptavidín-chrenová peroxidáza a platňa bola inkubovaná 30 minút pri 25 °C na orbitálnej trepačke pri 300 ot./min., s ďalším premývacím cyklom.
Vyvolanie farby a meranie. Do každej jamky bolo pridaných 100 µl substrátového roztoku a platňa bola inkubovaná 15 minút pri 25 °C v tme. Reakcia bola zastavená pridaním 100 µl stop roztoku. Absorbancia bola okamžite meraná pri 450 nm a koncentrácie sRAGE boli vypočítané z kalibračnej krivky.

2.4 Laboratórne stanovenie SP-D

Príprava vzoriek. Vzorky EDTA plazmy boli rozmrazené bezprostredne pred analýzou a zriedené v pomere 1:11 pomocou dodaného riediaceho pufra (Dilution Buffer). Vzorky moču boli analyzované bez riedenia.
Príprava reagencií. Všetky reagencie a vzorky boli pred analýzou temperované na izbovú teplotu. Premývací roztok bol pripravený zriedením koncentrovaného premývacieho pufra. Lyofilizovaný štandard SP-D bol rekonštituovaný a sériovo zriedený na vytvorenie kalibračnej krivky.
Inkubácia vzoriek. Do jamiek mikrotitračnej platne s naviazanou monoklonálnou anti-SP-D protilátkou bolo napipetovaných 100 µl jednotlivých štandardov, kontrol, jedenásťnásobne zriedenej EDTA plazmy alebo neriedeného moču. Platňa bola inkubovaná 2 hodiny pri 25 °C na orbitálnej trepačke pri 300 ot./min.
Premývanie a detekcia. Obsah jamiek bol odsatý a platňa bola päťkrát premytá 350 µl premývacieho roztoku na jamku. Po poslednom premytí bola platňa dôkladne vysušená na absorpčnom papieri. Do každej jamky bolo pridaných 100 µl biotinylovanej detekčnej protilátky, s inkubáciou 1 hodinu pri 25 °C na orbitálnej trepačke pri 300 ot./min. Premývací cyklus bol následne zopakovaný. Do každej jamky bolo pridaných 100 µl konjugátu streptavidín-chrenová peroxidáza a platňa bola inkubovaná 1 hodinu pri 25 °C na orbitálnej trepačke pri 300 ot./min., s ďalším premývacím cyklom.
Vyvolanie farby a meranie. Do každej jamky bolo pridaných 100 µl substrátového roztoku a platňa bola inkubovaná 15 minút pri 25 °C v tme. Reakcia bola zastavená pridaním 100 µl stop roztoku. Absorbancia bola okamžite meraná pri 450 nm a koncentrácie SP-D boli vypočítané z kalibračnej krivky.
Pri oboch stanoveniach platilo, že ak bolo pre toho istého pacienta v rovnakom časovom bode dostupné viac ako jedno meranie, v štatistickej analýze sa použil aritmetický priemer a počet zdrojových meraní bol zaznamenaný.

2.5 Hodnotené ukazovatele

Primárnym endpointom bola dokumentovaná pľúcna toxicita definovaná kompatibilnými symptómami a/alebo pozitívnym HRCT nálezom [3, 16]. Symptómy a HRCT nález boli analyzované aj samostatne. Medzi sekundárne premenné patrili DLCO pred liečbou a po liečbe, zmena DLCO, pľúcne metastázy, vek, fajčenie, hemoglobín, kreatinín, eGFR, kumulatívna dávka bleomycínu, použitie G-CSF, NLR, PLR, SII [13], klasifikácia IGCCCG a priaznivá odpoveď na liečbu.

2.6 Štatistická analýza

Kontinuálne premenné sú uvádzané ako medián a interkvartilové rozpätie, kategorické premenné ako počet a percento. Na porovnanie nezávislých skupín sa použil Mannov-Whitneyho U test, na hodnotenie párových zmien Wilcoxonov párový test, na binárne asociácie Fisherov exaktný test a na kontinuálne asociácie Spearmanova poradová korelácia. V logistickej regresii boli biomarkery transformované pomocou log2, preto OR vyjadruje efekt zdvojnásobenia hodnoty biomarkera. Regresné odhady efektu sú uvádzané s 95 % intervalmi spoľahlivosti. Longitudinálne modely zahŕňali čas, skupinu a interakciu čas × skupina s náhodným interceptom pacienta; pri singulárnych modeloch sa použila metóda najmenších štvorcov s robustnými štandardnými chybami klastrovanými podľa pacienta. Miera falošných objavov bola kontrolovaná Benjaminiho-Hochbergovou metódou. Chýbajúce údaje sa riešili analýzou dostupných prípadov [7, 8].

3. Výsledky

3.1 Charakteristika hlavnej kohorty

Terapeutická kohorta zahŕňala 60 pacientov: 46 s potvrdenými tromi cyklami BEP a 11 s potvrdenými štyrmi cyklami BEP. Traja pacienti, zaradení do terapeutickej kohorty, zomreli počas prvého cyklu

chemoterapie na septický šok (závažná nežiaduca udalosť, SAE) a boli z biomarkerovej analýzy vylúčení. Vstupné plazmatické SP-D a sRAGE boli dostupné u 60 pacientov. U trinástich pacientov bola dokumentovaná pľúcna toxicita. Močové údaje boli dostupné u 56 pacientov a 77 párových plazmaticko-močových pozorovaní bolo dostupných od 54 pacientov. Podrobná charakteristika celej terapeutickej kohorty vrátane samostatných podskupín 3×BEP a 4×BEP je uvedená v doplnkovej tabuľke S1.

3.2 Klinické faktory asociované s pľúcnou toxicitou

Pacienti s pľúcnou toxicitou mali nižší vstupný hemoglobín (p=0,0015), vyššie PLR (p=0,0019) a nižšie DLCO po liečbe (p=0,0063).

3.3 Predikčná hodnota vstupných hladín biomarkerov v plazme

Vstupné SP-D a sRAGE nepredikovali pľúcnu toxicitu: OR na zdvojnásobenie bolo 0,60 (95 % CI 0,27–1,37; p=0,230), resp. OR 1,20 (95 % CI 0,55–2,62; p=0,640).

3.4 Longitudinálne zmeny hladín biomarkerov v plazme

Výraznejší longitudinálny nárast plazmatického SP-D bol asociovaný s HRCT definovanou pľúcnou toxicitou. Medián plazmatického SP-D vzrástol z 92,4 ng/ml pred prvým cyklom na 134,9 ng/ml pred druhým cyklom a 123,7 ng/ml pred tretím cyklom. Posledný dostupný percentuálny nárast SP-D bol vyšší u pacientov s HRCT toxicitou (p=0,010), hoci po FDR korekcii asociácia nebola štatisticky významná (q=0,228). U 55 pacientov s dostupným východiskovým a konečným meraním bol medián individuálneho vzostupu SP-D 44,2 ng/ml (IQR 2,8–84,2; p<0,001). Celková interakcia čas × toxicita nebola významná pre SP-D ani sRAGE.

3.5 Pľúcne metastázy a trajektórie biomarkerov

SP-D sa v čase zvyšovalo menej u pacientov s pľúcnymi metastázami. Interakcia čas × metastázy bola významná v neupravenom modeli (p=0,012) aj po úprave na vek, fajčenie, hemoglobín a eGFR (p=0,027). Pľúcne metastázy neboli spojené s výskytom toxicity (Fisherov test p=0,709).

3.6 Asociácie s renálnou a pľúcnou funkciou

Vstupné plazmatické sRAGE korelovalo s kreatinínom (rho=0,455; p=0,0028) a negatívne s eGFR (rho=−0,396; p=0,010). Percentuálny nárast SP-D po liečbe koreloval so zmenou DLCO (rho=−0,648; p=0,012; q=0,114). Maximálne plazmatické sRAGE bolo vyššie u pacientov s neutropéniou a/alebo febrilnou neutropéniou v porovnaní s pacientmi bez tejto toxicity (1 347,8 verzus 845,1 pg/ml; p=0,00023).

3.7 Hladiny biomarkerov v moči

Vstupné močové SP-D bolo významným prediktorom horšej funkcie pľúc po liečbe: vyššie vstupné močové SP-D bolo asociované s nižším vstupným DLCO (rho=-0,530; p=0,0037) aj s nižším DLCO po liečbe (rho=-0,609; p=0,0010; q=0,014). Maximálne močové sRAGE bolo nominálne vyššie u pacientov s HRCT toxicitou (p=0,0159; q=0,351). Močové sRAGE vykazovalo nominálne významnú interakciu čas × toxicita (p=0,019) v modeli s robustnými štandardnými chybami klastrovanými podľa pacienta.

3.8 Zhoda medzi hladinami biomarkerov v plazme a moči

Vstupné plazmatické a močové SP-D nekorelovali (rho=-0,062; p=0,684), rovnako ako plazmatické a močové sRAGE (rho=-0,140; p=0,354). Naprieč párovými časovými bodmi vykazovalo SP-D slabú negatívnu asociáciu (rho=-0,233; p=0,049; q=0,394; klastrované beta=-0,200; p=0,046; R2=0,059).

3.9 Samostatná adjuvantná kohorta 1×BEP

Samostatná adjuvantná kohorta zahŕňala 18 pacientov; desať pacientov malo párové plazmatické biomarkery. Medián SP-D sa zmenil o -6,35 % (p=1,000) a sRAGE o -2,82 % (p=0,625). Párové močové merania mali iba traja pacienti.

3.10 Porovnanie 3×BEP a 4×BEP

U pacientov s potvrdeným počtom cyklov sa dokumentovaná pľúcna toxicita vyskytla u 8 zo 45 hodnotiteľných pacientov liečených tromi cyklami BEP (17,8 %) a u 4 z 11 pacientov liečených štyrmi cyklami (36,4 %). Hoci bola pľúcna toxicita po štyroch cykloch BEP numericky častejšia, rozdiel nebol štatisticky významný (OR 2,64; 95 % CI 0,62–11,23; Fisherov exaktný test p=0,224). Vstupné plazmatické SP-D, maximálne plazmatické SP-D ani posledná dostupná percentuálna zmena SP-D sa medzi skupinami s tromi a štyrmi cyklami významne nelíšili (p=0,255; p=0,726; p=0,660). Neutropénia a/alebo febrilná neutropénia sa vyskytla u 13 zo 46 pacientov liečených tromi cyklami (28,3 %) a u 1 z 11 pacientov liečených štyrmi cyklami (9,1 %; Fisherov exaktný test p=0,261). Vstupné plazmatické sRAGE, maximálne plazmatické sRAGE ani posledná dostupná percentuálna zmena sRAGE neboli v skupine so štyrmi cyklami významne vyššie (p=0,208; p=0,160; p=0,844). Maximálne plazmatické sRAGE pritom zostalo nezávisle asociované s hematologickou toxicitou aj po zohľadnení liečby tromi oproti štyrom cyklom BEP (OR na zdvojnásobenie 8,24; 95 % CI 1,74–38,99; p=0,0079).

4. Diskusia

Táto exploratívna translačná štúdia prináša niekoľko štatisticky signifikantných a klinicky relevantných nálezov. Longitudinálna dynamika plazmatického SP-D počas chemoterapie BEP bola štatisticky signifikantná (p=0,00018; n=30 s kompletnými meraniami), pričom výraznejší nárast plazmatického SP-D bol asociovaný s pľúcnou toxicitou dokumentovanou HRCT. Hoci po korekcii na viacnásobné testovanie nepretrvala štatistická signifikancia poslednej dostupnej percentuálnej zmeny SP-D (FDR q=0,228), celková štatisticky signifikantná longitudinálna dynamika potvrdzuje biologickú relevantnosť plazmatického SP-D ako citlivého indikátora alveolárneho poškodenia indukovaného bleomycínom. Tento nález je biologicky plausibilný: SP-D je produkovaný prevažne alveolárnyými bunkami II. typu a jeho plazmatické hladiny reflektujú intenzitu alveolárneho poškodenia [4–6].

Vstupné močové SP-D štatisticky signifikantne predikovalo nižšie DLCO po liečbe (rho=−0,609; p=0,001; FDR q=0,014), čo predstavuje, podľa nášho najlepšieho vedomia, prvú takúto správu v populácii pacientov s germinatívnymi nádormi liečených chemoterapiou BEP. Asociácia vstupného močového SP-D s post-terapeutickým DLCO naznačuje, že renálna frakcia SP-D môže poskytovať prognostické informácie o funkčnom poškodení pľúc presahujúce rámec samotnej plazmatickej koncentrácie. Interpretácia absolútnych močových koncentrácií je limitovaná absenciou normalizácie na močový kreatinín; hydratačný stav, koncentrácia moču a renálna tubulárna manipulácia môžu ovplyvňovať výsledky [1, 9].

Maximálne plazmatické sRAGE bolo štatisticky signifikantne asociované s neutropéniou a/alebo febrilnou neutropéniou počas chemoterapie BEP (OR na zdvojnásobenie 12,13; 95 % CI 2,59–56,93; p=0,0016; FDR q=0,013), pričom táto asociácia zostala robustná po korekcii na viacnásobné testovanie aj po zohľadnení počtu cyklov BEP. Zaujímavé je, že vstupné plazmatické sRAGE korelovalo s hladinou kreatinínu (rho=0,455; p=0,0028; FDR q=0,036) a negatívne s eGFR (rho=−0,396; p=0,010), čo naznačuje závislosť clearance sRAGE od renálnej funkcie; táto závislosť musí byť zohľadnená pri interpretácii hladín sRAGE v populáciách s renálnou insuficienciou alebo pri liečbe nefrotoxickými látkami, akými sú platinové deriváty.

Naopak, vstupné plazmatické SP-D a sRAGE nepreukázali prediktívnu hodnotu pre rozvoj dokumentovanej pľúcnej toxicity (OR 0,60 [95 % CI 0,27–1,37]; p=0,230, resp. OR 1,20 [95 % CI 0,55–2,62]; p=0,640). Pre biomarker využívaný pred liečbou na individualizované rozhodovanie o zaradení bleomycínu by bola nutná silnejšia, reprodukovateľná a nezávisle validovaná asociácia s príslušnými klinickými endpointmi [7, 8]. Na základe týchto exploratívnych údajov nie je možné odporučiť prahovú vstupnú koncentráciu pre klinické rozhodovanie.

Diferenciálny efekt prítomnosti pľúcnych metastáz na longitudinálne trajektórie plazmatického SP-D (interakcia čas × metastázy: p=0,012; korigované p=0,027) je pri germinatívnych nádoroch osobitne relevantný: nádorová záťaž, regresia metastáz pod vplyvom chemoterapie, lokálna zápalová odpoveď alebo alterácia integrity alveolárneho epitelu môžu modifikovať hladiny SP-D nezávisle od priameho bleomycínového poškodenia. Budúce validačné štúdie by preto mali zahŕňať sériové kvantitatívne hodnotenie pľúcnej nádorovej záťaže.

Nízka medzikompartmentová zhoda medzi plazmatickými a močovými koncentráciami SP-D aj sRAGE naznačuje kinetiku a reguláciu špecifickú pre jednotlivé biologické matrice. Plazmatické a močové hodnoty preto nie sú vzájomne zameniteľné a nemôžu sa navzájom substituovať bez predchádzajúcej samostatnej validácie [10, 11].
Medzi silné stránky štúdie patrí prospektívny dizajn s opakovaným odberom vzoriek, súčasné hodnotenie plazmy a moču, stratifikácia terapeutickej a adjuvantnej kohorty, analýza na úrovni pacienta a kontrola miery falošných objavov pomocou Benjaminiho–Hochbergovej metódy. Limitáciami sú malý počet udalostí pľúcnej toxicity, chýbajúce a nepravidelné časové body merania, absencia centrálneho zaslepeného hodnotenia pľúcnej toxicity, potenciálny efekt centra, riedke močové odbery a absencia normalizácie na močový kreatinín. Tieto výsledky formulujú konkrétne hypotézy pre prospektívne biomarkerové štúdie, nie okamžite klinicky implementovateľný test.

5. Závery

SP-D sa ukázalo ako vedúci kandidátny biomarker bleomycínom podmieneného pľúcneho poškodenia, zatiaľ čo maximálne plazmatické sRAGE bolo štatisticky signifikantne asociované s neutropéniou a/alebo febrilnou neutropéniou počas chemoterapie BEP (OR na zdvojnásobenie 12,13; 95 % CI 2,59–56,93; p=0,0016; FDR q=0,013). Signifikantná longitudinálna dynamika plazmatického SP-D identifikovala HRCT dokumentovanú pľúcnu toxicitu, zatiaľ čo vyššie vstupné močové SP-D predikovalo nižšie DLCO po liečbe, čo poukazuje na komplementárnu úlohu SP-D pri detekcii štrukturálneho aj funkčného pľúcneho poškodenia. Súčasne každé zdvojnásobenie maximálneho plazmatického sRAGE zvyšovalo pravdepodobnosť neutropénie a/alebo febrilnej neutropénie 12-násobne (OR 12,13; 95 % CI 2,59–56,93; p=0,0016; FDR q=0,013). Tieto komplementárne výsledky naznačujú, že SP-D a sRAGE zachytávajú odlišné dimenzie toxicity BEP: SP-D primárne odráža pľúcne poškodenie, zatiaľ čo liečbou navodené zvýšenie sRAGE môže odrážať systémovú zápalovú odpoveď a myelosupresiu spojenú s neutropéniou a/alebo febrilnou neutropéniou. Kombinovaná biomarkerová stratégia si zasluhuje prospektívnu validáciu pre rizikovo adaptované monitorovanie toxicity počas BEP.

5.1 Klinické implikácie

- Štatisticky signifikantná longitudinálna dynamika plazmatického SP-D a prediktívna hodnota vstupného močového SP-D pre post-terapeutickú difúznu kapacitu pľúc podporujú SP-D ako prioritný kandidátny biomarker pre prospektívnu klinickú validáciu u pacientov liečených bleomycínom. Skutočnosť, že plazmatické a močové SP-D zachytávajú odlišné aspekty pľúcneho poškodenia — rádiologický štrukturálny (HRCT) a funkčný (DLCO) — naznačuje, že tieto biologické matrice poskytujú komplementárne, nie redundantné informácie. Imunitne sprostredkovaný mechanizmus bleomycínovej pľúcnej toxicity — vrátane dysregulovaného alveolárno-imunitného crosstalku, aktivácie vrodenej imunity a profibrotickej signalizácie — bol nedávno komplexne zhrnutý v porovnávacej analýze režimov BEP, EP a VIP [17].
- Štatisticky signifikantná asociácia maximálneho plazmatického sRAGE s neutropéniou a/alebo febrilnou neutropéniou (OR na zdvojnásobenie 12,13; 95 % CI 2,59–56,93; p=0,0016) naznačuje potenciálnu úlohu sRAGE ako integrovaného markera systémovej toxicity BEP; jej klinické využitie si vyžaduje prospektívne overenie s vopred definovanými prahovými hodnotami a adjustáciou na renálnu funkciu.
- Ďalšia prospektívna biomarkerová štúdia v populácii germinatívnych nádorov je v súčasnosti v realizácii a bude zahŕňať sériové kvantitatívne hodnotenie pľúcnej nádorovej záťaže, normalizáciu močových biomarkerov na kreatinín a primárne analýzy s vopred špecifikovanými prahovými hodnotami, keďže post-hoc exploratívne prahové hodnoty nemôžu slúžiť ako základ pre klinické rozhodovanie.

6. Vyhlásenia

Etické schválenie: Štúdie zahŕňajúce ľudské subjekty boli schválené etickými komisiami Národného onkologického ústavu v Bratislave a Masarykovho onkologického ústavu v Brne (dátum schválenia: 1. 12. 2024). Štúdie boli realizované v súlade s lokálnou legislatívou a inštitucionálnymi požiadavkami. Všetci účastníci poskytli písomný informovaný súhlas s účasťou v štúdii.

Financovanie: Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V04-00189.
Dostupnosť údajov: Dátové súbory prezentované v tejto štúdii nie sú voľne dostupné z dôvodu ochrany súkromia pacientov. Žiadosti o prístup k dátovým súborom treba adresovať zodpovedajúcemu autorovi: k.rejlekova@gmail.com.
Konflikt záujmov: Autori deklarujú, že nemajú konflikt záujmov.
Príspevky autorov (CRediT): Katarína Rejleková: koncepcia štúdie, metodika, realizácia výskumu, vedenie projektu, získanie financovania, supervízia a príprava pôvodného rukopisu. Barbora Vlková a Peter Celec: metodika, laboratórne analýzy biomarkerov, validácia a kritická revízia rukopisu. Patrik Oláh: správa údajov, formálna štatistická analýza, vizualizácia a kritická revízia rukopisu. Tomáš Pokrivčák, Rateb Alzeer, Eva Escherová, Michal Chovanec, Peter Lesko, Jana Obertová, Zuzana Országhová, Patrik Palacka, Zuzana Sýčová-Milá a Michal Mego: realizácia výskumu, nábor pacientov, získavanie klinických údajov, zber biologického materiálu a kritická revízia rukopisu. Anna Mazanková a Jana Malicherová sa podieľali na zbere biologického materiálu a klinických údajov a na kontrole dodržania vopred definovaných časových intervalov odberov. Všetci autori rukopis skontrolovali a schválili jeho konečnú verziu.

7. Tabuľky

Doplnková tabuľka S1. Charakteristika celej terapeutickej kohorty BEP.

Charakteristika	Celá terapeutická kohorta (n=60)	3xBEP (n=46)	4xBEP (n=11)
Vek, roky	36,0 (32,0-41,0), n=59	37,0 (32,0-41,0), n=46	34,0 (24,0-36,5), n=11
Vek >=30 rokov	46/59 (78,0%)	37/46 (80,4%)	7/11 (63,6%)
Histológia: seminóm	25/58 (43,1%)	21/46 (45,7%)	2/10 (20,0%)
Histológia: NSGCT/zmiešaný nádor	32/58 (55,2%)	25/46 (54,3%)	7/10 (70,0%)
Histológia: iná	1/58 (1,7%)	0/46 (0,0%)	1/10 (10,0%)
Primárna lokalizácia: gonadálna	54/58 (93,1%)	44/46 (95,7%)	9/11 (81,8%)
Primárna lokalizácia: extragonadálna retroperitoneálna	2/58 (3,4%)	1/46 (2,2%)	1/11 (9,1%)
Primárna lokalizácia: mediastinálna	1/58 (1,7%)	1/46 (2,2%)	0/11 (0,0%)
Štádium I	4/57 (7,0%)	4/46 (8,7%)	0/11 (0,0%)
Štádium II	26/57 (45,6%)	26/46 (56,5%)	0/11 (0,0%)
Štádium III	24/57 (42,1%)	14/46 (30,4%)	10/11 (90,9%)
IGCCCG: dobrá prognóza	31/42 (73,8%)	30/31 (96,8%)	1/11 (9,1%)
IGCCCG: intermediárna prognóza	6/42 (14,3%)	1/31 (3,2%)	5/11 (45,5%)
IGCCCG: zlá prognóza	5/42 (11,9%)	0/31 (0,0%)	5/11 (45,5%)
Pľúcne metastázy	12/55 (21,8%)	9/44 (20,5%)	3/11 (27,3%)
Fajčenie v anamnéze	28/56 (50,0%)	25/45 (55,6%)	3/11 (27,3%)
Hemoglobín, g/l	150,0 (139,0-156,0), n=57	151,0 (141,2-156,8), n=46	140,0 (117,0-151,0), n=11
Kreatinín, mikromol/l	80,3 (73,9-91,5), n=56	82,0 (76,8-92,9), n=45	68,4 (61,4-81,5), n=11
eGFR, ml/min	108,9 (90,5-116,2), n=56	108,0 (88,2-112,8), n=45	125,4 (105,0-131,4), n=11
Vstupné DLCO, % náležitej hodnoty	95,0 (85,5-101,5), n=55	97,0 (88,0-104,2), n=46	90,0 (79,0-95,0), n=9
DLCO po liečbe, % náležitej hodnoty	96,0 (83,2-103,2), n=36	96,0 (86,0-103,5), n=27	96,0 (64,0-103,0), n=9
Zmena DLCO, percentuálne body	-4,0 (-12,8 to 2,5), n=34	-4,0 (-11,5 to 2,0), n=27	-4,0 (-26,5 to 4,0), n=7
NLR	2,47 (1,88-3,80), n=51	2,22 (1,77-3,28), n=40	3,63 (3,04-4,61), n=11
PLR	141,2 (115,0-210,3), n=51	140,3 (114,7-180,8), n=40	205,6 (158,9-255,9), n=11
SII	570,6 (404,5-885,6), n=51	547,3 (391,0-834,9), n=40	872,1 (472,3-1117,1), n=11
Kumulatívna dávka bleomycínu, mg	270 (270-360), n=39	270 (270-270), n=28	360 (360-360), n=11
Dokumentovaná pľúcna toxicita	13/59 (22,0%)	8/45 (17,8%)	4/11 (36,4%)
Neutropénia a/alebo febrilná neutropénia	14/57 (24,6%)	13/46 (28,3%)	1/11 (9,1%)
Priaznivá odpoveď na liečbu	36/39 (92,3%)	28/28 (100,0%)	8/11 (72,7%)

Stĺpec Celá terapeutická kohorta zahŕňa všetkých 60 pacientov. Pacienti s potvrdenými tromi a štyrmi cyklami BEP sú ponechaní v samostatných stĺpcoch. Údaje sú uvedené ako medián (interkvartilové rozpätie), n alebo n/N (%) s denomináormi podľa dostupných údajov. NSGCT, neseminómový germinatívny nádor; IGCCCG, International Germ Cell Cancer Collaborative Group; DLCO, difúzna kapacita pľúc pre oxid uhoľnatý.

Tabuľka 1. Vstupné a klinické charakteristiky.

Charakteristika	Celý súbor	Bez toxicity	Pľúcna toxicita	p
Vek, roky	36,0 (32,0-41,0)	37,0 (32,0-41,8)	36,0 (32,0-37,0)	0,2164
Vek >=30 rokov	46/59 (78,0%)	36/46 (78,3%)	10/13 (76,9%)	1,0000
Anamnéza fajčenia	28/56 (50,0%)	24/43 (55,8%)	4/13 (30,8%)	0,2047
Pľúcne metastázy	12/55 (21,8%)	10/42 (23,8%)	2/13 (15,4%)	0,7093
Hemoglobín, g/l	150,0 (139,0-156,0)	152,5 (142,0-157,2)	117,0 (110,0-149,0)	0,0015
Kreatinín, µmol/l	80,3 (73,9-91,5)	81,2 (75,0-88,7)	77,3 (71,2-93,7)	0,7798
eGFR, ml/min	108,9 (90,5-116,2)	108,3 (95,5-114,9)	109,5 (80,7-120,6)	0,8888
Vstupné DLCO, % náležitej hodnoty	95,0 (85,5-101,5)	95,0 (87,8-101,8)	98,0 (78,0-101,0)	0,5454
DLCO po liečbe, % náležitej hodnoty	96,0 (83,2-103,2)	102,0 (94,0-105,0)	84,0 (75,0-87,5)	0,0063
Zmena DLCO, percentuálne body	-4,0 (-12,8-2,5)	-3,0 (-10,0-4,0)	-10,0 (-17,0--4,0)	0,0971
NLR	2,5 (1,9-3,8)	2,2 (1,8-3,4)	3,1 (2,5-4,6)	0,0763
PLR	141,2 (115,0-210,3)	133,6 (113,4-175,7)	200,6 (167,5-293,6)	0,0019
SII	570,6 (404,5-885,6)	527,6 (375,9-821,2)	859,2 (583,7-1117,1)	0,0517

Kumulatívna dávka bleomycínu, mg	270,0 (270,0-360,0)	270,0 (270,0-337,5)	270,0 (270,0-360,0)	0,8187
Použitie G-CSF	57/57 (100,0%)	44/44 (100,0%)	13/13 (100,0%)	

Tabuľka 2. Kľúčové zistenia hladín biomarkerov v plazme.

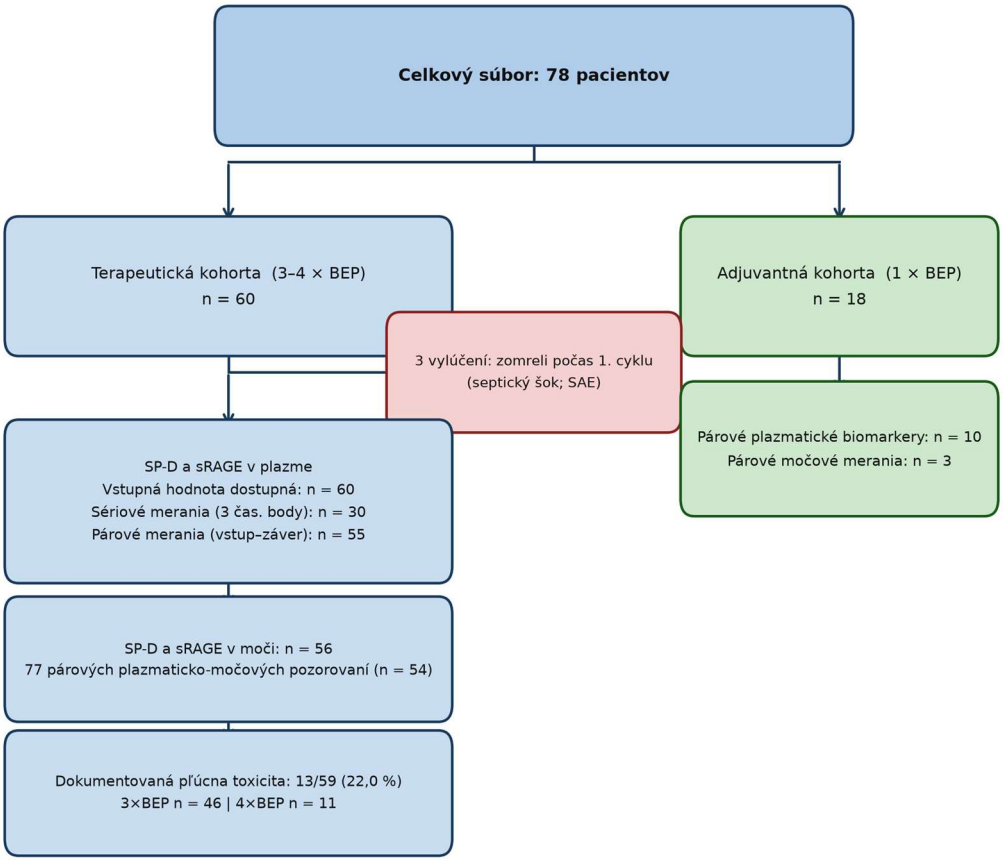
Prediktor	Endpoint	N	Efekt	p	Metóda
Vstupné SP-D	Akákoľvek pľúcna toxicita	60	OR 0,60 (95 % CI 0,27-1,37)	0,2300	Logistic regression; OR per doubling
Vstupné sRAGE	Akákoľvek pľúcna toxicita	60	OR 1,20 (95 % CI 0,55-2,62)	0,6400	Logistic regression; OR per doubling
Posledná percentuálna zmena SP-D	HRCT toxicita	26	Vyššie pri HRCT toxicite	0,0100	Mannov-Whitneyho U test; FDR q=0,228
Interakcia čas × toxicita, SP-D	Longitudinálna trajektória	187	Interakcia	0,1040	Lineárny zmiešaný model
Interakcia čas × pľúcne metastázy, SP-D	Longitudinálna trajektória	148	Interakcia	0,0120	Zmiešaný model; upravené p=0,027
Vstupné sRAGE	Kreatinín	41	rho=0,455	0,0028	Spearman; FDR v plazmatickej rodine q=0,036
Percentuálna zmena SP-D po liečbe	Zmena DLCO	14	rho=-0,648	0,0120	Spearman; FDR q=0,114
Maximálne plazmatické sRAGE	Neutropénia a/alebo febrilná neutropénia	Dostupné prípady	OR 12,13 (95 % CI 2,59-56,93)	0,0016	Logistická regresia; OR na zdvojnásobenie; FDR q=0,013

Tabuľka 3. Kľúčové zistenia hladín biomarkerov v moči a ich vzťahu k hladinám v plazme.

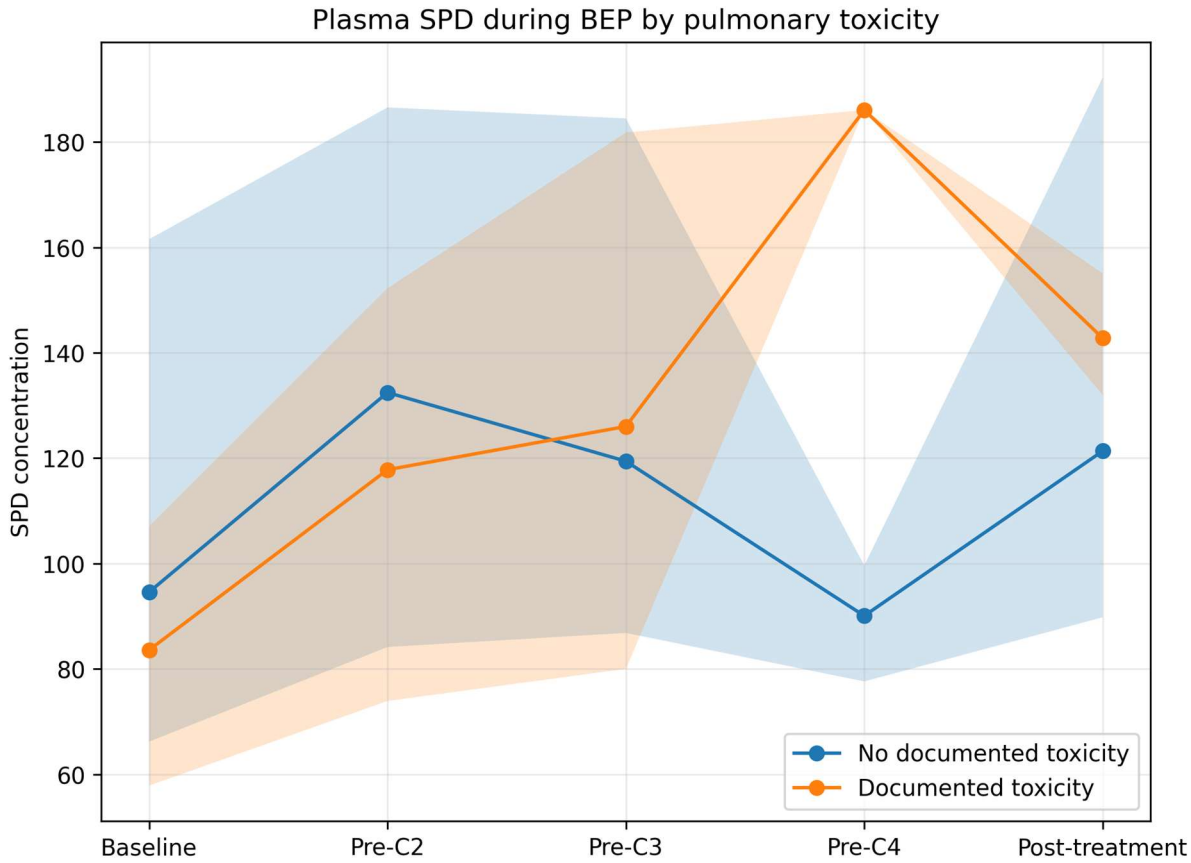
Prediktor/ porovnanie	Endpoint	N	Efekt	p	FDR q	Metóda
Vstupné močové SP-D	DLCO po liečbe	26	rho=-0,609	0,0010	0,0140	Spearman
Vstupné močové SP-D	Vstupné DLCO	28	rho=-0,530	0,0037	0,0390	Spearman
Maximálne močové sRAGE	HRCT toxicita	35	Vyššie pri HRCT toxicite	0,0159	0,3510	Mann-Whitney U
Interakcia čas × toxicita, močové sRAGE	Longitudinálna trajektória	95	Interakcia	0,0190		OLS s klastrovanými štandardnými chybami

Vstupné plazmatické SP-D vs močové SP-D	Vstupné hodnoty toho istého pacienta	46	rho=-0,062	0,6840		Spearman
Vstupné plazmatické sRAGE vs močové sRAGE	Vstupné hodnoty toho istého pacienta	46	rho=-0,140	0,3540		Spearman
Všetky časové body: plazmatické SP-D vs močové SP-D	Párové opakované merania	72	rho=-0,233	0,0490	0,3940	Spearman; klastrovaný model p=0,046

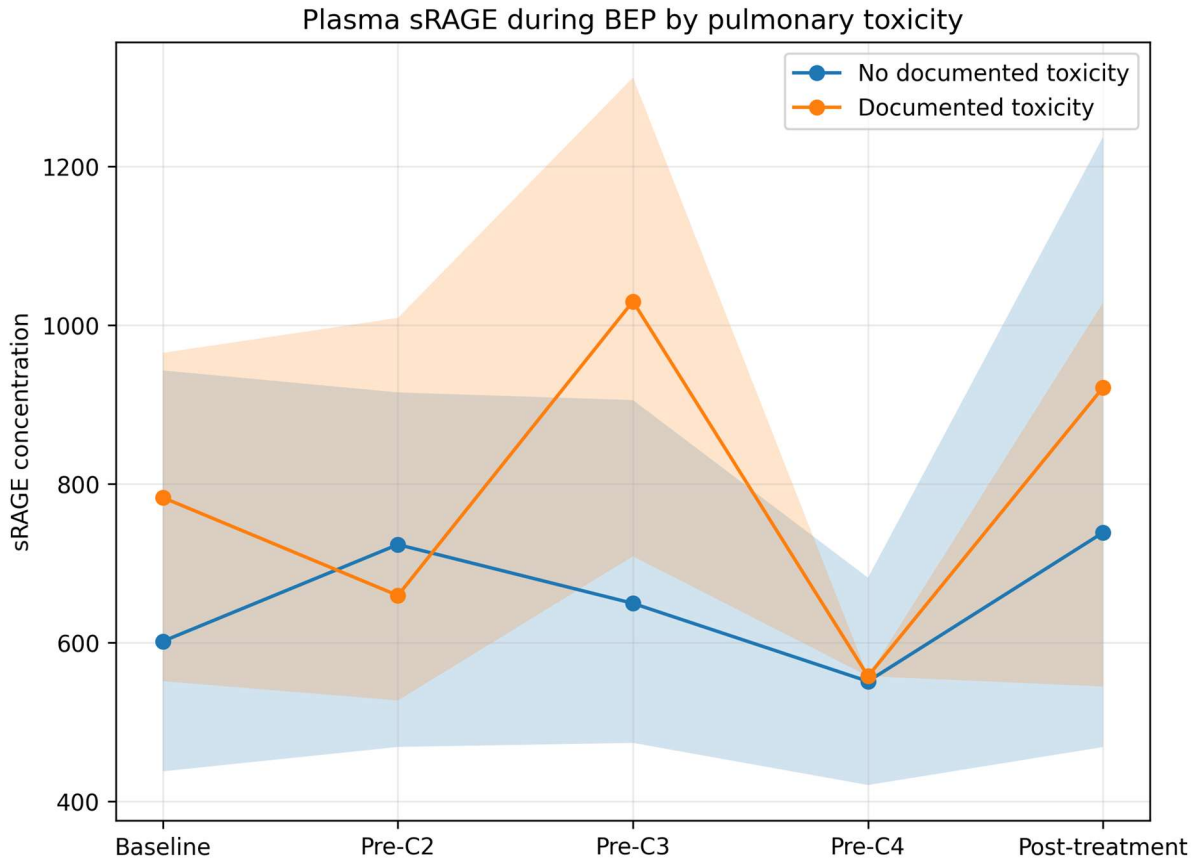
8. Obrázky a legendy



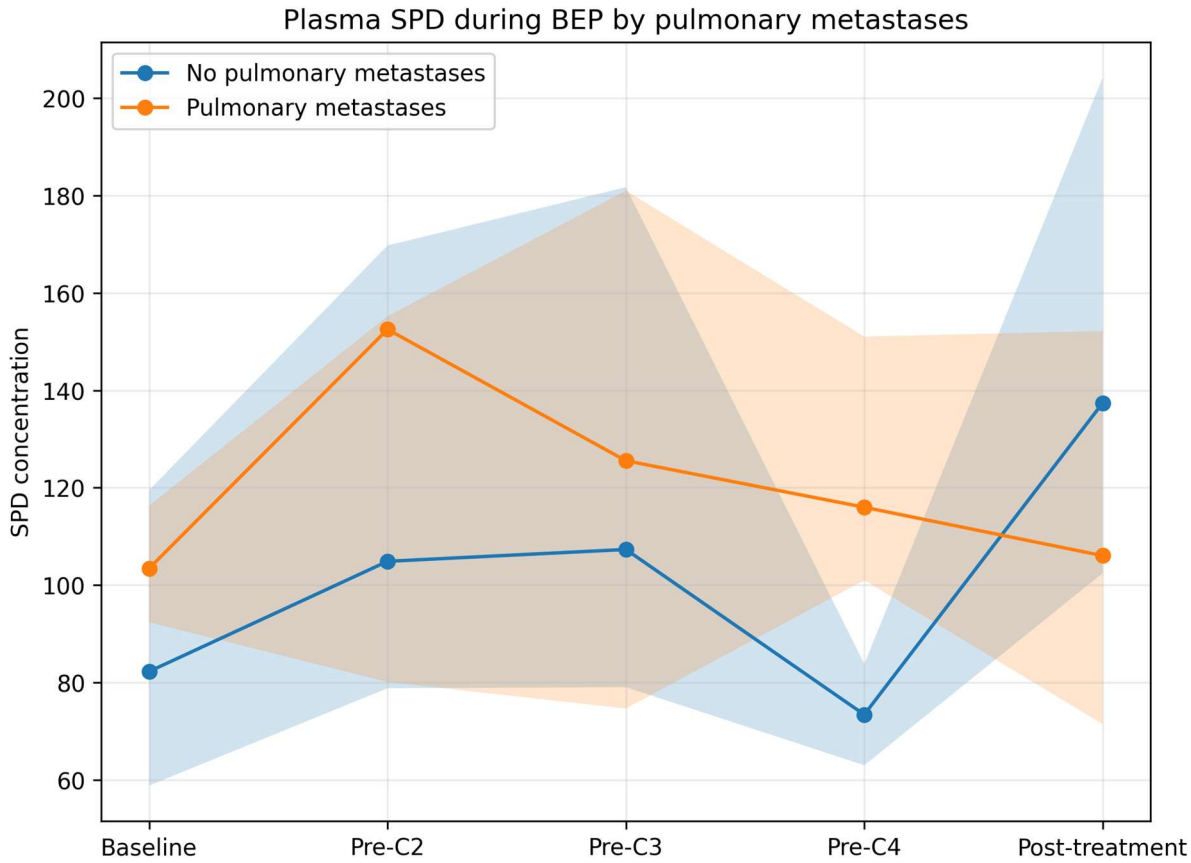
Obrázok 1. Študijná kohorta a dostupnosť plazmatických, močových, údajov o toxicite a párových medzikompartmentových údajov.



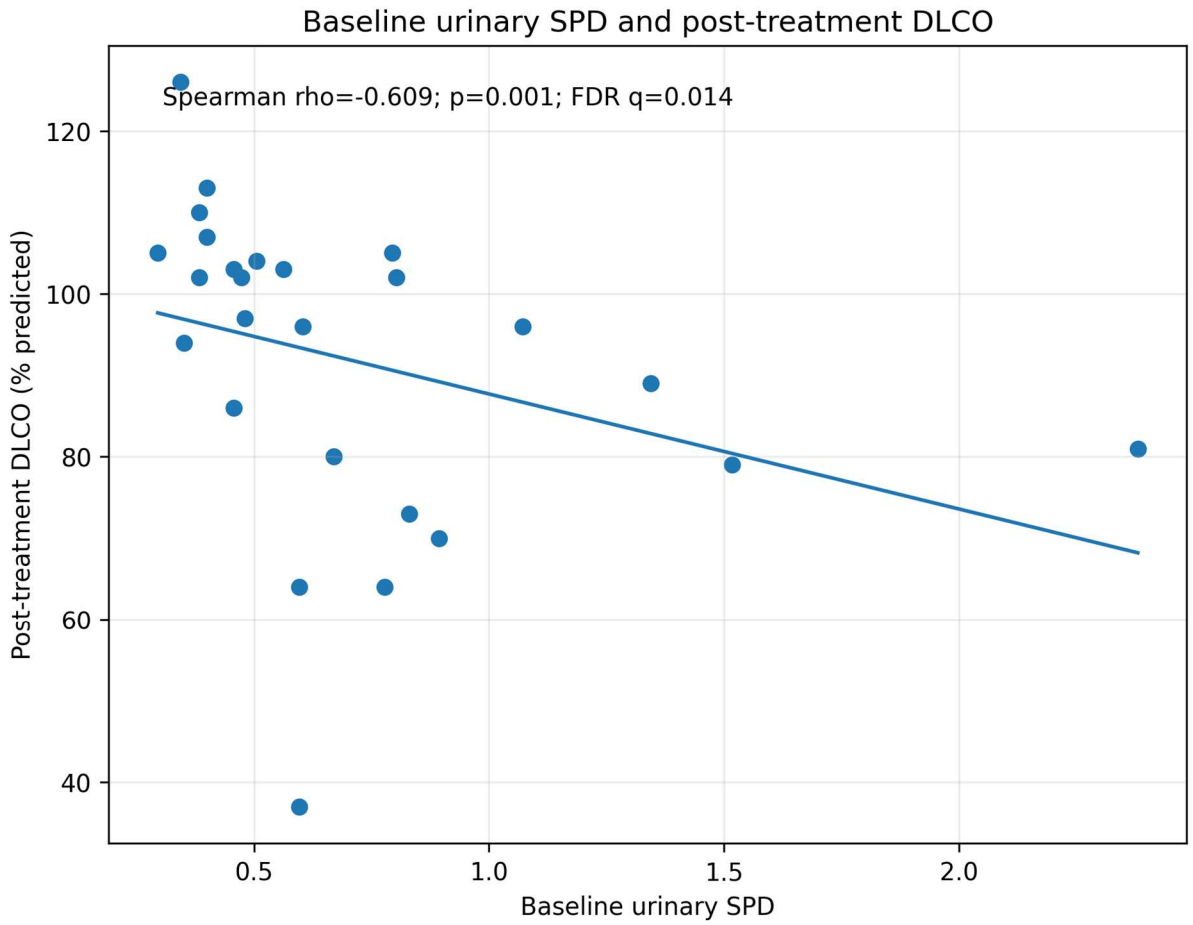
Obrázok 2. Medián hladiny SP-D v plazme počas BEP podľa dokumentovanej pľúcnej toxicity; tieňované oblasti zobrazujú interkvartilové rozpätia.



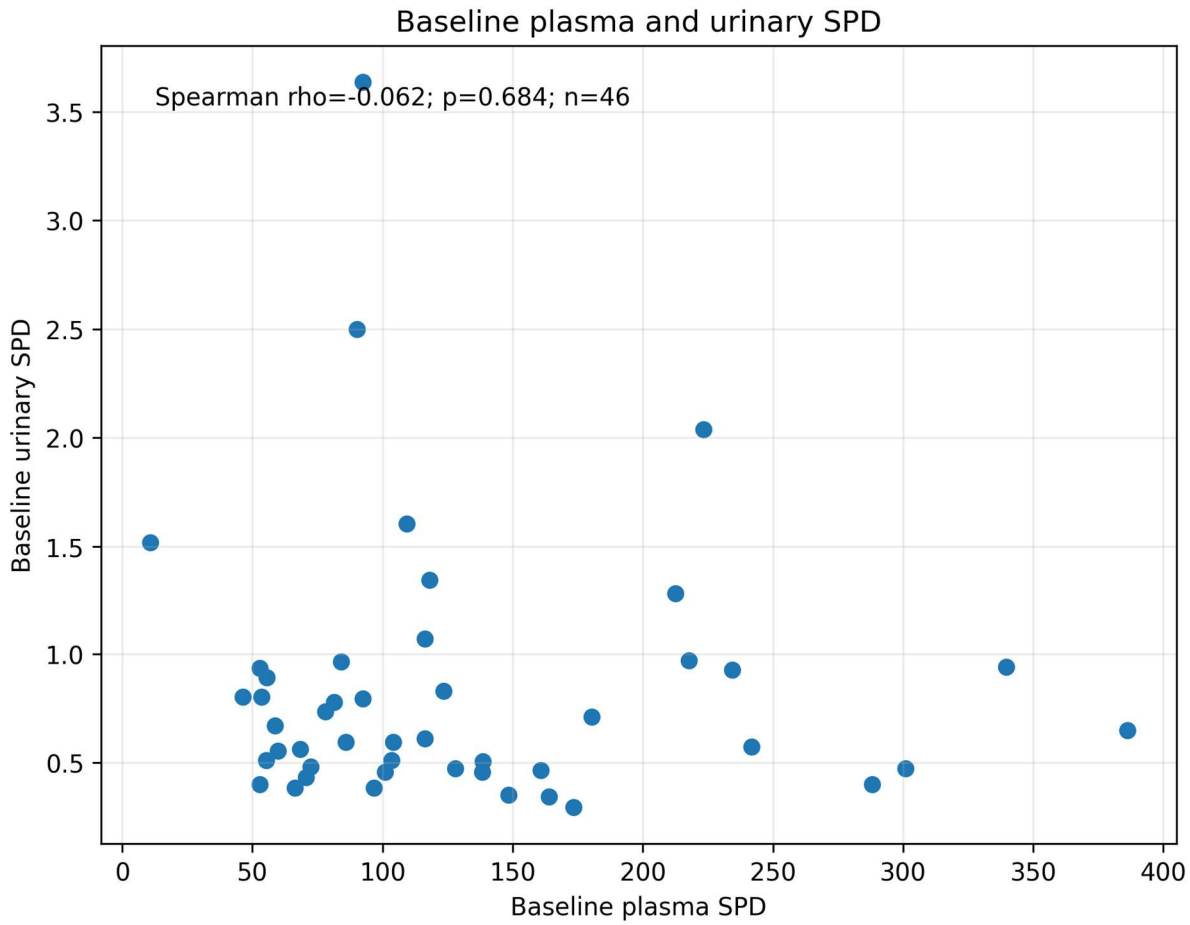
Obrázok 3. Medián hladiny sRAGE v plazme počas BEP podľa dokumentovanej pľúcnej toxicity; tieňované oblasti zobrazujú interkvartilové rozpätia.



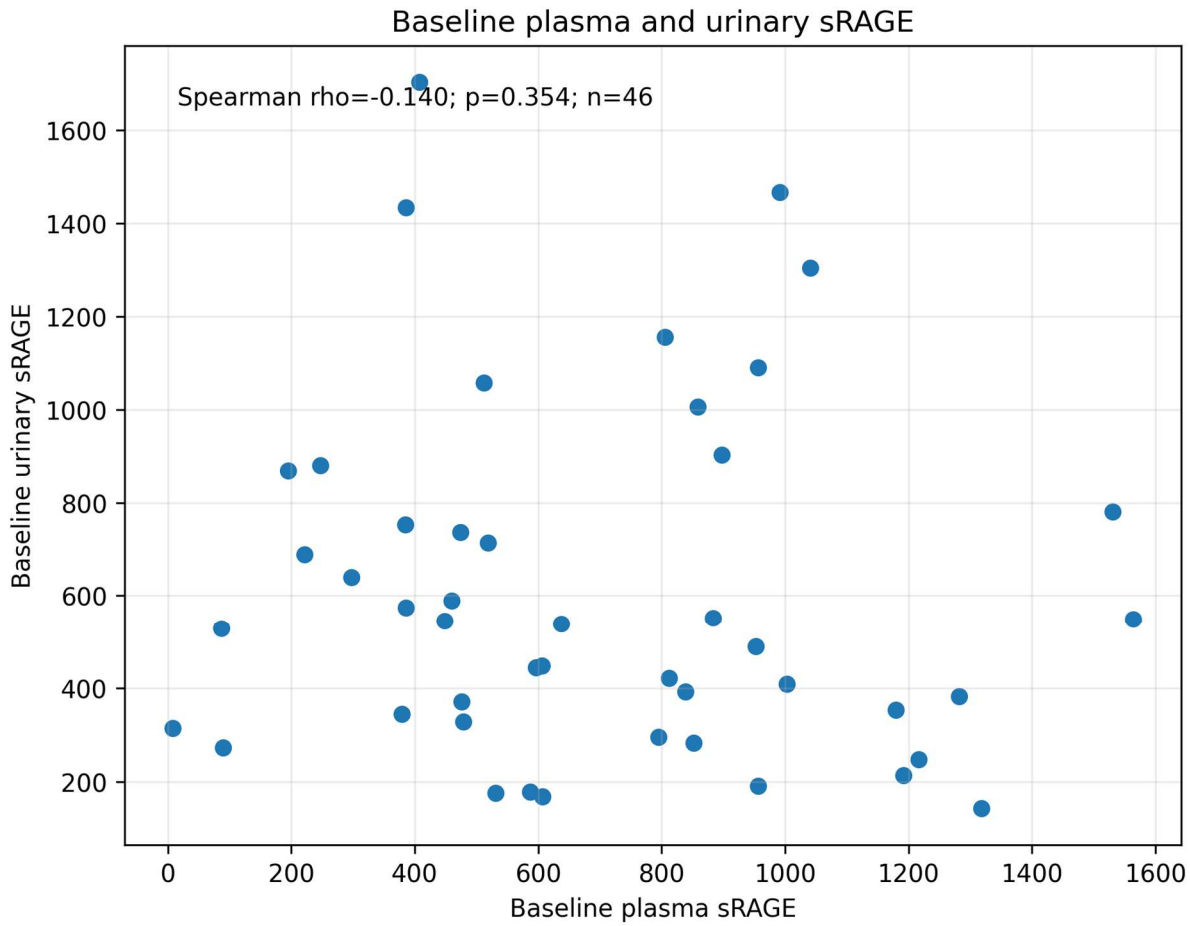
Obrázok 4. Medián hladiny SP-D v plazme počas BEP podľa prítomnosti pľúcnych metastáz. Interakcia čas × metastázy bola významná v neupravenom modeli (p=0,012) aj v upravenom modeli (p=0,027).



Obrázok 5. Vstupná hladina SP-D v moči a DLCO po liečbe (Spearmanovo rho=-0,609; p=0,001; FDR q=0,014).



Obrázok 6. Vstupné hladiny SP-D v plazme a moči; medzikompartmentová korelácia nebola pozorovaná.



Obrázok 7. Vstupné hladiny sRAGE v plazme a moči; medzikompartmentová korelácia nebola pozorovaná.

9. Literatúra

1. Lauritsen J, Kier MGG, Bandak M, et al. Pulmonary function in patients with germ cell cancer treated with bleomycin, etoposide, and cisplatin. J Clin Oncol. 2016;34(13):1492-1499. doi:10.1200/JCO.2015.64.8451.
2. Azambuja E, Fleck JF, Batista RG, Menna Barreto SS. Bleomycin lung toxicity: who are the patients with increased risk? Pulm Pharmacol Ther. 2005;18(5):363-366. doi:10.1016/j.pupt.2005.01.007.
3. O'Sullivan JM, Huddart RA, Norman AR, Nicholls J, Dearnaley DP, Horwich A. Predicting the risk of bleomycin lung toxicity in patients with germ-cell tumours. Ann Oncol. 2003;14(1):91-96. doi:10.1093/annonc/mdg020.
4. Murata M, Otsuka M, Ashida N, et al. Surfactant protein D is a useful biomarker for monitoring acute lung injury in rats. Exp Lung Res. 2016;42(6):314-321. doi:10.1080/01902148.2016.1215570.
5. Honda Y, Kuroki Y, Matsuura E, et al. Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. Am J Respir Crit Care Med. 1995;152(6 Pt 1):1860-1866. doi:10.1164/ajrccm.152.6.8520747.
6. Eisner MD, Parsons P, Matthay MA, Ware L, Greene K; Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. Thorax. 2003;58(11):983-988. doi:10.1136/thorax.58.11.983.
7. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM; Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). J Natl Cancer Inst. 2005;97(16):1180-1184. doi:10.1093/jnci/dji237.
8. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gotzsche PC, Vandenbroucke JP; STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. Lancet. 2007;370(9596):1453-1457. doi:10.1016/S0140-6736(07)61602-X.
9. Roncolato FT, Roder D, Strasser SI, et al. The effect of pulmonary function testing on bleomycin dosing in germ cell tumours. Intern Med J. 2016;46(8):939-944. doi:10.1111/imj.13158.
10. Jabaudon M, Blondonnet R, Pereira B, et al. Plasma sRAGE is independently associated with increased mortality in ARDS: a meta-analysis of individual patient data. Intensive Care Med. 2018;44(9):1388-1399. doi:10.1007/s00134-018-5327-1.
11. Jabaudon M, Blondonnet R, Roszyk L, et al. Soluble receptor for advanced glycation end-products predicts impaired alveolar fluid clearance in acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 2015;192(2):191-199. doi:10.1164/rccm.201501-0020OC.
12. Daffu G, del Pozo CH, O'Shea KM, Ananthakrishnan R, Ramasamy R, Schmidt AM. Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond. Int J Mol Sci. 2013;14(10):19891-19910. doi:10.3390/ijms141019891.
13. Chovanec M, Cierna Z, Miskovska V, et al. Systemic immune-inflammation index in germ-cell tumours: search for a biological prognostic biomarker. Br J Cancer. 2018;118(6):831-838. doi:10.1038/bjc.2017.460.
14. Rejlekova K, Kalavska K, Celec P, et al. Biomarkers of lung damage with possible predictiveness of ARDS within CS in super high-risk patients with germ cell tumors. J Clin Oncol. 2020;38(6_suppl):411. doi:10.1200/JCO.2020.38.6_suppl.411.
15. Reinert T, Baldotto CSR, Nunes FAP, Scheliga AAS. Bleomycin-induced lung injury. J Cancer Res. 2013;2013:480608. doi:10.1155/2013/480608.
16. Watson RA, De La Peña H, Tsakok MT, et al. Development of a best-practice clinical guideline for the use of bleomycin in the treatment of germ cell tumours in the UK. Br J Cancer. 2018;119(9):1044-1051. doi:10.1038/s41416-018-0300-x.
17. Oláh P, Celec P, Vlková B, Rejleková K. Toxicity of BEP Chemotherapy in Germ Cell Tumors: Focus on Immune-Mediated Bleomycin Pulmonary Toxicity in Comparison with EP and VIP Regimens.

Trénovaná imunita, pohlavný dimorfizmus a perzistencia NET pri myšom modeli sepsy

Emil Bečka, Letícia Hudecová, Michal Pastorek
Ústav molekulárnej biológie a biomedicíny LFUK
Prijaté na posúdenie: 22.6.2026, zverejnené: 23.7.2026

Abstrakt
Úvod: Sepsa je život ohrozujúca orgánová dysfunkcia spôsobená nesprávnou odpoveďou hostiteľa na infekciu. Neutrofilné extracelulárne pasce (NETs) a mitochondriálne molekulové vzory spojené s poškodením (mtDAMPs) zohrávajú kľúčovú úlohu v patogenéze sterilného a infekčného zápalu. Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať, či tréning vrodeného imunitného systému pomocou β-glukánu modifikuje tvorbu NET vyvolanú mtDAMP, či je táto odpoveď pohlavne dimorfná a či NET perzistujú v tkanivách aj po akútnej fáze sepsy. Metódy: Na myšom modeli sekálnej ligácie a punkcie (CLP) sme hodnotili vplyv β-glukánu na mieru tvorby NET (cfDNA, MPO–DNA, citH3), ex vivo reaktivitu neutrofilov na mitochondrie, hladiny circulating mtDNA a aktivitu plazmatickej DNázy po 24 a 72 hodinách u samcov a samíc. Výsledky: Tréning β-glukánom výrazne znížil časnú záťaž NET (24 h), pričom najvýraznejší efekt bol pozorovaný u samíc. Po 72 hodinách od indukcie CLP ostali markery NET a štruktúry v pľúcach a pečeni zvýšené najmä u netrénovaných samcov, zatiaľ čo u trénovaných samíc klesli takmer na úroveň kontrolnej skupiny. Vyššia perzistencia NET u samcov korelovala s nižšou aktivitou plazmatickej DNázy a pomalším vyčisťovaním (clearance) cirkulujúcej mtDNA. Záver: Výsledky naznačujú, že trénovaná imunita a pohlavie výrazne modifikujú dynamiku tvorby a odstraňovania NET pri sepse, pričom vyššia aktivita DNázy u samíc prispieva k rýchlejšej redukcii zápalového myšej záťaže.

Teoretický úvod
Sepsa predstavuje jeden z najzávažnejších medicínskych problémov súčasnosti, charakterizovaný nekontrolovanou imunitnou odpoveďou na infekciu, ktorá vedie k poškodeniu tkanív a zlyhaniu orgánov. V prvej línii imunitnej obrany zohrávajú kľúčovú úlohu neutrofily, ktoré okrem fagocytózy a degranulácie uvoľňujú do extracelulárneho priestoru sieťovité štruktúry zložené z DNA, histónov a granulárnych proteínov – tzv. neutrofilné extracelulárne pasce (NETs). Hoci sú NETs určené na zachytávanie a neutralizáciu patogénov, ich nadmerná tvorba alebo neefektívne odstraňovanie (clearance) prispieva k rozvoju mikrovaskulárnej trombózy, tkanivového poškodenia a persistentného sterilného zápalu.
Významným spúšťačom tvorby NETs sú mitochondriálne molekulové vzory spojené s poškodením (mtDAMPs), najmä cirkulujúca mitochondriálna DNA (mtDNA), ktoré sa uvoľňujú pri rozsiahlom bunkovom poškodení. Nedávne poznatky navyše ukazujú, že bunky vrodeného imunitného systému môžu prejsť procesom tzv. trénovanej imunity (trained immunity) – funkcionality charakterizovanej epigenetickým a metabolickým preprogramovaním po prvej expozícii imunomodulačným látkam, ako je napríklad β-glukán.
Okrem toho sa v klinickej aj experimentálnej sepse stále viac do popredia dostáva pohlavný dimorfizmus, kde samičí organizmus často vykazuje protektívnejší imunitný profil v porovnaní so samčím. Mechanizmy, ktorými trénovaná imunita a pohlavné rozdiely regulujú odpoveď na mtDAMPs a ovplyvňujú perzistenciu NETs v post-akútnej fáze sepsy, však zostávajú neúplne objasnené.

Predbežné výsledky
Vykonali sme prieskumnú (exploratívnu) analýzu na myšom modeli sekálnej ligácie a punkcie (CLP) ako doplnenie prehľadového článku „*Mitochondria as Inducers of Neutrophil Extracellular Traps*“, 2025. Keďže prehľad zdôrazňuje účinky mtDAMP závislé od koncentrácie a kontextu, konkrétne sme sa pýtali, či tréning vrodeného imunitného systému modifikuje tvorbu NET vyvolanú mtDAMP, či sa táto odpoveď líši medzi samcami a samicami myší a či NET perzistujú v cirkulácii a tkanivách aj po akútnej zápalovej fáze. Falošne operované (sham) a CLP myši boli randomizované do skupiny s vehikulom alebo s tréningom pomocou β-glukánu pred indukciou sepsy. Záťaž NET sa hodnotila pomocou plazmatickej bezbunčnej DNA (cfDNA), komplexov MPO–DNA, citrulínovaného histónu H3 (citH3), uvoľňovania NET *ex vivo* z neutrofilov kostnej drene a imunofluorescencie v pľúcach a pečeni. Cirkulujúca mitochondriálna DNA (mtDNA) a aktivita DNázy v plazme sa merali ako kandidátne modifikátory perzistencie NET.

Trénovaná imunita znižuje časnú záťaž NET spôsobom závislým od pohlavia
V tomto súbore údajov (n = 8–10 na skupinu) CLP vyvolala očakávaný nárast cfDNA, MPO–DNA a citH3 po 24 hodinách u oboch pohlaví. Samice trénované β-glukánom vykazovali najnižšiu záťaž NET po 24

hodinách, zatiaľ čo trénované samce vykazovali stredne veľké zníženie. Ilustratívne hodnoty boli: cfDNA 420 ± 85 ng/ml u samcov liečených vehikulom, 360 ± 70 ng/ml u trénovaných samcov, 250 ± 60 ng/ml u samíc liečených vehikulom a 180 ± 45 ng/ml u trénovaných samíc. Komplexy MPO–DNA nasledovali podobný vzorec. Uvoľňovanie NET *ex vivo* z neutrofilov kostnej drene stimulovaných izolovanými mitochondriami bolo nižšie u trénovaných samíc ako u trénovaných samcov, čo je v súlade s účinkom tréningu vrodeného imunitného systému na reaktivitu na mtDAMP závislým od pohlavia. Tieto rozdiely mali prieskumný charakter a po korekcii na viacnásobné porovnávanie neboli štatisticky významné pri všetkých sledovaných parametroch (endpoints).

Pohlavný dimorfizmus pri uvoľňovaní mtDNA a markerov NET
Cirkulujúca mtDNA sa po CLP zvýšila u oboch pohlaví, ale jej rozsah a kinetika sa líšili. Samce liečené vehikulom vykazovali po 24 a 72 hodinách vyšší počet kópií mtDNA ako samice. U trénovaných samíc sa hladiny mtDNA po 72 hodinách vrátili bližšie k východiskovej hodnote, zatiaľ čo u trénovaných samcov bol pokles pomalší. Aktivita plazmatickej DNázy bola po 72 hodinách vyššia u samíc ako u samcov a trénované samice vykazovali najvyššiu aktivitu DNázy zo všetkých skupín. Tieto predbežné pozorovania naznačujú, že pohlavie môže ovplyvňovať uvoľňovanie aj clearance (odstraňovanie) komplexov mtDAMP–NET, no štúdia nemala dostatočnú štatistickú silu na stanovenie definitívnych prahových hodnôt špecifických pre pohlavie.

NET perzistujú u samcov aj po akútnej fáze
Po 72 hodinách od CLP zostali reziduálne markery NET zvýšené u samcov liečených vehikulom, pričom v plazme bola detegovateľná MPO–DNA aj citH3 a v rezoch pľúc a pečene perzistovali štruktúry podobné NET. U trénovaných samíc boli markery NET po 72 hodinách výrazne znížené a u viacerých jedincov sa blížili k úrovniam kontrolnej (sham) skupiny. Ilustratívne hodnoty perzistencie pre MPO–DNA po 72 h boli 0,65 ± 0,18 AU u samcov liečených vehikulom, 0,48 ± 0,14 AU u trénovaných samcov, 0,31 ± 0,10 AU u samíc liečených vehikulom a 0,22 ± 0,08 AU u trénovaných samíc. Tieto údaje sú v súlade s dôrazom prehľadu na neefektívne odstraňovanie NET ako spúšťača pretrvávajúceho sterilného zápalu, vyžadujú si však potvrdenie vo väčších kohortách a s priamou kvantifikáciou proteínov spojených s NET.

mtDNA koreluje s zvyškovými štruktúrami NET a inverzne s aktivitou DNázy
Vo všetkých skupinách s CLP cirkulujúca mtDNA pozitívne korelovala s komplexmi MPO–DNA (ilustratívny Spearmanov koeficient $\rho = 0,62$) a citH3 ($\rho = 0,55$) a inverzne s aktivitou plazmatickej DNázy ($\rho = -0,41$). Tieto exploratívne korelácie naznačujú, že mtDNA môže slúžiť ako marker aj ako modifikátor perzistencie NET pri sepse. Z tejto analýzy však nemožno vyvodzovať príčinnú súvislosť.

Tabuľka 3: Exploratívne parametre v myšom CLP modeli sepsy

Parameter (Endpoint)	Samec (Vehikulum)	Samec (Trénovaný)	Samica (Vehikulum)	Samica (Trénovaná)
cfDNA po 24 h (ng/ml)	420 ± 85	360 ± 70	250 ± 60	180 ± 45
MPO–DNA po 24 h (AU)	0,82 ± 0,20	0,68 ± 0,17	0,52 ± 0,14	0,38 ± 0,11
citH3 po 24 h (AU)	0,75 ± 0,18	0,61 ± 0,15	0,46 ± 0,12	0,33 ± 0,09
Kópie mtDNA po 72 h	Vysoké	Stredné	Nízke až stredné	Blízko východiskovej hodnoty

Parameter (Endpoint)	Samec (Vehikulum)	Samec (Trénovaný)	Samica (Vehikulum)	Samica (Trénovaná)
Aktivita DNázy po 72 h	**Nízka**	**Stredná**	**Stredná**	**Najvyššia**
Perzistentné štruktúry podobné NET po 72 h	**Prítomné**	**Znížené**	**Znížené**	**Väčšinou neprítomné**

Štatistická a metodologická poznámka

Všetky analýzy mali exploratívny charakter. Skupiny sa porovnávali pomocou dvojcestnej ANOVA s pohlavím a tréningom ako faktormi, po ktorej nasledovala Tukeyho resp. Sidakova korekcia pre vybrané kontrasty. Premenné s nenormálnym rozdelením sa analyzovali pomocou Mann–Whitneyho U testu alebo Kruskal–Wallisovho testu. Korelácie sa hodnotili pomocou Spearmanovej rankovej korelácie. Údaje sú prezentované ako priemer ± SD alebo medián s IQR (medzikvartilovým rozpätím). Pre tieto analýzy sa neuskutočnil žiadny formálny výpočet veľkosti vzorky; preto by sa výsledky mali interpretovať ako výsledky generujúce hypotézy.

Záver

Táto exploratívna štúdia prináša predbežné dôkazy o tom, že modulácia vrodeného imunitného systému pomocou β-glukánu dokáže znížiť záťaž NET v akútnej aj post-akútnej fáze sepsy, pričom tento efekt podlieha výraznému pohlavnému dimorfizmu.

Kľúčové zistenia možno zhrnúť do nasledujúcich bodov:

1. Pohlavne podmienená protekcia: Samice vykazujú nižšiu časnú tvorbu NET a efektívnejšie odstraňovanie komplexov mtDAMP–NET v porovnaní so samcami.
2. Rola DNázy a clearance: Vyššia aktivita plazmatickej DNázy u samíc koreluje s rýchlejším poklesom cirkulujúcej mtDNA a znížením perzistencie štruktúr podobných NET v pľúcnom a pečeňovom tkanive po 72 hodinách.
3. Trénovaná imunita: Aplikácia β-glukánu úspešne redukuje ex vivo reaktivitu neutrofilov na mitochondriálne stimulátory, čo vedie k miernejšej systémovej zápalovej odpovedi.

Aj keď sú zistené korelácie prísľubné pre pochopenie patofyziológie sepsy a potenciálneho využitia imunomodulácie, výsledky majú zatiaľ hypotézy-generujúci charakter. Na potvrdenie príčinnej súvislosti a presných mechanizmov bude potrebný ďalší výskum na väčších kohortách s priamou kvantifikáciou proteínov spojených s NET.

Poďakovanie

Táto práca bola financovaná zo zdrojov Európskej únie NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti Slovenskej republiky v rámci projektu č. **09I01-03-V04-00079.**