UNIVERZITA KOMENSKÉHO
LEKÁRSKA FAKULTA V BRATISLAVE

ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC

51. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI
VII. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV LF UK



UNIVERZITA KOMENSKÉHO
LEKÁRSKA FAKULTA V BRATISLAVE

51. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI

VII. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV LF UK

ZBORNÍK PRÁC

BRATISLAVA
19. APRÍL 2012

Editor: Pavol Janega

Za obsahovú a jazykovú správnosť príspevkov zodpovedajú autori.

Výroba CD Tribun EU s.r.o., Gorkého 41, 602 00 Brno
© Univerzita Komenského v Bratislave

ISBN 978-80-223-3286-6

2012

PROGRAM KONFERENCIE

ÚVODNÉ PREDNÁŠKY

Jan Amos Komenský a Johann Christian Doppler a ich odkaz pre súčasnosť
prof. MUDr. Viera Štvrtinová, CSc., II.interná klinika LFUK a ÚNB

Od Christiana Dopplera k rádiofrekvenčnej ablácii
MUDr.František Žernovický, Klinika cievnej chirurgie NÚSCH

PROGRAM 51. FAKULTNEJ KONFERENCIE ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI

PREDKLINICKÁ A TEORETICKÁ SEKCIA

predseda: **doc. MUDr. Katarína Šebeková, DrSc.**
členovia: **doc. Ing. Ingrid Žitňanová, PhD.**
MUDr. Rastislav Važan, PhD.

1. Variácie remodelácie aorty v závislosti od typu experimentálnej hypertenzie: NG-nitro-L-arginínmetylesterom-, kontinuálnym osvetlením-indukovaná hypertenzia
Lenka Šlapáková, Tomáš Baka
Ústav patologickej fyziológie LF UK
Školitelia: prof. MUDr. Fedor Šimko, CSc.; MUDr. Kristína Repová; MUDr. Mgr. Jaroslav Hrenák; Mgr. Silvia Aziriová

2. Effect of aminoguanidine derivative RAG on different carcinoma cell line
Georgios A. Perdikaris
Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry
Školiteľ: Ing. Katarína Koňariková

3. Vplyv testosterónu na atraktivitu a na hodnotenie atraktivity u opačného pohlavia
Nina Koštová
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK
Školitelia:: MUDr. Mgr. Július Hodosy, PhD.; RNDr. Roman Gardlík, PhD

4. Glutathione and glutathione detoxification system in the liver of animals with streptozotocin induced diabetes
Chatzakis Christos
Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry
Školitelia: doc. RNDr. Eva Uhlíková, PhD.; doc. MUDr. Viera Rendeková, CSc.

5. Cellular and biochemical aspects of ageing human brain
Xylas Christos
Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry
Školitelia: MUDr. Katarina Hrubišková; doc. MUDr. Viera Rendekova,CSc.; doc. RNDr. Eva Uhlíková,CSc.

6. Experimentálna zraňujúca balistika: analýza zraňujúceho potenciálu odrazených projektilov
Viktor Rekeň
Ústav súdneho lekárstva LFUK
Školiteľ: MUDr. Norbert Moravanský, PhD.
Školiteľ - špecialista : doc. Ing. Ludvík Juříček, PhD. (Ústav bezpečnosti Vysokej školy Karla Engliše v Brne, Česká rep.)

KLINICKÁ SEKCIA

predseda: **doc. MUDr. Ľudovít Gašpar, CSc.**
členovia: **doc. MUDr. Martin Wawruch, PhD.**
MUDr. Svetoslav Štvrtina, PhD.

7. Orálna mikroflóra a slivárne markery pri stomatologických ochoreniach
Helena Fábryová
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK
Školiteľ: RNDr. Ľubomíra Tóthová, PhD.

8. Hodnoty krvného tlaku vo vzťahu k vitamínu D
Katarína Krivošíková
II. interná klinika LFUK a UNB
Školitelia: prof. MUDr. Viera Štvrtinová, CSc.; doc. MUDr. Martin Gajdoš, PhD.

9. Úloha oxidačného a nitračného stresu v patogenéze sclerosis multiplex
Štefan Lukáč
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK; I. neurologická klinika LF UK a UNB
Školitelia: doc. RNDr. Jana Muchová,PhD.; RNDr. Terézia Kalnovičová, CSc.

10. Analýza užívania nesteroidových antiflogistík a hodnotenie percepcie ich rizika
Katarína Mészárosová
Ústav farmakológie a klinickej farmakológie LF UK
Školiteľ: MUDr. Zoltán Varga

11. Vákuová terapia pri liečení rán
Martin Bibza
Klinika popálenín a rekonštrukčnej chirurgie LFUK a UNB
Školiteľ: doc. MUDr. Ján Koller, CSc

12. Účinok ubichinolu na psychologické prejavy, oxidačný stres a antioxidanty u detí s autizmom (predbežné pilotné výsledky).
Dalibor Nakládal
Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky LF UK
Školiteľ: prof. RNDr. Anna Gvozdjáková, DrSc.

13. Correlation between laboratory findings in patients with liver cirrhosis and final histopathological diagnosis
Giorgos Siskos, Joana Gomes
Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB
Školiteľ: MUDr. Pavol Janega, PhD.

ANATOMICKÁ SEKCIA

predseda: **doc. MUDr. Eliška Kubíková, PhD.**
členovia: **MUDr. Dalibor Hojsík, PhD.**
MUDr. Vladimír Šišovský, PhD.

14. Phrenic nerve as a branch of the cervical plexus
Michail Gerolaimou
Institute of Anatomy
Školitelia: MUDr Petra Šelmeciová, PhD.; MUDr Hisham El Falougy, PhD.

15. Anatomical preparation of the knee joint
Alexandra-Maria Koui
Institute of Anatomy
Školitelia: MUDr Petra Šelmeciová, PhD.; MUDr Hisham El Falougy, PhD.

16. Anatomy and Clinical Importance of the Axillary Fossa
Grigoriadou Georgia, Colson Brian Patrick
Institute of Anatomy
Školitelia: MUDr Hisham El Falougy. PhD.; MUDr. Petra Šelmeciová, PhD.

17. Posterior Mediastinum and its Clinical Importance
Efthychia-Maria Kontouri
Institute of Anatomy
Školitelia: MUDr. Hisham El Falougy, PhD.; MUDr. Petra Šelmeciová, PhD.

18. The macroscopical relations of the main pathways
Konstantinos Savvas, Christos Vazaios
Institute of Anatomy
Školitelia: MUDr. Hisham El Falougy, PhD.; MUDr. Petra Šelmeciová, PhD.; MUDr. Jana Šteňová

19. Superficial Veins of the lower limb and their impact in clinical medicine
Makris Evangelos-Michail
Institute of Anatomy
Školitelia: MUDr Petra Šelmeciová, PhD.; MUDr Hisham El Falougy, PhD.

20. Anatomy and Clinical Importance of the Anterior Thigh Region
Stavrou Effrosyni s
Institute of Anatomy
Školitelia: MUDr Petra Šelmeciová, PhD; MUDr Hisham El Falougy, PhD.

21. Anatomical preparation of the carpal region
Theodoros Zoulakis
Institute of Anatomy
Školitelia: MUDr. Hisham El Falougy, PhD.; MUDr. Petra Šelmeciová, PhD.

PROGRAM VII. VEDECKEJ KONFERENCIE DOKTORANDOV LF UK

PREDKLINICKÁ A ONKOLOGICKÁ SEKCIA

predseda: **prof. MUDr. Dalibor Ondruš, DrSc.**
členovia: **doc. MUDr. Helena Hupková, PhD**
RNDr. Ladislav Guller, CSc.
RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

22. Vplyv autonómneho nervového systému a jeho neurotransmiterov na in vivo a in vitro proliferáciu fibrosarkómu u potkanov.
Mgr. Lucia Bánovská
Ústav patologickej fyziológie LF UK
Školiteľ: doc. MUDr. Boris Mravec, PhD.

23. Vplyv radiačného žiarenia na tkanivá určené na transplantáciu
MUDr. Hedviga Mrázová
Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB; Klinika popálenín a rekonštrukčnej chirurgie LF UK a UNB
Školiteľ: prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.

24. TREM-1 a TREM-2 receptor v imunopatogenéze a diferenciálnej diagnostike pľúcnej sarkoidózy
MUDr. Magda Suchánková
Imunologický ústav LF UK
Školiteľ: doc. MUDr. Mária Bucová, CSc

25. Molekulový mechanizmus účinku meďnatého komplexu na bunkovú líniu ľudského nádoru hrubého čreva
Ing. Katarína Koňariková
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK
Školiteľ: doc. Ing. Ingrid Žitňanová PhD.

26. Hodnotenie lokálneho "bystander" efektu génovej terapie na ľudské nádorové bunky medulárneho karcinómu štítnej žľazy in vivo
Mgr. Lucia Feketeová
Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB; Laboratórium molekulárnej onkológie, Ústav experimentálnej onkológie, SAV
Školiteľ: prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.

27. Impact of molecular genetics on prognosis of optic glioma in NF1 patients
MUDr. Anna Rybárová
2nd Department of Pediatrics Comenius University Medical School and Children's University Hospital; Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University; Department of Cancer Genetics, National Cancer Institute; Laboratory of Genetics, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Bratislava
Školitelia: RNDr. Andrea Zaťková PhD; doc. MUDr. Denisa Ilenčíková PhD.; prof. MUDr. László Kovács, DrSc., MPH;
prof. RNDr. Ludevit Kádasi, CSc.

28. Súdnolekárske apekty pádu/skoku z výšky vo vzťahu k požitiu psychoaktívnych látok.
MUDr. Martin Zdarilek
Ústav súdneho lekárstva LFUK
Školiteľ: doc. MUDr. Jozef Šidlo, CSc.

29. Analýza DNA ploidie laserovou skenovacou cytometriou a expresia HER2 a hormonálnych receptorov v karcinóme prsníka
RNDr. Miroslava Vallová
Ústav patológie Slovenskej zdravotníckej univerzity a Onkologického ústavu sv. Alžbety, Bratislava
Školiteľ: prof. MUDr. Štefan Galbavý, DrSc.

30. Expresia proteínu poly(ADP-ribóza)polymerázy-1 v testikulárnych nádoroch zo zárodočných buniek.
MUDr. Zuzana Čierna
Ústav patologickej anatómie LFUK a UNB; II. onkologická klinika LF UK; Jednotka translačného výskumu LF UK; Onkologický ústav sv.Alžbety, Bratislav; Národný onkologický ústav, Bratislava
Školiteľ: prof. MUDr. Pavel Babál, PhD.

31. Fragmentácia DNA a jej vplyv na meranie koncentrácie DNA bežne používanými metódami
Mgr. Tatiana Sedláčková
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK
Školiteľ: RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

32. Biologické koreláty schopnosti mentálnej rotácie u intelektovo nadaných chlapcov
Mgr. Jaroslava Durdiaková
Fyziologický ústav LF UK
Školiteľ: doc. MUDr. Daniela Ostatníková, PhD.

33. Výber optimálnej metódy izolácie voľnej cirkulujúcej fetálnej DNA z plazmy tehotných žien
Mgr. Gabriela Repiská
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK
Školiteľ: RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

34. Lipidový profil, glykačný a oxidačný stres u pacientov s diabetes mellitus 2. typu s a bez diabetických komplikácií
Mgr. Erika Šándorová
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK
Školiteľ: doc. PharmDr. Vladimír Jakuš, CSc.

35. Účinnosť topickej terapie na multirezistentné bakteriálne kmene izolované z popáleninových rán pacientov
MUDr. Marianna Hajská
Klinika popálenín a rekonštrukčnej chirurgie LFUK a UNB
Školiteľ: doc. MUDr. Ján Koller, PhD.

KLINICKÁ SEKCIA

predseda: **doc. MUDr. Peter Valkovič, PhD.**
členovia: **doc. MUDr. Ľudovít Lukáč, PhD.**
doc. MUDr. Boris Mravec, PhD.
MUDr. Jarmila Jánošiová, PhD.

36. Zmeny zakrivenia rohovky navodené superotemporálnym, superonazálnym rohovkovým rezom po operácii katarakty.
MUDr. Bratislav Trnavec
Katedra oftalmológie LF SZU a UNB; Katedra optiky a optometrie PřF UP Olomouc
Školiteľ: prof. MUDr. Andrej Černák, DrSc.

37. Význam 99mTc-MIBI planárnej scintigrafie s pinhole kolimátorom pri predoperačnej lokalizačnej diagnostike hyperfunkčných prištítnych teliesok v ére SPECT/CT.
MUDr. Lucia Kaliska, FEBNM
INMM pracovisko Banská Bystrica, PET centrum Agel Diagnostic, Banská Bystrica,SR; Poliklinika Sekčov, Pracovisko nukleárnej medicíny, Wesper sro., Prešov, SR; Klinikum Kassel, Nuklearmedizin, Kassel, Nemecko; II.Chirurgická klinika SZU, FNsP FDR, Banská Bystrica, SR; ONM I.Internej kliniky UNB a LFUK, Nemocnica Staré mesto; Service de médecine nucléaire, Hôpital Tenon AP HP & Université Pierre et Marie Curie, Paris, Francúzsko
Školiteľ: doc. MUDr. Soňa Balogová, PhD.

38. Dlhodobá prognóza pacientov po prekonaní akútneho infarktu myokardu v rokoch 2006-2007
MUDr. Marcela Danková
IV. interná klinika LFUK a UNB
Školiteľ: prof. MUDr. Peter Ponťuch, CSc.

39. Neuroendoskopia v liečbe posthemoragického, postinfekčného a kongenitálneho hydrocefalu
MUDr. Dana Dúbravová
Klinika detskej chirurgie DFNsP a LFUK Bratislava
Školiteľ: doc. MUDr.Ján Trnka, CSc

40. Úloha dekompresívnej kraniektómie v liečbe expanzívneho hemisferiálneho infarktu mozgu
MUDr. Robert Chrenko
Neurochirurgické oddelenie, Landesklinikum, Wiener Neustadt, Rakúsko
Školiteľ: prof. MUDr. Juraj Šteňo, CSc.

41. Predbežné výsledky sledovania neuroendokrinných zmien u kriticky chorých pacientov.
MUDr. Andrea Gálusová
Klinika anestéziológie a intenzívnej medicíny SZU, Nemocnica akad. L.Dérera; Ústav experimentálnej endokrinológie SAV
Školiteľ: MUDr. Adela Penesová, PhD.

42. Therapeutický efekt rádiosynoviortézy
MUDr. Marika Vereb, FEBNM
Klinikum Kassel, Nuklearmedizin, Kassel, Nemecko; Poliklinika Sekčov, Pracovisko nukleárnej medicíny, Wesper sro., Prešov, SR; INMM, Pracovisko Banská Bystrica, PET CT Agel Diagnostic, SR; ONM I.Internej kliniky LF UK a UNB; Service de médecine nucléaire, Hôpital Tenon AP HP & Université Pierre et Marie Curie, Paris, Francúzsko
Školiteľ: doc. MUDr. Soňa Balogová, PhD.

43. Neuroendokrinné mechanizmy u začínajúceho kardiometabolického syndrómu
MUDr. Alexandra Garafová
Ústav normálnej a patologickej fyziológie SAV, Ústav experimentálnej endokrinológie SAV
Školiteľ: MUDr. Adela Penesová, PhD.

44. Vplyv dennej aeróbnej fyzickej aktivity na koncentrácie podtried lipoproteínov vysokej, intermediárnej a nízkej denzity stanovených metódou elektrogorézy v polyakrylamidovom géle
MUDr. Peter Sabaka
II. interná klinika LF UK a INB
Školitelia: doc. MUDr. Stanislav Oravec CSc., prof. MUDr. Andrej Dukát, CSc. FRCP

45. Asociácia medzi kalcifikátmi brušnej aorty a vybranými parametrami kostného metabolizmu u pacientov s osteoporózou
MUDr. Štefan Balogh
V. interná klinika LFUK a UNB
Školiteľ: doc. MUDr. Zdenko Killinger, PhD.

46. Jednoduché antropometrické indexy potenciálne využiteľné pri diagnostike celkovej a abdominálnej obezity u mladistvých
Mgr. Radana Kollárová
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK
Školiteľ: doc. MUDr. Katarína Šebeková, DrSc.

47. Stanovenie koncentrácie folátov v erytrocytoch a ich využitie v liečbe anémie u predčasne narodených
novorodencov
MUDr. Tatiana Žikavská
I. detská klinika LFUK a DFNsP Bratislava; I. gynekologicko-pôrodnícka klinika UNB akademika L. Dérera Bratislava
Školiteľ: doc. MUDr. Ingrid Brucknerová, PhD.

48. Transplantácia amnionovej membrány – naše skúsenosti
MUDr. Marek Horňák
Očná klinika LF UPJŠ, Klinika oftalmológie LF UK a UNB
Školiteľ: doc. MUDr. Marián Potocký, PhD.

51. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI

PREDKLINICKÁ A TEORETICKÁ SEKCIA

Hodnotiaca komisia

predseda: **doc. MUDr. Katarína Šebeková, DrSc.**
členovia: **doc. Ing. Ingrid Žitňanová, PhD.**
MUDr. Rastislav Važan, PhD.

1. miesto
Viktor Rekeň
Experimentálna zraňujúca balistika: analýza zraňujúceho potenciálu odrazených projektilov.

2. miesto
Lenka Šlapáková, Tomáš Baka
Variácie remodelácie aorty v závislosti od typu experimentálnej hypertenzie: NG-nitro-L-arginínmetylesterom-, kontinuálnym osvetlením- indukovaná hypertenzia.

3. miesto
Georgios A. Perdikaris
Effect of aminoguanidine derivative RAG on different carcinoma cell line.
Nina Koštová
Vplyv testosterónu na atraktivitu a na hodnotenie atraktivity u opačného pohlavia.

1. Variácie remodelácie aorty v závislosti od typu experimentálnej hypertenzie: NG-nitro-L-arginínmetylesterom a kontinuálnym osvetlením indukovaná hypertenzia

Lenka Šlapáková, Tomáš Baka
(všeobecné lekárstvo, 3. ročník; všeobecné lekárstvo, 4. ročník)

Školiteľ: prof. MUDr. Fedor Šimko, CSc.
Školiteľ-špecialista: MUDr. Kristína Repová, MUDr. Mgr. Jaroslav Hrenák, Mgr. Silvia Aziriová
Ústav patologickej fyziológie, LF UK

Úvod

Hypertrofia ľavej komory, ktorá vzniká ako odpoveď na chronické hemodynamické preťaženie, má za cieľ zvýšiť výkon srdca bez zvýšenia tenzie v stene ľavej komory. Tenzia je totiž jedným z hlavných faktorov, ktorým sa devastujú energetické zásoby myokardu. Na druhej strane, hypertrofované tkanivo je štrukturálne zmenené a hypertrofia sa preto považuje za samostatný rizikový faktor kardiovaskulárnych udalostí.

Hypertrofický rast a remodelácia sú deje, ktoré sú charakteristické nielen pre srdce, ale aj pre cievny systém. Laplaceov zákon hovorí, že tenzia je priamo úmerná vnútrocievnemu tlaku a polomeru cievy a nepriamo úmerná dvojnásobku hrúbky steny cievy. Pri vzniku hypertenzie sa zvyšuje vnútrocievny tlak a tým aj tenzia v stene. Normalizácia stenovej tenzie sa dá dosiahnuť zmenšením priemeru cievy, zhrubnutím cievy alebo oboma zásahmi (1). Typy remodelácie ciev sa delia do niekoľkých skupín v závislosti od priemeru cievy a plochy priečneho rezu. Remodelácia, ktorá prebieha smerom dovnútra alebo smerom von, môže byť podľa tejto klasifikácie hypertrofická, eutrofická alebo hypotropická (Obr. 3). Jednotlivé typy remodelácie sa dávajú do súvislosti s určitým typom neurohormonálnej aktivácie (2,3).

Remodelovaná cievna stena je okrem alterácie morfometrických parametrov charakterizovaná aj zmenami v kvantite a kvalite intravaskulárnej fibrózy. Z hľadiska neurohormonálnej aktivácie vo všeobecnosti platí, že proti sebe stoja dve skupiny rozlične pôsobiacich humorálnych látok: na jednej strane sú to angiotenzín II, katecholamíny, endotelín a aldosterón, ktoré majú vazokonstrikčné a proliferatívne účinky a na druhej strane oxid dusnatý (NO), prostacyklín alebo atriálny nátriuretický peptid, ktoré majú vazodilatačné a antiproliferatívne vlastnosti (4). Relatívna dominancia jednej z týchto dvoch skupín determinuje stupeň a kvalitu remodelácie.

Metodika

Dospelé samce potkanov kmeňa Wistar sme rozdelili do 3 skupín (n=11): kontrola (K), liečené NG-nitro-L-arginínmetylesterom (40 mg/kg/deň) (L-NAME) a potkany vystavené kontinuálnemu 24-hodinovému osvetleniu (24h). L-NAME bolo rozpustené v pitnej vode, pričom pre zachovanie správneho dávkovania bola jeho koncentrácia upravovaná vzhľadom k aktuálnej spotrebe vody. Všetky potkany mali neobmedzený prístup k potrave a skupiny K a 24h aj k pitnej vode. Zvieratám sme v pravidelných intervaloch neinvazívne merali systolický tlak krvi (STK).

Po 6 týždňoch trvania experimentu sme potkany usmrtili. Zvážili sme hmotnosť ľavej komory (ĽK) srdca a vypočítali jeho relatívnu hmotnosť (ako pomer k hmotnosti potkana). Zároveň sme odobrali vzorky aorty pre histologické vyšetrenie, ktoré sme fixovali v 4% roztoku formaldehydu, zaliali do parafínu a narezali na 5 μm rezy.

Morfometrické vyšetrenie aorty

Pre morfometrické vyšetrenie sme tkanivové rezy ofarbili hematoxylínom a eozínom. Použitím svetelnej mikroskopie a softvéru ImageJ (National Institut of Health, USA) sme zmerali hrúbku intimy+médie aorty v µm (WT), vnútorný obvod aorty v mm a vypočítali sme vnútorný priemer v mm (ID) a plochu priečneho rezu aorty v mm^2 (CSA) (5).

Histologické stanovenie kolagénov v aorte

Tkanivové rezy aorty sme ofarbili pikrosíriusovou červenou. Použitím polarizovanej mikroskopie a softvéru ImageJ sme stanovili percentuálne zastúpenie kolagénov typu I (hrubšie vlákna, červená a žltá farba) a III (tenšie vlákna, zelená farba) v analyzovanom výseku médie aorty (6).

Štatistická analýza

Výsledky sme vyjadrili ako priemer±štandardná chyba priemeru. Rozdiely sme považovali za signifikantné, ak $p<0,05$. Na štatistické hodnotenie boli použité ANOVA a Bonferroni test.

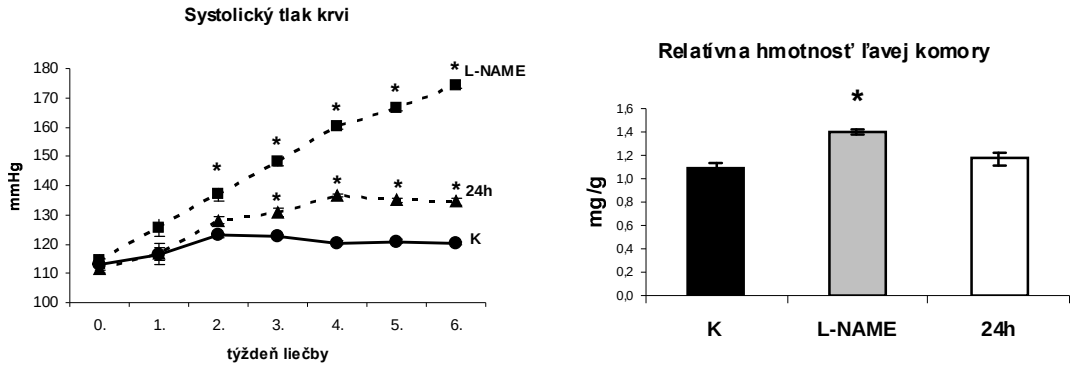
Výsledky

Po 6 týždňoch bol STK u kontrol 120±0,5 mmHg. STK stúpol signifikantne ($p < 0,05$) po podávaní L-NAME (45%) aj vystavení 24-hodinovému osvetleniu (12%). Relatívna hmotnosť ĽK u kontrol bola 1,1±0,04 mg/g, L-NAME ju signifikantne zvýšilo o 27% ($p < 0,05$), pričom 24h osvetlenie nemalo vplyv na hypertrofiu ĽK (Obr. 1).

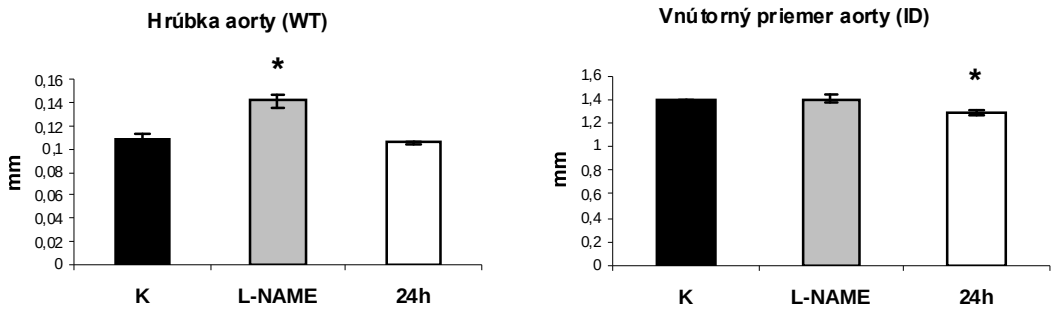
U kontrol sme pri morfometrickom vyšetrení namerali nasledovné parametre: WT 0,1±0,004 mm, ID 1,4±0,01 mm, CSA 0,49±0,02 mm^2 a pomer WT/ID 0,08±0,003. L-NAME signifikantne zvýšilo WT o 24%, CSA o 47% a pomer WT/ID o 37% ($p < 0,05$). 24-hodinové osvetlenie znížilo signifikantne iba ID o 7% ($p < 0,05$) (Obr. 1).

Zastúpenie kolagénu I v aorte u kontrol bolo 0,26±0,06% a kolagénu III 0,02±0,01%. Kontinuálne osvetlenie výrazne znížilo ($p < 0,05$) zastúpenie kolagénu I (85%) aj III (84%) vo vyšetrovanom výseku aorty (Obr. 1,2).

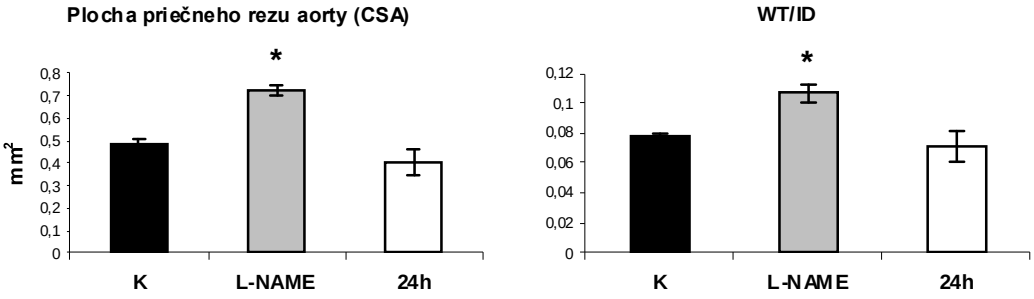
a b



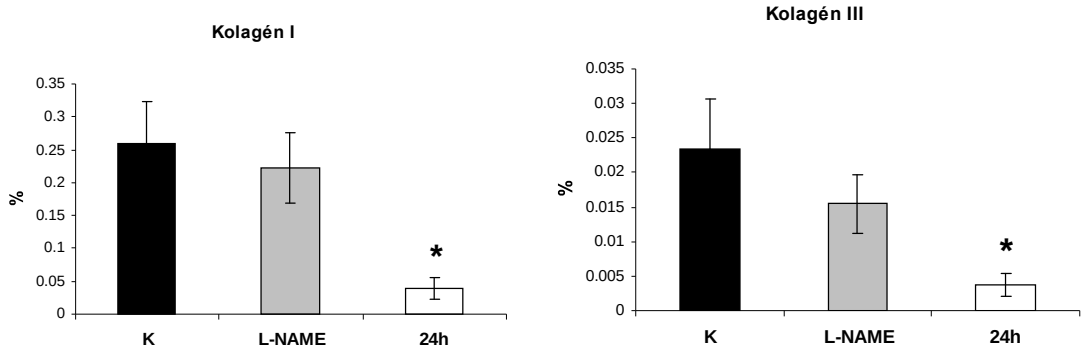
c d



e f

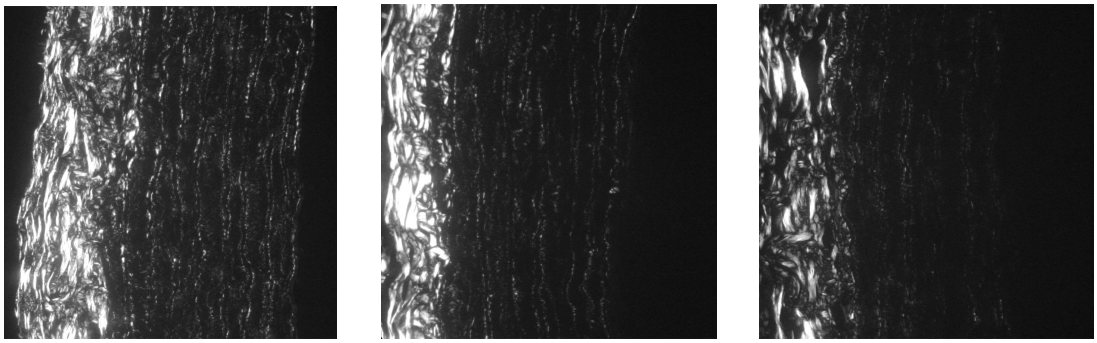


g h

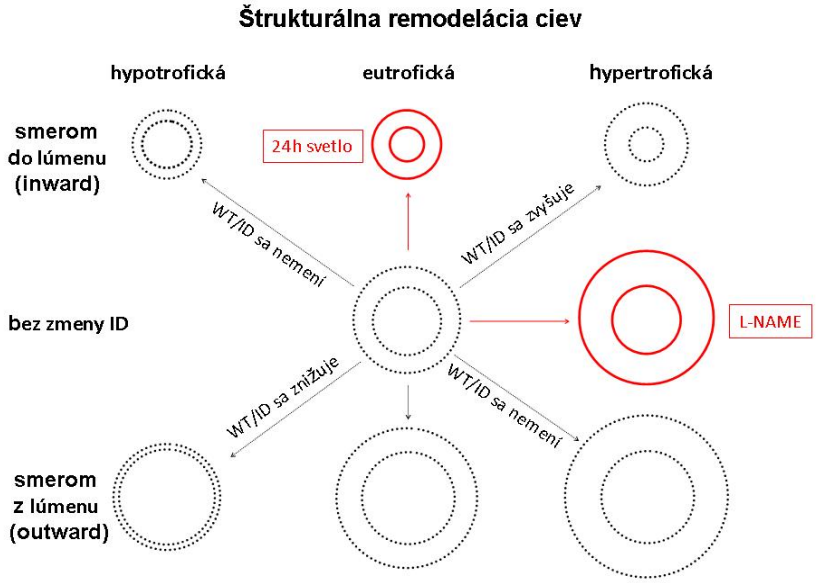


Obr. 1 Grafické znázornenie výsledkov experimentu. a – Systolický tlak krvi; b – Relatívna hmotnosť ľavej komory; c – Hrúbka aorty (WT); d – Vnútorný priemer aorty (ID); e – Plocha priečneho rezu aorty (CSA); f – WT/ID; g – Obsah kolagénu I; h – Obsah kolagénu III. K - kontrola; 24h - kontinuálne osvetlenie. * $p < 0,05$ vs. K

a b c



Obr. 2 Obsah kolagénu I a III v médii aorty (farbenie pikrosíriusovou červenou). a – kontrola; b – L-NAME; c – 24h.



Obr. 3 Štrukturálna remodelácia ciev. Voľne upravené podľa Mulvany et al. (1996). L-NAME – L-NAME indukovaná remodelácia; 24h svetlo – 24h-svetlom-indukovaná remodelácia. WT – hrúbka steny cievy; ID – vnútorný priemer cievy.

Diskusia

Úloha artériovej hypertenzie pri zmenách morfologických parametrov aorty nie je jednoznačne stanovená. Krvný tlak spôsobuje ťahové napätie a krvný prúd šmykové napätie, ktoré sa podieľajú na remodelácii cievnej steny zmenou charakteristiky hladkých svalových buniek (7). Hoci niektoré údaje nasvedčujú, že vnútorný priemer aorty sa v závislosti od hodnôt krvného tlaku výrazne mení (8), iné zdroje priamu súvislosť priemeru aorty s arteriálnou hypertenziou nepotvrdzujú (9). Hrúbka cievnej steny sa pri hypertenzii zväčšuje následkom hypertrofie a hyperplázie hladkých svalových buniek, ale aj zväčšením podielu intersticiálnej hmoty a vody (10).

Model L-NAME-indukovanej hypertenzie a kontinuálnym osvetlením-navodené zvýšenie krvného tlaku sú z hľadiska neurohormonálnej aktivácie podstatne odlišnými patofyziologickými stavmi. L-NAME navodzuje prostredníctvom inhibície NO syntázovej aktivity deficit NO – tento model sa môže považovať za tzv. NO-deficitnú hypertenziu. Na druhej strane, vystavenie potkanov kontinuálnemu 24h osvetleniu inhibuje endogénnu produkciu melatonínu v epifýze, ktorého hodnota je oproti fyziologickým hodnotám výrazne znížená. Mohli by sme preto hovoriť o melatonín-deficitnej hypertenzii (11). Pri oboch typoch hypertenzie však primárny humorálny deficit (NO alebo melatonínu) produkuje v sekvencii nadväzujúcich dejov aktiváciu celého radu humorálnych faktorov ako systém renín-angiotenzín-aldosterón, endotelín, glukokortikoidy a ďalšie (12).

V skupine 24h sme zistili signifikantné zníženie ID, avšak bez zmeny CSA. Podľa Mulvanyho klasifikácie je to teda remodelácia eutrofická (bez zmeny hrúbky) smerom do lúmenu. Na druhej strane, pri L-NAME-indukovanej hypertenzii sa zväčšila hrúbka steny aorty, CSA, ako aj pomer medzi hrúbkou a vnútorným priemerom. Podľa Mulvanyho schémy ide teda o hypertrofickú remodeláciu, avšak bez zmenšenia vnútorného priemeru. Takýto typ remodelácie Mulvanyho schéma nezahŕňa, a preto sme ju nazvali „L-NAME indukovaná remodelácia“ (Obr. 3).

Navrhnuté schémy cievnej remodelácie sú však zamerané na charakterizovanie periférnych rezistentných ciev, pričom neberú do úvahy väzivovú prestavbu cievnej steny. Dôležitou a v klasifikačných schémach zanedbávanou zložkou remodelácie je fibróza. Kolagény sú heterogénnou skupinou proteínov, ktoré tvoria základnú zložku intersticiálneho tkaniva. Zo známych 27 typov kolagénov hrajú kolagény typu I a III pravdepodobne rozhodujúcu úlohu. Zmeny v ich zastúpení sa opisujú pri rôznych patologických procesoch ciev. Zatiaľ čo kolagén typu I, ktorý má pevnosť ocele, je hlavný činiteľ tuhosti aorty, kolagén typu III (retikulín), ktorý je zastúpený v malom množstve, zodpovedá za elasticitu aorty (13) (Obr. 2).

Vzhľadom na to, že v oboch prezentovaných experimentálnych modeloch hypertenzie dochádza k posunu humorálnej rovnováhy v zmysle dominancie proliferáciu podporujúcich alterácií (deficit NO, melatonínu, hyperprodukcia angiotenzínu II, katecholamínov), predpokladali sme, že v aorte dôjde k zmnoženiu jednotlivých typov kolagénu. Zistili sme však prekvapujúci výsledok. Zastúpenie kolagénu I aj kolagénu III bolo v aorte v skupine L-NAME nesignifikantne znížené a v skupine kontinuálneho osvetlenia boli oba kolagény signifikantne znížené (Obr. 1).

Redukcia jednotlivých zložiek kolagénu v oboch modeloch pravdepodobne súvisí so špecifickou úlohou aorty v cirkulácii počas hypertenzie. Fyziologickou úlohou rezistentných ciev je zabezpečiť konštantnú perfúziu periférnymi orgánmi, pričom dochádza k aktivácii fibrózy (vrátane kolagénu I) v arteriolách, čo však spolu s hypertrofiou médie prispieva k vzostupu systémového arteriálneho tlaku (14). V aorte je však situácia podstatne iná. Aorta patrí medzi tzv. pružníkové cievy, ktorých úlohou je akumulovať hemodynamickú energiu počas systoly v podobe roztiahnutia cievnej steny a vrátiť túto energiu do cirkulácie tým, že počas diastoly sa roztiahnutá aorta kontrahuje a prítomná krv sa tým posunie distálne. Následkom zvýšeného vnútroaortálneho tlaku a následnej muskulárnej remodelácie dochádza síce k zníženiu tenzie cievnej steny, ale remodelácia vrstvy hladkých svalových buniek obmedzuje distenzibilitu aorty počas systoly. Zdá sa logické predpokladať, že následkom odbúrania jednotlivých zložiek väziva sa elasticita cievnej steny počas systoly zlepší a množstvo akumulovanej energie sa zvýši. Tým je umožnená lepšia kontrakcia aorty počas diastoly, čo umožní zachovanie funkcie aorty ako diastolickej pumpy udržiavajúcej diastolický tlak na adekvátnej úrovni. Našu úvahu podporujú aj zistenia ďalších autorov, ktorí stanovili redukciu kolagénu I a III v aorte u hypertenzných zvierat (15). Detekcia mechanizmov, ktorými sa redukcia väziva v aorte dosiahne (napr. aktiváciou metaloproteináz) presahuje zameranie a možnosti tejto práce.

Závery

L-NAME-indukovaná hypertenzia zväčšila hrúbku steny aorty, CSA, aj pomer WT/ID, ale bez zmenšenia vnútorného priemeru. Tento nami detekovaný nový typ cievnej remodelácie sme podľa upravenej Mulvanyho schémy nazvali „L-NAME indukovaná remodelácia“ (Obr. 3).

Kontinuálne osvetlenie zabezpečilo remodeláciu aorty len redukciou vnútorného priemeru, bez zmeny hrúbky alebo CSA. Ide teda o „eutrofickú remodeláciu do vnútra“ podľa Mulvanyho klasifikácie (Obr. 3).

Hladina kolagénu I a III sa v aorte pri modeli L-NAME-indukovanej hypertenzie mierne znížila, pričom pri modeli kontinuálneho osvetlenia bola redukcia kolagénu I a III výrazná. Predpokladáme, že hemodynamickým preťažením indukovaná redukcia kolagénneho tkaniva v aorte je kompenzačným mechanizmom na zabezpečenie udržania elastických vlastností a kontrakčnej schopnosti aorty (Obr. 1,2).

Použitá literatúra

1. Folkow B: Structural, myogenic, humoral and nervous factors controlling peripheral resistance. In: Harington M., editor. Hypotensive drugs. London, Pergamon. 1956, 163-174.
2. Mulvany MJ: Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? Cardiovasc Res 1999; 41(1): 9-13.

3. Schiffrin EL: Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment. Hypertension 2012; 59(2): 367-74.

4. Kolpakov V, Gordon D, Kulik TJ: Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. Circ Res 1995; 76(2): 305-9.

5. Paulis L, Matuskova J, Adamcova M, Pelouch V, Simko J, Krajcirovicova K, Potacova A, Hulin I, Janega P, Pechanova O, Simko F: Regression of left ventricular hypertrophy and aortic remodelling in NO-deficient hypertensive rats: effect of L-arginine and spironolactone. Acta Physiol (Oxf) 2008; 194(1): 45-55.

6. Vrankova S, Parohova J, Barta A, Janega P, Simko F, Pechanova O: Effect of nuclear factor kappa B inhibition on L-NAME-induced hypertension and cardiovascular remodelling. J Hypertens 2010; 28 Suppl 1: S45-9.

7. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ: Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. Neth Heart J 2007; 15(3): 100-8.

8. Vardulaki KA, Walker NM, Day NE, Duffy SW, Ashton HA, Scott RA: Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. Br J Surg 2000; 87(2): 195-200.

9. Mitchell GF, Lacourcière Y, Ouellet JP, Izzo JL Jr, Neutel J, Kerwin LJ, Block AJ, Pfeffer MA: Determinants of elevated pulse pressure in middle-aged and older subjects with uncomplicated systolic hypertension: the role of proximal aortic diameter and the aortic pressure-flow relationship. Circulation 2003; 108(13): 1592-8

10. Xu C, Lee S, Singh TM, Sho E, Li X, Sho M, Masuda H, Zarins CK: Molecular mechanisms of aortic wall remodeling in response to hypertension. J Vasc Surg 2001; 33(3): 570-8.

11. Simko F, Paulis L: Melatonin as a potential antihypertensive treatment. J Pineal Res 2007; 42(4): 319-22.

12. Simko F, Simko J: The potential role of nitric oxide in the hypertrophic growth of the left ventricle. Physiol Res 2000; 49(1): 37-46.

13. Arteaga-Solis E, Gayraud B, Ramirez F: Elastic and collagenous networks in vascular diseases. Cell Struct Funct 2000; 25(2): 69-72.

14. Chatziantoniou C, Boffa JJ, Ardaillou R, Dussaule JC: Nitric oxide inhibition induces early activation of type I collagen gene in renal resistance vessels and glomeruli in transgenic mice. Role of endothelin. J Clin Invest 1998; 101(12): 2780-9.

15. Hlavačková L, Janegová A, Uličná O, Janega P, Cerná A, Babál P: Spice up the hypertension diet - curcumin and piperine prevent remodeling of aorta in experimental L-NAME induced hypertension. Nutr Metab (Lond) 2011; 8: 72.

2. Effect of aminoguanidine derivative RAG on different carcinoma cell line

Georgios A. Perdikaris
(General Medicine, 2nd year)

Co-autors: Katarína Koňariková[1], Jozef Čársky[1], Zdeňka Ďuračková[1], Ingrid Žitňanová[1]
Supervisor: Katarína Koňariková[1]
[1]Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Comenius University, Faculty of Medicine, Bratislava

Introduction

Carcinogenic agents (chemical agents) exert the growth-inhibition power and the ability to induce cell death. These properties are widely used in anticancer chemotherapies (1). Cell death can be classified according to its morphological appearance, enzymological, functional aspects or immunological characteristics (2). In our study we examined the type of death (apoptotic or necrotic cell death) caused by aminoguanidine derivate RAG on carcinoma cell line.

Apoptosis is the process of programmed cell death that may occur in multicellular organisms. It is caused by various biochemical events leading to characteristic cell changes (morphology) and death. These changes include blebbing, cell shrinkage, nuclear fragmentation, chromatin condensation, and chromosomal DNA fragmentation (3).

On the other hand, necrosis is a form of traumatic cell death that results from acute cellular injury. Until recently it was believed that necrosis was a random, uncontrolled process that leads to the "accidental" death of the cell. Consequently, necrosis as a death modality was not well studied, which is unfortunate as necrosis probably plays a larger role in the pathogenesis of diseases than either apoptosis or autophagy. This dogma, however, is changing with the discovery of key mediators of necrotic death (4).

Aminoguanidine derivates are known for their antidiabetic properties. Considerable attention has been paid particularly to β-resorcylidene aminoguanidine (RAG), often shown as the efficient anti-glycation and antioxidant agent in both animal studies and *in vitro* experiments. The aim of the present study was to examine the cytotoxic and genotoxic effect of resorcylidene aminoguanidine derivate (RAG) on carcinoma cell line (5).

Materials and methods

Chemical

In our study we used aminoguanidine derivative – resorcylidene aminoguanidine hydrochloride (RAG), in the concentration range of 100 - 450 μmol / L, soluble in water.

Cell lines

Human colon carcinoma cells (HT-29) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC), and were maintained in complete Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% (vol./vol.) fetal calf serum, penicillin and streptomycin (100 μg/mL). Cell lines were grown at 37 °C, 5% CO_2.

Antiproliferative assay

Cell proliferation, growth curves and cytotoxic potential of RAG was determined by the trypan blue dye exclusion test. HT-29 were seeded at $1.5x10^5$ cells per mL of medium in 60-mm Petri dishes. After 24 h of incubation at 37 °C, the cells were exposed to RAG for 24, 48 and 72 h. Growth curves, cytotoxic/cytostatic effects and inhibition concentration IC_{50} and IC_{100} were determined after 3 days. Final concentrations of RAG added to the cells were in the concentration range of 100 - 450 µmol / L. The cell proliferation was determined by direct counting of cells in a counting chamber.

Electrophoretic analysis of cell death

Control HT-29 cells (without RAG) treated with RAG (300, 350, 400, 450 µmol/L) were harvested, washed with PBS, and then lysed in the solution supplemented with proteinase K (1mg/mL) and incubated for 1 hour. Following lysis, RNase (200 µg/mL) was added and samples were incubated again. The cell lysates were loaded into 2% agarose gel, stained with ethidium bromide (1 mg/mL), and subjected to electrophoresis. Separated DNA fragments (DNA ladders) were visualised on a UV transilluminator (254 nm).

Comet assay

DNA single strand breaks were measured using the alkaline comet assay (6). Cells were embedded in agarose on a microscope slide, lysed with detergent, and treated with high salt. With this procedure, nucleoids are formed, containing non-nucleosomal but still supercoiled DNA. Any breaks present in the DNA cause supercoiling to relax locally and loops of DNA are then free to extend toward the anode as a "comet tail" when the slide is subjected to alkaline electrophoresis. Comets were viewed by fluorescence microscopy by DAPI.

Results

Antiproliferative effect

For 72 h treatment of RAG with cells HT-29 (Fig. 1) cell growth inhibition was determined by direct counting of viable cells by trypan blue exclusion assay. Concentration range tested for RAG was 100-450 µmol/L. As shown in the Fig. 1 for cell line HT-29, two highest concentrations of RAG (400 and 450 µmol/L) induced cytotoxic effects after 72h of influence. Percentage of cell growth inhibition was dose- and time-depended in both cell lines.

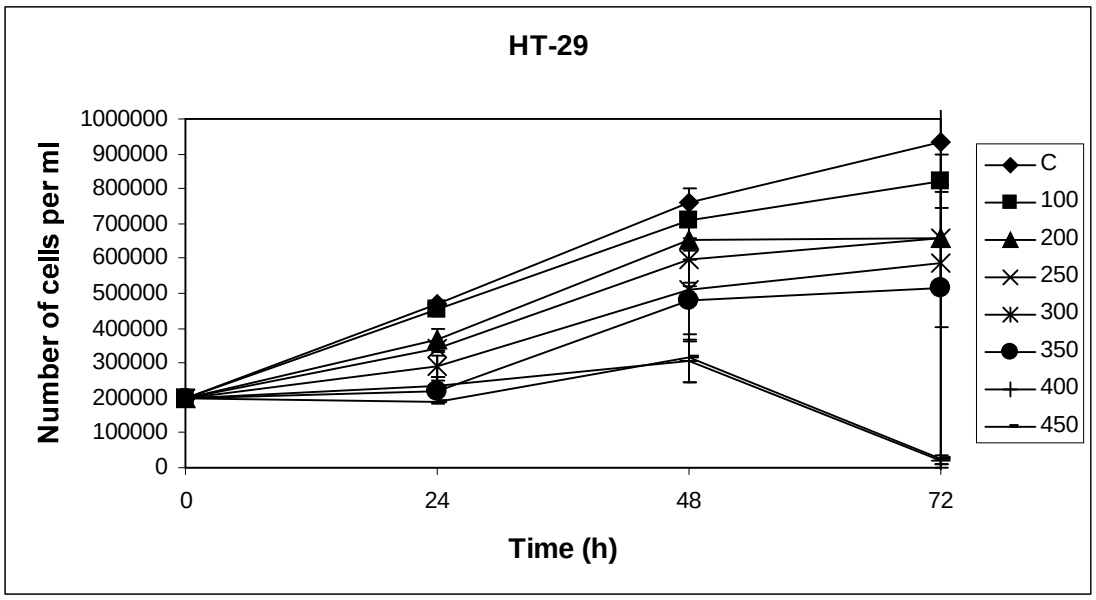


Fig.1: Effect of RAG on human colon carcinoma cell line HT-29. Cells were incubated with RAG for 72 h at the concentration range of 100-450 µmol/L. C - control cell line without RAG.

Electroforesis

In this study we determined the type of cell death (apoptosis or necrosis) caused by RAG in HT-29 cells (Fig. 2). For this purpose we used four highest concentrations (300, 350, 400 and 450 µmol/L) of RAG. Electroforetic assays showed a necrotic death in both cell lines at used range of concentrations. As a positive control we used DNA fragmentation caused by cis-platin at concentration of 6 µmol/L in murine leukemia cell line L1210.

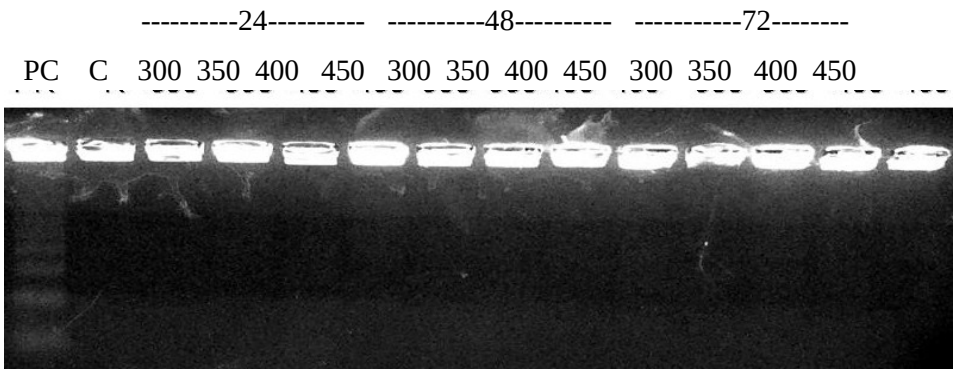


Fig.2: Effect of RAG on human colon carcinoma cell line HT-29. As a positive control cis-platin was used on L1210 cell line at concentration of 6 µmol/L and control cells were cells without RAG. PC - positive control; C - control; 300, 350, 400, 450 - concentrations of RAG in µmol/L).

Comet Assay

We have monitored also genotoxic effect of RAG complex (100-450 µmol/L) on HT-29 cells after 24 h of incubation of RAG with the cells. We detected DNA strand breaks (buffer) and total DNA damage (Fpg enzyme). Comets formed by damaged DNA were viewed by fluorescence microscopy after staining with 4´, 6-diamidine-2-phenylindole dihydrochlorid (DAPI). The relative intensity of fluorescence in the tails is a function of the frequency of DNA breaks, which can be assessed visually.

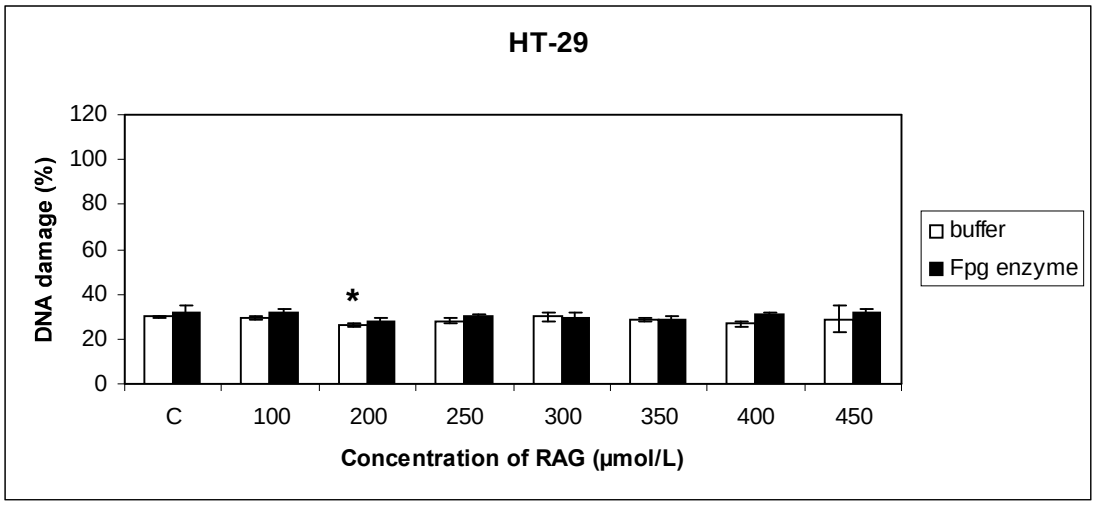


Fig. 3: Genotoxic effect of RAG (100 -450 µmol/L) on human colon carcinoma cells HT-29. Cells were treated without Fpg enzyme (buffer) and with Fpg enzyme (Fpg enzyme). C - control cell line without RAG.

Discussion

In this work we have studied the cytotoxic and genotoxic effect of RAG on the human colon cancer cells HT-29 cells. Trypan blue dye exclusion test suggested significant, concentration dependent antiproliferative effect of RAG on HT-29. Two higher concentrations of RAG (400 and 450 μmol/L) showed a significant cytotoxic effect on cancer cells after 72 h of incubation (Fig.1). The IC_{50} value of RAG for HT-29 was 360 μmol/L after 72h. Some studies from literature indicated an inhibitory effect of RAG on the proliferation of influenced cells that was probably caused by antioxidant properties of RAG. This effect could be ascribed to RAG´s ability to form a redox system. At the same time, no cytotoxic or genotoxic effect was determined in the used concentration range (7).

Electroforetic assays showed a necrotic death of cells while there was no indication for apoptotic cell death. We examined various concentrations (300-450 μmol/L) of RAG and different times of incubation (24-72 hours) with the HT-29 cells (Fig.2).

In this work we also studied a genotoxic effect of RAG. As presented in Fig.3 HT-29 cell line without RAG has the same percent of DNA damage without (DNA strand breaks) and with (total DNA damage) Fpg enzyme. Genotoxic effect of RAG on HT-29 was not significant. Vojtassák J. et al. (7) found no significant increase of DNA damage in B-HNF-1 cells (human neonatal diploid cell line) in the concentration range from $1x10^{-4}$ to $1x10^{-6}$ mol/L.

Based on our results we can conclude that RAG is not suitable for further investigation as an anticancer agent for human colon carcinoma (8).

Acknowledgement: This project was supported by Mind and Health civil association.

References

1. Haddow A: Cellular inhibition and the origin of cancer. Acta Unio Intern Contra Cancrum 1938; 3: 342-352.
2. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death and Differentiation. 2009; 16: 3–11.
3. Elmore S: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. 2007; 35(4): 495–516.
4. Baines Ch: Role of the mitochondrion in programmed necrosis. Frontiers in Physiology. 2010; 1(156): 1-8.
5. Watala ML, Siewiera K, Jozwiak Z: Resorcylidene Aminoguanidine (RAG) Improves Cardiac Mitochondrial Bioenergetics Impaired by Hyperglycaemia in a Model of Experimental Diabetes. Int J Mol Sci. 2011; 12(11): 8013–8026.
6. Collins AR, Dobson VL, Dušinská M, Kennedy G, Štetina R. Comet assay: What can it really tell us? Mutat Res. 1997; 375:183-193
7. Vojtaššák J. et al: *In Vitro* Evaluation of the Cytotoxicity and Genotoxicity of Resorcylidene minoguanidine in Human Diploid Cells B-HNF-1: Folia Biologica. 2008; 54: 109-114.
8. Watala C, Dobaczewski M, Kazmierczak P et al: Resorcylidene aminoguanidine induces antithrombotic action that is not dependent on its antiglycation activity. Vascular Pharmacology. 2009; 51(4): 275-283.

3. Vplyv testosterónu na atraktivitu a na hodnotenie atraktivity u opačného pohlavia

Nina Koštová
(všeobecné lekárstvo, 3. ročník)

Školitelia: MUDr. Mgr. Július Hodosy, PhD., MPH[1, 2], RNDr. Roman Gardlík, PhD.[1]
[1]Ústav molekulárnej biomedicíny LFUK, Bratislava
[2]Fyziologický ústav LF UK, Bratislava

Úvod

Vzťah medzi ľudskou sexualitou, výberom partnera a hladinou androgénov stále nie je ešte presne známy. Zebričky pestré, ktorým podávali v dospelosti testosterón, viac spievali a boli agresívnejšie, ale vyššia hladina testosterónu výber ich partnera neovplyvnila (1). Samičky potkanov, ktorým sa umelo podával testosterón propionát však preferovali sexuálne aktívnych samcov (2).

Pomer dĺžky druhého (2D) a štvrtého (4D) prsta ruky je ovplyvnený pôsobením androgénov, najmä testosterónu počas prenatálneho vývoja jedinca, pričom nižší pomer 2D:4D svedčí o vyššej prenatálnej expozícii androgénom. Pomer 2D:4D je sexuálne dimorfný, u mužov býva druhý prst kratší, u žien je druhý prst rovnako dlhý alebo dlhší ako štvrtý prst (3).

Cieľom našej práce bolo analyzovať súvislosť medzi atraktivitou, markermi prenatálneho testosterónu a hladinami aktuálneho testosterónu u mladých mužov a žien. Našou pracovná hypotéza hovorila, že ženy budú hodnotiť atraktívnejšie mužov s vysokým aktuálnym testosterónom.

Materiál a metódy

Súbor. V práci bol analyzovaný súbor 12 žien vo veku 20-27 rokov a 14 mužov vo veku 20-22 rokov, pričom ani jeden z mužov nepoznal ani jednu zo žien a naopak. Práca bola rozdelená do dvoch kôl.

Prvé kolo. V prvom kole sa probandom naskenovala ruka, spravila fotka tváre a vyplnil krátky dotazník, kde sme sa pýtali na stav (slobodná/vydatá), dĺžku súčasného vzťahu, priemerné mesačné výdavky, ručnosť, u žien na užívanie hormonálnej antikoncepcie, na priemerné trvanie menštruačného cyklu a dĺžku menštruácie. Pri skenovaní a fotení sme dodržiavali štandardizované podmienky.

Druhé kolo. V druhom kole sa odobrali sliny a krv na určenie hladiny testosterónu a probandi hodnotili opačné pohlavie. Na základe fotiek si probandi navzájom priraďovali hodnotenie od 0-10, pričom 0 bolo najhoršie a 10 najlepšie. Ženy sa zúčastnili druhého kola v 21. deň menštruačného cyklu +/-2 dni.

Z naskenovaných prstov rúk sme odmerali dĺžku druhého a štvrtého prsta pravej ruky. Na meraní hladín testosterónu bol použitý ELISA KIT od firmy DRG Diagnostics (Marburg, Nemecko). Získané údaje sme spracovali a analyzovali pomocou programov Microsoft Excel 2007, XLStatistics 09.09.24 a IBM SPSS 20. Pre účely analýzy výsledkov a hľadania korelácie medzi jednotlivými faktormi sme z celého súboru jedincov vytvorili všetky možné kombinácie dvojice muž-žena. Vzťah medzi faktormi sme študovali korelačnou a lineárnou regresnou analýzou. Dáta boli normalizovane na priemer hodnotení pre odstránenie interindividuálnych rozdielov v používaných škálach hodnotenia.

Výsledky

Skúmali sme závislosť hodnotení od veku, stavu (slobodný/ženatý(vydatá)), dĺžky súčasného partnerského vzťahu, priemerných mesačných výdavkov, ručnosti, užívania hormonálnej antikoncepcie, hladín testosterónu v slinách a plazme a od odhadu prenatálneho testosterónu na základe pomeru 2D:4D u hodnotených a hodnotiacich.

Signifikantné zo všetkých získaných údajov pri hodnotení muža ženou boli vek muža, dĺžka druhého prsta ženy, dĺžka partnerského vzťahu hodnotiacej ženy, mesačné výdavky ženy a slivárny testosterón ženy. Vyšší vek muža o 1 rok zlepšil jeho hodnotenie ženami o 0,860 bodu, dlhší 2. prst ženy zlepšil hodnotenie muža o 0,301 bodu, každý rok dĺžky partnerského vzťahu hodnotiacej ženy zlepšil hodnotenie mužov o 0,732 bodu, zvýšenie výdavkov ženy o 1 euro zhoršilo hodnotenie mužov o 0,016 bodu. Výsledky sú zobrazené v Tabuľke 1. Po normalizácii hodnotení mužov ženami je ako jediný signifikantný faktor vek muža, pričom o 1 rok vyšší vek muža zlepšil jeho hodnotenie o 0,224 bodu.

Tabuľka č. 1: Hodnotenie mužov ženami

Faktor	zmena hodnotenia	štandardizovaný koeficient beta	signifikantnosť (p hodnota)
vek muža	0,860	0,268	< 0,001
dĺžka 2. prsta ženy	0,301	0,375	0,005
dĺžka partnerského vzťahu ženy	0,732	0,919	< 0,001
mesačné výdavky ženy	-0,016	-0,937	< 0,001
slivárny testosterón ženy	-0,008	-0,348	0,001
Faktor po normalizácii			
vek muža	0,224	0,277	0,001

Pri hodnotení žien mužmi sa ako signifikantné faktory ukázali hodnoty slivárneho testosterónu ženy, dĺžka partnerského vzťahu muža a mesačné výdavky hodnotiaceho muža. Zvyšujúca sa hladina testosterónu v slinách hodnotených žien znižovala ich hodnotenie, dĺžka partnerského vzťahu muža zlepšovala hodnotenie žien každým rokom o 0,576 bodu, vyššie mesačné výdavky hodnotiaceho muža negatívne ovplyvnili hodnotenie atraktivity žien. Výsledky sú zhrnuté v Tabuľke 2. Po normalizácii hodnotení sa ako signifikantná ukázala len hladina slivárneho testosterónu hodnotenej ženy.

Tabuľka č. 2: Hodnotenie žien mužmi

Faktor	zmena hodnotenia	štandardizovaný koeficient beta	signifikantnosť (p hodnota)
slivárny testosterón ženy	-0,005	-0,299	< 0,001
dĺžka partnerského vzťahu muža	0,576	0,534	< 0,001
mesačné výdavky muža	-0,015	-0,457	< 0,001
Faktor po normalizácii			
slivárny testosterón ženy	-0,001	-0,334	< 0,001

Diskusia

Ukázalo sa, že ako jediný faktor muža, ktorý určuje mieru atraktivity u žien je jeho vek, nepotvrdil sa náš predpoklad medzi koreláciou hladiny prenatálneho testosterónu muža (2D:4D), ani aktuálnymi hladinami testosterónu na hodnotenie atraktivity muža ženami. Miera atraktivity viac závisí od faktorov hodnotiacej ženy, pozitívne ovplyvňuje hodnotenie dlhší druhý prst a dlhší partnerský vzťah, negatívny vplyv majú vyššie mesačné výdavky a vyššia hladina testosterónu v slinách žien. Ako signifikantný faktor hodnotenia po normalizácii je iba vek muža, čím je jeho vek vyšší tým lepšie hodnotenie dostal. Naše výsledky sa podobajú výsledkom u iných primátov. Napr. u samíc goríl nemala na kopulačné správanie vplyv hladina androgénov, ale zvýšené kopulačné správanie súviselo so zvýšenou hladinou estrogénov v periovulačnom období (4).

Pri hodnotení žien mužmi za signifikantný faktor považujeme hladinu salivárneho testosterónu žien, pričom jeho vyššia hladina negatívne ovplyvňuje hodnotenie, aj po normalizácii hodnotení. Ako u žien, tak aj u mužov, vyššie mesačné výdavky hodnotiaceho muža zhoršujú hodnotenie žien a dlhší partnerský vzťah muža hodnotiaceho ženy zlepšuje ich bodové ohodnotenie. Problémom v našej práci bol nízky počet zapojených ľudí, do budúcna treba zväčšiť súbor. Navyše sme zistili zaujímavú súvislosť medzi dĺžkou partnerského vzťahu, medzi mesačnými výdavkami, hladinou testosterónu v slinách žien a hodnoteniami u oboch pohlaví. Pri hodnotení mužov bol pre ženy dôležitý navyše ešte vek muža a dĺžka jej 2. prsta. Podobný výsledok, kedy to bolo skôr socioekonomické postavenie, ktoré hralo úlohu pri výbere sexuálneho partnera zistili aj iní autori (5).

Hlavnou limitáciou štúdie bol fakt, že išlo čisto o korelačnú štúdiu, a preto nie sme schopní vysvetliť kauzálne príčiny. Na druhej strane, lepšie hodnotenie mužov ženami závislé od veku mužov mohlo byť ovplyvnené malým vekovým rozptylom mužov.

Aj keď sa nám nepotvrdili naše predpoklady, že atraktivita a hodnotenie atraktivity u opačného pohlavia súvisí s hladinami testosterónu, výsledky sú zaujímavé a neodporujú doteraz známym výsledkom v podobnej oblasti. Na základe našich výsledkov sa nám podarilo identifikovať na malom súbore probandov ako nezavislý determinant atraktivity mužov ich vek. V ďalšej práci by bolo vhodné rozšíriť súbor, zväčšiť vekový rozptyl a vzhľadom na metabolizmus testosterónu by bolo vhodné sledovať aj vplyv ostatných pohlavných hormónov.

Použitá literatúra

1. Adkins-Regan E: Testosterone increases singing and aggression but not male-typical sexual partner preference in early estrogen treated female zebra finches. Horm Behav 1999; 35(1): 63-70.
2. de Jonge FH, Eerland EM, van de Poll NE: The influence of estrogen, testosterone and progesterone on partner preference, receptivity and proceptivity. Physiolo Behav 1986; 37(6): 885-91.
3. Zhengui Z, Cohn MJ: Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios. PNAS 2011; 108(39): 16289-16294.
4. Nadler RD, Collins DC, Miller LC, Graham CE: Menstrual cycle patterns of hormones and sexual behavior in gorillas. Horm Behav 1983; 17(1): 1-17.
5. Edelstein RS, Chopik WJ, Kean EL: Sociosexuality moderates the association between testosterone and relationship status in men and women. Horm Behav 2011; 60(3): 248-55.

4. Glutathione and glutathione detoxification system in the liver of animals with streptozotocin induced diabetes

Christos Chatzakis
(General Medicine, 3rd year)

Tutor : RNDr. Eva Uhlíková, PhD., Viera Rendeková, MD, PhD.
Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry,
Faculty of medicine, Comenius University, Bratislava

Introduction

Diabetes Mellitus is a metabolic disorder which is consequence of partial or complete lack of insulin. Experimental model of diabetes represents source of basic knowledge on human diabetes. The present experimental model of diabetes is useful for the observation of functional, morphological disorders and metabolic changes in cellular and subcellular level. Liver has a crucial role in intermediate metabolism. Therefore it's obvious that diabetes has significant affect in liver metabolism. A pathologic factor, that cause tissue damage in the liver, is the increased oxidative stress in diabetes. A factor which increase the oxidative stress in the liver of diabetics animals, is the induction of hepatic biotransformation system. Glutathione and GSH-dependent enzyme system represent an important system of detoxification, responsible for the inactivation of reactive oxidative species and products of biotransformation.

Methods

Role of this work was to investigate the levels of reduced glutathione and activity of glutathione detoxification system (glutathione S-transferase, glutathione peroxidase) in liver of animals with streptozotocin induced diabetes. In order to achieve this,

we used model of experimental streptozotocin induced diabetes in new born rats by administration of streptozotocin in the 2^{nd} and 9^{th} day of their life, in dose of 45mg/kg of body mass intraperitoneally. The animals where sacrificed at the 12^{th} week. From the liver of experimental animal we prepared 10% (w/v) homogenate in 0.25 mol/l of sucrose. We determined the reduced glutathione (GSH) by the method of Van Doorna et al (1980) using Ellmanov reagent. Activity of glutathione S-transferase were determined by the method of Habig and Jakoby (1981) using 1-chlor-2,4-dinitrobenzene as the substrate and activity of glutathione peroxidase by spectrophotometric UV-method Paglia and Valentine(1967).

Results

Amount of reduced glutathione (GSH) in the liver of diabetic animals were significantly decreased, compared to the control group (8.8µmol/g of tissue versus 7.78µmol/g of tissue). Activity of glutathione S-transferase (0.52 µkat/g of tissue versus 0,61 µkat/g of tissue) and also glutathione peroxidase (0.62 µkat/g of tissue versus 1.03 µkat/g of tissue) were significantly elevated compared to the control group.

Discussion

Decreased level of reduced glutathione (GSH) in the liver of diabetic animals is in agreement with the idea of increased oxidative stress in the liver of the experimental animals. Decreased levels of this

important metabolite reflects its enhanced utilization and indicates the increased activity of GSH-dependent enzymes and also the decreased regeneration of the reduced form of glutathione.

Acknowledgements

First of all I would like to thanks my tutors for their support during every step of my project, i'm really grateful for their help.

I would like also to underline the constant and so precious to me support of the Prof. Ladislav Turecky, MD, PhD who trusted me for this project. Thank you very much Professor.

References

1. Habig, W.H., Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferases. In: S.O.Colowick, N.O.Kaplan (eds.): Methods in Enzymology, Vol. 77, Academic Press, New York 1981, s. 218-231.
2. Paglia, D.E., Valentine, W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J.Lab.Clin.Med.70,1967, 158-167.
3. Van Doorn, R., Bos, R.P., Brouns, R.M.E., Leijdekkers, Ch.M., Henderson, P.T.: Effect of toluene and xylenes on liver glutathione and their urinary excretion as mercapturic acids in the rat. Arch. Toxicol 45, 1980, 293-304
4. John Baynes and Marek H. Dominiczak, 3rd edition, Mosby Elsevier, Medical Biochemistry
5. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko and Lubert Stryer, 7th edition, W.H. Freeman & Company, Biochemistry

5. Cellular and biochemical aspects of ageing human brain

Xylas Christos
(General Medicine, 3rd year)

Supervisor: doc.MUDr. Viera Rendekova,CSc, doc.RNDr Eva Uhlikova,CSc ,
MUDr. Katarina Hrubiškova
Comenius University, Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry,
Bratislava

Introduction and purpose of the work

Many cellular and molecular aspects of brain ageing are shared with other organ systems, including increased oxidative damage to proteins, nucleic acids, membrane lipids, impaired energy metabolism, the accumulation of intracellular and extracellular protein aggregates.

The aim of this project is to understand the basic cellular and biochemical changes during ageing of human brain, by diabetes mellitus that may predispose neurons to degeneration in disorders such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson disease (PD).

Materials

Blood examinations from 58 diabetic patients in department of Internal Medicine in Ružinov Hospital
Laboratory room in department of Internal Medicine in Ružinov Hospital
Pc room in department of Biochemistry of Comenius University
1 Laboratory white coat
Pc Toshiba A-300 A15
Book: Medical Biochemistry Jonh W Baynes, Marek H Dominiczak

Methods

All of the major cell types in the brain undergo structural changes during ageing. These changes include nerve cell death, dendritic retraction and expansion, synapse loss and remodeling. Furthermore glial cell (astrocytes and microglia) reactivity. But one of the most important reasons that can lead in cellular and neurochemical changes of human brain is Diabetes Mellitus.

Firstly, with the help of doctors , they took blood samples of all diabetic patients and then they had the results for each patient. Personally, I observed immediately the blood results of patients with diet markers : 9 or 9N which mean low salt.

I was working with diabetic patients, 58 patients in different ages(from 22 years old till 83 years old) and gender(32 males & 26 females), in department of Internal Medicine of Ružinov Hospital, to observe their blood biochemical results, but also some important increased indicators in their blood.

A biochemical blood test include:

Glucose in serum
Urea in serum
Creatinine in serum
Uric acid
Albumin in serum
Total protein in serum

Total serum bilirubin
Conjugated bilirubin in serum
AST(Aspartate Aminotransferase) in serum
ALT (Alanine aminotransferase) in serum
ALP (Alkaline Phosphatase) in serum
Cholesterol in serum
LDL(Low-density lipoprotein)
HDL(High-density lipoprotein) cholesterol
Triacylglycerol
Ferrum in serum
Sodium in serum
Potassium in serum
Chlorine in serum
Calcium in serum
Osmolality in serum
CRP(C-reactive protein) in serum

Results

In the end of record of the most significant markers in blood biochemical tests, I made a table in which I distinguished the genders and ages having as aim to present every change in blood that can be combined with a progressive way which leads to cellular and other neurochemical aspects during the ageing of human brain/

The most significant markers from research are:

•Gender •Age •Number of patients	Female 22-39 7	Female 40-60 7	Female 61-83 12	Male 22-39 8	Male 40-60 11	Male 61-83 13	Normal Values
Glucose in serum	**5,7-9,15**	**6,21-11,5**	**9,21-17,3**	**5,6-6,2**	**6,24-8,58**	**6,29-12,7**	**4-5,5 mmol/L**
Creatinine in serum	**0,64-1,10**	**0,64-1,19**	**0,67-1,28**	**0,63-1,10**	**0,64-1,15**	**0,69-1,29**	**0,62-1,06 mg/dL**
Triacylglycerol	**0,80-1,81**	**0,84-1,91**	**1,10-2,01**	**1,10-1,92**	**0,92-1,83**	**1,20-2,12**	**0,45-1,70 mg/L**
Free Radicals ‣superoxide dismutase ‣ nitric oxide ‣superoxide	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	
Osmolality in serum	**282-304**	**280-308**	**300-310**	**290-302**	**295-309**	**284-314**	**280-300 mmol/Kg**
CRP in serum	**1,57-5,32**	**13,7-31,4**	**36,7-87,1**	**3,28-5,25**	**19,3-26,7**	**32,4-113,8**	**0,5mg/L**

(↑= increased)

As we can see, there are some increased changes in our biochemical results that can a catalytic role to progress syndromes during ageing such as Parkinson Disease and Alzheimer Disease.

Discussion

How these significant markers can lead to cellular and neurochemical changes during aging?

Increased glucose in serum and CRP in serum can lead to protein oxidation :

Levels of protein oxidation, measured as protein carbonyls, are significantly elevated in the brains of aged rodents, and such age-associated protein oxidation can be prevented by administration of antioxidants. Studies of membrane structure have provided evidence for oxidation-related alterations in membrane protein conformation in old rodents. Studies of brain tissues of patients with Alzheimer Disease and Parkinson Disease have revealed increased levels of protein oxidation in vulnerable brain regions and, in particular, in degenerating neurons.

Oxidation of proteins impairs their function and is therefore a likely contributor to age-related cellular dysfunction and neuronal degeneration. Progressive addition of sugar residues to many different proteins occurs during the aging process. This process, called glycation, may promote oxidative stress in cells. Two proteins that have been shown to be heavily glycated in Alzheimer Disease are Aβ and tau, the major components of plaques and neurofibrillary tangles, respectively.

Increased level of Triacylglycerol in serum can lead to vascular changes:

As in other organ systems, vessels that supply blood to the brain are vulnerable to age-related atherosclerosis and arteriosclerosis, which render the vessels susceptible to occlusion or rupture (stroke), a major cause of disability and death in the elderly population.

Reduced brain perfusion in the absence of overt stroke may play a role in age-related cognitive dysfunction. Decreased cerebral blood flow occurs with advancing age and is accompanied by declines in cerebral metabolic rate for oxygen and glucose use. Age-related changes in cerebral vasculature are generally similar to those that occur in vessels elsewhere in the body and are therefore likely to result from common cellular and molecular changes, including oxidative damage to vascular endothelial cells and an inflammatory response in which macrophages may penetrate the blood–brain barrier.

Age-dependent cerebral vascular changes are strongly linked to heart disease and hypertension. Interestingly, apolipoprotein E polymorphisms are linked to increased risk of both atherosclerosis and Alzheimer Disease , with the apolipoprotein E4 increasing the risk. This association suggests that age-related vascular changes may make an important contribution to the neurodegenerative process in Alzheimer Disease. Finally, important transport functions of cells (endothelial cells and astrocytes) that comprise the blood–brain barrier may also be impaired in the aging brain and more so in Alzheimer Disease.

Amyloid accumulation can lead to increased osmolality in serum during ageing(especially in older ages) :

Amyloid plaques accumulate most heavily in brain regions involved in learning and memory processes such as the hippocampus and entorhinal cortex. In AD, the accumulation of Aβ in the brain is correlated with the amount of neuronal degeneration and with the severity of cognitive impairment.

Although the causes of the majority of cases of AD is unknown, some AD cases are caused by mutations in APP, presenilin-1, or presenilin-2; mutations in each of these proteins result in increased production of self-aggregating neurotoxic forms of Aβ. Aβ can be neurotoxic, and can increase neuronal vulnerability to metabolic, excitotoxic, and oxidative insults.

The sequence of events involved in Aβ-induced neuronal injury and death may involve induction of membrane lipid peroxidation, which generates a toxic aldehyde called 4-hydroxynonenal that covalently modifies proteins involved in maintenance of cellular ion homeostasis and energy metabolism, including the plasma membraneNa+/K+ and Ca2+ ATPases (adenosine triphosphatases),glucose transporters, and glutamate transporters. This may lead to excessive elevation of intracellular calcium levels, mitochondrial dysfunction, and a form of cell death called apoptosis. In addition to its likely involvement in the neurodegenerative process, Aβmay also disrupt neurotransmitter signaling pathways.

Increased free radicals:

A free radical is any molecule with an unpaired electron in its outer orbital*; in* biological systems, oxygen-based molecules are the predominant free radical species. A major oxyradical in cells O2−. is superoxide (O2−.), which is generated during the mitochondrial electron transport process; superoxide dismutases (Mn-SOD and Cu/ZnSOD) eliminateO2−. by converting it to hydrogen peroxide (H2O2).

H2O2 can be converted to hydroxyl radical(OH) via the Fenton reaction, which is catalyzed by Fe2+ and Cu+. Peroxynitrite(ONOO−) arises from the interaction of nitric oxide (NO) with O2−.; calcium influx is a major stimulus for NO production. While OHand ONOO− can cause direct damage to proteins and deoxyribonucleic acid (DNA), their major means of damaging cells is by attacking fatty acids in membranes and initiating a process called lipid peroxidation. Studies of aging have provided compelling evidence that there is an increase in production and accumulation of oxyradicals in essentially all tissues in the body during the aging process, including in the brain.

References

1. Jeffrey B.Halter,Joseph G.Ouslander,Mary E.Tinetti,Stephanie Studenski,Kevin P.High, Sanjay Asthana. Hazzard's Geriatric medicine and Gerontology,6th edition, Washington(USA),SAP.2009, 1-1632
2. John W Baynes, Marek H Dominiczak, Medical Biochemistry, 2nd edition, Philadelphia(USA), SAP.2005,1-693.
3. Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Paoloni R, Caselli U, Galeazzi L, Meier-Ruge W:Synaptic structural dynamics and aging. Gerontology 1996; 42(3):170-80
4. Blanc EM,Toborek M,Mark RJ,Hennig B,Mattson MP: Amyloid β-peptide induces cell monolayer albumin permeability, impairs glucose transport, and induces apoptosis in vascular endothelial cells. J Neurochem 1997; 68(5):1870–1881.
5. Mattson MP: Cellular actions of β-amyloid precursor protein, and its soluble and fibrillogenic derivatives. Physiological Reviews 1997; 77(5):1081–1132.
6. Mattson MP, Cheng A: Neurohormetic phytochemicals: Low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. Trends Neurosci. 2006; 29(11):632–639.
7. Landfield PW: Nathan Shock Memorial Lecture 1990. The role of glucocorticoids in brain aging and Alzheimer's disease: an integrative physiological hypothesis.Exp Gerontol. 1994; 29(1):3–11.

6. Experimentálna zraňujúca balistika: analýza zraňujúceho potenciálu odrazených projektilov.

Viktor Rekeň
(všeobecné lekárstvo, 5.ročník)

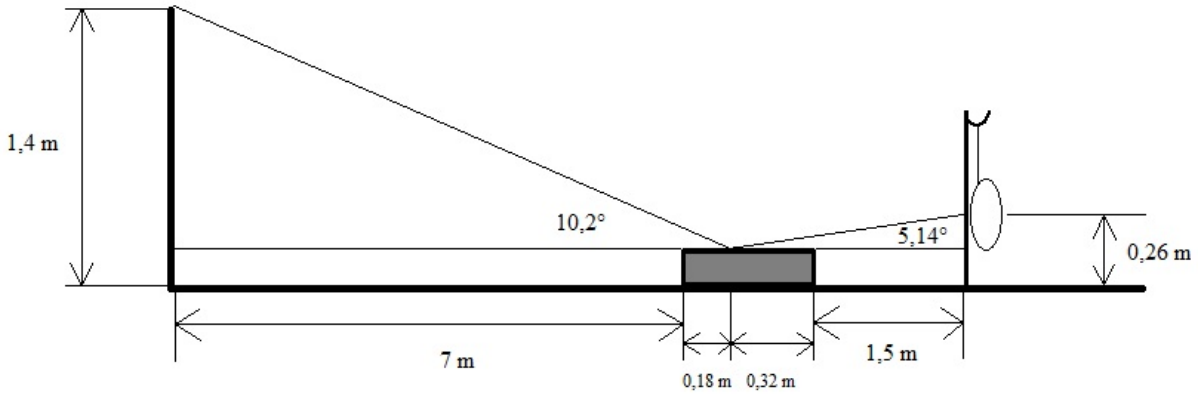
Školiteľ: MUDr. Norbert Moravanský, PhD.[1]
Školiteľ – špecialista: Doc. Ing. Ludvík Juříček, PhD.[2]
[1]Ústav súdneho lekárstva LF UK v Bratislave
[2]Ústav bezpečnosti Vysokej školy Karla Engliše v Brne, Česká republika

Úvod

Poznatky o zraňujúcom potenciáli projektilov rôznych typov malokalibrového streliva môžu byť prakticky zúročené v medicínskych odboroch – súdnom lekárstve, chirurgii, či traumatológii, ako aj na úrovni kriminalisticko - expertízneho skúmania. Účinky priamoletiacich projektilov sú neustále podrobne analyzované a skúmané v rôznych jednoduchých aj zložitých experimentoch (1,2). Zraňujúci potenciál a účinok odrazených projektilov vo vzťahu k ľudskému telu však predstavuje menej zastúpenú oblasť zraňujúcej balistiky a taktiež experimentálnych prác. K štúdiu poranení spôsobených odrazenými projektilmi nás priviedol aj prípad streľby v Bratislave – Devínskej Novej Vsi z roku 2010, kedy bolo potrebné zodpovedať na otázku, či došlo účinkom projektilov vystrelených zo zbraňových systémov ozbrojených zložiek aj k zraneniam civilného obyvateľstva (3). Uvedenú problematiku je možné skúmať z hľadiska medicíny a súdnolekárskeho hodnotenia účinkov simuláciou v podmienkach balistického experimentu (4). Predexperimentálny matematický model zraňujúceho účinku odrazeného projektilu (5) dotvára komplexný pohľad na túto problematiku. Odrazený projektil, tzv. *ricochet* projektil, je projektil, ktorý sa odchýli od svojho smeru tým, že pred zasiahnutím postreleného subjektu kontaktuje istý vmedzerený objekt. Samotný odraz vystreleného projektilu od prekážky je pomerne zložitý dej, na ktorý vplývajú viaceré faktory: kaliber strely, jej tvar, konštrukcia, použitý materiál, hmotnosť, rýchlosť a uhol dopadu strely na prekážku, ako aj vlastnosti vmedzereného objektu (6,7). Balistický experiment s použitím biologického modelu (prasacieho stehna) ako substitúcie zraneného, postreleného objektu umožňuje získať dobre popísateľné a analyzovateľné výsledky, čomu prispievajú aj vysoko porovnateľné podmienky v biomechanických a histologických vlastnostiach biologických tkanív prasaťa a človeka (8). Cieľom našej práce je poukázať na vysoký potenciál zraňujúceho efektu odrazených striel náboja konkrétneho kalibru so zameraním sa na poranenia dlhých končatinových kostí.

Materiál a metódy

Vlastný balistický (strelecký) experiment bol realizovaný za účelom simulácie reálnej situácie z praxe zasahujúceho príslušníka Policajného zboru Slovenskej republiky (PZ SR). Išlo o experiment so sériou výstrelov z krátkej guľovej zbrane (KGZ) s neočakávaným zásahom steny panelového domu, alebo horizontálnej pevnej plochy (živicový povrch vozovky) s následným očakávaným odrazom projektilu. V experimente bol použitý zbraňový systém CZ vz. 82 a náboj kalibru 9 mm vz. 82, momentálne používaný vo výzbroji PZ SR. Dizajn experimentu bol zostavený tak, aby sa prioritne splnila podmienka bezpečnej realizácie série opakovaných výstrelov, reprodukovateľnosti výsledkov, ako aj nízkej finančnej náročnosti vybavenia streleckého stanovišťa. Usporiadanie balistického experimentu (meracieho reťazca) je zrejmé z obrázku č. 1. a bolo realizované podľa zaužívanej schémy aj iných autorov (9).



Obr. 1. Schéma usporiadania streleckého stanovišťa experimentu

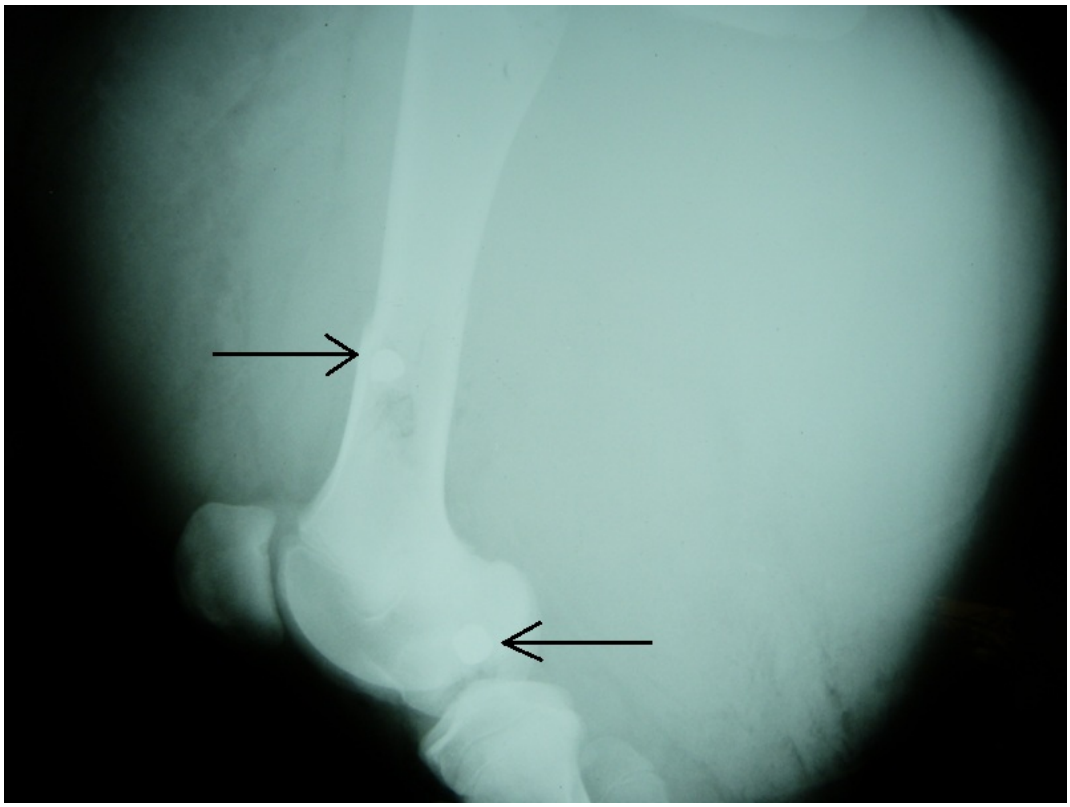
Priestor, kde prebiehala streľba bol ohraničený zadným záchytným valom o výške 5 metrov a bočnými záchytnými valmi o výške 2,5 metra. Na začiatok stanovišťa bol do jeho pozdĺžnej osi upevnený drevený kolík, ktorého vrchná časť sa nachádzala vo výške 140 cm nad zemským povrchom. Od tohto východzieho miesta bol do vzdialenosti 7 metrov horizontálne umiestnený betónový kváder o rozmeroch 50x50x10 cm, ktorým bola modelovaná stena obytného domu. Koncovou súčasťou experimentálnej balistickej sústavy bola kovová, pevná konštrukcia tvaru šibenice s hákmi, umiestnená do vzdialenosti 150 cm od zadnej plochy betónového kvádra, na ktorú sme jednotlivo pripevňovali biologické modely (kompletné prasacie stehná vrátane kože) orientované do ich anatomickej pozície. Takto bola vytvorená základná os streleckej experimentálnej sústavy, ktorú tvorili: ústie hlavne zbrane - betónový kváder - prasacie stehno. Športový strelec dodržujúci úplné požiadavky bezpečnosti držal oboma rukami zbraň opretú o pevnú oporu v podobe dreveného kolíka tak, aby ústie hlavne nepresahovalo hranu kolíka. Následne bola vedená mierená streľba na hornú plochu betónového kvádra, pričom vždy došlo k jeho zásahu a k následnému odrazeniu sa projektilu do pripevneného prasacieho stehna. Samotnému experimentu predchádzalo 10 nástrelov, kde bol namiesto prasacieho stehna pripevnený výkres formátu A2, určený na zachytenie a kalibráciu približného smeru pohybu projektilu po odraze, ako aj výšky od zemského povrchu pri danej vzdialenosti 150 cm od betónového kvádra. Kvôli zvýšeniu pravdepodobnosti zásahu heterogénneho biologického modelu bola z priemernej výšky odrazeného projektilu z 10 pokusov určená presná poloha modelu. Spolu boli postreľované 4 kusy prasacích stehien, pričom každý biologický model bol označený od 1. do 4.

Model č. 1 bol zasiahnutý 4 - krát, model č. 2 1 - krát, model č. 3 4 - krát a model č. 4 1 - krát. Biologický model č. 4 bol finálne zasiahnutý aj jedným priamym projektilom, pre možnosť neskoršieho porovnania charakteru strelných poranení. Zásahy v jednotlivých modeloch boli označené poradovými číslami zasiahnutia a bola realizovaná fotodokumentácia zasiahnutých modelov. Využitím *teórie plochých dráh striel* sme stanovili základné balistické parametre dráhy strely a predpokladaného zraňujúceho potenciálu odrazenej strely. Po každom výstrele bola zaznamenaná vzdialenosť stopy projektilu na betónovom kvádri od priemetu ústia hlavne zbrane na zem a výška zásahu na koži prasacieho stehna od zeme. Zasiahnuté modely boli následne zabalené do priesvitnej potravinárskej fólie a prevezené na súdnolekárske pracovisko Úradu pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou v Bratislave, kde bol každý model podrobený RTG snímkovaniu v dvoch na seba kolmých projekciách (predozadnej a bočnej). Miesta vstrelu, strelné kanály, strelné zlomeniny dlhej kosti (femur), ako aj finálne pozície projektilov (pri zástrele) a miesta výstrelov boli revidované preparáciou biologických modelov pitevnou technikou za účelom súdnolekárskeho zhodnotenia experimentu.

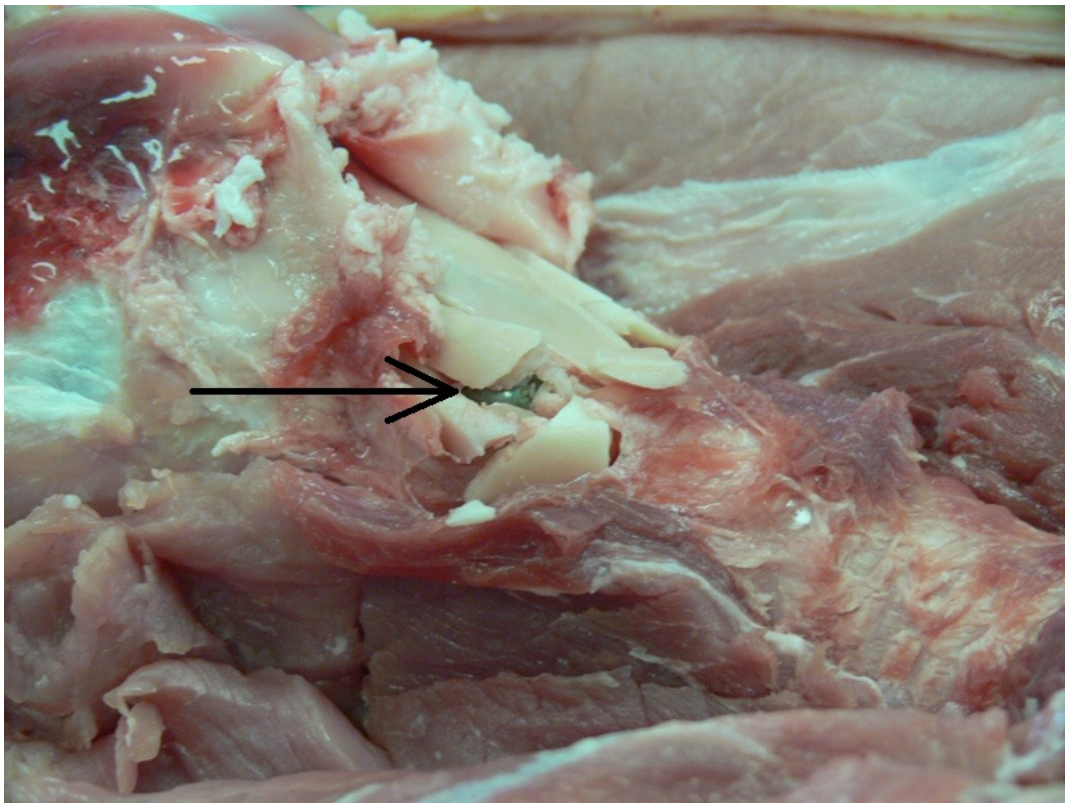
Výsledky

Na biologickom modeli č. 1 nedošlo k strelnej zlomenine femuru, čo sa preukázalo aj na RTG snímke, a to aj napriek štyrom zasiahnutiam modelu odrazeným projektilom. Na RTG snímke biologického modelu č. 2 nebolo preukázané zrejmé strelné poranenie stehnovej kosti, avšak po preparácii bol na diafýze kosti vizualizovaný defekt charakteru tangenciálneho ostrelu s vývojom motýľovitej lomnej línie.

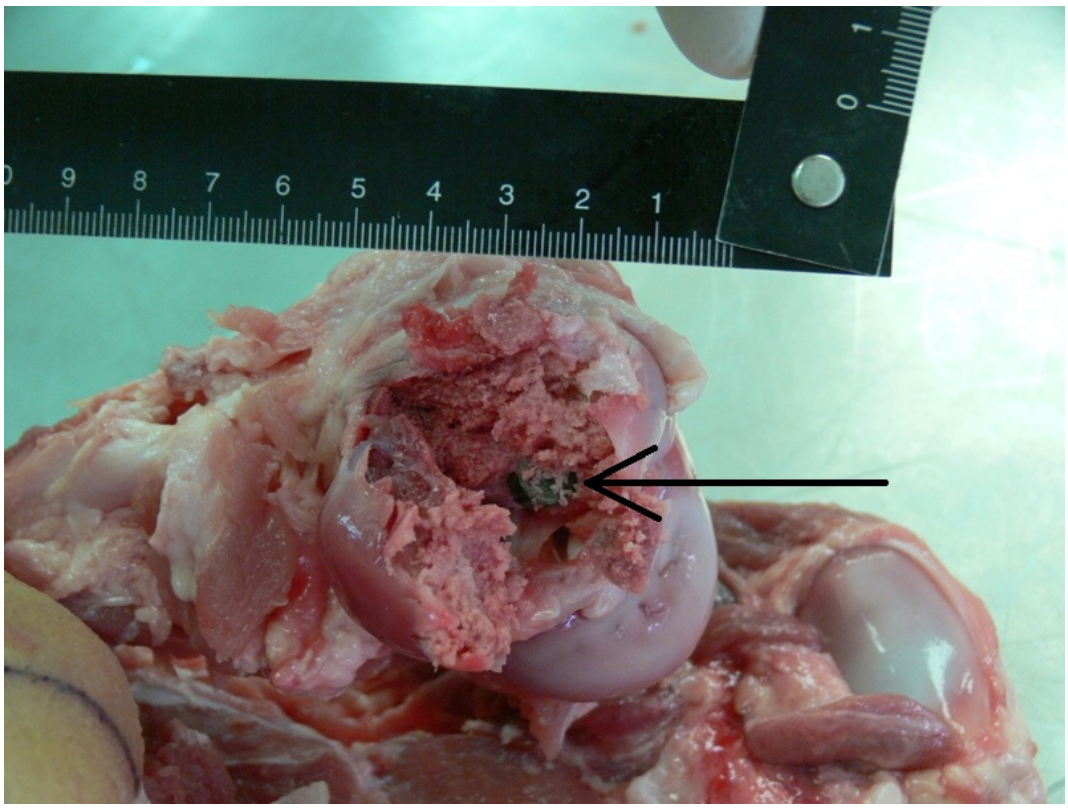
Na biologickom modeli č. 3 sme po vykonaní RTG snímkovania popísali viacnásobné poškodenie femuru v zmysle prítomnosti dvoch rôzne veľkých oválnych zatienení lokalizovaných v kosti, pričom jeden takýto útvar sa projikoval do hĺbky laterálneho kondylu femuru a ďalší bol popísaný v oblasti distálnej tretiny diafýzy, kde sa zistila aj porušená línia kosti imponujúca ako motýľovitá zlomenina (obr. 2). Vykonaním pitvy bolo verifikované, že v hĺbke 4,5 cm pod kožným krytom sa nachádza trieštivá zlomenina v distálnej tretine diafýzy femuru s motýľovitým priebehom trieštivých úlomkov, spôsobená prednou ogiválovou časťou projektilu pištoľového náboja kalibru 9 mm vz. 82 z homogénneho materiálu, približnej dĺžky 5 mm (obr. 3A). Ďalšou preparáciou kosti a priľahlého svalstva distálnym smerom bol odhalený defekt v oblasti laterálneho kondylu femuru nepravidelného kruhovitého tvaru s priemerom približne 4 cm a v hĺbke 3 mm od chrupavkového povrchu laterálneho kondylu femuru bol nájdený fragment projektilu bez jeho predného ogiválu, tvaru valca s približnou dĺžkou 6 mm (obr. 3B). Vizualizáciou poškodeného úseku kosti a jej extirpáciou zo stehenného svalstva bol bližšie popísaný komplexný strelný defekt vytvorený projektilom v kostnom tkanive prasacieho femuru. Po revízii a zhodnotení tohto strelného poranenia prasacieho femuru predpokladáme, že projektil vnikol po prieniku kožou do kosti cez laterálny kondyl femuru, kde došlo k jeho fragmentácii na dve nerovnaké časti - predný ogivál a zvyšnú valcovú časť. Ogivál po rozdelení prenikal tkanivom kosti približne 8 cm smerom proximálne a mierne mediálne až do oblasti distálnej tretiny diafýzy, kde spôsobil trieštivú zlomeninu s motýľovitého charakteru.



Obr. 2. Natívna RTG snímka biologického modelu č. 3, šípky ukazujú na oválne zatienenia (bočná projekcia)



Obr. 3A. Fotografia defektu diafýzy femuru spôsobeného ogiválom projektilu (šípka ukazuje na ogivál)



Obr. 3B. Fotografia defektu laterálneho kondylu femuru s viditeľným fragmentom projektilu (šípka ukazuje na fragment)

Na RTG snímke biologického modelu č. 4 bol popísaný kruhovitý defekt v oblasti distálnej epifýzy femuru. Pitva modelu preukázala, že ide o strelné poranenie – priestrel kosti v oblasti distálnej epifýzy femuru s kruhovitým vstrelom približného priemeru 1 cm typu *„drill hole“*, lokalizovaným na vonkajšej strane laterálneho epikondylu femuru a výstrelom v kosti nepravidelného tvaru, priemeru cca 1 cm, pričom lomná línia na chrupavkovom povrchu epikondylu smerovala asi 2,5 cm dovnútra kĺbovej dutiny. Bolo zistené, že projektil smeroval z laterálnej strany mediálne a došlo k priestrelu značnej časti laterálneho epikondylu femuru, izolovane - bez poškodenia ostatnej kosti, pričom strelný kanál mal dĺžku 4 - 5 cm. Priemetom pozície laterálneho epikondylu na povrch kože biologického modelu bolo ozrejmené, že toto strelné poranenie bolo spôsobené priamym - neodrazeným projektilom, ktorý bol vystrelený na biologický model priamo.

Diskusia

Z výsledkov realizovaného experimentu možno odvodiť, že sa naplno prejavila správnosť a účelnosť použitého zbraňového systému, ktorý predstavuje v služobnej činnosti Policajného zboru SR pomerne vysoký zraňujúci potenciál. Značne zaujímavým nežiadúcim fenoménom je fakt, že sa týmto poukázalo práve na jeho nechcené, ale žiaľ aj veľmi málo ovplyvniteľné účinky, ktoré však môžu byť zásadné pre zranenie okolitých náhodných osôb. V jednom z pokusov došlo po odraze projektilu od betónového kvádra a následnej penetrácii cez kĺbovú plochu stehnovej kosti k rozdeleniu projektilu na dve nerovnaké časti, s veľkou pravdepodobnosťou vplyvom homogénneho materiálu strely a ešte stále vysokej nadlimitnej rýchlosti (kinetickej energie) projektilu po odraze. Predná ogiválna časť rozdeleného projektilu pokračovala vo svojom prieniku vovnútri kosti až spôsobila klinicky preukázanú trieštivú zlomeninu diafýzy. Charakter strelných defektov odrazených projektilov na dlhej kosti vykazuje rovnaké tendencie vývoja lomnej línie kosti ako pri priamych účinkoch projektilov, t.j. *drill hole*, resp. *butterfly efekt* (10). V súvislosti s týmto reálnym experimentálnym poznatkom je nutné otvoriť diskusiu smerujúcu aj k otázke výberu zbraní a streliva príslušníkov Policajného zboru SR. Balistický experiment za daných podmienok výraznou mierou prispieva do odbornej diskusie ohľadom aplikácie modernejších zbraňových systémov do praxe Polície SR. Kľúčovým postupom k dostatočnej argumentácii na túto tému by rozhodne malo byť pokračovanie a sústavné zdokonaľovanie metodických postupov. Primárne by bolo vhodné potvrdiť a doplniť doterajšie zistenia na väčšom súbore modelov. V ďalších pokračujúcich experimentoch by použitie rýchlobežnej kamery bolo ich neoceniteľnou súčasťou za účelom spresnenia trajektórie strely a hodnotenia jej penetrácie tkanivom v čase a priestore, ako aj k verifikácii smerovania projektilu modelom, čím by bolo možné overiť morfologické hodnotenie poškodených anatomických štruktúr a podľa nich aj predpokladaný priebeh strelného kanála. Izolovanou a nadstavbovou etapou v ďalších experimentálnych štúdiách je použitie iného typu zbraňového systému, ktorého projektil by svojou konštrukciou a vlastnosťami dobre spĺňal požiadavky použitia v zastavaných aglomeráciách (napr. strely typu *frangible*).

Použitá literatúra

1. Moravanský N, Juříček L, Novomeský F, Kováč P, Zummerová A, Rekeň V: Forensic evaluation of wound ballistic experiment on human long bone model. Folia Societatis Medicinae Legalis Slovacae 2011; 1{1): 22–25.
2. Juříček L: Balistická simulace přímých účinků malorážových střel na kostní tkáně člověka. Brno, Sborník Univerzity obrany, řada „B“ 2/2004: 13-20.
3. Kuruc R, Šikuta J, Zummerová A, Bokor T, Moravanský N, Valent D, Šidlo J: The analysis of the causes and consequences of shooting in Bratislava. Folia Societatis Medicinae Legalis Slovacae 2011; 1{1): 105 – 110.
4. Krajsa J, Hirt M: Základní biologický model pro zkoušky ranivé balistiky. Soudní lékařství 2006; 51{4): 52-54.
5. Komenda J, Juříček L. Ranivá balistika. Brno, Vojenská akademie v Brně. 2003, 1-152.

6. Liška P: Posouzení ranivého účinku střelné zbraně v trestním řízení. Odborná sdělení Kriminalistického ústavu VB FSVB č. 7, Praha. 1980, 16-20.
7. Sellier K, Kneubuehl BP. Wundballistik und ihre ballistischen Grundlagen, 2. völlig überarbeitete und ergänzte Auflage. Berlin, Springer-Verlag. 2001, 1-526.
8. Schantz B: Aspects on the choice of experimental animals when reproducing missile trauma. Acta Chirurgica Scand Suppl 1979; 489: 121-130.
9. Kneubuehl BP: Das Abprallen von Geschossen aus forensicher Sicht. [These de doctorat]. Université de Lausanne. Thun, 1999: 1-148.
10. Swan KG, Swan RC. Gunshot Wounds: Pathophysiology and Management, 2. edition. Chicago, Year Book Medical Publishers. 1989, 1-261.

51. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI

KLINICKÁ SEKCIA

Hodnotiaca komisia

predseda: **doc. MUDr. Ľudovít Gašpar, CSc.**
členovia: **doc. MUDr. Martin Wawruch, PhD.**
MUDr. Svetoslav Štvrtina, PhD.

1. miesto
Štefan Lukáč
Úloha oxidačného a nitračného stresu v patogenéze sclerosis multiplex.

2. miesto
Katarína Krivošíková
Hodnoty krvného tlaku vo vzťahu k vitamínu D.

3. miesto
Giorgos Siskos, Joana Gomes
Correlation between laboratory findings in patients with liver cirrhosis and final histopathological diagnosis.

7. Orálna mikroflóra a salivárne markery oxidačného stresu pri stomatologických ochoreniach

Helena Fábryová
(všeobecné lekárstvo, 1.ročník)

Spoluautori: Mgr. Natália Kamodyová[1]
Školiteľ: RNDr. Ľubomíra Tóthová, PhD[1]
[1] Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

Úvod

Prevalencia zubného kazu a periodontitídy je vysoká. Patogenéza periodontitídy a zubného kazu je pomerne známa. Periodontitída je považovaná za zápalovú reakciu v dôsledku prítomnosti patogénnych mikroorganizmov v ústnej dutine, čo sa spája aj so zvýšeným oxidačným stresom [1]. Preto je z pohľadu molekulárnej biológie a klinickej stomatológie potrebné zaoberať sa metódami na identifikáciu mikroorganizmov nachádzajúcich sa v ústnej dutine a markermi oxidačného stresu, ktoré sú merateľné v sline. Slina má ako diagnostická tekutina mnohé výhody (jednoduchý a opakovaný odber, pomer zložiek analogický s plazmou, vytvára prostredie ústnej dutiny) [2].

Analýza terminálnych dĺžkových polymorfizmov restrikčných fragmentov (the restriction fragment lenght polymorphism – t-RFLP) je metóda, ktorá umožňuje sledovať diverzitu komplexných bakteriálnych spoločenstiev. Terminálne restrikčné fragmenty majú rôznu dĺžku charakteristickú pre rôzne bakteriálne druhy bakteriálneho spoločenstva. T-RFLP analýza umožňuje mapovať globálnu orálnu mikroflóru, ktorá môže byť charakteristická pre jednotlivé stomatologické ochorenia [3].

Oxidačný stres je narušenie rovnováhy medzi reaktívnymi metabolitmi kyslíka a antioxidačnou kapacitou bunky. Boli zistené asociácie medzi oxidačným stresom a niektorými patofyziologickými procesmi [4]. Táto práca sa zaoberá markermi peroxidácie lipidov (thiobarbituric acid reactive substances - TBARS; spolu s malondialdehydom - MDA sú najčastejšie meranými markermi oxidačného stresu vôbec), oxidácie proteínov (advanced oxidation protein products - AOPP), karbonylového stresu (advanced glycation end products - AGEs) a markermi celkového antioxidačného statusu (total antioxidant capacity - TAC, the ferric reducing ability of saliva - FRAS). Cieľom tejto práce je porovnať markery oxidačného stresu a orálnu mikroflóru pacientov bez mikrobiálneho ochorenia a zjavného aktívneho ochorenia zubných tkanív (ďalej len kontrola) s pacientmi s periodontitídou a pacientmi so zubným kazom.

Materiál a metódy

Nestimulované sliny odoberané klinickým stomatológom boli získané od pacientov, ktorým boli extrahované zuby (23 žien vo veku 19-70 rokov a 20 mužov vo veku 18-62 rokov). Následne bola identifikovaná základná príčina ochorenia vedúceho k extrakcii zubov a pacienti boli zaradení do 3 skupín: 1. kontrola, 2. s periodontitídou a 3. so zubným kazom. Vzorky slín aj zubov boli po odbere zmrazené na -20°C.

Zuby boli inkubované 30 minút pri 37°C v tlmivom fosfátovom roztoku(phosphate buffer saline - PBS). Zuby boli odobrané a obsah skúmavky bol centrifugovaný pri 15 500 g 30 minút. Pelet bol rozsuspendovaný v 200 µl PBS a použitý na izoláciu DNA kitom QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Nemecko) podľa inštrukcií výrobcu (DNA Purification from Blood or Body Fluids, príručka 04/2010). Analogicky bola izolovaná aj DNA z 200 µl celej necentrifugovanej sliny.

Vyizolované DNA boli použité na amplifikáciu 16S rDNA s využitím bakteriálnych primerov 27F a 1492R. PCR produkty boli štiepené reštrikčnou endoukleázou FastDigest HhaI (Fermentas, Litva).

T-RFLP fragmenty boli ďalej spracované pomocou kapilárnej elektroforézy. Elektroforetogramy boli spracované v programe Genemapper. Na zostrojenie dendrogramov bol použitý program Bionumerics.

Markery oxidačného stresu boli stanovené pomocou spektrofotometrických a spektrofluorometrických analýz v 96-jamkových platničkách. Markery oxidačného stresu (TBARS a AOPP), markery karbonylového stresu (AGEs) a markery antioxidačného statusu (FRAP a TAC) boli stanovené pomocou metód použitých v článku Celeca a kol. [5]. Na merania bol použitý platničkový spektrofotometer (Safire II, Tecan, Rakúsko). Na štatistické vyhodnotenie meraní bola použitá jednosmerná ANOVA a Tukeyho post-hoc test.

Výsledky

V dendrogramoch z t-RFLP neboli pacienti zoradení do klastrov podľa diagnostikej skupiny. V strome zostrojenom z t-RFLP profilov zo slín boli pacienti s periodontitídou zaradení do klastrov s pacientmi so zubným kazom aj s kontrolou. V strome zostrojenom z t-RFLP profilov zo zoškrabov zubov probandi neboli zaradení do klastrov podľa diagnostickej skupiny a zaradenie nekorelovalo s dendrogramom zostrojeným z t-RFLP profilov zo slín (dáta nie sú prezentované vo výsledkoch).

Priemerné salivárne koncentrácie (ďalej iba koncentrácie) TBARS boli v tejto práci v jednotlivých skupinách stanovené nasledovne: kontrola ženy 9.94 µmol/l; kontrola muži 1.6 µmol/l (16% z koncentrácie stanovenej u žien); ženy so zubným kazom 7.15 µmol/l; muži so zubným kazom 6.85 µmol/l (95% z koncentrácie stanovenej u žien; ženy s periodontitídou 11.89 µmol/l; muži s periodontitídou 13.35 µmol/l (112% z koncentrácie stanovenej u žien). V porovnaní s kontrolami bola u žien so zubným kazom koncentrácia TBARS znížená na 71.93% a u žien s periodontitídou zvýšená na 119.62%. V porovnaní s kontrolami bola u mužov so zubným kazom koncentrácia TBARS zvýšená na 328% (štatisticky nesignifikantný rozdiel; ďalej P=ns) a u mužov s periodontitídou na 734% (P<0,05; pozri Obr.č.:1). Štatistická významnosť rozdielov koncentrácií markerov medzi všetkými tromi skupinami probandov, stanovená na základe jednosmerného ANOVA testu je uvedená v Tab.č.:1.

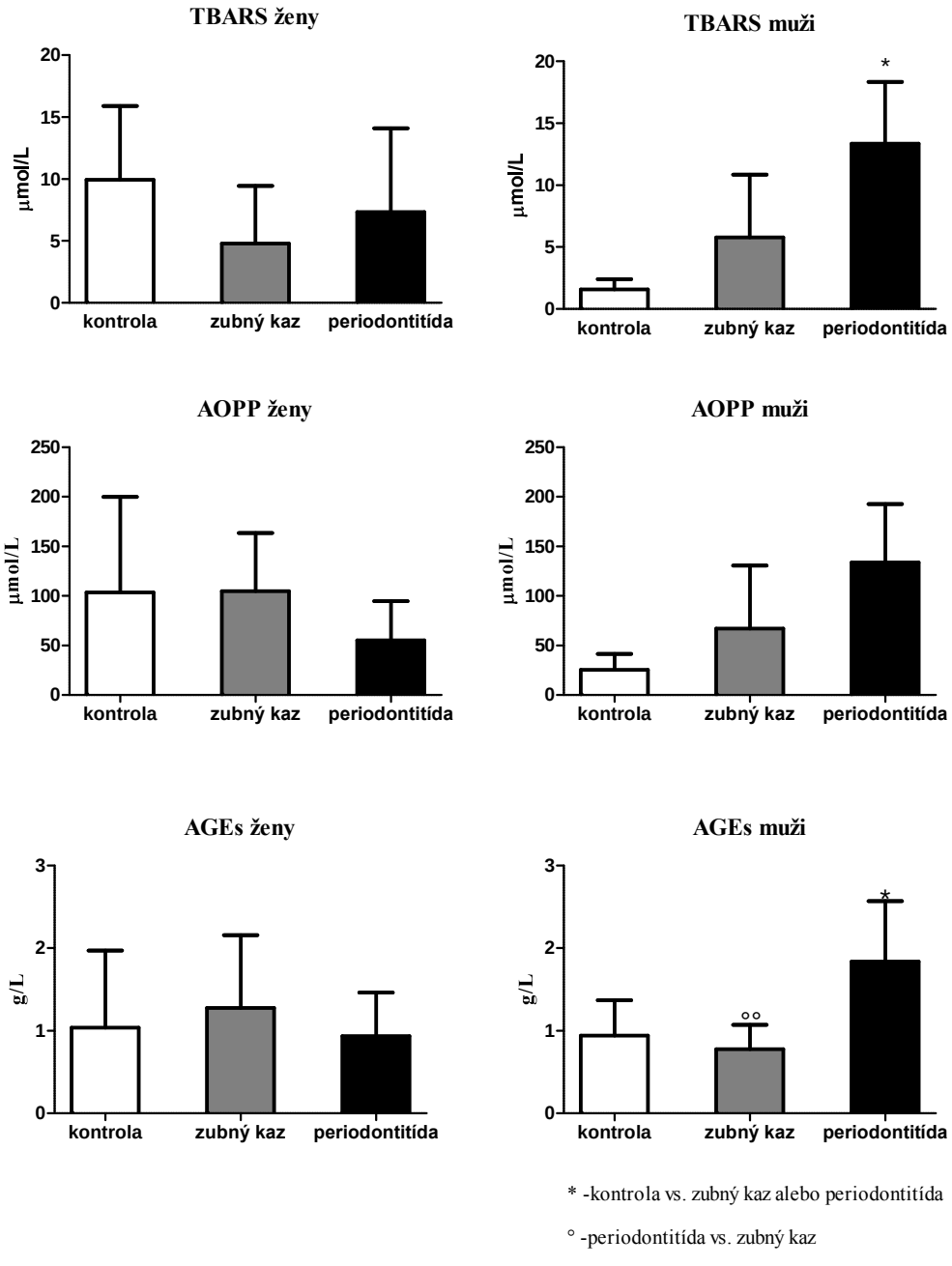
Priemerné koncentrácie markerov pokročilej oxidácie proteínov boli u kontroly a žien so zubným kazom porovnateľné (103.74 a 104.74 µmol/l), rozdiel bol vo veľkosti štandardnej odchýlky. V skupine žien s periodontitídou bola koncentrácia znížená na 53.21% (P=ns) koncentrácie u kontroly. U mužov bola priemerná koncentrácia v porovnaní s kontrolou u pacientov so zubným kazom zvýšená na 326% (P=ns) a u pacientov s periodontitídou zvýšená na 526% (P=ns; pozri Obr.č.:1).

Priemerné koncentrácie AGEs u žien boli porovnateľné (1.04; 1.28 a 0.94 g/l). U mužov bola v porovnaní s kontrolami priemerná koncentrácia u pacientov so zubným kazom znížená na 81.92% (P=ns) a u pacientov s periodontitídou zvýšená na 195% (P<0,05; pozri Tab.č.:1).

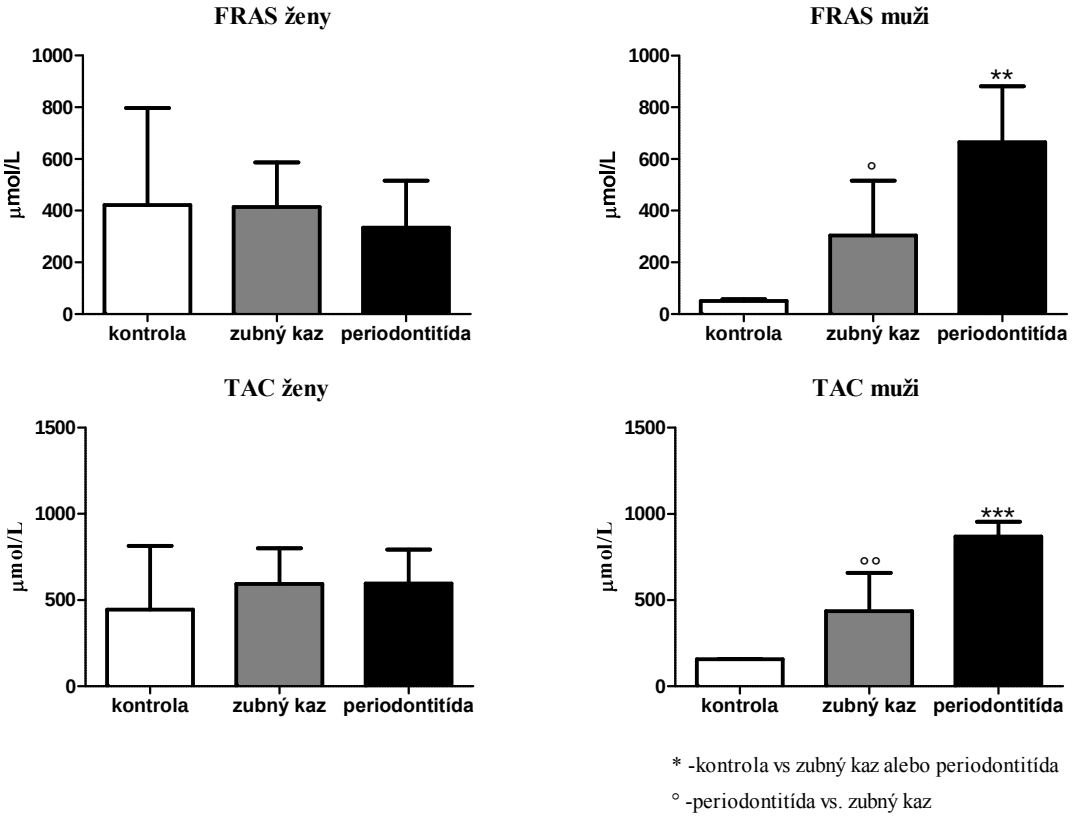
Pri markeroch antioxidačného statusu boli priemerné hodnoty koncentrácie u žien porovnateľné, bez štatisticky signifikantných rozdielov (pozri Tab.č.:1). Pri FRAS bola koncentrácia v porovnaní s kontrolami u mužov so zubným kazom zvýšená na 606% (P=ns) a u mužov s periodontitídou bola zvýšená na 1328% (P<0,001). Pri TAC bola koncentrácia v porovnaní s kontrolami u mužov so zubným kazom zvýšená na 278% (P=ns) a u mužov s periodontitídou na 553% (P<0,001) (pozri Obr.č.:2).

Tab. č.:1: Štatistická významnosť rozdielov salivárnych koncentrácií markerov oxidačného stresu (jednosmerná ANOVA) po porovnaní všetkých troch stomatologických skupín

Marker	ženy		muži	
	P hodnota	F hodnota	P hodnota	F hodnota
TBARS	0,385	1,01	0,025	4,97
AGEs	0,667	0,42	0,002	9,40
AOPP	0,251	1,49	0,802	3,04
FRAS	0,752	0,29	0,004	8,05
TAC	0,493	0,73	0,0004	13,43



Obr.:1: Salivárne koncentrácie markerov oxidačného poškodenia lipidov, proteínov a karbonylového stresu



Obr.:2: Salivárne koncentrácie markerov celkového antioxidačného statusu

Diskusia

Oxidačný status zrejme nie je asociovaný so zubným kazom, ale periodontitídou, pretože ide o zápalový proces, ktorý je induktorom oxidačného stresu [2]. Táto asociácia je naznačená aj v tejto práci, kde sme sledovali zvýšené koncentrácie markerov celkového antioxidačného statusu aj u pacientov so zubným kazom, no výraznejšie u pacientov s periodontitídou.

Signifikantné rozdiely medzi všetkými tromi diagnostickými skupinami boli v tejto práci zistené iba u mužov pri markeroch karbonylového stresu (AGEs) a pri markeroch celkového antioxidačného statusu (TAC, FRAS). V slinách mužov so zubným kazom bola stanovená nižšia a s periodontitídou vyššia koncentrácia AGEs oproti kontrole. Koncentrácie markerov FRAS a TAC boli najvyššie u mužov s periodontitídou a u mužov so zubným kazom boli vyššie ako u kontroly, no výrazne nižšie ako u mužov s periodontitídou. Pravdepodobne ide o kompenzačný mechanizmus k zvýšenej produkcií voľných radikálov. Práce zaoberajúce sa vzťahom salivárnej koncentrácie markerov TAC a periodontitídy uvádzajú rozdielne závislosti [6, 7]. Koncentrácie TAC boli sledované u detí a bolo preukázateľné, že stúpajú s vekom a sú vyššie u detí so zubným kazom [8]. Sledovaním koncentrácie TAC možno určiť náchylnosť na zubný kaz [9].

Koncentrácie markerov oxidačného stresu sú u pohlaví odlišné [10]. Zvýšené koncentrácie MDA boli pozorované pri pacientoch s periodontitídou [1]. V tejto práci bol zistený ten istý trend len u mužov, aj keď štatisticky nesignifikantne, čo môže byť dôsledok veľkých štandardných odchýlok. V niektorých vzorkách bola prítomná krv, čo môže mať výrazný vplyv na výsledky meraní oxidačného stresu (Kamodyová 2011, nepublikované výsledky). Tieto fakty naznačujú, že tento marker je využiteľný skôr pri populačných štúdiách ako diagnostike [10]. V databáze PubMed zatiaľ nebola indexovaná žiadna práca, ktorá by sa zaoberala vzťahmi medzi koncentráciami AOPP a stomatologickými ochoreniami. Oxidačný stres by sa dal pravdepodobne znížiť aplikovaním antioxidačnej terapie

(vitamín E, koenzým Q) [2]. Markery oxidačného stresu v sline však ovplyvňuje viacero faktorov, ako napríklad prítomnosť krvi, ale aj rôzne systémové ochorenia [10, 11].

Táto práca má niekoľko limitácií. Pracovalo sa so staršími vzorkami (žiadna práca indexovaná v databáze PubMed sa zatiaľ nezaoberala vplyvom dlhodobého skladovania vzoriek na hladinu markerov oxidačného stresu v sline). AGEs a TBARS predstavujú nehomogénnu skupinu chemických látok, a preto sú ako markery oxidačného stresu nešpecifické [12]. Populácia, ktorá sa zúčastnila pokusu, bola vekovo nehomogénna.

V dendrogramoch klastre nerozlišovali medzi kontrolou a pacientmi s periodontitídou, resp. zubným kazom, podobne ako v práci Sakamota a kol [13]. Môže to naznačovať zle zvolenú metódu ich konštrukcie a/ alebo štiepenie nevhodnou nukleázou. V ďalších prácach by bolo potrebné pracovať s inou nukleázu, resp. kombináciou nukleáz.

Aplikácia metódy t-RFLP vyžaduje ďalšiu optimalizáciu. Metóda t-RFLP má niekoľko limitácií. Píky, ktoré sú získané na základe t- RFLP analýzy nie je možné jednoznačne priradiť ku konkrétnemu mikroorganizmu. Dáta z rôznych analýz sa nedajú medzi sebou porovnávať. Pomocou tejto metódy je možné sledovať výskyt najmä dominantných predstaviteľov orálnej mikroflóry, ale nie jej dynamické zmeny [14]. Ďalšie limitácie tejto metódy vyplývajú z problémov mobility vzoriek na kapilárnej elektroforéze [3].

Skúmať markery oxidačného stresu pri stomatologických ochoreniach môže objasniť ich patológiu, ale aj dôsledok zmien v stave ústnej dutiny pri zdanlivo nesúvisiacich systémových ochoreniach [10, 11]. T-RFLP je metódou, ktorá bude pravdepodobne postupne nahradená high-throughput sekvenovaním [14], no momentálne je jednoduchšou alternatívou poskytujúcou dostatok informácií na porovnávanie orálnej mikroflóry pri rôznych stomatologických ochoreniach [15].

Použitá literatúra

1. Akalin, F.A., et al., Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. J Clin Periodontol, 2007. **34**(7): p. 558-65.
2. Battino, M., et al., Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. Crit Rev Oral Biol Med, 1999. **10**(4): p. 458-76.
3. Takeshita, T., Y. Nakano, and Y. Yamashita, Improved accuracy in terminal restriction fragment length polymorphism phylogenetic analysis using a novel internal size standard definition. Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(6): p. 419-28.
4. Dalle-Donne, I., et al., Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem, 2006. **52**(4): p. 601-623.
5. Celec, P., et al., Oxidative and carbonyl stress in patients with obstructive sleep apnea treated with continuous positive airway pressure. Sleep Breath, 2011.
6. Brock, G.R., et al., Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. J Clin Periodontol, 2004. **31**(7): p. 515-21.
7. Su, H., et al., Salivary DNA, lipid, and protein oxidation in nonsmokers with periodontal disease. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(7): p. 914-21.
8. Hegde, A.M., K. Rai, and V. Padmanabhan, Total antioxidant capacity of saliva and its relation with early childhood caries and rampant caries. J Clin Pediatr Dent, 2009. **33**(3): p. 231-4.
9. Kumar, D., R.K. Pandey, and D. Agrawal, An estimation and evaluation of total antioxidant capacity of saliva in children with severe early childhood caries. Int J Paediatr Dent, 2011. **21**(6): p. 459-64.

10. Behuliak, M., et al., Variability of thiobarbituric acid reacting substances in saliva. Dis Markers, 2009. **26**(2): p. 49-53.
11. Matough, F.A., et al., The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. Sultan Qaboos Univ Med J, 2012. **12**(1): p. 5-18.
12. Lykkesfeldt, J., Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. Clin Chim Acta, 2007. **380**(1-2): p. 50-8.
13. Sakamoto, M., et al., Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. J Med Microbiol, 2003. **52**(Pt 1): p. 79-89.
14. Hamady, M. and R. Knight, Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. Genome Res, 2009. **19**(7): p. 1141-52.
15. Sakamoto, M., et al., Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. Journal of Medical Microbiology, 2003. **52**(1): p. 79-89.

8. Hodnoty krvného tlaku vo vzťahu k vitamínu D

Katarína Krivošíková
(všeobecné lekárstvo, 3. ročník)

Školiteľ: Prof. MUDr. Viera Štvrtinová, CSc.[1]; doc. MUDr. Martin Gajdoš, PhD.[2]
[1] II. interná klinika LFUK
[2] Oddelenie klinickej a experimentálnej farmakoterapie SZU

Úvod

Vitamín D je hormón, ktorý sa tvorí predominantne v koži (vitamín D_3), a len minimálne množstvo získavame z potravy (vitamín D_2 a D_3). Obidve formy sa hydroxylujú najprv v pečeni na 25(OH)D, a potom v obličke na aktívnu formu $1,25(OH)_2D$. Vitamín D patrí medzi kalciotropné hormóny a jeho primárnou úlohou je regulácia účinnosti črevnej resorpcie vápnika a zabudovávanie vápnika do kosti. Deficit vitamínu D spôsobuje zníženie resorpcie vápnika z tenkého čreva, čo vedie ku zvýšeniu tvorby a uvoľňovaniu PTH do krvného obehu. PTH zvýši tubulárnu resorpciu vápnika v obličke, vyplavovanie vápnika z kosti a tiež zvýši tvorbu $1,25(OH)_2D$, vďaka čomu opätovne navodí vápnikovú homeostázu (1). Cirkulujúci $1,25(OH)_2D$ sa viaže na vitamín D receptor (VDR), ktorý sa vzápäti viaže na receptor kyseliny retinovej a slúži ako jadrový transkripčný faktor, ktorý priamo alebo nepriamo reguluje mnohé gény. VDR boli identifikované aj v ďalších bunkách, tkanivách a orgánoch, ktoré nie sú spojené s vápnikovou homeostázou a kostným metabolizmom. Vitamín D má tak širokú škálu biologických účinkov, ako je inhibícia proliferácie buniek, inhibícia angiogenézy, stimulácia produkcie inzulínu a mnohé iné (1). Jedným z ďalších účinkov je aj vplyv vitamínu D na krvný tlak.

Cieľom našej práce bolo zistiť hodnoty krvného tlaku vo vzťahu k vitamínu D vo vybranej populácii zdravých dobrovoľníkov z Bratislavy a okolia.

Materiál a metódy

Do retrospektívnej štúdie bolo zahrnutých 671 subjektívne zdravých probandov (506 Ž/ 165 M) vo veku od 15 do 81 rokov. Na analýzu sme využili údaje o systolickom a diastolickom tlaku, plazmatických koncentráciách 25(OH)D ako aj základné antropometrické údaje (vek, výška, hmotnosť, BMI) a fajčenie. Exklúzne kritériá boli: akékoľvek diagnostikované a liečené závažné ochorenie, suplementácia vitamínom D alebo iným výživovým doplnkom obsahujúcim vitamín D počas najmenej dvoch mesiacov pred zaradením do sledovania a účasť na štúdii v období od mája do októbra včítane.

Vitamín D status sme hodnotili ako optimálny (> 60 ng/ml), dostatočný (30-59 ng/ml), nedostatočný (20-29 ng/ml) a deficitný (< 20 ng/ml) (2).

Na štatistické analýzy sme použili softvér SPSS, verzia 12.

Výsledky

Údaje o pohlaví, veku, fajčení, BMI, STK, DTK a 25(OH)D sú uvedené v tabuľke 1. Spojité premenné sme vyjadrovali ako priemer ± SD. U jednotlivých pohlaví sme nezistili významný rozdiel v percentuálnom zastúpení fajčiarov.

Muži mali štatisticky významne vyššie hodnoty BMI, STK a DTK ako aj plazmatické koncentrácie 25(OH)D.

Pri hodnotení statusu vitamínu D sme zistili vysokú prevalenciu nedostatočnej a deficitnej plazmatickej koncentrácie 25(OH)D v celom súbore, z toho u mužov 47% a u žien 68%. Dostatočnú až optimálnu koncentráciu 25(OH)D sme našli len u 32% žien, čo je štatisticky významne menej než u mužov (53%) (graf 1-2).

Korelačná analýza (Spearmanov test) (tabuľka 1) ukázala štatisticky významné korelácie medzi 25(OH)D a STK (graf 3), vekom a BMI. Vzťah medzi 25(OH)D a DTK sa nenašiel (tabuľka 2, graf 4).

Všeobecný lineárny model sme použili na modelovanie vplyvu veku, BMI, 25(OH)D, pohlavia a fajčenia na hodnoty STK a DTK. V prípade STK sa ukázal štatisticky významný vplyv veku ($p< 0,001$), BMI ($p< 0,001$) a 25(OH)D ($p= 0,032$). Vprípade DTK sa ukázal štatisticky významný vplyv veku ($p< 0,001$), BMI ($p<0,001$) a pohlavia ($p= 0,013$).

	Ženy	Muži	p <
N (%)	506	165	0,001
Fajčiari (%)	105 (20,8)	44 (26,7)	ns
Vek (roky)	38,2 (17,7)	35,8 (14,9)	ns
BMI	24,2 (5,2)	26,9 (4,5)	0,0001
STK (mmHg)	128,5 (21,3)	129,9 (14,5)	0,001
DTK (mmHg)	76,1 (9,2)	78,8 (9,0)	0,003
25(OH)D (ng/ml)	26,4 (13,8)	33,3 (15,7)	0,0001

Tab. 1: Charakteristika súboru rozdeleného podľa pohlavia.

			TK-S	TK-D
Spearman's rho	**Vek**	**Correlation Coefficient**	**,599**	**,358**
		Sig. (2-tailed)	**,000**	**,000**
		N	**671**	**671**
	BMI	**Correlation Coefficient**	**,516**	**,389**
		Sig. (2-tailed)	**,000**	**,000**
		N	**671**	**671**
	25(OH)D	**Correlation Coefficient**	**-,117**	**,028**
		Sig. (2-tailed)	**,002**	**,465**
		N	**671**	**671**

Tab. 2: Spearmanove korelácie medzi krvným tlakom, vekom, BMI a 25(OH)D.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: TK-S

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	126552,467(a)	6	21092,078	102,170	,000
Intercept	158051,814	1	158051,814	765,602	,000
25(OH)D	957,478	1	957,478	4,638	,032
vek	63620,608	1	63620,608	308,178	,000
BMI	5780,626	1	5780,626	28,001	,000
Pohlavie	411,666	1	411,666	1,994	,158
Fajčenie	342,825	1	342,825	1,661	,198
Pohlavie * Fajčenie	30,828	1	30,828	,149	,699
Error	137076,958	664	206,441		
Total	11395968,000	671			
Corrected Total	263629,425	670			

a R Squared = ,480 (Adjusted R Squared = ,475)

Tab. 3: Modelovanie vplyvu 25(OH)D, veku, BMI, pohlavia, fajčenia a interakcie medzi pohlavím a fajčením na TK-S.

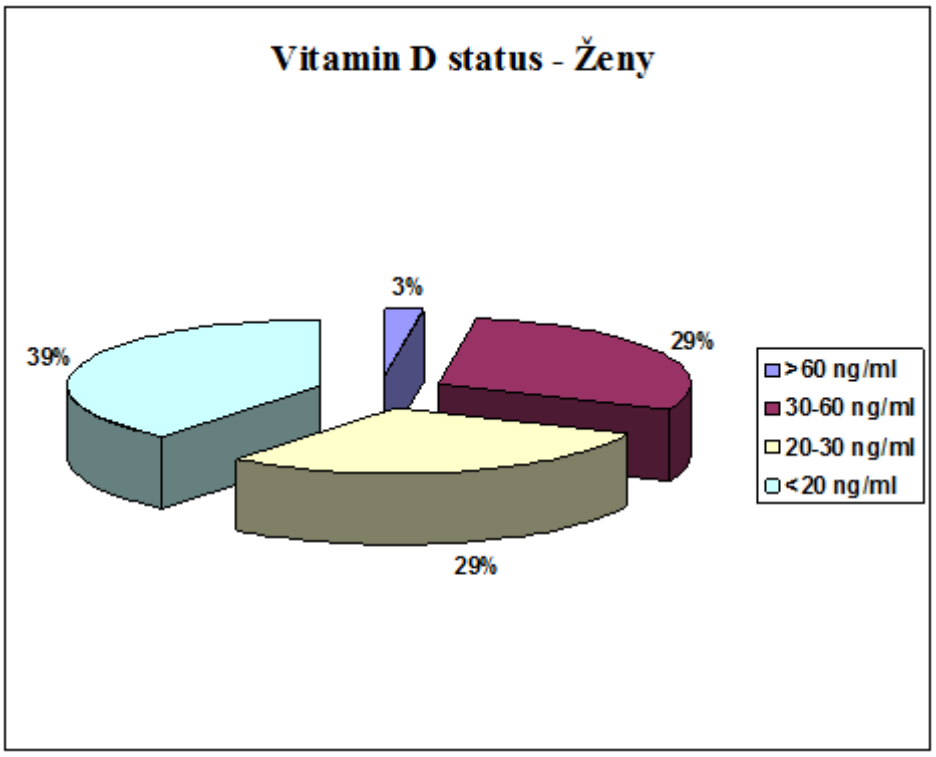
Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: TK-D

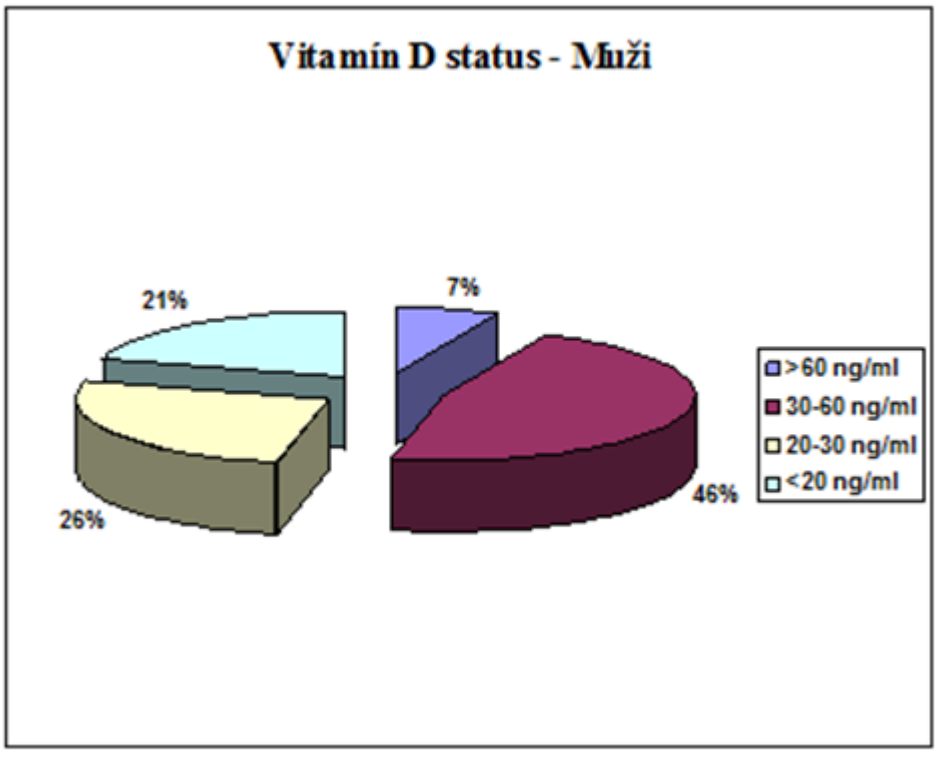
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	11232,451(a)	6	1872,075	26,976	,000
Intercept	73481,067	1	73481,067	1058,829	,000
25(OH)D	155,986	1	155,986	2,248	,134
vek	2485,428	1	2485,428	35,814	,000
BMI	2401,041	1	2401,041	34,598	,000
Pohlavie	432,802	1	432,802	6,236	,013
Fajčenie	210,777	1	210,777	3,037	,082
Pohlavie * Fajčenie	170,498	1	170,498	2,457	,117
Error	46080,568	664	69,398		
Total	4012452,000	671			
Corrected Total	57313,019	670			

a R Squared = ,196 (Adjusted R Squared = ,189)

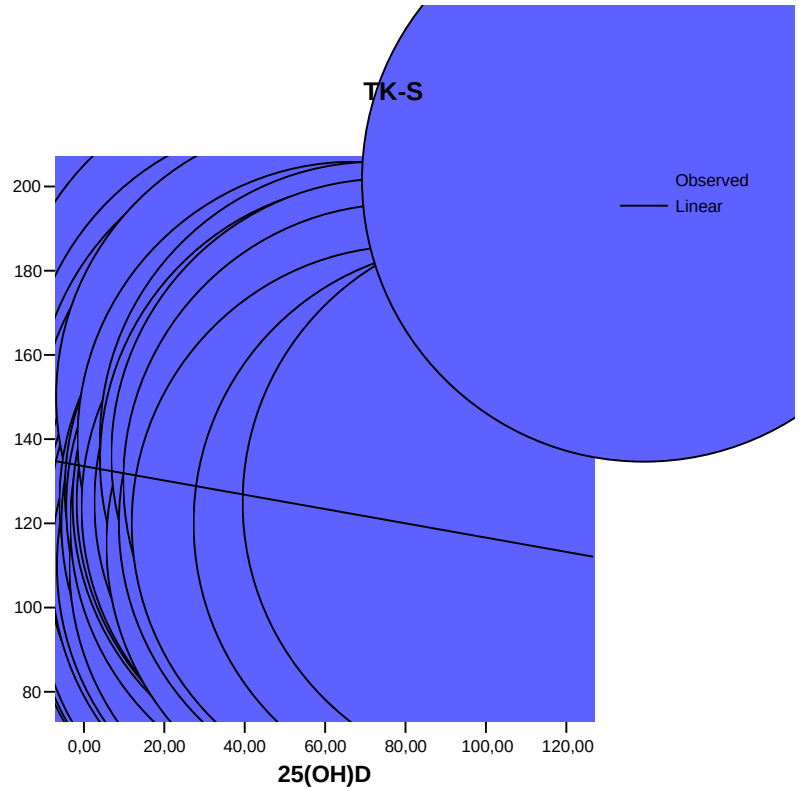
Tab. 4: Modelovanie vplyvu 25(OH)D, veku, BMI, pohlavia, fajčenia a interakcie medzi pohlavím a fajčením na TK-D.



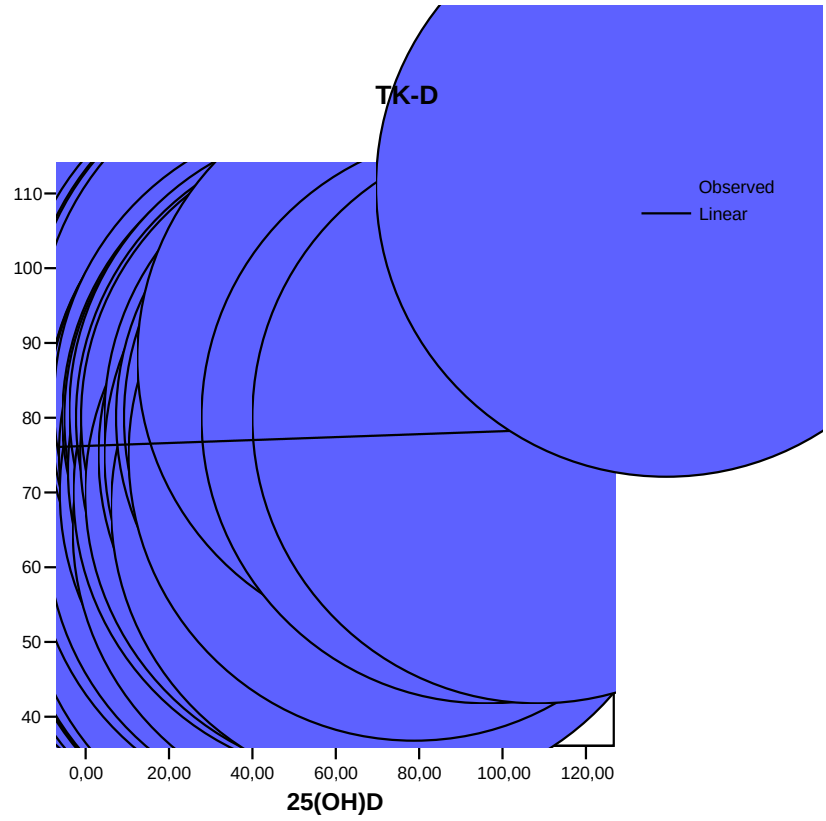
Graf 1: Percentuálne zastúpenie žien v skupinách podľa plazmatických koncentrácií 25(OH)D.



Graf 1: Percentuálne zastúpenie mužov v skupinách podľa plazmatických koncentrácií 25(OH)D.



Graf 3: Závislosť TK-S od plazmatickej koncentrácie 25(OH)D.



Graf 4: Závislosť TK-D od plazmatickej koncentrácie 25(OH)D.

Diskusia

Deficit 25(OH)D je celosvetový problém, ktorý odhadom postihuje približne 40% dospelej populácie a viac ako 50% ľudí vo vyššom veku (3,4). Podobne je to aj s hypertenziou. Podľa Sninčáka a spol., na Slovensku je prevalencia hypertenzie v populácii 25-64 ročných 41,4% so stúpajúcou tendenciou (5). Otázke vzťahu medzi nízkymi plazmatickými koncentráciami 25(OH)D a hypertenziou sa v poslednom období venovalo veľa pozornosti. Ukázalo sa, že nedostatočné a deficitné plazmatické koncentrácie 25(OH)D významne korelujú s hypertenziou (4). Podľa štúdie NHANES III, priemerný STK bol približne o 3 mmHg nižší u osôb s najvyšším kvartilom 25(OH)D v porovnaní s osobami v najnižšom kvartile (6). V štúdii Sugdena a spol. podanie jednej dávky 100 00 IU vitamínu D_2 pacientom, ktorí mali diabetes typu 2 a zároveň nízke koncentrácie 25(OH)D, znížilo STK o 14 mmHG (7). Možných mechanizmov účinku vitamínu D na krvný tlak je niekoľko. $1,25(OH)_2D$ inhibuje RAAS aj NF-κB signálnu dráhu, ktoré podporujú produkciu profibrotických a prozápalových faktorov, zvyšujú oxidačný stres a poškodzujú podocyty, čo prispieva k zvyšovaniu krvného tlaku (8). Okrem toho vitamín D pôsobí preventívne na vznik sekundárnej hyperparatyreózy, má priamy účinok na cievne bunky a funkciu endotelu (9).

V našom súbore sme zistili vysokú prevalenciu nedostatku až deficitu 25(OH)D s prevahou u žien. Zistili sme tiež štatisticky významný inverzný vzťah medzi STK a 25(OH)D nezávisle od veku, BMI, pohlavia a fajčenia. To znamená, že nízka plazmatická koncentrácia 25(OH)D významne súvisí so zvyšovaním systolického krvného tlaku, aj keď berieme do úvahy známe účinky vyššieho veku, obezity, fajčenia a príslušnosť k mužskému pohlaviu na vznik hypertenzie (10).

Nedostatky tejto štúdie spočívajú hlavne v nerovnomernom zastúpení mužov a žien v súbore a nerovnakom počte probandov v jednotlivých vekových skupinách. V ďalšom sledovaní by preto bolo vhodné rozšíriť skupinu mužov a doplniť počty podľa veku.

Záver

Zistený deficit vitamínu D v slovenskej populácii je alarmujúco vysoký, pričom úzko súvisí so zvýšeným systolickým krvným tlakom, nezávisle od známych rizikových faktorov hypertenzie. Štúdium vzťahu vitamínu D ku krvnému tlaku má veľký význam hlavne z dôvodu potenciálnych klinických dopadov. Stanovenie plazmatických koncentrácií 25(OH)D je relatívne dostupné a suplementácia vitamínom D, ktorá je potrebná hlavne v zimnom období, nie je finančne náročná. Udržiavanie optimálnej plazmatickej koncentrácie 25(OH)D by tak mohlo napomôcť v prevencii a liečbe hypertenzie.

Poďakovanie

Autori ďakujú RNDr. L. Wsólovej, PhD. za pomoc pri štatistickom vyhodnotení súboru. Práca bola finančne podporená projektom Ministerstva zdravotníctva „Vplyv genetických a environmentálnych faktorov na prevalenciu včasnej inzulínovej rezistencie".

Použité skratky

25(OH)D	25-hydroxyvitamín D, kalcidiol
$1,25(OH)_2D$	1,25-dihydroxyvitamín D, kalcitriol
BMI	body mass index
DTK	diastolický tlak krvi
STK	systolický tlak krvi
PTH	parathormón
RAAS	renín-angiotenzín-aldosterónový systém

NF-κB	jadrový transkripčný faktor kappa B
VDR	vitamín D receptor

Použitá literatúra

1. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. Am J Clin Nutr 2004;80(suppl):1689S–96S.
2. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation and clinical application. Ann Epidemiol 2009;19(2):73–78.
3. Baraké R, Weiler H, Payette H, Gray-Donald K. Vitamin D status in healthy free-living elderly men and women living in Quebec, Canada. J Am Coll Nutr. 2010 Feb;29(1):25-30.
4. Bhandari SK, Pashayan S, Liu ILA, Rasgon SA, Kujubu DA, Tom TY, Sim JJ. 25-Hydroxyvitamin D levels and hypertension rates. J Clin Hypertens (Greenwich). 2011;13:170-177.
5. Kamenský G, Murín J a kol. Kardiovaskulárne ochorenia – najväčšia hrozba. Bratislava, AEPress, s.r.o., 2009, s.117.
6. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Hypertens 2007;20:713-729.
7. Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D improves endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. Diabetes Med 2008;25:320-325.
8. Guijarro C, Egido J. Transcription factor-κB (NF-κB) and renal disease. Kidney Int 2001;59:415-424.
9. Richart T, Li Y, Staessen JA. Renal versus extrarenal activation of vitamin D in relation to atherosclerosis, arterial stiffening, and hypertension. Am J Hypertens 2007;20:1007-1015.
10. Balažovjech I. Aktuálne otázky v diagnostike hypertenzie. Cardiol 2004;13(2):36-37.

9. Úloha oxidačného a nitračného stresu v patogenéze sclerosis multiplex

Štefan Lukáč
(všeobecné lekárstvo, 2 .ročník)

Školitelia: doc. RNDr. Jana Muchová, PhD[1], RNDr. Terézia Kalnovičová, CSc.[2]
[1]Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK v Bratislave; [2]1. neurologická klinika LF UK a UN Bratislava

Úvod

Skleróza multiplex (SM) je progresívne zápalové, demyelinizačné, autoimunitné ochorenie centrálneho nervového systému. Príčiny vzniku SM nie sú známe, ale laboratórne a epidemiologické štúdie predpokladajú, že toto autoimunitné ochorenie sa vyskytuje prevažne u jedincov s genetickou predispozíciou a je iniciované infekčným agens (1). Novšie práce naznačujú, že v patogenéze zápalu a demyelinizácie zohráva významnú úlohu oxidačný a nitračný stres (2,3). Cieľom našej práce bolo detegovať celkový antioxidačný stav krvnej plazmy u pacientov so SM a analyzovať rozličné markery oxidačného poškodenia, ich vzájomné korelácie, ako i korelácie týchto parametrov so stavom hematolikvorovej bariéry (HLB). Taktiež sme sledovali hladiny kyseliny močovej (UA) ako antioxidantu, o ktorej koncentrácii v plazme u pacientov so sclerosis multiplex sa vedú v súčasnosti diskusie.

Materiál a metódy

Do štúdie bolo zaradených 58 pacientov (32 žien a 26 mužov) s diagnostikovanou SM podľa McDonaldových pravidiel a zároveň potvrdené prítomnosťou oligoklonálnych pásov. Priemerný vek pacientov bol 36,5 ± 10 rokov, vekový rozptyl (18-56 rokov). Funkcia hematolikvorovej bariéry sa hodnotila pomocou indexu QA (QA = CSF albumín/sérový albumín x 1000; CSF-cerebrospinal fluid), ktorý indikoval jej poškodenie (QA ≥ 7,4) u 7 mužov a 3 žien. Podľa našich informácií sa u pacientov nevyskytovalo iné závažné ochorenie, ktoré by ovplyvňovalo sledované parametre oxidačného poškodenia. Kontrolnú skupinu tvorilo 43 zdravých jedincov s priemerným vekom 39,22 ± 14,88 roka (24 mužov a 19 žien). U žiadneho z nich sa nevyskytovalo demyelinizačné ochorenie ani iné ochorenie spojené s nárastom oxidačného stresu. Vzorky krvi sme odoberali do komerčných skúmaviek s EDTA ako antikoagulantom. Krv sme centrifugovali, plazmu sme rozdelili na alikvóty a uskladnili pri -18 °C.

Celkový antioxidačný stav krvnej plazmy (TAS) bol analyzovaný metódou TEAC (trolox equivalent antioxidative capacity) podľa Re a kol. (4). Ako štandard bol použitý Trolox a antioxidačná schopnosť bola vyjadrená v alikvótoch Troloxu (mmol/l). Touto metódou sa merala prítomnosť hydrofóbnych aj hydrofilných antioxidantov v plazme daných probandov.

Miera oxidačného poškodenia lipidov bola detegovaná stanovením koncentrácie lipidových hydroperoxidov spektrofotometrickou metódou podľa el-Saadaniho a kol. (5). Koncentráciu lipoperoxidov sme vyjadrili v nmol/ml.

Pri poškodení proteínov boli vyhodnotené markery oxidačného (karbonyly proteínov) aj nitračného (3-nitrotyrozín) stresu. Na stanovenie karbonylov bol použitý ELISA test (enzyme linked immunosorbent assay) podľa Bussa a kol. (6). Hladina karbonylov bola vyjadrená v nmol/mg proteínov. Koncentrácia 3-nitrotyrozínu (nmol/l) bola stanovená prostredníctvom komerčných ELISA testov (Hycult®). Hladina tejto zlúčeniny v plazme bola vypočítaná pomocou rovnice Hillovej krivky.

Kyselina močová sa stanovila HPLC metódou (high performance liquid chromatography) s UV detekciou. Po deproteinácii (s 8% $HClO_4$) a následnej centrifugácii (10 000 ot/min, 20 min, 0-4 ^oC) sa vzorka injektovala do HPLC systému. Ako štandard sa použila UA o koncentrácii 0,1; 0,25; 0,5; resp. 0,75 µmol/l. Mobilná fáza obsahovala: 2 % (v/v) metanol v 80 mmol/l KH_2PO_4, pH 5,1; prietoková rýchlosť: 0,8 ml/min, kolóna 250 x 4 mm Nucleosil 120-5 C18 (Watrex, Česká Republika). Koncentrácia UA sa stanovila z kalibračnej krivky a vyjadrila v µmol/l.

V experimentoch naše výsledky reprezentujú priemer ± SD pre normálne distribuované parametre. Dáta, ktoré nepreukazovali odchýlku od normality sa vyhodnotili Studentovým t-testom. Na štatistické vyhodnotenie sa použil program StatsDirect® 2.3.7 (StatsDirect Sales, Sale, Cheshire M33 3UY, UK). Všetky grafické znázornenia sa robili použitím programu Excel 2007 (Microsoft Co.). Na stanovenie vzťahu medzi parametrami sme použili Pearsonov test.

Výsledky

Výsledky merania sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Hladiny analyzovaných parametrov v plazme u SM pacientov v porovnaní s kontrolným súborom

PARAMETER	PACIENTI-SM	KONTROLA	P
Počet	**58**	**43**	
Vek[roky]	**36,52 ± 10,56**	**39,22 ± 14,88**	**p>0,1**
Celkový antioxidačný stav TAS [mmol/l]	**1,41 ± 0,47**	**1,91 ± 0,74**	**p<0,001**
Lipoperoxidy [nmol/ml]	**79,17 ± 50,70**	**46,62 ± 27,36**	**p<0,001**
3-nitrotyrozín[nmol/l]	**104,51 ± 38,43**	**21,57 ± 3,67**	**p<0,001**
Karbonyly proteínov [nmol/mg P]	**0,44 ± 0,08**	**0,31 ± 0,01**	**p<0,001**
Kyselina močová-M [µmol/l]	**380,41 ± 86,57**	**320 ± 101,6**	**fyziologická**
Kyselina močová-Ž [µmol/l]	**298,86 ± 56,11**	**240 ± 101,6**	**fyziologická**

Zistili sme, že celkový antioxidačný stav plazmy bol u pacientov so SM v priemere 1,4±0,5 mmol/l, zatiaľ čo u zdravých jedincov bola stanovená hodnota 1,9±0,7 mmol/l ($p<0.001$). Sledovaním intersexuálnych rozdielov pri tomto parametri neboli zaznamenané štatisticky významné rozdiely ($p>0,1$).

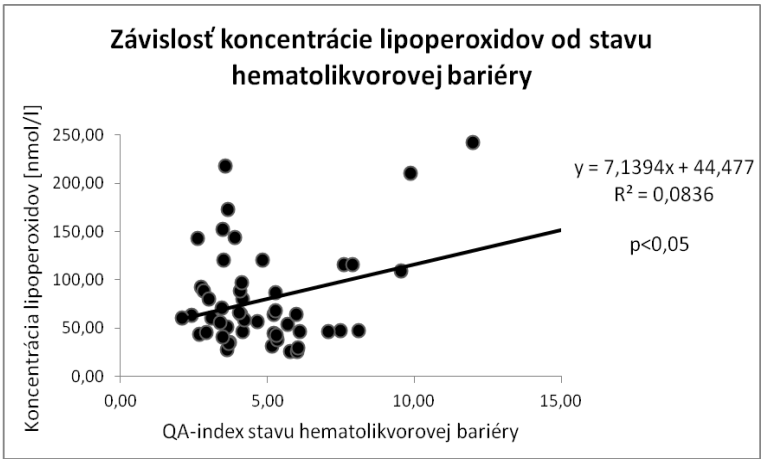
Oxidačné poškodenie lipidov je jedným z dôležitých ukazovateľov stavu bunkových membrán a priamo súvisí so stavom hematolikvorovej bariéry. Pozorovali sme štatisticky významný rozdiel v koncentrácii lipoperoxidov v plazme SM-pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou (79,17 ± 50,70 vs. 46,62 ± 27,36 nmol/ml; $p<0,001$). Zaznamenali sme aj koreláciu medzi stavom hematolikvorovej bariéry a mierou lipoperoxidácie ($p<0,05$). Významne vyššia miera lipoperoxidácie bola pozorovaná u mužov ako u žien ($p<0,05$).

3-nitrotyrozín ako významný marker neurodegenratívnych ochorení_sa nachádazal vo vysokých koncentráciách v plazme u testovaných jedincov bez ohľadu na ich pohlavie. Jeho priemerná koncentrácia bola u SM-pacientov významne zvýšená 104,51 ± 38,43 nmol/l v porovnaní s kontrolnou skupinou 21,57 ± 3,67 nmol/l ($p<0,001$).

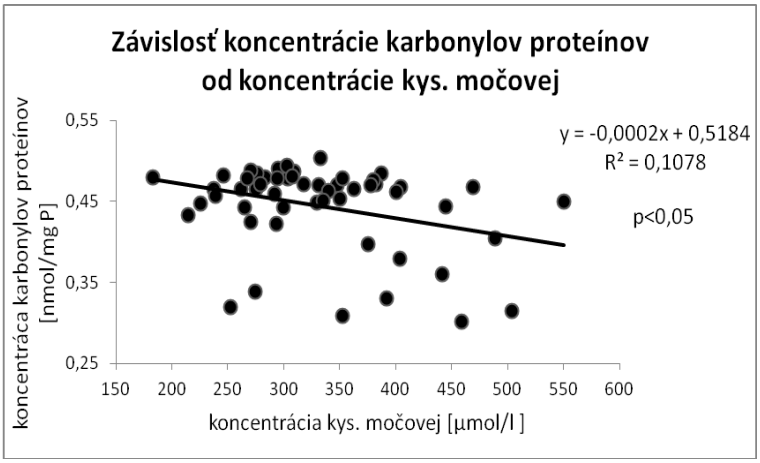
Výskyt karbonylov proteínov bol v plazme u pacientov so SM 0,47 ± 0,13 nmol/mg P, zatiaľ čo v plazme zdravých jedincov len 0,31 ± 0,01 nmol/mg P ($p<0,001$). Intersexuálne rozdiely tohto parametru neboli pozorované.

Hladina kyseliny močovej bola vyhodnotená u mužov a žien samostatne, nakoľko fyziologické hodnoty sú u mužov a žien odlišné. Stanovené hodnoty UA (380,41 ± 86,57 µmol/l u mužov vs. 298,86 ± 56,11 µmol/l u žien) sú vo fyziologickej oblasti.

Pri sledovaní korelácií jednotlivých markerov a stavu HLB bol významný iba vzťah k lipoperoxidácii ($r=0,289$, $n = 58$, $p<0,05$). Analyzovaním vzájomných vzťahov nami testovaných parametrov sme potvrdili pozitívny vzťah medzi TAS a koncentráciou kys. močovej ($r=0,308$, $n=58$, $p<0,05$), ďalej vzájomný vzťah markerov poškodenia proteínov – karbonylov a 3-nitrotyrozínu ($r=0,436$, $n=58$, $p<0,001$). Zároveň bol pozorovaný negatívny vzťah medzi koncentráciou UA a koncentráciou karbonylov ($r=0,328$, $n = 58$, $p<0,05$).



Graf 1: Závislosť koncentrácie lipoperoxidov od stavu hematolivkorovej bariéry



Graf 2: Závislosť koncentrácie karbonylov proteínov od koncentrácie kyseliny močovej

Diskusia

Oxidačný stres a nitračný stres (OS/NS) sú dôležité faktory, ktoré zohrávajú významnú úlohu pri demyelinizačných ochoreniach spojených s neurodegeneratívnymi zmenami ako je SM (8). V našej štúdii sme hodnotili stupeň OS/NS u SM pacientov pomocou plazmových hladín 3-nitrotyrozínu, karbonylov proteínov a lipoperoxidov ako markerov oxidačného poškodenia.

V súlade s inými štúdiami (3,7,8,9) sme u SM pacientov zistili zníženú antioxidačnú kapacitu plazmy a zvýšené hladiny lipoperoxidov (tab.1), ktoré pozitívne korelovali so stavom HLB. V súvislosti s lipoperoxidáciou sa objavujú aj úvahy o jej detekcii pri diagnostike sclerosis multiplex (8). U SM pacientov sme zaznamenali aj signifikantné zvýšenie ďalšieho markera OS, karbonylov proteínov,

ktorý vykazoval štatisticky významnú negatívnu koreláciu s kyselinou močovou ($p<0,05$). Ku karbonylácii, ireverzibilnej modifikácii proteínov indukovanej oxidačným stresom dochádza v situáciách, kedy tvorba voľných kyslíkových radikálov nestačí byť eliminovaná prirodzenými antioxidačnými rezervami organizmu. V tejto situácii môžeme uvažovať o poškodení proteínov plazmy, poškodení integrálnych proteínov bunkových membrán alebo o zvýšenom poškodení plazmových lipoproteínov (8). Ak sa tvoria voľné radikály vo vodnej fáze krvi, prvou ochranou sú vo vode rozpustné antioxidanty plazmy (vitamín C, bilirubín naviazaný na albumín, kyselina močová). Lipofilné antioxidanty sa spotrebovávajú až v neskorších štádiách a sú zodpovedné za vychytávanie lipofilných radikálov, ktoré sa formujú v membránach, alebo pri atakoch voľných radikálov na membrány (10). Negatívna korelácia medzi kyselinou močovou a karbonylmi proteínov (Graf 1) poukazuje na zníženú antioxidačnú kapacitu plazmy u SM pacientov, ktorá je asociovaná s deficitom hydrofilných a lipofilných antioxidantov v plazme. Pozitívny korelačný vzťah medzi lipoperoxidáciou a stavom hematolikvorovej bariéry (Graf 2) poukazuje na úlohu oxidačného poškodenia lipidov pri znižovaní jej funkčnosti. Absencia korelácie medzi nitrotyrozínom a kyselinou močovou môže poukazovať na významnejšiu úlohu kyseliny močovej pri ochrane bielkovín pri OS ako pri NS. Antioxidačné účinky kyseliny močovej a jej účasť na vychytávaní voľných radikálov plazmy potvrdzuje aj jej signifikantný korelačný vzťah s TAS.

Nitrotyrozín sa považuje za indikátor zvýšenej tvorby peroxynitritu, ktorý sa tvorí reakciou NO a superoxidu, ktoré sú produkované bunkami endotelu, aktivovanými fagocytmi a mikrogliami. V súhlase s literárnymi údajmi (11) sme v našom súbore SM pacientov zaznamenali signifikantne zvýšené plazmové hladiny 3-nitrotyrozínu, ktoré môžu odzrkadľovať výrazné poškodzovanie neurónov v CNS a rozvoj SM. Peroxynitrit okrem toxickej modifikácie proteínov nitráciou tyrozínových zvyškov spôsobuje tiež depléciu dôležitých antioxidantov a poškodenie lipidov (10).

SM-pacienti sa vyznačujú zníženou antioxidačnou, imunoregulačnou a neuroprotektívnou ochranou, čo sa odráža vo zvýšenom metabolizme purínových nukleotidov (12), ktorého výsledným produktom je kyselina močová (UA). V našej štúdii bola zaznamenaná fyziologická koncentrácia UA u oboch pohlaví. V publikovanej literatúre sa stretávame so zvýšenými, zníženými, alebo fyziologickými koncentráciami kyseliny močovej (11,13). My sa prikláňame k názoru, že tieto diskrepancie v hladinách UA sú spôsobené faktormi, ako sú stupeň integrity HLB, celkový antioxidačný stav organizmu a metodické vplyvy.

Doteraz nie je známa účinná prevencia SM, ani terapeutická intervencia do patologického procesu jej vzniku, ktorou by sa predišlo, alebo by sa výrazne spomalilo ťažké zneschopnenie, obmedzujúce bežné denné aktivity. Určitým prínosom k tejto problematike je aj naše štúdium, ktoré potvrdzuje nedostatočnú antioxidačnú kapacitu plazmy u pacientov so sklerózou multiplex spôsobenú deficitom hydrofilných a lipofilných antioxidantov v plazme v dôsledku zvýšeného oxidačného/nitračného stresu. Tento fakt by mal byť zohľadnený v terapeutickej praxi. Okrem suplementácie deficitných antioxidantov sa v boji proti oxidačnému stresu ukazuje sľubnou cestou aj celotelová kryoterapia (14,15). Oxidačný stres je len jedným z mnohých faktorov, ktoré negatívne pôsobia pri tomto ochorení. Je preto potrebné venovať pozornosť aj všetkým ďalším patogénnym aspektom a ich redukcii.

Použitá literatúra

1. Noseworthy JH: Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. Nature 1999; 399: 40-47.
2. Gonsette RE: Neurodegeneration in multiple sclerosis The role of oxidatvie stress and excitotoxicity. Journal of the Neurological Sciences 2008; 274: 48–53.
3. Hadžović-Džuvo A, Lepara O, Valjevac A, eds.: Serum total antioxidant capacity in patients with multiple sclerosis. Bosnian journal of basic medical sciences 2011; 11 {1): 36-36.

4. Re R, Pellegrini N, Protteggente A, Pannala A, Yang M, Rice- Evans C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 1999;vol. 26 {9-10): 1231-1237.
5. el-Saadani M, Esterbauer H, el-Sayed M, Goher M, Nassar AY, Jurgens G: A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. Journal of Lipid Research 1989; 30: 627- 630.
6. Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC: Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. Free Radic Biol Med. 1997; 23{3): 361-6.
7. Uttara B ,Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT: Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. Current Neuropharmacology 2009; 7{1): 65-74.
8. Besler HT, Comoglu S: Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. Nutritional Neuroscience 2003; 6 {3): 189–196.
9. Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Majsterek I: The Level of Isoprostanes as a Non-invasive Marker for in vivo Lipid Peroxidation in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. Neurochemical Research 2011; 36 {6): 1012–1016.
10. Frei B., Stocker R., Ames BN: Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc. Natl Acad Sci USA 1988;85:9748-9752.
11. Miller E, Walczak A, Saluk J, Ponczek MB, Majsterek I: Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. Clinical Biochemistry 2012; 45{1-2): 26–30.
12. Kuračka Ľ:Asociácia medzi degradačnými produktmi purinových nukleotidov v cerebrospinálnom likvore a hladinami niektorých lipofilných vitamínov v plazme u pacientov so sklerózou multiplex in Zborník vedeckých prác, 50. fakultná konferencia študentskej vedeckej a odbornej činnosti VI. vedecká konferencia doktorandov LF UK, Brno, Tribun EU s.r.o. 2011, 67-70.
13. Amorini AM, Petzold A, Tavazzi B, Eikelenboom J, eds: Increase of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients. Clinical biochemestry 2009; 42 {10-11):1001–1006.
14. Miller E, Mrowicka M, Malinowska K, Mrowicki J, Saluk-Juszczak J, Kedziora J: The effects of whole-body cryotherapy on oxidative stress in multiple sclerosis patients. Journal of Thermal Biology 2010, 35{8): 406-410.
15. Lukáč Š: Effects of whole body cryotherapy on chosen parameters of cardiovascular system. Orvosképzés 2012, 87{1): 17

10. Analýza užívania nesteroidových antiflogistík a hodnotenie percepcie ich rizika

Katarína Mészárosová
(všeobecné lekárstvo, 4.ročník)

Školiteľ: MUDr. Zoltán Varga
Ústav farmakológie a klinickej farmakológie Lekárskej Fakulty Univerzity Komenského

Úvod

Nesteroidové antiflogistiká (NSA) patria medzi celosvetovo najviac používané lieky. Viaceré sú dostupné bez lekárskeho predpisu. Ich užívanie prináša so sebou riziko gastro- a nefrotoxicity, čo bolo už dávno zdokumentované (1, 2). Zo strany kardiovaskulárneho systému hrozí zvýšenie artériového tlaku krvi, akútne zlyhanie srdca a trombotické príhody (3, 4, 5, 6). Veľký počet pacientov exponovaných nesteroidovým antiflogistikám zapríčiňuje, že nežiaduce účinky týchto liečiv predstavujú závažný medicínsky problém, preto je táto skupina neustále predmetom klinických a experimentálnych štúdií. My sme sa rozhodli vykonať dotazníkovú štúdiu na malej skupine respondentov, aby sme zistili údaje o tom, ako často a za akých okolností užíva tieto liečivá bežný občan Slovenskej republiky a odhaliť jeho informovanosť o nežiaducich účinkoch a percepciu rizika nesteroidových antiflogistík.

Materiál a metódy

Anketárka oslovovala respondentov v priestoroch Obchodného centra (OC) Polus City Center štruktúrovaným dotazníkom s cielenými otázkami. Podmienkou na zaradenie respondenta do štúdie bolo slovenské štátne občianstvo, plné vedomie, schopnosť komunikácie a ochota zúčastniť sa. Výber respondentov bol náhodný. V prípade každého respondenta, ktorý spĺňal inklúzne kritériá bol zaznamenaný vek a pohlavie, rodinné zázemie, a vzdelanie. Na otázky odpovedali sami, alebo s menšou pomocou, ak to bolo potrebné.

Štruktúrovaný dotazník obsahoval celkom 13 otázok, z ktorých 3 boli otvorené a 10 bolo zatvorených. Prvá otázka obsahovala obrázkovú prílohu pre zjednodušenie výberu. Pri prvej otázke si respondenti mohli vybrať z viacerých liekov, ale v rámci vyhodnotenia sa lieky s tým istým liečivom započítali len raz (napríklad respondent používa Ibalgin, Brufen aj Aspirin ale vo vyhodnotení je to zohľadnené len ako ibuprofén a kyselina acetylsalicylová na toho respondenta). Kvôli frekventovanému používaniu sme zaradili do štúdie aj analgetikum-antipyretikum paracetamol. Dve otázky obsahovali 10 centimetrov širokú škálu na ktorej mal pacient označiť mieru intenzity bolesti a mieru percepcie rizika liečiv.

Údaje boli spracované pomocou deskriptívnej štatistiky, v potrebných prípadoch sa použili metódy analytickej štatistiky (Studentov t-test, Chí kvadrát test). Respondentov v celkovom počte 234 osôb sme rozdelili do troch vekových kategórii ($\leq$ 20, 20- 40, > 40). Vo všetkých vekových kategóriách sme zvlášť spracovali výsledky dvoch pohlaví.

Limitáciami práce je nízky počet respondentov, možná predpojatosť (bias), vzájomné ovplyvňovanie sa respondentov, šírka na škále je subjektívnym odhadom, stále miesto (OC POLUS) zrealizovania ankety ovplyvnil výber respondentov (klientela obchodného centra je špecifická) a možné chyby pri vyplnení dotazníka.

Výsledky

Súbor respondentov predstavoval vekovú skupinu od 11 do 68 rokov s priemerným vekom 32,4 rokov. Z 234 respondentov bolo 98 (42 %) mužov a 136 (58 %) žien. Muži si kupovali analgetiká v priemere raz za 5,47 mesiacov, a to najmä lieky s liečivami ibuprofén, paracetamol a kyselina acetylsalicylová. Ženy si kupovali analgetiká v priemere raz za 4,67 mesiacov a to najmä ibuprofén, paracetamol a kyselinu acetylsalicylovú (tab. 1). 17 (17,3 %) mužov a 10 (7,4 %) žien nepoužívlo žiadne lieky proti bolesti. Obe pohlavia najviac používali analgetiká ak ich bolela hlava. Muži si užili liek pri intenzite bolesti 6,28cm a ženy pri 7,32cm šírky škály. 62 (63,3 %) mužov a 71 (52,2 %) žien nevedelo o žiadnych nežiaducich účinkoch. O možných rizikách terapie sa najviac informovali z príbalových letákov, ale 43 (43,9 %) mužov a 25 (18,4 %) žien vôbec neprejavilo záujem o takéto informácie (rozdiel v záujme mužov a žien - $P < 0,001$). Respondentov, ktorých lekár ani lekárnik neinformoval o možných nežiaducich účinkoch bolo u žien 76 (55,9 %) a u mužov 62 (63,3 %). Muži odhadovali rizikovosť týchto liekov na 4,58 cm a ženy na 4,95 cm ($P = 0,104$) šírky škály.

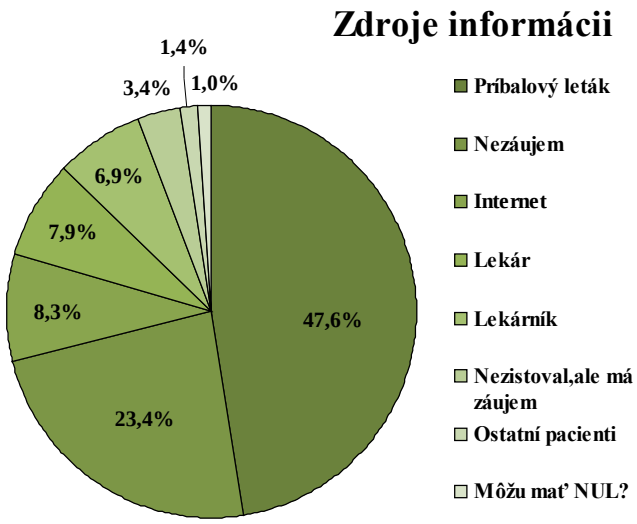
Prvá veková skupina predstavovala respondentov do 20 rokov veku, pričom najmladší mal 11 rokov a priemerný vek bol 17,65 rokov. Táto skupina zahŕňala celkovo 44 respondentov, z toho 18 mužov a 26 žien a tvorila 18,8 % z celkového súboru. Muži v tejto skupine si kupovali analgetiká v priemere raz za 3,66 mesiacov, ženy raz za 4,24 mesiacov. 1 (5,6 %) muž a 1 (3,8 %) žena nepoužívali žiadny takýto liek. Muži aj ženy najviac používali analgetiká pri bolestiach hlavy, muži si užili liek pri intenzite bolesti 5,44 cm a ženy pri 7,23cm šírky škály. 12 (66,7 %) mužov a 17 (65,4 %) žien nevedelo o žiadnych nežiaducich účinkoch. O možných rizikách terapie sa najviac informovali z príbalových letákov, ale 9 (50 %) mužov a 10 (38,5 %) žien ($P = 0,46$) vôbec neprejavilo záujem o takéto informácie. Respondentov, ktorých lekár ani lekárnik neinformoval o možných nežiaducich účinkoch bolo u žien 15 (57,7 %) a u mužov 10 (55,6 %). Muži odhadovali rizikovosť týchto liekov na 3,74 cm a ženy na 4,84 cm ($P = 0,042$) šírky škály. 89 % mužov a 96 % žien v tejto kategórii netrpelo chronickým ochorením.

Druhá veková skupina predstavovala respondentov od 20 do 40 rokov, priemerný vek bol 28,48 rokov. Táto skupina zahŕňala celkovo 123 respondentov, z toho 50 mužov a 73 žien a tvorila 52,56 % z celkového počtu respondentov. Muži v tejto skupine si kupovali analgetiká v priemere raz za 5,6 mesiacov, ženy raz za 4,62 mesiacov. 8 (16 %) mužov a 4 (5,5 %) ženy nepoužívalo žiadny takýto liek. Muži aj ženy najviac používali analgetiká ak ich bolela hlava, muži si ich užili pri intenzite bolesti 7,36 cm a ženy pri 7,72 cm šírky škály. U žien boli veľmi časté aj menštruačné bolesti. 32 (64 %) mužov a 35 (47,9 %) žien nevedelo o žiadnych nežiaducich účinkoch. Najviac informácií o nich získavali z príbalových letákov, ale 20 (40 %) mužov a 8 (11 %) žien ($P < 0,001$) vôbec neprejavilo záujem o takéto údaje. Respondentov, ktorých lekár ani lekárnik neinformoval o možných nežiaducich účinkoch bolo u žien 41 (56,2 %) a u mužov 31 (62 %). Muži odhadovali rizikovosť NSA na 4,9 cm a ženy na 5,0 cm ($P = 0,398$) šírky škály. 84 % mužov a 94,5 % žien v tejto kategórii netrpelo chronickým ochorením.

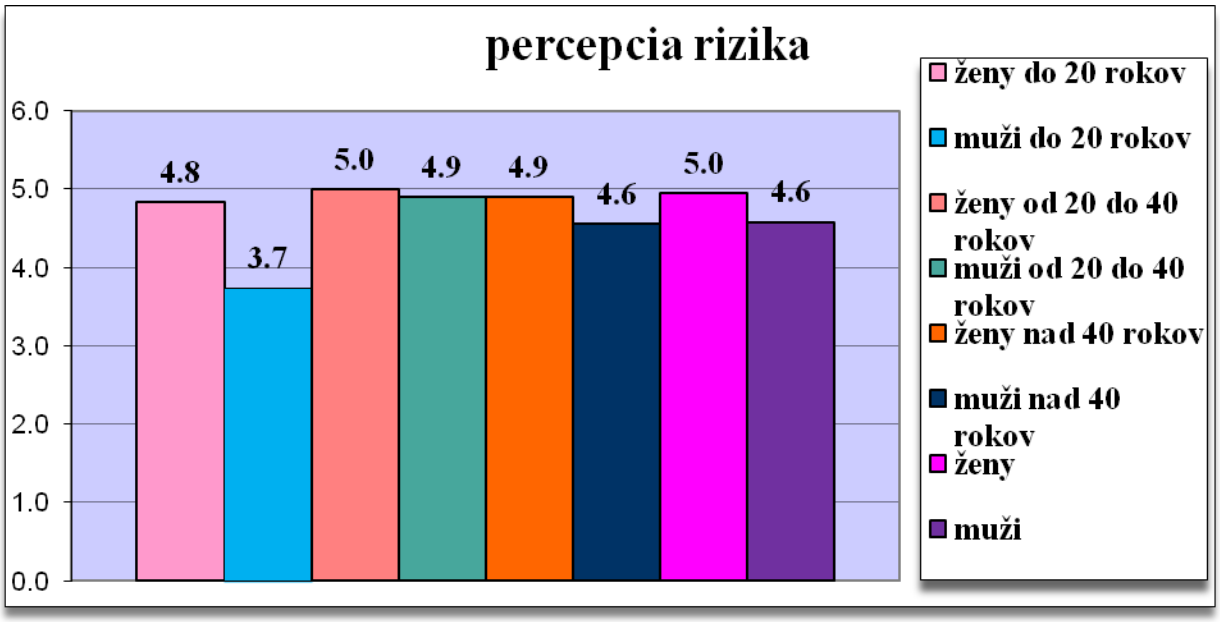
Tretia skupina respondentov predstavovala vekovú skupinu nad 40 rokov, pričom najstarší mal 68 rokov a priemerný vek bol 50,98 rokov. Táto skupina zahŕňala celkovo 67 respondentov, z toho 30 mužov a 37 žien a tvorila 28,63 % z celkového počtu respondentov. Muži v tejto skupine si kupovali analgetiká v priemere raz za 6,64 mesiacov, ženy raz za 5,08 mesiacov. 8 (26,7 %) mužov a 5 (13,5 %) žien nepoužívalo žiadny takýto liek. Muži aj ženy najviac používali analgetiká pri bolestiach hlavy, muži si užili liek pri intenzite bolesti 6,05 cm a ženy pri 7,02 cm šírky škály. 18 (60 %) mužov a 19 (51,4 %) žien nevedelo o žiadnych nežiaducich účinkoch. Najviac informácií o rizikách terapie získavali z príbalových letákov, ale 14 (46,7 %) mužov a 7 (18,9 %) žien ($P < 0,001$) vôbec neprejavilo záujem o takéto údaje. Respondentov, ktorých lekár ani lekárnik neinformoval o možných nežiaducich účinkoch bolo u žien 20 (54,1 %) a u mužov 21 (70 %). Muži odhadovali rizikovosť NSA na 4,56 cm a ženy na 4,9 cm ($P = 0,262$) šírky škály. 56,7 % mužov a 59,5 % žien v tejto kategórii netrpelo chronickým ochorením.

	ženy do 20	muži do 20	ženy 20-40	muži 20-40	ženy nad 40	muži nad 40	ženy celkom	muži celkom	celkom
Počet respondentov	**26**	**18**	**73**	**50**	**37**	**30**	**136**	**98**	**234**
ibuprofén	**22**	**14**	**57**	**33**	**22**	**9**	**101**	**56**	**157 (67,1%)***
paracetamol	**18**	**17**	**51**	**26**	**23**	**12**	**92**	**55**	**147 (62,8%)***
kyselina acetylsalicylová	**14**	**5**	**26**	**11**	**12**	**10**	**52**	**26**	**78 (33,3%)***
diklofenak	**5**	**5**	**8**	**7**	**11**	**9**	**24**	**21**	**45 (19,2%)***
meloxikam	**0**	**0**	**3**	**1**	**0**	**0**	**3**	**1**	**4 (1,7%)***
Iné	**3**	**4**	**2**	**3**	**1**	**1**	**6**	**8**	**14 (6,0%)***
Žiaden	**1**	**1**	**4**	**8**	**5**	**8**	**10**	**17**	**27 (11,5%)***

Tabuľka č.1: Respondentmi užívané analgetiká (čísla udávajú počet respondentov;*percento vypočítané zakaždým z celkového počtu respondentov)



Graf č.1: Respondentmi využité zdroje informácii o nežiaducich účinkoch (percentá vypočítané z celkového počtu odpovedí)



Graf č.2: Percepcia rizika analgetík u respondentov

Diskusia

Z nesteroidových antiflogistík sa najviac používal ibuprofén, čo je v súlade s výsledkami iných autorov (7). Kyselina acetylsalicylová sa používala o polovicu menej ako ibuprofén, diklofenak o polovicu menej v porovnaní s kyselinou acetylsalicylovou. Meloxikam užívali len štyria respondenti (1,7 %). 27 (11,5 %) respondentov neužívalo žiadne analgetiká na základe presvedčenia, že benefit týchto liekov za žiadnych okolností neprevažuje nad ich rizikom. Údaje, že si respondenti kupovali analgetiká v priemere raz za 5 mesiacov, užili si ich až pri intenzite bolesti v priemere 6,8 cm šírky škály a rizikovosť odhadovali na 4,7 cm šírky škály naznačuje, že analgetiká používali relatívne uvážlivo. Až 67,5 % respondentov si užilo analgetikum najčastejšie pri bolestiach hlavy. Približne rovnaký počet respondentov označil nežiaduce účinky postihujúce pečeň aj žalúdočný vred ako možné riziko terapie, čo poukazuje na to, že pacienti nemajú kvalitné informácie o možných nežiaducich účinkoch. Veľa respondentov, ktorí sa informovali o rizikách terapie vedelo len o nezávažných nežiaducich účinkoch ako nauzea alebo útlm centrálnej nervovej sústavy. 56,8 % respondentov nevedelo udať žiadny nežiaduci účinok. Toto percento zahŕňalo aj respondentov, ktorí sa informovali alebo boli informovaní o rizikách, ale zakrátko informácie zabudli. Napriek tomu pacienti hospitalizovaní v Dubline, Írsko odhadli rizikovosť nesteroidových antiflogistík na 2,1 cm a naša skupina respondentov na 4,7 cm šírky škály, čo nám dáva predpoklad menšieho zneužívania týchto liekov v našej populácii (8). Až 58,9 % respondentov si prečítalo príbalový leták, ale získané informácie si máloktorí vedeli spracovať a viac bolo takých, ktorí si zapamätali len nežiaduce účinky ktoré sa vyskytujú veľmi často aj v rámci iných liekových kategórii a sú menej závažné, napríklad neurčité gastrointestinálne ťažkosti, preto kvalitnejšie spracovanie a väčšia prehľadnosť informácii v príbalových letákoch by bolo účelové. Je zaujímavé, že presne také isté percento respondentov (58,9 %) nebolo informovaných lekárom ani lekárnikom o možných nežiaducich účinkoch. Z hľadiska nebezpečia neinformovanosti je alarmujúce, že v našej malej skupine respondentov (n = 234) sa našli až 2 respondenti, ktorí mali v osobnej anamnéze prekonaný žalúdočný vred a kvôli neinformovanosti si pravidelne užívali kyselinu acetylsalicylovú ako analgetikum. Zistenie, že viacerí respondenti si užili kyselinu acetylsalicylovú ako analgetikum pri žalúdočných ťažkostiach je tiež alarmujúce.

Celkovo oslovení respondenti boli pomerne málo informovaní, napriek tomu ich percepcia rizika nesteroidových antiflogistík nám dáva predpoklad, že narábajú s týmito liekmi viac-menej uvážlivo.

Použitá literatúra

1. Douthwaite AH. Recent advances in medical diagnosis and treatment. *Brit Med J 1938; 1: 1143-1146.*
2. Walshe JJ, Venuto RC. Acute oliguric renal failure induced by indomethacin: possible mechanism. Ann Intern Med 1979; 91: 47-9.
3. Beilin LJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and antihypertensive drug therapy. J Hypertens 2002; 20 (5): 849-850.
4. Chan CC, Reid CM, Aw TJ, Liew D, Haas SJ, Krum H. Do COX-2 inhibitors raise blood pressure more than nonselective NSAIDs and placebo? An updated meta-analysis. J Hypertens 2009; 27 (12): 2332-2341.
5. Page J, Henry D. Consumption of NSAIDs and the development of congestive heart failure in elderly patients: an underrecognized public health problem. Arch Intern Med 2000; 160 (6): 777-784.
6. Trelle S, Reichenbach S, Wandel S et al. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. Brit Med J 2011; 342:c7086 doi:10.1136/bmj.c7086
7. Hudec R, Kriska M, Bozekova L, Foltan V. Comparison of NSAID consumption in Slovakia, Finland and Norway. Bratisl Lek Listy 2008; 109 (8): 370-373.
8. Cullen G, Kelly E, Murray FE. Patients´ knowledge of adverse reactions to current medications. Br J Clin Pharmacol 2006; 62 (2): 232-236.

11. Vákuová terapia pri liečení rán

Martin Bibza
(všeobecné lekárstvo, 5.ročník)

Školiteľ: Doc. MUDr. Ján Koller, CSc.
Klinika popálenín a rekonštrukčnej chirurgie LFUK a UNB

Úvod

Za posledných 20 rokov nastali výrazné pokroky v našom chápaní procesov hojenia rán. Znamená to, že momentálne je možné predpokladať postupnosť procesov hojenia a približne aj čas, za ktorý sa rana kompletne uzavrie. Napriek vzrastajúcim poznatkom a vývoju mnohých interaktívnych produktov, v praxi sa stretávame s ranami, ktorých hojenie je veľmi zdĺhavé, alebo ktoré sa nikdy nezahoja. Faktory ovplyvňujúce hojenie rán môžeme rozdeliť do štyroch kategórií: 1. faktory závisiace od pacienta (patológie, komorbidity, alergie, užívané liečivá, psychosociálne faktory, bolesť, spolupráca pri liečbe), 2. faktory závisiace od rany (trvanie, veľkosť, spodina, ischémia, zápal, infekcia, anatomická lokalizácia, odpoveď na liečbu), 3. faktory závisiace od schopností a znalostí zdravotníckych pracovníkov (diagnostické, terapeutické, intervenčné), 4. faktory závisiace od zdrojov a možností liečby (systém zdravotnej starostlivosti, dostupnosť, využiteľnosť, efektivita, cena). (1)

Základným princípom vákuovej terapie pri liečení ťažko sa hojacich rán je klinická aplikácia podtlaku pomocou špeciálneho prístroja fungujúceho na princípe odsávacej pumpy. Miesto odsávania je prelepené fóliou , ktorá zabraňuje komunikácii odsávanej rany s vonkajším prostredím . Vnútorný priestor rany je vyplnený poróznou penou, ktorá zabezpečuje rovnomerné rozloženie tlaku v rane. Na fólii je vyrezaný malý otvor, na ktorú je pripevnená podložka prepojená s drenážnou hadičkou. Druhý koniec hadičky ústi do rezervoáru na tekutinu odsávanú z rany. Celý systém ovláda elektronika schopná udržiavať nastavený podtlak na požadovaných hodnotách a aplikovať ho či už kontinuálne alebo intermitentne. Hodnoty podtlaku a jeho zmeny v čase sú nastaviteľné. (2)

Vákuová terapia preukázateľne stimuluje neoangiogenézu, zvyšuje lokálny prietok krvi, redukuje opuch, stimuluje formovanie granulačného tkaniva, stimuluje bunkovú proliferáciu, odstraňuje rozpustené inhibítory hojenia z rany, redukuje bakteriálnu nálož a mechanicky priťahuje okraje rany k sebe. (2)

Terapiu môžeme využiť pri liečbe popálenín, diabetického vredu, vredu predkolenia pri chronickej venóznej insuficiencii, dekubitoch, podpore prihojenia kožného štepu, nehojacej sa pooperačnej rany, infekcie rany po sternotómii, problematickej rany po traume, otvorenej brušnej dutine zahŕňajúcej aj manažment fistúl. (3)

Kontraindikáciami terapie sú osteomyelitída, pri ktorej nebol vykonaný správny chirurgický debridement alebo nebola liečená vhodným antibiotikom, malignita v rane, nekrotické tkanivo s prítomným príškvarom v rane, priame pôsobenie podtlaku na cievy alebo orgány, rany s neobjavenými fistulami. Liečbu treba pozorne zvážiť pokiaľ rana fistuluje do niektorej telesnej dutiny, pokiaľ je pacient na antikoagulačnej terapii, pokiaľ oblasť rany aktívne krváca, v rane sú fragmenty kostí alebo ostré okraje, pokiaľ sú prítomné akútne alebo chronické enterické fistuly. (4)

Na Klinike popálenín a rekonštrukčnej chirurgie LFUK a Univerzitnej nemocnice Bratislava sa začala používať vákuom asistovanú liečba v roku 2007. U všetkých pacientov bol použitý prístroj KCI so súpravami špongie Granufoam® a odsávacím systémom TRAC®. (5)

Materiál a metódy

Do súboru retrospektívnej klinickej štúdie boli zahrnutí 23 pacienti s ranami rôznej etiológie liečenými na KPaRCH, ktoré nebolo možné vyliečiť bežnými doteraz používanými metódami liečenia a spĺňali indikačné kritériá pre VAC liečbu. Štúdia bola schválená etickou komisiou nemocnice Ružinov.

Zo zdravotnej dokumentácie z archívu kliniky boli použité nasledujúce údaje:

Demografické údaje pacientov (vek, pohlavie)
Anamnestické údaje: pridružené ochorenia, alergie, medikácie, ktoré môžu ovplyvniť proces hojenia
Charakter rany (akútna, chronická)
Trvanie hojenia rany
Doterajšia liečba rany
Popis a fotodokumentácia rany, prípadné pomocné vyšetrenia (aj bakteriologický nález)
Celkové trvanie VAC liečby
Charakter a popis rany po ukončení VAC liečby (+fotodokumentácia)
Komplikácie VAC liečby
Úspešnosť VAC liečby
Nutnosť opakovania VAC liečby
Pracoval som so zdravotnými záznamami pacientov a fotodokumentáciou pacientov.

Výsledky

Z 23 pacientov zahrnutých v štúdii bolo 9 žien a 15 mužov. Priemerná dĺžka hospitalizácie pacientov bola 31,52 dňa, najkratšia doba hospitalizácie bola 9 dní, najdlhšia 73 dní. Priemerný vek pacientov bol 58,39 roku, najmladší pacient mal 19 rokov, najstarší 90 rokov. Osem pacientov malo pozitívnu alergickú anamnézu. Prevládali hlavne alergie na rôzne liečivá, najčastejšie penicilín.

Z pridružených ochorení, ktoré mohli značne ovplyvniť priebeh terapie, malo v zdravotnej dokumentácii uvedených: 12 pacientov diabetes mellitus, 2 pacienti chronickú venóznu insuficienciu dolných končatín, 9 ischemickú chorobu srdca, 2 ischemickú chorobu dolných končatín.

Päť rán v súbore bolo hodnotených ako akútnych, 6 ako subakútnych a 12 ako chronických.

Z etiológie rany bola najviac zastúpená diabetická gangréna dolnej končatiny (8 pacientov), ďalej nehojaca sa rana po traume (6 pacientov), nehojaca sa rana po sternotómii (3 pacienti), pooperačný defekt (2 pacienti), decubitus (2 pacienti), omrzliny (1 pacient), decollement et fractura (1 pacient).

Trvanie rán pred začatím liečby bolo rozdelené do kategórií (Tab.1).

Trvanie rany	Počet pacientov
do 14 dní	1
15 dní - 1 mesiac	6
viac ako 1 mesiac - 3 mesiace	5
viac ako 3 mesiace - 6 mesiacov	2
viac ako 6 mesiacov - 1 rok	1
viac ako 1 rok - 3 roky	3
viac ako 3 roky	1
chronická rana bez údajov o dĺžke jej trvania	4

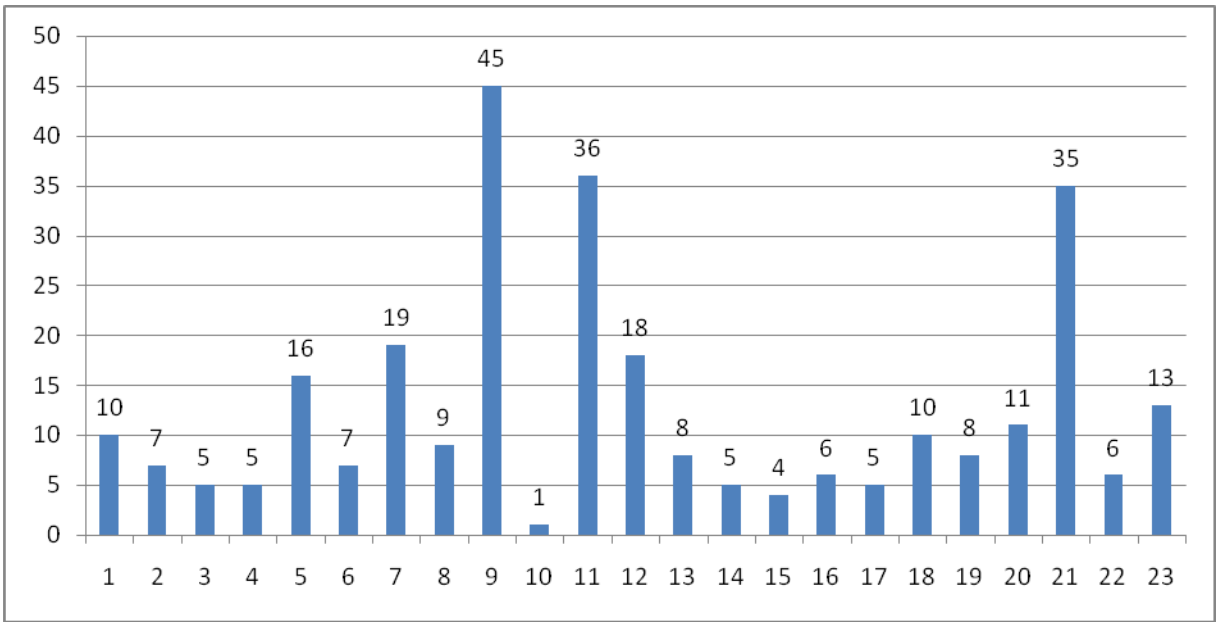
Tab.1: Trvanie rán pred začiatkom VAC liečby

Z rán pacientov bol najčastejšie vykultivovaný *Pseudomonas aeruginosa*, nasledoval *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a mnoho ďalších druhov baktérií a mikroskopických húb (rod *Candida*), celkovo 27 rôznych druhov (Tab.2). Mnoho z týchto bakteriálnych kmeňov vykazovalo vysoký stupeň rezistencie na antibiotiká.

Por.č.	mikroorganizmus	Počet kmeňov		Por.č.	mikroorganizmus	Počet kmeňov
1.	Pseudomonas aeruginosa	9		15.	Morganella morganii	2
2.	Enterococcus faecalis	7		16.	koaguláza negatívny Staphylococcus	1
3.	Acinetobacter	6		17.	Streptococcus pyogenes	1
4.	Staphylococcus aureus	6		18.	Citrobacter koseri	1
5.	Escherichia coli	5		19.	Candida glabrata	1
6.	Proteus mirabilis	4		20.	Bacteroides sp.	1
7.	Enterococcus faecium	4		21.	Eubacterium sp.	1
8.	Candida albicans	3		22.	Klebsiella oxytoca	1
9.	Candida parapsilosis	3		23.	Clostridium difficile (pozit. toxin)	1
10.	Staphylococcus haemolyticus	2		24.	Enterobacter sp.	1
11.	Streptococcus beta haemolyticus	2		25.	Serratia sp.	1
12.	Corynebacterium sp.	2		26.	Serratia odorifera	1
13.	Klebsiella pneumoniae	2		27.	Serratia marcescens	1
14.	Enterobacter cloacae	2				

Tab.2: Bakteriologické a mykolologické nálezy v ranách pacientov pred alebo počas terapie VAC

Priemerné trvanie VAC terapie bolo 12 dní. Najdlhšie, 45 dní, trvala liečba VAC u pacienta po ťažkej traume dolnej končatiny so stratovými poraneniami mäkkých tkanív a následnou infekciou rany multirezistentnými mikroorganizmami. Najkratšie, 1 deň, bola použitá u pacienta s diabetickou gangrénou nohy (Graf 1).



Graf 1: Os y - trvanie VAC terapie v dňoch, os x - poradové číslo pacienta

U 12 pacientov spočíval ďalší postup po dokončení VAC liečby v pravidelnej dezinfekcii a v preväzoch rany. U 6 pacientov nasledovala revízia a sutura rany. U 3 pacientov bola po ukončení VAC liečby vykonaná autotransplantácia defektu sieťovanými autotransplantátmi, u jedného pacienta bol použitý fasciokutánny lalok . U jedného pacienta po ukončení VAC liečby bola rana zrevidovaná a bol zavedený Redonov drén.

U 17 pacientov prebiehala liečba VAC bez komplikácií. Dvaja pacienti sa sťažovali na bolesť v rane. V troch prípadoch došlo počas VAC liečby k infekcii v rane, ktorú bolo treba kauzálne liečiť. Ďalšími komplikáciami, ktorých výskyt sa neopakoval, boli maloobehová dekompenzácia, psychomotorický nepokoj a odmietnutie liečby pacientom.

Úspešnosť liečby bola v 22 prípadoch hodnotená ako výrazné zlepšenie, alebo zlepšenie charakteru rany. V jednom prípade, u pacienta, ktorého liečba za pomoci VAC trvala len 1 deň, bol výsledok liečby nehodnotiteľný.

Diskusia

VAC liečba dokáže byť efektívnou terapeutickou metódou ťažko sa hojacich rán. Je však len metódou podpornou a jej úspech je výrazne závislý od kvalitnej chirurgickej starostlivosti o ranu a komplexnej starostlivosti o pacienta. (5)

Efektivita VAC liečby sa štatisticky preukázala pri liečbe diabetického vredu, ale pri liečbe iných rán nie sú výsledky jednoznačné. (6)

Je vhodné posudzovať indikáciu použitia VAC liečby u každého pacienta individuálne a dôsledne rešpektovať základné zásady chirurgickej starostlivosti o rany a celkovej starostlivosti o pacienta. Pri rozsiahlejších ranách je po príprave VAC terapiou nutné vždy zvážiť možnosť urýchlenia hojenia pomocou aktívneho chirurgického prístupu k uzavretiu rany plasticko – chirurgickými rekonštrukčnými metódami.

Použitá literatúra

1. European Wound Management Association (EWMA). Position Document: Hard-to-heal wounds: a holistic approach. London: MEP Ltd; 2008.
2. Gustafsson RI, Sjogren J, Ingemansson R. Understanding topical negative pressure therapy. In: Calne S, ed. Position Document. European Wound Management Association; 2007:2–4.
3. Vowden K. Téot L. Vowden P. Selecting topical negative pressure therapy in practice. In: Topical Negative Pressure in Wound Management. EWMA Position Document 2007. London. Medical Education Partnership Ltd.
4. Derby City NHS Controlled Document, Ref: G49, Issue: 1, Folder Section: 3 – Diagnostic, Observations & Treatments, Approved Date: Mar 2008, Review Date: Mar 2010.
5. Koller J: Vákuom asistovaná liečba (VAC) u popálenín a v rekonštrukčnej chirurgii. In: Šimek M. (ed.): Podlaková liečba rán v chirurgii (v tlači).
6. Technology Assesment Unit of the McGil University Health Centre, Negative Pressure Wound Therapy (NPWT) (Update of Report 19), Report Number 48, June 25, 2010.

12. Účinok ubichinolu na psychologické prejavy, oxidačný stres a antioxidanty u detí s autizmom (predbežné pilotné výsledky).

Dalibor Nakládal, Antónia Koplíková
(II. Ročník, Farmaceutická Fakulta UK, Bratislava)

Školiteľ: prof. RNDr. Anna Gvozdjáková, DrSc.
Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Farmakobiochemické laboratórium III. Internej kliniky, Bratislava

Úvod

Autizmus predstavuje multifaktoriálne poškodenie centrálneho nervového systému, ktoré sa manifestuje do 3 rokov po narodení. K charakteristickým prejavom autizmu patrí problémové správanie (hyperaktivita, deštruktivita, automutilácia, agresivita), poruchy spánku, poruchy v prijímaní potravy. Príčina ochorenia môže byť na genetickej, endokrinnej, imunologickej, prípadne metabolickej úrovni [1]. Metabolické zmeny môžu zahŕňať antioxidačný ochranný systém, oxidačný stres a tvorbu energie v mitochondriách mozgu, ktorá priamo súvisí s koncentráciou koenzýmu Q_{10}. V súčasnom období sa hľadajú nové diagnostické metódy a terapeutické možnosti autizmu.

Cieľ

1./ pokúsiť sa nájsť novú diagnostickú metódu autizmu, 2./ sledovať účinok podpornej terapie s ubichinolom (redukovaný koenzým Q_{10}, QH) na správanie, fyziologické funkcie, koncentráciu vybraných antioxidantov a oxidačného stresu v plazme detí s autizmom.

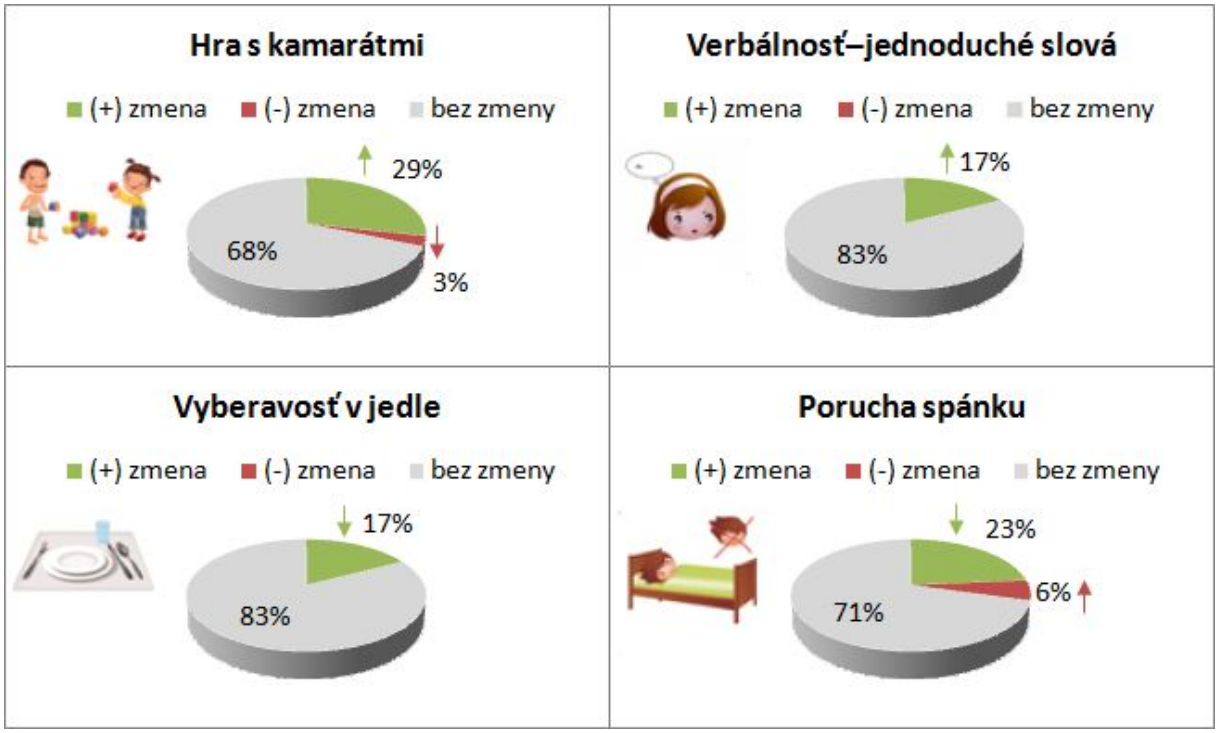
Materiál a metódy

Pacienti vo veku 3-6 rokov, boli zaradení podľa kritérií MKCH-10 (Medzinárodná klasifikácia chorôb-10) a miery autistických prejavov podľa CARS (skríningové testy pre autizmus). Všetky deti (v celkovom počte 24) boli vyšetrené pred vstupom do projektu psychológom, prípadne neurológom. Antioxidanty (γ-tokoferol, α-tokoferol, β-karotén a $CoQ_{10\text{-}TOTAL}$) sme extrahovali z plazmy, boli stanovené pomocou metódy HPLC (vysoko účinná kvapalinová chromatografia), za použitia UV detektora [2, 3]. Peroxidáciu lipidov (parameter oxidačného stresu) sme stanovili spektrofotometricky [4]. Na podpornej terapii s ubichinolom (QH) počas 3 mesiacov bolo 18 autistov, počas 2 mesiacov 6 autistov, s nasledujúcim mesiacom bez podpornej terapie s QH. Denná dávka QH (Li-QH™ - tekutý lipozomálny redukovaný koenzým Q_{10}) bola 2 x 50 mg. Kontrolné vyšetrenia boli urobené po 2 – prípadne 3 – mesačnej podpornej terapii. Rodičia detí s autizmom vyplnili psychologický dotazník pred začatím užívania QH, po 1-, po 2- a po 3- mesačnom účinku QH. Výsledky sme štatisticky vyhodnotili párovým Studentovým t-testom.

Výsledky

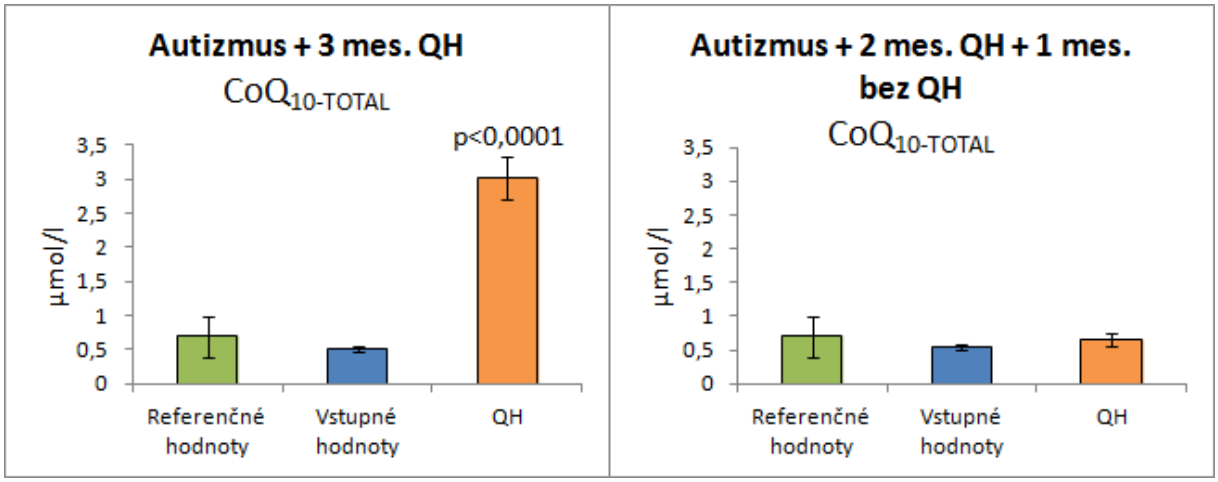
3-mesačná podporná terapia s QH u detí s autizmom sa pozitívne prejavila v správaní pacientov, prevládalo celkové zlepšenie komunikácie s rodičmi, hra s kamarátmi, menej agresivity, menej automutilácie, hnevu a kriku bez príčiny. Takmer u všetkých sa zlepšila slovná komunikácia, zmena v záujmoch, činnostiach, zlepšenie spánku a stravovania (obr.1).

Obr.1. Účinok Li-QH™ na správanie a fyziologické funkcie u detí s autizmom



Priaznivý účinok QH bol dokázaný najmä u detí s autizmom, u ktorých sa zvýšila koncentrácia celkového koenzýmu Q_{10} v plazme na terapeutickú hodnotu, nad 2,5 µmol/liter (obr. 2.) [5]. Účinkom QH sa mierne znížila peroxidácia lipidov, ktorá bola na hornej referenčnej hranici. Zníženie peroxidácie lipidov pretrvávalo aj u pacientov, u ktorých po 2-mesačnej podpornej terapii s QH, pacienti boli ďalší mesiac bez QH podpornej liečby. V ojedinelých prípadoch, najmä v prvých dňoch podpornej liečby s QH, sa vyskytli aj opačné účinky (zvýšenie hyperaktivity, deštruktívnych prejavov a hnevu, porucha spánku). V týchto prípadoch sme prispôsobili čas podpornej terapie a množstvo denných dávok QH.

Obr. 2. Účinok Li-QH™ na koncentráciu celkového koenzýmu Q_{10} ($CoQ_{10\text{-TOTAL}}$) v plazme detí s autizmom



Diskusia

Autizmus u detí predstavuje závažné poruchy centrálneho nervového systému, ktoré sa prejavujú problémovým správaním, poruchou spánku, komunikácie, prípadne poruchou v prijímaní potravy. V súčasnom období sa hľadajú nové diagnostické prístupy autizmu ako aj terapeutické možnosti. Oxidačný stres u autizmu súvisí so zmenami v antioxidačných enzýmoch, v poruche metabolizmu železa a medi, dysfunkciou mitochondrií a energetického metabolizmu pri autizme, vplyvom rizikových faktorov životného prostredia, genetickou predispozíciou. Oxidačný stres môže súvisieť s dysfunkciou neurónov, s imunitou, môže prispieť k vývoju tohto ochorenia [6]. Podporná terapia u autizmu zahŕňa melatonín, karnitín, vitamín C, karnozín, multivitamínový komplex, vitamín B_6 a horčík, probiotiká, vitamíny A a D s vápnikom, omega-3 polynenasýtené mastné kyseliny, železo, selén, zinok, prípadne hyperbarická kyslíková terapia [6, 7].

V súčasnom období nie sú dostupné informácie o účinku ubichinolu u detí s autizmom. Koenzým Q_{10} sa vyskytuje v organizme v tzv. „Q-CYKLE“ v rámci respiračného reťazca mitochondrií, teda v oxidovanej (ubichinón), redukovanej (ubichinol) a radikálovej forme (semichinón). Koenzým Q_{10}, antioxidant, je kľúčová látka respiračného reťazca mitochondrií, ktorý je nepostrádateľný pre tvorbu energie v bunkách vo forme ATP (adenozín trifosfát). Na základe predchádzajúcich experimentálnych výsledkov o účinku Li-QH™ na koncentráciu koenzýmu Q_{10} v jednotlivých štruktúrach mozgu, ktoré riadia a ovplyvňujú organizmus (ako je aktivita, spánok, bdenie, prijímanie potravy, činnosť srdca a iných orgánov, emócie a iné...) sme predpokladali pozitívny účinok aj u detí s autizmom [8]. Priaznivý účinok QH sa prejavil najmä u detí s autizmom, u ktorých sa zvýšila koncentrácia celkového koenzýmu Q_{10} v plazme nad 2,5 µmol/liter, čo predstavuje terapeutickú hodnotu [5].

Záver

Na základe predbežných výsledkov predpokladáme, že stanovenie koncentrácie celkového CoQ_{10} v plazme má význam nielen ako nová diagnostická metóda autizmu, ale nadobúda význam aj pri podpornej terapii s ubichinolom. Dôkazom toho sú pozitívne výsledky účinku redukovaného koenzýmu Q_{10} (Li-QH^{TM}), ktoré sa prejavili pri dosiahnutí terapeutickej hodnoty CoQ_{10} nad 2,5 µmol $CoQ_{10\text{-}TOTAL}$/liter plazmy.

Účinok ubichinolu u detí s autizmom patrí k pilotným výsledkom podpornej terapie autizmu. Pri odporúčaní denných dávok ubichinolu (Li-QH^{TM}) je nutné postupovať individuálne, sledovať zdravotný stav pacientov v spolupráci s ošetrujúcim lekárom.

Použitá literatúra

1. Ostatníková D. a kolektív: Autizmus z pohľadu neuropsychobiológie, Univerzita Komenského Bratislava, 2010, pp. 260.
2. Lang JK, Gohil K, Packer L. Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. Anal Biochem 1986; 157: 106-116.
3. Kucharská J, Gvozdjáková A, Mizera S, Braunova Z, Schreinerova Z, Schramekova E. Participation of coenzyme Q_{10} in the rejection development of the transplanted heart: a clinical study. Physiol Res 1998; 47: 399-204.
4. Janero DR, Burghardt B. Thiobarbituric acid-reactive malondialdehyde formation during superoxide-dependent iron-catalyzed lipid peroxidation: influence of peroxidation conditions. Lipids 1989; 24: 125-131.
5. Gvozdjáková A, Kucharská J, Babinská K, Lakatošová S, Nakládalová K, Gvozdjáková L, Nakládal D, Koplíková A, Ostrihoňová S, Mego R, Ostatníková D: Bazálne hladiny antioxidantov, peroxidácie lipidov a účinok lipozomálneho redukovaného koenzýmu Q_{10} na

psychologické prejavy u detí s autizmom (Predbežné pilotné výsledky medzinárodného projektu). Revue Medicíny v Praxi, 2011, 10/1: 11-13.

6. Chauhan A, Chauhan V: Oxidative stress in autism. Pathophysiology, 2006, 13: 171 -181.
7. Rossignol DA: Novel and emerging treatments for autism spectrum disorders: A systematic review. Annals of Clinical Psychiatry, 2009, 21/4: 213-236.
8. Gvozdjáková A, Mravec B, Kucharská J, Lackovičová L, Ondičová K, Mikulecký M, Tkáčov M, Singh RB: Ubiquinol stimulates ubiquinone production in brain structures. Sixth Conference of the International Coenzyme Q_{10} Association, Brussel, Belgium, May 27 – 30, 2010: 85-88.

Poďakovanie. Výsledky práce boli podporené grantom MŠ SR, VEGA 1/0328/10, TISHCON Corp., USA, (poskytnutie Li-QH® - lipozomálny ubichinol), prof. RNDr. Anne Gvozdjákovej, DrSc. (školiteľ), PharmDr. J. Kucharskej, PhD (za meranie antioxidantov), A. Štetkovej za technickú spoluprácu, Dr. Jánošíkovej za vypracovanie psychologického dotazníka, Doc. MUDr. D. Ostatníkovej, PhD a kolektívu za zabezpečenie a výber pacientov.

13. Correlation between laboratory and histopathology findings in patients with liver cirrhosis

Joana Gomes, Giorgos Siskos
(General medicine, 6th year)

Supervisor: MUDr. Pavol Janega, PhD.[1]
[1] Institute of Pathological Anatomy, Bratislava

Introduction

Cirrhosis of the liver was identified and published by the anatomic pathologist, Gianbattista Morgagni in his 500 autopsies in 1761. Only in 1930, however, the first theory as to the pathogenesis of this disorder was advanced by Robert Roessle as the combination of parenchymal degeneration, regeneration and scarring[1]. The pathogenesis is now understood according to the sequence of tissue:

1. Injury,
2. Degeneration,
3. Fibrosis,
4. Formation of fibro-vascular membranes,
5. Parenchymal dissection into nodules,
6. Rearrangement of blood circulation and
7. Cirrhosis[1]

Liver fibrosis results from continuous injury to the liver, including viral hepatitis, alcohol abuse and other chronic intoxication, metabolic diseases, auto-immune diseases, and cholestatic liver diseases. Fibrosis is a consequence of excessive healing response triggered by chronic liver injury. The end stage of liver fibrosis, cirrhosis, is histologically characterized by increased deposition and altered composition of the extracellular matrix (ECM) and the appearance of regenerative nodules.[2] The destruction of the normal architecture and the loss of hepatocytes prevent the liver from its normal synthetic and metabolic function.[3]

About one third of patients with liver cirrhosis are compensated and do not produce any clinical symptoms. Fibrosis or cirrhosis of the liver is then accidentally discovered during a medical examination or an operation or at autopsy. The rest are decompensated and produce complications mainly due to liver failure and portal hypertension. To the typical clinical symptoms belongs ascites, varices, portal vein thrombosis, digestive hemorrhages, jaundice, hepatic encephalopathy, impaired coagulation, anemia or neoplastic transformation. [1]

Histopathological examination is the gold standard in diagnostic process to confirm and stage of liver damage. Nevertheless, all invasive procedures are accompanied by risk of complications and have mortality rate associated with them. The benefits of obtaining liver for histology should always be weighed against the possible morbidity and mortality of the procedure [4]. There is a paucity of publications attempting to identify reliable non-invasive alternatives to biopsy. Most alternatives to liver biopsy assess one aspect of liver disease and translate this into a numeric score. Though, a single numeric score cannot be a substitute for complete histologic assessment, which can identify multiple disease etiologies. On the other hand, within defined clinical contexts, noninvasive assessment is an attractive alternative for many patients given the ease, avoidance of risk from invasive procedures, and validated contribution to clinical management.[5]

The presented study aimed to analyze the correlation between histopathological changes in cirrhotic liver and different biochemical parameters obtained during patient hospitalization.

Patients and methods

A retrospective study was realized using the formalin fixed and in paraffin embedded samples of liver tissue from autopsy of 50 patients (31 males and 19 females) with clinical diagnosis of liver fibrosis or cirrhosis; 32 patients had the history of chronic alcohol abuse, diabetes mellitus was present in 13 patients, 11 patients were hospitalized with the neoplastic process (urinary bladder, kidney, ovary, colon) without metastasizing into the liver. Patients with the neoplastic process disseminated in the liver tissue were excluded from the study. Additional samples from 24 patients with the diagnosis of liver venostasis without the development of liver fibrosis or cirrhosis were analyzed as controls. The samples came from the archive of the Institute of Pathological Anatomy, Faculty of medicine in Bratislava and were included in the study, based on the availability of adequate liver samples and corresponding laboratory data, referred from the hospital medical records.

Samples of the liver fixed in 4 % formaldehyde, embedded in paraffin, were cut in 4 μm slices and stained routinely with hematoxylin and eosin to confirm the histopathological diagnosis. Modified picrosirius red staining technique[6] was used to determine the level of fibrosis. Total fibrosis of each tissue sample was analyzed by light microscopy in polarized light and measured by histomorphometry in 10 microscopic fields at 20x magnification, with the intention of covering its whole area and posteriorly quantified using the ImageJ morphometric software v.1.33 (National Institutes of Health, USA). Results are expressed as the percentage of collagen positivity out of the total analyzed area. The area rich for collagen type I (red color in polarized light) and collagen type III (green color in polarized light) were analyzed by digital color extraction, and then the ratio of collagen type I to collagen type III was also determined.

The laboratory data obtained from medical autopsy reports were recorded and correlated with the histopathological findings. We focused at the level of standard biochemical parameters AST, ALT, ALP, GMT, total and conjugated bilirubin and albumin. The parameters were documented according to their minimum and maximum value described. The correlations were statistically analyzed by unpaired t-test and linear regression between the analyzed parameter and collagen area, using the GraphPad Prism (LaJolla, USA).

Results

The patients with liver cirrhosis had significantly increased level of AST (3.01±0.90 vs. 0.58±0.07 ukat/l, $p<0,01$), ALT (1.31±0.31 vs. 0.61±0.12 ukat/l, $p<0,01$), AST/ALT ratio (2.52±0.20 vs. 1.27±0.13 %, $p<0,01$) and total bilirubin (84.26±12.33 vs. 12,6±1.9 mmol/l, $p<0,01$) and significantly decreased albumin level (24.9±1.2 vs. 31.6±1.8 g/l, $p<0,01$ comparing to controls.

	AST/ALT		
	<1		>2
Control	45,80%	41,70%	12,50%
Cirrhosis	6,80%	41,00%	52,20%
Alcohol abuse	3,10%	46,90%	50%

Tab. 1 The percentage of patients with AST/ALT ratio bellow 1, between 1 to 2 and over 2 in each group. AST/ALT ratio was significantly increased in cirrhotic group. This increase was not dependent on alcohol abuse.

The development of liver cirrhosis is accompanied by the increase of collagen level in affected tissue (3.9±0.49 vs. 0,74±0.08 %) when compared to controls. It is interesting, that the cirrhotic liver is characterized by more pronounced increase of collagen type III, comparing to collagen type I, with the significant decrease of collagen type I to III ratio (Fig.1) in cirrhotic group comparing to controls (0,88±0.07 vs. 1,2±0.12, $p=0,03$).

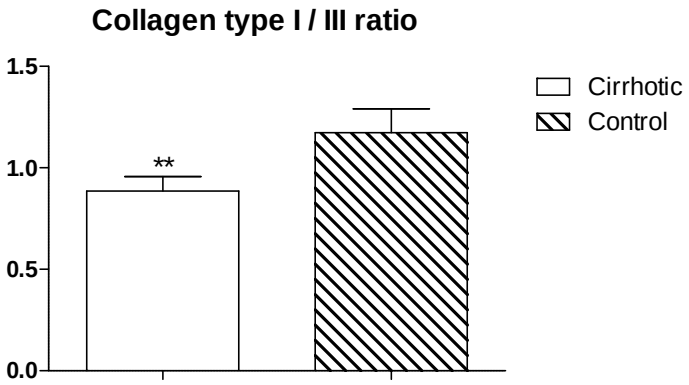


Fig. 1 Collagen I to III ratio. More pronounced increase of collagen type III, comparing to collagen type I, with the significant decrease of collagen type I to III ratio was found in cirrhotic group comparing to controls.

No statistically significant correlation was found between collagen amount and any analyzed laboratory parameter. However, in the correlation between plasma level of total bilirubin and collagen amount in liver, we can differentiate two subgroups within the cirrhotic patients; group A and B (Fig.2a). One group (A) is characterized by disproportionately higher bilirubin level with simultaneously lower collagen amount, the second group (B) has significantly more serious liver cirrhosis but accompanied by lower bilirubin level. In both groups, when analyzed separately, the linear correlation between bilirubin depending on collagen amount is significant. Similar findings were also noticed for AST and ALT, but these results were not significant. These groups were not associated with gender (Fig.2b), or with the possible alcohol abuse (Fig.2c). Any association to previous history of neoplastic disease or diabetes mellitus was also, not found.

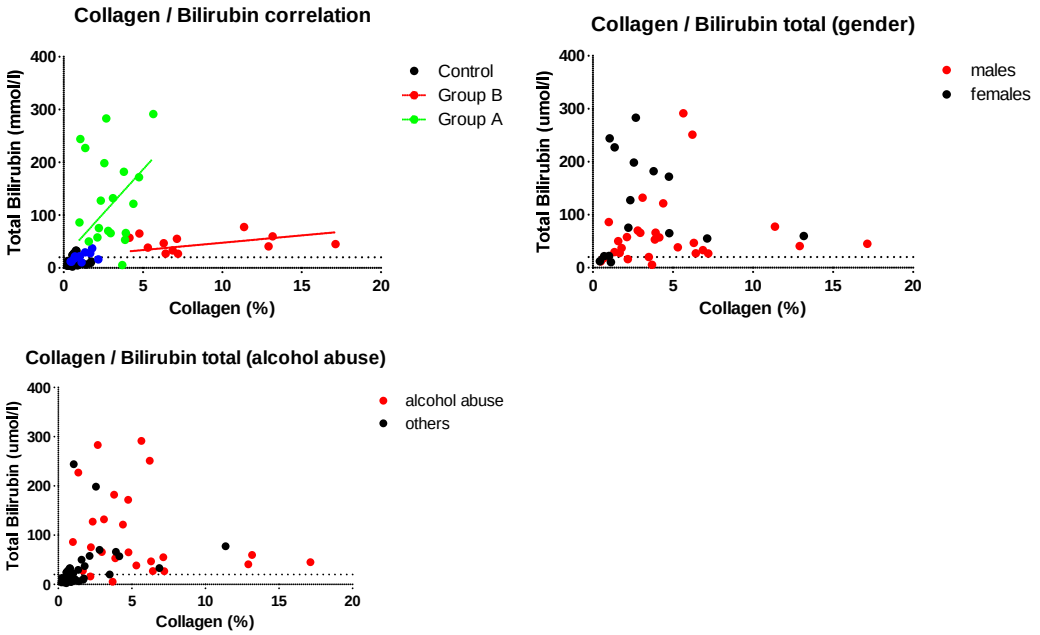


Fig. 2 Collagen and total bilirubin correlation. Correlation between collagen area and total bilirubin pointed at two different subgroups of patients within the cirrhotic group, independent on gender and alcohol abuse.

Discussion

In presented study, we analyzed the course of liver-related laboratorial markers and their correlation to collagen amount in liver among patients with liver cirrhosis. The quantification of collagen amount in affected liver by morphometry followed by correlation with different laboratory markers is a suitable approach that could help to distinguish potential parameters useful in the non-invasive staging of liver cirrhosis.

Histological examination revealed marked increase in amounts of collagen type I and, predominantly, of type III in cirrhotic patients. This is in accordance with Rojkind et al., which showed that the collagen from normal liver is predominantly type I, whereas in fibrosis are increased both collagens, but the increase in type III is proportionately larger.[8] Increased collagen type III playing the crucial role in the repair of liver damage was described also by Veidal et al. [9]

No significant correlation between laboratory markers and exact collagen amount in cirrhotic liver was found. However, it was possible to observe two different subgroups within the cirrhotic patients, which is suggestive of two distinct clinical courses of liver cirrhosis. One group is characterized by liver failure expressed by higher increase of bilirubin and AST level in sooner stage of liver fibrosis, vice versa as in the second group. We could not support our results with other authors, since in the available literature there are not any data about the correlation between the exact collagen amount and bilirubin or AST level. It is likely, that patients with slightly increased levels of bilirubin simultaneously with moderate to severe degree of cirrhosis (group B), follow an indolent course of the disease, suggesting that the liver better compensates the injury. On the other hand, the patients with highly increased levels of bilirubin and coexisting mild cirrhosis of the liver (group A), have a faster progression of the disease, suggesting early decompensation of the liver. They are many data indicating that the progression rate of liver cirrhosis development differs among patients, related to etiology, especially to hepatitis C infection[11] or based on genetic predisposition. In our study no etiological correlations were found. However they were not sufficient data about the possible hepatitis C virus infection available in clinical reports. It will be necessary to realize the genetic analysis of liver samples for HCV in the future.

In the patients with liver cirrhosis, the AST/ALT ratio is significantly increased. According to Correia et al., an elevated serum AST in relation to serum ALT has been proposed as an indicator that alcohol has induced organ damage. Thus, when AST/ALT ratio is >1.5, this is considered as highly suggestive that alcohol is the cause of the patient's liver injury.[7] Giannini et al., showed that the AST/ALT ratio was able to grade the disease in patients with cirrhosis, being significantly higher in decompensated patients compared with well-compensated disease.[8] However, when correlate AST/ALT ratio with the alcohol abuse cases in the cirrhotic patients, we found no clear relation. The AST/ALT ratio was increased over 1 also in half of the patients in control group without the development of liver fibrosis.

The present study has shown no significant correlation between laboratory markers and collagen amount in cirrhotic liver that could be used in non-invasive staging of liver cirrhosis. The original finding regarding the subgroups in the cirrhotic study group as means of representing two different clinical courses, will enable future researches in attempting to predict the outcome of cirrhosis and improve the care for these patients.

Acknowledgements. The work was supported by the Framework Programme for Research and Technology Development, project: Building of Centre of Excellency for Sudden Cerebral Vascular Events, Comenius University Faculty of Medicine in Bratislava (ITMS: 26240120023),cofinanced by European Regional Development Fund.

References

1. Liver Cirrhosis. Review of Pathology of the Liver.
2. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J. Clin. Invest. 2005.

3. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. J. Clin. Invest. 2007
4. A Grant, J Neuberger. Gut. 1999
5. Van Leeuwen DJ, Balabaud C, Crawford JM, Bioulac-Sage P, Dhillon AP. Clin Gastroenterol Hepatol. 2008 May
6. Dolber PC, Spach MS: Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. J Histochem Cytochem. 1993.
7. Correia, J. P., Alves, P. S. and Camilo, E. A. SGOT-SGPT ratios. Digestive Diseases and Sciences. 1981
8. Rojkind and Martinez-Palorno. Increase in type I and type III collagens in human alcoholic liver cirrhosis. Cell Biology. 1976
9. Veidal SS, Vassiliadis E, Barascuk N, Zhang C, Segovia-Silvestre T, Klickstein L, Larsen MR, Qvist P, Christiansen C, Vainer B, Karsdal MA. Matrix metalloproteinase-9-mediated type III collagen degradation as a novel serological biochemical marker for liver fibrogenesis. Liver Int. 2010
10. Giannini et al, Validity and Clinical Utility of the Aspartate Aminotransferase–Alanine Aminotransferase Ratio in Assessing Disease Severity and Prognosis in Patients With Hepatitis C Virus–Related Chronic Liver Disease. 2003
11. Probst A, Dang T, Bochud M, Egger M, Negro F, Bochud PY. Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression--a systematic review and meta-analysis. J Viral Hepat. 2011

51. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI

ANATOMICKÁ SEKCIA

Hodnotiaca komisia

predseda: **doc. MUDr. Eliška Kubíková, PhD.**
členovia: **MUDr. Dalibor Hojsík, PhD.**
MUDr. Vladimír Šišovský, PhD.

1. miesto
Konstantinos Savvas, Christos Vazaios
The macroscopical relations of the main pathways.

2. miesto
Grigoriadou Georgia, Colson Brian Patrick
Anatomy and Clinical Importance of the Axillary Fossa.

3. miesto
Efthychia-Maria Kontouri
Posterior Mediastinum and its Clinical Importance.

14. Phrenic nerve as a branch of the cervical plexus

Michail Gerolaimou
(General Medicine, 1st year)

Supervisors : MUDr. Petra Šelmeciová, PhD., MUDr. Hisham El Falougy, PhD.
Institute of Anatomy

Introduction

Nerve plexuses are divided in two categories, visceral which are directed to inner organs (controlling smooth muscles involuntarily) and somatic (controlling skeletal muscles voluntarily). The cervical plexus is a major nervous plexus, which is considered somatic and is formed by the anterior rami of the spinal nerves C1 to C4. The phrenic nerve is a branch of the cervical plexus, which is responsible for the innervation of the pericardium, the mediastinal pleura and the diaphragm.

The aim of this research is to evaluate the path of the phrenic nerve and its relation with other organs and structures. Another purpose of this research is also to give the chance to other medical students understand the path and the importance of the phrenic nerve.

Materials and Methods

In order to comprehend the path of the phrenic nerve we had to dissect it at the level of the neck and at the pericardium. We used the cadavers at the dissection room of Institute of Anatomy at the Comenius University of Bratislava and the basic anatomical dissection tools. For the dissection of the phrenic nerve from the pericardium we had to open the thorax by using medical bone cutters.

For the dissection of the phrenic nerve at the level of the neck at the right side we used a cadaver in which the skin and the superficial muscles of the neck were dissected. In order to dissect the phrenic nerve we had to extract some of the connective tissue in order to get a clear view of the neck. After locating the

subclavian artery we traced the phrenic nerve, which was surrounded by some connective tissue. By using forceps we managed to extract it from the surrounding structures and finally dissect it.

In order to open the thorax for the dissection of the phrenic nerve from the pericardium we removed the partly dissected skin by cutting the connective tissue with a scalpel until the level of the posterior axillary fold. We also dissected the pectoralis major and pectoralis minor muscles by doing an incision with the scalpel at their origins and finally by using forceps we detached them from the thorax. Finally by using of medical bone cutters we cut the ribs and opened the thorax. By using forceps we dissected the left phrenic nerve from the fibrous layer of the lateral wall of the pericardium until the level of the diaphragm. We after had to clean the nerve with forceps from parts of the fibrous layer that were still attached to it. On the right side and again by the help of forceps we dissected it from the lateral part of the fibrous layer of the pericardium until the level of the caval foramen and separated it from the pericardium.

Results and Discussion

According to our research the phrenic nerve is mostly originating from the 4th cervical nerve but the 5th and the 3rd cervical nerves are also contributing. The C5 spinal nerve contributes to the phrenic nerve by an accessory phrenic nerve, which is a branch of the nerve to the subclavius, descending anteriorly or posteriorly of the subclavian vein. It is placed laterally to the main nerve and may join the phrenic nerve at the root of the neck or in the thorax. In addition to this nerve the phrenic nerve, may receive

branches from the ansa cervicalis or from the cervical sympathetic trunk (containing the paravertebral ganglia).

The path of the phrenic nerve is very similar in both sides. On the left side after descending anteriorly from the anterior scalene muscle, it goes anteriorly of the subclavian artery, crosses the aortic arch and attaches at the pericardium at the level of the left ventricle and finally exits by piercing the diaphragm. On the right side similarly passes anteriorly of the anterior scalene muscle and anteriorly of the of the subclavian artery, posteriorly of the internal jugular vein over the brachiocephalic trunk, posteriorly to the subclavian vein and after continues anteriorly at the level of the root of the right lung and attaches to the pericardium close to the right atrium. It finally leaves the diaphragm from the caval foramen at the level of T8 where the inferior vena cava exits. Phrenic nerves supply their motor fibers to the diaphragm and their sensory fibers to the pericardium, mediastinal pleura, diaphragmatic peritoneum and diaphragmatic pleura.

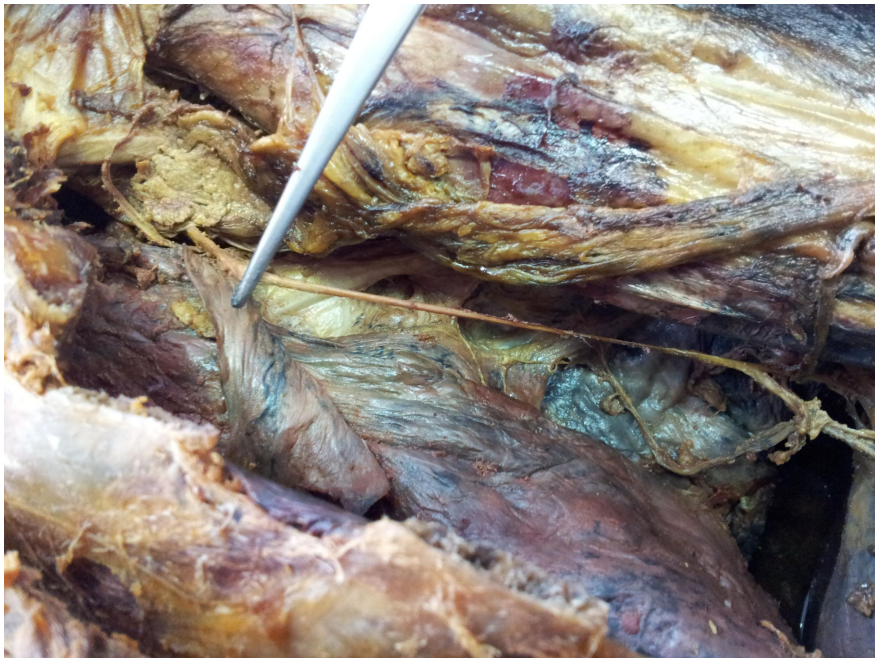


Photo: Right phrenic nerve dissected from pericardium

From our results from the dissection preformed at the level of the neck, we located the phrenic nerve lateral of the common carotid artery, passing anteriorly of the first part of the subclavian artery and descending anteriorly of the anterior scalene muscle as my research suggested. After its dissection we noticed it continued descending more medially to join the pericardium.

At the pericardium on the left side we traced the phrenic nerve firstly attached at the level of the left ventricle and continuing to descend at the lateral wall of the of the pericardium until inferiorly were it pierced the diaphragm, which was accordant with that path stated in my research. We after traced the phrenic nerve on the right side on the lateral part of the fibrous layer of the pericardium at about the level of the root of right lung, descending down to the diaphragm to the caval foramen as again my research suggested.

The results we obtained for the path of the right phrenic nerve at the level of the neck and for the left and right phrenic nerves at the pericardium and inside the thorax were all confirmed by our research. An aspect of the phrenic nerve, which is worth mentioning, is it's clinical importance. Phrenic nerves innervate the diaphragm with motor fibers, producing contraction of the diaphragm, which permits expansion of the chest cavity, and allow breathing. Damage to the phrenic nerve may occur during surgery (surgery of the lungs, heart valve surgery) or due to epidural injections, chiropractic manipulation of the neck or even because of a trauma. The most common symptom of phrenic nerve

injury is diaphragmatic paralysis, which causes breathing difficulties. This kind of breathing difficulties may further cause abscess in the diaphragm and tissues or even a ruptured spleen.

Conclusion

By this project we managed to describe the path of the phrenic nerve as well as its clinical importance. It would be favorable if this research would be used to provide to other medical students knowledge about this important nerve of our organism.

References

1. Jadhav, Aparna. "Phrenic Nerve Damage." *Buzzle.com*. Buzzle.com, 25 Jan. 2011. Web. 10 Mar. 2012. <http://www.buzzle.com/articles/phrenic-nerve-damage.html>.
2. "Phrenic Nerve (anatomy) - General Practice Notebook." *Untitled Document*. Web. 10 Mar. 2012. <http://www.gpnotebook.co.uk/simplepage.cfm?ID=-1402273763>.
3. "Phrenic Nerve Injuries." - *Diaphragm Muscle Damage*. Web. 10 Mar. 2012. <http://www.advancedreconstruction.com/nerve-surgery-reconstruction/phrenic-nerve-injuries/>.
4. Drake RL, Vogl AW, Mitchell AWM. Grey's Anatomy for Students. Second Edition. Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier, 2010, 50-51.
5. Romanes GJ (Eds). Cunningham's Textbook of Anatomy. Twelfth Edition. Toronto, Oxford, 1981, 773.

15. Anatomical preparation of the knee joint

Alexandra-Maria Koui, Maria Lasithiotaki
(general medicine, 2.year)

Supervisor: MUDr Petra Šelmeciová, PhD., MUDr Hisham El Falougy, PhD.
Institute of Anatomy, Comenius University of Bratislava

Introduction

The aim of this project is the preparation and presentation of the knee joint, so as to become known to students of medical school. The reported topic is examined and approached from anatomical and clinical point of view, in order to clear the components and function of the joint and the clinical correlations that arise from them.

The knee joint, is the largest joint in the human body and anatomically the most complicated. It belongs to diarthroses or synovial joints and it is considered as a hinge joint, a special type of mobile trochoginglymus. It is the site of connection of femur with tibia. The patella also participates in formation of the joint, by being inserted in the thin anterior wall of the joint capsule. Its complexity responds to the presence of all additional (plus the basic and necessary) features, that a synovial joint can have. It is attached with muscle fibers from the surrounding muscles known as articular muscles which strengthen it. The articular capsule of the knee joint, commonly known as capsular ligament, is wide and lax; thin in front and at the side. The surrounding ligaments which offer stability to the knee joint by limiting movements protect the articular capsule and they can be divided to extracapsular and intracapsular. There are numerous bursae surrounding the knee joint. Thin-walled and filled with synovial fluid, they represent the weak part of the joint, but also enlargements to the joint space. They are usually grouped into either communicating or non-communicating. Finally, the menisci of knee joint are two pads of connective tissue, the lateral and the medial, which serve to disperse friction in knee joint between tibia and femur.

The knee joint permits flexion and extension, as well as a slight medial and lateral rotation around the axis of the lower leg in the flexed position. The knee joint is called ‘mobile’, because the femur and lateral meniscus move over the tibia during rotation, while the femur rolls and glides over both menisci during extension and flexion.

Material and methods

To perform the anatomical preparation of the knee joint, we’ve been to the dissection room of the institute of Anatomy of faculty of medicine, Comenius University. We dissected the separate knee of a male cadaver, which was kept in formaline during the procedure. First of all, by using the classical anatomical instruments, we removed the fatty tissue, the muscles surrounding the knee joint, the blood vessels, and nerves. We restored the collateral ligaments as well as the patellar ligament.

Afterwards, we opened the articular capsule. Later we merged the knee joint in benzyl alcohol solution, in order to dry and defat the joint for one week. Next step was treating the knee joint into hydrogen peroxide solution for four days, so as to have all the fat and soft tissue removed. We polished the joint and then color the components of it so as to be more distinct.

Results and discussion

From the procedures followed at the dissection room of the institute of anatomy of our faculty, we have obtained an ideal model of the knee joint. The model presents both the extra-articular and the intra-articular ligaments in addition to medial and lateral menisci.

The strongest extra-articular ligament is the patellar ligament. It gives the patella its mechanical leverage and also functions as a cap for condyles of femur. Patella tendonitis is the inflammation, degeneration or rupture of the patellar ligament and the tissue that surrounds it, leading to pain and discomfort to the area just below the knee cap. Activities like walking, running and especially swimming or squatting will cause extreme discomfort to the joint. Other ligaments are the medial collateral ligament which stretches from medial epicondyle of femur to the medial tibial condyle, the lateral collateral condyle which stretches from lateral epicondyle of femur to head of fibula. Because the medial collateral ligament (MCL) resists widening of the inside of the knee joint, the ligament is usually injured when the outside of the knee joint is struck. This force causes the outside of the knee to buckle, and the inside to widen. When the MCL is stretched too far, it is susceptible to tearing and injury. Lateral collateral ligament (LCL) injury is an injury to the ligament on the outer side of the knee. It can be a stretch, partial tear, or complete tear of the ligament. The LCL is usually injured by pressure or an injury that pushes the knee joint from the inside, which results in stress on the outside part of the joint.

Moreover, the knee is stabilized by a pair of cruciate ligaments, the anterior cruciate ligament (ACL) which stretches from lateral condyle of femur to anterior intercondylar area and the posterior cruciate ligament which stretches from medial condyle of femur to posterior intercondylar area. The role of the anterior cruciate ligament is to prevent forward movement of the tibia from underneath the femur. The posterior cruciate ligament prevents movement of the tibia in a backwards direction. Together these two ligaments are vitally important to the stability of the knee joint, therefore a torn ACL has serious implications for the stability and function of the knee joint. The posterior cruciate ligament also helps to prevent the tibia from twisting outwards. Injury to the ligament leads to knee instability with the shin bone having a tendency to 'sag' backwards when the knee is bent at 90 degrees.

Last but not least, we can find the two menisci of the knee joint, the medial and the lateral. The most common problem caused by a torn meniscus is pain. The pain may be felt along the edge of the knee joint closest to where the meniscus is located. Or the pain may be vaguer and involve the whole knee. The knee may swell, causing it to feel stiff and tight. This is usually because fluid accumulates inside the knee joint. This is not unique to meniscal tears, since it can also occur when the knee becomes inflamed. The knee joint can also lock up if the tear is large enough. Locking refers to the inability to completely straighten out the knee. This can happen when a fragment of the meniscus tears free and gets caught in the hinge mechanism of the knee.

A torn meniscus can cause long-term problems. The constant rubbing of the torn meniscus on the articular cartilage may cause the joint surface to become worn, leading to knee osteoarthritis.

There is a group of muscles which are connected directly to the knee joint and prove to be helpful to its movement. Those are the quadriceps femoris, the gastrocnemius (medial and lateral head) and plantaris. Several types of quadriceps injuries can occur, the most common being the quadriceps contusion, which is painful and disabling, as well as strains of the quadriceps tendon, complete and partial tears of the quadriceps tendon, and fascial rupture of the quadriceps muscle. Just like quadriceps, gatrocnemius muscle can also suffer from ruptures and strains. Numerous bursae surround the knee joint. As communicating bursae, we can distinguish the suprapatellar, the semimembranosous and at the origin of the two heads of the gastrocnemius muscle, are the lateral and medial subtedinous bursae of gastrocnemius. The non-communicating bursae include the subcutaneous prepatellar bursa, the deep infrapatellar bursa and some smaller bursae such as the subfcacial or subtendinous patellar.



Conclusion

We have obtained an ideal model of the knee joint, which helped us, as medical students, to understand thoroughly and deeply the anatomy and functions of the particular region of the lower limb, as well as its clinical correlations.

References

1. Platzer W. Color atlas of human anatomy, Locomotor System volume 1.6th edition. Stuttgrat, Thieme, 2003, 206-212
2. Drake RL, Vogl WA, Mitchell AWM. Gray's anatomy for students 2nd edition. Pheladelphia, Churchill Livingstone, 2005, 575-582
3. www.the strechinghandbook.com/archives/patellar-tendonitis
4. www.sportsinjuryclinic.net/sport-injuries/knee-pain
5. www.sportsinjuryclinic.net
6. www.orthogate.org/patient-education/knee/meniscal-injuries

16. Anatomy and Clinical Importance of the Axillary Fossa

Grigoriadou Georgia, Colson Brian Patrick
(General Medicine, 2nd year)

Tutor: MUDr. Hisham El Falougy. PhD. MUDr. Petra Šelmeciová, PhD.
Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava

Introduction

The aim of this project is to gain an understanding of the axillary fossa and its topographical relations, as well as its underlying clinical importance.

The axilla is a truncated cone or pyramidal shaped space between the neck and the upper limb and it is worth considering its borders and limits. The apex of the axilla is the cervicoaxillary canal, the floor is formed by axillary fascia which lies between anterior and posterior axillary folds. The posterior wall is formed by three muscles: subscapularis, teres major and the tendon of latissimus dorsi. The anterior wall is formed by the lateral part of pectoralis major together with pectoralis minor and the enveloping clavipectoral fascia. The lateral wall is the intertubercular sulcus of humerus and the medial is formed by serratus anterior. The contents of the axilla can be summarized as being all the major vessels and nerves extending from the neck to the upper limb. This includes the axillary artery and branches, axillary vein with its tributaries, lymphatic vessels and several node groups together with nerves of the cords and branches of the brachial plexus.

Material and Methods

Using a male cadaver, roughly 70 years of age, from Institute of Anatomy, Comenius University, we performed a dissection of the axillary region. To conduct the dissection we used standard forceps and scalpel and followed the dissection procedure as layed out in Mráz, P et al. With the arm abducted we removed the skin and the subcutaneous fat. We then reflected the pectoralis major and minor muscles and identifying the medial and lateral pectoral nerves together with the pectoral branch of the thoracoacromial trunk. For identification of deeper structures such as the axillary vein, axillary artery and the brachial plexus cords and branches, the pectoral nerves were cut.

Results

In the very beginning of our work we identified the superficial structures of the axillary fossa. The cutaneous nerves of the upper limb; medial antebrachial cutaneous nerve and the anastomosis between the medial brachial cutaneous and the intercostobrachial nerve were distinguished. As a final step we located the “M” pattern formation between the ulnar, musculocutaneous, and median nerve which leads to medial and lateral cords. Behind this arrangement we identified the axillary artery and vein. We traced each of its branches along with their accompanying nerves to reveal their close relationship.

Discussion

Besides of the identification of the different structures we tried to explain on anatomical basis the clinical features of axillary fossa. All lymphatics from upper limb drain into axilla, but also 75% of mammary gland. Breast cancer is closely associated to axillary region as lymphatic drainage from lateral part of the breast passes through nodes to axilla (metastasis). During mastectomy for prevention of postoperative sensory dysfunction of the upper arm and armpit it is important to underline the value

of preserving among the others the intercostobrachial nerve. The vessels of the axillary region have also a clinical importance. Axillary vein, is usually preferred in cases of catheterization (ex; chemotherapy) as well as insertion of pacemaker wires. And while its large size and exposed position make it ideal for catheterization, it also makes it exceptionally vulnerable to inury when the axilla is wounded. Axillary artery can be used for direct arterial pressure monitoring. In case of thrombosis of this vessel even though it supplies the whole upper limb, a complete ischemia is prevented because of the extensive collateral circulation. Likewise in case of profuse bleeding, it can easily be compressed against the humerus.

However, in case of anterior dislocation of the humerus apart from axillary artery injury, brachial plexus should be considered due to its close relationship. A radial nerve injury, for example, in axillary region, might cause paralysis of anconeus and long extensors of the wrist, which lead to inability of extension of the elbow joint the wrist joint and the digits. Apart from the deep nerve injuries one should consider also the cutaneous nerves. In case of branchioplasty knowledge of the anatomy of the course of the medial brachial and antebrachial cutaneous nerves is required for the surgeon to limit nerve injury which might indirectly lead to painful neuromas over the anesthetic area.

References

1. Mraz P et al.: Pitevné cvičenia. Martin: Osveta. 1995: 200
2. Richard L. Drake, Wayne Vogl, Adam W. M.Mitchell, Henry Gray, eds. Gray's Anatomy for Students: Second Edition. Canada, Churchill Livingstone, Elsevier Inc. 2010, 1-1103
3. Moore, Agur, Dalley, eds. Essential Clinical Anatomy: 4th edition. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins : Wolters Kluwer. 2011, 1-736
4. A F MacNamara, A Ismail: Combined brachial plexus and vascular injury in the absence of bony injury. Emergency Medicine Journal, 2000; 17:378-379
5. Saeed Chowdhry, MD, Joshua B. Elston, BA, Todd Lefkowitz, MD, and Bradon J. Wilhelmi, MD: Avoiding the Medial Brachial Cutaneous Nerve in Brachioplasty: An Anatomical Study. Accessible through the internet: http://www.medscape.com/viewarticle/718624 Posted: 04/12/2010 ePlasty. Open Science Company: page 1

17. Posterior Mediastinum and its Clinical Importance

Efthychia –Maria Kontouri, Agori-Maria Korompilia
(general medicine,2nd year, general medicine, 2nd year)

Supervisors: MUDr. Hisham El Falougy, PhD.[1], MUDr. Petra Šelmeciová, PhD[1].
[1] Institute of anatomy, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava

Introduction

This research was designed to aid in practical studies as well as in analysis of topographic relations and clinical importance of the posterior mediastinum and its structures. Initially, the mediastinum forms the central compartment of the thorax between the two pleural cavities. From anatomical point of view is divided into a superior and inferior mediastinum which in turn is further subdivided into anterior-middle-posterior mediastinum. At the same time, from clinical point of view it was better to divide the posterior mediastinum- including all the structures from the superior thoracic aperture until the diaphragm- and the anterior mediastinum-including all the structures in front- where the border between them are the trachea, bronchopericardial membrane and pericardium. Generally, mediastinum houses the thymus gland superficially; the heart surrounded by the pericardial sac, posterior to the heart the trachea which projects in front of the esophagus, large blood vessels, and finally nerve pathways.

Material and methods

For our work we dissected a female cadaver-from the Institute of Anatomy, of Comenius University in Bratislava, using classical autopsy instruments, guided by the manual book-Pitevné cvičenia Prof. MUDr Peter Mráz et al. In order to penetrate to the considered area we remove all the structures which cover it by the accomplishment of the following steps: Firstly we removed the superficial layer of adipose tissue from the superior mediastinum, extract the right and left lung with their hilum (right –left main bronchi respectively, pulmonary arteries and inferior pulmonary veins). Secondly we stripped from the sternocostal surface of the heart the fatty tissue, the connective tissue between pericardial sac and heart resulting the visualization of superior-inferior venae cavae and the chambers of the heart (atrii and ventricles). The same procedure we followed in order to observe the ascending aorta the aortic arch and on the right side the beginning of the brachiocephalic trunk. As we followed step by step this procedure, finally, we were able to detect all the structures in the posterior mediastinum.

Results and discussion

As we approached step by step the examined area we were able to distinguish the following structures: the thoracic aorta with its parietal (intercostal arteries accompanied by intercostals veins and nerves) and visceral branches, the oesophagus in line together with the vagus nerve, the azygos vein system- with the azygos vein on the right side of vertebral column and hemiazygos and accessory hemiazygos veins on the left side and their communication point,

the sympathetic trunk with the splanchnic nerves, and finally the thoracic duct accompanied by the posterior mediastinal nodes.

Analytically, the thoracic aorta which is the thoracic portion of the descending aorta begins at the level of the fourth thoracic vertebra (T4). Anteriorly is in relation with the inferior lobe of the left lung and the retro-pericardial part of the esophagus (more precisely passes along the left side of the esophagus and distally courses behind it). On the right side with the hemiazygos vein and the thoracic duct, on the left side with pleura, it's posterior wall projects against the vertebral column and the inferiorly enters the diaphragm through the aortic hiatus to become the abdominal aorta. Important to mention is the case of the thoracic aneurism, enlargement of a weak area of the aorta which can cause its rupture and blunt injury. Furthermore, esophagus is a muscular tube arises from the inferior border of the cricoids cartilage at the level of the sixth and seventh cervical vertebrae (C6-C7) until the cardiac orifice tenth-eleventh thoracic vertebrae (T10-T11). The examined thoracic part of the esophagus runs parallel to the trachea and at the level of the tracheal bifurcation (T4) is in relation to the descending thoracic aorta on the left, the azygos vein on the right and rests directly against the left atrium of the heart. Its posterior wall contacts with the autonomic esophageal plexus and posterior vagal trunk. Clinical importance of this organ is firstly the gastroesophageal reflux disease (GERD), abnormality in the digestion process with presence of acids, causes heartburn in the thoracic aorta, secondly the hiatal hernia, weakening of the connective tissue of the esophageal hiatus, and thirdly the rupture of the esophageal wall-Boerhaave syndrome (left posterolateral wall) due to excess amount of food and alcohol, but only 10% of esophageal perforations occur due to vomiting.

Moreover, the azygos vein system composed from the azygos vein, on the right side of the body, along with its left-side counterparts, hemiazygos vein and the accessory hemiazygos vein. The former one begins from the abdominal cavity as the union of the ascending lumbar veins with the right subcostal veins and empties at the level of fourth-fifth (L4-L5) through the arch of azygos vein to the superior vena cava. It is covered anteriorly by the esophagus and arches over the right main bronchus posteriorly at the root of the right lung. At the same time, hemiazygos vein as a major tributary of the azygos vein, arises also from the ascending lumbar vein and empties at the level of ninth-tenth thoracic vertebrae (T9-T10) into the azygos vein. Injuries in azygos vein in a blunt chest trauma are uncommon and associated with hypovolemic shock.

Sympathetic trunk, additionally, is component of sympathetic part of the autonomic division of the peripheral nervous system. The concerned thoracic portion is composed by 11-12 ganglia, connected by white and gray rami communicantes, travelling lateral to the vertebral bodies, as it interacts with the spinal nerves. Important component of it is the stellate ganglion located at the level of the seventh cervical vertebra (C7), is created by the fusion of the inferior cervical and first thoracic ganglion. Branches of the fifth to ninth thoracic ganglia join to form the greater splanchnic nerve, similarly ninth to twelfth ganglia form the lesser splanchnic nerve, and lastly eleventh to ganglia compose the least/lowest splanchnic nerve. Sympathetic trunk is sometimes damaged during the anterior approach to lower cervical spine, leading to Horner's syndrome, associated with ptosis, miosis, and anhydrosis. It is also complication in stellate ganglion result difficulty swallowing vocal cord, paralysis and pneumothorax.

Eventually, vagus nerve is the tenth cranial nerve (n. X), descends into the thorax where it ramifies with the viscera. In the examined thoracic area it forms the esophageal plexus, the anterior-posterior vagal trunks, which consists of primarily fibers from the left vagus nerve and few from the right one, and together contribute to the esophageal plexus. Effects of vagus

nerve lesions result in dysphagia and hoarse voice. In addition, injury of this nerve causes the movement of uvula away from the side of lesion, failure of palate elevation, and paralysis of internal laryngeal muscles.

In conclusion, according with our research and the results we lead to the fact that in our examined cadaver the communication point between azygos vein and hemiazygos wasn't visible enough. (Also the presented lymph nodes were enlarged due to the presence of masses identified in the area of the thoracic cavity).



The macroscopical relations of the main pathways

Conclusion

Awareness of the regional/topographical anatomy of the posterior mediastinum may help in identifying and preserving this important area, while it could serve as an extremely effective medium for us to our future medical careers, and also in the teaching process to other students of medicine school, in order to understand, analyze, and to learn more practically the structures of the posterior mediastinum.

References

1. Fritsch H, Kuehnel W. Internal Organs, 5th edition. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 2008, 1 – 372.
2. Kahle W, Frotscher M. Nervous System and Sensory Organs, 6th edition, 2010 Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 2010, 1 – 406.

3. Drake RL, Vogl AW, Mitchell AWM. Gray's Anatomy for Students, 2nd edition. Philadelphia, Churchill Livingstone, 215-223.

18. The macroscopical relations of the main pathways

Konstantinos Savvas, Christos Vazaios
(General Medicine 3.year; General Medicine 3.year)

Supervisors: MUDr. Hisham El Falougy, PhD., MUDr. Petra Šelmeciová, PhD
MUDr. Jana Šteňová
Department of Anatomy LF UK

Introduction

Though the gross anatomy of the brain has been studied by anatomists and clinicians, the intrinsic 3-dimensional microanatomical study of the complex fibers of the white matter is still somewhat neglected. That is the reason why we decided to dissect and study the arrangement and the anatomical relations of the white matter inside the cerebral hemispheres. Part of the white matter structures of the brain are association fibers and internal capsule. Association fibers connect areas within the same hemisphere. The cell bodies of association fibers are the most prevalent type of neuron found in the brain. To the association fibers belong short fibers, superior longitudinal fasciculus, association fibers of gyrus cinguli, perpendicular fasciculus, uncinate fasciculus, inferior longitudinal fasciculus. The internal capsule lies between the lenticular and caudate nuclei. It is a group of myelinated fiber tracts including axons of pyramidal and extrapyramidal upper motor neurons that connect the cortex to the cell bodies of lower motor neurons. This makes it a very crucial place to get a lesion. The internal capsule ends within the cerebrum, just above the midbrain, but the axons that pass through it continue down through brain stem and spinal cord. They descend through the brainstem within two large bundles called the cerebral peduncles or crus cerebri. Despite its close proximity to the caudate nucleus and lentiform nucleus, the internal capsule is not part of the basal ganglia. As stated previously it forms part of the corpus striatum along with the caudate and lentiform nuclei. In the horizontal section the internal capsule exhibits the shape of a hook, made up of the anterior limb, the posterior limb and the genu. Anterior limb includes frontopontine and thalamocortical fibers, the genu contain corticobulbar fibers and the posterior limb contains the corticospinal fibers, corticobulbar fibers and sensory fibers (including the medial lemniscus).

Methods

During our study we used 5 human brains which were formalinated (10% formalin) and they were provided to us by the Department of Anatomy of Comenius University. For the dissection we used 16cm and 12cm forceps. We dissected each hemisphere separately with both medial and lateral approach. We started to dissect the brain from medial side by removing the corpus callosum, cortex of gyrus cinguli, the association fibers of gyrus cinguli, thalamus and caudate nucleus. After the removal of all those structures we were able to see the internal capsule. After the display of the internal capsule we were able to follow the course of the fibers through crus cerebri and pons to medulla oblongata. We continue with the lateral dissection and we first removed frontal, temporal and parietal opercula to expose insular cortex. Then we removed insular cortex, extreme capsule, claustrum to expose lateral aspect of putamen. After we removed that to display fibers of the internal capsule. Then we removed optic tract and superficial dissection of medulla oblongata we exposed longitudinal pontine and the medullary fibers. We also used the transversal section of the brain to display the relations and the topography of the internal capsule.

Results

During our dissections we were able to find and describe the structure and topography of internal capsule by realizing the transversal section of the brain. After we studied the topographical relations of internal capsule we started dissecting the cerebral hemispheres in order to visualize the fibers in the brain. During the dissection of cerebral hemisphere from the medial side we were able to describe the association fibers of gyrus cinguli, fasciculus longitudinalis superior, corona radiata, internal capsule. During the dissection of the cerebral hemisphere from the lateral side we were able to visualize insula, lentiform complex, part of the internal capsule, fasciculus longitudinalis superior and short U-shaped association fibers. We also realize superificial dissection of pons and crus cerebri and we found continuation of pyramidal tract from posterior limb of internal capsule to crus cerebri and finally downwards. During this dissection we exposed rubrospinal tract and nigrospinal tract. During the dissection from the lateral aspect of the cerebral hemisphere we exposed the interconnections of neighboring sulci with short U-shaped association fibers. During dissection from the medial aspect of the cerebral hemisphere we were able to better expose the internal capsule and the fibers converging to it.



Figure 1 Exposure of pyramidal tract descending posterior to the pons and anterior to rubrospinal tract

Discussion

The dissection of the white matter of the brain and thus the tracts it is very important from educational point of view but also from clinical point of view. It is very crucial for medical students to realize and understand the topography of white matter in the brain and which fibers are contained in white matter bundles (e.g internal capsule).It is not easy for a student to study the topography of the white matter of brain only by reading of textbooks, but he needs 3-dimensional orientation and that is why we need to use dissected brains to show to students 3d topographical relations of the structures. From clinical point of view it is very important for physicians to evaluate certain imaging methods and to be able to

take advantage of revolutionary methods, such as MRI guided neurosurgery. A physician should have good anatomical orientation and good anatomical basis in order to correctly evaluate and successfully use the imaging methods. Furthermore it is very important for the physician to be able to diagnose lesions and compressions of white matter in the brain, such as tumors, aneurysms and hemorrhages. All these pathological situations can damage the fibers causing specific symptoms, which are consequences of damage of specific pathways, and if the doctor is able to understand the topography of the lesion can diagnose the patient correctly using imaging methods and the symptomatology of the patient.

References

1. Drake L.R, Vogl W.A, Mitchell A.W.M, Tibbits M.R, , Richardson E.P, Atlas Of Gray's Anatomy, Philadelphia, 2006, 1-558.
2. Chowdhury F. H, et al: White Fiber Dissection, Turkish Neurosurgery 2010, (20), (3), 314-322
3. McCaffrey P, CMSD 620 Neuroanatomy of Speech, Swallowing and Language, The Corpus Striatum, Rhinencephalon, Connecting Fibers, and Diencephalon, Chapter 5, http://www.csuchico.edu/~pmccaffrey/syllabi/CMSD%20320/362unit5.html
4. Snell R.S, Clinical Neuroanatomy, 7th edition, Lippincott Williams Wilkins, 2011, 1-560.

19. Superficial Veins of the lower limb and their impact in clinical medicine

Makris Evangelos-Michail
(general medicine, 1st year)

Supervisors: MUDr. Petra Šelmeciová, PhD., MUDr. Hisham El Falougy, PhD.
Institute of Anatomy, Comenius University of Bratislava, Faculty of Medicine

Introduction

The body has two networks of veins in the upper and lower extremities, the deep and superficial venous systems. The superficial veins which are close to the skin normally bring blood back to the heart by eventually connecting with the deep veins that lie close to nerves, arteries, and bones. In fact, the two systems run parallel to each other, resembling a ladder. So by the term **Superficial Veins** we describe the veins that are located in the subcutaneous tissue between the two layers of the superficial fascia. The superficial veins of the lower extremity are the **Great and Small Saphenous veins** and their tributaries.

The aim of this project is firstly to study the anatomical completeness or not of the superficial veins of the lower limb, and their effectiveness concerning the physiological (or not) function of the human body and secondly to relate the anatomy with the clinical impact of these veins, whether it concerns the pathological part with conditions such as varicose veins, phlebitis, thrombophlebitis (and the connection with deep vein thrombosis) and more, or their use in emergency medicine and cardiovascular procedures.

Materials and procedure

The materials we used were the cadavers at the dissection room of Institute of Anatomy at the Comenius University of Bratislava and the anatomical dissection tools. The procedure we followed was the one described in Pitevné cvičenia (Mráz et al.).

After removal of the skin, we prepared the two main Superficial Veins of the lower limb from their origin in the dorsum of the foot. We dissected these veins and their tributaries from the distal part of the limb toward their inflow in the popliteal vein (vena saphena parva) and the femoral vein (vena saphena magna).

Results

We managed to locate the great and small saphenous veins and their tributaries as well as their connections to the deep veins. The great saphenous vein originated from where the dorsal vein of the first digit (the large toe) merged with the dorsal venous arch of the foot. After passing anterior to the medial malleolus (where it often can be visualized and palpated), it ran up the medial side of the leg. At the knee it ran over the posterior border of the medial epicondyle of the femur bone. The great saphenous vein then coursed laterally to lie on the anterior surface of the thigh before entering an opening in the fascia lata called the saphenous opening. It joined with the femoral vein in the region of the femoral triangle at the saphenofemoral junction. The small saphenous vein originated from where the dorsal vein from the fifth digit (smallest toe) merged with the dorsal venous arch of the foot, which attached to the great saphenous vein. From its origin, it coursed around the lateral aspect of the foot (inferior and posterior to the lateral malleolus) and run along the posterior aspect of the leg (with the

sural nerve), passed between the heads of the gastrocnemius muscle, and drained into the popliteal vein, approximately at or above the level of the knee joint.

Tributaries- At the ankle it received branches from the sole of the foot through the medial marginal vein; in the lower leg it anastomosed freely with the small saphenous vein, communicated with the anterior and posterior tibial veins and received many cutaneous veins; in the thigh it communicated with the femoral vein and received numerous tributaries; those from the medial and posterior parts of the thigh united to form a large accessory saphenous vein which joins the main vein at a variable level. Near the fossa ovalis it is joined by the superficial epigastric, superficial iliac circumflex, and superficial external pudendal veins. The thoracoepigastric vein ran along the lateral aspect of the trunk between the superficial epigastric vein below and the lateral thoracic vein above and established an important communication between the femoral vein and the axillary vein.

As we mentioned in the introduction the body has two networks of veins, the deep venous system and the superficial venous system. Many superficial collecting veins deliver their blood into the great and small saphenous veins, which deliver most of their blood into the deep system through the SFJ (saphenofemoral junction) and the saphenopopliteal junction (SPJ). However, the SPJ and SFJ are not the only pathways from the superficial system to the deep system. These two networks have many connections through their course in the human body and they are called Perforator Veins. The perforator veins are named so because the vessel "perforates" the aponeurosis of the muscle. The perforator veins also have one way valves that if damaged or not work properly may lead to blood flowing from the deep venous system to the superficial increasing the pressure in the superficial venous.

We were able to locate some of the many (the lower limb contains in excess of 100 of these connections) perforating veins. In one of the cadavers we were able to locate in the calf the Paratibial, the posterior tibial PV (formerly Cockett's perforators), in the Anterior leg the lateral leg PV, the Posterior leg PV (medial and lateral gastrocnemius, Intergemellar, para-achillean PV).

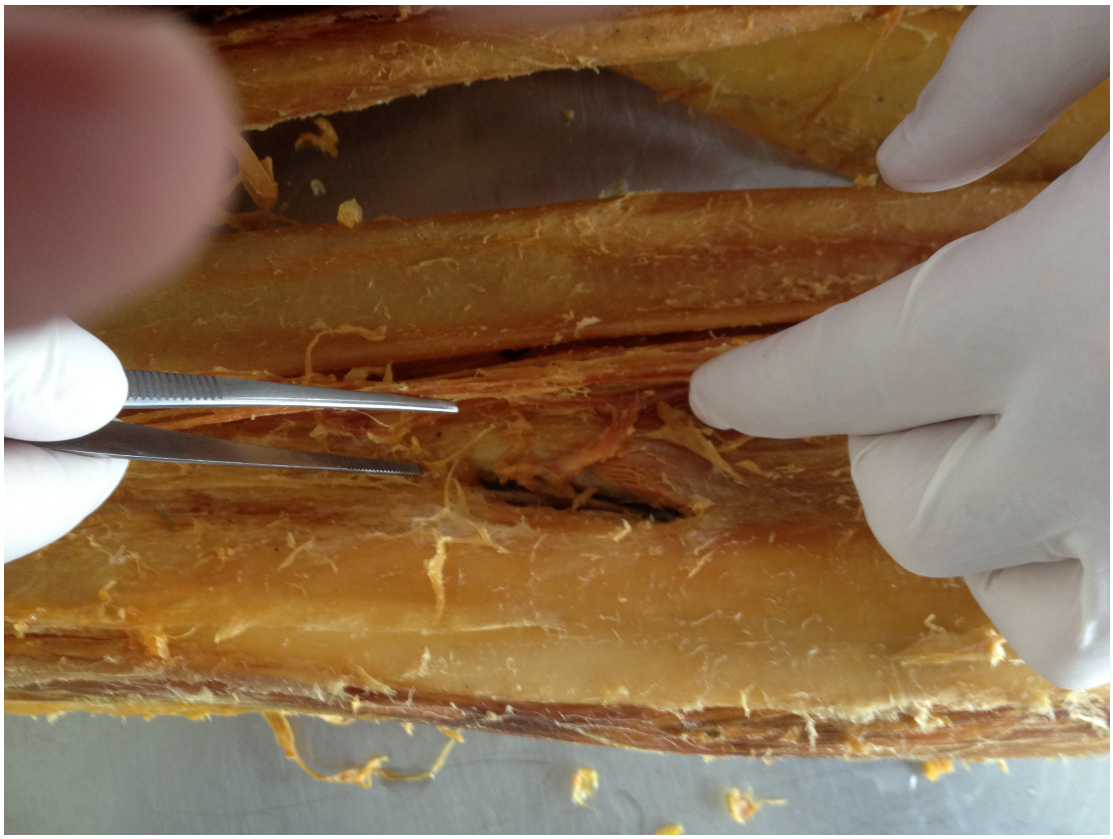
Discussion

As we mentioned the main conditions of the superficial veins are the varicose veins, phlebitis and thrombophlebitis. Varicose veins are veins that have become enlarged and tortuous. When veins become varicose, the leaflets of the valves no longer meet properly and the valves do not work. This allows blood to flow backwards and they enlarge even more. Varicose veins are most common in the superficial veins of the legs, which are subject to high pressure when standing. Besides cosmetic problems, varicose veins are often painful, especially when standing or walking. They often cause itchiness and scratching them can cause ulcers. Varicose veins are more common in women than in men and are linked with heredity. Other related factors are pregnancy, obesity, menopause, aging, prolonged standing, leg injury, abdominal straining and crossing legs at the knees or ankles.

Phlebitis is the inflammation of the veins and has various causes like bacteria, chemical, mechanical, genetic, alcohol and drug abuse. When phlebitis is associated with the formation of blood clots (thrombosis), usually in the deep veins of the legs, the condition is called thrombophlebitis. These clots (tear-off) can travel to the lungs, causing pulmonary embolisms that can be fatal. When it occurs repeatedly in different locations, it is known as "Thrombophlebitis migrants" or "migrating thrombophlebitis" related mostly with migrating cancer. It is also associated with deep vain thrombosis when the clot migrates to the deep veins. The main causes include prolonged sitting and immobilization or blood clotting disorders.

Conclusion

The goal of this project is the improvement of the student's knowledge of the anatomy of the human body and to inspire other students to work on similar projects thus increasing their familiarity with scientific research.



References

1. Platzer W, Spitzer G. Color Atlas of Human Anatomy. Vol.1 Locomotor System. 6th edition. Stuttgart, Thieme. 2009, 1 - 462.
2. Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. Gray's Anatomy for Students. Philadelphia, Churchill Livingstone/Elsevier, 2010. 1 - 1058.
3. http://prosono.ieasysite.com/vasc_chapter_perforator_anatomy.pdf
4. http://www.phlebology.org/pdfs/Ch1_pp1-4.pdf
5. http://www.varicoseveindoctor.com/veinproblems_perferator.html
6. http://www.veinsveinsveins.com/perforators.html
7. http://www.webmd.com/a-to-z-guides/phlebitis
8. http://www.phlebologia.com/en/terr_saph_int_06.asp
9. http://www.lasertreatmentclinics.co.uk/how_veins_work.html
10. http://www.lasertreatmentclinics.co.uk/Venous_Anatomy.html
11. http://www.surgical-tutor.org.uk/filler.htm
12. Putz R, Pabst R (eds.). Sobotta Atlas of Human Anatomy.14th edition. New York URBAN & FISCHER, 2008. 1 – 842

20. Anatomy and Clinical Importance of the Anterior Thigh Region

Stavrou Effrosyni, Maris Spyridon, Metaxas Dimitrios, Skoumas Nikiforos
(Dentistry 2nd year, General Medicine 2nd year, General Medicine 2nd year, General Medicine 2nd year)

Supervisors: MUDr Petra Šelmeciová PhD, MUDr Hisham El Falougy PhD
Institute of Anatomy, Comenius University of Bratislava, Faculty of Medicine

Introduction

This project deals with the anterior compartment of the thigh. The purpose is the preparation of this region, the identification of the structures located in it as long as the analysis of their clinical importance. These structures are muscles which perform extension of the knee joint, flexion of the hip joint and adduction of the thigh, and main vessels and nerves for the blood and nerve supply of the lower limb. The clinical importance of these structures, as analyzed below, is major to both diagnostic and therapeutic medicine.

Methods

For the dissection of this region we used a kit consisted of several scalpels and several pairs of forceps.

We started by an incision on the skin from the iliac spine till the pubic symphysis, then we made another incision along the skin of the lateral side of the midline of the thigh from the level of the inguinal ligament till two fingers above the knee where we made a transverse incision to the skin. To proceed we reflected the skin flaps to the sides being careful to preserve the superficial veins and the fascia of the thigh.

We continued by separating the saphenous vein and locating its connection with the femoral vein.

Afterwards we identified the borders of the femoral triangle which are the inguinal ligament superiorly, the sartorius muscle laterally and the adductor longus muscle medially and we located the structures inside it. Firstly we located the femoral artery and the femoral vein wrapped in the femoral sheath and after removing the fascia of this area we identified the femoral nerve lateral to the femoral artery. Previously to this region the femoral artery and the femoral vein pass through the lacuna vasorum while the femoral nerve passes through the lacuna musculorum.

The next step was to clean up the muscles of the anterior compartment. Firstly we separated the most superficial muscle which is the sartorius muscle, then we cleared the most lateral muscle of the thigh which is the tensor fasciae latae. Afterwards we separated the four heads of the biggest muscle of the thigh, the quadriceps femoris, which are the rectus femoris and the three vasti (medialis, lateralis and intermedius).

We continued by cleaning the muscles of the medial compartment. We separarted first the gracilis muscle which is the most medial one. Then we separated the four adductor muscles (longus, brevis, magnus and minimus) and at the end we separated the two obturator muscles (externus, internus) and the pectineus muscle.

During this whole procedure we also located two canals. The first one was the adductor canal whose borders are anteriorly and laterally the vastus medialis muscle, posteriorly the adductor longus and the adductor magnus muscles and medially and superiorly the Sartorius muscle. From this canal pass the femoral artery and vein, the femoral nerve and the saphenus nerve. The second canal we identified was

the obturator canal which is formed by a part of the obturator membrane and from which pass the obturator artery and vein and the obturator nerve.

Results

During the dissection of the anterior thigh region we located the following structures and their courses:

Muscles: Sartorius muscle, Pectineus muscle, Rectus femoris, Vastus lateralis, Vastus medialis, Vastus intermedialis, Gracilis, Obturator internus, Obturator extrnus, Adductor longus, Adductor magnus, Adductor brevis, Adductor minimus, Tensor Fasciae Latae

Nerves: Lateral Cutaneus, Medial Cutaneus, Intermedial Cutaneus, Femoral, Saphenous, Obturator

Arteries: Femoral, Deep Femoral, External Pudendal, Medial Femoral Circumflex, Lateral Femoral Circumflex, Descending Genicular, Superficial Iliac Circumflex

Veins: Great Saphenous, Lesser Saphenous, Lateral Accessory Saphenous, Femoral, External Pudendal, Superior Iliac Cicrumflex, Medial Circumflex, Lateral Circumflex

Discussion

From the clinical point of view the anterior thigh region interests about its major importance to several diagnostic and therapeutic procedures as well as about the ailments developed inside it.

The most important clinical procedures are the ones concerning the cardiovascular diseases.

Some of the most usual diagnostic procedures are the following. The angiography of the coronary vessels is achieved by the catheterization of the femoral artery and by application of contrast fluid. Angiography by this way is also possible for the aorta, the renal arteries and the arteries of the brain. The same procedure is followed for ventriculography of the left ventricle while for the ventriculography of the right ventricle we perform catheterization of the femoral vein.

As far as the therapeutic procedures are concerned the most important are the following. Firstly the angioplasty of the coronary vessels during which a balloon tipped catheter is inserted through the femoral artery and when it reaches the points of the coronary vessels that are blocked by cholesterol plaques, it is used to open them and restore the blood flow. Sometimes it is also necessary to insert a stent with the balloon catheter, a structure which remains in the vessel in order to retain its shape. By the same procedure a stent could be also applied to the abdominal aorta and to the arteries and peripheral vessels of the lower limbs. Another therapeutic procedure is the percutaneus aortic valve replacement during which a replacement valve is passed through the femoral artery and runs through the aorta till it reaches the heart where it is placed. This procedure is performed to persons with aortic stenosis who cannot endure an open heart procedure. Last but not least, an important structure for the treatment of cardiovascular diseases is the saphenous vein which is used for bypass procedures.

Catheterization of the femoral artery is also very common and very important for the retrograde fixation of human cadavers as well as laboratory animals, for educational and experimental purposes respectively.

The most common ailments in the region of the anterior thigh are the muscle contusions and the fractures of the femoral bone. Another ailment of this region is the femoral hernia which occurs just below the inguinal ligament, when abdominal contents pass through a naturally occurring weakness called the femoral canal. Moreover a rare type of ailment is the obturator hernia, a type of abdominal wall hernia in which abdominal content protrudes through the obturator foramen.



References

1. Platzer W. Color Atlas of Human Anatomy. Vol.1, Locomotor System. 6th edition. New York-Stutgart, Thieme. 2009, 1- 445.
2. Fritsch H, Kuehnel W. Color Atlas of Human Anatomy. Vol. 2, Internal Organs. 5th edition. New York-Stutgart, Thieme. 2008, 1- 419.
3. Kahle W, Frotscher M. Color Atlas of Human Anatomy. Vol. 3, Nervous System and Sensory Organs, 5th revised edition. New York-Stutgart, Thieme. 2001, 1 – 383.
4. Drake RL, Vogl AW, Mitchel AWM, Gray's Anatomy for students. 2nd edition. Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier. 2010, 1- 1079
5. Putz, R. Pabst R. Sobotta Atlas of Anatomy. 14th edition. New York, Churchill Livingstone. 2008, 1 – 842.

6. Netter F. Atlas of Human Anatomy. 5th edition. Philadelphia, Saunders Elsevier. 2011, 1 – 532.
7. Savvas AP. Human Anatomy and Atlas. Vol. 1,2. Thessaloniki, Kyriakides bros, 1979.
8. http://www.buzzle.com/articles/anterior-thigh-pain.html

21. Anatomical preparation of the carpal region

Theodoros Zoulakis, Georgios Fotiadis
(General medicine, 1st year)

MUDr. Hisham El Falougy, PhD., MUDr. Petra Šelmeciová, PhD.
Institute of Anatomy, Comenius University of Bratislava, Faculty of Medicine

Introduction

The hand is without discussion the most important and capable tool that mankind has known until now. Hand abilities are numerous, and all of these thanks to the formation of thumb or pollex. The function of these thenar muscles contributed to the development of human kind. If anyone tries to spend a day without using his hands he will then realize the importance of this magnificent tool. The aim of our work is to demonstrate the anatomical elements that lie in the carpal region, the muscles, the tendons, and we will deal mainly with the structures that lie within the carpal canal such as the median nerve and a series of flexor muscles and with the ulnar and radial artery, vein and nerve.

Material and methods

We worked on a cadaver of the institute of anatomy in Comenius University in Bratislava. We used the small dissection kit which included blunt forceps, fine point forceps, seekers, cutting needle, dissecting needle, scalpels and sterile blades. The first part included the removal of the skin and the fatty tissue surrounding the muscles. Afterwards we used the tools of the anatomical kit to reveal, project and remove all the muscle layers. We placed the model into hydrogen peroxide in order to preserve only the ligaments and the bones that will be used for education purposes.

Results

Muscles

The muscles of the hand are divided into intrinsic and extrinsic.

Extrinsic muscles are extensor carpi radialis brevis, extensor carpi radialis longus, extensor carpi ulnaris, extensor digitorum communis, extensor indicis proprius, extensor digiti minimi, abductor pollicis longus, extensor pollicis brevis, and extensor pollicis longus, flexor carpi radialis, flexor carpi ulnaris, palmaris longus, flexor pollicis longus, flexor digitorum superficialis, flexor digitorum profundus.

The intrinsic muscles are situated totally within the hand. They are divided into 4 groups: the thenar, hypothenar, lumbrical, and interossei muscles.

The thenar group consists of the abductor pollicis brevis, flexor pollicis brevis, opponens pollicis, and adductor pollicis muscles. The hypothenar group consists of the palmaris brevis, abductor digiti minimi, flexor digiti minimi, and opponens digiti minimi. The lumbrical muscles contribute to the flexion of the metacarpophalangeal joints and to the extension of the interphalangeal joints, the interossei group consists of 3 volar and 4 dorsal muscles.

Nerve supply

The innervation of the hand is performed by the medial, ulnar and radial nerve.

The median nerve is responsible for innervating the muscles involved in the fine precision and pinch function of the hand. It originates from the lateral and medial cords of the brachial plexus (C5-T1). Proximal to the wrist, the palmar cutaneous branch provides sensation at the thenar eminence. As the

median nerve passes through the carpal tunnel, the recurrent motor branch innervates the thenar muscles (abductor pollicis brevis, opponens pollicis, and superficial head of flexor pollicis brevis). It also innervates the index and long finger lumbrical muscles. Sensory digital branches provide sensation to the thumb, index, long, and radial side of the ring finger.

The ulnar nerve is responsible for innervating the muscles involved in the power grasping function of the hand. It originates at the medial cord of the brachial plexus (C8-T1). Motor branches innervate the flexor carpi ulnaris and flexor digitorum profundus muscles to the ring and small fingers. Proximal to the wrist, the palmar cutaneous branch provides sensation at the hypothenar eminence. The dorsal branch, which branches from the main trunk at the distal forearm, provides sensation to the ulnar portion of the dorsum of the hand and small finger, and part of the ring finger.

The radial nerve is responsible for innervating the wrist extensors, which control the position of the hand and stabilize the fixed unit. It originates from the posterior cord of the brachial plexus (C6-8). At the elbow, motor branches innervate the brachioradialis and extensor carpi radialis longus muscles. The superficial branch provides sensation at the radial aspect of the dorsum of the hand, the dorsum of the thumb, and the dorsum of the index finger, long finger, and radial half of the ring finger proximal to the distal interphalangeal joints.

Vessels

The blood supply is curried through the radial and ulnar artery and vein.

The radial artery runs distally in the forearm between the brachioradialis and flexor carpi radialis muscles. At the wrist, it crosses dorsally deep to the tendons of the "anatomic snuffbox" to enter the palm and form the deep palmar arch. A superficial branch arises at the level of the wrist and contributes to the superficial palmar arch.

The ulnar artery runs distally in the forearm under the flexor carpi ulnaris muscle. At the wrist, it travels into the hand through the Guyon canal, where it divides into the deep palmar branch and the superficial palmar branch. The superficial branch forms the superficial palmar arch, and the deep branch contributes to the deep palmar arch.

Carpal canal

The carpal canal is a region of great clinical importance because of disorders that occur more than ever because of nowaday's life. There lies a series of flexor muscles of the wrist and only one nerve passes through. It is bordered anteriorly by the flexor retinaculum and posteriorly by the carpal bones.

The structures that pass through the carpal canal are:

Flexor digitorum profundus , flexor digitorum sublimis, flexor pollicis longus and the medial nerve.

Discussion

The structure that stands out on hand is the thumb, for a variety of reasons. The act of opposition is the one that differentiates us from the other primers and this would not be able without the formation of the thenar muscles. The main task of a hand surgery is to maintain the functionality of the *pollex*. The various aspects of life, demands the development of elegant moves of the hand in order to cope with common things of everyday life. *Manus* is the latin word that mean *"the tool that can handle"*. Since we are born, our hands, through practice tend to continually develop efficiencies in order to live properly in this world. If anyone tries to spend a day without using his hands he will then realize the importance of this magnificent implement.

The anatomy of the hand is complex, intricate, and fascinating. Our hands may be affected by many disorders, most commonly traumatic injury. For any physician or therapist treating hand problems, the mastery of such anatomy is fundamental in order to provide the best quality of diagnosis and care.

Carpal tunnel syndrome occurs from compression of the medial nerve within the carpal tunnel. It occurs most often in patients between 30 and 60 years old and is five times more common in women than in men.

There are several contributing factors that can cause carpal tunnel syndrome such as, trauma, obesity, diabetes, scleroderma, thyroid disease, lupus, amyloidosis, gout, acromegaly, Paget's disease, mycopolysaccharidoses.

There are physical tests to establish the diagnosis of carpal tunnel, such as medial nerve percussion test, carpal tunnel compression test etc.

Conclusion

This thesis helped us to understand the anatomical structures of the hand and especially the carpal region. We found information about the carpal tunnel syndrome, the ways of its development and treatment.

Furthermore as first year student's we had our first experience in working with a cadaver that will help us for the future dissections.

References

1. Sun I. Kim-Tae Suk Suh(Eds.).World congress on medical physics and biomedical engineering 2006. Berlin, Springer, 2007, 4220 p.
2. TSEMENTZIS SA. Differential diagnosis in neurology and neurosurgery :a clinician's pocket guide. Stuttgart, Thieme, 2000, 338.
3. Platzer W. Color atlas of human anatomy vol.1: Locomotor system. 6th edition. Stuttgart, Thieme, 2004, 478 .

VII. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV LF UK

PREDKLINICKÁ A ONKOLOGICKÁ SEKCIA

Hodnotiaca komisia

predseda: **prof. MUDr. Dalibor Ondruš, DrSc.**
členovia: **doc. MUDr. Helena Hupková, PhD**
RNDr. Ladislav Guller, CSc.
RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.

1. miesto
RNDr. Miroslava Vallová
Analýza DNA ploidie laserovou skenovacou cytometriou a expresia HER2 a hormonálnych receptorov v karcinóme prsníka.

2. miesto
MUDr. Anna Rybárová
Impact of molecular genetics on prognosis of optic glioma in NF1 patients.

3. miesto
Mgr. Jaroslava Durdiaková
Biologické koreláty schopnosti mentálnej rotácie u intelektovo nadaných chlapcov.
MUDr. Marianna Hajská
Účinnosť topickej terapie na multirezistentné bakteriálne kmene izolované z popáleninových rán pacientov.

22. Vplyv autonómneho nervového systému a jeho neurotransmiterov na *in vivo* a *in vitro* proliferáciu fibrosarkómu u potkanov.

Mgr. Lucia Bánovská[1]
(patologická fyziológia)

Spoluautori: Ľubica Lackovičová[2], Jozef Bizik[3]
Školiteľ: Doc. MUDr. Boris Mravec, PhD.[1,2]
[1]Ústav patologickej fyziológie LF UK, [2]Ústav experimentálnej endokrinológie SAV, Bratislava,
[3]Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava

Úvod

Experimentálne a klinické štúdie preukázali, že autonómny nervový systém(ANS) zohráva významnú úlohu v mnohých aspektoch nádorovej biológie. Ovplyvňuje vzniku únavy a vyčerpania súvisiaceho s nádorovou chorobou, podieľa sa na procesoch spojených s neoangiogenézou nádorového tkaniva, či v zápalových procesoch sprevádzajúcich nádorovú progresiu (1). Predpokladá sa preto, že dysregulácia v aktivite sympatikových a parasympatikových nervov môže významnou mierou ovplyvňovať priebeh nádorových chorôb.

Parasympatikový nervový systém je vo vzťahu s karcinogenézou diskutovaný predovšetkým pre jeho schopnosť regulovať chronický zápal, ktorý je za istých podmienok výrazným iniciátorom nádorovej progresie. Predpokladaný pozitívny účinok stimulácie činnosti parasympatikového nervového systému je sprostredkovaný inhibíciou syntézy a uvoľňovania prozápalových cytokínov makrofágmi, ktoré sprostredkujú a kontrolujú imunitnú a zápalovú odpoveď(2, 3).

Rovnako aj sympatikový nervový systém môže ovplyvniť vznik a proliferáciu nádorov ako aj tvorbu metastáz. Pravdepodobný stimulačný účinok sympatikového nervového systému na nádorovú progresiu je sprostredkovaný katecholamínmi a ich kontransmitermi uvoľňovanými zo symaptikových nervových zakončení, ktoré modulujú činnosť viacerých zložiek imunitného systému (2, 4). V experimentálnych štúdiách bolo preukázané, že narušenie sympatikového nervového systému významne ovplyvnilo reakciu zvierat na zápal, ktorý sa spája so vznikom a progresiou nádorových chorôb. Vplyv sympatikového nervového systému na činnosť imunitných buniek a tým aj na nádorovú progresiu nie je uniformný, ale vykazuje rozdiely, v závislosti od vývojového štádia miery narušenia sympatikového nervového systému a v závislosti na tom, či je narušený na lokálnej alebo systémovej úrovni (5).

Cieľom výskumu bolo objasniť účinok autonómneho nervového systému pri vzniku a progresii intra-abdominálnych nádorov indukovaných u laboratórnych potkanov intraperitoneálnou aplikáciou BP6-TU2 fibrosarkómových buniek. Na aktiváciu parasympatikového nervového systému sme využili analógiu stimulácie protizápalovo pôsobiacich dráh, konkrétne podávanie nikotínu *per os*. Pre sledovanie účinku sympatikového nervového systému na nádorovú progresiu sme využili jeho vyradenie pomocou neurotoxínu 6-hydroxydopamínu. Okrem toho sme v *in vitro* experimentoch skúmali priamy účinok noradrenalínu a nikotínu, ako hlavných neurotransmiterov sympatikového a parasympatikového nervového systému, na proliferáciu BP6-TU2 fibrosarkómových buniek.

Metodika

Experimentálne zvieratá

V *in vivo* experimentoch boli použité laboratórne potkany, samce kmeňa Wistar, umiestnené v klietkach po 3 - 4 a chované v štandardných podmienkach zverinca, prístup k vode a peletovanej potrave *ad libitum.*

Indukcia nádorov u experimentálnych zvierat

V experimentoch sme na indukciu nádorov využili model jednorazovej injekčnej aplikácie BP6-TU2 fibrosarkómových buniek experimentálnym zvieratám. BP6-TU2 fibrosarkómové bunky boli aplikované zvieratám s hmotnosťou 150 - 175 g intraperitoneálne (ip) v množstve 0,5 x 10^6 buniek v 2 ml RPMI 1640 média. BP6-TU2 fibrosarkómové bunky ani v jednom z uskutočnených experimentov neindukovali tvorbu metastáz.

Chronické podávanie nikotínu v pitnej vode potkanom s nádormi

Nikotín bol zvieratám podávaný perorálne ako súčasť pitnej vody s 2 % obsahom sacharínu od 3 dňa po aplikácii nádorových buniek. Koncentrácia nikotínu v podávanej pitnej vode bola postupne zvyšovaná. Prvý a druhý deň bola koncentrácia nikotínu 50 µg/ml pitnej vody. Nasledujúce dva dni (tretí a štvrtý) bola koncentrácia zvýšená na 100 µg/ml pitnej vody. Od piateho dňa bolo množstvo nikotínu ustálené na konečnej hodnote 200 µg/ml pitnej vody.

Chemická sympatikotómia

Chemická sympatikotómia bola dosiahnutá opakovaným ip podaním 6-OHDA (100 mg 6-OHDA /kg hmotnosti zvieraťa) po 24 hodinách. Táto látka spôsobuje do 3-5 dňoch po podaní deštrukciu periférnych katecholaminergických nervových zakončení. Týždeň po chemickej sympatikotómii boli zvieratám ip aplikované nádorové bunky.

Sledovanie vplyvu noradrenalínu a nikotínu na rast BP6-TU2 buniek *in vitro*

Do 48 jamkovej platničky boli prenesené bunky v RPMI 1640 kultivačnom médiu vo výslednom množstve 500 b/ml/jamku. Bunky boli kultivované pri teplote 37 °C a saturácii 10 %-nou CO_2 atmosférou. Do 24 jamiek bol pridaný jeden z neurotransmiterov s výslednou koncentráciou 100 µmol/l. Táto koncentrácia bola použitá na základe publikovaných údajov (6, 7, 8). Od 3. dňa bol každý deň počítaním sledovaný nárast počtu buniek s pridaným neurotransmiterom v porovnaní s počtom kontrolných buniek bez pridania neurotransmitera. Vyhodnocovali sme štyri štvorce vrchnej a štyri štvorce spodnej mriežky Bürkerovej komôrky. Pre jedno meranie boli použité bunky z troch jamiek a určili sme priemerné množstvo buniek pripadajúcich na jednu jamku v platničke. Získané údaje (*priemer* ± *SEM*) boli východiskom pre vytvorenie rastovej krivky.

Štatistická analýza dát

Všetky získané hodnoty sú uvádzané ako priemer ± SEM na skupinu. Výsledky boli považované za štatisticky významné v prípade, že $p<0,05$.

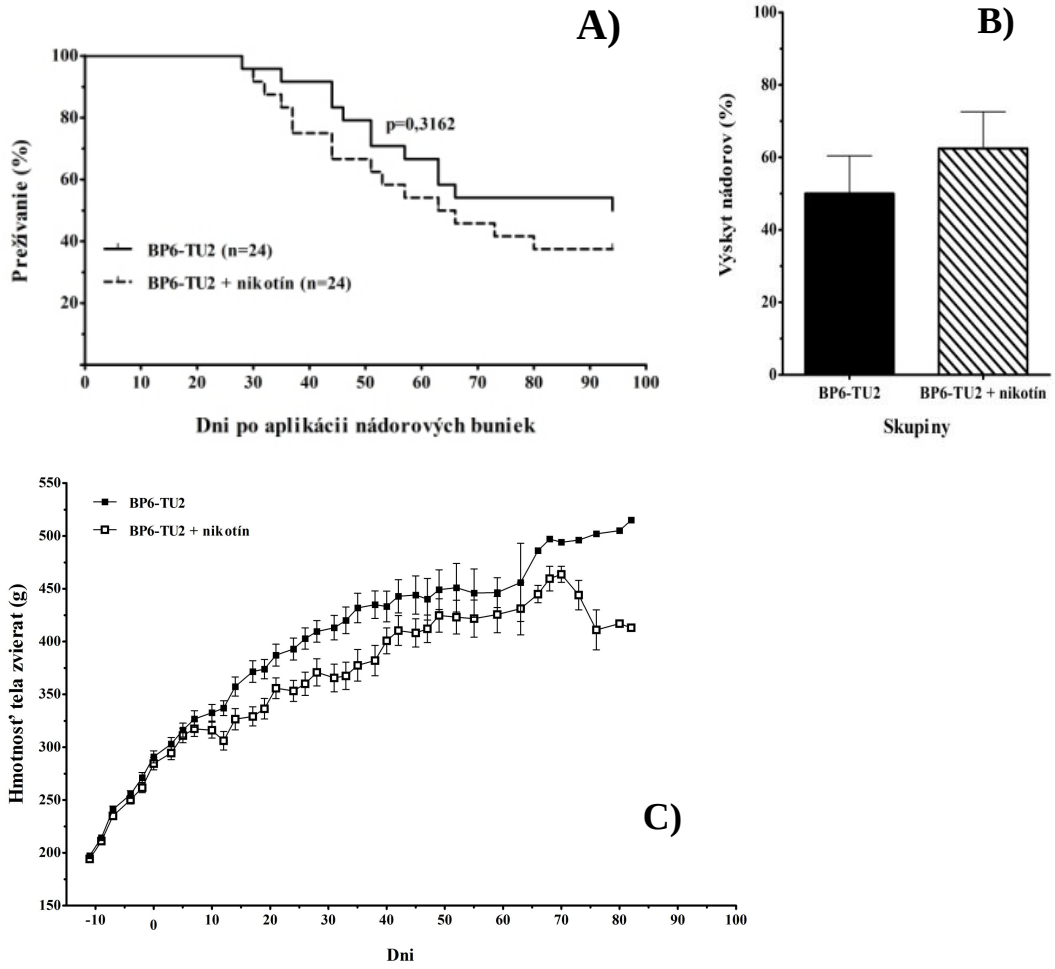
Pre štatistické vyhodnotenie boli použité nasledujúce typy testov:

dvojcestná ANOVA (faktory skupina a čas) s následným Bonferroni post testom

Studentov t-test

Log-rank (Mantel-Cox) Test (na porovnanie prežívacích kriviek)

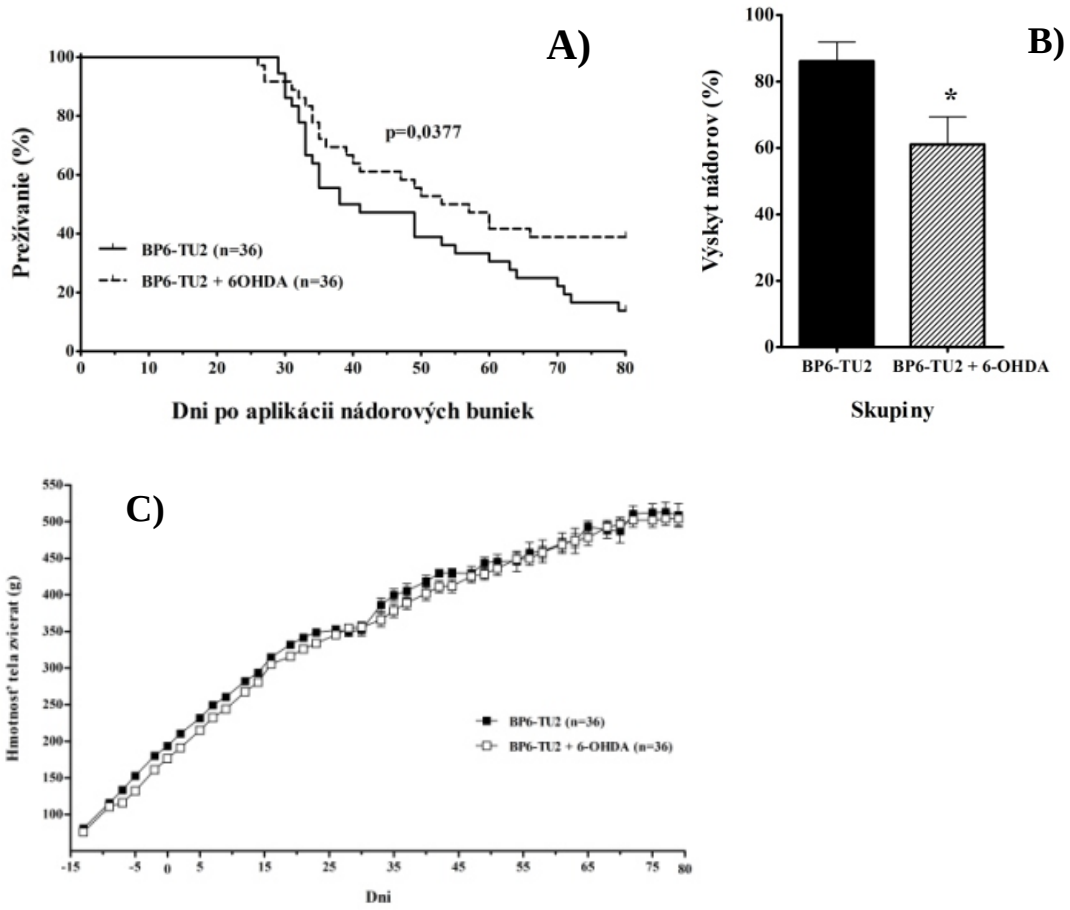
Výsledky



Obrázok 1. Chronické podávanie nikotínu v pitnej vode. A) Prežívanie zvierat, B) Výskyt nádorov, C) Zmeny hmotnosti zvierat.

Chronické podávanie nikotínu v pitnej vode potkanom s nádormi

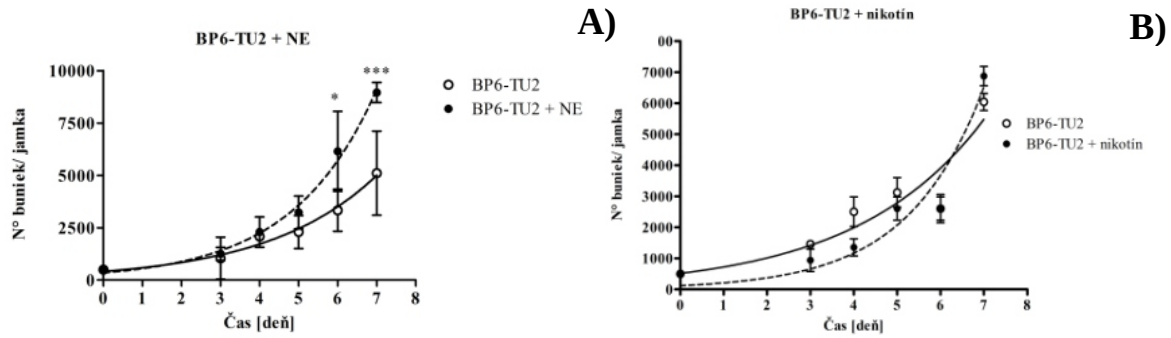
Podávanie nikotínu v pitnej vode neovplyvnilo prežívanie zvierat s ip BP6-TU2 nádormi (IP + nikotín) v porovnaní so zvieratami s nádormi, ktoré nikotín neprijímali (obr. 1A). Okrem dĺžky prežívania zvierat s nádormi sme sledovali aj výskyt nádorov u zvierat v oboch študovaných skupinách (IP aj IP + nikotín). Ani v tomto sledovanom parametri neboli zistené žiadne štatisticky významné rozdiely medzi sledovanými skupinami (obr. 1B). Naopak, od 10. dňa po aplikácii nádorových buniek sme pozorovali zníženie nárastu hmotnosti u zvierat s nádormi, ktoré prijímali nikotín v porovnaní so zvieratami bez príjmu nikotínu (obr. 1C).



Obrázok 2.Chemická sympatikotómia. A) Prežívanie zvierat, B) Výskyt nádorov, C) Zmeny hmotnosti zvierat.

Sledovanie vplyvu chemickej sympatikotómie

Chemická sympatikotómia signifikantne ovplyvnila dĺžku prežívania zvierat s aplikovanými BP6-TU2 fibrosarkómovými bunkami (p=0,0377) na rozdiel od zvierat s intaktným sympatikovým nervovým systémom (obr. 2A). Okrem sledovania dĺžky prežívania zvierat s nádormi sme sledovali aj možné zmeny v hmotnosti zvierat v jednotlivých nádorových modeloch. Tu sme však nepozorovali takmer žiadne rozdiely v hmotnostiach tela medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami obr. 2C). Ďalším sledovaným parametrom bol výskyt nádorov v oboch študovaných skupinách, kde sme zaznamenali štatisticky významné zníženie incidencie nádorov u zvierat po chemickej sympatikotómii v porovnaní so zvieratami s intaktným sympatikovým nervovým systémom (obr. 2C).



Obrázok 3 Vplyv noradrenalínu (A) a nikotínu (B) na in vitro rast BP6-TU2 buniek.

Sledovanie vplyvu noradrenalínu a nikotínu na in vitro rast BP6-TU2 buniek

V prípade *in vitro* experimentov sme nepozorovali žiadne štatisticky významné rozdiely medzi počtom nádorových buniek po pridaní nikotínu do kultivačného média (BP6-TU2 + nikotín) v porovnaní s počtom buniek kultivovaných v médiu bez nikotínu (obr. 3A). Na rozdiel od toho, pridanie noradrenalínu do kultivačného média signifikantne zvýšilo proliferáciu BP6-TU2 fibrosarkómových buniek (obr. 3B).

Diskusia

Viacero experimentálnych a aj klinických štúdií poukazuje na význam autonómneho nervového systému pri vzniku a proliferácii nádorových chorôb a tvorby metastáz. V našich experimentoch sme sa preto zamerali na obe zložky ANS a ich vplyv na proliferáciu nádorových buniek v *in vivo* a *in vitro* podmienkach.

Mnohé publikované práce popisujú úlohu acetylcholínu v procesoch karcinogenézy. V uvedených experimentoch sa podávali agonisti (napr. nikotín) a antagonisti (napr. hexametónium) cholinergických receptorov, alebo sa inhibovali, prípadne stimulovali enzýmy regulujúce syntézu a degradáciu acetylcholínu (9). Parasympatikový nervový systém je v súvislosti s tvorbou a proliferáciu nádorov skúmaný najmä pre jeho schopnosť regulovať chronický zápal. Práve modulácia lokálneho a systémového zápalu ovplyvnením činnosti parasympatikového nervového systému, by mohla inhibovať progresiu periférnych nádorov podobne, ako to bolo preukázané aj pri iných chorobných stavoch (10). Na základe týchto údajov sme predpokladali, že stimulácia činnosti parasympatikových nervov bude mať inhibičný účinok na vznik a proliferáciu nádorov. Na druhej strane bola v prípade pľúcnych nádorov preukázaná zvýšená dostupnosť acetylcholínu, v dôsledku zníženej aktivity acetylcholínesterázy, ktorá mohla stimulovať cholinergickú signalizáciu a prispievať k progresii nádorov pľúc (9). Naše výsledky však tieto predpoklad nepotvrdili.

Výsledky z experimentov, v ktorých sme uskutočnili chemickú sympatikotómiu sú v súlade s publikovanými prácami, ktoré preukázali stimulačný vplyv noradrenalínu na nádorový rast, nakoľko deštrukcia sympatikových nervových zakončení, ktorú sme uskutočnili, viedla k zníženému uvoľňovaniu noradrenalínu u zvierat s BP6-TU2 nádormi a tieto prežívali signifikantne dlhšie v porovnaní so zvieratami s intaktným sympatikovým nervovým systémom (11, 12). Je ale potrebné brať do úvahy aj fakt, že vyradenie sympatikového nervového systému ovplyvnilo rovnováhu v činnosti autonómneho nervového systému. Keďže je známe, že parasympatikový nervový systém, najmä nervus vagus, má protizápalový účinok (13), je možné, že zlepšené prežívanie zvierat s nádormi po chemickej sympatikotómii môže odrážať nie len redukovaný vplyv sympatika, ale aj prevažujúci efekt intaktných parasympatikových nervov.

In vitro štúdie poukazujú na priamy účinok noradrenalínu na rast BP6-TU2 buniek. U rôznych typov nádorových buniek bola preukázaná prítomnosť receptorov pre viaceré neurotransmitery (14). Údaje získané z našich experimentov podporujú predpoklad priameho stimulačného účinku noradrenalínu na proliferáciu BP6-TU2 nádorových buniek a to pravdepodobne cez obsadenie adrenergických

receptorov exprimovaných týmito bunkami. Účinok nikotínu na tieto bunky sa nám nepodarilo preukázať, čo naznačuje, že tieto bunky neexprimujú receptory pre tento neurotransmiter.

V našich experimentoch sme charakterizovali vplyv oboch zložiek autonómneho nervového systému na rast fibrosarkómu u experimentálnych zvierat. Získané poznatky podporujú koncept neurobiológie nádorových chorôb a vytvárajú tak podklad pre eventuálne nové terapeutické potupy, ktoré prostredníctvom modulácie činnosti nervového systému budú ovplyvňovať nádorový rast a tvorbu metastáz u onkologických pacientov.

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV-0045-06 a APVV-0007-10).

Použitá literatúra

1. Ondicova K, Mravec B: Role of nervous system in cancer aetiopathogenesis. Lancet Oncol 2010; 11: 596–601.
2. Tracey, K.J.: The inflammatory reflex. Nature 2002; *420*, 853-859.
3. Pavlov, V.A. a Tracey, K.J.: Neural regulators of innate immune responses and inflammation. Cell Mol Life Sci *2004; 61*, 2322-2331.
4. Elenkov, I.J., Hasko, G., Kovacs, K.J. a Vizi, E.S.: Modulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by selective alpha- and beta-adrenergic drugs in mice. J Neuroimmunol *1995; 61*, 123-131.
5. Sternberg, E.M.: Emotions and disease: from balance of humors to balance of molecules. Nat Med 1997; *3*, 264-267.
6. Palm, D., Lang, K., Niggemann, B., Drell, T.L.t., Masur, K., Zaenker, K.S. a Entschladen, F.: The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. Int J Cancer 2006; *118*, 2744-2749.
7. Sood, A.K., Bhatty, R., Kamat, A.A., Landen, C.N., Han, L., Thaker, P.H., Li, Y., Gershenson, D.M., Lutgendorf, S. a Cole, S.W. : Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. Clin Cancer Res 2006; *12*, 369-375.
8. Yang, E.V., Kim, S.J., Donovan, E.L., Chen, M., Gross, A.C., Webster Marketon, J.I., Barsky, S.H. a Glaser, R.: Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. Brain Behav Immun 2009; *23*, 267-275.
9. Martínez-Moreno P, Nieto-Cerón S, Torres-Lanzas J, Ruiz-Espejo F, Tovar-Zapata I, Martínez-Hernández P, Rodríguez-López JN, Vidal CJ, Cabezas-Herrera J. Cholinesterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification. Carcinogenesis. 2006; 27(3):429-36.
10. Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W. a Tracey, K.J.: Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature 2000; *405*, 458-462.
11. Tatsuta, M., Iishi, H., Baba, M. a Taniguchi, H.: Inhibition of azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis in Wistar rats by 6-hydroxydopamine. Int J Cancer 1992; *50*, 298-301.
12. Raju, B., Haug, S.R., Ibrahim, S.O. a Heyeraas, K.J.: Sympathectomy decreases size and invasiveness of tongue cancer in rats. Neuroscience 207; *149*, 715-725.

13. Raju, B., Hultstrom, M., Haug, S.R., Ibrahim, S.O. a Heyeraas, K.J.: Sympathectomy suppresses tumor growth and alters gene-expression profiles in rat tongue cancer. Eur J Oral Sci 2009; *117*, 351-361.

14. Entschladen, F., Palm, D., Niggemann, B. a Zaenker, K.S.: The cancer's nervous tooth: Considering the neuronal crosstalk within tumors. Semin Cancer Biol 2008; *18*, 171-175.

23. Vplyv radiačného žiarenia na tkanivá určené na transplantáciu

MUDr. Hedviga Mrázová [1]
(patologická anatómia)

Spoluautori: doc. MUDr. Ján Koller, CSc.[2], Gabriela Fujeríková[1]
Školiteľ: prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.[1]
[1]Ústav patologickej anatómie LF UK, [2]Klinika popálenín a rekonštrukčnej chirurgie, Bratislava

Úvod:

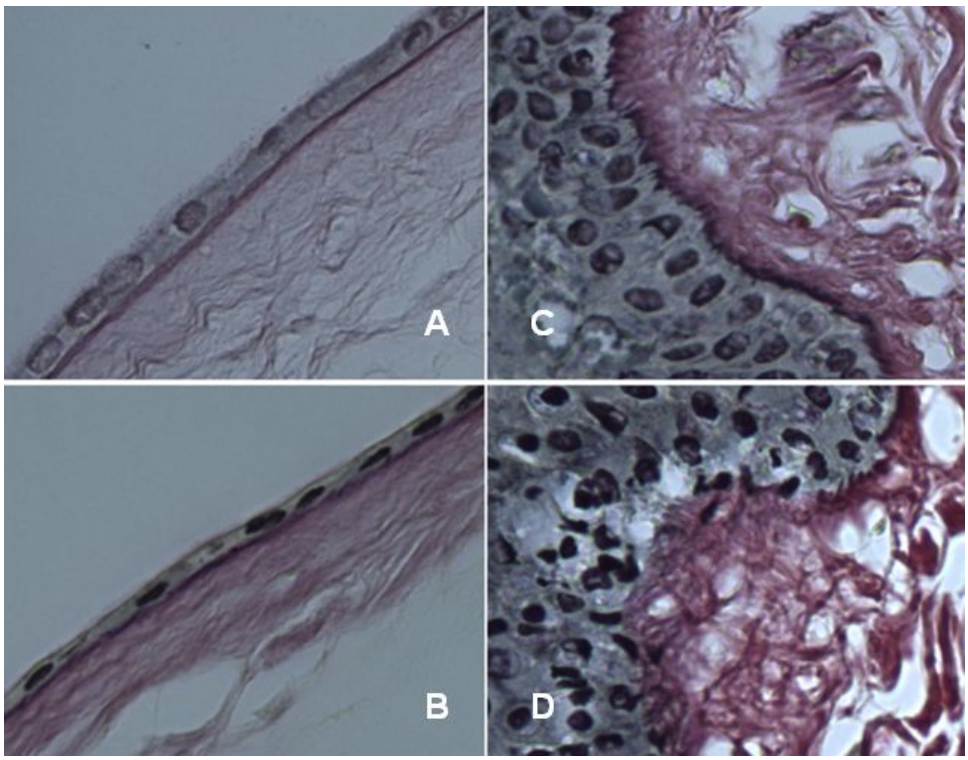
Dôležitou súčasťou prípravy biologických materiálov na transplantáciu je ich sterilizácia za účelom zabránenia prenosu infekčných ochorení. V prvej fáze sa tkanivá vystavia účinku kokteilu antibiotík, ktorý samotný na ich dokonalú dekontamináciu nestačí. Následne preto musia byť biologické materiály sterilizované chemicky alebo prostredníctvom ionizačného žiarenia. Na chemickú sterilizáciu sa používajú etylénoxid, glycerol, propylénglykol a kyselina peroctová (1). Práve kombinácia posledných troch chemických zlúčenín sa ukazuje ako najšetrnejšia metóda v rámci chemickej sterilizácie biologických materiálov. Pridaním kyseliny peroctovej sa eliminujú cytotoxické účinky glycerolu a propylénglykolu použitých len v dvojkombinácii (2). Vzhľadom na toxicitu používaných chemických prostriedkov sa však javí ako vhodnejšia sterilizácia ionizačným žiarením tkanív určených na transplantáciu. V našej práci sú posudzované tri druhy biologických tkanív používaných na dočasné krytie kožných defektov (xenotransplantát, alotransplantát, amnion), dopad rôznych dávok žiarenia na bunky a zložky extracelulárnej matrix, a tým aj vplyv na bezpečnosť použitia týchto tkanív.

Materiál a metódy:

Tri druhy tkanív boli rozdelené do piatich skupín podľa dávky žiarenia, ktorému boli tieto vzorky vystavené. Jednalo sa o porcínny kožný xenotransplantát, kožný alotransplantát a humánny amnion. Ožiarené boli dávkami 12,5, 25, 35 a 50 kGy, jedna skupina bola kontrolná, neožiarená a fixované boli zmrazením. Tkanivá boli následne fixované formalínom a spracované rutínnou parafínovou technikou. Rezy boli farbené hematoxylínom a eozínom, alciánovou modrou (ALC) pri pH 2,5 (farbenie na mucín), orceínom (farbenie na elastické vlákna), PAS reakciou (Periodic Acid Schiff Reaction – farbenie na neutrálne sacharidy) a impregnáciou striebrom (znázornenie retikulínových vlákien). Arbené rezy boli zaliate do akrylového média a prikryté krycím sklíčkom.

Výsledky:

Každé z farbení preukázalo iný typ morfologických zmien v štruktúre ožiarených tkanív. Vo farbení hematoxilínom a eozínom sa zobrazila hydropická (vakuolárna) degenerácia buniek epidermy xenotransplantátu už od dávky 12,5 kGy; v ľudskej koži od dávky 35 kGy. Farbenie na elastické vlákna odhalilo poškodenie a rozpad jemných elastických vlákien v papilárnej derme xenotransplantátu od dávky 12,5 kGy, v alotransplantáte od dávky 35 kGy. Impregnácia striebornými soľami (metenaminové striebro) znázornilo kondenzáciu chromatínu jadier buniek epidermy tiež prevažne v amnione, a to už pri dávke 12,5 kGy, v xenotransplantáte sú pri rovnakej dávke badateľné len drobné zmeny na jadrách a v alotransplantáte pozorujeme nástup kondenzácie jadrového chromatínu až od dávky 35 kGy. Ďalšou zmenou bolo rozvláknenie a strata denzity bazálnej membrány epitelu vo všetkých tkanivách, s najväčším postihnutím v amniálnej blane, s výrazným nástupom degeneratívnych zmien už pri dávke 25 kGy.



Obr.1 (A) Kontrolná vzorka amniálnej blany; impregnácia striebornými soľami (B) Piknóza jadier s kondenzáciou jadrového chromatínu v amniálnej blane po ožiarení ionizačným žiarením (50 kGy); impregnácia striebornými soľami (C) Kontrolná vzorka porcínneho xenotrasnplantátu; impregnácia striebornými soľami (D) Strata denzity bazálnej membrány v porcínnom xenotransplantáte po ožiarení ionizačným žiarením (50 kGy). Metenamínové striebro, 400x.

Tab.1: Postradiačné zmeny v troch druhoch biologických tkanív

	Xenotransplantát	Alotransplantát	Amnion
Vakuolárna degenerácia epitelových buniek	+++ (12,5 kGy)	+ (35 kGy)	-
Jadrový chromatín - kondenzácia	+ (12,5 kGy)	+ (35 kGy)	+++ (12,5 kGy)
Rozvláknenie a strata denzity bazálnej membrány	+ (25 kGy)	+ (25 kGy)	++ (25 kGy)
Rozpad jemných elastických vlákien papilárnej dermy	++ (12,5 kGy)	+ (35 kGy)	-

Diskusia:

Biologické materiály musia byť pred použitím podrobené sterilizácii, ktorá však má zachovať pôvodnú štruktúru tkanív. Z dostupných metód sa sterilizácia ionizačným žiarením javí ako najšetrnejšia a nezostávajú po nej v tkanivách škodlivé rezíduá, ako je to v prípade najviac využívanej sterilizácie prostredníctvom etylénoxidu (3). Pri použití tohto spôsobu dekontaminácie tkanív odpadá tiež nutnosť uchovávať určitú dobu biologické materiály za účelom dostavenia sa bakteriostatického účinku, ako je tomu pri použití glycerolu (4). Do úvahy prichádza aj kombinácia chemickej a radiačnej sterilizácie. Jedna štúdia sa zameriava na sterilizáciu hlboko zmrazených kožných alotransplantátov rôznymi koncentráciami glycerolu a ich následným ožiarením ionizačným žiarením (25 kGy). Pri 20 % koncentrácii glycerolu ostali tkanivá bez vážnejšieho poškodenia a boli teda vhodné na klinické použitie (5).

Výsledky nášho projektu zatiaľ nasvedčujú tomu, že pod vplyvom ionizačného žiarenia v závislosti od jeho dávky dochádza k štrukturálnym zmenám v ožiarených materiáloch, a to hlavne v oblasti epidermy. Najviac citlivé sú kožný xenotranspantát a amnion s výskytom degeneratívnych zmien už od najnižších dávok žiarenia, kým vo vzorkách alotransplantátu sa znaky poškodenia objavili hlavne až pri dávke 35 kGy. V oblasti papilárnej dermy tiež dochádza k štrukturálnym zmenám zložiek extracelulárnej matrix, ako je uvedené aj v iných štúdiách (6, 7). Práve tieto zmeny sú pre klinické použitie týchto biologických materiálov kľúčové. V ďalších fázach nášho projektu sa teda budeme venovať podrobnejšej špecifikácii zmien na tkanivách, špeciálne na štruktúrach extracelulárnej matrix použitím imunohistochemických techník zameraných na jednotlivé zložky väziva a niektoré cytokíny.

Použitá literatúra

1. Ghosh MM, Boyce S, Layton C, Freedlander E, Mac Neil S: A comparison of methodologies for the preparation of human epidermal-dermal composites. Annals of plastic surgery 1997; 39(4):390-404.
2. Lomas RJ, Huanq Q, Peqq DE, Kearney JN: Application of high-level peracetic acid disinfection protocol to re-process antibiotic disinfected skin allografts. Cell and tissue banking 2004; 5(1):23-36.
3. Nakheon K, Jinyoung K, Jaehyoung A a spol.: Properties of sterilized human skin allografts by gamma-irradiation. Key engineering materials 2007; 342-343:365-368.
4. Bourroul SC, Herson MR, Pino E, Matho MB: Sterilization of skin allografts by ionizing radiation. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France) 2002; 48(7):803-7.
5. Rooney P, Eagle M, Hoqq P, Lomas R, Kearney J: Sterilization of skin allograft with gamma irradiation. Burns 2008; 34(5):-664-73.
6. Shanqina OR, Niqmatullin RT: Effect of radiation sterilization on biomaterial structure and properties. Morfologiia 2006; 129(3):44-7.
7. Dziedzic-Goclawska A, Kaminski A, Uhrynowska-Tyszkiewicz I, Stachowicz W: Irradiation as a safety procedure in tissue banking. Cell and tissue banking 2005; 6(3):201-219.

24. TREM-1 a TREM-2 receptor v imunopatogenéze a diferenciálnej diagnostike pľúcnej sarkoidózy.

MUDr. Magda Suchánková[1]
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Bucová M[1], Tibenská E[2], Demian J[3], Majer I[3], Novosadová H[3], Ďurmanová V[1], Paulovičová E[4], Tedlová E[3]
Školiteľ: doc. MUDr. Mária Bucová, CSc.[1]
[1]Imunologický ústav LFUK, Bratislava, [2]Medirex a. s., Bratislava, [3]Klinika pneumológie a ftizeológie LF UK, Bratislava, [4]Chemický ústav SAV, Bratislava

Úvod

TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells), objavený v roku 2000, je receptor exprimovaný na povrchu myeloidných buniek (monocyty/makrofágy, neutrofily) (1). Jeho expresia na bunkách sa zvyšuje v prítomnosti extracelulárnych mikroorganizmov a ich aktiváciou sa amplifikuje zápalový proces (2). TREM-1 receptor sa uplatňuje tiež v imunitnej odpovedi na plesňové mikroorganizmy (3, 4). Štúdie M. Tercelj a kol. z roku 2011 poukazujú na možnosť úlohy plesní v etiológii pľúcnej sarkoidózy (5).

K expresii TREM-2 dochádza až po vstupe bunky do tkaniva. Tento receptor viaže široké spektrum baktérií a niektoré plesne, a tiež spúšťa ich fagocytózu. Molekula TREM-2 má pravdepodobne tiež kľúčovú úlohu pri pri fúzii makrofágov (6). Fúzia makrofágov a tvorba granulómov je pri sarkoidóze typická – je teda pravdepodobné, že TREM-2 môže mať dôležitú úlohu v imunopatogenéze sarkoidózy.

Na základe týchto faktov sme formulovali hypotézu zvýšených expresií TREM-1 a TREM-2 u pacientov s pľúcnou sarkoidózou. Cieľom našej práce bolo stanoviť expresie TREM-1 a TREM-2 na bunkách v bronchoalveolárnej tekutine (BAT). Doteraz nebola publikovaná štúdia zameraná na zisťovanie účasti týchto receptorov v imunopatogenéze pľúcnej sarkoidózy.

Súbor pacientov a metodika

Do súboru sme zaradili pacientov, ktorým bolo z diagnostických dôvodov indikované vyšetrenie BAT. Vyšetrenie bolo realizované na bronchoskopickej ambulancii Kliniky pneumológie a ftizeológie LF UK v Bratislave.

10 – 20 ml BAT sme použili na zistenie expresie TREM-1 a TREM-2 na povrchu myeloidných buniek. Bunky BAT boli inkubované so značenými anti-TREM-1 a anti-TREM-2 monoklonálnymi protilátkami (R&D Systems, Minneapolis, USA). Bunky boli analyzované prietokovým cytometrom NAVIOS a hodnotené softwarom CXP (Beckman Coulter, Inc, USA). Zisťovali sme absolútne hodnoty, percentuálne zastúpenie a strednú fluorescenčnú intenzitu (SFI) (prepočítanú na 10 000 buniek) TREM-1 a TREM-2 pozitívnych myeloidných buniek.

Do štúdie bolo zaradených 26 pacientov s pľúcnou sarkoidózou (PS: n=26). Diagnóza sarkoidózy bola stanovená na základe odporúčaní: American Thoracic Society/European Respiratory Society. Joint Statement of the and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG): typický klinický a rádiologický nález spojený s histologickým potvrdením nekazifikujúceho granulómu a/alebo zvýšený pomer CD4/CD8 (>3,5) v BAT (7). Iné príčiny granulomatózneho zápalu sme vylúčili. Na základe rádiologického nálezu bolo 9 pacientov v štádiu I a 13 pacientov v štádiu II, 4 pacienti v štádiu III a žiadny pacient v štádiu IV.

Ako kontrolnú skupinu (KS) sme zvolili pacientov s inými intersticiálnymi pľúcnymi procesmi (IPP: n=27) (tab.č.1). Porovnanie pľúcnej sarkoidózy s inými IPP je zaujímavé z hľadiska diferenciálnej diagnostiky.

Tabuľka 1: Charakteristika súboru

Zisťovanie koncentrácií sTREM-1	N=	% mužov	Priemerný vek	RTG št I/II/III (% pacientov)	Lymfocytárna alveolitída >20% (% pacientov	Zvýšenie CD4/CD8 >3,5 (% pacientov)	DLCO (priemer ± SO)
PS	26	50,0	40,4	9/13/4	92%	76%	72,3±15,7
KS (IPP)	27	59,3	59,6	-	6,25%	0%	56,7±14,2

Legenda: PS – pľúcna sarkoidóza, KS – kontrolná skupina (pacienti s inými IPP), N – počet osôb, RTG št.I/II/III – percento pacientov s PS v I. štádiu/percento pacientov s PS v II. štádiu/percento pacientov s PS v III. štádiu podľa RTG nálezu, CD4/CD8 – pomer pomocných a cytotoxických T lymfocytov, DLCO difúzna kapacita oxidu dusnatého vyjadrená ako percento náležitej hodnoty, SO – štandardná odchýlka.

Štatistické metódy

Získané údaje sme najskôr analyzovali testami, ktoré zisťujú, či rozloženie dát je alebo nie je parametrické. Skupiny dát s parametrickým rozložením sme analyzovali nepárovým T-testom. Na štatistickú analýzu dát s neparametrickým rozložením sme použili Mann-Whitneyho U- test. Na zistenie senzitivity, špecificity sme použili Fisherov test.

Výsledky

TREM-1 expresie sú zvýšené u pacientov s pľúcnou sarkoidózou.

Zistili sme signifikantne zvýšené absolútne hodnoty (median: 23,81 buniek/µl, range:6,89-150,63), percentuálne zastúpenie (median: 41,3%, range: 13,3-67,9) a SFI (median: 5,43, range:1,38-12,5) TREM-1 pozitívnych buniek v BAT u pacientov s pľúcnou sarkoidózou v porovnaní s kontrolnou skupinou pacientov (absolútne hodnoty: median: 13,5 buniek/µl, range: 1,05-123,95, p=0,0039; percentuálne zastúpenie: median: 15,7%, range: 1,2-64,7, p=0,0002 a SFI: median: 1,96, range: 0,48-8,26, p=0,0005) (tab.č.2).

TREM-2 expresie sú zvýšené u pacientov s pľúcnou sarkoidózou.

Zistili sme signifikantne zvýšené absolútne hodnoty (median: 32,81 buniek/µl, range: 9,42-81,25), percentuálne zastúpenie (median: 34%, range: 11,3-82,3) a SFI (median: 6,85, range: 1,92-62,68) TREM-2 pozitívnych buniek v BAT u pacientov s pľúcnou sarkoidózou v porovnaní s kontrolnou skupinou pacientov (absolútne hodnoty: median: 7,76 buniek/µl range: 0,28-53,57, p<0,0001; percentuálne zastúpenie: median: 9,6%, range: 0,3-31,2, p<0,0001 a SFI: median: 2,77, range: 0,66-13,92, p=0,0011) (tab.č.2).

Tabuľka 2: Porovnanie absolútneho počtu, percentuálneho zastúpenia a SFI TREM-1 a TREM-2 pozitívnych buniek u pacientov s pľúcnou sarkoidózou a kontrolnou skupinou.

	PS	KS (IPP)	P=
Abs TREM-1	Priemer: 49,99 ± 47,26 Median: 23,81 Rozpätie: 6,89– 150,63	Priemer: 19,86 ± 26,67 Median: 13,50 Rozpätie: 1,05– 23,95	0,0039
% TREM-1	Priemer: 40,99 ± 16,25 Median: 41,30 Rozpätie: 13,30–67,90	Priemer: 20,38 ± 18,48 Median: 15,70 Rozpätie: 1,20 – 64,70	0,0002
SFI TREM-1	Priemer: 6,04 ± 3,36 Median: 5,43 Rozpätie: 1,38 – 12,50	Priemer: 2,71 ± 2,22 Median: 1,96 Rozpätie: 0,48 – 8,26	0,0005
Abs TREM-2	Priemer: 35,05 ± 22,44 Median: 32,81 Rozpätie: 9,42 – 81,25	Priemer: 11,14 ± 11,79 Median: 7,76 Rozpätie: 0,28 – 53,57	<0,0001
% TREM-2	Priemer: 36,35 ± 16,74 Median: 34 Rozpätie: 11,30 – 82,30	Priemer: 10,18 ± 7,43 Median: 9,60 Rozpätie: 0,30 – 31,20	<0,0001
SFI TREM-2	Priemer: 13,66 ± 16,25 Median: 6,85 Rozpätie: 1,92 – 62,68	Priemer: 3,64 ± 3,27 Median: 2,77 Rozpätie: 0,66 – 13,92	0,0011

Legenda: PS – pacienti s diagnózou pľúcnej sarkoidózy, KS – kontrolná skupina (pacienti s inými IPP), Abs – absolútne hodnoty, % - percentuálne zastúpenie, SFI – stredná fluorescenčná intenzita.

Senzitivita a špecificita

Na základe nameraných hodnôt sme určili hladinu (cut off) pre absolútny počet >20buniek /µl, pre percentuálne zastúpenie buniek >20% TREM-1 a TREM-2 pozitívnych buniek a strednú fluorescenčnú intenzitu >3 a hodnoty vyššie ako definovaný cut off sme označili ako pozitívny výsledok, hodnoty nižšie ako definovaný cut off sme označili ako negatívny výsledok testu.

Pre pľúcnu sarkoidózu sme zistili tieto hodnoty senzitivity a špecificity TREM-1 testu: Zvýšenie absolútnych hodnôt TREM-1 pozitívnych buniek: senzitivita 78,95%, špecificita 62,07%; percentuálneho zastúpenia: senzitivita 87,50%, špecificita 56,25%; SFI: senzitivita 94,44%, špecificita 73,08%.

Hodnoty senzitivity a špecificity TREM-2 testu: Absolútne hodnoty: senzitivita 77,78%, špecificita 72,41%; percentuálne zastúpenie: senzitivita 84,62%, špecificita 84,85%; SFI: senzitivita 77,78%, špecificita 65,38%.

Vzhľadom na skutočnosť, že pre sarkoidózu je typické zvýšenie oboch receptorov testovali sme senzitivitu a špecificitu pri súčasnom zvýšení oboch receptorov u jedného pacienta: (pozitivita TREM-1 aj TREM-2): Absolútna hodnota: senzitivita 68,42%, špecificita 79,31%. Percentuálne zastúpenie: senzitivita 72,00%, špecificita 90,91%. SFI: senzitivita 72,22%, špecificita 92,59% (graf).

CD4/CD8 index patrí k bežne používaným markerom v diagnostike sarkoidózy. Tento marker má vysokú špecificitu: pomer nad 3,5 má špecificitu od 94 do 96% ale relatívne nízku senzitivitu: od 52 do 59% (8).

Zisťovali sme špecificitu a senzitivitu CD4/CD8 indexu u nášho súboru pacientov. Zistili sme senzitivitu 72,97 %, špecificitu 91,67 % (graf).

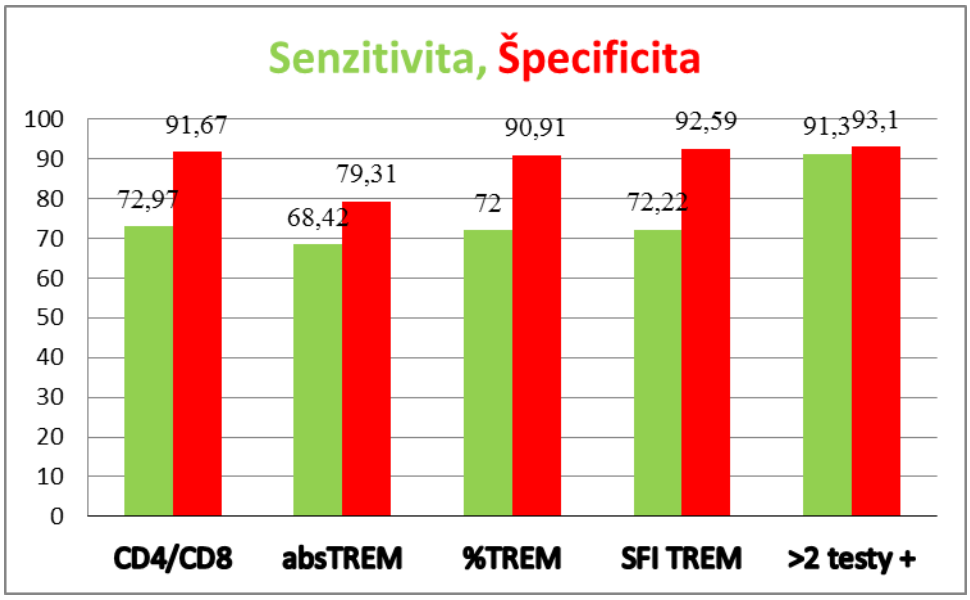
Zvýšenie špecificity a senzitivity je možné dosiahnuť kombináciou týchto testov.

Výrazné zvýšenie senzitivity a mierne zvýšenie špecificity dosiahneme spojením týchto štyroch testov. 91,3% pacientov so sarkoidózou má zvýšené dva a viac z nasledovných štyroch sledovaných testov:

1. Test: $CD4^+/CD8^+$
2. Test: absolútne hodnoty TREM-1+TREM-2
3. Test: percentuálne zastúpenie TREM-1+TREM-2
4. Test: SFI TREM-1+TREM-2

A len 6,90% pacientov s inou IPP má zvýšené 2 zo štyroch testov. Senzitivita tohto testu je 91,3%, špecificita 93,10% (graf).

Graf. Porovnanie senzitivity a špecificity 4 testov (CD4/CD8, absolútne hodnoty TREM-1+TREM-2, percentuálne zastúpenie TREM-1+TREM-2, SFI TREM-1+TREM-2) a zohľadnenie viacerých testov súčasne (pozitivita >2 testoch).



CD4/CD8 –pomer CD4/CD8 (test 1), absTREM –absolútne hodnoty TREM-1 a TREM-2 pozitívnych buniek (test 2), %TREM –percentuálne zastúpenie TREM-1 a TREM-2 pozitívnych buniek (test 3), SFI TREM-1 a TREM-2 pozitívnych buniek (test 4), > 2 testy + – pozitivita minimálne dvoch predchádzajúcich testov.

Diskusia

Intersticiálne pľúcne procesy (IPP) zahŕňajú heterogénnu skupinou chorôb s doteraz nie celkom jasnou etiológiou, patogenézou a obmedzenými možnosťami ich liečby. K tejto skupine chorôb zaraďujeme aj sarkoidózu. Táto choroba má v porovnaní s ostatnými IPP svoje špecifiká. Sprevádza ju výrazná lymfadenopatia, lymfocytárna alveolitída s dominanciou T pomocných lymfocytov (na rozdiel od iných IPP), čo naznačuje aktiváciu makrofágov spojenú s intenzívnou prezentáciou antigénu. Ďalším typickým príznakom je tvorba nekazeifikujúcich granulómov. Antigén zodpovedný za takúto imunitnú odpoveď pri sarkoidóze však doteraz nie je známy.

Expresia TREM-1 receptora sa zvyšuje na povrchu myeloidných buniek v prítomnosti extracelulárnych mikroorganizmov. Podľa Terčelj a spol. sú možným etiologickým agens plesne, patriace medzi extracelulárne mikroorganizmy (5). V imunitnej odpovedi na plesňové mikroorganizmy sa uplatňuje aj TREM-1 receptor (3, 4). TREM-2 receptor sa zúčastňuje pri tvorbe granulómov (6). Na základe týchto skutočností sme formulovali hypotézu zvýšených expresií TREM-1 a TREM-2 na povrchu myeloidných buniek. V našej práci sme zistili zvýšené absolútne hodnoty,

percentuálne zastúpenie a SFI TREM-1 aj TREM-2 pozitívnych buniek v BAT u pacientov s pľúcnou sarkoidózou v porovnaní s kontrolnou skupinou pacientov s inými IPP a potvrdili tak účasť týchto receptorov v imunopatogenéze pľúcnej sarkoidózy. Testovaním špecificity a senzitivity sme zistili najlepšie výsledky testovaním oboch receptorov. Spojením viacerých testov je možné dosiahnuť zvýšenie špecificity aj senzitivity. V našej práci sme testovali súčasné zvýšenie oboch receptorov a $CD4^+/CD8^+$ indexu. Súčasným testovaním týchto troch premenných (zvýšenie $CD4^+/CD8^+$, TREM-1, TREM-2) sme dosiahli relatívne vysokú senzitivitu 91,3% aj špecificitu 93,10 % . Zisťovanie TREM-1 a TREM-2 receptorov sa javí ako potenciálny diferenciálno-diagnostický marker, ktorým je možné odlíšiť pľúcnu sarkoidózu od iných IPP.

Záver

TREM-1 aj TREM-2 receptor sa uplatňujú v imunopatogenéze pľúcnej sarkoidózy a ich sledovanie v BAT je možné využiť v diferenciálnej diagnostike tejto choroby.

Použitá literatúra

1. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M: Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. J Immunol 2000; 164 (10): 4991-4995.
2. Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, Sieling PA, Stenger S, Colonna M, Modlin RL. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. J Immunol 2003; 170(7): 3812–3818.
3. Buckland KF, Ramaprakash H, Murray LA, a spol. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) modulates immune responses to Aspergillus fumigatus during fungal asthma in mice. Immunol Invest 2011; 40(7-8):692-722.
4. Carpenter KJ, Buckland KF, Xing Z, Hogaboam CM. Intrapulmonary, adenovirus-mediated overexpression of KARAP/DAP12 enhances fungal clearance during invasive aspergillosis. Infect Immun 2005; 73(12):8402-8406.
5. Terčelj M, Stopinšek S, Ihan A, Salobir B, Simčič S, Wraber B, Rylander R. In vitro and in vivo reactivity to fungal cell wall agents in sarcoidosis. Clin Exp Immunol 2011; 166(1): 87-93.
6. Helming L, Tomasello E, Kyriakides TR, Martinez FO, Takai T, Gordon S, Vivier E. Essential role of DAP12 signaling in macrophage programming into a fusion-competent state. Sci Signal 2008; 1(43):ra11.
7. American Thoracic Society/European Respiratory Society. Joint Statement of the and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG). Am J Respir Crit Care Med 1999; 160:736–755.
8. Drent M, Mansour K, Linssen C. Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. Semin Respir Crit Care Med. 2007; 28(5):486-495.

25. Molekulový mechanizmus účinku meďnatého komplexu na bunkovú líniu ľudského nádoru hrubého čreva

Ing. Katarína Koňariková[1]

Spoluautori: Ingrid Žitňanová,[1] Lucia Andrezálová,[1] Zdeňka Ďuračková,[1] Helena Gbelcová[2]
Školiteľ: doc. Ing. Ingrid Žitňanová[1] PhD.
[1]Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK v Bratislave [2]Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta UK v Bratislave

Úvod

Na Slovensku každý rok ochorie na rakovinu viac ako 20 000 ľudí. Aj napriek úsiliu lekárov nepriaznivý trend vo výskyte nádorových ochorení u nás pretrváva. V súčasnosti štatistická krivka úmrtnosti na zhubné nádory stúpa, avšak podstatne menej ako krivka výskytu nádorov. To znamená, že každoročne narastá percento vyliečených pacientov.

Dnes sa bežne a rutinne používa na vyhľadávanie nových potenciálnych cytostatík primárny skríning *in vitro*, pri ktorom sa rôznymi metódami sleduje citlivosť nádorových buniek rastúcich *in vitro* na cytotoxické látky. Vlastnosti potenciálnej protinádorovej zlúčeniny sú charakterizované rôznymi parametrami, medzi ktoré patrí antiproliferačná aktivita, zmeny v obsahu bunkových proteínov, zmeny bunkového cyklu, indukcia apoptózy, atď. Sledovaním týchto parametrov súčasne sledujeme aj mechanizmus účinku cytotoxicky účinnej látky.

Primárny biochemický skríning je prvým krokom na určenie vzťahu medzi chemickou štruktúrou a cytotoxickou účinnosťou. Skríning umožňuje hodnotenie veľkého počtu chemicky príbuzných, resp. rozličných látok, rýchle vyraďuje neúčinné látky, odhaľuje látky s najväčšou účinnosťou a zároveň umožňuje štúdium mechanizmu účinku cytotoxicky účinnej látky.

Cieľom naše práce bolo zistiť mechanizmus účinku meďnatého komplexu so známymi antibakteriálnymi, antivirálnymi, protizápalovými a antioxidačnými vlastnosťami na ľudskej nádorovej línii hrubého čreva HT-29.

Materiál a metódy

Testovaný meďnatý komplex

Meďnatý komplex ZK1 – monohydrát diakva-(N-salicylidén-L-glutamáto) meďnatý komplex - [Cu(N-sal-L-glu)(H_20)$_2$].H_20 bol syntetizovaný podľa (1-5). Na základe primárneho skríningu sme vybrali na ďalšie testovanie koncentrácie 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 50 a 100 µmol/L. Ako kontrolu sme použili bunky, ktoré neboli ovplyvnené komplexom. Komplex bol rozpustný v destilovanej vode.

Použité bunkové modely

Ľudská nádorová línia hrubého čreva HT-29

Bunky HT-29 sú izolované z primárneho nádoru 44 ročnej ženy. Rastú prichytené na dne kultivačnej nádoby, kde postupne vytvárajú jednovrstvu. Bunky sa kultivujú pri 37 °C vo zvlhčenej atmosfére s obsahom 5% CO_2. Bunkové inokulum je $1x10^5$ buniek na 1 ml. Na kultiváciu bunkovej línie HT-29 sme použili médium DMEM obohatené fetálnym sérom (10%) a antibiotikami penicilínom a

streptomycínom (10 μg/ml). Bunky boli získané z American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA.

Sledovanie cytotoxického a genotoxického účinku meďnatého komplexu ZK1 na bunkovej línii HT-29

Cytotoxický účinok meďnatého kompexu ZK1 sme sledovali na ľudskej nádorovej bunkovej línii hrubého čreva HT-29. K vyrastenej kultúre buniek sme pridali testovaný komplex vo výslednej koncentrácii 0,001 – 100 μmol/L. Kontrolné bunky neboli ovplyvnené meďnatým komplexom. V rôznych časových intervaloch (24, 48, 72 hod) sme určili bunkový rast priamym počítaním buniek v Bűrkerovej komôrke a viabilitu buniek farbením 0,4 % trypánovou modrou. Vypočítali sme relatívnu inhibíciu rastu bunkovej proliferácie a degenerácie bunkovej populácie. Z grafickej závislosti percenta rastu buniek od koncentrácie derivátu sme určili hodnotu IC_{50} a IC_{100} v μmol/L.

Sledovanie indukcie apoptózy na bunkovej línii HT-29

Kontrolné bunky a bunky ovplyvnené meďnatým komplexom (1 x 10^6) sme zlyzovali a DNA buniek elektroforeticky rozdelili v 2 % agarózovom géle s pridaním etídium bromidu. Separované apoptotické DNA fragmenty (DNA rebríky) boli vizualizované s použitím UV transiluminátora. Ako pozitívnu kontrolu sme použili cisplatinu (6 μmol/L), ktorá podľa literárnych údajov indukuje apoptózu buniek L1210.

Fluorescenčná mikroskopia

Ku kontrolným a látkou ovplyvneným bunkám (1x10^6 buniek/1 ml) sme pridali fluorescenčné farbivo Hoechst 33258 (1 μg/ml) a 15 μl propidium jodidu (50 μg/ml). Bunky boli kultivované 30 min., pri 37°C a sledované na podložnom sklíčku pod fluorescenčným mikroskopom.

Aktivita kaspázy 3

Aktivita kaspázy 3 bola sledovaná kolorimetricky pomocou zakúpeného kitu CaspACE™ Assay System, Colorimetric.

Aktivita kaspázy 8 a 9

Aktivita kaspázy 8 a kaspázy 9 bola sledovaná luminometricky pomocou zakúpených kitov Caspase-Glo™ 8 a Caspase-Glo™ 9 Assay.

Jednobunková gélová elektroforéza

Pripravené bunky, ovplyvnené resp. neovplyvnené látkou sme centrifugovali 5 min. pri 200xg. Sediment bol rozsuspendovaný v príslušnom objeme 0,75 % LMP agarózy a nanesený s počtom buniek 2 – 2,5 x 10^4 buniek na sklíčko, ktoré bolo predtým zdrsnené 1% roztokom NMP agarózy. Po 60 min.lýze boli sklíčka odvíjané 40 min. v elektroforetickom tlmivom roztoku a samotná elektroforéza prebiehala 30 min. pri 300 mA a 25 V. Po skončení elektroforézy sa sklíčka neutralizovali, vizualizovali fluorescenčným farbivom DAPI a určili sa triedy poškodenia (6).

Výsledky

Sledovanie cytotoxického účinku meďnatého komplexu ZK1 na bunkovej línii HT-29

V rámci štúdia cytotoxického účinku meďnatého komplexu ZK1 na ľudskú nádorovú bunkovú líniu HT-29 sme zistili, že meďnatý komplex ZK1 mal cytotoxický účinok po 48h pôsobenia resp. spôsobil degeneráciu časti bunkovej pri dvoch najvyšších použitých koncentráciách (50 a 100 µmol/L).

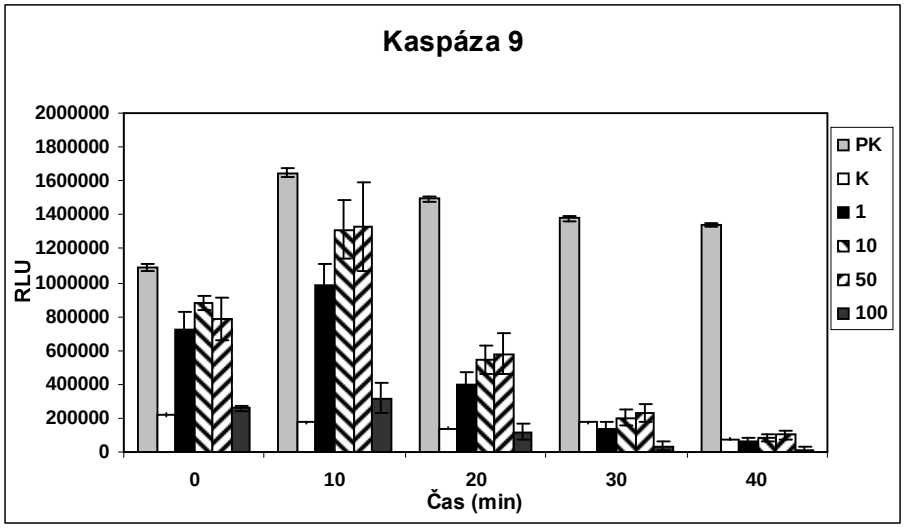
Sledovanie indukcie apoptózy na bunkovej línii HT-29

Agarózovou gélovou elektroforézou sme študovali schopnosť derivátu ZK1 indukovať apoptotickú resp. nekrotickú bunkovú smrť. Zistili sme, že ZK1 indukoval internukleozomálne štiepenie DNA (tvorbu apoptotického „DNA rebríka“) po 48 a 72 h v

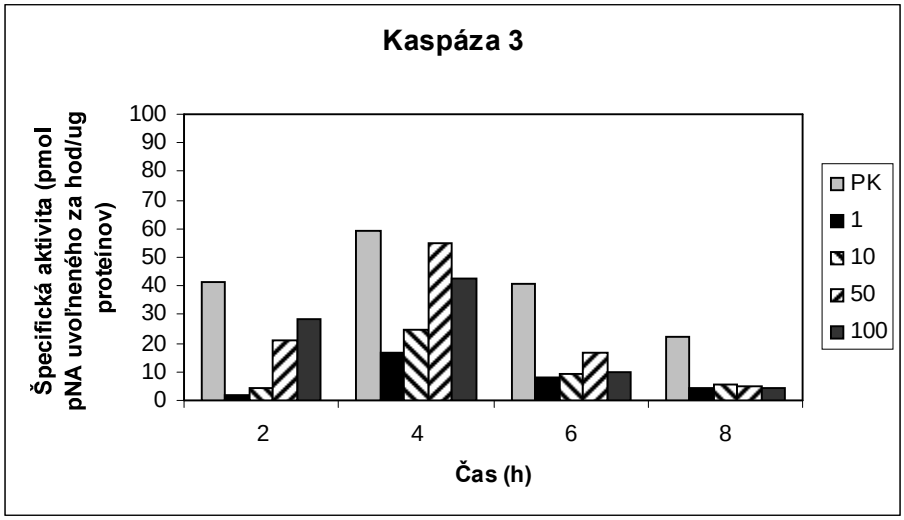
použitých koncentráciách (1, 10, 50 a 100 µmol/L), čo sme potvrdili aj flurescenčným farbením.

Aktivita kaspázy 8, 9 a 3

Na základe získaných výsledkov zo štúdia spôsobu bunkovej smrti, sme v ďalšej časti práce študovali molekulový mechanizmus apoptózy indukovanej meďnatým komplexom ZK1 koncentráciami 1-100 µmol/L. Zistili sme neaktívnu kaspázu 8 a aktívnu kaspázu 9 (Obr. 1) a kaspázu 3 (Obr. 2).



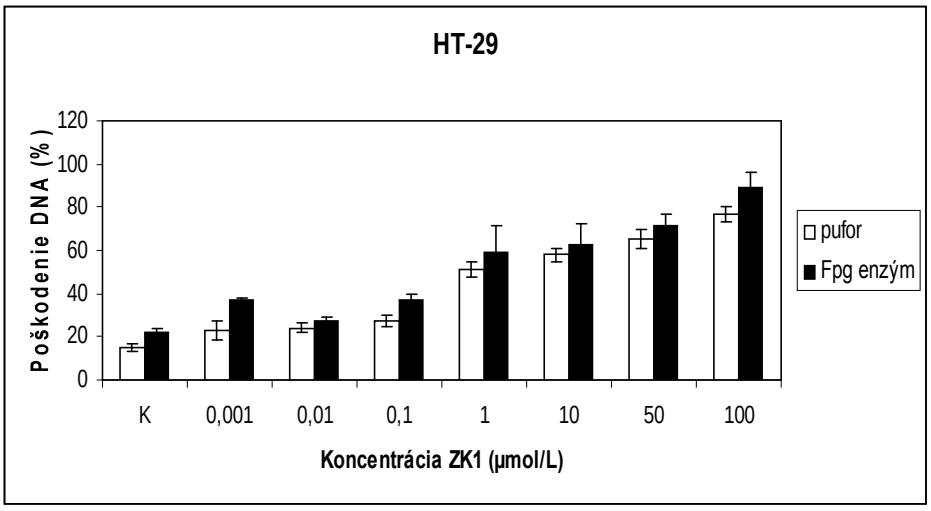
Obr.1: Účinok meďnatého komplexu ZK1 na aktivitu kaspázy 9 buniek HT-29 vyjadrenú v relatívnych luminiscenčných jednotkách (RLU). K- kontrola (bunky HT-29 neovplyvnené komplexom), PK - pozitívna kontrola (bunky L1210 ovplyvnené 6 µmol/L cisPt); Koncentrácie sú uvedené v µmol/L.



Obr.2: Aktivita kaspázy 3 vyjadrená ako špecifická aktivita (pmol pNA uvoľneného za hodinu/µg proteínov). Pk - pozitívna kontrola (bunky L1210 ovplyvnené 6 µmol/L cisPt). Koncentrácie sú uvedené v µmol/L.

Jednobunková gélová elektroforéza

Tvorbu DNA poškodení indukovaných komplexom ZK1 sme študovali jednobunkovou gélovou elektroforézou (SCGE). Výsledky sú znázornené na obr. 3. Ako vidieť z obr. 3 hladina DNA zlomov (pufor) a hladina celkového poškodenia DNA (tvorba DNA zlomov + oxidačne poškodených purínov) (Fpg enzým) priamoúmerne vzrastala so stúpajúcou koncentráciou ZK1.



Obr.3: Fluorescenčná analýza DNA poškodení priamych DNA zlomov (pufor) a celkového poškodenia DNA (tvorba DNA zlomov + oxidovaných purínov) (Fpg enzým) buniek HT-29 ovplyvnených koncentráciami komplexu uvedenými v grafe. DNA poškodenia sme merali kométovou metódou (6).

Diskusia

V rámci štúdia cytotoxického účinku meďnatého komplexu ZK1 na ľudskú nádorovú líniu hrubého čreva sme zistili jeho výrazný cytotoxický efekt v 48h pôsobenia pri dvoch najvyšších použitých koncentráciách (50 a 100 µmol/L). Inhibičná koncentrácia IC_{50} klesala s časom pôsobenia a použitou

koncentráciou (IC_{50} pre 24h bola 42, pre 48h 21 a pre 72h 0,007 µmol/L). Podobné výsledky publikovali aj Shrivastav et all. (2006). Študovali cytotoxický efekt meďnatého komplexu N'-[(2-hydroxy fenyl) carbonotioyl] pyridine-2-carbohydrazin na ľudskú nádorovú líniu hrubého čreva HT-29 a zistili hodnotu IC_{50} 12.20 µmol/L po 48h pôsobenia (7), čo koreluje s našimi výsledkami.

Pri štúdiu spôsobu bunkovej smrti gélovou elektroforézou sme identifikovali apoptotickú bunkovú smrť v 48 a 72h pôsobenia ZK1 v koncentračnom rozsahu 1-100 µmol/L. Shrivastav et al. (2006) taktiež indukovali apoptózu meďnatým komplexom na nádorovej línii HT-29, ktorú dokázali internukleozomálnym štiepením (7).

V ďalšej časti práce sme sa zaoberali molekulovým mechanizmom apoptózy. Z literatúry je známe, že apoptóza môže prebiehať vonkajšou dráhou (cez smrtiace receptory), kedy je aktivovaná kaspáza 8 a vnútornou (mitochondriálnou) dráhou, kedy je aktivovaná kaspáza 9 a v obidvoch prípadoch kaspáza 3. Zistili sme, že meďnatý komplex ZK1 indukoval zvýšenie aktivity kaspázy 9 (Obr.1). Bunky boli ovplyvnené komplexom ZK1 24h koncentráciami v rozsahu 1-100 µmol/L. Na druhej strane sme nepozorovali zvýšenie aktivity kaspázy 8. Po 36h ovplyvnení buniek komplexom ZK1 koncentráciami v rovnakom rozsahu, sme pozorovali časovo závislé zvýšenie aktivity kaspázy 3 do 4h, potom aktivita klesala (obr. 2). Z týchto výsledkov vyplýva, že meďnatý komplex ZK1 v koncentračnom rozsahu 1-100 µmol/L spôsobil apoptotickú smrť buniek HT-29, ktorá bola indukovaná vnútornou (mitochondriálnou) dráhou cez aktivitu kaspázy 3 a 9. Je známe, že meďnaté komplexy aktivujú kaspázu 9 aj v iných bunkových líniách, ako napríklad MDA-MB-231 (ľudská nádorová línia prsníka), kde bola pozorovaná zvýšená aktivita kaspázy 3 a 9 (8).

Štúdiom genotoxického účinku meďnatého komplexu ZK1 po 24h pôsobení na bunkovú líniu HT-29 v koncentračnom rozsahu 0,001-100 µmol/L sme pozorovali zvýšenie hladiny priamych zlomov DNA a celkové poškodenie DNA (tvorba DNA zlomov + oxidačne poškodených purínov) oproti kontrolným bunkám (bunky neovplyvnené komplexom ZK1), ktoré stúpalo s použitou koncentráciou. Toto zvýšenie však nebolo signifikantné.

Presnou identifikáciou spôsobu smrti a konkrétnych proteínov, ktoré sú zapojené do tejto dráhy, je možné nájsť spôsob, ako efektívnejšie iniciovať bunkovú smrť v nádorových bunkách a blokovať v zdravých bunkách. Pochopenie mechanizmu bunkovej smrti umožní objasniť a eliminovať defekty, ktoré vedú k závažným patologickým stavom

Poďakovanie

Autori ďakujú za finančnú pomoc občianskemu združeniu Rozum a zdravie.

Použitá literatúra

1. Krätsmár-Šmogrovič, J. a kol.: Z.Naturforsch.46b, 1323-1327, 1991.
2. Kohútová M., Valent A.: Chem.Papers, 56, 95-99, 2002.
3. Kohútová M. a kol.: Chem.Papers, 54, 87-90, 2000.
4. Langer V. a kol.: ActaCryst., C65, 208-210, 2009.
5. Langer V. a kol.: Chem.Listy, 62. zjazd chemických spoločností, 104, 413, 2010.
6. Collins AR, Dobson VL, Dušinská M, Kennedy G, Štetina R. Comet assay: What can it really tell us? Mutat Res 1997; 375:183-193
7. Shrivastav A, Singh NK, Tripathi P, George T, Dimmock JR, Sharma RK: Copper(II) and manganese(III) complexes of N'-[(2-hydroxy phenyl) carbonothioyl] pyridine-2-carbohydrazide: novel therapeutic agents for cancer. Biochimie 2006;88(9):1209-16
8. Fei Wang, Shumei Zhai, Xiaojun Liu, Liwen Li, Shirley Wu, Q. Ping Dou, Bing Yan: A novel dithiocarbamate analogue with potentially decreased ALDH inhibition has copper dependent

proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing activity in human breast cancer cells. Cancer Letters 2011; 300:87–95

26. Hodnotenie lokálneho „bystander“ efektu génovej terapie na ľudské nádorové bunky medulárneho karcinómu štítnej žľazy in vivo

Mgr. L. Feketeová[1]
(Patologická anatómia)

Spoluautori: Ing. M. Poturnajová, PhD.[2], Mgr. L, Kučerová, PhD.[2]
Školiteľ: prof. MUDr. P. Babál, CSc.[1]
[1]Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave
[2]Laboratórium molekulárnej onkológie, Ústav experimentálnej onkológie, Slovenská akadémie vied, Bratislava

Úvod:

Génová terapia je metóda využívajúca zmenu genómu bunky v prospech zvýšenia odpovede na terapiu. Na zvýšenie citlivosti nádorových buniek sa využívajú tzv. „samovražedné gény“, kódujúce enzým aktivujúci podávané predliečivo a jeho premenu na toxické liečivo. Pri tomto type terapie je prínosom aj tzv. „bystander“ efekt, kedy liečivo difunduje a poškodzuje aj okolité nádorové bunky bez vneseného génu pre potrebný enzým (1). Tento typ génovej terapie je využívaný pri experimentálnej liečbe gastrointestinálnych nádorov, nádorov prsníka a tiež nádorov hlavy a krku (2).

Medulárny karcinóm štítnej žľazy (MTC) predstavuje malígny nádor pochádzajúci z parafolikulárnych buniek. V prípade neskorej diagnostiky sa stretávame s metastázami v lymfatických uzlinách krku, prípadne vzdialenými metastázami (3). Tieto, lokalizované najmä v pečeni, kostiach a pľúcach, sú hlavnou príčinou úmrtia v súvislosti s MTC, často sú viacpočetné a voči rádio- a chemoterapii rezistentné (4).

Cieľom práce bolo overiť účinnosť „bystander“ efektu terapie, kombinácie fúznej kvasinkovej cytozíndeaminázy (yCD) s 5- fluorocytozínom (5FC), na nádorové bunky medulárneho karcinómu štítnej žľazy ako perspektívneho terapeutického postupu pri liečbe metastatického medulárneho karcinómu štítnej žľazy. Účinnosť lokálneho „bystander“ efektu sme testovali na modeli ľudských nádorových xenotransplantátov odvodených z modelovej bunkovej línie TT na imunodeficientných myšiach in vivo.

Metodika:

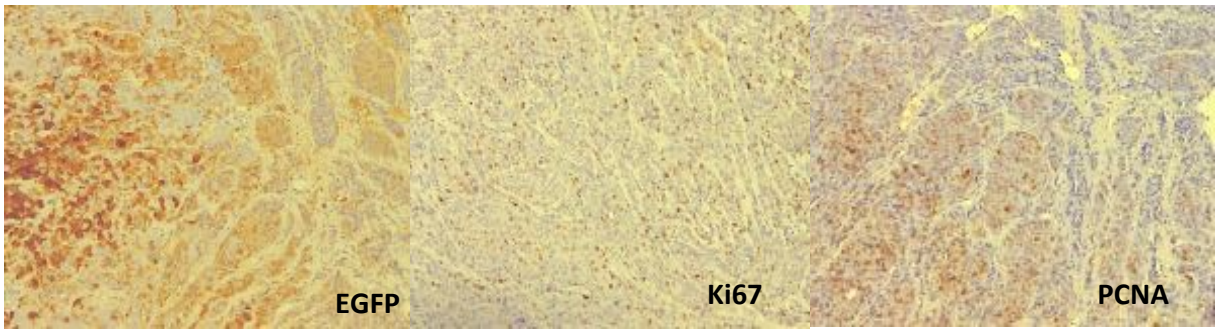
V práci bol použitý retrovírusový konštrukt pST2 obsahujúci spojenie kvasinkovej cytozíndeaminázy s uracil fosforibozyltransferázou (yCD), sprostredkujúci „suicide“ efekt liečby v nádorových bunkách, a pAPGFP s génom pre zosilnený zelený fluorescenčný proteín (EGFP), označujúci bunky, ktoré by mali podľahnúť tzv. „bystander“ efektu terapie. Oba konštrukty boli transfekované do nádorových buniek TT línie, nesúcich mutáciu Cys634Trp v RET onkogéne. Na inokuláciu sme použili terapeutické bunky yCD-TT zmiešané s cieľovými EGFP-TT v pomere 2:9. Bunky ($5x10^6$) boli subkutánne inokulované v ECM komponente do 6 týždňových samičiek myší nu/nu. Keď xenotransplantáty dosiahli objem cca $100mm^3$, tieto boli rozdelené na skupinu neliečených a liečených po 4 zvieratá. 5FC bol zvieratám v skupine liečených podávaný v dávke 500mg/kg/deň po dobu 14 dní. Zvieratá boli usmrtené po presiahnutí objemu $1cm^3$ v neliečenej skupine.

Nádory boli vyexcidované, zafixované v pufrovanom formaldehyde a zaliate v parafíne. Po narezaní na 5µm hrubé rezy boli tkanivá použité na imunohistochemickú analýzu expresie markerov EGFP na zistenie prítomnosti nádorových buniek po liečbe, Ki67 a PCNA na overenie ich proliferačnej aktivity. Použité boli polyklonová králičia protilátka proti EGFP (Abcam, Cambridge, UK) a monoklonové myšacie protilátky proti Ki67 a PCNA (Dako, Dánsko). Na vizualizáciu bol použitý univerzálny

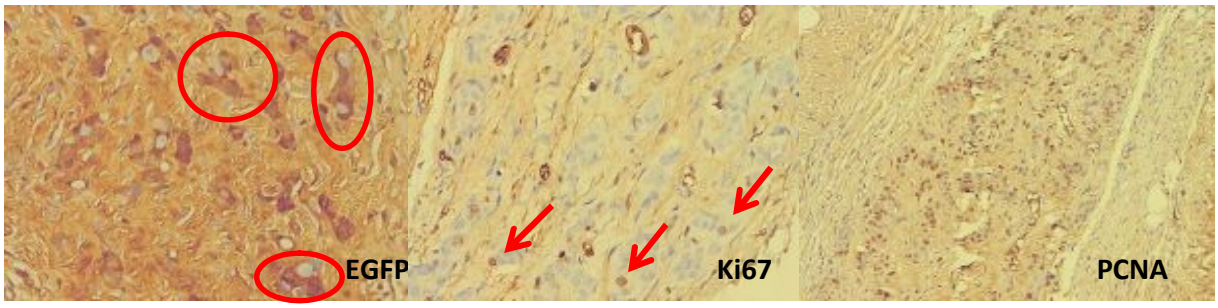
peroxidázový polymér Histofine s diaminobenzidínom (Dako, Dánsko), ako substrátom pre farebnú reakciu. Tkanivá boli hodnotené semikvantitatívne vo svetelnom mikroskope hodnotiac prítomnosť/ neprítomnosť jadrovej pozitivity na vyšetrované markery.

Výsledky:

V neliečených, kontrolných nádoroch pozorujeme EGFP pozitívne aj negatívne bunky, ktoré vykazujú pozitivitu aj na proliferačné markery Ki67 a PCNA (obr.1). V nádoroch po liečbe pozorujeme zhluky nádorových buniek EGFP pozitívnych aj negatívnych. Tieto vykazujú difúznu pozitivitu na PCNA marker, avšak pozitivita na Ki67 je iba v ojedinelých bunkách (obr. 2).



Obrázok 1: Neliečený medulárny karcinóm štítnej žľazy, jadrová pozitivita/ negativita na EGFP, znázorňujúca prítomnosť dvoch populácií buniek (TTpST2/yCD a parentálne TT/EGFP), tiež na markery Ki67 a PCNA, 20x zväčšenie, DAB (hnedá farba)



Obrázok 2: Medulárny karcinóm štítnej žľazy po liečbe yCD/5FC, prítomná jadrová pozitivita/ negativita na EGFP (označené skupiny buniek), difúzna jadrová pozitivita na PCNA, naproti ojedinelej pozitivite na Ki67 (označené šípkou) , 40x zväčšenie, DAB (hnedá farba)

Diskusia:

Medulárny karcinóm štítnej žľazy (MTC) je malígny nádor, pomerne rýchlo sa šíriaci do lymfatických uzlín krku, prípadne vytvára vzdialené metastázy v pľúcach, kostiach a pečeni. Pri metastazujúcom karcinóme sa veľmi často stretávame s rezistenciou voči dostupným liečebným metódam, rádio- a chemoterapii (4). MTC sa môže vyskytovať samostatne, označovaný ako sporadický typ, kedy rastie pomaly. Závažným je najmä z dôvodu prítomnosti metastáz v lymfatických uzlinách krku až u 50% pacientov v čase diagnózy a približne 10- 20% pacientov má v tomto čase už vyvinuté aj vzdialené metastázy, ktoré sú často inoperabilné vďaka ich lokalizácii (7). V dedičnej forme môže ísť o familiárny MTC (FMTC) alebo MTC ako súčasť syndrómu mnohopočetnej endokrinnej neoplázie typu 2 (MEN2). Ako súčasť MEN2 syndrómu rastie pomerne rýchlo. Za vznik dedičnej formy je zodpovedná zárodočná, autozomálne- dominantná, gain-of-function mutácia v RET onkogéne. Za veľmi častú je považovaná najmä mutácia Cys634Trp, ktorá vedie ku substitúcii aminokyselín na kodóne 634, pozorovaná najmä u pacientov s MEN2A a FMTC (7). Túto mutáciu nesie aj TT bunková

línia, využívaná na modelovanie rastu medulárneho karcinómu štítnej žľazy v experimentálnych zvieratách a bola použitá aj v nami použitom zvieracom modeli.

Vo viacerých prípadoch agresívnych malígnych nádorov sa úspešnou metódou ukazuje génová terapia a to nielen jej tzv. „suicide" efekt, ale najmä dokázaný „bystander" efekt, ovplyvňujúci nádorové bunky bez transfekovaného génu pre enzým, spôsobujúci premenu netoxického predliečiva na chemoterapeutikum. (5) V praxi sú zaužívané kombinácie viacerých rôznych typov predliečiv a enzýmov. Jedným z takýchto je aj kombinácia enzýmu kvasinkovej cytozíndeaminázy (yCD) sprostredkúvajúcej premenu 5- fluorocytozínu (5FC) na cytotoxický 5- fluorouracil (5FU), a následne na jeho metabolity, ktoré spôsobujú usmrcovanie nádorových buniek aj využitím „bystander" efektu. Ten je dosiahnutý vďaka vysokej schopnosti difúzneho prechodu 5FU a jeho metabolitov medzi bunkami, nezávisle od medzibunkových spojení. (5) Transgén yCD kóduje enzým obsahujúci uracil fosforibozyltransferázovú doménu, ktorá účinne premieňa 5FU na 5FU monofosfát. Tento je schopný začleniť sa do tvoriaceho sa reťazca nukleovej kyseliny a sprostredkúvať zablokovanie dráh syntézy nukleotidov a tým blokuje syntézu DNA aj RNA (6). V predošlej práci sme potvrdili, že na 90% inhibíciu proliferácie cieľových buniek postačuje 10% terapeutických buniek (6).

V našej práci sme na vyvolanie rastu MTC použili kombináciu parentálnych TT buniek značených EGFP na odlíšenie od TTpST2 buniek s transfekovaným génom pre yCD, tzv. cieľových buniek, schopných konvertovať predliečivo 5FC na chemoterapeutikum 5FU. Na základe našich výsledkov, kedy sme v liečených nádoroch pozorovali prítomné skupiny buniek EGFP pozitívnych aj negatívnych, sme pristúpili k zhodnoteniu ich proliferačnej aktivity vyšetrením prítomnosti expresie markerov Ki67 a PCNA. Vysoký počet PCNA pozitívnych buniek možno interpretovať ako zastavenie nádorových buniek v S fáze bunkového cyklu, kedy je expresia tohto markera zvýšená. Dôležitú informáciu nám dáva veľmi nízky počet Ki67 pozitívnych buniek, čo znamená už spomínané zastavenie bunkového delenia a tieto bunky by sme mohli označiť ako neaktívne. Keďže väčšina nádorových buniek je negatívnych, zahŕňajúc bunky zo skupiny liečených (schopných konverzie 5FC účinkom transfekovaného génu pre yCD), ale i neliečených (bez priameho účinku 5FU), výsledky našej práce hovoria, že napriek úniku týchto buniek „bystander" efektu, sú tieto nedeliace sa, neschopné vyvolať ďalší rast a šírenie nádoru. Naznačujú možnosť dosiahnuť týmto prístupom nádorovú dormanciu u modelového MTC xenotransplantátu aj v prípade, ak len 10% nádorových buniek exprimuje terapeutický transgén.

Zdá sa, že použitie génovej terapie typu yCD/5FC a jej „bystander" efektu by mohlo byť úspešne využívaným pri liečbe metastatického medulárneho karcinómu štítnej žľazy aj u humánnych pacientov s touto diagnózou.

Práca bola podporená grantovou úlohou VEGA 2/008/11 a VEGA 2/0135/09, MZSR 2006-23-UK-02.

Použitá literatúra

1. Springer C.J., Niculescu- Duvaz I., 2000: Prodrug- activating systems in suicide gene therapy, Journal of Clinical Ibvestigation 105: 1161- 1167
2. Miller C.R., Williams Ch.R., Buchsbaum D.J., Gillespie Y., 2002: Intratumoral 5-Fluorouracil produced by Cytosine Deaminase/ 5- Fluorocytosine gene therapy is effective for experimental human glioblastomas, Cancer Research 62: 773- 780
3. Muro- Cacho C.A., Ku N.N., 2002: Tumors and tumor like lesions of the thyroid gland. In: Pellitteri P., Mc CaVrey T.V. (eds): Endocrine surgery of the head and neck, 1st edn. Thompson Delmar Learning, New York, pp 35–36
4. Leboulleux S., Baudin E., Travagli J.-P., Schlumberger M., 2004: Medullary thyroid carcinoma, Clinical Endocrinology 61: 299- 310

5. Evravd A., Cuq P., Ciccolini J., Vian L., Cano J.-P., 1999: Increased cytotoxicity and bystander effect of 5- fluorouracil and 5- deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transduced with thymidine phosphorylase, British Journal of Cancer 80: 1726- 1733
6. Kučerová L., Matušková M., Hlubinová K., Bohovič R., Feketeová L., Janega P., Babál P., Poturnajová M., 2011: Bystander cytotoxicitiy in human medullary thyroid carcinoma cells mediated by fusion yeast cytosine deaminase and 5- fluorocytosine, Cancer Lett., doi:10.1016/j.canlet.2011.07.014
7. Pacini F., Castagna M.G., Cipri C., Schlumberger M., 2010: Medullary thyroid carcinoma, Cancer Oncology 22: 475- 485

27. Impact of molecular genetics on prognosis of optic glioma in NF1 patients

Anna Rybárová[1], Martina Némethová[2], Katarina Hlinková[3], Anna Hlavatá[1], László Kovács[1], Ludevit Kádasi[4,2], Andrea Zaťková[4,2], Denisa Ilenčíková[1]

[1]2nd Department of Pediatrics Comenius University Medical School and Children's University Hospital, Bratislava, Slovakia, [2]Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovakia, [3]Department of Cancer Genetics, National Cancer Institute, Bratislava, Slovakia, [4]Laboratory of Genetics, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Bratislava, Slovakia.

Introduction

Neurofibromatosis type 1 (NF1; OMIM 162200), one of the most common autosomal dominant genetic disorders (incidence 1: 3000) is mostly a progressive disease with variable clinical manifestations, including neurological complications, such as central nervous system tumors. Optic nerve gliomas (ONG) are present in about 15% (1) patients with NF1 and in general, they are the most common low grade gliomas in childhood (2,3). They are mostly asymptomatic, only 5% develop symptoms such as visual impairment, or protrusion of the bulbus (4,5). We performed a study in Slovak patients in order to correlate clinical features of NF1 and genetic data. Our aim was to disclose a genotype-phenotype correlation of optic nerve glioma in NF1 patients as a promising prognostic tool for management of NF1 patients.

Materials and methods

In the present study, 164 patients with NF1 from the 2nd Department of Pediatrics in Children's University Hospital and adult patients from the Department of Clinical Genetics at National Cancer Institute in Bratislava underwent novel genetic testing and annual clinical review. Only patients meeting diagnostic criteria for neurofibromatosis type 1 were selected for genetic testing (6). We summarized the molecular and clinical data in order to find the correlation between mutation location and presence of optic glioma. The diagnosis of optic nerve glioma was based on the MRI of the brain. The classification of optic nerve gliomas was performed using newly proposed Modified Dodge Classification (MDC) (7), in order to determine the severity of ONG.

We established a diagnostic method based on the analyses of the entire region of NF1in cooperation with Faculty of Natural Sciences and National Cancer Institute. Two EDTA-blood samples were tested from each patient. One was used for RNA extraction, second sample was used for DNA extraction and confirmation of mutation found in cDNA (8). The entire coding region of the NF1 gene was PCR amplified from total cDNA in 5 overlapping fragments of approximately 2kb (covering exons 1 – 12 A, 10 A – 21, 19 A – 29, 28 – 38, 34 - 49). All fragments were analyzed first by gel electrophoresis, in order to identify shortened or longer fragments indicating splicing mutations (9,10). These fragments were subsequently sequenced using 18 specific sequencing primers and commercial sequencing kits using ABI sequencers. All mutations identified at cDNA level were confirmed in genomic DNA (8,9). In case that screening did not uncover any mutations, samples were analyzed using MLPA (multiple ligation dependent probe amplification) with NF1 microdeletion MLPA kit P122 from MRC Holland (11). In order to confirm, or exclude the presence of a microdeletion in the NF1 gene deletion, we used an interphase FISH analysis employing BAC probes neighboring NF1 gene (RP-1002G3, RP5-926B9) (6). Whole NF1 gene deletion was identified using MLPA kits P081 and P082 from MRC-Holland.

Results

We identified causal mutations in 51 Slovak patients with NF1. Patients were divided into two groups 1) with ONG (21 patients), 2) without ONG (30 patients).

All patients presented with café-au-lait spots. In the group with ONG patients, there was a significantly higher incidence of following features compared to the group without ONG: freckling (95% vs. 28,5%), brain hamartomas (71% vs. 23,3%) and neurofibromas (70% vs. 50%) and Lisch nodules (30% vs. 20%).

A half of mutations in the group with ONG were located in the first 5'tertile (first 16 exons) of the *NF1* gene. There were 15 novel mutations identified. We found three simple splicing mutations, single missense and single mutation causing premature stop codon. Five mutations were located in RAS-domain, and four in cAMPK domain. The rest of mutations were positioned in other constitutive exons. Three patients with the most severe form were found to have mutations in the exon 16 (in cAMPK domain). The mutational spectrum and clinical manifestation in the group without ONG was different. In the group without optic gliomas only 27% were distributed in the first 5'tertile of the *NF1* gene. 22 mutations have not been previously described. In RAS-domain there were 3 mutations identified, and 7 were found in cAMPK domain. The rest of mutations were positioned in other constitutive exones.

Discussion

This is the first report combining genetic and wide spectrum of clinical data focusing on presence of optic glioma in NF1 patients. Our data include information about the mutational spectrum in NF1 patients with and without ONG. Presented results show the clustering of mutations in the 5' tertile of *NF1* gene in patients with optic nerve glioma and sugguest the incidence of more NF1-disease features. To date in patients with neurofibromatosis type 1 only two genotype/phenotype correlations have been reported. The first clinical correlation relates to NF1 patients with large genomic deletion (12). Such patients present with a more severe disease status with more cutaneous neurofibromas then expected for their age, dysmorphic features and learning disabilities and higher risk of MPNSTs (13, 14). The second relates to a correlation between the presence of a 3bp (AAT) deletion in exon 17of the NF1 gene and the complete absence of neurofibroma development and a milder NF1 phenotype (15). Sharif and colleagues studied mutational status in 29 NF1 patients with optic nerve glioma and focused at mutation distribution without the assessment of other clinical features of NF1. His work sugguested clustering of mutations in the 5'tertile of the *NF1* gene in patients (16). Our data strongly support his findings and stress the predictive value of distribution of mutation in the this region to development of ONG.

Conclusion

Our results may contribute to a better prognosis prediction of optic nerve glioma in NF1 patients and hence improve the clinical management.

References

1. Lewis RA, Gerson LP, Axelson KA: von Recklinghausen neurofibromatosis, Incidence of optic glioma. Ophtalmology 1984; 91: 929-35.
2. Listernick R, Charow J, Greenwald MJ: Optic gliomas in children with neurofibromatosis type 1. J Pediatrics 1989; 114: 788-92.
3. Lund AM, Skovby F: Optic gliomas in children with neurofibromatosis type 1. European Journal of Pediatrics 1991; 150: 835-838.

4. Singhal S, Birch JM, Kerr B, Lashford L, Evans: Neurofibromatosis type 1 and sporadic optic gliomas. Arch Dis Child 2002; 87: 65-70.
5. Sharif S, Ferner R, Birch JM, Gillespie JE: Second primary tumors in neurofibromatosis 1 patients treated for optic gliomas: substantial risks after radiotherapy. J Clin Oncol 2006; 24: 2570-2575.
6. Gutmann, D.H., Aylsworth, A., Carey, J.C: The diagnostic evaluation and multidisciplinary mangement of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. JAMA 1997;278:51-57.
7. T. Taylor, T Jaspan, G Milano: Radiological classification of optic pathway gliomas: experience of a modified functional classification system. Brit J Radiol 2008; 81: 761-766.
8. Messiaen, L.M.: Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. Hum Mutat 2000;15: 541-555.
9. Wimmer, K., Eckart, M., Rehder, H., Fonatsch, C.: Illegitimate splicing of the NF1 gene in healthy individuals mimics mutation-induced splicing alterations in NF1 patients. Hum Genet 2000; 106: 311-313
10. Vandenbroucke, I. et al.: Genetic and clinical mosaicism in a patient with neurofibromatosis type 1. Hum Genet 2004; 114: 284-290
11. Messiaen, L., Wimmer, K.: NF1 Mutational Spectrum. in Neurofibromatoses, Vol. 16 (ed. Kaufman, D.L.) 63-77 (Karger, Basel, 2008)
12. Kayes LM, Burke W, Richardi VM: Deletions spanning the neurofibromatosis type 1 gene: identification of phenotype in five patients. Am J Hum Genet 1994; 54: 424-436
13. De Raedt T, Brems H, Wolkenstein P: Elevated risk for MPNST in NF1 microdeletion patients. Am J Hum Genet 2003; 72: 1288-1292.
14. Kluwe L, Fredrich RE, Peiper: Constitutional NF1 mutations in neurofibromatosis type 1 patients with malignant periferal nerve sheath tumors (MPNSTs). Hum Mutat 2003; 22:420.
15. Upadhyaya M, Huson SM, Davies M: An absence of cutaneous neurofibromas associated with 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c2970-2972 del AAT); evidence of a clinicaly signisficant NF1 phenotype correlation. Am J Hum Genet 2007; 80:140-151.
16. Sharif et al. Fahsold R.: A molecular analysis of individuals with neurofibromatosis type 1 (NF1) and optic pathway gliomas (OPGs), and assessment of a genotype-phenotype correlations. Am.J.Hum. Gen. 2000; 48: 256-260.

28. Súdnolekárske aspekty pádu/skoku z výšky vo vzťahu k požitiu psychoaktívnych látok.

MUDr. Martin Zdarilek
(patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Spoluautor: MUDr. Roman Kuruc
Školiteľ: doc. MUDr. Jozef Šidlo, CSc.
Ústav súdneho lekárstva LFUK, Bratislava

Úvod

Pád z výšky patrí medzi mechanické poranenia prevažne tupého charakteru. Ide o pohyb ľudského tela, pričom zraňujúci predmet ostáva nepohyblivý. Pohyb je priamočiary, rovnomerne zrýchlený a potenciálna energia tela sa premieňa na energiu kinetickú, ktorá sa po náraze na podložku v okamihu spotrebuje a vedie tak ku vzniku poranení (1).

Pády z výšky možno na základe príčiny rozdeliť do troch skupín: náhodný pád, samovražedný skok a zhodenie, teda vraždu. Náhodné pády z výšky sú často následkom zanedbania bezpečnostných predpisov pracovníkmi vykonávajúcimi práce vo výškach. Rizikovým faktorom pri prácach vo výškach je konzumácia alkoholu a iných psychoaktívnych látok.

Samovrah v snahe o uistenie sa, že jeho skok skončí smrteľnými a nezvratnými zraneniami, vyhľadáva vyššie budovy, strmé zrázy skál, veľké mosty či priepasti. Ideálnym miestom sa pre neho stávajú strechy budov a vyššie poschodia (1). Tento spôsob je v porovnaní s inými typmi samovrážd pomerne ojedinelý, avšak preferovaný ako metóda voľby najmä u starších ľudí (2). Vo väčšine prípadov si postihnutý otvorí okno, avšak nie je výnimkou ani skok cez sklenenú výplň zatvoreného okna (3).

Vražda zhodením z výšky nie je častá a spravidla sa ťažko dokazuje, najmä ak niet svedkov alebo na tele obete nie sú žiadne stopy predchádzajúceho zápasu (1). Pri pitve je potrebné pátrať po známkach vitality poranení, či nešlo o snahu zhodením z výšky zastrieť inú príčinu smrti (4). Je veľmi dôležité okrem pitevného nálezu a výsledkov toxikologického vyšetrenia brať do úvahy aj obhliadku miesta nálezu mŕtveho tela a anamnestické údaje o zdravotnom stave, psychiatrických ochoreniach a sociálnom zázemí nebohej osoby.

Požitie psychoaktívnych látok môže ovplyvniť správanie sa človeka po psychickej aj fyzickej stránke. Etanol pôsobí na centrálny nervový systém (CNS) ako narkotikum. Mierne dávky vyvolávajú príjemné uvoľnenie, stúpanie sebavedomia, stratu zábran. Úroveň pozornosti a schopnosti sústredenia sa klesá, zhoršuje sa koordinácia motoriky (5). Požitie alkoholu v kombinácii s niektorými psychofarmakami, napríklad benzodiazepínmi, má navzájom potencujúci účinok.

Psychoaktívne liečivá sú častejšie zistené pri suicidálnych skokoch z výšky než pri iných pokusoch o samovraždu. V mnohých prípadoch je prítomná anamnéza liečby psychiatrického ochorenia (6). Najčastejším nálezom sú zvýšené koncentrácie benzodiazepínov a antidepresív (3). Benzodiazepíny pôsobia tlmivým účinkom. Medzi ich psychické nežiaduce účinky patrí suicidium, medzi somatické ataxia a závrat (7). Častým nálezom je aj prítomnosť amfetamínov a metamfetamínov. Amfetamíny majú naopak psychostimulačný efekt na CNS a môžu mať až halucinogénne účinky. Ich vysoké dávky môžu u užívateľa spôsobiť exacerbáciu schizofrénie (8). Takmer v nijakom prípade nie sú zistené dávky požitých psychoaktívnych látok v smrteľných koncentráciách, či už ide o lieky, drogy alebo alkohol (6).

Metódy

Bola vykonaná retrospektívna analýza 797 pitevných protokolov prípadov úmrtí pitvaných v roku 2011 na Súdnolekárskom pracovisku Úradu pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou v Bratislave so zameraním na úmrtia následkom pádu/skoku z výšky. Vo všetkých prípadoch bola vykonaná pitva štandardnou metódou. V indikovaných prípadoch bola vykonaná toxikologická analýza so zameraním na zistenie prítomnosti etanolu, liečiv a iných psychoaktívnych látok v krvi. Ďalšími sledovanými parametrami boli pohlavie, vek, výška a príčina pádu, čas smrti a anamnestické údaje. V súbore prípadov úmrtí následkom skoku z výšky bolo hodnotené zanechanie listu na rozlúčku.

Výsledky

V analyzovanom súbore bolo zistených 30 prípadov úmrtí následkom pádu/skoku z výšky, čo predstavovalo 3,7 % všetkých pitvaných prípadov na Súdnolekárskom pracovisku v Bratislave v roku 2011. V 67 % prípadov išlo o mužov a v 33 % o ženy. Vekový interval bol v rozmedzí 16 až 91 rokov, pričom medián prestavoval vek 60 rokov. V 60 % prípadov išlo o skok z výšky na základe suicidálneho úmyslu, v 40 % išlo o náhodný pád z výšky. Vekový medián samovrahov predstavoval vek 64 rokov, 13 bolo mužov a 5 žien. Vekový medián zosnulých pri náhodnom páde z výšky bol 43 rokov, išlo o 7 mužov a 5 žien.

Priemerná výška pádu pri skoku bola 19 m s minimom 9 a maximom 40 metrov, pri náhodnom páde išlo o výšky od 9 do 19 metrov s priemerom 10 metrov. List na rozlúčku bol zanechaný v 11 % prípadov suicidálnych skokov z výšky.

Čas úmrtia pri náhodných pádoch z výšky bol v 75 % zaznamenaný v časovom intervale od 06:00 do 17:59 hod. a v 25 % od 18:00 do 05:59 hod. Smrť skokom z výšky si počas intervalu 06:00 – 17:59 hod. privodilo až 89 % postihnutých.

Vyšetrenie na prítomnosť etanolu v krvi bolo vykonané v 26 prípadoch, v 8 prípadoch bola potvrdená prítomnosť etanolu, čo predstavuje hodnotu 31 %. Pri náhodnom páde z výšky bola prítomnosť etanolu v krvi zistená v 44% a pri skokoch z výšky v 23 % prípadov.

Testy na prítomnosť psychoaktívnych liečiv boli vykonané v 63 % prípadov. Pri náhodných pádoch z výšky bol pozitívny výsledok zistený v 14 % vykonaných testov. V skupine samovražedných skokov z výšky bol výsledok pozitívny v 50 % testovaných vzoriek, z toho v 67 % prípadov boli zistené benzodiazepíny a v 33 % prípadov amfetamíny a metamfetamíny. V jednom prípade bola zistená kombinácia benzodiazepínov a antidepresíva citalopramu. V 50 % prípadov skokov z výšky, pri ktorých bola potvrdená prítomnosť benzodiazepínov, bolo súčasne potvrdené aj požitie etanolu.

V 28 % prípadov skoku z výšky bol prítomný anamnestický údaj duševnej choroby alebo sucidálneho pokusu v minulosti. Pri náhodných pádoch takéto zistenie nebolo prítomné.

Diskusia

V literatúre sa opisuje vzájomná súvislosť medzi výškou pádu a úmyslom skoku z tejto výšky. Bolo dokázané, že vyššie budovy sú preferovanejšie pri skokoch z výšky so samovražedným úmyslom (6). Výsledky analýzy korelujú s údajmi v literatúre. Priemerná výška pádu pri skoku bola 19 metrov, pri náhodných pádoch sa pohybovala priemerne na úrovni 10 metrov nad dopadovou podložkou.

Väčšina prípadov smrteľných pádov z výšky je podľa literatúry na podklade samovražedného úmyslu (6). V sledovanom súbore sa tento predpoklad potvrdil. O samovraždu išlo v 60% prípadov.

Starší ľudia v kategórii nad 65 rokov sa podľa štúdií pokúšajú o samovraždu menej často ako mladšie vekové skupiny, zato sú ale v týchto pokusoch úspešnejší. Samovražda skokom z výšky je v porovnaní s inými samovraždami skôr ojedinelý spôsob ako ukončiť svoj život, avšak preferovaný ako metóda voľby práve u starších ľudí (2). Vekový medián v skupine prípadov skoku z výšky bol 64 rokov. Najstarším samovrahom bol 91 ročný muž. Iba 4 nebohí (22 %) mali vek pod 50 rokov.

Pracovné úrazy vznikajú najmä v pracovnej dobe, samovraždy sú podľa literatúry páchané najmä večer a v noci (6). V sledovanom súbore si smrť skokom z výšky privodilo 89 % ľudí v čase od 06:00 do 17:59 hod. a len 11 % v časovom intervale 18:00 až 05:59 hod.

List na rozlúčku býva menej často prítomný pri samovražde skokom než pri iných typoch samovrážd. Zanechaný je v cca 10 – 25 % prípadov (3). V súbore skokov z výšky bol list na rozlúčku zanechaný v 11 % prípadov.

Pri samovraždách je podľa literatúry v mnohých prípadoch potvrdená anamnéza psychiatrického ochorenia. Jedným z najčastejších toxikologických nálezov sú zvýšené koncentrácie benzodiazepínov a antidepresív (6, 3). V skupine skokov z výšky bol anamnestický údaj liečenia na psychiatrii alebo sucidálneho pokusu v minulosti v 28 % prípadov. Toxikologické nálezy v sledovanom súbore korelujú s literárnymi údajmi. V 67 % pozitívnych výsledkov išlo o prítomnosť benzodiazepínov, v 33 % prípadov o prítomnosť amfetamínov a metamfetamínov. V jednom prípade bola prítomnosť benzodiazepínov zaznamenaná súčasne s nálezom antidepresíva.

Výsledok testu na zistenie etanolu v krvi metódou plynovej chromatografie do hodnoty 0,20 g/kg (promile) nie je hodnotiteľný, táto koncentrácia sa považuje za nepresvedčivú (9).

V rámci viacerých štúdií bol etanol stanovený v 15-20 až 35 % prípadov, s rovnakým podielom medzi náhodnými pádmi a samovraždami skokom z výšky (6). Hodnoty etanolu v krvi vyššie ako 0,20 g/kg boli v sledovanom súbore zistené v 31 % prípadov, čo koreluje s údajmi z literatúry. Pri náhodnom páde z výšky bola zistená prítomnosť etanolu v krvi v 44 % prípadov, čo predstavuje približne dvojnásobok počtu prípadov v porovnaní so skokmi z výšky (23 %).

Použitá literatúra

1. Kováč P.: Súdne lekárstvo pre právnikov, Iura edition, Bratislava. 2005, 195-198.
2. Bennett A.T., Collins K.A.: Elderly suicide: a 10-year retrospective study. The American journal of forensic medicine and pathology 2001, 22, 169–172.
3. Gill JR.: Fatal descent from height in New York City. 2001, Journal of Forensic Sciences 46: 1132-1137.
4. Mego M.: Súdne lekárstvo I., PSYCHOPROF, Nové Zámky. 2001, 119-121.
5. Balíková M.: Forenzní a klinická toxikologie, Praha, Galén. 2004
6. Turck E.E.: Pathologic Features of Fatal Falls From Height. The American journal of forensic medicine and pathology official publication of the National Association of Medical Examiners 2004, 25, 194-199.
7. Kriška M. a spol.: Memorix klinickej farmakológie a liekov , Bratislava, SAP. 2006, 501-503.
8. Marek J. a spol.: Farmakoterapie vnitrnich nemoci, Praha, GRADA. 2010, 707.
9. Hirt M., Lacina P., Krejzlík Z., Mráz J.: Etanol. In Vorel F. a spol.: Soudní lékárství, Praha, Grada Publishing. 1999, 532-533.

29. Analýza DNA ploidie laserovou skenovacou cytometriou a expresia HER2 a hormonálnych receptorov v karcinóme prsníka

RNDr. Miroslava Vallová
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautor: RNDr. Peter Kuliffay, PhD.
Školiteľ: Prof. MUDr. Štefan Galbavý, DrSc.
Ústav patológie Slovenskej zdravotníckej univerzity a Onkologického ústavu sv. Alžbety, Bratislava

Úvod

Objektívne stanovenie prognostických a prediktívnych markerov u pacientov s karcinómom prsníka hrá dôležitú úlohu vo výbere vhodnej terapie a v stanovení prognózy. Keďže nádory s podobnou morfologickou charakteristikou majú odlišný klinický priebeh, hľadajú sa stále lepšie metódy, ktoré by pomohli spresniť prognózu a vybrať cielenú terapiu. Jednou z nových metód v histopatologickej diagnostike nádorov je laserová skenovacia cytometria (LSC), ktorá umožňuje skúmať biologické vlastnosti nádorových buniek a objektívne kvantifikovať bunkové subpopulácie (1). Nové molekulové metódy umožňujú rozdeliť nádory na základe génovej expresie na niekoľko molekulových podtypov, a to na luminálny A, luminálny B, HER2, bazálny a normálnemu tkanivu prsníka podobný podtyp. Pomocou imunohistochemického stanovenia estrogénových (ER) a progesterónových (PR) receptorov, HER2 a Ki67 je možné identifikovať jednotlivé molekulové podtypy karcinómu prsníka. Nádory ER/PR pozitívne, HER2 negatívne a s nízkou expresiou Ki67 (<14%) budú luminálny A podtyp, ER/PR+, HER2- s vysokou expresiou Ki67 (>14%) luminálny B podtyp, ER/PR-, HER2+ budú HER2 podtyp a ER/PR-, HER2- bazálny (*triple* negatívny) podtyp (2, 3).

V práci sme sa zamerali na hľadanie súvislostí medzi hodnotami S-fázy a DNA indexu, získaných cytometrickou analýzou obsahu DNA a statusom estrogénových a progesterónových receptorov, expresie HER2, Ki67 a p53.

Materiál a metódy

Na analýzu sme použili 140 vzoriek karcinómu prsníka (113 vzoriek s invazívnym duktálnym karcinómom, 11 s invazívnym lobulárnym karcinómom, 16 s iným histologickým typom). Nefixované vzorky tkaniva získané z operačného materiálu sme mechanicky dezintegrovali pomocou čepele žiletky a pripravili sme monocelulárnu suspenziu buniek podľa metódy Kuliffayho et al. (4), ktorú sme imobilizovali na podložné sklo v cytocentrifúge. Bunky sme potom fixovali v metanole a zafarbili monoklonálnou protilátkou proti cytokeratínu konjugovanou s FITC (CK-FITC) (klón CK3-6H5, Miltenyi Biotec, Nemecko, riedenie 1:10) a propídium jodidom (PI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 5 µg/ml). Zafarbené vzorky buniek sme opláchli v PBS, montovali do čistého glycerínu a následne analyzovali pomocou laserového skenovacieho cytometra (CompuCyte Inc., Cambridge, MA) so softvérom WinCyte verzia 3.7. Z nameraných údajov o celej populácii buniek sme v bodovom grafe ohraničili populáciu CK+ buniek, ktoré sme považovali za nádorové bunky.

Na stanovenie ER, PR, HER2, Ki67 a p53 sme použili imunohistochemickú metódu na parafínových rezoch s monoklonálnymi protilátkami firmy Dako (Dánsko) proti ER (1D5, 1:60), PR (PgR 636, 1:50), HER2 (HercepTest kit), Ki67 (MIB-1, 1:110), p53 (DO-7, 1:60) a polymérový vizualizačný systém s chromogénom diaminobenzidínom (Dako REAL EnVision). Za pozitivitu ER, PR, Ki67 a p53 sme považovali jadrové farbenie vo viac ako 10% buniek. Ako HER2 pozitívny sme hodnotili výsledok reakcie 3+ a pri intenzite 2+ sme pozitivitu overili metódou FISH (PanPath Rembrandt FISH Her2/neu-Cen 17).

Na porovnanie hodnôt DNA indexu, S-fázy a imunohistochemických parametrov sme použili Pearsonov χ^2 test a hodnotu $p < 0,05$ sme považovali za štatisticky významný vzťah.

Výsledky

V analyzovanom súbore prevažnú časť tvorili nádory s aneuploidným obsahom DNA (51,9%) a so strednou a vysokou hodnotou S-fázy (40,0% a 37,8%). Medzi hodnotami DNA indexu a S-fázy sme zistili štatisticky významný vzťah (p=0,025). Nádory s vyšším obsahom DNA mali vyššiu frakciu S-fázy (Tab. 1).

Tab. 1: Cytometrické charakteristiky nádorov

		S-fáza			**n**
		nízka ≤ 5,0%	stredná 5,1–10,0%	vysoká > 10,1%	
DNA index	hypodiploidný (≤ 0,95)	5 (33,3%)	7 (46,7%)	3 (20,0%)	15
	diploidný (0,96 – 1,04)	13 (37,1%)	15 (42,9%)	7 (20,0%)	35
	aneuploidný (1,05 – 1,99)	11 (15,7%)	26 (37,1%)	33 (47,2%)	70
	tetraploidný/hypertetraploidný/ multiploidný (≥ 2,00)	1 (6,7%)	6 (40,0%)	8 (53,3%)	15

Na základe prítomnosti hormonálnych receptorov a expresie HER2 a Ki67 sme nádory rozdelili do piatich skupín (Tab. 2).

Tab. 2: Molekulové podtypy a cytometrické parametre

	ER/PR+ HER2- Ki67 <14% (luminálny A)	**ER/PR+ HER2- Ki67 >14% (luminálny B)**	**ER/PR+ HER2+ (luminálny HER2+)**	**ER/PR- HER2+ (HER2+)**	**ER/PR- HER2- (*triple* negatívny)**
DNA index					
hypodiploidný	6 (13,9%)	5 (12,5%)	0	2 (18,2%)	2 (6,9%)
diploidný	12 (27,9%)	8 (20,0%)	2 (14,3%)	1 (9,1%)	12 (41,4%)
aneuploidný	22 (51,2%)	26 (65,0%)	9 (64,3%)	5 (45,4%)	9 (31,0%)
tetraploidný/ hypertetraploidný/ multiploidný	3 (7,0%)	1 (2,5%)	3 (21,4%)	3 (27,3%)	6 (20,7%)
n	43	40	14	11	29
S-fáza					
nízka	14 (32,6%)	11 (28,9%)	4 (28,6%)	0	1 (3,4%)
stredná	20 (46,5%)	14 (36,8%)	4 (28,6%)	2 (18,2%)	14 (48,3%)
vysoká	9 (20,9%)	13 (34,3%)	6 (42,8%)	9 (81,8%)	14 (48,3%)
n	43	38	14	11	29

Frekvencia abnormálneho obsahu DNA mala štatisticky významný vzťah so statusom estrogénových (p=0,009) a progesterónových receptorov (p=0,026). Frakcia S-fázy bola signifikantne vyššia pri ER a PR negatívnych nádoroch (p=0,002). HER2 pozitívne nádorové bunky vykazovali vyššiu proliferáciu vyjadrenú vyššou hodnotou S-fázy (p=0,039). Nádory neexprimujúce hormonálne receptory ani HER2

mali prevažne aneuploidný obsah DNA a strednú až vysokú hodnotu S-fázy. Populácie nádorových buniek so strednou a vysokou hodnotou S-fázy viac exprimovali Ki67 a p53 (p=0,039, p=0,032).

Diskusia

Už niekoľko rokov je analýza bunkového cyklu a obsahu DNA oblasťou záujmu a intenzívneho štúdia nádorových buniek. Súčasné poznatky naznačujú, že u väčšiny solídnych nádorov abnormálny obsah DNA (aneuploidia) a vysoké percento S-fázy môžu mať významnú prognostickú hodnotu a je spojené s agresívnejším správaním tumoru (5,6).

Nádory s aneuploidným obsahom DNA majú podľa literárnych údajov signifikantne vyššie hodnoty S-fázy (7,8). Tieto údaje potvrdila aj analýza nášho súboru pacientiek laserovou skenovacou cytometriou.

Negativita estrogénových a progesterónových receptorov má vyššiu frekvenciu s aneuploidným obsahom DNA a tiež s vyššou proliferáciou nádoru (7). V našom súbore mali zhodne najvyššie hodnoty S-fázy ER/PR-/HER2- a ER/PR-/HER2+ populácie nádorových buniek. Sarode et al. (9) porovnávali expresiu ER, PR, HER2, Ki67, p53 a DNA ploidiu vo vzťahu k molekulovým podtypom. Pre *triple* negatívny a HER2 podtyp bola charakteristická DNA aneuploidia, vysoká expresia Ki67 a p53 v porovnaní s luminálnym podtypom.

Stanovenie obsahu DNA a frakcie S-fázy môže pomôcť v klasifikácii nádorov prsníka a poskytuje dôležitú prognostickú informáciu. V kombinácii s ďalšími biomarkermi môže pomôcť pri hľadaní vhodnej cielenej liečby.

Použitá literatúra

1. Galbavy S, Kuliffay P. Laser scanning cytometry (LSC) in pathology - a perspective tool for the future? Bratisl Lek Listy 2008; 109 (1): 3-7.
2. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. Mod Pathol 2010; 23: 60-64.
3. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst 2009; 101: 736-750.
4. Kuliffay P, Sanislo L, Galbavy S. Chromatin texture, DNA index, and S-phase fraction in primary breast carcinoma cells analysed by laser scanning cytometry. Bratisl Lek Listy 2010; 111 (1): 4-8.
5. Yildirim-Assaf S, Coumbos A, Hopfenmüller W, Foss HD, Stein H, Kühn W. The prognostic significance of determining DNA content in breast cancer by DNA image cytometry: the role of high grade aneuploidy in node negative breast cancer. J Clin Pathol 2007; 60: 649-655.
6. Munteanu D, Zlei M, Ailiesei O, Chifu C, Diaconu C, Carasevici E. Flow cytometric evidence of DNA ploidy in human breast cancer. J Prev Med 2004; 12 (3-4): 59-65.
7. Chassevent A, Jourdan ML, Romain S, Descotes F, Colonna M, Martin PM, Bolla M, Spyratos F. S-phase fraction and DNA ploidy in 633 T1T2 breast cancers: a standardized flow cytometric study. Clin Cancer Res 2001; 7: 909-917.
8. Prasad AR, Divine G, Zarbo RJ. Two-color, cytokeratin-labeled DNA flow cytometric analysis of 332 breast cancers lack of prognostic value with 12-year follow-up. Arch Pathol Lab Med 2001; 125: 364-374.
9. Sarode VR, Han JS, Morris DH, Peng Y, Rao R. A Comparative analysis of biomarker expression and molecular subtypes of pure ductal carcinoma in situ and invasive breast carcinoma by image analysis: relationship of the subtypes with histologic grade, Ki67, p53 overexpression, and DNA ploidy. Int J Breast Cancer 2011; ID 217060, 7p.

30. Expresia proteínu poly(ADP-ribóza)polymerázy-1 v testikulárnych nádoroch zo zárodočných buniek.

MUDr. Zuzana Čierna[1]
(patologická anatómia)

Spoluautori: Michal Mego[2,3,5] , Daniela Svetlovská [3,5], Dušan Macák [4], Katarína Macháleková [4], Viera Miškovská [4], Michal Chovanec [2,3,5], Vanda Ušáková [4], Jozef Mardiak [2,5]
Školiteľ: prof. MUDr. Pavel Babál, PhD[1]
[1]Ústav patologickej anatómie LFUK, Bratislava, [2] II. onkologická klinika LFUK, Bratislava, [3]Jednotka translačného výskumu LFUK, Bratislava, [4]Onkologický ústav sv.Alžbety, Bratislava,. [5]Národný onkologický ústav, Bratislava

Úvod:

Nádory semenníkov zo zárodočných buniek sú typicky nádory mladých dospelých (1). Vo väčšine prípadov sú výrazne chemosenzitívne, s možnosťou vyliečenia aj v metastatickom štádiu. No u malého percenta pacientov sa vyskytne recidíva ochorenia. Novou skupinou sľubných protinádorových liečiv sa javia inhibítory PARP, či už v monoterapii, alebo v kombinácii s chemoterapiou a rádioterapiou (2). PARP inhibítory zvyšujú cytotoxický efekt agensov poškodzujúcich DNA (2).

Poly(ADP-ribóza)polymeráza-1 (PARP1) je jadrový enzým patriaci do rodiny reparačných enzýmov jednovláknových zlomov DNA cestou excíznej opravy báz, jedného z kľúčových reparačných systémov bunky. PARP syntetizuje a prenáša ADP-ribóza polyméry na glutamátové, aspartátové alebo lyzínové zvyšky proteínov za využitia NAD+ ako substrátu (3). PARP inhibítory súťažia s NAD+ o väzobné miesto na PARP enzýme.

Expresia PARP doteraz nebola sledovaná u nádorov semeníkov. Cieľom našej práce bolo stanovanie expresie PARP1 u pacientov s rôznymi typmi testikulárnych nádorov z germinatívnych buniek a v tkanive semenníkov bez nádoru. Výsledky expresie PARP1 sme korelovali s klinicko - patologickými dátami pacientov. Do úvahy sme brali vek pacienta, histologický typ nádoru, klinické štádium ochorenia, miesto a počet metastáz a podávanie systémovej liečby.

Materiál a metódy:

Pacienti:

Do retrospektívnej štúdie sme zahrnuli 124 pacientov s nádormi zo zárodočných buniek, 114 prípadov s primárnym testikulárnym nádorom a 10 s extragonadálnym nádorom zo zárodočných buniek. Išlo o pacientov identifikovaných z databázy Národného onkologického ústavu v Bratislave, ktorí boli liečení systémovou liečbou od januára 2000 do decembra 2010.

Spracovanie vzoriek tkaniva:

Formalínom fixované a v parafíne zaliate bioptické vzorky spracované metódou microarray boli narezané na 5 µm hrubé rezy. Po deparafinizácii rezov štandardným postupom, vyblokovaní endogénnej peroxidázovej aktivity, bez revitalizácie, boli preparáty premyté vo fosfátmi pufrovanom fyziologickom roztoku (10 mM PBS; pH 7,2) 3x5 minút. Nasledovne sa rezy inkubovali s primárnou protilátkou riedenou 1:500 120 minút pri izbovej teplote. Na detekciu proteínu PARP1 bola použitá monoklonálna protilátka proti PARP1/2 (H-250, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Po inkubácii boli vzorky opäť premyté v pufrovanom roztoku 3x5 minút. Na detekciu primárnej protilátky bola použitá kombinovaná proti králičia/proti myšacia sekundárna protilátka (Histofine anti-mouse and rabbit, Nichirei Biosciences, Japan). Rezy sa inkubovali so sekundárnou protilátkou 30

minút pri izbovej teplote, následne boli premyté v PBS 3x5 minút. Na vizualizáciu reakcie bol použitý 3,3‘-diaminobenzidín (DAB, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) po dobu 5 minút. Rezy boli nakoniec krátko dofarbené hematoxylínom, zaliate do akrylového média a prikryté krycím sklíčkom.

Hodnotenie expresie PARP1:

Expresiu PARP1 sme hodnotili metódou stanovenia multiplikačného skóre (multiplicative quickscore - QS), pričom sme brali do úvahy percento pozitívnych buniek aj intenzitu pozitivity. Podľa percenta pozitívnych buniek bola priradená hodnota od 1 do 6 (1 = 1–4%; 2 = 5–19%; 3 = 20–39%; 4 = 40–59%; 5 = 60–79%; 6 = 80–100%). Podľa priemernej pozitivity zafarbených buniek bola priradená hodnota od 0 do 3 (0 = negatívne; 1 = slabá pozitivita, 2 = stredná pozitivita, 3 = silná pozitivita). QS sme vypočítali vynásobením hodnoty percenta pozitívnych buniek hodnotou intenzity pozitivity, s minimálnou hodnotou QS 0 a maximálnou 18. Na základe QS sme jadrovú expresiu PARP1 hodnotili ako nízku (0–9) alebo vysokú (10–18).

Štatistické hodnotenie:

Pri analýze rozdielnej distribúcie PARP1 expresie medzi dvoma skupinami pacientov sme použili Mann–Whitney *U* test a medzi viac ako dvoma skupinami Kruskal–Wallisov test. Fisherov exaktný test resp. Chi-kvadrátový test boli použité pri hodnotení PARP1 expresie ako binárnej premennej (nízka vs. vysoká PARP1 expresia). Kaplan-Meierovu metódu sme použili pri analýze prežívania pacientov. Všetky hodnoty *P* boli dvojstranné. Pre všetky štatistické analýzy, $P < 0.05$ bolo považované za signifikantné.

Výsledky:

Do súboru bolo zaradených 124 pacientov vo veku od 17 do 67 rokov, s priemerným vekom 29 rokov. U 116 pacientov bol nádor vyšetrený pred podávaním chemoterapie (z toho u 6 pacientov boli odobraté vzorky z retroperitoneálnych lymfatických uzlín aj po chemoterapii) a u 8 pacientov sme mali k dispozícii len vzorky nádorového tkaniva po chemoterapii. Išlo o tkanivo z lymfatických uzlín odstránené retroperitoneálnou lymfadenektómiou po skončení prvolíniovej chemoterapie. Zo 116 nádorov pred liečbou bolo 108 primárnych testikulárnych nádorov, 6 extragonadálnych retroperitoneálnych a 2 extragonadálne mediastinálne nádory.

V I. štádiu, bez vzdialených metastáz bolo diagnostikovaných 33 pacientov, u 91 pacientov sa vyskytli metastázy na jednom, alebo viacerých miestach (89 pacientov malo postihnuté retroperitoneum, 21 mediastínum, 28 pľúca a 14 malo viscerálne non-pulmonálne metastázy).

Podľa IGCCCG (International Germ Cell Concensus Classification Group) boli pacienti rozdelení do skupiny s dobrou prognózou (n=82), intermediárnou prognózou (n=17) a zlou prognózou (n=25).

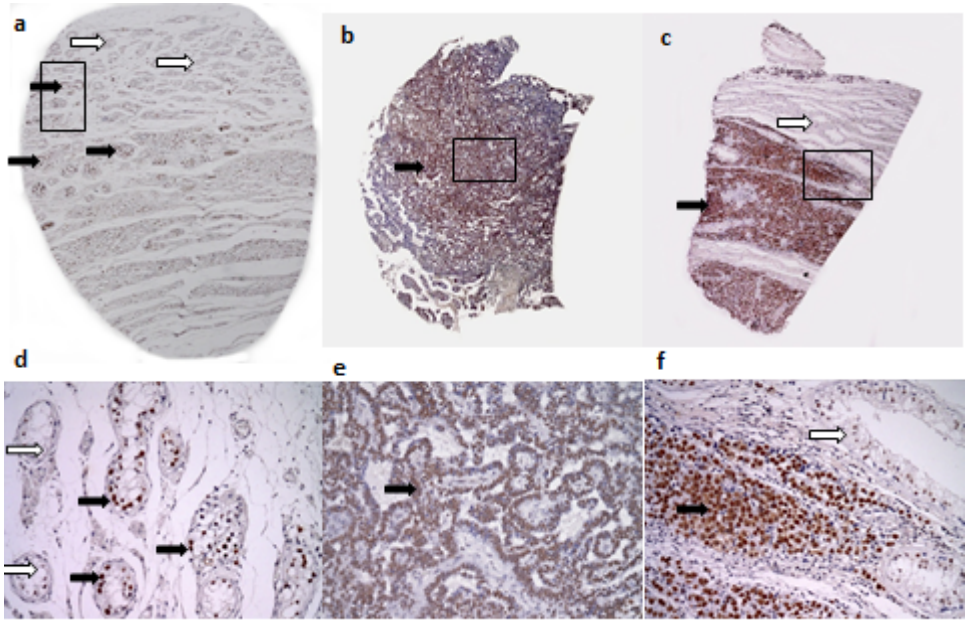
Na histologické podtypy boli vzorky rozdelené podľa klasifikácie Svetovej zdravotníckej organizácie z roku 2004. V 24 prípadoch išlo o čistý seminóm, v 60 prípadoch o čisté neseminomatózne germinatívne nádory (embryonálny karcinóm - 43, nádor žĺtkového vaku - 10, choriokarcinóm - 1, nezrelý teratóm - 6). V 32 prípadoch išlo o zmiešané testikulárne germinatívne nádory.

Zistili sme vyššiu expresiu PARP1 v germinatívnych nádoroch testes v porovnaní s normálnym testikulárnym tkanivom (priemerné QS = 10,04 vs. 3,60, $p < 0,0000001$). Priemerné QS ± SD pre každý histologický podtyp bol nasledovný: intratubulárna neoplázia zo zárodočných buniek (ITGCN) = 18,00 ± 0,00, embryonálny karcinóm = 9,62 ± 5,64, seminóm = 9,74 ± 6,51, nádor žĺtkového vačku = 7,8 ± 7,20, teratóm = 5,87 ± 5,34 a choriokarcinóma = 4,50 ± 8,33. Zvýšená expresia PARP1 (QS > 9) bola najčastejšie pozorovaná v ITGCN (100% vzoriek s PARP1 overexpresiou), seminóm (52,6%), embryonálny karcinóm (47,0%), nádor žĺtkového vačku (33,3%), teratóm (26,7%) a choriokarcinóm (25,0%), v porovnaní k 1,9% vzoriek normálneho tkaniva testes (Obr. 1).

Zo šiestich nádorov odoberaných po liečbe u pacientov, ktorí boli vyšetrení aj pred chemoterapiou, v dvoch prípadoch sme vo vzorke našli len nekrózu a fibrózu. V ostatných

prípadoch bola expresia PARP1 v nádoroch pred liečbou a po liečbe porovnateľná. Nezistili sme žiadnu koreláciu medzi expresiou PARP1 a klinickými dátami pacientov.

Medián sledovania pacientov bol 53,7 mesiacov (0,5 – 180,6 mesiacov). Celkové 5-ročné prežívanie pacientov bolo 83,7% (95% CI: 76,8%- 90,7%). Pacienti s vysokou expresiou PARP-1 v primárnom nádore mali nesignifikantne lepší čas prežívania v porovnaní s pacientami s nízkou expresiou PARP-1, hazard ratio 0,53, 95% CI (0,22 – 1,28), p= 0,17.



Obrázok 1. Jadrová expresia PARP-1proteínu v normálnych a nádorových tkanivách testes. a,d) ITGCN so silnou jadrovou PARP-1 pozitivitou (čierne šípky) a susedné normálne testikulárne tkanivo PARP1 negatívne (biele šípky), b,e) nádor žĺtkového vačku so silnou jadrovou PARP-1 pozitivitou (čierna šípka), c,f) seminóm so silnou jadrovou PARP-1 pozitivitou (čierna šípka) a susedné normálne testikulárne tkanivo PARP1 negatívne alebo so slabou PARP1 pozitivitou (biela šípka). DAB, podfarbené hematoxylinom; a), b), c) x 25, d), e), f) zväčšenie vyznačenej oblasti x 200.

Diskusia:

Výsledky viacerých štúdií ukazujú, že PARP inhibítory môžu mať veľmi široké terapeutické využitie v protinádorovej liečbe, pričom selektívne pôsobia na nádorové bunky a nemajú vplyv na zdravé tkanivo (4). Zdá sa, že PARP inhibítory sú účinné u pacientiek s karcinómom prsníka a ovárií s mutáciou v géne BRCA1 alebo BRCA2 (5). BRCA1 a BRCA2 sú tumor supresorové gény, ktorých mutácia vedie k nemožnosti DNA reparácie cestou homológnej rekombinácie. Za normálnych okolností nastupuje reparácia DNA cestou aktivácie PARP. Inhibícia PARP zablokuje DNA reparáciu a vedie k apoptóze bunky (6).

Prebiehajú viaceré štúdie sledujúce účinok PARP inhibítorov v kombinácii s chemoterapiou v rôznych typoch nádorov (7). Zatiaľ nie je jasné, ktorí pacienti sú vhodní pre liečbu PARP inhibítormi. V literatúre sa objavili výsledky sledovania jadrovej expresie PARP v karcinóme prsníka (8), kolorektálnom karcinóme (9) a melanóme (10). Výsledky prác ukazujú na asociáciu medzi stupňom expresie PARP a odpoveďou na liečbu PARP inhibítormi.

Doteraz neboli publikované údaje o sledovaní expresie PARP v germinatívnych testikulárnych nádoroch. V našej štúdií sme prvýkrát ukázali, že PARP1 je zvýšene exprimovaný v nádoroch semeníkov v porovnaní so zdravým tkanivom. Pozorovali sme tiež vysokú expresiu PARP1 vo

všetkých prípadoch intratubulárnej neoplázie, na základe čoho predpokladáme, že zvýšená expresia PARP1 je včasná udalosť v karcinogenéze germinatívnych testikulárnych nádoroch. Domnievame sa, že proteín PARP1 by mohol byť cieľovou molekulou v liečbe pacientov s nádormi semenníkov zo zárodočných buniek. Vyšetrenie expresie PARP1 v nádorovom tkanive môže vyselektovať pacientov vhodných pre liečbu PARP inhibítormi.

Grant 2007/30-NOU-01 a VEGA 1/0724/11

Použitá literatúra

1. Ondrusova M, Ondrus D. Epidemiological features of testicular cancer in the Slovak Republic--retrospective study. Klin Onkol. 2009;22(2):52-7.
2. Sandhu SK, Yap TA, de Bono JS: Poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors in cancer treatment: A clinical perspective. Eu J Cancer 2010;46:9-20.
3. Yelamos J, Farres J, Llacuna L, Ampurdanes C, Martin-Caballero J: PARP-1 and PARP-2: New players in tumour development. Am J Cancer Res 2011;1(3):328-346.
4. Zaremba T, Curtin NJ: PARP inhibitor development for systemic cancer targeting. Anti-Cancer Agents Med Chem 2007;7:515-523.
5. von Minckwitz G, Muller BM, Loibl S a spol: Cytoplasmic poly(adenosine diphospate-ribose)polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol 2011;29(16):2150-2157.
6. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG: PARP inhibition: PARP1 and beyond. Nature Reviews Cancer 2010;10:293-301.
7. Calvert H, Azzariti A. The clinical development of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. Ann Oncol 2011;22,Suppl 1:153-159.
8. Domagala P, Huzarski T, Lubinski J, Gugala K, Domagala W. PARP-1 expression in breast cancer including BRCA1-associated, triple negative and basal-like tumors: possible implications for PARP-1 inhibitor therapy. Breast Cancer Res Treat. 2011;127(3):861-869.
9. Nosho K, Yamamoto H, Mikami M a spol: Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the early stage of colorectal carcinogenesis. Eur J Cancer 2006; 42:2374–2381.
10. Csete B, Lengyel Z, Kadar Z, Battyani Z: Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase-1 expression in cutaneous malignant melanomas as a new molecular marker of aggressive tumor. Pathol Oncol Res 2009;15:47–53.

31. Fragmentácia DNA a jej vplyv na meranie koncentrácie DNA bežne používanými metódami

Mgr. Tatiana Sedláčková[1]
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Gabriela Repiská[1], Gabriel Minárik[1, 2, 3]
Školiteľ: RNDr. Gabriel Minárik, PhD.
[1]Ústav molekulárnej biomedicíny, LF UK, Bratislava, [2]Geneton s.r.o., Bratislava, [3]Katedra molekulárnej biológie, Prif UK, Bratislava

Úvod

Cirkulujúce nukleové kyseliny sú aktuálne skúmané z hľadiska možnej diagnostiky onkologických chorôb, ale aj vo vzťahu k patogenéze preeklampsie. Dôležitou charakteristikou cirkulujúcich nukleových kyselín je ich fragmentácia, ale aj nízka koncentrácia. Bežne používanými metódami merania koncentrácie DNA sú zhodnotenie intenzity bandov na agarózovom géli, meranie fluorescencie pomocou rozličných DNA viažucich farbičiek a meranie absorbancie pri 260 nm (1), pričom najčastejšie používanou je práve posledná spomenutá metóda (2,3). Nevýhodou tejto metódy je, že meranie absorbancie pri 260 nm zahŕňa v sebe dvojvláknovú aj jednovláknovú DNA, oligonukleotidy a voľné nukleotidy, nerozlišuje medzi DNA a RNA a má nízku senzitivitu (2,4), zatiaľ čo fluorescenčné farbičky selektívne merajú len dvojvláknovú DNA (4). Najčastejšie používanými fluorescenčnými farbičkami sú Hoechst 33258 a PicoGreen®. Farbička Hoechst 33258 umožňuje detekciu a kvantifikáciu DNA až do koncentrácie 10 ng/ml (5). Meranie koncentrácie s použitím farbičky PicoGreen® je ešte senzitívnejšie, pretože jeho fluorescencia po naviazaní na dvojvláknovú DNA (dsDNA) stúpa viac ako tisícnásobne (4,6), čo umožňuje detekciu dsDNA až do koncentrácie 25 pg/ml (4). Nevýhodou je, že meranie koncentrácie pomocou fluorescenčných farbičiek podhodnocuje koncentráciu dvojvláknovej DNA s veľkosťou menšou ako 23 kb (2). Cieľom našej práce bolo zistiť, či má úroveň fragmentácie DNA vplyv na meranie koncentrácie DNA.

Materiál a metódy

Vzorky venóznej krvi pochádzajúce od 10 zdravých ľudí boli odobraté do odberovej súpravy BD Vacutainer®, do skúmaviek s antikoagulačným činidlom K_3EDTA. Z týchto vzoriek bola izolovaná DNA pomocou QIAamp DNA Blood Mini Kitu podľa priloženého protokolu, pričom vzorky boli na záver eluované v 150 µl elučného pufru. Každá vzorka bola izolovaná v troch alikvótach, ktoré boli zmiešané. Tieto vzorky boli fragmentované ultrazvukom, použitím prístroja Covaris S220 v mikroskúmavkách s objemom vzorky 130 µl. Rozlične dlhé fragmenty DNA boli získané použitím rôznych podmienok počas fragmentácie ultrazvukom. Tieto podmienky sú uvedené v tabuľke 1. Na overenie fragmentácie DNA bola použitá 1,5% agarózová elektroforéza. Ako marker molekulovej hmotnosti bol použitý GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder od firmy Fermentas. Vo výsledku bola každá vzorka v štyroch rôznych dĺžkach: nefragmentovaná, 1500 bp, 500 bp a 150 bp. Boli spravené desiatkové riedenia týchto vzoriek (10, 100 a 1000x riedené vzorky) a zmeraná koncentrácia. Koncentrácia DNA bola meraná tromi rôznymi metódami: meraním absorbancie pri 260 nm, použitím fluorescenčnej farbičky PicoGreen® a pomocou qPCR. Meranie absorbancie bolo prevedené na prístroji NanoDrop ND-1000 v 1 µl vzorky. Na kvanfitikáciu DNA pomocou fluorescenčnej farbičky bol použitý Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagents and Kits od firmy Invitrogen™. Meranie koncentrácie bolo spravené podľa protokolu od výrobcu a na prístroji Tecan Safire2. qPCR bola vyhodnocovaná pomocou softvéru Eppendorf Realplex 2.0 na základe Ct hodnôt amplifikačných kriviek 115 bp dlhého fragmentu Alu sekvencie. Na zostavenie kalibračnej krivky bola použitá ľudská

DNA vzorka Control DNA 9947A z kitu AmpFLSTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit od Applied Biosystems™, ktorej koncentrácia bola 10 ng/µl. Každá vzorka bola pustená v dvoch paralelne bežiacich esejách. Dáta zo všetkých meraní boli štatisticky vyhodnotené pomocou testu opakovaných meraní ANOVA a Tukeyho testu.

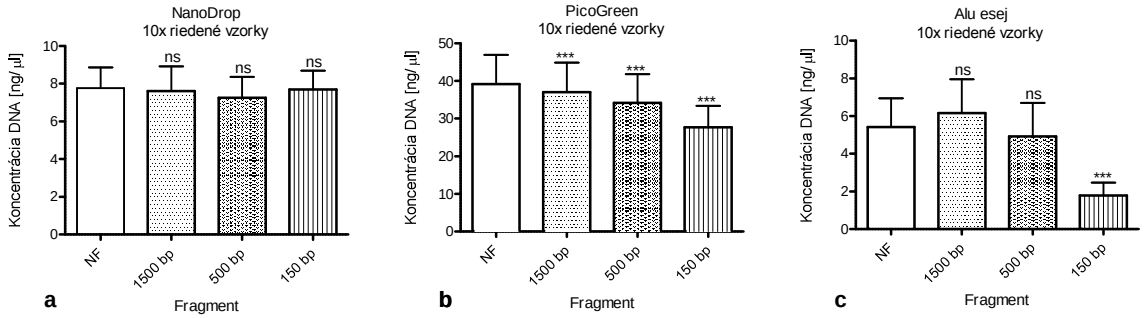
Tabuľka 1: Prevádzkové nastavenia prístroja pre fragmentáciu ultrazvukom

	Duty factor [%]	Peak incidence power [W]	Cycles per burst	Time [s]
1500 bp	2	140	200	15
500 bp	5	105	200	80
150 bp	10	175	200	430

Výsledky

Spektrofotometrickým meraním absorbancie pri 260 nm bola DNA kvantifikovaná v neriedených a v 10x riedených vzorkách. V 100x a 1000x riedených vzorkách koncentráciu nebolo možné zmerať, nakoľko bola nízka a pod detekčným limitom tejto metódy kvantifikácie DNA. Merania ukázali, že koncentrácia DNA nebola ovplyvnená dĺžkou fragmentov ani v prípade neriedených vzoriek, ani v prípade 10x riedených vzoriek. Výsledky kvantifikácie DNA v neriedených vzorkách sú na obrázku 1a.

V prípade merania koncentrácia DNA s použitím fluorescenčnej farbičky PicoGreen® bolo možné určiť koncentráciu v 10x, 100x a 1000x riedených vzorkách. Koncentráciu neriedených vzoriek nebolo možné určiť z dôvodu, že fluorescencia zodpovedajúca najvyššiemu bodu kalibračnej krivky bola menšia ako fluorescencia neriedených vzoriek. Z meraní vyplýva, že koncentrácia DNA vo vzorkách s rôznou úrovňou fragmentácie bola ovplyvnená dĺžkou fragmentov, a to vo všetkých prípadoch riedenia vzoriek. So zvyšujúcou sa fragmentáciou DNA klesá nameraná koncentrácia DNA. Tento pokles je štatisticky významný pre 10x ($p < 0{,}0001$, $F = 65{,}34$), 100x ($p < 0{,}0001$, $F = 152{,}6$) ako aj 1000x riedené vzorky ($p < 0{,}0001$, $F = 109{,}8$). Výsledky kvantifikácie DNA v 10x riedených vzorkách sú na obrázku 1b.



Obrázok 1: Na obrázku 1 sú grafy, na ktorých sú znázornené výsledky kvantifikácie DNA 10x riedených vzoriek tromi rôznymi metódami: a) meranie koncentrácie DNA spektrofotometricky pri 260 nm, b) meranie koncentácie DNA použitím fluorescenčnej farbičky PicoGreen®, c) meranie koncentrácie DNA pomocou qPCR. Na grafoch sú znázornené aj výsledky štatistického spracovania dát. Skratka ns znamená štatisticky nesignifikantný výsledok, *** znamenajú štatisticky významú zmenu, kde $p < 0{,}0001$.

Na základe DNA kvantifikácie pomocou qPCR, bolo možné určiť koncentráciu v 10x, 100x a 1000x riedných vzorkách, podobne ako pri meraní s PicoGreen® farbičkou, keďže najvyšší bod kalibračnej

krivky zodpovedal koncentrácii 10 ng/µl a merané vzorky mali vyššiu koncentráciu ako bol tento bod. Koncentrácia DNA vo vzorkách s dĺžkou fragmentov ≥ 500bp nebola ovplyvnená úrovňou fragmentácie, avšak koncentrácia nameraná vo vzorkách s dĺžkou fragmentov 150 bp signifikantne poklesla ako v prípade 10x riedených ($p< 0,0001$, $F= 55,61$), tak aj v prípade 100x ($p< 0,0001$, $F= 27,05$) a 1000x riedených vzoriek ($p< 0,0001$, $F= 10,74$). Výsledky kvantifikácie DNA v 10x riedených vzorkách sú na obrázku 1c.

Diskusia

V súčastnosti existuje niekoľko metód, pomocou ktorých je možné kvantifikovať DNA v roztoku. Každá z nich ponúka výhody aj nevýhody. Mnohí autori sa zaoberajú najmä kvantifikáciou DNA meraním absorbancie pri 260 nm (1,7) a použitím fluorescenčných farbičiek (1,2,7,8). Z dostupných literárnych zdrojov je známe, že správnosť merania koncentrácie DNA môže byť ovplyvnená viacerými faktormi (8), napríklad aj dĺžkou fragmentov DNA (1,2,8,9). Cieľom našej práce bolo zistiť, či fragmentácia DNA má vplyv na meranie koncentrácie DNA. V našej práci sme sa zamerali na kvantifikáciu DNA pomocou troch rôznych metód. Ako prvú sme použili najčastejšie využívanú metódu, ktorou je spektrofotometrické meranie pri 260 nm. Podľa pracovnej skupiny Shoekere a kol. nameraná koncentrácia DNA mierne stúpa so zvyšujúcou sa fragmentáciou DNA. Naše výsledky ale ukázali, že toto meranie nie je ovplyvnené úrovňou fragmentácie DNA. Nevýhodou tejto metódy je však jej nízka senzitivita a to, že meranie nie je špecifické len pre dvojvláknovú DNA, ale zahŕňa aj jednovláknovú DNA, oligonukleotidy a voľné nukleotidy. Druhá metóda, ktorou sme sa v našej práci zaoberali bolo meranie koncentrácie použitím fluorescenčnej farbičky PicoGreen®. Rovnako ako ukázali práce autorov Geargiou a kol. a Holden a kol. aj naše výsledky ukazujú, že fragmentácia DNA signifikantne ovplyvňuje kvantifikáciu DNA s použitím farbičky PicoGreen®, pričom koncentrácia DNA klesá s narastajúcou fragmentáciou DNA. Napriek tomu výhodou tejto metódy je jej vysoká senzitivita (možnosť merať vzorky s koncentráciou 25 pg/ml) (4) a selektívne meranie len dvojvláknovej DNA. Ako tretiu metódu sme použili kvantitatívnu PCR s 115 bp dlhým fragmentom odvodeným od Alu sekvencie. Podobne ako v prípade merania pomocou PicoGreen®, aj v tomto prípade fragmentácia ovplyvňuje správnosť merania koncentrácie DNA, avšak na rozdiel od predchádzajúcej metódy, sa tento efekt prejaví až pri krátkych fragmentoch s dĺžkou 150 bp. DNA kvantifikácia vo vzorkách s velkosťou fragmentov ≥ 500 bp nebola ovplyvnená úrovňou DNA fragmentácie.

Naša práca ukazála, že správnosť merania koncentrácie DNA pomocou fluorescenčných farbičiek a kvantitatívnej PCR je ovplyvnená úrovňou fragmentácie DNA, zatiaľ čo pri kvantifikácii DNA na základe spektrofotometrie tento vplyv nebol preukázaný. Z tohto dôvodu, v prípade, že sú pre downstream molekulárne metódy využívané práve krátke fragmenty DNA, koncentrácia by mala byť meraná na nefragmentovanej DNA, ako je to napríklad pri next generation sekvenovaní.

Táto práca vznikla vďaka podpore a financovaniu grantov APVV-0720-10 a VMSP-II-0030-09

Použitá literatúra

1. Shokere LA, Holden MJ, Jenkins GR: Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA. Food Control 2009; 20: 391-401
2. Georgiou CD, Papapostolou I: Assay for quantification of intact/ fragmented genomic DNA. Anal Biochem 2006; 358(2): 247-256
3. Holden MJ, Rabb SA, Tewari ZB, Winchester MR: Traceable phosphorus measurement by ICP-OES and HPLC for quantification of DNA. Anal Chem 2007; 79(4): 1536-1541

4. Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP: Characterization of picogreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantification. Anal Biochem 1997; 249(2): 228-238
5. Labarca C, Paigen K: A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. Anal Biochem 1980; 102(2): 344-352
6. Dragan AI, Bishop ES, Casas-Finet JR, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD: Mental-enhanced PicoGreen fluorescence: application for double-stranded DNA quantification. Anal Biochem 2010; 396(1): 8-12
7. Gallagher SR: Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. Curr Protoc Mol Biol 2011; 93:A.3D.1-A.3D.14.
8. Holden MJ, Haynes RJ, Rabb SA, Satija N, Yang K, Blasic JR Jr.: Factors affecting quantification of total DNA by UV spectroscopy and PicoGreen fluorescence. J Agric Food Chem 2009; 57(16): 7221-7226
9. Georgiou CD, Patsoukis N, Papapostolou I: Assay for quantification of small-size fragmented genomic DNA. Anal Biochem 2005; 339(2): 223-230

32. Biologické koreláty schopnosti mentálnej rotácie u intelektovo nadaných chlapcov

Mgr. Jaroslava Durdiaková[1]
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Aneta Kubranská[1], Peter Celec[2]
Školiteľ: doc. MUDr. Daniela Ostatníková, PhD.[1]
[1]Fyziologický ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, [2]Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

Úvod

Intelektovo nadaní jedinci disponujú viacerými unikátnymi charakteristikami detekovanými od skorých štádií vývinu. Z pohľadu neurofyziológie je u nich pozoruhodná dominancia pravej mozgovej hemisféry (1). Geschwind a Galaburda vysvetľujú model cerebrálnej dominancie účinkom prenatálneho testosterónu na organizáciu mozgu počas vývinu *in utero*. Zvýšené koncentrácie testosterónu počas intrauterinného vývinu inhibujú rast zadných častí ľavej hemisféry, súčasne však stimulujú rast pravej hemisféry (2). Mentálna rotácia je jednou z kognitívnych funkcií regulovaných z pravej hemisféry, preto možno usudzovať, že nadaní jedinci budú disponovať lepšími schopnosťami mentálnej rotácie a priestorovej predstavivosti v porovnaní so zvyškom populácie (3). Doposiaľ neboli publikované štúdie, ktoré by preukázali vplyv prenatálneho účinku testosterónu na schopnosť mentálnej rotácie.

Viaceré práce však potvrdili vzťah medzi aktuálnymi hladinami testosterónu a schopnosťou mentálne rotovať. Ženy s vyššími hladinami testosterónu dosahujú lepšie skóre v testoch mentálnej rotácie v porovnaní so ženami s nižšími hladinami hormónu (4). U mužov nadpriemerne vysoké hladiny testosterónu negatívne ovplyvňujú schopnosť mentálnej rotácie a priestorovú orientáciu (5). Možno teda predpokladať, že existuje optimálna hladina testosterónu, pri ktorej je schopnosť mentálnej rotácie maximálna.

Cieľom našej práce je odhaliť fyziologické koreláty mentálnej rotácie v populácii intelektovo nadaných chlapcov s dôrazom na komplexné posúdenie vplyvu testosterónu. Okrem aktuálnych hladín testosterónu bol vo vzťahu k mentálnej rotácii analyzovaný prenatálny účinok testosterónu ako aj genetická variabilita androgénového receptora.

Materiál a metódy

Štúdie sa zúčastnilo 147 intelektovo nadaných chlapcov vo veku od 10 do 18 rokov. Chlapci navštevovali Školu pre mimoriadne nadané deti a Gymnázium v Bratislave. Kritérium prijatia na štúdium v uvedenej inštitúcii je IQ vyššie ako 130. Účasť dieťaťa vo výskumnom projekte bola podmienená podpisom informovaného súhlasu zákonným zástupcom. Probandi boli požiadaní o odber slín do sterilnej skúmavky vždy v čase od 8:00 do 10:00 vzhľadom na cirkadiánny rytmus testosterónu.

Izolácia DNA bola uskutočnená komerčným kitom podľa inštrukcií výrobcu (QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook 04/2010). Stanovenie hladín salivárneho testosterónu bolo realizované využitím metódy ELISA pomocou komerčného kitu podľa inštrukcií výrobcu. Palmárna strana dlane na oboch rukách u každého probanda bola elektronicky zoskenovaná. Pomer dĺžky druhého a štvrtého prsta ruky (2D/4D) bol automaticky vyhodnotený systémom AutoMetric. V práci je prezentovaná priemerná hodnota 2D/4D z meraní na oboch rukách. Polymorfný úsek v géne pre androgénový receptor bol ohraničený špecifickou sadou oligonukloetidov a amplifikovaný využitím metódy PCR. Počet $(CAG)_n$ opakovaní v prvom exóne génu pre androgénový receptor bol detekovaný pomocou kapilárnej

elektroforézy (6). Meranie inteligenčného kvocientu (IQ) bolo realizované počas individuálneho vyšetrenia psychológom využitím štandardizovaných IQ testov *(Wechsler inteligence scale for children, WISC-III)*. Mentálna rotácia bola hodnotená formou testu. Úloha spočíva v správnom priradení analyzovanej kocky s rozličnými znakmi na každej zo šiestich strán k jednej z predložených kociek v zmenenej (rotovanej) polohe v časovom intervale osem minút. Koeficient mentálnej rotácie bol vypočítaný vzorcom zohľadňujúcim počet správnych aj nesprávnych odpovedí.

Získané dáta boli štatisticky vyhodnotené. Korelácie boli analyzované využitím lineárnej regresie a Spearmenovho testu. MANCOVA *(variable multivariate analysis of covariance)* bola využitá na odstránenie vplyvu veku na testované parametre. Výsledky sú prezentované ako priemer ± štandardná odchýlka na hladina významnosti $p<0.05$.

Výsledky

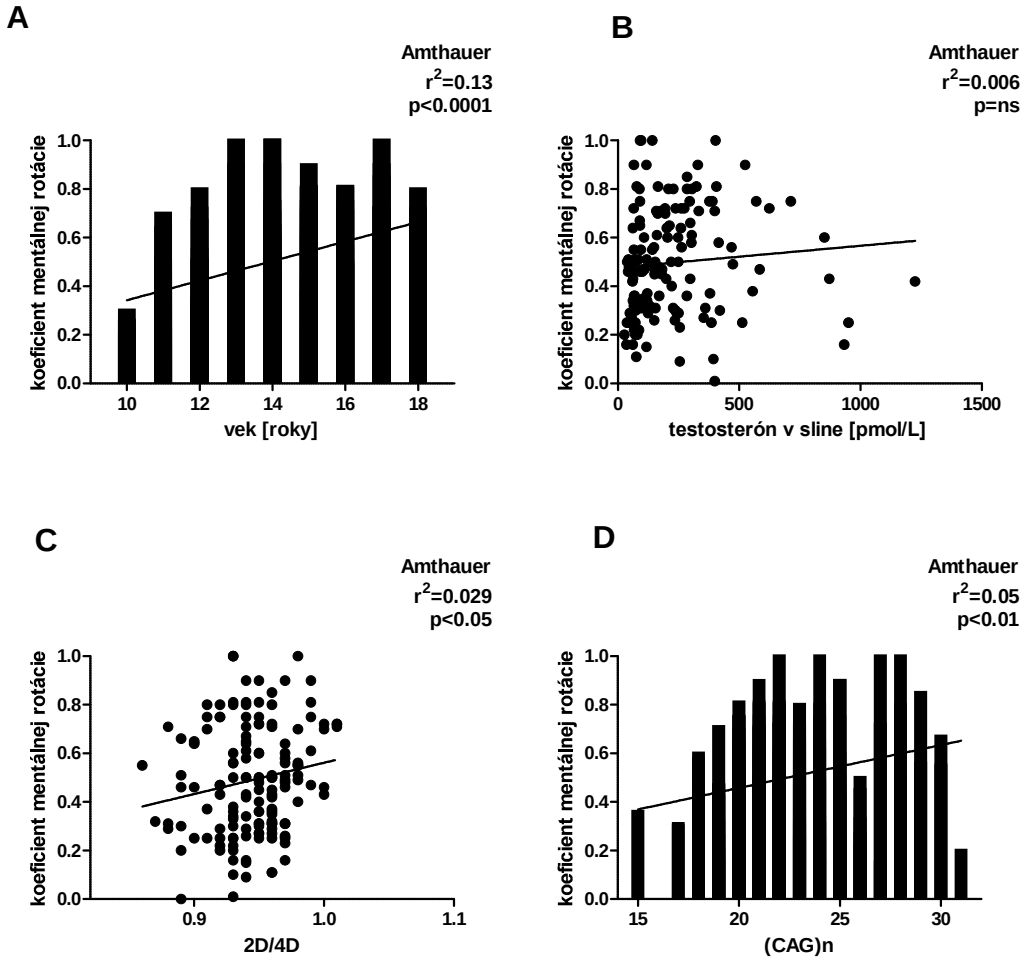
Intelektovo nadaní chlapci vo veku vo veku od 10 do 18 rokov (priemer 14± 2) dosahovali priemerný inteligenčný kvocient 139 ± 5. Štatistická analýza potvrdila pozitívnu koreláciu medzi vekom a dosiahnutým skóre v testoch mentálnej rotácie ($r^2=0.013$; $p<0.0001$). Aktuálne hladiny testosterónu v sline nekorelovali so schopnosťou mentálne rotovať ($r^2=0.006$; p=ns). Korelačná analýza preukázala štatisticky významný vzťah medzi vyšším pomerom 2D/4D a lepšou schopnosťou mentálnej rotácie ($r^2=0.029$; $p<0.05$). Podobne vyšší počet CAG opakovaní v géne pre androgénový receptor bol asociovaný s lepším skóre v testoch mentálnej rotácie ($r^2=0.048$; $p<0.01$) (Obr. 1).

Štatistická analýza MANCOVA po korekcii nežiaduceho vplyvu veku na analyzované parametre potvrdila, že schopnosť mentálnej rotácie u intelektovo nadaných chlapcov je ovplyvnená vekom ($r^2=0.144$; $p<0.0001$) a počtom CAG opakovaní v géne pre androgénový receptor ($r^2=0.046$; $p<0.02$). Ostatné testované parametre neovplyvňujú schopnosť mentálnej rotácie.

Diskusia

V populácii nadaných chlapcov bol analyzovaný vplyv prenatálneho pôsobenie testosterónu, aktuálne hladiny testosterónu v sline a genetická variabilita v androgénovom receptore s cieľom odhaliť fyziologické koreláty mentálnej rotácie. Predchádzajúce štúdie ukázali nelineárnu závislosť medzi hladinami testosterónu a priestorovými schopnosťami u mužov (4). Odchýlka od optimálnych hormonálnych hladín negatívne ovplyvňuje schopnosť mentálnej rotácie (5). V našej práci nebol potvrdený vzťah medzi hladinami salivárneho testosterónu a dosiahnutým skóre v testoch mentálnej rotácie. Účinok testosterónu na štruktúru a funkcie mozgu môže byť sprostredkovaný aj jeho metabolickou premenou na estradiol alebo dihydrotestosterón (7). Možno preto predpokladať, že schopnosť mentálnej rotácie významne závisí od miery konverzie testosterónu na jeho aktívne metabolity v mozgu, nie od samotných hladín voľného cirkulujúceho testosterónu. V budúcnosti plánujeme pozornosť zamerať na analýzu génov kódujúcich 5α-reduktázu či aromatázu s cieľom preukázať vzťah medzi vyššou aktivitou enzýmov, zvýšenou mierou konverzie testosterónu a lepšími výsledkami v mentálnej rotácii.

Účinok prenatálneho testosterónu nie je možné priamo zmerať počas postnatálneho obdobia. Pomer dĺžky druhého a štvrtého prsta na ruke (2D/4D) je považovaný za spoľahlivý biologický indikátor prenatálnych hladín testosterónu (8, 9). Vysoké hladiny testosterónu *in utero* stimulujú rast článkov štvrtého prsta ruky a sú teda indikované nízkym 2D/4D pomerom. Zvýšený prenatálny účinok testosterónu zároveň potencuje dominanciu pravej hemisféry a jej funkcií (2). Na rozdiel od štúdií iných autorov, naša práca preukázala pozitívne asociácie medzi vyšším 2D/4D (nižším prenatálnym účinkom testosterónu) a koeficientom mentálnej rotácie. Viacerí autori uvádzajú, že pomer dĺžok prstov ostáva počas života nemenný (10). Naše štatistické analýzy naznačili, že pomer 2D/4D je signifikantne ovplyvnený vekom jedinca v súlade s výsledkami longitudinálnej štúdie v populácii detí na Jamaike (11). Štatistická analýza MANCOVA umožnila odfiltrovanie nežiaduceho vplyvu veku, následkom čoho sa vplyv prenatálneho testosterónu na schopnosť mentálnej rotácie nepreukázal



Obr.1 Vplyv biologických parametrov na schopnosť mentálnej rotácie u intelektovo nadaných chlapcov. A: Vek probandov signifikantne koreloval s dosiahnutým skóre v testoch mentálnej rotácie podľa Amthauera (r^2=0.13; p<0.0001). **B**: Hladiny salivárneho testosterónu nemali signifikantný vplyv na schopnosť mentálnej rotácie (r^2=0.006, p=ns). **C**: Priemerná hodnota 2D/4D pomeru z merania oboch rúk pozitívne korelovala s koeficientom mentálnej rotácie (r^2=0.029; p<0.05). **D**: Vyšší počet CAG opakovaní v prvom exóne génu pre androgénový receptor pozitívne ovplyvňoval schopnosť mentálne rotovať (r^2=0.048; p<0.01). Korekcia využitím MANCOVA potvrdila štatisticky významný vplyv veku a genetickej variability v androgénovom receptore vzhľadom na skóre v testoch mentálnej rotácie.

Androgénový receptor je hlavný mediátor účinku testosterónu (12). Variabilita v rámci jeho génu ovplyvňuje senzitivitu i aktivitu receptora. Vyšší počet CAG opakovaní v prvom exóne génu redukuje senzitivitu voči androgénom a znižuje jeho transaktivačnú aktivitu (13). Výsledky našej práce potvrdili pozitívnu koreláciu medzi vyšším počtom CAG opakovaní, slabším androgénovým účinkom a lepšou schopnosťou mentálnej rotácie. Zosilnený účinok testosterónu nie je nevyhnutne spojený s amplifikáciou typicky mužskej charakteristiky, ktorou je aj mentálna rotácia a priestorová predstavivosť (5). Uvedený vzťah ostal štatisticky významný aj po korekcii veku využitím analýzy MANCOVA.

Prezentované výsledky poukazujú, že schopnosť mentálnej rotácie u intelektovo nadaných chlapcov je signifikantne ovplyvnená vekom a variabilitou v géne pre androgénový receptor. Vplyv aktuálnych hladín testosterónu ani prenatálneho účinku na priestorové schopnosti nebol preukázaný.

Práca bola podporená grantom pre Dobudovanie centra excelentnosti *pre náhle cievne mozgové príhody na Lekárskej fakulte UK v BA,* ITMS:26240120023.

Použitá literatúra

1. Winner E: The origins and ends of giftedness. Am Psychol 2000; 55(1): 159-69.
2. Geschwind N, Galaburda AM: Cerebral lateralization. Biological mechanisms, associations, and pathology: III. A hypothesis and a program for research. Arch Neurol 1985; 42(7): 634-54.
3. Milivojevic B, Hamm JP, Corballis MC: Hemispheric dominance for mental rotation: it is a matter of time. Neuroreport 2009; 20(17): 1507-12.
4. Ostatnikova D, Putz Z, Celec P, Hodosy J: May testosterone levels and their fluctuations influence cognitive performance in humans? Scr Med 2002; 75(5): 245-54.
5. O'Connor DB, Archer J, Hair WM, Wu FC: Activational effects of testosterone on cognitive function in men. Neuropsychologia 2001; 39(13): 1385-94.
6. Holešová Z, Ostatníková D, Minárik G, Ficek A, Putz Z, Celec P: Has the bain a gender? Homeostasis 2006; 44: 1-2.
7. Celec P, Ostatnikova D, Holesova Z, Minarik G, Ficek A, Kelemenova S, et al.: Spatial abilities in prepubertal intellectually gifted boys and genetic polymorphisms related to testosterone metabolism. J Psychophysiol 2009; 23(1).
8. Manning JT, Fink B: Digit ratio (2D:4D), dominance, reproductive success, asymmetry, and sociosexuality in the BBC Internet Study. Am J Hum Biol 2008; 20(4): 451-61.
9. Malas MA, Dogan S, Evcil EH, Desdicioglu K: Fetal development of the hand, digits and digit ratio (2D:4D). Early Hum Dev 2006; 82(7): 469-75.
10. Manning JT, Barley L, Walton J, Lewis-Jones DI, Trivers RL, Singh D, et al.: The 2nd:4th digit ratio, sexual dimorphism, population differences, and reproductive success. evidence for sexually antagonistic genes? Evol Hum Behav 2000; 21(3): 163-83.
11. Trivers R, Manning J, Jacobson A: A longitudinal study of digit ratio (2D:4D) and other finger ratios in Jamaican children. Horm Behav 2006; 49(2): 150-6.
12. Manning JT: The androgen receptor gene: a major modifier of speed of neuronal transmission and intelligence? Med Hypotheses 2007; 68(4): 802-4.
13. Westberg L, Henningsson S, Landen M, Annerbrink K, Melke J, Nilsson S, et al.: Influence of androgen receptor repeat polymorphisms on personality traits in men. J Psychiatry Neurosci 2009; 34(3): 205-13.

33. Výber optimálnej metódy izolácie voľnej cirkulujúcej fetálnej DNA z plazmy tehotných žien

Mgr. Gabriela Repiská[1]
(Normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Tatiana Sedláčková[1], Gabriel Minárik[1],[2,3]
Školiteľ: RNDr. Gabriel Minárik, PhD.[2]
[1]Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, Bratislava, [2]Geneton s.r.o., Bratislava, [3]Katedra molekulárnej biológie, Prif UK, Bratislava

Úvod

Prenatálna genetická diagnostika je v súčasnosti založená na invazívnych procedúrach odberu biologického materiálu embrya/plodu ako sú amniocentéza a biopsia chóriových klkov. Tieto so sebou nesú malé, ale významné riziko straty plodu (0,5 – 1%) (1), ako aj riziko pre samotnú matku. Objav voľnej cirkulujúcej fetálnej DNA a RNA (cffDNA/RNA – cell-free fetal DNA/RNA) v krvi tehotných žien (2) predznamenal potenciálne využitie maternálnej krvi ako alternatívny zdroj materiálu pre neinvazívnu prenatálnu diagnostiku (NIPD).

V súčasnosti existuje množstvo odlišných aplikácií analýzy cffDNA v rámci NIPD založenej na rozlíšení fetálneho a maternálneho genómu. Voľná cirkulujúca fetálna DNA sa využíva pri NIPD dedičných ochorení viazaných na pohlavie – napr. Hemofília A, Duchenneova muskulárna dystrofia (3), z dôvodu možných komplikácii pri tehotenstvách Rh negatívnych žien s Rh pozitívnymi mužmi pri určení RhD statusu plodu – Rh inkompatibilita (4), stanovení prítomnosti mutácií pre autozomálne dominantné dedičné ochorenia – Huntingtonova chorea (5) a stanovení prítomnosti paternálnej alely pre autozomálne recesívne dedičné ochorenia – talasémia, cystická fibróza (5, 6). Na výskumnej úrovni sa aktuálne testuje využitie najmodernejších molekulárno-genetických laboratórnych metód – digitálna PCR (7) a technológií ako next generation sekvenovanie (8) aj pre detekciu chromozomálnych aneuploidií so zameraním najmä na najčastejšie sa vyskytujúci Downov syndróm. Z uvedeného vyplýva, že NIPD založená na analýze cffDNA má výrazný potenciál stať sa alternatívou ku klasickej invazívnej prenatálnej DNA diagnostiky dostupnou pre rutinné klinické využitie.

Voľnú cirkulujúcu fetálnu DNA v krvi tehotných žien je možné detegovať už vo veľmi skorých štádiách (od 5-6 týždňa) tehotenstva (9), ale je výrazne fragmentovaná a minoritná v porovnaní s maternálnou DNA v rámci celkovej plazmatickej DNA– podiel cffDNA je 3-10% (10, 11). Veľkosť molekúl cffDNA a vysoký podiel maternálnej DNA získanej zároveň s cffDNA pri izolácii DNA z maternálnej plazmy momentálne limitujú využitie ffDNA v rutinnej prenatálnej DNA diagnostike dedičných ochorení. Rozhodujúcim krokom v analýze cffDNA je teda výber optimálnej metódy izolácie voľnej cirkulujúcej nukleovej kyseliny.

Cieľom našej práce bol výber optimálnej metódy izolácie voľnej cirkulujúcej fetálnej DNA priamym porovnaním komerčných kitov štandardne využívaných pri izolácii cirkulujúcich nukleových kyselín z hľadiska výťažku izolovanej voľnej cirkulujúcej DNA fetálneho pôvodu.

Materiál a metódy

Vzorky periférnej krvi od tehotných žien boli odoberané do štandardnej odberovej súpravy (BD Vacutainer K3-EDTA) a následne bola plazma oddelená centrifugovaním dvakrát 10 minút pri 2200 rcf a odobratá bez toho, aby došlo k porušeniu bunkovej časti krvi.

Extrakcia cffDNA sa uskutočnila z 20 spojených vzoriek plazmy získaných od viacerých tehotných žien s plodom mužského pohlavia, aby bolo možné vzorky spracovať súčasne tromi komerčnými kitmi

- QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAamp DSP Virus Kit, QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit podľa protokolov uvedených výrobcom s minimálnou modifikáciu (vákuový systém odporúčaný výrobcom bol nahradený centrifugácoiu 1 minútu pri 2200 rcf).

Porovnanie výťažnosti izolácie pri použití rovnakého pomeru vstupného objemu plazmy k výslednému elučnému objemu pomocou QIAamp Blood Mini Kit a QIAamp DSP Virus Kit bolo realizované izoláciou cffDNA z 10 spojených vzoriek plazmy tehotných žien s plodom mužského pohlavia. Postup izolácie DNA bol upravený tak, aby množstvo vstupného objemu plazmy a výsledného elučného objemu bolo rovnaké, objem lyzačného roztoku a proteázy pri izolácii pomocou QIAamp Blood Mini Kit boli navýšené adekvátne k použitému objemu plazmy, ale jednotlivé kroky izolácie sa zhodovali s protokolmi jednotlivých kitov uvedenými výrobcom.

Pre porovnanie výťažnosti kitov s ohľadom na cirkulujúcu DNA embryonálneho pôvodu bola využitá amplifikácia vybraných úsekov DNA pomocou real time PCR v 2 paralelne bežiacich esejách. Na detekciu a relatívnu kvantifikáciu cffDNA bol použitý marker - gén DYS14, ktorý je lokalizovaný na Y-chromozóme. Na detekciu celkovej cirkulujúcej DNA bol ako marker využitý gén pre androgénový receptor lokalizovaný na X-chromozóme.

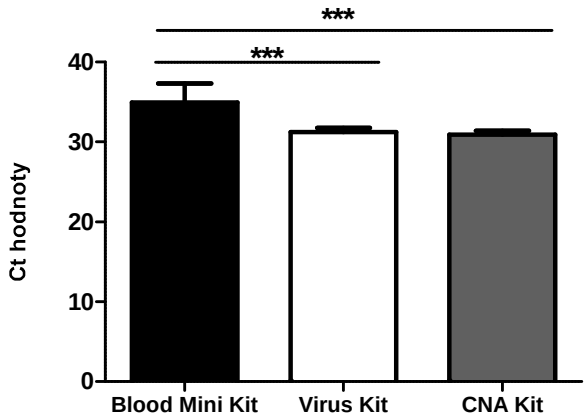
Výsledky amplifikácie boli analyzované pomocou programu Eppendorf Realplex 2.0. Na základe amplifikačných kriviek bol stanovený prahový cyklus (threshold cycle - Ct) pre každú vzorku, ktorý bol použitý ako parameter na určenie relatívnej kvantity izolovanej cffDNA. Výsledky amplifikácie vybraných markerov boli štatisticky spracované pomocou Microsoft Excel 2007® a softvéru GraphPad Prism ® verzia 5.03.

Pre porovnanie výťažnosti troch kitov s ohľadom na cffDNA boli Ct hodnoty pre jednotlivé testované vzorky (vyššia hodnota Ct zodpovedá menšiemu množstvu získanej DNA) štatisticky spracované pomocou testu opakovaných meraní ANOVA a Tukeyho testu, pričom Ct hodnoty pre QIAamp Blood Mini Kit boli upravené s ohľadom na množstvo vstupného materiálu (200µl plazmy) a výsledného elučného objemu (200µl elučného pufru) – pomer vstupný : výstupný objem je 1:1, aby ich bolo možné porovnať s dátami prezentovanými pre QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit a QIAamp DSP Virus Kit, kde množstvo vstupného materiálu bolo 1000µl, resp. 500µl a množstvo výsledného elučného objemu bolo 100µl, resp. 50µl – pomer vstupný : výstup objem 10:1. Pre porovnanie výťažnosti izolácie pomocou dvoch vybraných kitov z rovnakého vstupného objemu plazmy bol použitý Mann-Whitneyho test.

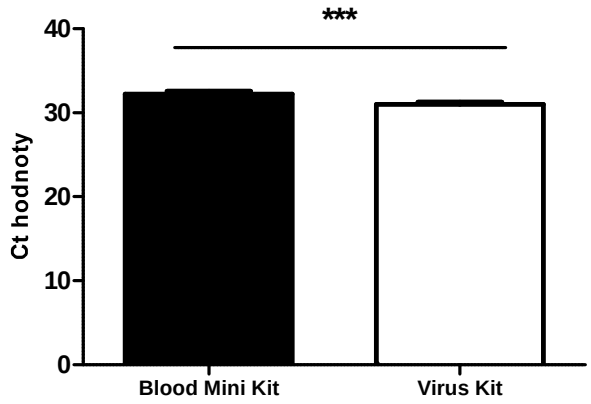
Výsledky

Porovnaním výsledkov amplifikácie pomocou testu opakovaných meraní ANOVA a Tuckeyho testu bol zistený štatisticky významný rozdiel medzi trojicou testovaných kitov ($F= 46.40$; $p<0.0001$). QIAamp DSP Virus Kit poskytol signifikantne vyšší výťažok cffDNA ako QIAamp Blood Mini Kit ($p<0.0001$), a rovnako aj QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit ako QIAamp Blood Mini Kit ($p<0.0001$). Medzi použitím QIAamp DSP Virus Kit a QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit nebol detekovaný signifikantný rozdiel (p=ns). Výsledky sú prezentované na Obr. 1.

Pre porovnanie výťažku izolácie cffDNA z rovnakého vstupného objemu plazmy do rovnakého výsledného elučného objemu pomocou QIAamp Blood Mini Kit a QIAamp DSP Virus Kit boli Ct hodnoty získané amplifikáciou vybraných markerov štatisticky spracované pomocou Mann-Whitneyho testu a bol zistený štatisticky významný rozdiel medzi dvojicou testovaných kitov ($p<0.0001$ ***, Obr. 2).



Obr.1 Porovnanie výťažku cffDNA vybraných kitov na základe priemerných Ct hodnôt. Pomocou opakovaných meraní ANOVA bol zistený štatisticky významný rozdiel medzi trojicou testovaných kitov ($p<0.0001$ ***). Pomocou Tukeyho testu bol zistený signifikantný rozdiel medzi QIAamp Blood Mini Kit a QIAamp DSP Virus Kit ($p<0.0001$ ***) a tiež medzi QIAamp Blood Mini Kit a QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit ($p<0.0001$ ***). Medzi QIAamp DSP Virus Kit a QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit nebol zistený štatisticky významný rozdiel vo výťažku cffDNA. Výsledky sú prezentované ako priemerná hodnota ± štandardná odchýlka.



Obr. 2 Porovnanie výťažku cffDNA vybraných kitov z rovnakého vstupného množstva plazmy do rovnakého elučného objemu na základe priemerných Ct hodnôt. Pomocou Mann Whitneyho testu bol detekovaný štatisticky významný rozdiel medzi QIAamp Blood Mini Kit a QIAamp DSP Virus Kit ($p<0.0001$ ***).

Diskusia

Existuje mnoho protokolov využívaných na izoláciu voľných cirkulujúcich kyselín, vrátane množstva komerčne dostupných kitov. Hlavnú komplikáciu pri práci s voľnými cirkulujúcimi kyselinami prestavuje jej vysoký stupeň fragmentácie a nízky výťažok izolácie. Použitie komerčných kitov v porovnaní s inými metódami, ako napríklad fenol-chloroformová izolácia, môže tieto ťažkosti zmierniť, ale fragmenty DNA kratšie ako 150bp sa nemusia zachytiť na membráne izolačných kolóniek (12).

V našej práci boli porovnávané tri komerčné kity bežne využívané na izoláciu DNA. Výsledky dokumentujú, že na izoláciu fragmentovanej cirkulujúcej DNA pochádzajúcej z fetálnych buniek je najvhodnejší QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, ktorý je primárne určený na izoláciu cirkulujúcich nukleových kyselín z ľudskej plazmy alebo séra. Porovnateľné výsledky dosiahol QIAamp DSP Virus Kit, ktorý je finančne dostupnejší a vyžaduje menší vstupný objem plazmy. Za účelom štandardizovania metodiky pre izoláciu voľnej cirkulujúcej fetálnej DNA z maternálnej plazmy sa uskutočnil ešte v roku 2005 workshop za účasti 12 rôznych európskych inštitúcií, kde boli porovnané rôzne manuálne a automatické extrakčné metódy používané v jednotlivých laboratóriách, najvyšší výťažok cffDNA bol dosiahnutý izoláciu pomocou QIAamp DSP Virus Kit (13). Použitím QIAamp DSP Virus Kit s QIAamp Blood Mini Kit na izoláciu voľnej cirkulujúcej DNA sa venujú viaceré štúdie, ktorých výsledky sú zhodné s našimi a teda, že na izoláciu fragmentovanej cirkulujúcej DNA je výhodnejší QIAamp DSP Virus Kit (13, 14, 15). V rámci spomenutého workshopu ani publikovaných prác nebol testovaný QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, ktorý sa na trh dostal až v roku 2009, preto sme sa rozhodli jeho využiteľnosť pre účely izolácie cffDNA otestovať.

QIAamp Blood Mini Kit je bežne používaný na izoláciu DNA z rôzneho biologického materiálu a dosahuje všeobecne dobrý výťažok. V našej štúdii dosiahol signifikantne nižší výťažok cffDNA ako ostatné dva testované kity. Možnou príčinou menšieho množstva cffDNA získaného QIAamp Blood Mini Kit môže byť to, že je navrhnutý na extrakciu hlavne veľkých fragmentov, zatiaľ čo cffDNA je výrazne fragmentovaná (<300bp) (10). Príčinou nižšieho výťažku môže byť aj menšie množstvo pridanej proteázy v lyzačnou kroku izolácie (QIAamp Blood Mini Kit 50µl, QIAamp DSP Virus Kit 75µl), prípadne to, že pri izolácii pomocou QIAamp DSP Virus Kit aQIAamp Circulating Nucleic Acids sa do lyzačného roztoku pridáva carrier RNA, ktorý zvyšuje afinitu krátkych fragmentov DNA na membránu izolačnej kolónky.

Na základe našich výsledkov môžeme na kvantitatívnu analýzu cffDNA odporučiť QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, prípadne QIAamp DSP Virus Kit, v závislosti od dostupného množstva vstupného materiálu – plazmy a finančných prostriedkov laboratória.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore grantov APVV-0720-10 a VMSP-II-0030-09

Použitá literatúra

1. Danielssson K: What's the Real Risk of Miscarriage After an Amniocentesis? [online]. [2009-01-15]. [Cit. 2012-10-03]. Dostupné na: <http://miscarriage.about.com/od/pregnancyafterloss/f/amniocentesis.htm>
2. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS: Presense of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet 1997*; 350(9076): 485-487.
3. Finning KM, Chitty LS: Non-invasive fetal sex determination: Impact on clinical practice. Semin Fetal Neonatal Med 2008; 13(2): 69-75.
4. Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E: Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: Current practice and future prospects. Prenat Diagn 2009; 29(2): 101-107.
5. Bustamante-Aragones, Trujillo-Tiebas MJ, Gallego-Merlo J a spol.: Prenatal diagnosis of huntington disease in maternal plasma: Direct and indirect study. Eur J Neurol 2008; 15(12): 1338-1344.
6. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM: Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. Lancet 2002; 360(9338): 998-1000.
7. Zimmermann BG, Grill S, Holzgreve W, Zhong XY, Jackson LG, Hahn S: Digital PCR: A powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? Prenat Diagn 2008; 28(12): 1087-1093.

8. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR: Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(42): 16266-16271.
9. Galbiati S, Smid M, Gambini D a spol.: Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. Hum Genet 2005; 117(2-3): 243-248.
10. Chan KC, Zhang J, Hui AB a spol.: Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem 2004; 50(1): 88-92.
11. Lo YM, Tein MS, Lau TK a spol.: Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Gen 1998; 62(4): 768-775.
12. Schmidt B, Weickmann S, Witt C, Fleischhacker M: Improved method for isolating cell-free DNA. Clin Chem 2005; 51(8): 1561-1563.
13. Legler TJ, Liu Z, Mavrou A a spol.: Workshop report on the extraction of fetal DNA from maternal plasma. Prenat Diagn 2007; 27(9): 824–9.
14. Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Dziegiel MH: Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. Prenat Diagn 2007; 27(1): 6-10.
15. Pinzani P, Salvianti F, Pazzagli M, Orlando C: Circulating nucleic acids in cancer and pregnancy. Methods 2010; 50(4): 302-307.

34. Lipidový profil, glykačný a oxidačný stres u pacientov s diabetes mellitus 2. typu s a bez diabetických komplikácií

Mgr. Erika Šándorová[1]
(normálna a patologická fyziológia)

Školiteľ: doc. PharmDr. Vladimír Jakuš, CSc.[1]
[1]Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Úvod

Diabetes mellitus (DM) sa považuje za jedno z najcharakteristickejších voľnoradikálových ochorení. Celosvetová epidémia diabetu výrazne zvyšuje náklady na liečbu samotného ochorenia ako aj pridružených početných komplikácií. DM je spojený so zrýchleným vývojom mikrovaskulárnych komplikácií ako je diabetická nefropatia, neuropatia a retinopatia a makrovaskulárnych ochorení ako ateroskleróza periférnych tepien, ischemická choroba srdca, vysoký krvný tlak, cievne mozgové príhody. Jeden z kľúčových faktorov zodpovedných za vývoj diabetických komplikácií je hyperglykémia, ktorá indukuje nadmernú tvorbu voľných kyslíkových radikálov v mitochondriách endoteliálnych buniek a následné zvýšenie oxidačného stresu. Včasná a účinná prevencia chronických komplikácií u diabetikov predstavuje veľmi významnú úlohu v diabetológii. Je potrebné skúmať vzťah medzi voľnými radikálmi a diabetickými komplikáciami a objasniť mechanizmy, ktoré sa zvyšujú systémový a lokálny oxidačný stres a urýchľujú rozvoj diabetických komplikácií v snahe rozšíriť možnosti liečby DM (1,2). V našej práci sme sa zamerali na meranie fluorescenčných AGEs a AOPP u pacientov s DM 2. typu.

Materiál a metódy

Krv a krvné séra/plazmy boli získané od pacientov, ktorí pravidelne navštevovali diabetologickú ambulanciu II. internej kliniky vo Fakultnej nemocnici s poliklinikou v Bratislave. Pacienti (n=53) vo veku 62,58±11,54 rokov s dĺžkou trvania diabetu 10,68±6,17 rokov boli rozdelení podľa glykemickej kompenzácie na zle kompenzovaných (ZK) a dobre kompenzovaných (DK). DK boli diabetickí pacienti, ktorých priemerná hodnota glykovaného hemoglobínu za posledné 2 roky nepresiahla 6 % (n=22). Ostatní diabetickí pacienti (ZK) boli zaradení do skupiny s nedostatočne kompenzovanou glykémiou (n=31). Ďalej boli títo pacienti rozdelení na skupinu bez (-DC) a s diabetickými komplikáciami (+DC).Všetkých 53 diabetických pacientov malo retinopatiu, z toho 13 malo navyše aj inú komplikáciu (nefropatiu, neuropatiu, ischemickú chorobu srdca). Zdravú kontrolnú skupinu tvorili nediabetickí pacienti (n=35).

Z *klinických parametrov* sme stanovili vek, trvanie diabetu, BMI u všetkých diabetických pacientov.

Biochemické parametre:

HbA1c bol stanovený na princípe iónomeničovej HPLC metódy. Hodnoty HbA1c sa kalibrovali podľa normy Svetovej federácie klinickej chémie a laboratórnej medicíny (IFCC). Lipidový profil (celkový cholesterol, HDL, LDL a TG) bol stanovený enzymatickou metódou.

AGEs boli stanovené spektrofluorimetricky (exc.345 nm/em. 455 nm).

AOPP boli stanovené spektrofotometricky (A_{340}).

Normalitu rozdelenia dát sme testovali pomocou Shapiro-Wilkovho testu. Súbory s normálnym (Gaussovým) rozdelením sme porovnávali pomocou nepárového Studentovho t-testu a výsledky sme

vyjadrili ako priemer ± SD. V prípade výskytu nenormálneho rozdelenia dát sme na porovnávanie použili neparametrický Mann-Whitneyho test. Vzťahy medzi parametrami v jednotlivých skupinách sme zisťovali pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu. Štatistická signifikancia bola definovaná, ak $p<0,05$.

Výsledky

parameter	DK-DC n=11	DK+DC n=11	ZK-DC n=10	ZK+DC n=21	KS n=35
Vek (r.)	57,38±9,94[2,4,5]	73±9,59[1,3,5]	54±12,94[2,4]	65,88±7,87[1,3,5]	49,49±5,64[1,2,4]
Trvanie DM (r.)	7,29±5,65[2,4]	14,83±5,53[1,3]	6±3,94[2,4]	13,25±5,51[1,3]	-
BMI	30,75±6,55[5]	28,92±4,31[3]	36,05±9,22[2,4,5]	29,52±3,68[3,5]	25,98±4,2[1,3,4]
HbA1c (%)	4,86±0,68[2,3,4]	5,42±0,37[1,3,4]	8,09±0,65[1,2]	7,83±0,89[1,2]	-
TC (mmol l^{-1})	4,68±0,81[3,4]	4,53±0,86[3]	5,45±0,74[1,2]	5,21±1,01[1]	5,2±0,72
HDL (mmol l^{-1})	1,47±0,37[3,4]	1,34±0,49[1]	1,08±0,20[1,5]	1,14±0,28[1,5]	1,42±0,35[3,4]
LDL (mmol l^{-1})	2,55±0,76[3,5]	2,47±0,55[3,5]	3,31±0,63[1,2,5]	2,94±0,79[5]	3,73±0,97[1,2,3,4]
TAG (mmol l^{-1})	1,46±0,77[3]	1,66±0,63[3]	2,36±0,59[1,2,5]	3,31±3,82[5]	1,26±0,61[3,4]
AGEs (AU/g proteínov)	80,56±12,71[2,3,4]	93,43±10,08[1,3,4,5]	128,31±5,39[1,2,4,5]	159,39±47,73[1,2,3,5]	81,19±14,64[2,3,4]
AOPP(µmol/l)	109,58±48,88	105,56±36,15	88,59±42,22[4]	121,94±53,86[3,5]	88,61±35,06[1]

Tab. 1.: Klinické a biochemické parametre pacientov s DM2 a kontrolnej skupiny
[1]- signifikantný rozdiel v porovnaní s DK-DC
[2]- signifikantný rozdiel v porovnaní s DK+DC
[3]- signifikantný rozdiel v porovnaní s ZK-DC
[4]- signifikantný rozdiel v porovnaní s ZK+DC
[5]- signifikantný rozdiel v porovnaní s KS

Zistili sme signifikantne zvýšené hladiny AGEs u ZK+DC (159,39±47,73 AU/g proteínov) ($p<0,0001$), ZK-DC (128,31±5,39 AU/g proteínov) ($p<0,0001$), DK+DC (93,43±10,08 AU/g proteínov) ($p<0,05$), ale nie u DK-DC (80,56±12,71 AU/g proteínov) pacientov v porovnaní so zdravou KS (81,19±14,64 AU/g proteínov). V oboch skupinách ZK a DK pacientov sme našli signifikantne zvýšené hladiny AGEs u pacientov +DC v porovnaní s pacientmi –DC (Tab. 1).

Zistili sme signifikantne zvýšené hladiny AOPP len u ZK+DC pacientov (121,94±53,86 µmol/l) v porovnaní s KS (88,61±35,06 µmol/l) ($p<0,05$). U ZK pacientov sme pozorovali signifikantne zvýšené hladiny AOPP u pacientov +DC v porovnaní s –DC pacientmi (Tab. 1). U DK pacientov sme nenašli signifikantný rozdiel v hladinách AOPP medzi pacientmi +DC a –DC.

Zistili sme signifikantné korelácie AGEs s HbA1c u ZK+DC ($r=68$; $p=0,001$), ZK-DC ($r=0,93$; $p=0,0003$), DK+DC ($r=0,67$; $p=0,0255$), DK-DC ($r=0,7$; $p=0,0187$) pacientov a signifikantné korelácie AOPP s HbA1c u ZK+DC ($r=0,56$; $p=0,0094$), ZK-DC ($r=0,85$; $p=0,0029$) a u DK-DC ($r=0,63$; $p=0,0404$) pacientov.

Zistili sme signifikantné korelácie AGEs a AOPP u ZK+DC ($r=0,54$; $p=0,0126$) a u ZK-DC ($r=0,92$; $p=0,0005$) pacientov. U DK pacientov sme korelácie medzi AGEs a AOPP nenašli.

U ZK+DC pacientov sme pozorovali signifikantnú koreláciu AGEs s TC ($r=0,55$; $p=0,0104$), s LDL ($r=0,43$; $p=0,0326$) a negatívnu koreláciu s HDL ($r=-0,47$; $p=0,0319$).

Diskusia

V našej práci sme pozorovali zvýšené hladiny AGEs u ZK +DC a ZK–DC pacientov v porovnaní so zdravou KS. Naše výsledky poukazujú na to, že ak je pacient dobre kompenzovaný, tak hladiny AGEs sú signifikantne nižšie.

U DK pacientov sme pozorovali signifikantne zvýšené hladiny AGEs len u DK+DC pacientov, to značí, že ak sú diabetické komplikácie už prítomné , zlepšenie glykemickej kompenzácie samo o sebe nemusí byť dostatočné, aby zabránilo ďalšej progresii týchto patologických procesov. Bez ohľadu na glykemickú kompenzáciu sú naše výsledky v súlade s prácou (3). Na rozdiel od výsledkov práce (4) sme našli signifikantný rozdiel v hladinách AGEs u ZK+DC pacientov v porovnaní s ZK-DC pacientmi, aj u DK+DC pacientov v porovnaní s DK-DC pacientmi.

Signifikantne zvýšené AOPP sme pozorovali iba u ZK+DC pacientov v porovnaní so zdravou KS. Tieto výsledky poukazujú na zvýšený oxidačný stres najmä u ZK+DC pacientov. Signifikantne zvýšené hladiny AOPP u ZK pacientov bez ohľadu na výskyt diabetických komplikácií boli sledované aj v práci (5).

Nezistili sme signifikantný rozdiel v hladinách AOPP u DK+DC pacientov v porovnaní s DK-DC pacientmi, čo je v zhode s prácou (4). Avšak sme pozorovali signifikantne zvýšené hladiny AOPP u ZK+DC pacientov v porovnaní s ZK–DC pacientmi podobne ako v práci (6).

Zvýšené hodnoty markerov glykačného a oxidačního stresu a u týchto diabetikov zrejme poukazujú na nedostatočnú farmakologickú a nefarmakologickú terapiu, ktorá vedie k akumulácii týchto produktov v tkanivách s následným rozvojom chronických diabetických komplikácií. Preto normalizácia hodnôt týchto markerov vhodne zvolenou terapiou by mala viesť aspoň k oddialeniu rozvoja diabetických komplikácií.

Použitá literatúra

1. Madonna R, De Caterina R: Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes-part I: pathways of vascular disease in diabetes. Vacsul Pharmacol, 2011;54 (3-6): 68-74.
2. Madonna R, De Caterina R: Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes-part II: Cellular mechanisms and therapeutic targets. Vacsul Pharmacol, 2011;54 (3-6): 75-79.
3. Bush M, Franke S, Stein G, Wolf G; Collaborative Study Group: Is the serum concentration of pentosidine a predictor of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes and kidney disease? Dtsch Med Wochenschr, 2007; 132 (36):1810-1814.
4. Abou Seif MA, Youssef AA: Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. Clin Chim Acta, 2004; 346 (2): 161-170.
5. Cakatay U: Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. Diabetes Metab, 2005; 31(6): 551-557.
6. Pan H Z, Zhang H, Chang D, Li H, Sui H: The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. Br J Ophthalmol, 2008; 92 (4): 548-551.

35. Účinnosť topickej terapie na multirezistentné bakteriálne kmene izolované z popáleninových rán pacientov

MUDr. Marianna Hajská[1]
(chirurgia)

Školiteľ: doc. MUDr. Ján Koller, PhD.[1]
[1]Klinika popálenín a rekonštrukčnej chirurgie LFUK a UNB

Úvod

Popáleniny sú jedným zo zdravotných problémov v modernej spoločnosti, ktoré sú spojené s nenapraviteľnými poškodeniami a mnohými vedľajšími problémami pre pacientov a ich rodiny. [1]

Príčinou smrti pacientov, ktorí prežili iniciálny popáleninový inzult a resuscitačné obdobie sú najčastejšie infekčné komplikácie. Najčastejším pôvodom týchto komplikácií je samotná popáleninová rana, z ktorej sa môže rozvinúť najzávažnejšia celková infekčná komplikácia – sepsa z popáleninovej rany. [2] Odhaduje sa, že 75% mortality následkom popáleninovej traumy je v priamej súvislosti s infekciou. [3] [4] [5]

Dôležité je uvedomiť si skutočnosť, že pomerne rozsiahle oblasti popáleninovej rany tvoria avaskulárne nekrotické tkanivá. Celkovo podávané liečivá, najmä antibiotiká, sa nedokážu dostať do týchto častí rany a preto sa nemôžeme spoliehať na ich pôsobenie pri prevencií a liečbe infekcie popáleninovej rany. Topické prostriedky majú kľúčovú úlohu v starostlivosti o popáleného pacienta, nakoľko sa aplikujú priamo na cieľové miesto. Z toho je zrejmé, že len topická aplikácia antimikrobiálnych prostriedkov môže zaistiť ich zodpovedajúcu koncentráciu prítomnú aspoň na povrchu ranových plôch, kde je riziko bakteriálnej kontaminácie najväčšie. [6] [7] Popáleniny vedú k strate prvej línie imunologickej obrany, ktorú predstavuje koža. Popálení pacienti sú imunosuprimovaní a je u nich vysoké riziko vzniku infekcie vyvolanej hlavne nozokomiálne získanými multirezistentnými mikroorganizmami. [8]

Popáleninové centrá na celom svete sa zaoberajú otázkou ovplyvnenia infekcie popáleninovej rany topickými antimikrobiálnymi prostriedkami a vytvárajú štúdie monitorujúce výskyt mikroorganizmov na jednotlivých pracoviskách. Medzi najčastejšie sa vyskytujúce kmene v popáleninových ranách patria Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Klebsiella sp. a Acinetobacter sp. [4] [9] [10]

Pri výbere vhodného systémového antibiotika pomáhajú lekárovi výsledky mikrobiologických vyšetrení, ako napr. stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie(MIC). Tieto vyšetrenia však nie sú bežne dostupné pre topické antimikrobiálne liečivá a výber vhodného z nich sa často uskutočňuje len podľa klinického nálezu, skúsenosti ošetrujúceho lekára, či obvyklých postupov na danej klinike. Jedným z celosvetovo najpoužívanejších liečiv je sulfadiazinum argentum 1% , ktorý sa vďaka jednoduchému a bezbolestnému použitiu, nízkej toxicite a baktericídnemu efektu stal zlatým štandardom medzi topickými antimikrobiálnymi prostriedkami. Avšak aj toto liečivo má nežiaduce účinky ako redukcia bielych krviniek, zvýšená pigmentácia kože, zvýšená bakteriálna rezistencia. [1] Z tohto dôvodu sa v popáleninových centrách vedci pracujúci v laboratóriu ako aj lekári ošetrujúci pacientov snažia overiť účinnosť dostupných topických antimikrobiálnych prostriedkov. Cieľom projektu realizovaného na Klinike popálenín a rekonštrukčnej chirurgie LFUK a UNB bolo zistiť účinnosť bežne používaných topických antimikrobiálnych prostriedkov na multirezistentné bakteriálne kmene izolované z popáleninových rán pacientov.

Metodika

V spolupráci s Mikrobiologickým ústavom LFUK sme vytvorili zbierku multirezistentných bakteriálnych kmeňov izolovaných z popáleninových rán pacientov hospitalizovaných na Klinike popálenín a Rch LFUK a UNB. Z nej sme vybrali 5 kmeňov (zoznam a rezistencia uvedená v Tab. 1) a testovali sme účinnosť topických prostriedkov pomocou modifikovanej metodiky vypracovanej *Hammond et al.* [11]. Hodnotili sme účinnosť 9 topických prípravkov (zoznam a zloženie uvedené v Tab. 2) na nižšie uvedené kmene v planktonickej forme.

Na Petriho misku s Luria-Bertani tuhým kultivačným médiom (LB-agar) sme uložili tri celulózové disky a na každý z nich sme aplikovali 10µl bakteriálnej suspenzie s koncentráciou 10^4CFU/ml. Disky sme potom prekryli gázovým štvorcom (veľkosti 5x5cm) obsahujúcim liečivo (2ml roztoku, 1g krému alebo masti), resp. impregnovaným obväzom rovnakej veľkosti. Následne sme priložené štvorce, impregnované obväzy zaťažili malými sterilnými sklenenými miskami a nechali inkubovať 24 hodín pri 37 °C.

Potom sme každý disk preniesli do skúmavky s 1ml Luria-Bertani tekutým kultivačným médiom (LB-bujón) a intenzívne vortexovali 3x2 minúty. Obsah skúmavky sme 4-krát následne zriedili desiatkovým riedením, takže sme z jedného disku získali 5 skúmaviek. Z každej skúmavky sme aplikovali 10µl na Petriho misku s LB-agarom na označené miesto zodpovedajúce číslu skúmavky. Po 20 hodinách inkubácie pri 37 °C sme spočítali kolónie formujúce jednotky (CFU) a prepočítali na CFU/ml. Ak množstvo CFU aj v mieste zodpovedajúcom najväčšiemu zriedeniu prekračovalo hodnotu 100, do výsledkov sme uviedli 10^8 CFU/ml. Postup práce sme zaznamenali fotograficky.

Tab. 1: Prehľad použitých mikroorganizmov

BAKTERIÁLNY KMEŇ	**REZISTENCIA NA**
Pseudomonas aeruginosa	ampicilín, ampicilín+sulbaktam, piperacilín+tazobaktam, cefuroxim, cefotaxim, cefepim, meropenem, gentamicín, ciprofloxacín, kotrimoxazol
Staphylococcus haemolyticus	oxacilín, erytromycín, kotrimoxazol, ciprofloxacín, bacitracín, neomycín, gentamicín
Enterococcus faecalis	piperacilín+tazobaktam, erytromycín, ciprofloxacín, gentamicín
Escherichia coli	rezistentcia na ampicilín, ampicilín+sulbaktam, cefuroxim, cefotaxim, cefoperazon, ceftazidim, cefepim, aztreonam, ciprofloxacín
Staphylococcus aureus MRSA	oxacilín, erytromycín, klindamicín, ciprofloxacín, moxifloxacín

Tab. 2: Prehľad testovaných topických antimikrobiálnych prostriedkov

Acidum aceticum 1%	príprava magistraliter
Nitrofurantoin 0,2%	príprava magistraliter
Sulfadiazinum argentum 1%	pri testovaní bol použitý komerčne vyrábaný preparát Dermazine® crm., SANDOZ Ph.
Neomycinum + Bacitracinum	pri testovaní bol použitý komerčne vyrábaný preparát Framykoin® ung., ZENTIVA
Acidum aceticum 1% + Sulfadiazinum argentum 1%	
Acticoat®, SMITHandNEPHEW	vnútorná vrstva z rayon/polyesteru a vonkajšie vrstvy z polyetylénu potiahnutého nanokryštalickým striebrom
Atrauman®, HARTMANN	nosný materiál z polyamidových vlákien potiahnutý elementárnym striebrom
Aquacel®Ag, CONVATEC	hydrokoloidné vlákna, Na-karboxymethylcelulóza s obsahom 1,2% iónového striebra
Ialugen® Plus, IBSA	natrii hyaluronas 0,05%, sulfadiazinum argentum1%

Výsledky

(Sumárny prehľad získaných výsledkov účinnosti jednotlivých topických prostriedkov na použité bakteriálne kmene je uvedený na Obr. č.1.)

Roztoky:

Acidum aceticum (AA1%) – mal preukázaný bakteriostatický účinok na kmene E.faecalis a E.coli, u ktorých z pôvodného množstva 10^4 CFU/ml znížil svojim pôsobením množstvo baktérií na 4.10^3, resp. 3.10^3 CFU/ml, na ostatné tri testované kmene mal 100% baktericídny účinok

Nitrofurantoin (FUR) – na kmeň P. aeruginosa neúčinkoval vôbec, avšak v prípade ostatných štyroch testovaných kmeňov bola jeho baktericídna schopnosť 100%

Krémy a masti:

Sulfadiazinum argentum (Dermazine® crm.) – jeden s najúčinnejších testovaných topických prostriedkov, baktericídna účinnosť na všetky použité kmene 100%

Neomycinum + Bacitracinum (Framykoin®ung.) - na všetky použité bakteriálne kmene preparát neúčinný, výsledky pri jeho použití zhodné s použitím sterilného gázového štvorca.

3. Kombinácie krému a roztoku:

Acidum aceticum + Sulfadiazinum argentum - vysoko účinná kombinácia, 100% baktericídny účinnok na všetky použité kmene

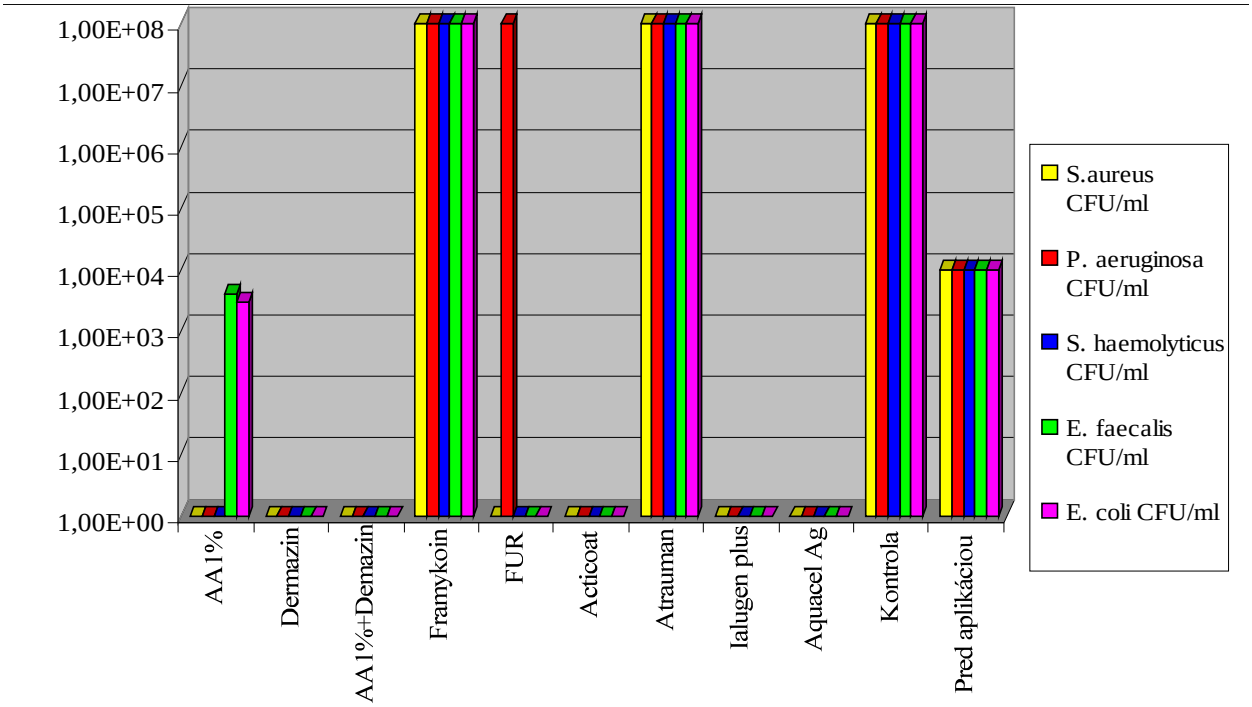
4. Impregnované obväzy (komerčne vyrábané preparáty):

Acticoat® - jeden s najúčinnejších testovaných topických prostriedkov, 100% baktericídny účinok na všetky použité kmene

Atrauman® - na použité kmene preparát neúčinný, výsledky pri jeho aplikácií zhodné s použitím sterilného gázového štvorca.

Aquacel®Ag - jeden s najúčinnejších testovaných topických prostriedkov, 100% baktericídny účinok na všetky použité kmene

Ialugen® Plus - jeden s najúčinnejších testovaných topických prostriedkov, 100% baktericídny účinok na všetky použité kmene



Obr.1: výsledné hodnoty zobrazujúce maximálny rast baktérií (v CFU/ml) po 24hod pôsobení testovaných liečiv a pred ich aplikáciou. (1,00E+08 CFU/ml zodpovedá množstvu rovnému príp. väčšiemu ako 10^8 CFU/ml.)

Diskusia

Z vyššie uvedených výsledkov vyplýva, že v prípade neznámeho bakteriálneho osídlenia popáleninovej rany za účelom kontroly ranovej infekcie je vhodné použiť jeden z nasledovných topických antimikrobiálnych prostriedkov - Sulfadiazinum argentum, Acidum aceticum + Sulfadiazinum argentum, Acticoat®, Aquacel®Ag, Ialugen® Plus.

Súčasne je potrebné zdôrazniť, že podľa vyššie prezentovaných výsledkov by sa empirické použitie topických prostriedkov - Neomycinum + Bacitracinum a Atrauman® malo obmedziť na minimálnu mieru z dôvodu nedostatočnej účinnosti týchto liečiv na v tomto projekte použité multirezistentné bakteriálne kmene.

K najčastejšie používaným topickým prostriedkom na Klinike popálenín a Rch v Bratislave patria Acidum aceticum, Sulfadiazinum argentum a ich kombinácia. Zistenia Koo et el. [12] rovnako ako výsledky nášho projektu potvrdili baktericídnu účinnosť dobre dostupného liečiva Sulfadiazinum argentum napriek jeho dlhodobému a častému používaniu. Ďalšie dobre dostupné liečivo s bakteriostatickým a na niektoré kmene až baktericídnym účinkom je Acidum aceticum, ktoré aj Ryssel et al. [13] [14] považujú na základe viacerých štúdií za veľmi vhodnú súčasť starostlivosti o popálené plochy. Z liečiv vyrobených v posledných 10 rokoch je podľa štúdie realizovanej na pacientoch hospitalizovaných na Klinike popálenín a Rch v Bratislave [15] veľmi účinnou kombinácia natrii hyaluronas + sulfadiazinum argentum. Výsledky nášho laboratórneho testovania potvrdzujú výbornú baktericídnu účinnosť tejto novej kombinácie na baktériách v planktonickej forme. Do skupiny baktericídne pôsobiacich impregnovaných obväzov patrí podľa vyššie uvedených výsledkov tiež Acticoat®, ktorého vysokú účinnosť na infekcie popáleninových rán vyvolané baktériou Acinetobacter baumannii potvrdili testy na potkanoch vykonané Uygur F. et al. [16] Klinická štúdia vykonaná Marbrouk et al. [17] hodnotila u popálených pacientoch množstvo aspektov topickej liečby a ukázala výborné vlastnosti ďalšieho z impregnovaných obväzov, Aquacel®Ag, ktorý sa aj v našom projekte ukázal ako baktericídne účinné topické liečivo.

Projekt podporený grantom Univerzity Komenského č. UK/191/2011

Za podporu pri realizácií tohto projektu ďakujem pani prednostke Mikrobiologického ústavu LFUK doc. MUDr. Helene Hupkovej, PhD., vedúcej výskumného laboratória Mikrobiologického ústavu LFUK RNDr. Lívií Slobodníkovej, CSc. a pani laborantke Ruženke Klemensichovej.

Použitá literatúra

1. Daryabeigi R et al.: Comparison of healing time of the 2nd degree burn wounds with two dressing methods of fundermolherbal ointment and 1% silver sulfadiazine cream., Iran J Nurs Midwifery Res. 2010, 15 (3): 97-101.
2. Koller J a kol. Popáleniny. Bratislava; Univerzita Komenského, 2010: 40.
3. Guggenheim M, Thurnheer T, Gmür R, Giovanoli P, Guggenheim B. Validation of the Zürich burn-biofilm model. Burns. 2011; 37 (7): 1125-33.
4. Koller J, Boča R, Langšádl L. Changing pattern of infection in the Bratislava burn center. Acta chirurgicae plasticae 1999; 41 (4): 112-116.
5. Königova R, Bláha J a kol. Komplexní léčba popáleninového traumatu. Praha; Karolinum, 2010: 305
6. Koller J a kol. Popáleniny. Bratislava; Univerzita Komenského, 2010: 59.
7. Königova R, Bláha J a kol. Komplexní léčba popáleninového traumatu. Praha; Karolinum, 2010: 109.
8. Königová R.: Komplexní léčba popálenin., Praha, Grada 1999, s. 103
9. Neely AN, Gardner J, Durkee P, Warden GD, Greenhalgh DG, Gallagher JJ, Herndon DN, Tompkins RG, Kagan RJ. Are topical antimicrobials effective against bacteria that are highly resistant to systemic antibiotics? Burn Care Res. 2009; 30 (1): 19-29.
10. Azimi L, Motevallian A, Ebrahimzadeh Namvar A, Asghari B, Lari AR. Nosocomial infections in burned patients in motahari hospital, Tehran, Iran. Dermatol Res Pract. 2011; 2011: 436952.
11. Hammond AA, Miller KG, Kruczek CJ, Dertien J, Colmer-Hamood JA, Griswold JA, Horswill AR, Hamood AN. An in vitro biofilm model to examine the effect of antibiotic ointments on biofilms produced by burn wound bacterial isolates. Burns. 2011; 37 (2): 312-21.
12. Koo DS, Zhen S, Zhen ZD, Shi XW, Xiang SJ. Assessment of topical therapy of the burn wound with silver sulphadiazine after its use for 15 years in a burn unit. Burns. 1989; 15 (3): 193-6.
13. Ryssel H, Kloeters O, Germann G, Schäfer T, Wiedemann G, Oehlbauer M. The antimicrobial effect of acetic acid – an alternative or common local antiseptics? Burns 2009; 35(5): 695-700
14. Ryssel H, Gazyakan E, Germann G, Hellmich S, Riedel K, Reichenberger MA, Radu CA. Antiseptic therapy with a polylactacid-acetic acid matrix in burns. Wound Repair Regen. 2010; 18 (5): 439-444.
15. Koller J. Topical treatment of partial thickness burns by silver sulfadiazine plus hyaluronic acid compared to silver sulfadiazine alone: a double-blind, clinical study. Drugs Exp Clin Res. 2004; 30 (5-6): 183-90.
16. Uygur F, Oncül O, Evinç R, Diktas H, Acar A, Ulkür E. Effects of three different topical antibacterial dressings on Acinetobacter baumannii-contaminated full-thickness burns in rats. Burns. 2009; 35 (2): 270-3.

17. Mabrouk A, Boughdadi NS, Helal HA, Zaki BM, Maher A. Moist occlusive dressing (Aquacel(®) Ag) versus moist open dressing (MEBO(®)) in the management of partial-thickness facial burns: A comparative study in Ain Shams University. Burns. 2012; 38 (3): 396-403.

VII. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV LF UK

KLINICKÁ SEKCIA

Hodnotiaca komisia

predseda: **doc. MUDr. Peter Valkovič, PhD.**
členovia: **doc. MUDr. Ľudovít Lukáč, PhD.**
doc. MUDr. Boris Mravec, PhD.
MUDr. Jarmila Jánošiová, PhD.

1. miesto
Mgr. Radana Kollárová
Jednoduché antropometrické indexy potenciálne využiteľné pri diagnostike celkovej a abdominálnej obezity u mladistvých.

2. miesto
MUDr. Peter Sabaka
Vplyv dennej aeróbnej fyzickej aktivity na koncentrácie podtried lipoproteínov vysokej, intermediárnej a nízkej denzity stanovených metódou elektrogorézy v polyakrylamidovom géle

3. miesto
MUDr. Marcela Danková
Dlhodobá prognóza pacientov po prekonaní akútneho infarktu myokardu v rokoch 2006-2007

36. Zmeny zakrivenia rohovky navodené superotemporálnym, superonazálnym rohovkovým rezom po operácii katarakty

MUDr. Branislav Trnavec[1]
(oftalmológia)

Spoluautor: RNDr. Ivo Komenda[2]
Školiteľ: prof. MUDr. Andrej Černák, DrSc.[1]
[1]Katedra oftalmológie LF SZU, UNB Nemocnica sv. C. a M. Bratislava, [2]Katedra optiky a optometrie PřF UP Olomouc

Úvod

Jeden z významných faktorov, ktorý môže negatívne ovplyvniť výslednú zrakovú ostrosť je indukovaný čiže chirurgicky navodený astigmatizmus.

Na pooperačný astigmatizmus má vplyv operačná incízia, astigmatizmus závisí od jej dĺžky, lokalizácie, konfigurácie (1).

Otvorenie prednej komory incíziou pri operácii katarakty je dôležitý krok, ktorý poruší integritu oka a ovplyvní refrakciu oka (optický systém oka).

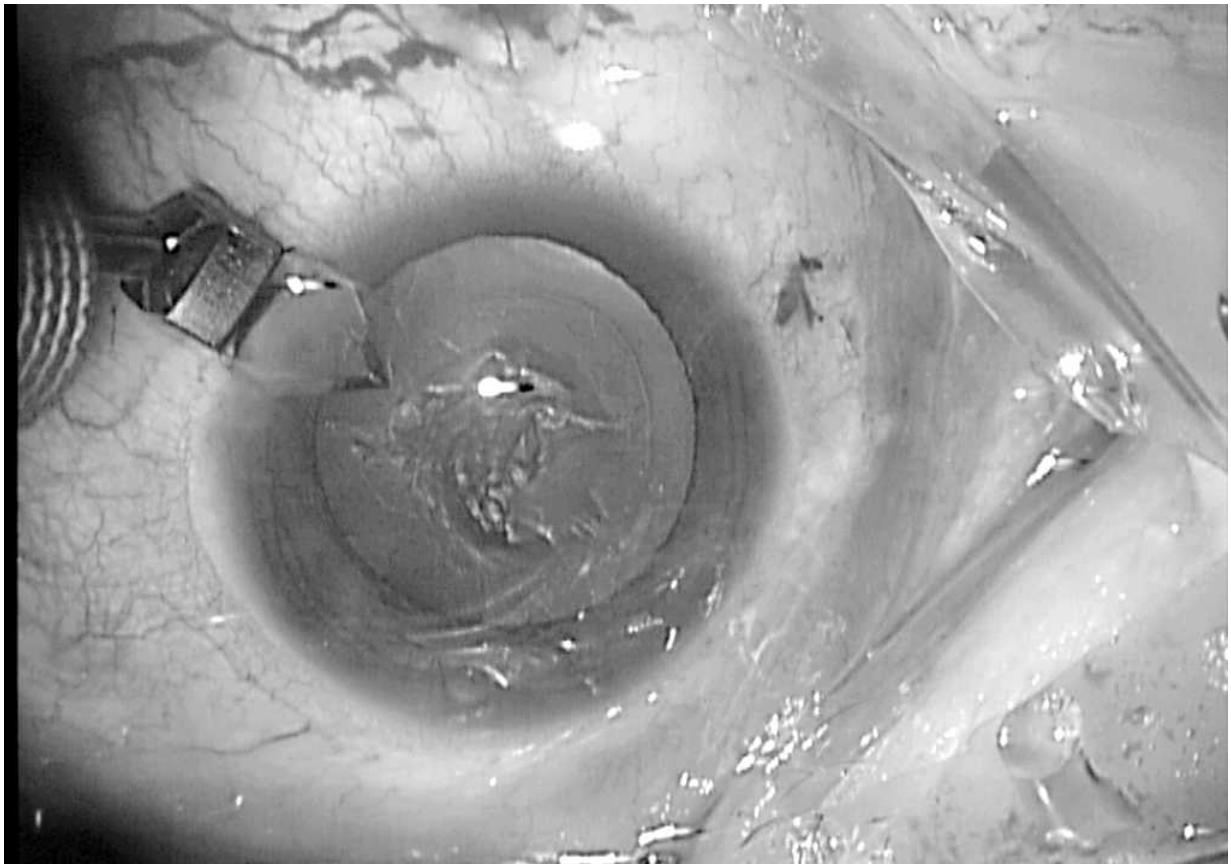
V našej práci sme chceli objektívne zistiť veľkosť astigmatizmu spôsobeného operáciou katararakty po 3,0 mm superotemporálnom rohovkovom tunelovom reze u pravých očí a superonazálnom u ľavých očí, určiť veľkosť rohovkového indukovaného astigmatizmu prvý deň a tri mesiace po operácii katarakty, zistiť, či je rozdiel v indukovanom astigmatizme medzi pravými a ľavými očami.

Metodika

Sledovali sme 57 pacientov (63 očí), 31 žien a 26 mužov vo veku od 25 do 86 rokov, priemerný vek 70,5 roka. Zo 63 očí je 34 pravých a 29 ľavých. Do prospektívnej štúdie sme nezaradili oči v minulosti operované a oči s ochorením rohovky.

Operácie boli vykonané v peribulbárnej anestéze 0,5% bupivacain hydrochlorid 2,0 ml a topickej anestéze 0,4 % Oxybuprocain hydrochlorid kvapky.

V meridiáne 120º sme robili rohovkový tunelový rez 70 stupňovým 3,0 mm širokým diamantovým fako nožom Meyco 208 (Anton Meyer CO.LTD) (Obr.1). Rohovkový tunel mal šírku 3 mm a dĺžku 1,5 až 2,0 mm. Paracentézu diamantovým nožom Meyco 111 (Anton Meyer CO.LTD) 0,9 mm širokú sme robili na čísle 2:00 h. Po instilácii 2,5% hydroxymetylcelulózy nasledovala kontinuálna cirkulárna kapsulorhexa, hydrodiskcia, hydrodelineácia, štandardná koaxiálna fakoemulzifikácia jadra technikou fako chop, alebo fako crack fakoemulzifikátoromi Millennium (Bausch Lomb Surgical), Orbit (Oertli). Kortex sme odsávali bimanuálnym irigačno/aspiračným systémom. Implantovali sme mäkké hydrofilné monofokálne akylátové zadnokomorové šošovky (Aqua Sense, Ophthalmia Innovations International) injektorom cez cartridge (Viscoject 2.2, Medicel AG) do púzdra. Po odsatí hydroxymetylcelulózy na konci operácie sme skontrolovali vodotesnosť rany. Operačnú ranu sme stehom nezaistili ani raz.



Obr.1. (Trnavec) Superotemporálny rohovkový tunelový rez, vykonaný 3,00 mm/70º diamantovým fako nožom ME-208 (Anton Meyer & CO.LTD).

Pooperačne pacienti užívali lokálne kvapky tobramycín s dexametazonom sedem dní päť krát denne, potom tri týždne len dexametazon kvapky v klesajúcich dávkach.

Na presnú identifikáciu zakrivenia rohovky bol použitý počítačový rohovkový topograf (EyeSys Corneal Analysis System, EyeSys Laboratries, Inc.). Topografické merania sa robili pred operáciou, prvý deň a tri mesiace po operácii katarakty. Všetky merania robil jeden lekár.

Na výpočet priemerného predoperačného, pooperačného aj indukovaného astigmatizmu sme použili hodnoty topografickej keratometrie.

V práci sme veľkosť indukovaného astigmatizmu počítali pomocou vektorovej analýzy (2).

Na štatistickú analýzu sme použili dvojstranný párový Studentov test. Za štatisticky významné sme považovali p hodnoty menšie ako 0,05.

Výsledky

Tabuľka 1 ukazuje veľkosť priemerného rohovkového predoperačného astigmatizmu 0,52 D, ktorý signifikantne vzrástol prvý deň po operácii katarakty na 0,86 D a o tri mesiace klesol takmer na pôvodnú veľkosť 0,56 D. Obdobný výsledok je na pravých aj ľavých očiach.

Štatisticky významný rozdiel sme nenašli medzi celkovým priemerným predoperačným rohovkovým astigmatizmom a priemerným pooperačným astigmatizmom tri mesiace po operácii.

Tabuľka 1. Celkový priemerný predoperačný a pooperačný rohovkový astigmatizmus

	Astigmatizmus Predoperačný		**Astigmatizmus pooperačný 1.deň**		**Astigmatizmus pooperačný 3 mes.**	
	Počet očí (n=63)		**Počet očí (n=63)**		**Počet očí (n=63)**	
Ø Veľkosť (D)	0,518		0,857		0,563	
Str. kv. chyba	0,422		0,497		0,371	
Rozsah	0,040 - 2,120		0,175 - 2,650		0,035 - 2,105	
Štat. význ. p	-		0,0001		0,526	
	PO (34)	ĽO (29)	PO (34)	ĽO (29)	PO (34)	ĽO (29)
Ø Veľkosť (D)	0,460	0,587	0,813	0,908	0,547	0,583
Str. kv. chyba	0,313	0,520	0,416	0,581	0,328	0,422
Rozsah	0,040-1,245	0,060-2,120	0,245-1,760	0,175-2,650	0,050-1,230	0.035-2,105
Stat. význ. p	-	-	0,0001	0,03	0,267	0,975

Str. kv. chyba – stredná kvadratická chyba; PO = pravé oči, ĽO = ľavé oči; D = dioptria

Tabuľka 2 uvádza hodnotu priemerného indukovaného astigmatizmu, ktorý prvý pooperačný deň signifikantne vzrástol na 0,68 D, následne po troch mesiacoch indukovaný astigmatizmus sa signifikantne znížil na hodnotu 0,39 D. Významný rozdiel v indukovanom astigmatizme medzi pravými a ľavými očami sme nezistili.

Tabuľka 2. Priemerný indukovaný astigmatizmus prvý pooperačný deň a tri mesiace po operácii katarakty

	Indukovaný astigmatizmus 1. deň		**Indukovaný astigmatizmus po 3 mes.**	
	Počet očí (n=63)		**Počet očí (n=63)**	
Ø Veľkosť (D)	**0,680**		**0,394**	
Str. kv. chyba	**0,392**		**0,255**	
Rozsah	**0,159 – 1,758**		**0,048 - 1,399**	
Štat. význ. p	**0,00010**		**0,00000**	
	PO (34)	**ĽO (29)**	**PO (34)**	**ĽO (29)**
Ø Veľkosť (D)	0,629	0,740	0,376	0,416
Str. kv. chyba	0,369	0,415	0,214	0,298
Rozsah	0,218-1,574	0,159-1,758	0,071-0,960	0,048-1,399
Štat. význ. p	0,40694	0,00000	0,00214	0,00003

Str. kv. chyba – stredná kvadratická chyba; PO = pravé oči, ĽO = ľavé oči; D = dioptria

Diskusia

V našom prospektívnom súbore 57 pacientov (63 očí, 34 pravých, 29 ľavých) sme mali celkový priemerný predoperačný rohovkový astigmatizmus 0,46 D u pravých očí, 0,59 D u ľavých očí, tri mesiace po operácii katarakty bol priemerný pooperačný rohovkový astigmatizmus 0,55 D u pravých očí a 0,58 D u ľavých očí. Nenašli sme štatisticky významný rozdiel medzi celkovým priemerným predoperačným rohovkovým astigmatizmom a priemerným pooperačným astigmatizmom tri mesiace po operácii katarakty.

Beltrame a spol.(3) u rovnakého rezu, len 3,5 mm mali priemerný predoperačný astigmatizmus 0,63 D u pravých očí, 0,78 D u ľavých očí, po troch mesiacoch bol priemerný pooperačný astigmatizmus 0,90 D u pravých očí, 0,88 D u ľavých očí.

Výsledný indukovaný astigmatizmus po troch mesiacoch u našich pacientov bol 0,38 D na pravých očiach, 0,41 D u ľavých očí. Beltrame a spol. (3) uvádzajú priemerný pooperačný indukovaný astigmatizmus po troch mesiacoch 0,68 D u pravých očí, 0,66 D u ľavých očí.

Rainer a spol. (4) v skupine pacientov, kde použili identický rez ako my, mali po troch mesiacoch priemerný indukovaný astigmatizmus 0,88 D u pravých očí a 0,90 D u ľavých očí.

U pacientov v skupine po tradičnom koaxiálnom faku Krootila popísal chirurgicky indukovaný astigmatizmus 0,99 D prvý pooperačný deň a 0,59 D po troch mesiacoch. Operácie vykonal cez 3 mm rez, ale umiestnený temporálne (teda v osi 0°, 180°)(5).

Nám vyšiel menší indukovaný astigmatizmus v porovnaní s uvedenými literárnymi údajmi Beltrame a spol. (3), Rainer a spol. (4), Krootila (5).

V našej práci sme ďalej zisťovali, či je rozdiel v indukovanom astigmatizme medzi pravými a ľavými očami.

Nezistili sme významný rozdiel v indukovanom astigmatizme medzi pravými a ľavými očami. Horší prístup k ľavému oku pre praváka nemal vplyv na indukovaný cylinder na rozdiel od zistení Jacobsa a spol.(6) (poznámka: operatér sedí za hlavou pacienta, pravák má horší prístup k ľavému oku, prístup sťažuje väčší nadočnicový obúk i nos, čo by mohlo spôsobiť väčšiu traumatizáciu rany).

Beltrame a spol.(3), Rainer a spol.(4) vo svojich štúdiách v zhode s nami nenašli štatisticky signifikantný rozdiel v indukovanom astigmatizme medzi superotemporálnym rezom u pravých očí a superonazálnym rezom u ľavých očí.

Vysvetlenie, prečo superotemporálny, superonazálny rohovkový rez (rez v meridiáne 120º) nespôsobí veľký indukovaný astigmatizmus by mohla vysvetliť Smolekova práca (7). Smolek vo svojej experimentálnej práci zistil, že interlamelárne kohezívne sily v nazálnej a temporálnej periférii rohovky sú väčšie.

Vznik malého astigmatizmu pri tomto operačnom reze by by mohla vysvetliť aj histologická práca P. Ernesta. Rohovka na limbe (prechod rohovky do skléry) obsahuje elastín a fibroblasty na rozdiel od centrálnejšej rohovky. Fibroblasty majú kľúčovú úlohu v procese hojenia, elastín je zodpovedný za pružnosť. Preto rana na limbe sa hojí rýchlo, nadobudne pôvodnú konfiguráciu, je teda stabilná a indukuje menší astigmatizmus. Avaskulárna rohovka neobsahuje fibroblasty, ale keratocyty, ktoré sa metapláziou menia na fibroblasty, to trvá 30-60 dní a až potom pokračuje proces hojenia. Preto sa rana v centrálnej časti rohovky hojí dlho (8).

Naša práca potvrdila, že 3,0 mm superotemporálny rohovkový tunelový rez u pravých očí a superonazálny rohovkový tunelový rez u ľavých očí je minimálne invazívny, nespôsobuje klinicky významný indukovaný astigmatizmus.

Použitá literatúra

1. Steinert, RF et al.: Cataract surgery: technique, complications and management. 19. kapitola. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995, 229-242.
2. Holladay JT, Cravy TV, Koch DD: Calculating the surgically induced refractive change following ocular surgery. J Cataract Refract Surg. 1992; 18(5): 429-443.
3. Beltrame G, Salvetat ML, Chizzolini M, Driussi G: Corneal topographic changes induced by different oblique cataract incisions. J Cataract Refract Surg. 2001; 27(5): 720-727.
4. Rainer G, Menapace R, Vass C, Annen D, Findl O, Schmetterer K: Corneal shape changes after temporal and superolateral 3.00 mm clear corneal incisions. J Cataract Refract Surg. 1999; 25(8): 1121-1126.
5. Krootila K: Bimanual just as safe as coaxial surgery. Ophthalmology Times Europe 2008; 4 (3): 10.
6. Jacobs BJ, Gaynes BI, Deutsch TA: Refractive astigmatism after oblique clear corneal phacoemulsification cataract incision. J Cataract Refract Surg. 1999; 25(7): 949-952.
7. Smolek MK: Interlamellar cohesive strength in the vertical meridian of human eye bank corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993; 34: 2962-2969.
8. Ernest P, Tipperman R, Eagle R, Kardasis C, Lavery K, Sensoli A, Rhem M: Is there a difference in incision healing based on location? J Cataract Refract Surg. 1998; 24(4): 428-486.

37. Význam 99mTc-MIBI planárnej scintigrafie s pinhole kolimátorom pri predoperačnej lokalizačnej diagnostike hyperfunkčných prištítnych teliesok v ére SPECT/CT.

MUDr. Lucia Kaliská[1]
(vnútorné choroby)

Spoluautori: Marika Vereb[2,3], Lucia Jakubíková[1], Ladislav Šinkovič[4]
Školiteľ: Doc. MUDr. Soňa Balogová, PhD.[5,6]
[1]INMM pracovisko Banská Bystrica, PET centrum Agel Diagnostic, Banská Bystrica, SR [2]Poliklinika Sekčov, Pracovisko nukleárnej medicíny, Wesper sro., Prešov, SR, [3]Klinikum Kassel, Nuklearmedizin, Kassel, Nemecko, [4]II.Chirurgická klinika SZU, FNsP FDR, Banská Bystrica, SR, [5]ONM I.Internej kliniky UNB a LFUK, Nemocnica Staré mesto, Bratislava, SR, [6]Service de médecine nucléaire, Hôpital Tenon AP HP & Université Pierre et Marie Curie, Paris, Francúzsko

Úvod

Význam scintigrafickej lokalizácie hyperfunkčného prištítneho telieska a jej vplyv na plánovanie typu operačného výkonu pri primárnej hyperparatyreóze (pHPT) je dostatočne dokumentovaný (1,2,3): pacienti so solitárnym ortotopickým adenómom prištítnych teliesok môžu profitovať z minimálne zaťažujúceho, miniinvazívneho chirurgického výkonu, ktorý možno v niektorých prípadoch realizovať aj v lokálnej anestéze (4,5). Bez korektnej informácie o lokalizácii hyperfunkčného prištítneho telieska je potrebná bilaterálna chirurgická explorácia krku, ani tá však neumožní identifikovať prípadné ektopické prištítne teliesko.

Technika SPECT/CT v porovnaní s klasickou planárnou scintigrafiou priniesla zlepšenie senzitívnosti (76 vs. 92-96%) (6,7,8,9) a umožnila najmä presnejšiu anatomickú lokalizáciu hyperfunkčných prištítnych teliesok (1), technika je však časovo náročnejšia a zatiaľ dostupná len obmedzene. Predbežné literárne údaje naznačujú, že planárne zobrazenie pomocou pinhole kolimátora má pri zobrazení ortotopických PT na krku porovnateľnú senzitivitu ako SPECT/CT (1).

Cieľom práce je retrospektívne zhodnotenie miery detekcie (detection rate) hyperfunkčného prištítneho telieska u pacientov s laboratórnym nálezom svedčiacim pre primárnu hyperparatyreózu (pHPT) pomocou planárneho zobrazenia vo viacerých projekciách s použitím pinhole kolimátora.

Materiál a metódy

Retrospektívne boli analyzované scintigrafické nálezy u 123 pacientov s laboratórnym nálezom svedčiacim pre pHPT, ktorí následne podstúpili rádionavigovanú chirurgickú paratyreoidectomiu na chirurgickom pracovisku Rooseveltovej nemocnice v období od 1.1.2008 do 31.12.2011.

Vyšetrenie bolo realizované pomocou gamma kamery Sopha DSX s pinhole kolimátorom. Subtrakčnou technikou dvoch rádiofarmák /dvoch snímaní (dual tracer/dual phase): ako prvá bola realizovaná scintigrafia štítnej žľazy so 150MBq 99mTc-pertechnetátu, s následným podaním 400mg KClO4 p.o. (čím sa dosiahlo urýchlené vyplavenie 99mTc-pertechnetátu z parenchýmu štítnej žľazy). S časovým odstupom 1-2 hodiny sa pokračovalo s aplikáciu 600MBq 99mTc-MIBI a následné včasné (10-15 min) a neskoré snímanie (2 hod). Vo včasnej fáze snímania bola realizovaná predná projekcia, pravá a ľavá predná šikmá projekcia, v pozdnej fáze minimálne jedna predná projekcia. Vo včasnej fáze snímania bola doplnená aj planárna projekcia anterior s koliátorom LAEP na celú oblasť mediastina a jugula a v prípade podozrenia na ektopické PT bolo doplnené aj SPECT vyšetrenie hrudníka. Na záver bola realizovaná počítačová subtrakcia obrazu štítnej žľazy s 99mTc od obrazu

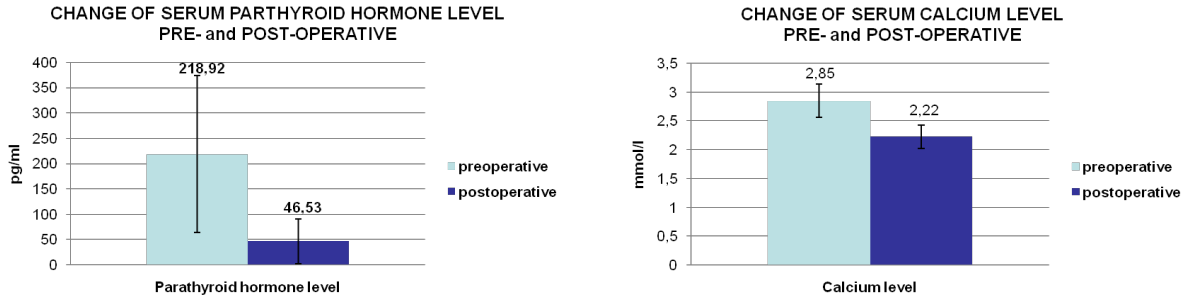
99mTc-MIBI, v typickom prípade zostal obraz hyperfunkčného prištítneho telieska. Metodika je v súlade s odporúčaniami EANM (1,3), sčasti prispôsobená podmienkam pracoviska.

Pri operácii bola použitá gama sonda Gamma Sonic Probe. Predoperačne bolo každému pacientovi aplikované 370 - 550 MBq 99mTc-MIBI. Verifikovaná bola sérová hladina vápnika pred operáciou a 24 hodín po operácii a tiež peroperačná hodnota iPTH na včasné potvrdenie úspešnosti operácie. Každé extirpované tkanivo bolo podrobené histopatologickému vyšetreniu. Za štandard pravdy bol považovaný peroperačný pokles iPTH na menej ako 50% východiskovej hodnoty a jeho pokles na normálnu hladinu do 24 hodín po operácii.

Výsledky

Vyšetrených bolo 123 pacientov, 115 (93%) žien a 8 (7%) mužov, vo veku od 18 do 79 rokov, priemerný vek 58 rokov. Predoperačná hodnota parathormónu bola v rozmedzí od 68,6 do 780 pg/ml (referenčné hodnoty: 15-65 pg/ml). Predoperačné sérové hodnoty kalcia boli v rozmedzí od 2,49 do 3,89 mmol/l (referenčné hodnoty: 2,25 – 2,70 mmol/l).

Scintigrafia. Scintigrafia s pinhole kolimátorom identifikovala 131 patologických PT, pričom u 7 z nich bol nález falošne pozitívny (5,3%). Správna identifikácia bola u 124 (94,7%) prištítnych teliesok. Lokalizácia patologických PT podľa scintigrafie bola nasledovná: 15 (12%) vpravo hore, 16 (12%) vľavo hore, 58 (44%) vpravo dole, 38 (29%) vľavo dole, 4 (3%) ektopicky v mediastine. Typická 99mTc-MIBI retencia bola sledovateľná len u 72 adenómov (57%), kým ostatné adenómy vykazovali rýchle vyplavovanie 99mTc-MIBI (rapid washout).



Graf 1. a 2. Laboratórne nálezy parathormónu a sérového kalcia predoperačne a postoperačne.

Chirurgia. Na miniinvazívny zákrok (MIRP) bolo indikovaných 92/123 (=75%) pacientov. U 13/123 pacientov (=10,5%) bola použitá rozšírená unilaterálna explorácia krku pre homolaterálnu patológiu štítnej žľazy (patologický uzol na scintigrafickom obraze štítnej žľazy). Bilaterálna explorácia krku bola realizovaná u 18/123 (=14,5%) pacientov: v prípadoch multiglandulárneho prostihnutia PT [6/123 (=5%)], v prípadoch súčasne plánovanej operácie štítnej žľazy [24/123 (=20%)] a v prípadoch zlyhania rádionavigácie [5/123 (=4%)]. Súčasný operačný zákrok na štítnej žľaze [lumpectomia (14x), lobectomia (5x), nTTE(5x)] bol vykonaný u 24/123 (=20%) pacientov. U jedného pacienta bol potvrdený papilárny karcinóm štítnej žľazy (studený uzol na pertechnetátovom obraze štítnej žľazy, minimálna akumulácia na MIBI obraze). Ani v jednom prípade nebolo zaznamenané poranenie laryngeálneho nervu. U 12 pacientov došlo k prechodnej postoperačnej hypokalcemii (následne liečenej suplementáciou kalcia).

Histológia. Solitárny adenóm PT bol potvrdený u 102 (86%) pacientov, multiglandulárny adenóm u 5 (4%), hyperplázia u 10 (9%) a karcinóm PT u 1 (1%) pacienta.

Diskusia

Prezentované komplexné scintigrafické zobrazenie hyperfunkčných prištítnych teliesok dosahuje vysokú mieru detekcie pri lokalizácii adenómov prištítnych teliesok u pacientov s pHPT a pri stanovení mnohočetného postihnutia. Uplatnenie viacerých projekcií umožnilo lepšiu orientáciu a priestorovú lokalizáciu najmä u paraezofageálne a retroezofageálne uložených prištítnych teliesok. Našou metódou dosiahnutá miera detekcie 94,7% je porovnateľná s 92-96% senzitivitou SPECT (6,7,8), resp.96% senzitivitou SPECT/CT (9). Tomografické vyšetrenie tak nie je nevyhnutné pre lokalizáciu ortotopických PT. Bez tejto techniky je však menej spoľahlivá lokalizácia ektopických prištítnych teliesok v oblasti mediastína.

Záver: uvedené výsledky nám umožňujú konštatovať, že kombinácia planárnych predných a šikmých projekcií pomocou kolimátora pinhole s použitím dual tracer/dual phase subtrakčnej techniky umožňuje dostatočne spoľahlivú lokalizáciu hyperfunkčných prištítnych teliesok a správnu indikáciu minimálne invazívnych chirurgických výkonov.

Perspektívou je redukcia dávky MIBI použitej pri peroperačnej detekcii za účelom minimalizácie expozície pacienta a personálu ionizujúcemu žiareniu (10).

Použitá literatúra

1. Hindié E, Ugur O, Fuster D, et al.: 2009 EANM parathyroid guidelines. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2009 ; 36 (15) : 1201-1216.
2. Smith JR, Oates ME: Radionucluide Imaging of the Parathyroid Glands: Patterns, Pearls, and Pitfalls. RadioGraphics 2004; 24 (4): 1101-1115
3. Rubello D, Saladini G, Casara D: The role of scintigraphy with dual tracer and potassium perchlorate (99mTcO4 and KClO4/MIBI) in primary hyperparathyroidism. Minerva Endocrinol. 2001 Mar;26(1): 13-21
4. Starker LF, Fonseca AL, Carlinh T et al.: Minimally invasive Parathyroidectomy. Review Article. International Journale of Endocrinology 2011; Article ID 206502
5. Povoski SP, Neff RL, Mojzisik CM, et al.: A Comprehensive overview of radioguided surgery using gamma detection probe technology. Word journale of Surgical Oncology 2009; 7:11
6. Lorberboym M, Minski I, Macadziob S, et al.: Incremental Diagnostic Value of Preoperative 99mTc-MIBI SPECT in Patients with a Parathyroid Adenoma. J Nucl Med. 2003; 44:904-908
7. Lorberboym M, Ezri T, Schachter PP: Preoperative technetium Tc 99m sestamibi SPECT imaging in the management of primary HPT in patients with concomitant multinodular goiter. Arch Surg. 2005; 140 (7) : 656-60.
8. Ansquer C, Mirallié E, Carlier T, et al.: Preoperative localization of parathyroid lesions. Value of 99mTc-MIBI tomography and factors influencing detection. Nuklearmedizin. 2008;47(4):158-62.
9. Oksüz MO, Dittmann H, Wicke C, et al.: Accuracy of parathyroid imaging: a comparison of planar scintigraphy, SPECT, SPECT-CT, and C-11 methionine PET for the detection of parathyroid adenomas and glandular hyperplasia. Diagn Interv Radiol. 2011 Dec;17(4):297-307. Epub 2011 Feb 8.
10. Rubello D, Al-Nahhas A, Mariani G, et al.: Feasibility and long-term results of focused radioguided parathyroidectomy using a „low“ 37 MBq (1 mCi) 99mTc-sestamibi protocol. International Seminars in Sugical Oncology 2006; 3:30

38. Dlhodobá prognóza pacientov po prekonaní akútneho infarktu myokardu v rokoch 2006-2007

MUDr. Marcela Danková [1]
(Vnútorné choroby)

Spoluautori: doc. MUDr. Oľga Jurkovičová, CSc. [1], prof. MUDr. Vasiľ Hricák PhD.,FESC [2], MUDr. Jozef Kalužay PhD. [1], MUDr. Stanislava Remišová [1]
Školiteľ: Prof. MUDr. Peter Ponťuch, CSc.[1]
[1] IV.Interná klinika LFUK a UNB, Nemocnica sv. Cyrila a Metoda, Bratislava, [2] Oddelenie akútnej kardiológie, Národný ústav srdcových a cievnych chorôb a.s., Bratislava

Úvod

Liečba pacientov s akútnym infarktom myokardu (AIM) prešla v posledných rokoch zmenami, ktoré zásadným spôsobom ovplyvnili prežívanie týchto pacientov.

Cieľ

Analýza klinických charakteristík a liečby u pacientov z okresu Bratislava V s diagnózou akútneho infarktu myokardu (AIM) v rokoch 2006-2007 a dlhodobá prognóza týchto pacientov priemerne po 35 mesiacoch od prekonaného AIM.

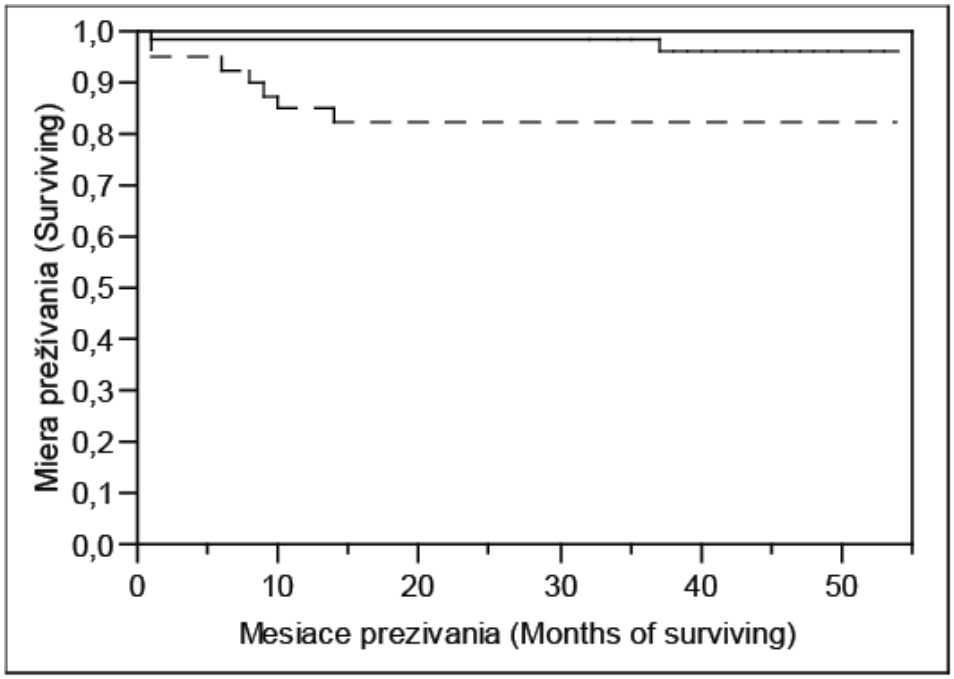
Pacienti a metódy

Prezentovaný súbor predstavuje 155 pacientov z okresu Bratislava V, ktorí boli od januára 2006 do decembra 2007 hospitalizovaní na koronárnej jednotke IV. internej kliniky LFUK a na Oddelení akútnej kardiológie Národného ústavu srdcových chorôb s diagnózou AIM. Súbor sme analyzovali štatistickým programom JMP 7. Distribúciu miery prežívania sme zisťovali Kaplan-Maierovou analýzou.

Výsledky

Z celkovo hospitalizovaných 155 pacientov s AIM (muži/ženy 103/52; priemerný vek 62,4 ± 12,5 rokov) išlo v 89 prípadoch o infarkt myokardu s elevá̋ciami segmentu ST (STEMI) a v 66 prípadoch o infarkt myokardu bez elevácií segmentu ST (NSTEMI). Ženy so STEMI boli signifikantne staršie (p=0,0006). U polovice pacientov so STEMI sme zaznamenali výskyt artériovej hypertenzie, hyperlipidémie a aktívneho fajčenia. Výskyt artériovej hypertenzie bol častejší u žien (p=0,009). Muži boli častejšie fajčiari (p=0,0007). Takmer jednu štvrtinu pacientov so STEMI tvorili diabetici. Výskyt diabetu medzi pohlaviami však napriek vekovým rozdielom nebol štatisticky signifikantný. *V skupine NSTEMI* malo anamnézu artériovej hypertenzie až 91,3% z celkového počtu žien s NSTEMI (p=0,008). Zastúpenie mužov fajčiarov v skupine s NSTEMI bolo významne vyššie ako žien (48% verzus 17%, p=0,008). Selektívnu koronarografiu podstúpilo 77,5% pacientov so STEMI a 42,4% pacientov s NSTEMI. Perkutánna koronárna intervencia sa realizovala u 71,9% pacientov so STEMI a 10,6% pacientov s NSTEMI. Nemocničná úmrtnosť v celom súbore bola 10,9%, nevýznamne vyššia u pacientov so STEMI (16,7%) než s NSTEMI (6,7%), pričom v skupine STEMI boli úmrtia signifikantne častejšie u osôb ženského pohlavia (p=0,002). Neskoré úmrtie po 35 mesiacoch od prvej hospitalizácie sme zaznamenali u 17 pacientov, významne častejšie u pacientov s NSTEMI než STEMI (p<0,05). Hospitalizácia z dôvodu opakovaného infarktu myokardu po prepustení bola vyššia

u pacientov s NSTEMI (p=0,03). Potvrdili sme horšie prežívanie pre pacientov s NSTEMI (p=0,011), významnejšie v skupine mužov (p=0,017) - diabetikov a súčasne fajčiarov.



Obrázok 1 Kaplan-Meierove krivky miery prežívania u mužov so STEMI a NSTEMI

—— STEMI

- - - NSTEMI

Diskusia

Stratégie v prevencii a liečbe kardiovaskulárnych chorôb musia byť komplexné s využitím najmodernejšej efektívnej liečby zameranej na sekundárnu prevenciu s dôrazom na razantnú redukciu rizikových faktorov. Čo sa týka fajčenia, podobne ako v štúdii EUROASPIRE, sme aj my zistili vysoký podiel aktívnych fajčiarov v celom súbore pacientov bez ohľadu na typ AIM (1). Medzi fajčiarmi výrazne dominovali muži.

Zaujímavosťou bolo zistenie, že napriek vekovej štruktúre súboru (mladší muži ako ženy) sme potvrdili rovnaký výskyt diabetes mellitus medzi pohlaviami bez ohľadu na typ AIM. Podobný posun diagnózy diabetu do mladších vekových kategórií, pri nižšej hodnote BMI u mužov zaznamenala aj skupina škótskych vedcov (2). Weitzman a spol. (3) zistili vyššiu 1-ročnú mortalitu po prvom AIM u diabetikov mužov v porovnaní so ženami.

Nemocničná mortalita našich pacientov so STEMI je pri porovnaní s registrom SLOVAKS o niečo vyššia, ale ešte v medziach hlásených z ostatných krajín Európy (4, 5).

V hospitalizačnej fáze majú pacienti s NSTEMI nižšiu mortalitu u než pacienti so STEMI, v prvom polroku po AIM je mortalita v oboch skupinách porovnateľná, po 4 rokoch od prekonania AIM je až dvojnásobne vyššia (6). V našom súbore pacientov s NSTEMI za vyššiu neskorú úmrtnosť môže byť zodpovedný najmä nízky podiel pacientov liečených koronárnou intervenciou, častejší výskyt viaccievneho postihnutia a prognosticky nepriaznivých rizikových faktorov, ako sú fajčenie a diabetes mellitus v mužskej populácii a artériovej hypertenzie u žien. I keď podiel našich pacientov s NSTEMI indikovaných na invazívnu diagnostiku bol o niečo vyšší ako v registri SLOVAKS 2008, aj napriek tomu je počet pacientov vyšetrených koronarograficky a stále neuspokojivo nízky (4,7). Pomerne nízky v porovnaní s registrom SLOVAKS je aj podiel pacientov s NSTEMI z nášho súboru, ktorí podstúpili PKI (8). Všeobecne na Slovensku, nielen na našom pracovisku, by sa podiel pacientov

s NSTEMI indikovaných na koronarografiu a prípadnú následnú revaskularizáciu mal podstatne zvýšiť.

Použitá literatúra

1. Kotseva K, Wood D, De Backer G et al. Cardiovascular prevention guidelines in daily practice - a comparison of EUROASPIRE I, II and III surveys in eight European countries. Lancet 2009;373(9667):929-940.
2. Logue J, Walker JH, Colhoun M et al. Do men develop type 2 diabetes at lower body mass indices than women? Diabetologia 2011;54:3003-3006.
3. Weitzman S, Wang C, Rosamond WD et al. Is diabetes an independent risk factor for mortality after myocardial infarction? The ARIC Surveillence Study. Acta Diabetol 2004;41:77-83.
4. Studenčan M, Hricák V, Kovář F et al. Význam cielených organizačných opatrení pre implementáciu oficiálnych odporúčaní pre manažment pacientov so STEMI do klinickej praxe. Analýza výsledkov registra SLOVAKS 2007-2008. Cardiology 2010;19(1):57-69.
5. Widimský P, Wijns W, Fajadet J et al. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries. Eur Heart J 2010;31:943-957.
6. Terkelsen CJ, Lassen JF, Norgaard BL, et al. Mortality rates in patients with ST elevation vs non ST elevation acute myocardial infarction: observation from an unselected cohort. Eur Heart J 2005;26:18-26.
7. Kovář F, Studenčan M, Hricák V et al. Manažment pacientov s akútnym koronárnym syndrómom bez elevácií segmentov ST. Analýza údajov registra SLOVAKS z roku 2008. Cardiology 2010;19(3):181-191.
8. Studenčan M, Baráková A, Hlava P et al. SLOVenský Register Akútnych Koronárnych Syndrómov – analýza údajov z roku 2007. Cardiology 2008;17(5):179-190.

39. Neuroendoskopia v liečbe posthemoragického, postinfekčného a kongenitálneho hydrocefalu.

MUDr. Dana Dúbravová[1]
(chirurgia)

Spoluautori: Miroslava Fuňáková[1], Eva Valachovičová[1], František Horn[1], Doc.MUDr.Viktor Matejčík, PhD. [2]
Školiteľ: Doc. MUDr. Ján Trnka CSc. [1]
[1]Klinika detskej chirurgie, DFNsP a LFUK Bratislava, [2]Neurochirurgická klinika, Univerzitná nemocnoca Bratislava

Úvod

Akumulácia zvýšeného množstva tekutiny v intrakrániu bola popisovaná už Hippokratom, ktorý údajne aj vykonal prvú komorovú punkciu (460 – 377 p.n.l.). Prvý morfologický popis hydrocefalu s dôrazom na rozšírenie komorového systému a útlak mozgu podal Andreus Vesalius (1514 – 1564). Podrobnejšie ho ďalej popísali vo svojich prácach aj Jean Louis Petit (1664 – 1750) a Giovanni Morgani (1682 – 1771), ktorý popísal klinické symptómy hydrocefalu u dieťaťa. Chirurgická terapia hydrocefalu sa rozvinula až začiatkom 20. storočia. Predtým terapia spočívala skôr v observácii ako v intervencii.

V súčasnosti definujeme hydrocefalus ako symptomatickú progresívnu dilatáciu komorového systému dieťaťa. Z funkčného hľadiska rozlišujeme hydrocefalus obštrukčný (nekomunikujúci) a komunikujúci hydrocefalus (porucha cirkulácie CSF na úrovni arachnoidálnych granulácií, napr. ako dôsledok pozápalových zmien (1). Podľa obdobia vzniku rodeľujeme hydrocefalus na kongenitálny (hydrocefalus rozvíjajúci sa prenatálne ako dôsledok vývojovej anomálie najmä počas 6. – 17. týždňa intrauterinného vývoja – Arnold – Chiari malformácia, stenóza aqueduktu, Dandy Walker malformácia) a získaný v dôsledku infekcie, hemorágie, tumoru alebo traumy. V našich podmienkach je typický kongenitálny hydrocefalus a posthemoragický hydrocefalus po intraventrikulárnej hemorágii (IVH) následkom celkovej asfyxie u nezrelých novorodencov, pričom zvýšené riziko IVH je najmä u detí vážiacich menej ako 1500 g. Postinfekčný hydrocefalus ako následok neonatánej sepsy je najčastejším typom hydrocefalu v rozvojových krajinách a je väčšinou asociovaný s gram – negatívnymi črevnými baktériami (2).

Klinické prejavy hydrocefalu predstavuje zvýšený trend rastu hlavičky, vyklenutá veľká fontanela a symptomatológia zvýšeného intrakraniálneho tlaku.

Chirurgická terapia spočíva v drenáži nadmerného obsahu cerebrospinálnej tekutiny a to do vonkajšieho prostredia – externá drenáž alebo do telesných dutín– interná drenáž (3). Externú drenáž predstavujú komorové punkcie, zavedenie komorového rezervoára alebo kontinuálna externá drenáž (4). Pod internú drenáž zaraďujeme ventrikuloperitoneálny, ventrikuloátriálny, ventrikulopleurálny, ventrikulosubgaleálny a lumboperitoneálny shunt. Externú drenáž považujeme za dočasné riešenie, pri pretrvávajúcej potrebe drénovania likvoru u dieťaťa pristupujem k internej drenáži alebo k neuroendoskopii (5, 6).

Ventrikuloperitoneálny shunt (VPS) je najčastejšie využívaná forma internej drenáže. Spočíva v drénovaní likvoru z komorového systému do peritoneálnej dutiny. Zabezpečuje spoľahlivé drénovanie takmer všetkých typov hydrocefalu, je však zaťažený vysokou mierou komplikácií – až 50% pacientov je nutné chirurgicky revidovať do 2 rokov od imlantácie VPS pre mechanickú, infekčnú alebo funkčnú poruchu VPS.

Neuroendoskopia je v súčasnosti najmodernejšou metódou. Princíp neuroendoskopickej ventrikulostómie tretej mozgovej komory (ETV) spočíva vo vytvorení alternatívnej cesty pre tok

likvoru. Vytvorená stómia zabezpečí komunikáciu medzi III. komorou a interpedunkulárnou a prepontínnou cisternou a tým sa vytoria predpoklady pre následné fyziologické vstrebávanie likvoru (7). Ďalšími endoskopickými výkonmi sú septostómia, cystostómia, fenestrácia intraventrikulárnych sépt, aqueduktoplastika a koagulácia chorioidálneho plexu.

Pri obštrukčnom hydrocefale v dôsledku tumoru mozgu je možné vykonať popri ventrikulostómii aj biopsiu tumoru a ev. parciálnu alebo rozsiahlu resekciu intraventrikulárneho tumoru. Úspešnosť liečby tohto typu hydrocefalu je popisovaná 83 – 95%, pričom najlepšie výsledky sú pri gliómoch a ependymómoch.

Metodika

V práci sme analyzovali 47 neuroendoskopicky riešených pacientov za 5 ročné obdobie 2007 – 2011 na Klinike detskej chirurgie DFNsP a LFUK v Bratislave. Do štúdie boli zaradení pacienti s posthemoagickým (PHH), postinfekčným (PIH) a kongenitálnym hydrocefalom (KonH). Vyhodnocovali sme percentuálne zastúpenie jednotlivých typov hydrocefalu podľa etiológie (PIH, PHH, KonH), vek pacientov pri operácii (< 6 mesiacov / > 6 mesiacov / > 1 rok), typ operácie (primárna / sekundárna), typ procedúry (Neuroendoskopická ventrikulostómia III. mozgovej komory – ETV / cystostómia / septostómia / aqueduktoplastika / extrakcia alebo zavedenie katétra VPS), mieru úspešnosti neuroendoskopickej procedúry.

Priemerná doba pooperačného sledovania bola 23 mesiacov.

Výsledky

V rokoch 2007 – 2011 sme zrealizovali 47 neuroendoskopických výkonov u 40 pacientov. Celkovo tvorí neuroendoskopia približne 15% výkonov – v.r. 2010 bolo operovaných 81 pacientov s hydrocefalom pričom implantácia ventrikuloperitoneálneho shuntu predstavovala 53% operácií, neuroendoskopia 15%, implantácia komorového rezervoáru 16% a kontinuálna externá drenáž 16% výkonov.

Pri primárnych výkonoch prevažovala implantácia komorového rezervoára (42%). Primárna inzercia ventrikuloperitoneálneho shuntu predstavovala 33% výkonov, neuroendoskopia 17% a kontinuálna externá drenáž 8%. Pri sekundárnych operáciách dominovala inzercia ventrikuloperitoneálneho shuntu (62%). Sekundárne zavedenie externej drenáže predstavuje 20% výkonov, neuroendoskopia 14% a komorový rezervoár 4%.

Počet neuroendoskopicky riešených pacientov na našej klinike každoročne stúpa (Graf č.1)

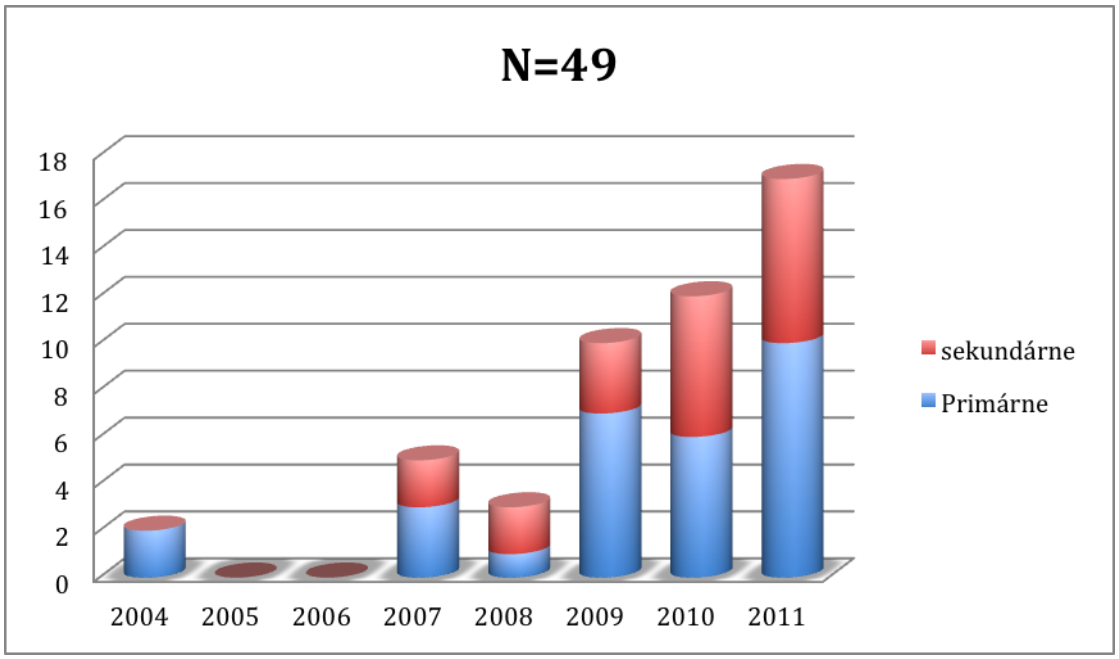
V etiológii hydrocefalu u neuroendoskopicky riešených pacientov dominoval kondenitálny hydrocefalus (57%). Posthemoragický hydrocefalus sa vyskytoval v 35%, postinfekčný v 8%.

Miera úspešnosti neuroendoskopického riešenia bola 63% pri kongenitálnom hydrocefale, 20% pri posthemoragickom hydrocefale a 66% pri postinfekčnom hydrocefale.

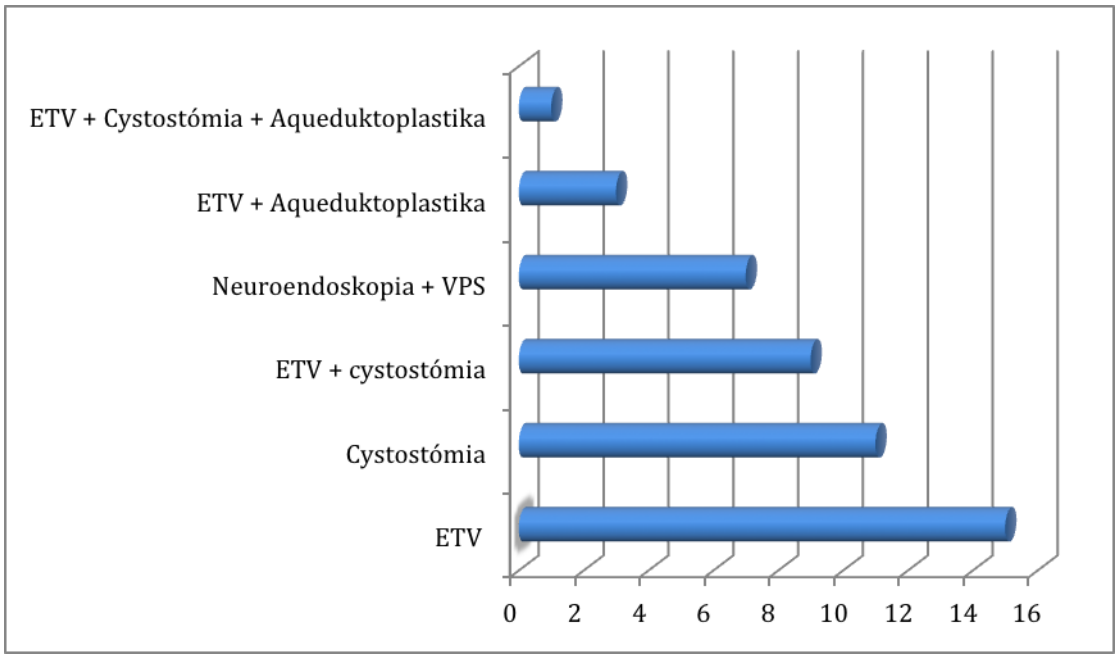
Z celkového počtu 47 neuroendoskopických operácií bolo 57% primárnych výkonov a 43% sekundárnych. Miera úspešnosti neuroendoskopie je 62% pri primárnom riešení a 21% pri sekundárnom riešení.

Z celkového počtu výkonov predstavovala samostatná neuroendoskopická fenestrácia spodiny III. komory 33% výkonov, cystostómia 24%, kombinovaný výkon ETV + cystostómia 19%, neuroendoskopia kombinovaná so zavedením ventrikuloperitoneálneho shuntu / extrakciou proximálneho katétra 15%, ETV + aqueduktoplastika 7% a kombinovaný zákrok ETV + cystostómia + aqueduktoplastika v 2% (Graf č.2).

Graf č.1



Graf č.2



Diskusia.

Cieľom chirurgickej liečby hydrocefalu je zabezpečiť primeranú drenáž likvoru pre dosiahnutie optimálneho intrakraniálneho tlaku. Hypodrenáž i hyperdrenáž má nepriaznivý vplyv na psychomotorický vývoj dieťaťa. Ventrikuloperitoneálny shunt predstavuje v súčasnosti najvyužívanejší typ chirurgického riešenia hydrocefalu, jeho implantácia je však zaťažená vysokou mierou komplikácií – nutnosť reoperácie u 50% pacientov v priebehu 2 rokov od implantácie VPS. Podľa súčasnej odbornej literatúry každá reoperácia znižuje kvalitu života pacienta a taktiež nepriaznivo ovplyvňuje psychomotrický vývoj dieťaťa. Neuroendoskopia predstavuje najmodernejší spôsob liečby hydrocefalu. Vytvorením alternatívnej komunikácie medzi komorovým systémom a

subarachnoidálnymi priestormi sa zabezpečí prirodzené vstrebávanie likvoru. Množstvo likvoru drénovaného cez funkčnú ventrikulostómiu je regulované v závislosti od intrakraniálneho tlaku. Pomocou neuroendoskopie tak dokážeme zabezpečiť drenáž likvoru bez nutnosti zavedenia cudzieho telesa (VPS) a tým eliminujeme vysoký počet reoperácií. Vzhľadom na to, že potreba drenáže pretrváva zvyčajne po celý život dieťaťa, neuroendoskopia predstavuje pre pacienta veľký benefit.

Najoptimálnejším typom hydrocefalu pre neuroendoskopické riešenie je 3-komorový hydrocefalus. V našom súbore pacientov sme zaznamenali pomerne vysokú úspešnosť pri riešení kongenitálneho a postinfekčného hydrocefalu, a nižšiu mieru úspešnosti neuroendoskopie pri posthemoragickom hydrocefale. Celkovo vyššie pravdepodobnosť vytvorenia funkčnej ventrikulostómie sa predpokladá pokiaľ je neuroendoskopia primány výkon u pacienta.

V rámci môjho PhD štúdia som absovovala 3 mesačný pobyt na Detskej neurochirurgickej klinike v CURE Children`s hospital of Uganda. Podobne ako v iných rozvojových krajinách v etiológii hydrocefalu dominoval postinfekčný hydrocefalus (56%). Vzhľadom na nevyhovujúce socio-ekonomické podmienky a finančnú náročnosť zavedenia ventrikuloperitoneálneho shuntu je v CURE preferované neuroendoskopické riešenie pacientov. Počas 3 mesiacov predstavovala neuroendoskopia 66% výkonov, VPS 26% výkonov, komorový rezervoár 4% a a kontinuálna externá drenáž 2% výkonov. Celková miera úspešnosti je 63 – 90% s najväčšou pravdepodobnosťou vytvorenia funkčnej ventrikulostómie u dieťaťa staršieho ako 1 rok s kongenitánym hydrocefalom a prechodným aqueduktom (90%). Determinaty miery úspešnosti neuroendoskopického riešenia v CURE a na našej klinike potvrdzujú predpoklad kongenitálneho hydrocefalu ako optimálneho pre neuroendoskopickú intervenciu. Štúdia ďalej poukazuje na uspokojivé percento úspešnosti neuroendoskopie pri postinfekčnom hydrocefale, napriek predpokladanej účasti pozápalových zmien v subarachnoidálnych priestoroch a zníženej resorbcie likvoru v etiopatogenéze PIH.

Neuroendoskopia pri správnom výbere pacientov umožňuje znížiť alebo úplne odstrániť potrebu shuntu pre pacienta, a tým znižuje riziko ďaľších komplikácii u dieťaťa s hydrocefalom, ktoré si pri VP shunte väčšinou vyžadujú opakované revízie systému. Úprava dilatácie komorového systému na MRI trvá dlhšie ako pri VP shunte, štúdie však ukázali že výsledný neurokognitívny nález u detí s VP shuntom a po neuroendoskopii je rovnaký (8, 9). Posudzovanie úspešnosti neuroendoskopického riešenia by malo byť teda založené najmä na klinickom stave dieťaťa (10).

Použitá literatúra

1. Kolarovszki B et al.: Detský hydrocefalus. Neurológia 2009;4(1): 13-17.
2. Warf BC. Hydrocephalus in Uganda: the predominance of infectious origin and primary management with endoscopic third ventriculostomy. J Neurosurg. 2005;102(1 Suppl):1-15.
3. Kolarovszki B, Ďurdík P, De Riggo J, Šútovský J, Kolarovszká H.: Menežment dieťaťa s hydrocefalom. Pediatria 2006;1(S2): S33.
4. Danišová B.: Externá drenáž mozgových komôr. Neonatologické zvesti 2004;8(2): 42-43.
5. Kolarovszki B et al.: Indikácia drenážneho výkonu u novorodencov a dojčiat s hydrocefalom. Neurológia pre prax 2008;9(S1): 16-17.
6. Kolarovszki B, Šútovský J, Maťašová K, Čiljak M, Kolarovszká H, De Riggo J. :Indikácia drenážneho výkonu u novorodencov s hydrocefalom. Neonatologické zvesti 2007;11(2): 71-72 .
7. Šútovský J et al. : Endoskopická ventrikulostómia III. mozgovej komory - liečba detského hydrocefalu. Česko-slovenská pediatrie 2005;60(8-9): 535.
8. Kulkarni AV, Shams I, Cochrane DD, McNeely PD. : Quality of life after endoscopic third ventriculostomy and cerebrospinal fluid shunting: an adjusted multivariable analysis in a large cohort. J Neurosurg Pediatr. 2010;6(1):11-6.

9. Warf B et al.: Neurocognitive outcome and ventricular volume in children with myelomeningocele treated for hydrocephalus in Uganda. J Neurosurg Pediatr. 2009;4(6):564-70.

10. Buxton N, Turner B, Ramli N, Vloeberghs M. : Changes in third ventricular size with neuroendoscopic third ventriculostomy: a blinded study. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002 Mar;72(3):385-7.

40. Úloha dekompresívnej kraniektómie v liečbe expanzívneho hemisferiálneho infarktu

MUDr. Róbert Chrenko
(chirurgia)

Spoluautori: žiadnni
Školiteľ: prof. MUDr. Juraj Šteňo, CSc.
Neurochirurgické oddelenie, Landesklinikum Wiener Neustadt, Rakúsko

Úvod

Ischemické cievne mozgové príhody majú incidenciu 160-240/100.000 obyvateľov ročne. Z toho počtu tvorí rozsiahly hemisferiálny infarkt 1-10%. V nasledujúcich hodinách po infarkte sa vyvíja vazogénny edém, stúpa intrakraniálny tlak a za známok kmeňovej herniácie takmer 80% pacientov umiera. Chirurgická liečba formou dekompresívnej kraniektómie sa v súčasnosti na základe multicentrických randomizovaných kontrolovaných štúdii Destiny, Hamlet a Decimal (1-4) doporučuje u vybranej skupiny pacientov ako životzachraňujúci zákrok, ktorý znižuje mortalitu pod 30%. Taktiež v operovanej skupine stúpa dvojnásobne počet pacientov, ktorí zostávajú funkčne nezávislí z 21 na 43%. Na druhej strane, po dekompresívnej kraniektómii niekoľkonásobne stúpa počet prežívajúcich pacientov s permanentým ťažkým neurologickým deficitom, so všetkými súvisiacimi socioekonomickými dôsledkami.

Metódy

Štúdia si kladie za cieľ retrospektívne analyzovať výsledky chirurgickej liečby u pacientov s expanzívnym hemisferiálnym infarktom operovaných na našom oddelení. Porovnávame výsledky liečby s výsledkami najnovších štúdii (Destiny, Hamlet a Decimal). Porovnávame výsledky chirurgickej liečby s výsledkami konzervatívnej liečby, ktorú absolvovali pacienti, ktorí neboli na operáciu indikovaní. Zdôrazňujeme, že v tomto zmysle štúdia nie je randomizovaná a placebom kontrolovaná, preto toto porovnanie treba považovať za orientačné. Za významný prínos štúdie považujeme vyhodnotenie chirurgickej liečby u vybraných pacientov vo veku nad 60 rokov.

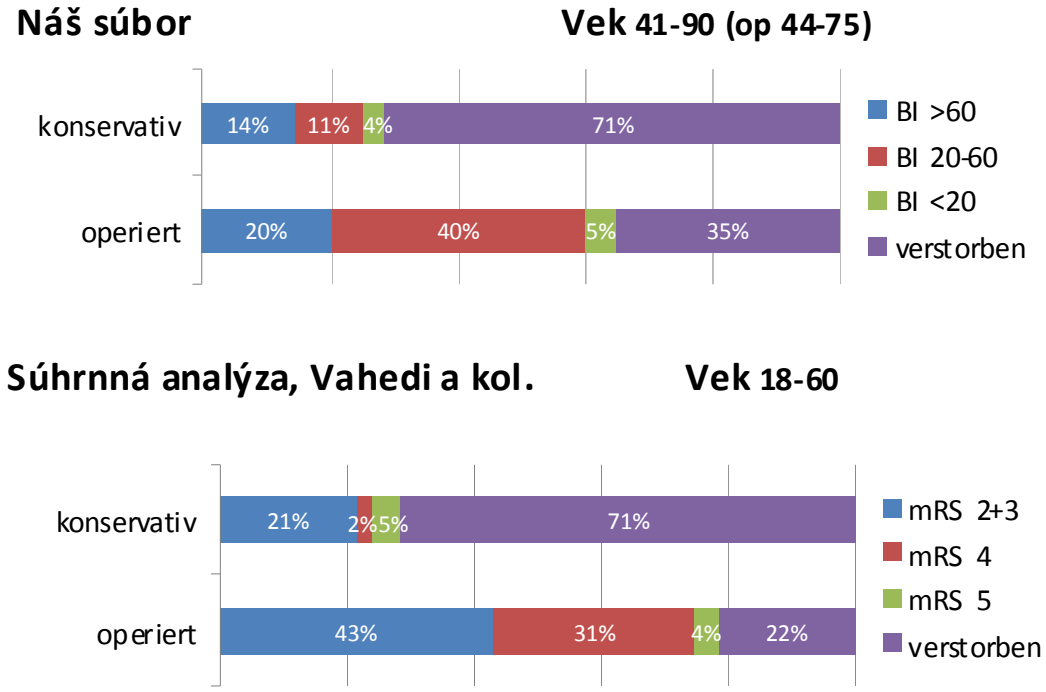
V prvej fázy retrospektívnej štúdie vlastného súboru 20 pacientov s expanzívnym hemisferiálnym infarktom operovaných na neurochirurgickom oddelení Wiener Neustadt medzi októbrom 2005 a júlom 2009. Indikovaní k operačnému zákroku boli pacienti s rozsiahlym expanzívnym hemisferiálnym infarktom postihujúcim minimálne 50% teritória arteria cerebri media. Operácia bola indikovaná najneskôr do 72 hodín od začiatku symptómov, ale pri progredujúcej klinickej deteriorácii z expanzívnych príčin v indikovaných prípadoch aj neskôr, bez ohľadu na stranu lézie. Bezprostredný predoperačný stav pacientov bol hodnotený podľa Glasgow Coma Scale (GCS) a cieleným neurologickým vyšetrením. Zákrok bol vykonaný štandardne u pacientov do 60 rokov veku. U pacientov vo vyššej vekovej skupine bola operácia vykonaná v indikovaných prípadoch po dôslednej diagnostickej rozvahe spravidla za spoluúčasti príbuzných. U všetkých pacientov bola vykonaná dekompresívna kraniektómia na strane lézie a implantácia sensora intrakraniálneho tlaku. Všetci pacienti boli pooperačne liečení na oddelení intenzívnej medicíny. V nasledujúcich dňoch bola vykonávaná séria CT kontrol, pri známok klinického zlepšovania boli pacienti extubovaní a doliečovaní na neurochirurgickom alebo neurologickom oddelení. U pacientov bola už počas hospitalizácie vykonávaná intenzívna fyzioterapia, v ktorej sa pokračovalo po stabilizácii stavu v špecializovaných rehabilitačných zariadeniach. Reimplantácia kostenného laloka sa vykonávala plánovane z časovým odstupom niekoľkých týždňov až mesiacov. Ročná pooperačná kontrola bola

vykonaná u všetkých prežívajúcich pacientov spravidla ambulantne alebo telefonicky po kontakte s najbližšou osobou pacienta, klinický stav bol hodnotený dotazníkom pre Barthelov index (BI).

Výsledky

V prvej fáze štúdie medzi októbrom 2005 a júlom 2009 bola u 20 pacientov v pomere muži:ženy 3:2 s priemerným vekom 60 rokov (44 až 75 rokov) vykonaná dekompresívna kraniektómia na strane lézie. Predoperačné Glasgow Coma Scale (GCS) bolo u 13 pacientov 9–12, u 4 pacientov >12, u 3 pacientov <9. 11 pacientov bolo operovaných do 24 hodín, 9 pacientov po 24 hodinách. U 4 pacientov sa vykonala operácia po 4 dňoch. U 8 pacientov bola vykonaná predoperačne systémová trombolýza.

20% pacientov malo Barthelov index nad 60 (1 pacient 100, 2 pacienti 85, 1 pacient 70), 35% Barthel index 20 – 60 (odkázaní na opatrovanie ale nie vo vegetatívnom stave). Mortalita bola 35%.



Skratky: BI – Barthelov index, mRS – modifikovaná Rankinova škála

Diskusia

Pacienti s najlepším výsledkom boli mladší ako 60 rokov, mali predoperačné GCS priemerne 12 a boli operovaní do 24 hodín. Výsledky práce potvrdili závery novších štúdii, že prežívanie a dobrý neurologický výsledok chirurgickej liečby expanzívneho hemisferiálneho infarktu sa dá očakávať u mladších pacientov (do 60 rokov), nezávisle na strane ischémie a operovaných skoro (do 48 hodín od začiatku symptómov), avšak ešte pred manifestáciou neurologických známok kmeňovej kompresie. Dekompresívna kraniektómia je takto u vybranej skupiny pacientov s expanzívnym hemisferiálnym infarktom efektívnou liečebnou metódou jednoznačne zlepšujúcou prognózu.

Použitá literatúra

1. Vahedi et al. (Sequential-Design, Multicenter, Randomized, Controlled Trial of Early Decompressive Craniectomy in Malignant Middle Cerebral Artery Infarction - DECIMAL Trial) Stroke 2007;38;2506-2517
2. Jüttler et al. (Decompressive Surgery for the Treatment of Malignant Infarction of the Middle Cerebral Artery (DESTINY). A Randomized, Controlled Trial) Stroke 2007;38:2518-2525
3. Hofmeijer et al. (Surgical decompression for space-occupying cerebral infarction (the Hemicraniectomy After Middle Cerebral Artery infarction with Life-threatening Edema Trial [HAMLET]): a multicentre, open, randomised trial) Lancet Neurol 2009; 8: 326–333
4. Vahedi et al. (Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials) Lancet Neurol 2007; 6: 215–222

41. Predbežné výsledky sledovania neuroendokrinných zmien u kriticky chorých pacientov.

MUDr. Andrea Gálusová[1]
(Normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Doc. MUDr. Milan Májek,CSc.[1], MUDr. Jaroslava Macková[1],
MUDr. Richard Imrich,PhD.[2], MUDr. Miroslav Vlček,PhD.[2]
Školiteľ: MUDr. Adela Penesová,PhD.[2]
[1]Klinika anestéziológie a intenzívnej medicíny SZU UNB, Nemocnica akad. L. Dérera
[2]Slovenská Akadémia Vied, Bratislava, Ústav experimentálnej endokrinológie

Úvod

Kriticky chorí pacienti predstavujú nehomogénnu skupinu pacientov, kde život ohrozujúci stav je navodený rôznorodými život ohrozujúcimi ochoreniami alebo stavmi (napr. trauma, popáleniny, chirurgický zákrok, zápal), ktoré navodzujú stav kritického stresu (Müller B. 2007).

Cieľom štúdie je sledovať dynamické zmeny neuroendokrinných parametrov u pacientov kriticky chorých počas prvých hodín od vzniku akútnej orgánovej dysfunkcie, napojenia pacienta na umelú pľúcnu ventiláciu, v súvislosti so zmenami v metabolizme, imunitnej odpovedi a klinickému stavu. Predpokladaný význam spočíva v možnosti odhalenia skorých markerov pľúcneho poškodenia, v skorej diagnostike a ovplyvnení liečby, eventuálne morbi/mortality pacientov.

Materiál a metódy

Pacienti s izolovanou kraniocerebrálnou traumou, polytraumatizovaní pacienti, pacienti po kardiopulmonálnej resuscitácii, septickí pacienti, vyžadujúci umelú pľúcnu ventiláciu (UPV) prijatí na Kliniku anestéziológie a intenzívnej medicíny (KAIM). Počas pobytu na KAIM budú sledované parametre ako je klinický stav pacienta, stav vedomia, APACHE II skóre kritickosti stavu, skóre závažnosti postihnutia (ISS), skóre orgánového postihnutia pri sepse (SOFA), použitý ventilačný režim, zápalové markery. Okrem toho sa pacientovi odobrali vzorky krvi na vyšetrenie biochemických krvných a neuroendokrinných parametrov (krvný obraz, hemokoagulačné vyšetrenie, biochémia, zápalové a imunitné parametre)

Výsledky

Celkovo sme doteraz sledovali 21 pacientov prijatých na KAIM (10 pacientov s polytraumou, 2 pacientov so sepsou, 2 pacientov po kardiopulmonálnej resuscitácii, 5 pacientov s izolovaným kraniocerebrálnym poranením, 1 pacienta s ťažkou hyponatrémiou a bezvedomím, 1 pacientku po transplantácii pečene, priemerný vek ± SD : 45 ± 18 r.), ktorí vyžadovali UPV.

	1.deň po prijatí	Po 48-tich hodinách	Po 7.dňoch
APACHE II	14,7 bodov	12,95 bodov	11,07 bodov
UPV	100%	90%	30%
analgosedácia	100%	90%	10%
farmakologická podpora cirkulácie	100%	95%	10%
p_aO_2/FiO_2	< 350	< 400	> 400
PCT	7,59	3,97	1,36
CRP	88,98	109,63	74,4

Tab.1: **Klinická charakteristika sledovaných kriticky chorých pacientov.**
UPV– umelá pľúcna ventilácia, APACHE II- Acute physiology and chronic health evaluation, CRP- C- reaktívny proteín, PCT – prokalcitonín, p_aO_2 - parciálny tlak kyslíka v arteriálnej krvi, FiO_2- frakcia inspirovaného kyslíka

Diskusia:

Cieľom štúdie je sledovať dynamiku endokrinných zmien (1) v súvislosti so zápalovými parametrami a klinickým stavom v organizme kriticky chorého, ktoré súvisia s druhom poranenia, počtom združených poranení, pridružených infekcií eventuálne prítomných chronických ochorení, sledované parametre vyhodnocujeme po 24, 48, 72 hodinách a 7.dňoch. Stresová hormonálna dysbalancia výrazne ovplyvňuje klinický stav pacienta a úzko súvisí s možnosťou jeho kompenzačných mechanizmov. Sledované zápalové markery (CRP, PCT) nám poukazujú na rozsah poranení v organizme, pri vzostupe v priebehu hospitalizácie taktiež na pridružené infekcie eventuálne na systémovú zápalovú odpoveď.

Vzhľadom na časovú náročnosť momentálne prebieha hlavne zber klinických dát a vzoriek krvi od kriticky chorých pacientov, komplexne hodnotíme skórovacími systémami náročnosť kritickosti stavu eventuálne orgánové postihnutie.

Počas realizovanej štúdie sme komplexne zhodnotili klinický stav prijatého pacienta s poruchou vedomia a laboratórne potvrdenou ťažkou hyponatrémiou, ktorú prezentujeme ako zaujímavú kazuistiku.

Jednalo sa o 35-ročného muža s mentálnou retardáciou, dlhodobo na liečbe Carbamazepínom pre výskyt tonicko-klonických kŕčov. Pacient bol prijatý s poruchou vedomia, intermitentne prítomnými tonicko-klonickými kŕčmi, spontánne dýchajúci cez orotracheálnu kanylu, ktorá bola zavedená pre nutnosť zaistenia dýchacích ciest pri poruche vedomia. Cirkulačne bol pacient stabilizovaný, afebrilný, bez ventilačnej insuficiencie, eupnoický. V náleze s poruchou vedomia dominovala ťažká hyponatrémia (Na^+ 105,1 mmol/l). Vzhľadom na klinickú symptomatológiu a dlhodobú antipsychotickú (Levopromazin) a antikonvulzívnu (Carbamazepín) liečbu sme zisťovali možný vplyv chronickej medikácie na klinický stav a laboratórne parametre pacienta. Diferenciálne diagnosticky je popisovaná u psychiatrických pacientov polydispsia a polyúria. Vzhľadom na aktuálny klinický stav pacienta a prítomnú ťažkú mentálnu retardáciu (s nemožnosťou samostatnej existencie a obsluhy) sme možnosť polydipsie vylúčili. Genézu ťažkej hyponatrémie pripisujeme chronickej liečbe eventuálne predávkovaniu Carbamazepínom (aj s možnou interakciou pri podávaných diuretikách) (2). Laboratórne signifikantné nálezy ťažkej hyponatrémie, zníženej osmolality plazmy, pri normálnej renálnej a adrenálnej funkcii, svedčia pre možný syndróm neprimeranej sekrécie vasopresínu (SIADH). Našim laboratórnym skríningom sme nezistili signifikantne zmenené hodnoty vasopresínu (0,86 ng/ml prvý deň, 0,79 ng/ml na tretí deň) a SIADH sme ako príčinu hyponatrémie vylúčili. Na tretí deň dochádza k úprave hyponatrémie ako aj klinického stavu pacienta a hladina sodíka sa postupne normalizovala na 130,7 mmol/l). Príčinou ťažkej hyponatrémie bol pravdepodobne nežiaduci účinok liečby Carbamazepínom.

Podporené čiastočne grantom VEGA 2/0154/10 a VEGA 2/0084/12.

Použitá literatúra

1. Müller B. Endocrine aspects of critical illness. Ann Endocrinol (Paris). 2007 Sept, 68(4):290-8.Epub 2007 Jul 30. Review
2. Salawu F, Danburam A. Hyponatraemia during low-dose carbamazepine therapy. Ann Afr Med. 2007 Dec;6(4):207-8.

42. Bolestivé artropatie kolenného klbu: pilotné porovnanie efektu rádiosynoviortézy a lokálnej kortikoterapie

MUDr. Marika Vereb, FEBNM[1,2]
(vnútorné lekárstvo)

Spoluautori: MUDr. Lucia Kaliská, FEBNM[3]
Školiteľ: doc. MUDr. Soňa Balogová, PhD[4,5]
[1]Klinikum Kassel, Nuklearmedizin, Kassel, Nemecko, [2]Poliklinika Sekčov, Pracovisko nukleárnej medicíny, Wesper sro., Prešov, Slovenská Republika, [3]INMM, Pracovisko Banská Bystrica, PET CT Agel Diagnostic, Slovenská Republika, [4]ONM I.Internej kliniky UNB a LFUK, Nemocnica Staré mesto, Bratislava, Slovenská Republika, [5]Service de médecine nucléaire, Hôpital Tenon AP HP & Université Pierre et Marie Curie, Paris, Francúzsko

Úvod

Rádiosynovioortéza (RSO), často nazývaná ako rádiosynovectomia alebo radiačná synovectomia je bezpečná, neinvazívna, cca 40 rokov akceptovaná alternatíva chirurgickej synovektomie, špeciálne pri liečbe reumatoidnej artritis ale aj u iných kĺbových ochoreniach ako je psoriatická artritis, hemofilická artritis, aktivovaná arthróza či recidivujúci kĺbový výpotok pri nešpecifikovaných artropatiách. (1,2) Podľa dostupných literatúrnych údajov je terapeutický efekt (v zmysle ústupu bolesti a redukcie kĺbového výpotku) medzi 73±17%. (2) Vznik lokálnej malignity po aplikácii RSO nebol opísaný (3).

RSO spočíva v intraartikulárnom podaní nedifuzibilne viazaného beta-žiariča s cieľom lokálnej iradiácie a deštrukcie zápalom zmenenej synovie. Pri intrakavitálnej aplikácii vhodne zvoleného rádiofarmaka (v závislosti od veľkosti kĺbu) možno dosiahnuť optimálnu lokálnu iradiáciu synovie bez nežiadúcej celotelovej iradiácie. (4)

Na terapiu kolenného kĺbu se používa **ytrium ^{90}Y (**T1/2=2,7dňa, E_{bmax}=2,28MeV, vo formě citrátu), po aplikácii 222MBq **^{90}Y** do kolenného kĺbu dávka absorbovaná synoviou s plochou 150cm^2 v hĺbke 2.5mm zodpovedá 50Gy, pričom celotelová dávka len 0.16Gy. Dávka absorbovaná gonádami zodpovedá 11 μGy/MBq. (5)

Materiál a metódy

U vybratých pacientov s bolestivou artropatiou kolenného kĺbu bola realizovaná dvojfázová gamagrafia skeletu s 99mTc HDP. Pri pozitívnom gamagrafickom vyšetrení, v zmysle lokálnej hyperperfúzie kolenného kĺbu bola indikovaná rádiosynovioortéza.

Efekt liečby bol hodnotený 0-3 mesiacov pred RSO a 6 a 12 mesiacov po RSO, na základe subjektívneho hodnotenia bolesti v škále od 1 do 10 (1 vyjadruje stav bez bolesti a 10 stav najväčšej predstaviteľnej bolesti). Tab. č. 1

Dobrý efekt terapie považujeme ako pokles o >2 stupne v škále bolesti, ako aj ústup hyperperfúzie v kolennom kĺbe pri kontrolnej gamagrafii skeletu. Minimálny, alebo žiadny efekt na kolennom kĺbe hodnotíme ako nezmenený stupeň v 10-stupňovej škále bolesti, ako aj pretrvávajúcu hyperperfúziu pri kontrolnej gamagrafii skeletu.

V kontrolnej skupine boli pacienti s bolestivou artropatiou kolenného kĺbu, ktorí boli liečení intraartikulárnou aplikáciou kortikosteroidu (20-40mg Triamcinolone inj.) a identicky hodnotení na základe subjektívneho určenia bolesti v škále 1-10 (ako pri skupine RSO pacientov). Bez gamagrafického vyšetrenie skeletu.

Výsledky

Od r. 2003-2006 bolo na našom pracovisku vyšetrených a následne liečených 26 pacientov s 29 kolennými kĺbmi: reumatoidná artritis = 48% (14/29), aktivovaná arthróza = 36% (10/29), psoriatická artritis = 13% (4/29) a hemofilická artritis = 3% (1/29) s **^{90}Ytrium**, podaná aktivita 184 ± 4MBq, pohlavie: M/Ž 7/19, vek: 23-81 r., vekový priemer 59 rokov.

Subjektívne hodnotená úspešnosť liečby 6 a 12 mesiacov po rádiosynoviortéze bola v škále od 1-10. 12 mesiacov po intra-artikulárnej instilácii radiofarmaka respektívne kortikoidu do kolenného kĺbu bol pozorovaný lepší, zároveň dlhšie trvajúci efekt po rádiosynoviortéze ako po kortikoterapii, v zmysle poklesu bolesti (Tab. 1.) Objektívne hodnotenie efektu rádiosynoviortézy nie je k dispozícii, zvyčajne je akceptovaná dvojfázová gamagrafia skeletu, čo sme si určili ako golden standard. (Tab.2) Liečba rádiosynoviortézy bola považovaná za úspešnú v 69% (20/29), keď došlo k poklesu bolesti o >2 stupne za 6 mesiacov, respektívne v 75% (21/29) za 12 mesiacov, pričom mismatch medzi subjektívnym vyhodnotením bolesti pacienta a scintigrafickým vyšetrením bol 17% (5/29) s 2 falošne negatívnymi a 5 falošne pozitívnymi prípadmi (Tab. 3).

V skupine pacientov po kortikoterapii bolo sledované len subjektívne hodnotenia bolesti.

Intra-artikulárna instilácia do kolenného kĺbu	Bolesť 0-3 mes. pred RSO	Bolesť 6 mes. po RSO	Bolesť **12 mes. po RSO**
^{90}Ytrium (29 kĺbov)	**7** ± 2	**4** ± 2	**3** ± 2
Kortikosteroid (29 kĺbov)	**7** ± 2	**5** ± 2	**6** ± 2

Tab.1: Porovnanie účinku RSO s účinkom kostikosteroidov u kontrolnej skupiny pacientov, vyjadrené 10-stupňovou analógovou škálou bolesti (1 - vyjadruje stav bez bolesti a 10 - stav najväčšej predstaviteľnej bolesti)

Intra-artikulárna instilácia do kolenného kĺbu	Dvojfázová gamagrafia skeletu 0-3 mes. pred RSO	Dvojfázová gamagrafia skeletu 6 mes. po RSO	Dvojfázová gamagrafia skeletu 12 mes. po RSO
^{90}Ytrium (29 kĺbov)	lokálna hyperperfúzia 100% (29/29)	ústup hyperperfúzie 69% (20/29)	ústup hyperperfúzie 75% (21/29)
Kortikosteroid (29 kĺbov)	nevykonaná	nevykonaná	nevykonaná

Tab.2: Porovnanie účinku RSO s dvojfázovou gamagrafiou skeletu, na základe hodnotenia ústupu hyperperfúzie v postihnutom kĺbe. Skupina pacientov pred a po kortikoterapii gamagraficky vyšetrená nebola (navrhnutý postup nebol schváleny etickou komisiou)

Porovnanie účinku RSO	Match	Mismatch
Subjektívne vyhodnotenie bolesti	83% (24/29)	17% (5/29)
Scintigrafické vyšetrenie	2x falošne negatívny	5x falošne pozitívny

Tab.3: Porovnanie účinku rádiosynoviortézy medzi subjektívnym vyhodnotením bolesti pacienta so scintigrafickým vyšetrením skeletu

Nežiadúci účinok po RSO ako je lokálny opuch a prechodný vzostup bolesti bol zaznamenaný u 14% (4/29), ktorý do 7-10 dní ustúpil. U žiadneho pacienta po injekcii radiofarmaka nebola zaznamenaná nekróza kože.

Diskusia

V Európe sú pre použitie na RSO registrované:

^{169}**Erbium** - odporúčané pre matakarpo/metatarzo falangeálne kĺby a interfalangeálne kĺby
^{186}Renium - odporúčané pre ramenné, lakťové, zápästné kĺby ako aj bedrové, členkové a subtalárne kĺby, v poslednej dobe aj pra sakroiliakálne kĺby
^{90}**Ytrium** - (ako jediné rádiofarmakum registrované na Slovensku) odporúčané len pre kolenné kĺby, vrátane kolenných kĺbov po implantácii totálnej endoprotézy.

RSO je bezpečná terapeutická metóda, ktorá na Slovensku zatiaľ nepatrí medzi bežne indikované a dostupné nuklearisické postupy. Multidisciplinárnou spoluprácou (s ortopédom, reumatológom a hematológom) sa budeme snažiť, aby sa rádiosynoviortesis stala dostupnejšou, i keď cieľ, priblížiť sa k európskemu priemeru je asi veľmi trúfalý.

Podporené medzinárodným projektom IAEA

Použitá literatúra

1. Deutsch E, Brodack JW, Deutsch KF (1993) Radiation synovectomy revisited. Eur J Nucl Med 20: 1113-1127
2. Kresnik E, Mikosch P, Gallowitsch HJ, et al. Clinical outcome of radiosynoviorthesis: a meta-analysis including 2190 treated joints. Nucl Med Commun 2002;23:683-688
3. Vuorela J, Sokka T, Pukkala E, Hannonen P. Does yttrium radiosynovectomy increase the risk of cancer in patients with rheumatoid arthritis? Ann Rheum Dis 62:57-64
4. Zuderman L, Liepe K, Zöphel K., Andreeff M, Kotzerke J, Luboldt W (2008) Radiosynoviorthesis (RSO): influencing factors and therapy monitoring. Ann Nucl Med 22:735-741
5. Dostupné na internete: http://www.sukl.sk/buxus/docs/download/SPC00041349.doc

43. Neuroendokrinné mechanizmy u začínajúceho kardiometabolického syndrómu

MUDr. Alexandra Garafová
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: MUDr. Richard Imrich, PhD, MUDr. Miroslav Vlček, PhD
Školiteľ: MUDr. Adela Penesová, PhD
Laboratórium endokrinológie človeka,Ústav experimentálnej endokrinológie SAV, Bratislava

Úvod

Názvom kardiometabolický, alebo metabolický syndróm (MS) označujeme kombináciu ochorení alebo metabolických abnormalít, ktoré sa vyskytujú spoločne a v konečnom dôsledku predstavujú významný rizikový faktor aterosklerózy, vzniku kardiovaskulárnych ochorení a diabetu mellitu 2. typu. Základnými komponentmi MS sú inzulinorezistencia, centrálna obezita, dyslipidémia, hypertenzia, subklinická zápalová reakcia a hypofibrinolytický stav. Vedecké štúdie poukazujú na to, že pri vzniku a progresii metabolického syndrómu zohráva dôležitú úlohu i neuroendokrinný systém, ktorého zvýšenú aktivitu pozorujeme v súvislosti so vznikom hypertenzie, inzulínovej rezistencie a obezity .(Grassi, 1999)

Cieľom práce bolo klinicky charakterizovať pacientov so začínajúcim kardiometabolickým syndrómom, jednak mladých pacientov s esenciálnou hypertenziou I. stupňa bez obezity (s body mass indexom- BMI<25 kg/m^2; HT), a obéznych inak zdravých jedincov (s BMI>30 kg/m^2, OB) v porovnaní so zdravými kontrolami bez obezity alebo nadváhy (s BMI <25 kg/m^2 , K). Cieľom práce bolo taktiež zhodnotiť odpoveď autonómneho nervového systému (ANS) na vybrané stresové podnety ako aj vybrané metabolické parametre.

Materiál a metódy

Celkovo sme doposiaľ vyšetrili 13 pacientov s HT, 8 jedincov s OB a 9 kontrol. Súbor tvorili muži vo veku od 18 do 35 rokov. Sledovali sme antropometrické ukazovatele ako je telesná hmotnosť, výška, z ktorých sme vypočítali BMI. Okrem toho sme merali obvod pásu a percento telesného tuku (bioimpedačnou metódou, OMRON BF 508).Odpoveď ANS sme sledovali počas mentálneho stresu (Stroopov test) v trvaní 10 min. Pred a počas testusme zaznamenávali hodnoty tlaku krvi (TK) ako aj pulzovú frekvenciu (Dinamap, Critikon Inc., USA), kontinuálne sme zaznamenávali EKG (PowerLab) a pomocou softwaru sme vyhodnocovali variabilitu srdcovej frekvencie (HRV). Odoberali sme vzorky krvi na analýzu stresových hormónov (adrenalín, noradrenalín). Metabolické parametre sme hodnotili z bazálnych vzoriek krvi (glykémiu, hladinu inzulínu, ako aj počas orálneho glukózového tolerančného testu (oGTT). Vypočítali sme index inzulínovej rezistencie IR HOMA. Na štatistické hodnotenie sme použili jednocestnú analýzu variancie (ANOVA) a ANOVA pre opakované meranie v čase.

Výsledky

Pacienti s hypertenziou a obézny pacienti majú vyššie hodnoty BMI a percento telesného tuku v porovnaní so zdravými kontrolami. Podľa očakávania, štatistické hodnotenie preukázalo signifikatne vyšší bazálny systolický a diastolický TK v skupine pacientov s HT a v skupine pacientov s OB v porovnaní s kontrolami. Mentálny stres viedol k vzostupu systolického TK u kontrol aj pacientov s HT, pokým u pacientov s OB sme nezaznamenali žiadnu zmenu. U pacientov s HT a kontrol nemal stres signifikantý vplyv na zmenu diastolického tlaku, u pacientov s OB sme však pozorovali jeho

pokles. Hodnoty pulzovej frekvencie boli u všetkých troch skupín porovnateľné pred i po strese. Hodnotenie HRV paradoxne preukázalo zvýšenie LF v skupine kontrol ako na začiatku, tak aj na konci Stroopovho testu v porovnaní so skupinou HT. V hodnotách HF a LF/HF nedošlo k zmenám ani medzi skupinami ani v čase.

Tab.1: Klinická charakteristika súboru. Hodnoty sú uvedené ako priemer a smerodajná odchýlka (SD)

	K (n=9)	HT (n=13)	OB (n=8)	Štatistika
Vek (r.)	24 ± 5	25 ± 5	31 ± 2***	*** p<0.001 vs. K
BMI (kg/m2)	22,8 ± 2	28 ± 6*	34 ± 4 ***	* p<0.05 vs. K *** p<0.001 vs. K
Percento telesného tuku (%)	17 ± 5	27 ± 9*	32 ± 7***	* p<0.05 vs. K *** p<0.001 vs. K
Obvod pásu (cm)	83,3 ± 6,8	94,9 ± 13,99	109,9 ± 10,4***	*** p<0.001 vs. K
TKSYS (mmHg)	123 ± 16	146 ± 12*	136 ± 11***	* p<0.05 vs. K *** p<0.001 vs. K
TKDIA (mmHg)	65 ± 9	81 ±7***	80 ± 12***	*** p<0.001 vs. K
Pulz –30 min (1/min)	72 ± 16	75 ± 10	79 ± 9	NS
TKSYS Stroop (mmHg)	127 ± 10	153 ± 13***	134 ± 17	*** p<0.001 vs. K
TKDIA Stroop (mmHg)	70 ± 8	86 ± 7***	80 ± 14	*** p<0.001 vs. K
Pulz Stroop (1/min)	69 ± 11	71 ± 10	79 ± 12	NS
LF (ms2)	2048,8 ±975,8**	927,5 ± 494,02	1457,0 ± 1046,6	** p<0,01 vs. HT
HF (ms2)	2876,5 ± 5483,2	339,7 ± 216,5	227,8 ± 123,9	NS
LF/HF	2,6 ± 1,5	3,4 ± 1,9	6,9 ± 3,7	NS
LF Stroop (ms2)	2757,7±1620,1*	1267,3 ± 725,4	1271,6 ± 876,3	* p<0.05 vs. HT
HF Stroop(ms2)	1720,9 ± 2304,6	494,1 ± 470,1	225,4 ± 128,5	NS
LF/HF Stroop	2,7 ± 1,05	3,6 ± 1,8	5,6 ± 2,8	NS

TK_{SYS}- systolický tlak v pokoji, TK_{DIA}- diastolický tlak v pokoji, TK_{SYS} Stroop- systolický tlak na konci Sroopovho testu, TK_{DIA} Stroop- diastolický tlak na konci Stroopovho testu, LF- low frequency, spektrálny výkon v nízkofrekvenčnom pásme v pokoji, HF- high frequency, spektrálny výkon vo vysokofrekvenčnom pásme v pokoji, LF/HF- v pokoji, LF Stroop, HF Stroop, LF/HF Stroop- na konci Stroopovho testu

Diskusia

U obéznych inak zdravých pacientov pozorujeme zvýšené hodnoty systolického i diastolického tlaku už za pokojových podmienok, pacienti vykazujú známky MS. Výsledky u nich naznačujú aj na zmenenú, resp. nedostatočnú odpoveď ANS počas mentálneho stresu. Paradoxne u pacientov s HT, u

ktorých sme zaznamenali normálnu telesnú hmotnosť, prípadne miernu nadváhu, nepozorujeme iné známky prejavov MS. Hodnoty inzulinémie a glykémie sa budú merať priebežne. Presnejšie závery budeme môcť poskytnúť po analýze stresových hormónov (adrenalín, noradrenalín).

Podporené čiastočne grantom VEGA č. 2/0154/10, APVV APVV- 0028-10

Použitá literatúra

1. Grassi G, Esler M: How to assess sympathetic activity in humans. J Hypertens. 17(6):719-34, 1999
2. Hulín I, eds. Patofyziológia, 6.vydanie. Bratislava, SAP. 2002, 1-1397.

44. Vplyv dennej aeróbnej fyzickej aktivity na koncentrácie podtried lipoproteínov vysokej, intermediárnej a nízkej denzity stanovených metódou elektrogorézy v polyakrylamidovom géle

MUDr. Peter Sabaka[1]
(Vnútorné choroby)

Školiteľ: doc. MUDr. Stanislav Oravec CSc.[1]
Konzultant: prof. MUDr. Andrej Dukát CSc. FRCP[1]
[1]II. interná klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave

Úvod:

Zmeny lipoproteínového profilu pod vplyvom pravidelnej aeróbnej fyzickej aktivity sa významne podieľajú na jej pozitívnom vplyve na kardiovaskulárnu morbiditu a mortalitu. Je známi najmä efekt cvičenia na koncentráciu celkového HDL cholesterolu a zníženia priemernej veľkosti LDL častíc, ktorá je významne asociovaná s rizikom kardiovaskulárnych ochorení (5). Zmeny distribúcie HDL a IDL častíc z hľadiska ich podtried však doposiaľ neboli dostatočne prebádané. Keďže jednotlivé podtriedy IDL a HDL nie sú rovnocenné z hľadiska biologických vlastností a z hľadiska asociácie s kardiovaskulárnym rizikom (1,5,6), je možné predpokladať, že prípadné zmeny distribúcie IDL a HDL podtried pod vplyvom aeróbnej aktivity sa môžu podieľať na jej priaznivom efekte na kardiovaskulárne riziko.

Metódy:

Zdravý jedinci (n=15) vo veku do 30 rokov vykonávali 30 minút nepretržitej fyzickej aktivity strednej intenzity (nepretržitý poklus) denne po dobu 14 dní. Probandi zaradený do vyhodnocovania museli absolvovať cvičenie o trvaní minimálne 90% požadovaného času. Pred zahájením a po ukončení tréningového obdobia (deň 1 a deň 14) boli koncentrácie lipoproteínových tried a podtried podtried stanovené metódou lineárnej elektroforézy v polyakrylamidovom gély Quantimetrix Lipoprint LDL systém a Quantimetrix Lipoprint HDL systém. Stanovované a porovnávané boli koncentrácie VLDL, 3 podtriedy IDL (malé, stredné a veľké), 3 podtriedy LDL (malé, stredné a veľké) a 3 podtreidy HDL (malé, stredné a veľké) (1,3,4). Koncentrácie lipoproteínových tried a podtried pred a po ukončení tréningového obdobia boli porovnané s využitím Wilcoxonovho párového testu.

Výsledky:

Požadovaný tréningový protokol ukončilo 15 probandov (10 mužov, 5 žien). Po štrnástich dňoch cvičenia došlo k poklesu koncentrácie podtriedy aterogénnych LDL častíc strednej veľkosti ($p<0,001$) s k vymiznutiu malých denzných LDL u všetkých probandov u ktorých boli prítomné pred začiatkom tréningového režimu (n=6). Taktiež došlo k poklesu priemernej koncentrácie VLDL ($p<0,05$). V oblasti častíc intermediárnej denzity bol zaznamenaný štatisticky významný pokles podtriedy veľkých IDL, ktorá predstavuje aterogénne VLDL remnanty ($p<0,05$). Zmena celkovej koncentrácie HDL častíc nebola zaznamenaná, no došlo k zmene ich distribúcie v zmysle zníženia koncentrácie HDL strednej veľkosti ($p<0,05$).

Diskusia:

V súlade s výsledkami predošlých prác bol zistený pokles koncentrácie VLDL a malých LDL častíc (5). Dôležitým zistením je, že po štrnástich dňoch pravidelného aeróbneho cvičenia dochádza k významným zmenám v oblasti podtried IDL a HDL. Zaznamenaný bol pokles veľkých IDL (MID C podľa metódy Lipoprint) predstavujúce VLDL remnanty, ktoré zrejme nesú významný aterogénny potenciál (6). Rovnako poklesla koncentrácia HDL častíc strednej veľkosti, u ktorých bola dokázaná asociácia so zvýšeným rizikom infarktu myokardu v mladom veku (1,3). To sa odrazilo na zvýšení relatívnej koncentrácie protektívnych veľkých HDL častíc. V literatúre bol opísaný vzostup priemernej veľkosti HDL častíc, ktorý môže byť spôsobený aj poklesom koncentrácie HDL strednej veľkosti v prospech relatívneho vzostupu veľkých HDL (5). Je teda možné zhrnúť, že denná aeróbna fyzická aktivita už po 14 dňoch vedie k významným zmenám koncentrácie lipoproteínových podtried nielen v oblasti LDL a VLDL, ale aj k poklesu koncentrácie VLDL remnantov a HDL častíc strednej veľkosti, čo sa môže spolupodieľať na priaznivom vplyve fyzickej aktivity na kardiovaskulárne riziko.

	VLDL		**Veľké IDL**		**LDL strednej veľkosti**		**HDL strednej veľkosti**	
	deň 1	deň 15	deň 1	deň 15	deň 1	deň 15	deň 1	deň 15
Priemer	26,79	23,29	16,80	14,73	12,5	9,12	24,57	23,29
SD	7,2	5,64	3,67	3,65	5,08	3,98	4,09	2,2
p	p<0,05		p<0,05		p<0,001		p<0,05	

Tabuľka 1: koncentrácie lipoproteínových podtried v g/dcl pred zahájením (deň 1) a po ukončení štrnásťdňového tréningového obdobia (deň 15) pri ktorých došlo k štatisticky významnej zmene koncentrácií.

Použitá literatúra

1. Goliasch G, Oravec S, Blessberger H .a spol. Relative importance of different lipid risk factors for the development of myocardial infarction at a very young age (≤ 40 years of age). Eur J Clin Invest. 2011 Nov 10. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02629.x.
2. Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien JF, Branum EL, Sun D, Meissne I, McConnell J P. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the QuantimetrixLipoprint LDL System. Clin Chem. 2001;47(2):266-74.
3. Oravec S, Dostal E, Dukát A, Gavorník P, Kucera M, Gruber K. HDL subfractions analysis: a new laboratory diagnostic assay for patients with cardiovascular diseases and dyslipoproteinemia. Neuro Endocrinol Lett. 2011;32(4):502-9
4. Packard Ch., Caslake M., Shepherd J. The role of small, dense low density lipoprotein (LDL): a new look. Int. J. of Cardiol. 2000; 74:17–22.
5. Slentz CA, Houmard JA, Johnson JL a spol. , Inactivity, exercise training and detraining, and plasma lipoproteins. STRRIDE: a randomized, controlled study of exercise intensity and amount. *J Appl Physiol* 103: 432–442, 2007
6. Spiedel M, Booyse F, Abrams A, Moore MA, Chung BH. Lipolysed hypertriglyceridemic serum and trigylceride–rich lipoprotein cause lipid accumulation in and are cytotoxic to cultured human endothelial cells. Thromb Res. 1990;48:251–264.

45. Asociácia medzi kalcifikátmi brušnej aorty a vybranými parametrami kostného metabolizmu u pacientov s osteoporózou

MUDr. Štefan Balogh[1]
(vnútorné choroby)

Školiteľ: Doc. MUDr. Zdenko Killinger, PhD.[1]
[1] V. interná klinika LFUK a UN Bratislava

Úvod

Na základe histomorfologických štúdií sa predpokladá súvis medzi kostným metabolizmom a kalcifikačným procesom v cievnej stene.[1] Predpokladá sa nepriaznivý vplyv redukovaného cievneho prietoku na kostný metabolizmus, ako aj na kostnú denzitu.[2] Pokroky v oblasti zobrazovacej techniky umožnili pomocou denzitometrického prístroja hodnotiť okrem kostnej hmoty aj prítomnosť kalcifikátov brušnej aorty.[3] Cieľom práce bolo zistiť vzťah medzi kostným statusom hodnoteným pomocou kostnej denzity a markermi kostného obratu a prítomnosťou kalcifikátov brušnej aorty.

Metódy

V prospektívnej štúdii sme vyšetrili 56 žien s priemerným vekom 76,6 rokov, ktorým sme merali kostnú denzitu v oblasti L-chrbtice a proximálneho femuru DXA metódou (Hologic Discovery). Kalcifikáty abdominálnej aorty sme zobrazili pomocou bočného DXA skenu, a vyhodnotili sme ich kalcifikačným skórovacím systémom AAC-24. Hodnotili sme antropometrické hodnoty (váha, obvod pásu, BMI), vyšetrili sme markery kostného obratu (osteokalcín,P1NP, CTX) a kalcio-fosfátového metabolizmu. Hodnotili sme korelácie medzi kalcifikátmi abdominálnej aorty a antropometrickými parametrami, markermi kostného obratu a kostnou denzitou pomocou nepárového T-testu resp. Mann-Witneyho testom u parametrov s nerovnomernou distribúciou hodnôt.

Výsledky

Zistili sme štatisticky významnú pozitívnu koreláciu závažnosti kalcifikátov abdominálnej aorty s vekom (p 0,0506), trvaním menopauzy (p 0,0319). Z antropometrických parametrov s váhou (p 0,0497) a BMI (0,0433). Z parametrov kostného obratu sme potvrdili signifikantne pozitívnu asociáciu medzi stupňom kalcifikácií a s markermi kostnej formácie (osteokalcín p 0,0263, P1NP p 0,0027) a markerom kostnej resorpcie (CTX p 0,046). Zistili sme signifikantne pozitívnu koreláciu medzi kostnou denzitou a obvodom pásu (p 0,0027), hladinou vápniku (p 0,0234) a fosforu (p 0,0442). U pacientov s kalcifikačným skóre AAC-24 nad 5 sme pozorovali vyššie hodnoty kostnej denzity.

	váha	BMI	Osteokalcín	P1NP	CTX
AAC24 pod 5	61,66667	24,3	14,63571	32,98286	418,1875
AAC24 nad 5 vrátane	71,55319	28,08723	25,37318	59,91119	626,1968
Korelácia	**p 0,0497**	**p 0,0433**	**p 0,0263**	**p 0,0027**	**p 0,046**

Tab. 1: Korelácia medzi kalcifikačným skóre a antropometrickými i biochemickými parametrami. BMI – body mass index, P1NP – terminálny propeptid prokolagénu typu 1, CTX - carboxy-terminal collagen crosslinks, AAC – abdominal aortic calcifications



Obr. 1: Kalcifikáty abdominálnej aorty zobrazené pomocou bočného DXA skenu. šípky – kalcifikované pláty

Diskusia

V našej štúdii sme zistili signifikantnú pozitívnu koreláciu rozsahu kalcifikátov abdominálnej aorty s hladinou markerov kostného metabolizmu. Nezistili sme signifikantný rozdiel v hodnotách kostnej denzity chrbtice medzi pacientami s nízkym a vysokým kalcifikačným skóre. Signifikantne nižšie hodnoty kostnej hustoty v oblasti proximálneho femuru v porovnaní s chrbticou u pacientov

s mimoriadne rozsiahlymi kalcifikátmi (AAC skóre nad 16) potvrdzujú teóriu Baggera a spol. o osteoporóze pri obmedzenom prietoku krvi koncovými skeletálnymi artériami v dôsledku aterosklerotických zmien.

Nesignifikantnú koreláciu kalcifikátov s kostnou denzitou napriek významnej asociácii obidvoch procesov s markermi kostného metabolizmu možno vysvetliť tým, že kostné markery odzrkadľujú aktuálny stav kostného metabolizmu, ale vývoj samotnej osteoporózy s poklesom kostnej hustoty vyžaduje dlhšie obdobie a je ovplyvnené aj inými faktormi. Preto hlavne u mladších pacientov, resp. s kratším doterajším trvaním menopauzy zmeny kostnej denzity neboli dostatočne výrazné.

Pri tejto metóde musíme pripomenúť aj jej limtácie vyplývajúce z anatomických pomerov v dutine brušnej, polohovania pacienta, aj z kvality zhotovenej snímky. Ďalším skresľujúcim faktorom môžu byť rozsiahlejšie kalcifikáty, ktoré arteficiálne zlepšujú hodnotu kostnej hustoty v oblasti chrbtice ich sumáciou so stavcami vo výslednom AP (antero-posteriórnom) obraze.

Doterajšie štúdie [4] ako aj naše výsledky poukazujú na možný súvis medzi kostným metabolizmom, denzitou a závažnosťou kalcifikačných zmien abdominálnej aorty.

Použitá literatúra

1. Demer LL , Tintut Y. Mechanisms Linking Osteoporosis With Cardiovascular Calcifi cation. Current Osteoporosis Reports 2009; 7:42–46.
2. Bagger YZ, Tankó LB , Alexandersen P a spol. Radiographic measure of aorta calcification is a site-specific predictor of bone loss and fracture risk at the hip. Journal of Internal Medicine 2006; 259: 598–605.
3. Wilson KE. Detection of Abdominal Aortic Calcification with IVA. W-158 US/INTL 2006.
4. Balogh Š, Killinger Z, Čierny D a spol. Význam hodnotenia kalcifikátov abdominálnej aorty metódou bočného denzitometrického skenu pri stanovení kardiovaskulárneho rizika u pacientov s osteoporózou. Interná Medicína, Samedi, 10/1010: 595-598.

46. Jednoduché antropometrické indexy potenciálne využiteľné pri diagnostike celkovej a abdominálnej obezity u mladistvých

Mgr. Radana Kollárová [1]
(normálna a patologická fyziológia)

Školiteľ: doc. MUDr. Katarína Šebeková, DrSc.[1]
[1] Ústav molekulárnej biomedicíny, LF UK

Úvod

Obezita - nadbytok tukového tkaniva v organizme - je najčastejšie sa vyskytujúcim metabolickým ochorením 21. storočia. Svetová zdravotnícka organizácia ju označila za najväčší zdravotný problém na celom svete, a varuje pred globálnou epidémiou. V súčasnosti sa stáva obezita závažným zdravotným problém nielen u dospelých, ale aj u detí a dospievajúcich (1,2), u ktorých spôsobuje ochorenia, ktoré sa donedávna považovali výlučne za ochorenia dospelých, ako napr. diabetes 2. typu a ateroskleróza.

U detí a dospievajúcich sa obezita prejavuje nárastom telesnej hmotnosti nad normálnu úroveň pre daného jedinca s ohľadom na vek, výšku a pohlavie. Hodnotí sa pomocou rastového indexu telesnej hmotnosti (body mass index, BMI). V súčasnosti odborná verejnosť na Slovensku uznáva Národné štandardy zverejnené Úradom verejného zdravotníctva z roku 2001 (www.uvzsr.sk, informácie: deti a mládež) - percentilové grafy (tabuľky) pre deti a dospievajúcich oboch pohlaví do 18 rokov.

Je však dokázané, že inzulínová rezistencia, hypertriacylglycerolémia a zvýšené riziko vzniku metabolického syndrómu a kardiovaskulárnych ochorení sa spája s obezitou hornej časti tela (tzv. abdominálna obezita, obezita androidného typu) (3). Vague a spol. doložili už pred temer 60 rokmi, že výskyt diabetu a aterosklerózy je vyšší u ľudí s obezitou androidného typu, v porovnaní so ženským typom gynoidnej obezity (4). Preto BMI používaný v klinike pri určovaní nadhmotnosti a obezity nie je vhodný na odhad metabolického rizika, a obzvlášť u detí a dospievajúcich má svoje obmedzenia (5,6). V ostatných rokoch sa preto zaviedli antropometrické indexy, ktoré zohľadňujú obezitu hornej časti tela - obvod pása, pomer pás/výška, pomer pás/boky, alebo obvod krku (6-9), ktoré lepšie korelujú s kardiometabolickým rizikom (7-9).

Projekt „Rešpekt pre zdravie“ inicioval Bratislavský samostatný kraj na stredných školách, ktorých je zriaďovateľom. Odborným garantom projektu je Regionálny úrad verejného zdravotníctva Bratislava. Hlavným cieľom projektu je prevencia kardio-metabolických a iných chronických ochorení. Projekt má charakter neintervenčnej, observačnej štúdie, ktorá zahŕňa zber epidemiologických údajov dotazníkmi, biochemické vyšetrenia zamerané na kardiometabolické rizikové faktory a antropometrické merania včítane testovania telesnej zdatnosti (Ruffierov test).

Nakoľko sa osobne zúčastňujem realizácie antropometrických meraní na školách, v predloženej práci analyzujem niektoré antropometrické údaje získané v roku 2011. Cieľom tejto predbežnej analýzy bolo zhodnotiť, ako jednoduché antropometrické ukazovatele (obvod pása, krku, resp. ich pomer k telesnej výške) korelujú s rastovým indexom telesnej hmotnosti a percentom celkového telesného a viscerálneho tuku, a či sa niektorý z jednoduchých ukazovateľov javí ako vhodný na odhad centrálnej obezity u mladistvých.

Materiál a metódy

Štúdiu schválila Etická komisia VÚC Bratislava. Podmienkou účasti je podpísanie informovaného súhlasu plnoletým probandom, u neplnoletých zákonným zástupcom.

Z 19172 mladistvých navštevujúcich v šk. r. 2011/2012 stredné školy, ktorých zriaďovateľom je Bratislavský samosprávny kraj, sa do štúdie prihlásilo 5234, vo veku 14-21 rokov. Analyzujem výsledky získané vyšetrením 939 probandov. Zber údajov bude pokračovať do decembra 2012.

Antropometrické merania sme v spolupráci so študentami Verejného zdravotníctva SZU vykonávali priamo na školách. Ovod krku sme merali ohybnou neelastickou ciachovanou páskou v mieste štítnej chrupavky, u probanda stojaceho so vzpriamenou hlavou pri pohľade vpred. Obvod pása sme merali vo vzpriamenom stoji, vo vodorovnej rovine v polovičnej vzdialenosti medzi spodným rebrom a hrebeňmi panvových kostí. Hmotnosť a percento telesného a viscerálneho tuku (bioimpedančnou metódou použitím 4 senzorov) sme merali digitálnou váhou s meračom telesného tuku Omron BF510.

Probandov sme podľa percentilových tabuliek BMI z roku 2001 zaradili do 4 kategórií: ako podhmotnosť sme označili BMI pod 10. percentilom, ako nadhmotnosť hodnotu BMI medzi 90. a 97. percentilom, ak BMI prekročilo 97. percentil, probanda sme klasifikovali ako obézneho. Hodnoty BMI medzi 10. a 90. percentilom sme považovali za normálnu hmotnosť. Probandov starších ako 18 rokov sme do kategórií zaradili podľa noriem platných pre dospelých (podhmotnosť: BMI < 19,9; normálna hmotnosť: BMI od 20 do 24,9; nadhmotnosť: BMI od 25 do 29,9; obezita: BMI > 30). Vypočítali sme pomer krk/výška a pás/výška.

Štyri skupiny (podľa BMI) sme vzájomne porovnávali jednoduchou analýzou rozptylu (ANOVA) s post-hoc Bonferoniho testom. Korelácie sme vyhodnocovali metódou lineárnej regresie Pearsonovým testom. Teoretickú a aktuálne zistenú distribúciu probandov do 4 kategórií podľa BMI sme porovnávali pomocou χ-kvadrát testu. Za významné sme považovali $p<0,05$. Na štatistické hodnotenie sme použili program Microsoft Excel a SPSS v.16.

Výsledky

Z 939 vyšetrených probandov (18 % prihlásených) tvorili 44 % chlapci a 56 % dievčatá. Po rozdelení do 4 kategórií podľa percentilových tabuliek pre BMI sme zistili, že v našom súbore je 3,9 % chlapcov a 7,8 % dievčat s podhmotnosťou, normálnu hmotnosť má 76,3 % chlapcov a 82,5 % dievčat, nadhmotnosť sme zistili u 10,2 % chlapcov a 5,5 % dievčat, a obezitou trpelo 9,7 % chlapcov a 4,2 % dievčat. Ak porovnáme teoreticky očakávané početnosti vyplývajúce z kategorizácie podľa Národných štandardov so zistenými početnosťami v 4 kategóriách χ-kvadrát testom, ani u chlapcov ($p=0,07$), ani u dievčat ($p=0,93$) nie sú významné rozdiely v distribúcii. Pri zlúčení kategórií nadhmotnosť a obezita (teda porovnaním distribúcie v 3 kategóriách) sa však v našom súbore nachádza viac chlapcov s nadhmotosťou a obezitou ($p=0,05$), ako by zodpovedalo tabuľkovej distribúcii. U dievčat sme rozdiel nezistili ($p=0,88$).

Zisťovali sme vzťahy medzi obvodom krku, pásu, a pomermi pás/výška a krk/výška a percentom telesného tuku. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke č. 1a), kde uvádzame vypočítané korelačné koeficienty R vzhľadom na pohlavie, zvlášť u mladistvých mladších a starších ako 18 rokov. Obvod krku, pomer krk/výška a pomer pás/výška významne korelovali s percentom telesného tuku u oboch pohlaví v oboch vekových kategóriách. Najtesnejší vzťah bol vo všetkých kategóriách k pomeru obvod pása/výška, nasledovaný u chlapcov pomerom krk/výška, a u dievčat obvodom krku. Vo všetkých prípadoch však boli korelácie tesnejšie u mladistvých v staršej vekovej kategórii. Parameter obvod pása však s percentom tuku v žiadnej z kategórií nekoreloval.

Použitá váha má softvér na výpočet viscerálneho tuku obmedzený vekom $\geq$ 18 rokov. Percento viscerálneho tuku sme vyhodnotili u 91% 18-21-ročných chlapcov a u 90% dievčat - tabuľka 1b). Všetky parametre - obvod krku, pomer krk/výška, obvod pása aj pomer pás/výška - významne korelovali s percentom viscerálneho tuku u oboch pohlaví, a to tesnejšie v porovnaní s koreláciami s percentom telesného tuku. Najtesnejšie s viscerálnym tukom u dievčat aj u chlapcov koreluje pomer pás/výška, nasledované u chlapcov obvodom pása, a pomerom krk/výška, u dievčat je druhým najtesnejšie korelujúcim ukazovateľom pomer krk/výška.

Tabuľka 1

Tabuľka 1a): Korelačné koeficienty antrometrických indexov s percentom telesného tuku

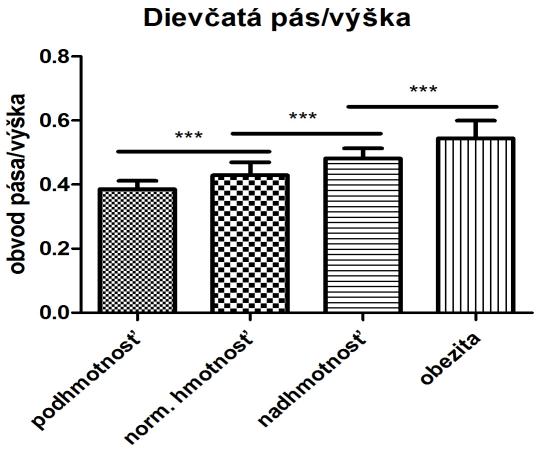
	Obvod krku	Krk/výška	Obvod pása	Pás/výška
Chlapci				
14-17 rokov, N=295	0,496***	0,511***	0,013	0,829***
18-21 rokov, N=118	0,625***	0,652***	-0,073	0,861***
Dievčatá				
14-17 rokov, N=355	0,529***	0,526***	0,006	0,713***
18-21 rokov, N=171	0,638***	0,613***	-0,001	0,748***
	*** *p<0,001*			

Tabuľka 1b): Korelačné koeficienty antrometrických indexov s percentom viscerálneho tuku

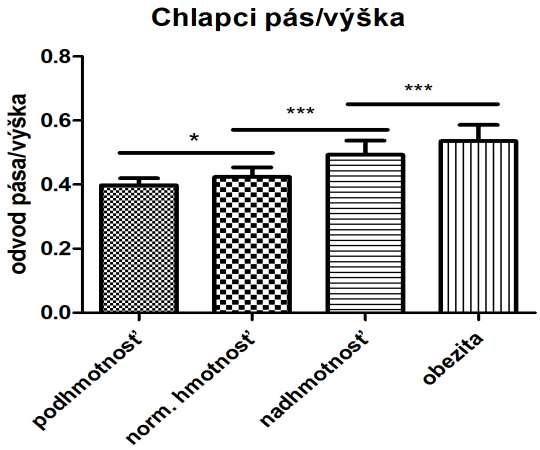
	Obvod krku	Krk/výška	Obvod pása	Pás/výška
Chlapci				
18-21 rokov, N=107	0,724***	0,754***	0,877***	0,900***
Dievčatá				
18-21 rokov, N=154	0,715***	0,740***	0,725***	0,773***
	*** *p<0,001*			

V ďalšom kroku sme analyzovali, či sa obvod krku, pomer pás/výška a krk/výška významne líšia v rámci pohlaví v jednotlivých kategóriách BMI. Analýza rozptylu poukázala na významné rozdiely ($p<0,0001$) medzi jednotlivými kategóriami BMI tak u chlapcov, ako aj u dievčat. Chlapci s podhmotnosťou a normálnou hmotnosťou, ako aj skupina s normálnou hmotnosťou a nadhmotnosťou, sa významne líšili obvodom krku, pomerom krk/výška aj pás/výška ($p<0,05$. Medzi chlapcami s nadhmotnosťou a obéznymi je významný rozdiel len v pomere pás/výška ($p<0,001$) - obr. 1a).

Vo všetkých troch pozorovaných parametroch sa významne odlišujú aj dievčatá s podhmotnosťou od dievčat s normálnou hmotnosťou, a tiež dievčatá s normálou hmotnosťou od tých s nadhmotnosťou ($p<0,001$). Dievčatá s nadhmotnosťou a obezitou sa významne líšia len v obvode krku ($p<0,05$) a v pomere pás/výška ($p<0,001$) - obr. 1b).



Obrázok 1a)



Obrázok 1b)

Obrázok 1: Pomer pás/výška v jednotlivých kategóriách BMI u dievčat - a) a chlapcov - b). ** p<0,05 ; *** p<0.001*

Diskusia

Klasifikácia podľa tabuliek Národných štandardov je prakticky náročná, nakoľko vypočítanú hodnotu BMI treba korigovať na vek a pohlavie, a t.č. podľa našich najlepších vedomostí nie je k dispozícii voľne prístupný počítačový program, pomocou ktorého by praktický lekár mohol rýchlo a jednoducho zaradiť pacienta. Ďalším problémom sú aj diskrepancie medzi tabuľkovými medznými hodnotami nadhmotnosti a obezity u mladistvých v porovnaní s dospelými, u ktorých sa nadhmotnosť a obezita kategorizuje bez ohľadu na vek a pohlavie. Naviac, uvedená klasifikácia neumožňuje odlíšenie prítomnosti centrálnej obezity.

Naše predbežné výsledky naznačujú, že jednoduché antropometrické parametre by mohli byť prakticky užitočné v klasifikácii centrálnej obezity u mladistvých. Pravdepodobne najvhodnejším ukazovateľom bude pomer pás/výška. Obvod krku, resp. jeho pomer k výške, by však mohol slúžiť ako alternatíva v prípade, že nie je možné spoľahlivo zmerať obvod pása. Či sú nami sledované ukazovatele centrálnej obezity vhodné pre klinickú prax, odhalí až analýza údajov po skončení projektu, keď budeme môcť vypočítať senzitivitu a špecifitu, pozitívne a negatívne prediktívne hodnoty, a plochy pod krivkami ROC (Receiver Operating Characteristic curve) analýzou správnej a falošnej pozitivity a správnej a falošnej negativity, vzhľadom na pohlavie a vek.

Poďakovanie

Ďakujem rodičom a deťom za ochotu zúčastniť sa štúdie, personálu stredných škôl na ktorých sme uskutočnili merania a študentom Verejného zdravotníctva SZU za spoluprácu pri meraniach, a najmä MUDr. Zore Gerovej, CSc. (ÚVZ, Bratislava) za uvedenie do problematiky, praktické zaučenie a koordináciu projektu.

Použitá literatúra

1. de Wilde JA, van Dommelen P, Middelkoop BJ, Verkerk PH: Trends in overweight and obesity prevalence in Dutch, Turkish, Moroccan and Surinamese South Asian children in the Netherlands. Arch Dis Child 2009; 94: 795-800.
2. Tzotzas T, Kapantais E, Tziomalos K et al: Epidemiological survey for the prevalence of overweight and abdominal obesity in Greek adolescents. Obesity (Silver Spring) 2008; 16: 1718-1722.
3. Kissebach AH, Vydelinqum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ: Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. J Clin Endocrinol Metab. 1982; 54: 254-260.
4. Vague J: The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. Am J Clin Nutr 1956; 4: 20-34.
5. Prentice AM, Jebb SA: Beyond body mass index. Obes Rev 2001; 2: 141-147.
6. Kahn HS, Imperatore G, Cheng YJ: A population-based comparison of BMI percentiles and waist-to-height ratio for identifying cardiovascular risk in youth. J Pediatr 2005; 146: 482-488.
7. Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S et al: Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. Am J Cardiol 1994; 73: 460-468.
8. Kunesova M, Hainer V, Hergetova H et al: Simple anthropometric measurements relation to body fat mass, visceral adipose tissue and risk factors of atherogenesis. Sb Lek 1995; 96: 257-267.

9. Hatipoglu N, Mazicioglu MM, Kurtoglu S, Kendirci M: Neck circumference: an additional tool of screening overweight and obesity in childhood. Eur J Pediatr 2010; 169: 733-739.

47. Stanovenie koncentrácie folátov v erytrocytoch a ich využitie v liečbe anémie u predčasne narodených novorodencov

MUDr. Tatiana Žikavská[1]
(pediatria)

Spoluautor: Bc. Margita Galliková[2]
Školiteľka: Doc. MUDr. Ingrid Brucknerová, PhD.[1]
[1] I. detská klinika LFUK a DFNsP Bratislava, [2] I. gynekologicko-pôrodnícka klinika UNB akademika L. Dérera Bratislava

Úvod

Kyselina listová a jej biologicky aktívne formy *foláty* sú súčasťou dôležitých biochemických procesov v organizme. Zúčastňujú sa syntézy nukleových kyselín, prenosu jednouhlíkových zvyškov a premeny serínu alebo metionínu (1). Potreba folátov rastie najmä v období zvýšených požiadaviek organizmu na rýchly telesný alebo bunkový rast.

Status folátov u dieťaťa zodpovedá nutričnému stavu ich matiek, ale je ovplyvnený aj gestačným vekom novorodenca, transplacentárnym prenosom, zásobami v organizme, ako aj výživou dieťaťa po narodení (2). Pri deficite folátov vzniká riziko rozvoja anémie, trombocytopénie a neutropénie (3).

Stanovenie koncentrácie folátov v erytrocytoch sa považuje za najpresnejší indikátor saturácie organizmu kyselinou listovou. Na rozdiel od stanovenia sérových hladín kyseliny listovej, ktorá odráža denné zmeny v organizme a vplyv stravy, je koncentrácia folátov v erytrocytoch odrazom dlhodobého procesu a zásob v organizme (4).

Hladina folátov predstavuje kľúčový faktor vplývajúci na rast plodu a novorodenca a preto je potrebné poznať skutočné koncentrácie folátov v organizme, čo následne umožňuje prispieť k určeniu adekvátnej liečby anémie u predčasne narodených novorodencov (5).

Materiál a metódy

Sledovaný súbor tvorilo 62 novorodencov. Z celkového počtu bolo 36 dievčat a 26 chlapcov. Išlo o fyziologických zdravých novorodencov hospitalizovaných na Novorodeneckom oddelení Univerzitnej nemocnice akademika L. Dérera v Bratislave. Súbor sme rozdelili do troch skupín podľa rôzneho gestačného veku (*skupina A: 35. - 37. gestačný týždeň*, n=9; *skupina B: 38.- 39. gestačný týždeň*, n=28; *skupina C: 40. - 41. gestačný týždeň*, n=25).

Vo všetkých troch skupinách boli stanovené koncentrácie folátov v erytrocytoch zo vzorky pupočníkovej krvi. Na analýzu folátov v erytrocytoch sme využili vytvorenie hemolyzátu (100 µl pupočníkovej krvi a 3 ml 0,2 % roztoku kyseliny askorbovej). Ďalším krokom bola inkubácia hemolyzátu, ktorá prebiehala po dobu 90 minút pri teplote 20-25°C. Hemolyzát bol následne umiestnený do vzorkovej oblasti analyzátora ELECSYS s využitím komerčných setov Folate III *(Roche Slovensko)*. Analýza folátov v erytrocytoch prebiehala elektrochemiluminiscenčnou metódou, pri ktorej sa využíva značenie ruthéniovým chelátom.

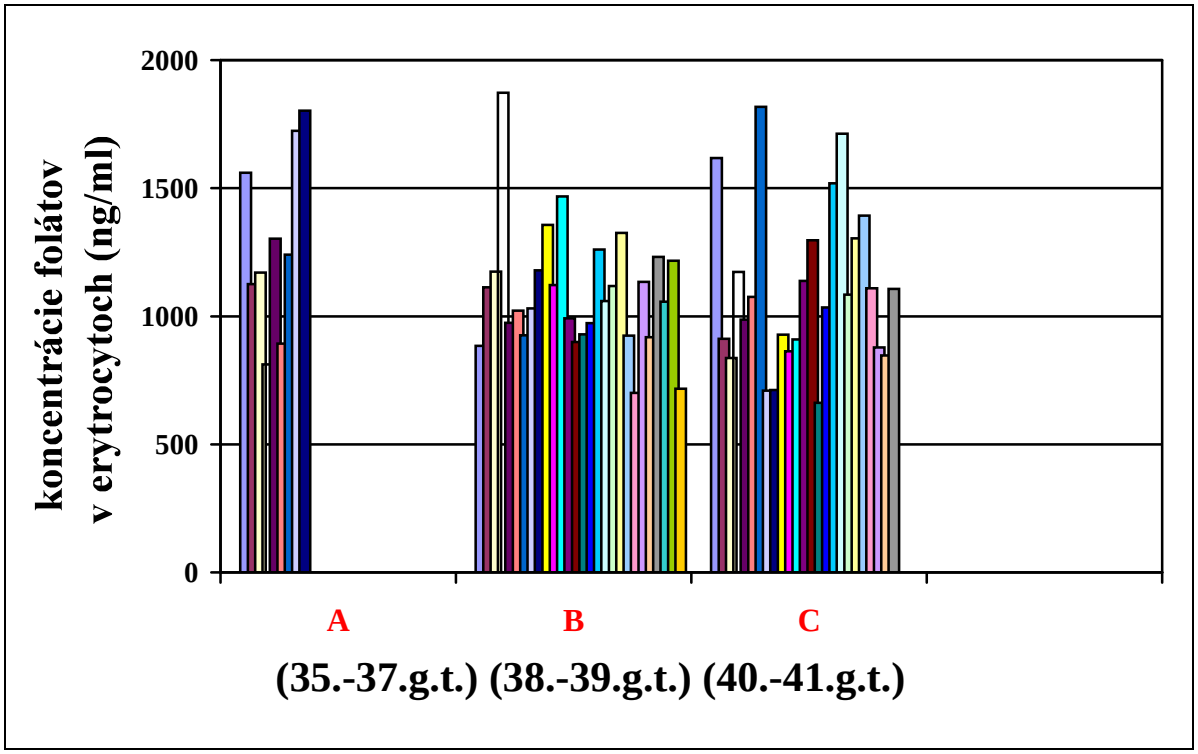
Výsledky

V súbore 62 novorodencov boli koncentrácie folátov v uvedených skupinách: v ***skupine A*** boli hodnoty folátov v erytrocytoch v rozpätí 812,02 - 1802,09 ng/ml, v ***skupine B*** 700,56 - 1872,16 ng/ml

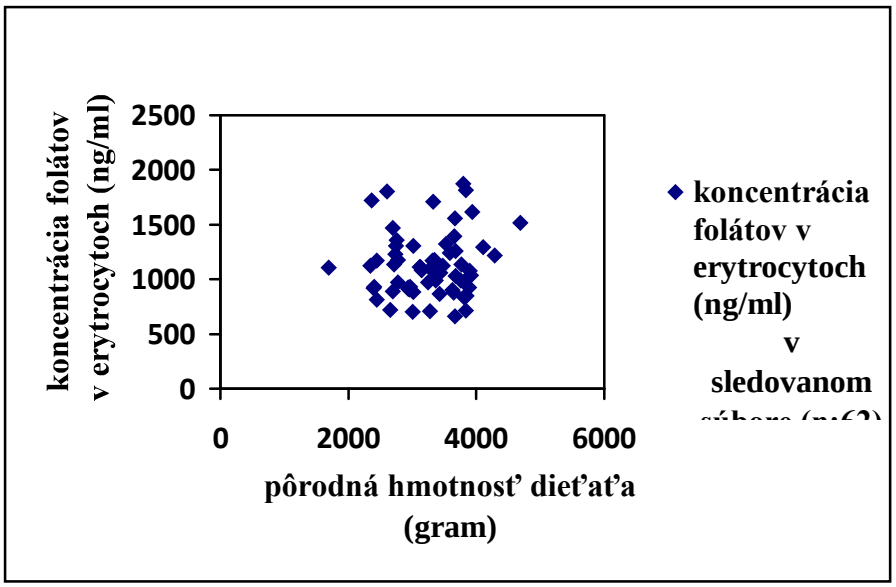
a v ***skupine C*** 661,61 - 1817,53 ng/ml, ktoré prehľadne uvádza tabuľka 1. V uvedených skupinách sme stanovili priemerné hodnoty koncentrácií folátov v erytrocytoch v *skupine A* 1292,23 ng/ml, v *skupine B* 1092,09 ng/ml, v *skupine C* 1105,13 ng/ml. Namerané koncentrácie folátov v súvislosti s dĺžkou gravidity sú ilustratívne uvedené v grafe 1 a ich variabilitu vzhľadom na pôrodnú hmotnosť dieťaťa zobrazuje graf 2. V celom sledovanom súbore boli **3 prenatálne hypotrofickí novorodenci** (pôrodná hmotnosť pod 10. percentil), u ktorých boli zistené koncentrácie folátov v erytrocytoch v rozpätí 717,49 - 1125,45 ng/ml..

Tabuľka 1 **Koncentrácie folátov v erytrocytoch v pupočníkovej krvi**

Koncentrácie folátov v erytrocytoch v pupočníkovej krvi		
sledovaná skupina pacientov	**koncentrácie folátov v erytrocytoch (ng/ml)**	
	rozpätie hodnôt	**priemer $\bar{x}$**
A: novorodenci narodení v 35. - 37. gestačnom týždni	812,02 - 1802,09	1292,23
B: novorodenci narodení v 38. - 39. gestačnom týždni	700,56 - 1872,16	1092,09
C: novorodenci narodení v 40. - 41. gestačnom týždni	661,61 - 1817,53	1105,13



Graf 1 **Koncentrácie folátov v erytrocytoch v sledovaných skupinách (A, B, C) podľa gestačného týždňa (g.t.)**



Graf 2 **Koncentrácie folátov v erytrocytoch vzhľadom na pôrodnú hmotnosť dieťaťa**

Diskusia

Kyselina listová sa vyskytuje v prírode vo forme pteroyl-monoglutamátu alebo pteroyl-polyglutamátu. Pomer oboch sa v jednotlivých potravinách rastlinného i živočíšneho pôvodu líši. Ideálnym rastlinným zdrojom kyseliny listovej sú najmä zelené časti rastlín a zelenina (šalát, špenát, kel, čínska kapusta, paradajky, cvikla) a v menšej miere niektoré druhy ovocia (melón, maliny, čučoriedky a banány), orechy a huby. Zo živočíšnych zdrojov sú najbohatším zdrojom kyseliny listovej pečeň, mlieko (srvátka) a mäso (6).

V ľudskom organizme je kyselina listová absorbovaná až v 90 % vo forme monoglutamátu. Utilizácia polyglutamátov v organizme je oveľa nižšia. Polyglutamáty sú dekonjugované pomocou enzýmov (folylpoly-γ-glutamát karboxypeptidáza II) v tenkom čreve na monoglutamáty. Následne dochádza k absorpcii z čreva do krvného obehu (4). Absorpcia monoglutamátu prebieha buď prostredníctvom špecifického nosiča alebo procesom podobným difúzii v prípade nadmerného príjmu folátov. Najvyššie hodnoty v krvi dosahuje monoglutamát naviazaný na albumín medzi 30 až 60 minútami po prijatí a následne sa rýchlo vychytáva tkanivami. Po vychytávaní z portálnej cirkulácie je časť folátov odstraňovaná pomocou folátového nosiča a časť je uložená v pečeni vo forme polyglutamátu. V prípade potreby je uvoľnená do riečiska pre ďalšie využitie v bunkách organizmu. Menej ako 1 % sa vylučuje z organizmu močom (1).

Význam kyseliny listovej je dobre známy v prevencii srdcovocievnych ochorení. Pri chorobných stavoch s následnou hyperhomocysteinémiou hrá dôležitú protektívnu úlohu práve kyselina listová. Obdobne je to aj v prípade demencie a Parkinsonovej choroby u starších ľudí pri nedostatku folátov a súčasne prítomnej hyperhomocysteinémii. Existujú mnohé práce, ktoré uvádzajú súvislosť zníženého príjmu kyseliny listovej s výskytom kolorektálneho karcinómu a rakoviny prsníka. Často sú však výsledky na zvieracích modeloch a rozsiahlych epidemiologických štúdiách protichodné (1).

Súvis prenatálne podávanej kyseliny listovej a zníženie rizika kongenitálnych anomálií bol jednoznačne potvrdený v mnohých štúdiách (1, 7, 8). Benefit denného užívania kyseliny listovej pred plánovanou koncepciou a v gravidite sa preukázal už pri dennom perorálnom príjme 400 µg kyseliny listovej. Tým sa signifikantne znižuje riziko vzniku defektov neurálnej rúry a rázštepov podnebia (7). U detí matiek s diabetes mellitus 1. typu, ktoré počas tehotenstva užívali kyselinu listovú, bola výrazná redukcia izolovaných kongenitálnych anomálií (8).

Hladina folátov v organizme môže byť ovplyvnená rôznymi chorobnými stavmi. V prípade neonatálnej asfyxie boli zistené signifikantne nižšie hladiny folátov v sére a vyššie hladiny

homocysteínu u predčasne narodených asfyktických novorodencov v porovnaní s donosenými asfyktickými novorodencami. Rozdiely medzi pohlaviami neboli zistené (9). V prípade asfyxie u donosených novorodencov môže byť následkom spustenia celej kaskády reakcií oxidačného stresu, redistribúcie krvi alebo krvácania práve rozvoj anémie (10).

U zdravých novorodencov a dojčiat je koncentrácia folátov do šiestich mesiacov vysoká, potom klesá na rozdiel od kobalamínu, čo znamená, že foláty pozitívne korelujú s dĺžkou výlučného dojčenia (11). V prípade umelej mliečnej výživy je stanovený minimálny denný príjem kyseliny listovej u detí do prvého roku života a to 60 μg (6).

Osobitosti novorodeneckého veku prinášajú otázku adekvátnej dávky kyseliny listovej v rámci liečby a profylaxie v skupine predčasne narodených novorodencov. Nielen referenčné hodnoty folátov v organizme v závislosti od veku, pohlavia a použitej metodiky vyšetrovania sa líšia, ale aj údaje o dávkovaní kyseliny listovej sú v literatúre rôznorodé (1, 12, 13). V našom súbore boli 3 prenatálne hypotrofickí novorodenci, u ktorých nachádzame relatívne nižšie hodnoty folátov v erytrocytoch. Vzhľadom na malú skupinu pacientov k celkovému sledovanému súboru tieto výsledky štatisticky nevyhodnocujeme.

Optimálna koncentrácia folátov v erytrocytoch u detí v Anglicku vo veku 1,5 – 4,5 roka bola 412 ng/ml (934 nmol/l) u chlapcov a 395 ng/ml (894 nmol/l) u dievčat. Viac ako 2 % detí malo koncentráciu folátov v erytrocytoch menej ako 177 ng/ml (400 nmol/l) (1). Podľa nami použitých komerčných setov Folate III (Roche Slovensko) sa referenčné hodnoty pohybujú v Európskej populácii v rozsahu 523 - 1257 ng/ml s priemerom 730 ng/ml u dospelých. V oboch uvedených prípadoch išlo o použitie periférnej krvi a dospelú populáciu. V prípade nášho súboru išlo o analýzu pupočníkovej krvi v skupine fyziologických novorodencov, čo sa môže podieľať na špecifickosti výsledkov. Variabilita výsledkov by mohla byť ovplyvnená aj národnými rozdielmi v rámci odlišností v stravovacích návykoch.

Stanovenie folátov v erytrocytov je odrazom dlhodobého statusu folátov na rozdiel od plazmatických zásob, ktoré sú ovplyvnené príjmom folátov v strave. Zrelé erytrocyty nemajú schopnosť transportovať alebo akumulovať folát v organizme. Počas erytropoézy sú foláty pravdepodobne naviazané na hemoglobín. Celková zásoba folátov v organizme človeka je limitovaná polčasom obratu a to je približne 100 dní (4).

Anémia predčasne narodeného novorodenca je multifaktoriálna. Príčinou býva nízka hladina erytropoetínu, znížený cirkulujúci objem krvi, nedostatočná krvotvorba pri nedostatku stavebných látok alebo iatrogénne straty krvi (3).

Foláty (*acidum folicum*) sú súčasťou preventívneho podávania v podpore adekvátnej erytropoézy nielen v tehotenstve, ale aj po narodení, najmä u predčasne narodených novorodencov. Pre poznanie efektivity liečby je potrebné poznať východziu hodnotu folátov v organizme. Práca prináša prvotné výsledky stanovenia koncentrácie folátov v pupočníkovej krvi u fyziologických novorodencov. V sledovanom súbore zdravých novorodencov nachádzame široké rozpätie hodnôt folátov v erytrocytoch bez ohľadu na gestačný vek, ale relatívne znížené hodnoty folátov v prípade novorodencov s intrauterinnou rastovou retardáciou.

Súčasťou komplexnej liečby anémie u predčasne narodených novorodencov je perorálna substitúcia kyselinou listovou, ktorá je jedna z dôležitých stavebných prvkov krvotvorby. Pre určenie stratégie liečby je žiadúce poznať koncentrácie kyseliny listovej v organizme pred a po liečbe a následne pokračovať v sledovaní efektivity suplementácie kyselinou listovou v závislosti od druhu výživy predčasne narodeného novorodenca.

Práca bola podporená Grantom UK - GUK 320/2011.

Poďakovanie

Ďakujem mojej školiteľke Doc. MUDr. Ingrid Brucknerovej, PhD. za cenné rady, ale aj spoluprácu v klinickej oblasti. Veľká vďaka za spoluprácu patrí kolegom z Oddelenia laboratórnej medicíny, najmä RNDr. Alene Vasilenkovej, vďaka ktorej sa zrealizovala laboratórna časť celej práce. Ďakujem za spoluprácu pracovníkom I. gynekologicko-pôrodníckej kliniky a Novorodeneckého oddelenia Univerzitnej nemocnice akademika L. Dérera v Bratislave.

Použitá literatúra

1. Jackson a spol.: Folate and disease prevention. London, The Stationery Office, United Kingdom. 2006, 14-222.
2. Jain BK: Vitamin requirements of very low birth weight infants: a review. Indian J Matern Child Health 1994; 5(2): 46-49.
3. Alarcón de P, Werner E. Neonatal hematology. 1. vydanie. Cambridge University Press. 2005, 1-451.
4. Hlúbik P, Opltová L. Vitaminy. Praha, Grada Publishing. 2004, 111-118.
5. Takimoto H, Hayashi F, Kusama K a spol.: Elevated maternal serum folate in the third trimester and reduced fetal growth: a longitudinal study. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2011; 57: 130-137.
6. Turzová A, Šmalová I: Význam kyseliny listovej pre zdravie. TRENDY v potravinárstve. Účelové periodikum Ministerstva poľnohospodárstva SR 2008; XV(2): 16-17.
7. Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K a spol.: Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. BMJ 2007; 334(7591): 464.
8. Bánhidy F, Dakhalaoui A, Puhó EH, Czeizel AAE: Is there a reduction of congenital abnormalities in the offspring of diabetic pregnant women after folic acid supplementation? Population-based case-control study. Congenital Anomalies 2011; 51: 80-86.
9. Mi WY, Liu W, Liu TC a spol.: Serum levels of homocysteine and folate in neonates with asphyxia. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi 2008; 10(2): 130-132.
10. Brucknerová I, Ujházy E, Dubovický M, Mach M: Early assessment of the severity of asphyxia in term newborns using parameters of blood count. Interdisc Toxicol 2008; 1(3-4): 211-213.
11. Hay G, Hohnston C, Whitelaw A, Trygg K, Refsum H: Folate and cobalamin status in relation to breastfeeding and weaning in healthy infants. American Journal of Clinical Nutrition 2008; 88(1): 105-114.
12. Hadler MC, Sigulem DM, Alves M de F, Torres VM: Treatment and prevention of anemia with ferrous sulfate plus folic acid in children attending daycare centers in Goiânia, Goiás State, Brazil: a randomized controlled trial. Cad Saude Publica 2008; 24(Suppl 2): 259-271.
13. Haiden N, Klebermass K, Cardona F a spol.: A randomized, controlled trial of effects of adding vitamin B12 and folate to erythropoetin for the treatment of anemia of prematurity. Pediatrics 2006; 118(1): 180-188.

48. Transplantácia amnionovej membrány – naše skúsenosti.

MUDr.Marek Horňák [1]
(oftalmolmológia)

Školiteľ: Doc.MUDr.Marián Potocký,PhD.[2]
[1]Očná klinika LF UPJŠ, [2]Očná klinika LF UK

Úvod

Transplantácia amnionovej membrány /TAM/ v oftalmológii má dlhodobú tradíciu a dá sa konštatovať, že predstavuje jeden z míľnikov chirurgie oka. Prvé skúsenosti boli zdokumentované de Rothom v r.1940 u pacienta so symblefaronom. Odvtedy bola TAM použitá pri mnohých diagnózach. Musíme však uznať že niekedy s rozporuplnými výsledkami. Až práce J.Batlla a S.Tsenga z polovice 90 rokov, ktorí navrhli nové postupy spracovania, konzervácie a samotnej transplantácie amnionovej mebrány, poskytli novú nádej pre množstvo pacientov trpiacich rozličnými druhmi poškodenia predného segmentu oka. Amnionova membrána /AM/ je 0.02-0.5 mm hrubá, najvnútornejšia fetálna membrána ľudskej placenty získanej pri pôrode via sectio Ceasarea. Histologicky je tvorená 3 základnými vrstvami: jednovrstvovým epitelom, bazálnou membránou a avaskulárnou, hypocelulárnou stromálnou matrix. Presný mechanizmus hojivého účinku AM nie je známy. Je isté, že dopomáha epitelizácii a diferenciácii buniek povrchu predného segmentu oka. Vo svojej stróme obsahuje vysokú koncentráciu bázického fibroblastového faktoru /b-FGF/ a keratocytového rastového faktoru /KGF/. Pri štrukturálnych proteínoch /laminin, kolagén VII/ bazálnej membrány bol pozorovaný epitelotropický efekt. Obsah intristických neurotropných substancií robí z AM ideálny substrát pre rekonštrukciu epitelu povrchu oka. AM zároveň inhibuje transdukciu TGF-B v rohovkových a spojovkových fibroblastoch, čo má výrazný anti-jazvovitý efekt. Po TAM dochádza v prvých fázach k redukcii prozápalových substancií hlavne citokínov IL-1 a IL-10, čo poukazuje na imunomodulačný efekt AM. Významný efekt preukazujú aj inhibítory proteináz ako 2-antiplazmín,1 a 2 antitrypsín. AM obsahuje podobne ako iné bazálne membrány kolagén IV,V a VII, laminín, fibronektín, ktoré sú dôležité pre adhéziu, migráciu a diferenciáciu rohovkového epitelu Nezanebateľným je aj fakt, že pri TAM sa transplantuje iba substrát a nie živé bunky, čím nedochádza k rejekcii allograftu. Existujú 2 techniky transplantácie AM. Pri implantačnej - inlay - sa aplikuje AM na spodinu defektu epiteliálnou stranou nahor a jej veľkosť korešponduje s rozsahom defektu. Tým funguje ako bazálna membrána po ktorej môže defekt reepitelizovať. Pri aplikačnej - onlay - technike sa AM aplikuje na povrch rohovky, limbu a perilimbálnej oblasti kde slúži ako biologická kontaktná šošovka. Je popisovaný aj spôsob vrstvenia - filling - viacerých AM na seba pri hlbších defektoch. Za účelom udržania AM in situ ju fixujeme k podkladu jednotlivými stehmi Ethilon 10.0. Niektorý autori doporučujú prekrytie AM kontaktnou šošovkou či impregnáciu AM in vitro glutaraldehydom, ktorý spôsobí prekríženie - crosslinking - jednotlivých kolagénnych vláken a tým jej spevnenie. Pooperačná starostlivosť pozostáva z aplikácie lokálnej antibiotickej, steroidnej a reepitelizačnej liečby. V bezprostrednom pooperačnom období sa môže pod AM vytvoriť hematóm. Krv sa väčšinou po čase vstrebe, no niekedy je nutné jej odsatie spod AM. Predčasná degradácia AM je častým dôvodom jej retransplantácie. V určitých prípadoch dochádza k tvorbe reziduálnych subepiteliálnych membrán čo môže spôsobovať opacifikáciu v zrakovej osi. Incidencia posttransplantačnej infekcie je 1.6%. Pri použití čerstvej AM však môže dosiahnuť až 8%. Najčastejšie pri nej boli vykultivované gram pozitívne baktérie. Gabler a kol.popisujú rozvoj sterilného hypopyonu po opakovaných TAM. Kalcifikácia je popisovaná v 12.8%. Pri ich vzniku sa doporučuje podávanie Ciprofloxacinu v kvapkovej instilácii.

Metodika

V rokoch 2005 - 2011 sme na Očnej klinike UNLP a LF UPJS v Košiciach transplantovali 18 AM u 15 očí 13 pacientov. V súbore bolo 6 mužov s priemerným vekom 57.6r a 7 žien s priemerným vekom 69.4r. Sušený amnion sme získali zo združenej tkanivovej banky UNLP a LF UPJŠ v Košiciach. Transplantáciu sme so súhlasom pacienta realizovali v 2 v celkovej a u 13 - tich v retrobulbárnej anestézii 4% Marcainom v kombinácii s lokálnou anestéziou kvapkami Benoxi či Tetracainom. Vo všetkých prípadoch sme použili aplikačnú tzv. „onlay" metódu transplantácie s fixáciou AM jednotlivými stehmi Ethilon 10.0 resp. 8.0 v perilimbálnej oblasti. Pri hlbších defektoch sme použili metódu vrsvenia AM cez seba tzv. „filling". V 2 prípadoch sme fixáciu AM umocnili aplikáciou kontaktnej šošovky a v 2 prípadoch tarzorafiou. Pooperačná starostlivosť spočívala v aplikácii lokálnej ATB, antiflogistickej a reepitelizačnej liečby. Transplantácia AM bola zrealizovaná u 3 pacientov s vredom rohovky náledkom poleptania, u 3 pri ťažkej forme syndrómu suchého oka, u 2 s trofickým vredom ,u l po paréze n.VII., u 2 s rejekciou rohovkového štepu, v 1 prípade symbelara, v 3 prípadoch recidivujúcich erózií rohovky a v 1 prípade insufficientného filtračného vankúšika po TE. Cieľom bolo retrospektívne zhodnotiť naše skúsenosti s transplantáciou amnionovej membrány pri poškodeniach predného segmentu ľudského oka.

Výsledky

Hoci bol náš súbor malý, je v ňom zastúpené vcelku široké spektrum indikácií. Primárny cieľ, prekrytie a prehojenie defektu, sme dosiahli v 100%. Eliminácia bolestivosti a diskomfortu nastala v 80% našeho súboru. Zlepšenie zrakovej ostrosti nastalo v 10% prípadov. V 2 prípadoch sme zaznamenali už peroperačné zakrvácanie pod AM. Išlo o pacientov užívajúcich Warfarin, u ktorých nebolo, pre krátkosť času, možné tento pred TAM vynechať,resp. prejsť na LMWH . Príčinou bola aj metodika fixácie AM, ktorej okraj sme zanárali pod bulbárnu spojovku. V oboch prípadoch došlo k spontánnemu vstrebaniu krvi, nebolo ju nutné odsávať a narušiť tým integritu AM. Prípad postransplantačnej infekcie či opacifikácie sme v našom súbore nezaznamenali. V l prípade sme pristúpili k retransplantácii AM, pretože sa AM odlúčila už na 1.pooperačný deň. V 2 prípadoch perforovaných rohovkových vredov sme realizovali perforačnú keratoplastiku .

Diskusia

Prvou otázkou je či používať čerstvú, mrazenú alebo sušenú AM. Účinky čerstvej aj mrazenej AM na ľudskom oku sú rovnaké. Je tu však obava, pri použití čerstvej AM, zo zvýšeného rizika prenosu infekcie HIV, hepatitídy B,A a syfilisu. Mrazená resp.sušená AM sa podrobuje opakovaným testom na tieto prenosné choroby, ktoré toto riziko znižujú. Je popisovaný aj rozdiel v incidencii posttransplantačnej infekcie. U sušenej AM je 1.6%, pri použití čerstvej AM môže dosiahnuť až 8%. Ďalej je tu problematika rentabilnosti. Z mrazenej/sušenej AM sa dá pripraviť viac, až 30 transplantátov. V našom súbore sme s čerstvou AM nepracovali. Pri používaní mrazenej AM sme museli čakať na jej rozmrazenie čo nebolo veľmi praktické. Zároveň sa nám mrazená AM zdala vulnerabilnejšia, často sa pri fixácii trhala. Zmena nastala, keď nám z tkanivovej banky začali dodávať sušenú AM najprv na nitrocelulóze s ktorou sme boli spokojný. No praktickejšia na použitie sa nám zdá byť sušená AM bez nej. Je pripravená na použitie hneď, nemusí sa vopred namáčať, dá sa ľahko upraviť na požadovanú veľkosť nastrihaním, čo je výhodné hlavne pri technike vrstvenia AM cez seba resp. vyplňania hlbších defektov. Ďalšou otázkou je technika aplikácie. Pri povrchových defektoch postačuje jedna vrstva AM, pri hlbších sa nám osvedčila metóda vrstvenia viacerých AM cez seba. Pre správny terapeutický efekt AM je nevyhnutná určitá doba zotrvania AM na povrchu oka. To je podmienené zvolením správnej formy fixácie AM k povrchu oka. Tu sa jednoznačne doporučuje fixácia 8.0 či l0.0 stehom. Niektorí autori používajú pokračujúci, niektorí jednotlivé stehy. Uzlíky sa doporučuje zanárať z dôvodu zníženia iritácie povrchu oka a prevencie postransplantačnej infekcie. V čase písania tejto práce sa objavovalo čoraz viac správ o fixácii AM tzv. "biolepidlom" na podklade fibrínu. S týmto sme však nemali možnosť pracovať. Podľa našich skúseností preferujeme jednotlivé stehy 8.0,v prípade fixácie na rohovku 10.0, ktoré zabezpečia dostatočnú stabilizáciu AM a

nehrozí pri nich prezanie a tým poškodenie integrity AM. Veľmi sa nám tiež osvedčilo zanorenie okrajov AM pod bulbárnu spojovku. K aplikácii kontaktnej šošovky sme pristúpili v prípadoch pridruženej patológie tarzálnej spojovky. Tieto techniky zabezpečili stabilizáciu AM na dostatočne dlhú dobu. V našom súbore sme v 2 prípadoch boli nútený na stabilizáciu AM použiť tarzorafiu. Toto však sami nepovažujeme za ideálne riešenie, pretože pri ňom nemôžeme sledovať proces hojenia a obmedzená je aj pooperačná liečba, ktorá je nemenej dôležitá pre výsledný efekt. Tu v súlade s ostatnými autormi doporučujeme lokálne ATB, antiflogistiká a epitelizanciá. Veľmi vhodné sa ukazujú aj umelé slzy hustejšej konzistencie, ktoré znižujú povrchové trenie vznikajúce medzi AM a tarzálnou spojovkou hornej mihalnice. Aplikácia mastí sa v našom súbore veľmi neosvedčila. Ich hromadenie v spoj.vaku a schnutie sa prejavilo ako kontraproduktívne a zvyšovalo riziko poškodenia integrity AM.

Záver

Aj napriek našim ešte malým skúsenostiam si dovoľujeme tvrdiť, že transplantácia AM predstavuje v indikovaných prípadoch jednoduchú a bezpečnú metódu rekonštrukcie predného segmentu oka a nemala by chýbať v armamentáriu žiadneho oftalmológa.

Použitá literatúra

1. Tseng SCG,Tsubota K : Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface Reconstruction, in Medical and Surgical Management,Springer 2001
2. Meler D.,Pires RTF,Mack RJS,Figueiredo FC. et al,: Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns,Ophthalmology 2000,107:980:990
3. Alizera Baradaran-Rafii,Hamid-Reza Aghanyan,Babak Arjamand,Mohammad-Ali Javadi: ,Amniotic Membrane Transplantation,Iran J.Of Ophthalmic Reseearch 2007,2:58-75
4. Dogru M.,Yildiz M.,Baykara M.,Corneal senzitivity and ocular surface changes following preserved amniotic membrane transplantation for non-healing ulcers,Eye 2003,17:139-148
5. Chen HJ.,Pires RTF,Tseng SCG : Amniotic membrane for sever neurotrophic ulcers,Br.J.Ophthamology 2000,84:826-833
6. Shimura S.,Shimazaki J.,Oheshi Y.:Antiinflamatory effect of amniotic memnrane transplantation in ocular surface disorders,Cornea 2001,20:408-413
7. Baum J.:Amniotic membrane transplantation.Why is it effective?,Cornea 2002, 21:339-341
8. Hossein Saoor,Maryam Aehata: Amniotic Membrane Transplantation for Congenital Distichiasis,Iranian J of Ophthalmic Research 2006,1:81-84
9. Weiyun Shi,Min Chen,Lixin Xie: Amniotic Membrane Transplantation Combined with Antiviral and Steroid Therapy for herpes Necrotizing Stromal Keratitis, Ophthalmology 2007,1174:1476-1481
10. Abraham Solomon,Edgar MEspana,Scheffer CGTseng: Amniotic Membrane Transplantation for Reconstruction of the Conjuctival Fornices,Ophthamology 2003,110:93-100
11. Arya SK.,Bhala S.,Malik A.,Sood S.,Role of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders,Nepal J Opthalmology 2010,2:145-153
12. Nguyen D NganmHoang TM Chau: Amniotic membrane transplantation for Moorens ulcer,Clinical and Experimental Ophthalmology 2011,39:386-392
13. Dua HS,Rahman I,A.Miri,D.G.Said: Variations in amniotic membrane relevance for cinical applications,Br.J.Ophthalmology 2010,94:963-964

14. NubileM,DuaHS,T.EvbLanzini,P.Carpineto,M.Ciancagini,L.Toto,L.Mastropasqua: Amniotic membrane transplantation for management of corneal epithelial defects, Br.J.Ophthalmology 2008,92:54-60

15. N.Koizumi,S.Kinoshita,Ocular surface reconstruction,amniotic membrane and cultivated epithelial cells from the imbus,Br.J.Ophthalmology 2003,87:1437

16. Woo HM,M.S.Kim,O.K.Kweon,D.Y.Kim,T.C.Nam,J.H.Kim: Effect of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodeling after excimer laser keratectomy,Br.J.Ophthalmology 2001,85:345-349

17. Ti SE,M.Grueterich,E.M.Espana,A.Touhani,D.F.Anderson,S.C.G.Tseng :Correlation of long term phenotypic and clinical outcomes following limbal epithelial transplantation cultivated on amniotic membrane in rabbits,Br.J.Ophthalmology 2004,88:422-427

18. Budenz DL.,Barton K.,Tseng SC: Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs,Am.J.Ophthamology 2000,130:580-588

19. Ma DHK.,See LC.,Liau SB: Amniotic membrane graft for primary pterygium, comparision with conjuctival autograft and topical mitomicin C treatement, Br.J.Ophthalmology 2000,84:973-978

20. Meljia LF.,Santamaria JP.,Acosta C.: Symptomatic management of postoperative bullous keratopathy with non-preserved human amniotic membrane,Cornea 2002, 21:342-345

21. Ucakhan OO.,Koklu G.,Firat E.: Nonprederved human amniotic membrane transplantation in acute and chronic chemical eye injuries,Cornea 2002,21:169-172

22. Gris O.,del Campo Z.,Wolley-Dod C:,Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatement of epitelial disorders,Cornea 2002,21:22-27

23. Letko E.,Stechschulte SU,Kenyon KR.: Amniotic membrane inlay et overaly grafting for corneal epitheial defects and stromal ulcers,Arch Ophthalmology 2001,119:659-663

24. Hanada K.,Shimazaki J.,Shimura S. et al: Multilayered amniotic membrane transplantation for severe uceration of the cornea et sclera,Am.J.Ophthalmology 2001, 131:324 -331

25. Dua HS.,Gomes JA.,King AJ. et al.:The amniotic membrane in ophthalmology, Surv. Ophthamology 2004,49:51-77

26. Burman S.,Tejwani S.,Vemuganti GK. et al.: Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane:A review of current indications,Ce Tissue bank 2004,5:167-175

27. Fernandes M.,Sridhar M.S.,Sangwan V.S.et al.: Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction,Cornea 2005,24:643-653

28. Joseph A.,Dua HS.,King AJ.: Failure of amniotic membrane transplantation in treatement of acute chemical burns,Br.J.Ophthalmoogy 2001,85:1379-1383

29. Kobayashi A.,Ijiri S.,Sugiyama K. et al.: Detection of corneal epithelia defect through amniotic membrane patch by fluorescein,Cornea 2005,24:359-360

30. Tamhane A.,Vajpayee RB.,Biswas NR. et al.: Evaluation of amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy as compared with medical therapy aone in acute ocular burns,Ophthalmology 2005,112:1963-1969

31. Solomon A.,Meller D.,Prabhasawat P. et al.: Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations,descementocees and deep ucers,Ophthamology 2002,109:694-703

32. Maharajan VS.,Shanmuganathan V.,Currie A. et al.: Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstructions:indications and outcomes,Clin.Experiment.Ophthamol 2007,35:140-147

33. Rahman I.,Said DG.,Maharjan VS.et al.: Amniotic membrane in ophthalmology: indcations and limitations,Eye 2009,23:1954-1961

34. Said DG.,Nubile M.,Aomar T. et al.: Histologic features of transplanted amniotic membrane implications for corneal wound healing,Ophthamology 2009,116:1287-129

35. Solomon A.,Pires RTF.,Tseng SCG.: Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurent pterygia,Ophthalmology 2001,108:449-460

36. Rodriguez-Ares MT.,Tourino R.,Lopez-Valadares MJ.,Gude F.: Multilayer amniotic membrane transplantation in the treatement of corneal perforation,Cornea 2004,23:577-583

37. Heligenhaus A.,Li H.,Heranandez Gaindo E. et al.: Management of acute ulcerative and necrotising herpes simplex and zoster keratitis with amniotic membrane transplantation,Br.J.Ophthalmology 2003,87:1215-1219

38. Anderson DF.,Prahbasawat P.,Alfonso E.,Tseng SC.: Amniotic membrane transplantation after the primary surgical management of band keratopathy,Cornea 2001,20:34-54-361

39. Agrawal W.: Amniotic membrane transplantation an advance in ocular surface disease management,Journal of the Bombay Ophthalmologist Association 2000,10:157-158

40. Honavar SG.,Bansal AK.,Sangwan VS.,Rao NG.: Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson syndrome, Ophthalmology 2000,107:975-979

41. Ti SE.,Tow SLC.,Chee SP.: Amniotic membrane transplantation in entropion Surgery,Ophthalmology 2001,108:1209-1217

42. KhataminiaG.,Gholami Gheibi H.: Amniotic membrane graft in distichiasis: a new method,Bina J Ophthalmology 2000,6:9-13

43. Kee C.,Hwang JM.: Amniotic membrane Graft for lateonset glaucoma filtering leaks,Am.J.Ophthalmology 2002,138:834-835

44. Meallet MA.,Espana EM.,Grueterich M.: Amniotic membrane transplantation with conjuctival limbal autograft for total limba stem cell deficiency,Ophthalmology 2003,110:1585-1592

45. Anderson DF.,Ellies P.,Pires RTF.: Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency,Br.J.Ophthalmology 2001,85:567-575

46. Gomes JAP.,Serapaio dos Santos M.,Cunha MC.: Amniotic membrane transplantation for partial and total limbal stem cell deficiency secondary to chemical burn, Ophthalmology 2003,110:466-473

47. John T.,Foulks GN.,John ME.: Amniotic membrane in the surgical manegement of acute toxic epidermal necrolysisOphthalmology 2002,109:351-360

48. Paridaens D.,Beekhuis H.,Vanden Bosch W.: Amniotic memnbrane transplantation in the management of conjuctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia,Br.J.Ophthalmology 2001,85:658-661

49. Barabino S.,Rolando M.,Bentivoglio G.: Role of amniotic membrane transplant for conjuctival reconstruction in ocular cicatricial pemphigoid,Ophthalmology 2003, 110:474-480

50. Espana EM.,Grueterich M.,Sandoval H.: Amniotic membrane transplantation for bulous keratopathy in eyes with poor visual potential,J.Cataract Refract Surgery 2003,29:279-284

51. Kim JS.,Kim JC.,Hahn TW.: Amniotic membrane transplantation in infected corneal ucer,Cornea 2001,20:720-726

52. Sridhar MS.,Sangwan VS.,Bansal AK.: Amniotic membrane transplantation in the management of shield ulcers of vernal keratokonjuctivitis,Ophthalmology 2001,105:1218-1222

53. Prabhasawat P.,Tesavibul N.,Komolsuradej W.: Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation,Br.J.Ophthalmology 2001,85:1455-1463

54. Nakamura T.,Yoshitani M.,Rigby H.: Sterile freeze-dried amniotic membrane a useful substrate for ocular surface reconstruction,Invest Ophthalmol 2004,45:93-99

55. Solomon A.,Espana EM.,Tseng SCG: Amniotic membrane for reconstruction of conjuctival fornices,Ophthalmology 2003,110:93-100