UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
LEKÁRSKA FAKULTA

Zborník vedeckých prác

56. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI
XII. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV

2017

ŠVOČ team

Univerzita Komenského v Bratislave
Lekárska fakulta

ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC

56. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI
XII. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV

BRATISLAVA
12. APRÍL 2017

Editori: Adriána Furdová, Róbert Lipták
Predná strana: Adriána Furdová
Logo navrhol: Sebastián Andil

Recenzenti: prof. MUDr. Peter Valkovič, PhD., MUDr. Pavol Janega, PhD.

Za obsahovú a jazykovú správnosť zodpovedajú autori prác.

Vydavateľ
© Univerzita Komenského v Bratislave

ISBN 978-80-223-4304-6

56. FAKULTNÁ KONFERENCIA ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI
XII. VEDECKÁ KONFERENCIA DOKTORANDOV
12. apríl 2017

Úvodná prednáška

Inovatívne intervenčné riešenia pri zlyhaní srdca
doc. MUDr. Jozef Bartúnek, PhD.
Cardiovascular Center, OLV Hospital, Aalst Belgicko
Department Cardiovasculaire Wetenschappen, Katholiek Universiteit Leuven, Belgicko, visiting professor

PROGRAM 56. FAKULTNEJ KONFERENCIE ŠTUDENTSKEJ VEDECKEJ ODBORNEJ ČINNOSTI

Klinická sekcia I

1. Rizikové faktory sclerosis multiplex
Dóra Horváth
Školiteľ: MUDr. Iveta Lisá, CSc.
II. neurologická klinika LF UK a UN Bratislava

2. Extracelulárna DNA ako potencionálny prognostický a terapeutický marker u pacientov so zápalovým ochorením čreva
Kristína Tomová
Školitelia: Mgr. Janka Bábíčková, PhD., RNDr. Ľubomíra Tóthová, PhD.
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

3. Chorobnosť a faktory pôsobiace na zdravotný stav dieťaťa v predškolskom veku
Katarína Bahnová
Školiteľ: doc. MUDr. Ingrid Brucknerová, PhD.
Neonatologická klinika intenzívnej medicíny LFUK a DFNsP

4. Aterogénny index plazmy je pozitívne asociovaný s rizikom smrti u starších žien – 10-ročná follow up štúdia
Rúth Báneszová, Mária Bisahová
Školiteľ: MUDr. Peter Sabaka, PhD
II. interná klinika LF UK a UN Bratislava

5. Vplyv civilizačných ochorení rodičov na zdravie ich detí v predškolskom veku
Lucia Soldanová
Školiteľ: doc. MUDr. Ingrid Brucknerová, PhD.
Neonatologická klinika intenzívnej medicíny LFUK a DFNsP

6. Veľkosť lipoproteínových častíc u pacientov s akútnym koronárnym syndrómom.
Michal Pečík
Školiteľ: prof. MUDr. Andrej Dukát, CSc.
V. interná klinika LF UK a UN Bratislava

7. Peri a postoperačný manažment primárnej hyperparatyreózy
Karin Molnárová
Školiteľ: MUDr. Králik Róbert, PhD.
Klinika onkologickej chirurgie LF UK a OÚSA

8. Atrial fibrillation and anticoagulation treatment
Stylianos-Chrysovalantis Daios
Tutor: MUDr. Martin Caprnda PhD
1st Department of Internal Medicine

9. Štatistické vyhodnotenie vybraných somatických parametrov novorodenca na 1. deň veku a ich porovnanie
Jana Brucknerová, Lucia Lauková
Školitelia: PhDr. Michal Trnka, PhD., doc. MUDr. Ingrid Brucknerová, PhD.
Neonatologická klinika intenzívnej medicíny LFUK a DFNsP

10. Využitie acelulárnej dermálnej matrix v procese rekonštrukcie prsníka
Martina Chotárová
Školiteľ: MUDr. Martin Boháč, Ph.D, MHA, FEBOPRAS
Klinika plastickej, rekonštrukčnej a estetickej chirurgie LF UK a UN Bratislava

Klinická sekcia II (choroby hlavy a krku)

11. Amniotic membrane covering defects in patients with orbital and epibulbar lesions
Neofytos Mavris
Tutor: assoc. prof. Mgr. MUDr. Furdová Alena, PhD., MPH, MSc
Department of Ophthalmology, Comenius University in Bratislava

12. Výsledky tónovej audiometrie pri rôznych typoch kochleárnej implantácii
Peter Buček
Školiteľ: prof. MUDr.Milan Profant, CSc.
Klinka otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNB

13. Congenital abnormalities of face in newborns
Maria Koukouvitaki
Školiteľ: doc. MUDr. Ingrid Brucknerová, PhD.
Neonatal Department of Intensive Medicine, Comenius University in Bratislava

14. Evaluation of facial soft tissues in diagnostics of orthodontics
Olga Gkeka
Školiteľ: MUDr. Andrej Thurzo, PhD
Department of Orthodontics, Comenius University Bratislava

15. Evaluation of airway in pre and postoperative phase in patient with sleep apnoe
Georgia Fountoulaki
Tutor: MUDr. Andrej Thurzo, PhD., MPH, MHA
Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery, Comenius University Bratislava

16. Populačné vyhodnocovanie proporcií tváre prostredníctvom 3D skenov
Bronislava Lenčuchová
Školiteľ: MUDr. Andrej Thurzo, PhD., MPH, MHA
Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LF UK a OÚSA

17. Ľudský papilomavírus v etiopatogenéze orofaryngeálneho karcinómu
Tomáš Kovačič
Školiteľ: MUDr. Patrik Štefanička, PhD.
Klinika otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNB

18. Gingival recession and gum graft surgery: a review
Xanthopoulou Vithleem
Tutor: MUDr. Amir Amiry Manesh, PhD
Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery

19. Determinujúce faktory výsledkov liečby u pacientov s lymfómovým ochorením v oblasti oka a očnice
Anna Marková
Školiteľ: doc. MUDr. Mgr. Alena Furdová, PhD., MPH
Klinika oftalmológie LF UK a UN Bratislava

20. Príprava hybridného hydrogélu pre bioprinting orálneho epitelu a kože.
Filip Peťko
Školiteľ: MUDr. Andrej Thurzo, PhD, MPH, MHA
Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LF UK a OÚSA

Predklinická sekcia

21. Behavioral changes in chronic kidney disease in mice
Rafael Ján Sepp
Tutor: MUDr. Mgr. Július Hodosy, PhD., MPH.
Institute of molecular biomedicine, Comenius University Bratislava

22. Môže mať DNA z potravy vplyv na ľudský organizmus?
Martina Karovičová, Ondrej Lengyel
Školiteľ: Mgr. Barbora Konečná
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

23. Efekt ivabradínu na remodeláciu srdca a aorty pri zlyhaní srdca indukovanom izoprenalínom
Peter Stanko
Školitelia: prof. MUDr. Fedor Šimko, CSc.; MUDr. Tomáš Baka
Ústav patologickej fyziológie LF UK

24. Pohlavné rozdiely v markeroch oxidačného stresu u pacientov po náhlej cievnej mozgovej príhode
Petra Pazderová
Školiteľ: doc. Ing. Ingrid Žitňanová, PhD
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK

25. Úloha imunitného systému v procese vzniku nádorov hrubého čreva
Erika Gaálová
Školiteľ: MUDr. Pavol Janega, PhD.
Ústav patologickej anatómie LF UK a UN Bratislava

26. Vplyv podávania vitamínu C na vybrané charakteristiky ľudských erytrocytov.
Juraj Krajčír, Katarína Kučerová, Jana Laceková
Školiteľ: MUDr. Jana Radošinská, PhD.
Fyziologický ústav LF UK

27. Aeróbny a silový tréning špecificky ovplyvňujú hladiny vybraných bioaktívnych molekúl v cirkulácii a ich zmeny v odpovedi na akútnu fyzickú záťaž.
Mikuláš Štofaňák
Školiteľ: doc. MUDr. Barbara Ukropcová, PhD.
Ústav patologickej fyziológie LF UK

28. Student to Student Tutorial Project In Physiology
Athina Ioanna Daponte, Amiria Dal Grande, Yuki Senoo, Fabian Schmitt
Tutor: MUDr. Silvia Hnilicova, PhD.
Institute of Physiology, Comenius University Bratislava

29. Aplikácia Human Anatomy VR do Virtuálnej Anatomickej Učebne (VAU)
Tomáš Brngál, Miloš Svrček, Tung Cao Thanh
Školiteľ: MUDr. Andrej Thurzo, PhD, MPH, MHA
Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LF UK a OÚSA

30. Vplyv elektromagnetického poľa generovaného základňou telefónu na aktivitu autonómneho nervového systému
Terézia Červenková, Katarína Redhammerová
Školiteľ: MUDr. Rastislav Važan, PhD.
Fyziologický ústav LF UK

31. Vplyv kofeínu na činnosť mozgu.
Martin Pekarčík
Školitelia: Mgr. Helena Svobodová, Ing. Erik Vavrinský, PhD
Ústav lekárskej fyziky, biofyziky, informatiky a telemediciny LF UK

32. Využitie keramiky v klasickej 3D tlači a bioprintingu
Lucia Krupanová
Školiteľ: MUDr. Andrej Thurzo, PhD., MPH, MHA
Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LF UK a OÚSA

PROGRAM XII. VEDECKEJ KONFERENCIE DOKTORANDOV

Predklinická sekcia

33. Prvé skúsenosti s masívnym paralelným sekvenovaním panelov génov v onkogenetike.
Lenka Dolešová
Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.
Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava

34. Analýza sociálnej expozície hluku u vybranej vulnerabilnej populácie v Bratislave
Mgr. Alexandra Filová
Školiteľ: doc. MUDr. Ľubica Argalášová PhD., MPH
Ústav hygieny LF UK

35. Klozapín odlišne ovplyvňuje expresiu c-Fos proteínu vo vybraných mozgových oblastiach po vystavení akútnemu stresu a novému stresoru po predchádzajúcom predstresovaní
Mgr. Alena Černáčková
Školiteľ: prof. MUDr. Boris Mravec, PhD.
Fyziologický ústav LF UK

36. Salivárne markery v modeli akútneho zlyhania obličiek
Mgr. Alexandra Kovalčíková
Školiteľ: RNDr. Ľubomíra Tóthová, PhD
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

37. Vplyv kompozície črevnej mikroflóry na efekt prebiotík
Lenka Pálková
Školiteľ: RNDr. Gabriel Minárik, PhD.
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

38. Štúdium kandidátnych génov asociovaných s chemorezistenciou voči cisplatine u testikulárnych nádorov z germinatívnych buniek.
Ing. Silvia Schmidtová
Školiteľ: Mgr. Lucia Kučerová, PhD.
Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV

39. Pohlavné rozdiely v úzkosti podobnom správaní starnúcich potkanov: úloha endogénnych pohlavných hormónov
Emese Domonkos
Školiteľ: MUDr. Mgr. Július Hodosy, PhD., MPH.
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

40. Metabolizmus metylglyoxalu u centrálne obéznyh adolescentov
Melinda Csongová
Školiteľ: doc. MUDr. Katarína Šebeková, DrSc.
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

41. Expresia molekúl TREM-1 v tkanivách gliómov
MUDr. Lenka Maruščáková
Školiteľ: doc. MUDr. Mária Bucová, CSc.
Imunologický ústav LF UK

Klinická sekcia

42. Hodnotenie rôznych typov operácií rázštepu sekundárneho podnebia
MUDr. Pavol Macho
Školiteľ: doc. MUDr. Jozef Fedeleš, CSc.
Klinika plastickej, rekonštrukčnej a estetickej chirurgie LF UK a UN Bratislava

43. Porovnanie presnosti vzorcov na výpočet dioptrickej sily umelej vnútroočnej šošovky pred operáciou katarakty
MUDr. Ivajlo Popov
Školiteľ: doc.MUDr. Vladimír Krásnik PhD.
Klinika oftalmológie LF UK a UN Bratislava

44. Porušená placentácia vo vzťahu k operačným výkonom na maternici
MUDr. Eva Korňanová
Školitelia: MUDr. Andrea Maľová, PhD., prof. MUDr. Miroslav Borovský, CSc.
I. gynekologicko-pôrodnícka klinika LF UK a UN Bratislava

45. Rozdiel v expresii cytokínov v zapálenej a nezapálenej sliznici u pacientov s nešpecifickými zápalovými ochoreniami čreva.
MUDr. Zuzana Lešková
Školiteľ: doc. MUDr. Tibor Hlavatý PhD.
V. interná klinika LF UK a UN Bratislava

46. Skríning sluchu novorodencov, včasná diagnostika a rehabilitácia porúch sluchu
MUDr. Lívia Majerníková
Školiteľ: doc. MUDr. Zuzana Kabátová, CSc.
Klinka otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNB

47. Detekcia markerov oxidačného stresu v slinách pacientov s autoimunitnými ochoreniami ústnej dutiny a gastrointestinálneho traktu
Katarína Janšáková
Školiteľ: RNDr. Ľubomíra Tóthová, PhD
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

48. Postural reactions to visual scene movements in senior patients with instability and cognitive impairment (preliminary study)
MUDr. Martin Kucharík
Tutor: MUDr. Marián Šaling, CSc.
Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia; National Institute of Cardiovascular Diseases, Bratislava, Slovakia

49. Extracelulárna DNA u pacientov s ankylozujúcou spondylitídou a psoriatrickou artritídou sa po aplikácii biologickej liečby nemení
Barbora Konečná
Školiteľ: RNDr. Barbora Izrael Vlková, PhD.
Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK

1. Rizikové faktory Sclerosis Multiplex

Dóra Horváth, Lejla Vendégh
(všeobecné lekárstvo, 6. ročník, všeobecné lekárstvo, 6. ročník)

Školiteľ: MUDr. Iveta Lisá, CSc.
II. neurologická klinika lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice v Bratislave

Úvod

Sclerosis multiplex cerebrospinalis je chronické zápalové demyelinizačné neurodegeneratívne ochorenie centrálneho nervového systému. Je najčastejšou príčinou neurologickej invalidity mladých dospelých. Napriek závažnosti tejto problematiky stále nepoznáme jednoznačnú príčinu tohto ochorenia.

Cieľom našej práce bolo podať prehľad dostupných dát o možných rizikových faktoroch, skúmať ich zastúpenie vo vzorke slovenských pacientov a porovnať výsledky získané od pacientov s výsledkami získanými od súboru zdravých jedincov.

Rizikové faktory sme rozdelili na dve skupiny: ovplyvniteľné environmentálnymi faktormi, respektíve nimi neovplyvniteľné. Medzi ovplyvniteľné sme zaradili rizikové faktory podmienené vonkajšími činiteľmi, ktoré súvisia so životosprávou pacienta, ako napríklad deficit vitamínu D, fajčenie, prekonanie niektorých infekcií, vakcinácia, nadmerné užívanie antibiotík, a stresové udalosti v živote pacienta. Medzi neovplyvniteľné sme zaradili genetickú predispozíciu, pohlavné rozdiely, mesiac narodenia, atopický terén, prítomnosť iného autoimunitného ochorenia a niektoré fenotypické prejavy ako farba očí a vlasov a sérové hladiny vybraných parametrov u daných pacientov.

Materiál a metodika

Náš súbor tvorí 100 pacientov, ktorí sú sledovaní v Centre pre liečbu Sclerosis multiplex v Univerzitnej nemocnici akademika Ladislava Dérera. Našou metódou bola retrospektívna štúdia prípadov a kontrol. Na hodnotenie rizikových faktorov vzniku ochorenia sme u sledovaných pacientov použili štandardizovaný dotazník zahrňujúci anamnestické údaje pacientov.

Údaje nášho dotazníka sme porovnali s údajmi nášho kontrolného súboru, ktorý tvorí 61 dospelých náhodne vybraných ľudí vekovej skupiny 18-64 rokov bez demyelinizačného ochorenia CNS.

Okrem údajov z dotazníkov sme retrospektívne hodnotili aj sérové hladiny vybraných parametrov u daných pacientov liečených na sclerosis multiplex, ktoré sme získali z nemocničnej databázy. Pri týchto údajoch sme uviedli výsledky vstupných vyšetrení, o ktorých predpokladáme, že ešte neboli ovplyvnené imunomodulačnou liečbou.

Výsledky boli štatisticky spracované prostredníctvom programu R-studio binom. test. p-hodnotu menšiu ako 0,05 sme považovali za štatisticky významnú.

Výsledky

Tabuľka 1: Zhrnuté údaje z našich dotazníkov

	Pacienti so sclerosis multiplex	**Kontrolná skupina**	**Hodnota p**
Ženské pohlavie	75	28	$2,18 \times 10^{-17}$
Dátum narodenia v jarných/letných mesiacoch	60	21	$1,59 \times 10^{-7}$
Prítomné autoimunitné ochorenie u pacienta	15	3	0,000139
Pozitívna rodinná anamnéza autoimunitného ochorenia	33	4	$3,289 \times 10^{-15}$
Alergia u pacienta	51	9	$2,2 \times 10^{-16}$
Pozitívna anamnéza v dospelosti prekonanej infekcie vírusom morbíl	1	0	SN
Pozitívna anamnéza v dospelosti prekonanej infekcie vírusom Epsteina-Barrovej	5	0	
Pozitívna anamnéza v dospelosti prekonanej infekcie vírusom hepatitídy (A/B/C)	3	0	SN
Pozitívna anamnéza v dospelosti prekonanej infekcie vírusom varicella zoster	7	0	SN
Anamnéza nadpriemerne častej antibiotickej liečby počas detstva	38	4	$2,2 \times 10^{-16}$
Čas strávený vonku menej ako 2-3 hodiny týždenne (najmä pred vznikom ochorenia)	32	4	$2,29 \times 10^{-14}$
Nadmerný stres v živote	40	9	$7,185 \times 10^{-10}$
Pozitívna anamnéza fajčenia pred vznikom choroby	43	26	0,5077
Očkovanie proti vírusu influenzy	12	7	0,4813
Očkovanie proti vírusu hepatitídy A	10	4	0,1205
Očkovanie proti Human Papiloma Virus	2	2	0,8436
Očkovanie proti tetanu	5	5	0,9203
Pozitívna rodinná anamnéza Sclerosis Multiplex	14	0	SN

SN: štatisticky nehodnotiteľná

Tabuľka 2: Percentuálne zastúpenie pacientov s patologickými hodnotami uvedených parametrov

Vyšetrený parameter:	**Vitamín D**	**Absolútny počet eozinofilov v sére**
Počet vyšetrených pacientov:	68	96
Percentuálne zastúpenie pacientov, u ktorých bol vyšetrený parameter patoligicky zmenený (znížená hodnota vitamínu D/ zvýšený absolútny počet eozinofilov)	85,3 %	42,7 %

Diskusia

Sclerosis multiplex (SM) je multifaktoriálne podmienené ochorenie. Na jeho rozvoji sa spoločne podieľajú genetické a environmentálne faktory. Súčasná predstava o patogenéze SM predpokladá, že chorobu spúšťajú niektoré environmentálne faktory u geneticky predisponovaných jedincov. Zatiaľ popísaných zhruba 200 genetických faktorov vysvetľuje 18-24% dedičnosti rizika vzniku SM, pričom 11% pripadá haplotypu HLA-DRB1-15 (1).

Podľa súčasných vedeckých poznatkov medzi najdôležitejšie rizikové faktory patria:

Početné štúdie potvrdili protektívny vplyv vitamínu D na vývoj SM. Skúmanie sérových hladín vitamínu D ukázalo, že hladiny vitamínu D boli výrazne nižšie u pacientov SM v porovnaní so zdravou populáciou, a to najmä v priebehu relapsov. Nedostatok vitamínu D vedie k nerovnováhe medzi lymfocytmi Th-1 a Th-2, čo môže viesť k rozvoju autoimunitných ochorení. Kritickým obdobím pre vývin imunity z hľadiska možného nedostatku vitamínu D sú obdobia gestácie, ranného detstva, a skorej puberty. Suplementácia vitamínom D sa ukázala jedným možným preventívnym zásahom proti rozvoja SM. Podľa niektorých štúdii podávanie vitamínu D je efektívne iba v určitých kritických obdobiach rozvoja imunity.

Početné štúdie pozorovali aj súvis medzi mesiacom narodenia a výskytom SM, čo by mohlo poukázať na význam dostatočnej hladiny vitamínu D v gestačnom období. Ľudia narodení v jarných a letných mesiacoch by podľa tejto hypotézy mali byť v najväčšom riziku rozvoja SM, lebo prevažná časť tehotenstva prebieha v menej slnečných mesiacoch. Štúdium vo Veľkej Británii našlo relevantné rozdiely v mesiaci narodenia SM pacientov a zdravej populácie (2).

Fajčenie pokladáme za dôležitý možný rizikový faktor aj z dôvodu, že je 100%-ne preventabilným rizikovým faktorom. Mechanizmus účinku fajčenia je hlavne aktivizácia prozápalových imunitných dejov. Longitudinálne štúdie ukázali relatívne riziko rozvoja SM 1,8-krát vyššie pre fajčiarov v porovnaní s nefajčiarskou kontrolnou skupinou (3).

Niektoré epidemiologické štúdie poukazujú na to, že u geneticky predisponovaných pacientoch prekonané infekcie – vyvolané najmä vírusovými časticami – by mohli byť silnými kofaktormi indukcie rôznych autoimunitných ochorení. Medzi najčastejšie infekcie spomínané v súvislosti so SM sú infekcie vyvolané vírusmi Ebsteina-Barrovej, rubeoly, osýpok, herpes simplex, a vírusom parotitídy. Okrem prítomnosti infekcie zohráva úlohu aj vekové obdobie v živote pacienta, v ktorom infekciu prekonal. Infekcia hore uvedenými vírusmi u väčšiny pacientov prebehne v rannom detstve. Infekcia EBV v detstve má väčšinou asymptomatický priebeh, v období puberty a dospelosti naopak prebehne pod obrazom symptomatickej infekčnej mononukleózy. Vo vývojových krajinách v oblastiach s nižšou socioekonomickou úrovňou obyvatelia prekonajú tieto infekcie v rannom detstve, veľká časť detí sa infikuje do 10. roku svojho života. Vo vyspelých krajinách s vyššou hygienickou úrovňou, kde sú deti viac chránené pred nečistotou a infekciami, menej často sa infikujú. Prvý kontakt s infekciou vo vyššom veku môže viesť k dysregulácii vo vývoji imunitného systému (4).

Ďalšie štúdie poukazujú na zvýšené riziko vzniku SM po nadmernej antibiotickej liečbe, najmä počas detstva (5).

Ďalším rizikovým faktorom v súvislosti so vznikom SM sú stresové životné udalosti. Neuroendokrinné hormóny nadmerne aktivované počas stresových situácii môžu viesť k dysfunkcii imunitného sytému so zmenenou produkciou cytokínov zapríčiňujúcou zníženú obranyschopnosť človeka (6).

Vzťah medzi vznikom autoimunitných ochorení a predchádzajúcim očkovaním je kontroverzným, často diskutovaným javom. Autoimunitné ochorenie sa podľa niektorých autorov pokladá za potenciálny vedľajší účinok vakcinácie.

Existujú aj teórie o protektívnom účinku vakcinácie na rozvoj SM. Podľa niektorých autorov práve infekcie znamenajú riziko pre vznik SM, tým pádom očkovanie proti týmto ochoreniam chráni pacienta pred rozvojom autoimunitných ochorení.

Viac štúdii podporuje teóriu, že očkovanie znamená riziko pre rozvoj SM u predtým zdravého jedinca, alebo exacerbáciu ochorenia u pacientov so SM (7).

Alergia a autoimunita sú dva rôzne následky dysregulácie imunitného systému a niektoré analýzy ukázali možnú asociáciu medzi prítomnosťou oboch typov poruchy imunitného systému u jedného pacienta. Niektoré štúdie naznačujú, že atopické ochorenie v detstve zvyšuje predpoklad, že sa u pacienta rozbehne autoimunita v neskoršom veku, čo poukazuje na možné spoločné črty v patogenéze týchto ochorení (8).

Je všeobecne známy jav, že pohlavné hormóny majú vplyv na imunitný systém pacienta a ženy sú všeobecne náchylnejšie na autoimunitné ochorenia. Tehotenstvo môže mať ochranný biologický účinok proti rozvoja SM (9).

Záver

Naše výsledky ukázali signifikantný vzťah medzi rozvojom sclerosis multiplex a nasledujúcimi faktormi: ženské pohlavie, hodnota $p = 2{,}18 \times 10^{-7}$; dátum narodenia v jarných / letných mesiacoch, hodnota $p = 1{,}59 \times 10^{-7}$; anamnéza ďalších autoimunitných ochorení, hodnota $p = 0{,}0001139$; pozitívna rodinná anamnéza autoimunitných ochorení, hodnota $p = 3{,}289 \times 10^{-15}$; alergické ochorenie u pacienta, hodnota $p = 2{,}2 \times 10^{-16}$; anamnéza nadmerného užívania antibiotík počas detstva, hodnota $p = 2{,}2 \times 10^{-16}$; menej ako 2 hodiny strávené vonku týždenne (v súvislosti s hladinou vitamínu D), hodnota $p = 2{,}29 \times 10^{-14}$; modrá / zelená / sivá farba očí, hodnota $p = 5{,}288 \times 10^{-14}$; svetlá farba vlasov, hodnota $p = 1{,}79 \times 10^{-6}$; anamnéza nadmerného stresu v živote, hodnota $p = 7{,}185 \times 10^{-10}$.

Nezistili sme významnú koreláciu medzi fajčením a nástupom ochorenia, hodnota p = 0, 5077; a naše štúdie nepreukázali negatívny vplyv očkovania na vznik sclerosis multiplex.

Naša štúdia napriek obmedzenia malým počtom skúmaných pacientov poukázala na signifikantný vplyv niektorých teoretických rizikových faktorov pri vzniku multietiologického demyelinizačného ochorenia, sclerosis multiplex.

Zoznam použitej literatúry:

1. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP a spol.: Heterogenity at the HLA-DRB1 locus and risk of multiple sclerosis. Human molecular genetics 2006; 15(18): 2813-24
2. Balbuena L, Middleton M, Tuite-Dalton K a spol.: Sunshine, Sea, and Season of Birth: MS Incidence in Wales. Plos one 2016; 11(5): 1-11
3. Hedstom AK, Sundqvist E, Baarnhielm M a spol.: Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. Brain 2011; 134 (3): 653-664
4. Eftekharian, Mohammad M, Ghannad a spol.: Frequency of viral infections and environmental factors in multiple sclerosis. Hum Antibodies 2016, 24 (6): 17-23

5. Nørgaard M, Nielsen RB, Jacobsen JB a spol.: Use of penicillin and other antibiotics and risk of multiple sclerosis: a population-based case-control study. Am J Epidemiol. 2011; 174(8): 945–948
6. Mitsonis CI, Potagas C, Zervas I, Sfagos K: The effects of stressful life events on the course of multiple sclerosis. Rev Int J Neurosci 2009; 119 (3): 315-335
7. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N.: ASIA autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. J Autoimmun 2011; 36 (1): 4–8
8. D'Angelo G, Lucia M, Sara M a spol.: Atopy and autoimmune thyroid diseases: melatonin can be useful? Pediatr 2016; 42: 95
9. Magyari M.: Gender differences in multiple sclerosis epidemiology and treatment response. Dan Med J 2016; 63 (3): 1-18

2. Extracelulárna DNA ako potencionálny prognostický a terapeutický marker u pacientov so zápalovým ochorením čreva

Kristína Tomová
(všeobecné lekárstvo, 4.ročník)
Spoluautori: MUDr. Zuzana Lešková[1], Doc. MUDr. Tibor Hlavatý[1], PhD., Mgr. Barbora Konečná[2]

Školitelia: Mgr. Janka Bábíčková[2], PhD., RNDr. Ľubomíra Tóthová[2], PhD.
[1]V. Interná klinika, LF UK, Univerzitná nemocnica, Bratislava; [2]Ústav molekulárnej biomedicíny LFUK

Úvod

DNA, ktorá je nositeľom genetickej informácie je súčasťou každej bunky, kde sa vyskytuje v jadre a v mitochondriách. DNA je možné ale nájsť aj v mimojadrovom priestore. Sme sa dostáva rôznymi spôsobmi z buniek. Takúto DNA nazývame extracelulárna DNA (ecDNA).

EcDNA je prítomná v plazme, bola izolovaná aj zo slín, moča, materského mlieka a dokonca aj semena.[1] Hlavným zdrojom ecDNA za fyziologických podmienok sú bunky nachádzajúce sa v krvi.[2,3] Za nefyziologických podmienok, napríklad pri orgánovom poškodení aké vzniká pri infarkte myokardu, mŕtvici, či popáleninách, koncentrácie ecDNA v plazme stúpajú a vtedy sú hlavným zdrojom ecDNA bunky poškodených orgánov.[4,5,6,7,8]

Na druhej strane, u neutrofilov aktivovaných určitými podnetmi, napríklad rôznymi cytokínmi alebo lipopolysacharidom, môže dôjsť k špecifickému typu bunkovej smrti nazývanej NETóza.[9] Je to proces, pri ktorom neutrofil tvorí siete (NETy), pomocou ktorých vypudzuje zo seba DNA do extracelulárneho priestoru. Aj v tomto prípade dochádza k zvyšovaniu ecDNA. Hoci primárna úloha neutrofilov je ochrana tela pred poškodením, počas nadmernej akumulácie spolu s ostatnými molekulami a zápalovými bunkami, môžu viesť k poškodeniu tkaniva. Proces NETózy môže preto poslúžiť ako marker zápalu, čo sa už pozorovalo pri viacerých zvieracích modeloch a pri rôznych typoch chorôb.[10]

Zápalové črevné choroby sú chronické choroby gastrointestinálneho traktu s multifaktoriálnou etiológiou. Patria sem Crohnova choroba, ulcerózna kolitída a iné nešpecifické kolitídy. Crohnova choroba inak regionálna enteritída je charakterizovaná transmurálnymi, nekazeifikujúcimi zápalovými granulómami.[11] Najčastejšie postihuje 15-25 cm úsek terminálneho ilea, môže sa rozšíriť do céka a ascendentnej časti hrubého čreva. Makroskopické znaky segmentálne s neporušenými zónami, postihujú celú hrúbku steny postihnutej časti čreva, častá je fibróza. Mikroskopicky je vidieť na sliznici škvrnité ulcerácie, submukóza je edematózne rozšírenia s lymfoidnými nahromadeninami. Svalovina je infiltrovaná zápalovými bunkami. Komplikácie tohto ochorenia sú malabsorpcia, tvorba fistúl, tvorba striktúr, predispozícia k vzniku malignity.[12]

Ulcerózna kolitída sa začína klasicky v rekte a pokračuje nahor do sigmy, zostupnej časti hrubého čreva, a ďalej ascendentne, pričom niekedy môže postihnúť celé hrubé črevo.[13] Makroskopicky je črevo postihnuté plynule, častejšie povrchovo t.j. ohraničené sliznicou. Mikroskopicky je sliznica prekrvácaná s ulceráciami, submukóza normálna alebo tenšia. Komplikácie tohto ochorenia sú toxické megacolon (akútne, náhle dochádza ku výraznému stenčeniu steny s výraznou dilatáciou a náchylnosťou k perforácii a peritonitíde), perianálne fistuly, karcinóm, tvorba striktúr. Obe

ochorenia sa vyskytujú v každom veku, ale častejšie v 2. až 3. dekáde života, pričom častejšie postihujú ženy ako mužov.[10]

Na myšacom modeli kolitídy, indukovanej dextrán sulfátom sodným sa zistilo, že ecDNA v plazme je vyššia ako u zdravých myší, a že tieto koncentrácie pozitívne korelovali s dĺžkou trvania kolitídy. Zároveň, proporcionálne stúpal aj počet NET-ov. Navyše koncentrácie ecDNA u pacientov s ulceróznou kolitídou korelovali s klinickým stavom ochorenia.[14]

Naše doterajšie štúdie so zameraním sa na ecDNA ukazujú, že ecDNA môže stúpať počas priebehu DSS indikovanej kolitídy u myší. U pacientov takáto dynamika nebola zatiaľ popísaná.

Cieľom našej práce bolo teda zistiť, či je ecDNA u pacientov s rôznymi typmi kolitíd vyššia v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých jedincov. Keďže ecDNA môže byť vyššia nielen v dôsledku jej uvoľňovania z poškodených buniek ale aj v dôsledku nižšej aktivity DNázy, cieľom bolo popísať aj aktivitu tohto enzýmu, ktorý má za úlohu ecDNA degradovať.

Materiál a metodika

Vzorky krvi sme získali na základe spolupráce s V. internou klinikou Univerzitnej nemocnice v Bratislave. Pacientom s ulceróznou kolitídou a Crohnovou chorobou, bola odobratá vzorka krvi do skúmavky obsahujúcej K_3EDTA pre zisk plazmy a skúmavky bez aditíva na zisk séra. Ako kontrolnú skupinu sme použili zdravých jedincov, ktorým sme odobrali krv rovnakým spôsobom. Celkovo sme mali 56 pacientov (39 pacientov vs. 17 kontrol).

Krv bola centrifugovaná po dobu 10 minút 2000 g, následne bol odpipetovaný supernatant do novej skúmavky a centrifugovaný znovu na 10 minút 2000 g aby sme sa zbavili všetkých krvných buniek. Následne, boli plazmy centrifugované na 16000 g 10 min pri 4 °C pre odstránenie apoptotických teliesok.

Izolácia a meranie ecDNA

EcDNA bola izolovaná z 200µl ľudskej plazmy použitím QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko) podľa odporúčaného protokolu. Po vyizolovaní bola DNA skladovaná na - 20°C do ďalšej analýzy. Na meranie koncentrácie ecDNA v plazme sa použil Qubit Fluorometer a Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, California, USA).

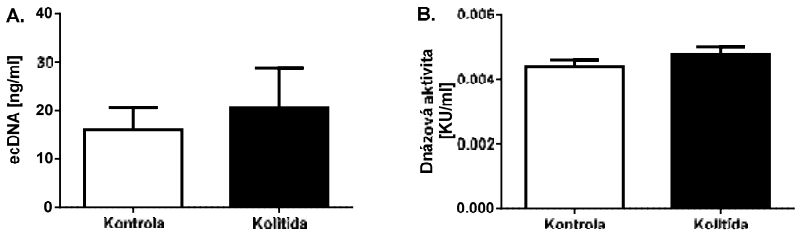
Meranie DNázovej aktivity

DNázová aktivita vo vzorkách séra bola meraná radiálnou enzýmovou difúznou metódou (SPRED) použitím 1% agarózového gélu, ktorý obsahoval DNA v koncentrácii 5mg/ml. Do gélu sa tiež pridali roztoky TRIS-HCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, aby sa vytvorili vhodné podmienky pre aktivitu enzýmu. Z každej vzorky séra boli 2µl napipetované do pripraveného gélu, a následne počas noci inkubované na 37˚C v tme. DNáza I bola riedená pre vytvorenie kalibračnej krivky. Priemery kruhov vytvorených degradáciou DNA v géli boli merané pomocou ImageJ softvéru a následne prerátané na aktivitu DNázy.

Dáta sme štatisticky spracovali pomocou programu GraphPad Prism v 6.0, použitím nepárového t-testu. $p<0,05$ sme hodnotili ako štatisticky významné. Dáta sú prezentované ako priemer + štandardná chyba priemeru (SEM).

Výsledky

Priemerná koncentrácia ecDNA vo vzorkách plazmy v kontrolnej skupine bola 16,83 ± 4,59 ng/ml a u pacientov s kolitídou 20,57 ± 8,20 ng/ml. Tento rozdiel nebol štatisticky signifikantný (Obrázok 1A). Nameraná DNázová aktivita bola v skupine pacientov s kolitídou vyššia o 8,7% v porovnaní s kontrolnou skupinou. Ani tento rozdiel však nebol štatisticky významný (Obrázok 1B).



Obrázok 1. Výsledky koncentrácií ecDNA (A) a DNázovej aktivity (B). Dáta prezentované ako priemer + SEM.

Diskusia

Zápalové ochorenia ako i poškodenie rôznych tkanív vedie k zvýšenej ecDNA v plazme takýchto pacientov. V prípade zápalových ochorení čriev kam sa radí najmä Crohnova choroba a ulcerózna kolitída sa potvrdilo experimentálne zvýšenie ecDNA u zvierat s DSS indukovanou kolitídou. U pacientov sa na našej vzorke signifikantné rozdiely nepodarilo v koncentráciách ecDNA zistiť. Pacienti s kolitídou mali síce o 22% vyššiu koncentráciu ecDNA v porovnaní s kontrolnou skupinou, ale tento rozdiel nebol štatisticky významný. Dôvodov na takéto zistenie môže byť niekoľko. V prvom rade, ide o pacientov buď s Crohnovou chorobu alebo ulceróznou kolitídou. Obe ochorenia, aj keď sa radia medzi zápalové črevné ochorenia, majú odlišnú patogenézu, ktorej v súčasnosti nie úplne rozumieme. Takisto, išlo o prierezovú štúdiu, t.j. pacienti, ktorých sa nám podarilo získať boli v rôznych štádiách ochorenia a tiež s rôznou liečbou. To všetko mohlo mať vplyv na nesignifikantné rozdiely. Na druhej strane, aktivita DNázy bola tiež vyššia u pacientov s kolitídou, čo mohlo viesť k väčšej degradácii ecDNA.[15]

Záverom možno povedať, že na našom súbore sa nám nepodarilo jednoznačne dokázať vyššie koncentrácie ecDNA u pacientov s kolitídou. Avšak nízky počet pacientov a veľká variabilita v klinickom stave, ako i v liečbe pacientov s kolitídou vyžaduje rozšírenie súboru a následné podskupinové analýzy, pre potvrdenie, či ecDNA je vhodný prognostický a terapeutický marker zápalových črevných ochorení.

Zoznam použitej literatúry:

1. O'Driscoll, L. Extracellular nucleic acids and their potential as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers. Anticancer Res 2007, 27, 1257-1265

2. Lui, Y. Y. et al. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. Clin Chem 2003, 49, 495-496
3. Zhong, X. Y. et al. Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. Obstet Gynecol 2000, 96, 991-996
4. Antonatos, D., Patsilinakos, S., Spanodimos, S., Korkonikitas, P. & Tsigas, D. Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. Ann N Y Acad Sci 2006, 1075, 278-281
5. Destouni, A. et al. Cell-free DNA levels in acute myocardial infarction patients during hospitalization. Acta Cardiol 2009, 64, 51-57
6. Boyko, M. et al. Cell-free DNA--a marker to predict ischemic brain damage in a rat stroke experimental model. J Neurosurg Anesthesiol 2011, 23, 222-228
7. Chiu, T. W., Young, R., Chan, L. Y., Burd, A. & Lo, D. Y. Plasma cell-free DNA as an indicator of severity of injury in burn patients. Clin Chem Lab Med 2006, 44, 13-17
8. Shoham, Y. et al. Admission cell free DNA as a prognostic factor in burns: quantification by use of a direct rapid fluorometric technique. Biomed Res Int 2014, 306580
9. Brinkmann, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 2004, 303, 1532-1535
10. Masuda, S. et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. Clin Chim Acta 2016, 459, 89-93
11. Soucy, G. et al. Clinical and pathological analysis of colonic Crohn´s diesease, including a subgroup with ulcerative colitis-like features. Mod Pathol 2012, 25, 295-307
12. Neurath F. M. Current and emerging therapeutic targets for IBD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2017, 1-10
13. Di Sabatino A. Recent advances in understanding of ulcerative colitis. Intern Emerg Med 2012, 7, 103-111
14. Koike, Y. et al. Dynamic pathology for circulating free DNA in a dextran sodium sulfate colitis mouse model. Pediatr Surg Int 2014, 30, 1199-1206
15. Dunaeva, M et al. Decreased serum cell-free DNA levels in rheumatoid arthritis Auto Immun Hightlights 2015, 23-30

3. Chorobnosť a faktory pôsobiace na zdravotný stav dieťaťa v predškolskom veku

Katarína Bahnová
(všeobecné lekárstvo, 6. ročník)

Školiteľ: Doc. MUDr. Ingrid Brucknerová, PhD.
Neonatologická klinika intenzívnej medicíny LFUK a DFNsP v Bratislave

Úvod

Detstvo je dynamické obdobie, ktorého základnými charakteristikami je rast a vývin. Dochádza k zväčšovaniu orgánov, ale aj ku zmenám ich funkcie.

V našej práci sme sa zamerali na obdobie predškolského veku. Je to obdobie, kedy dochádza k najpomalšiemu tempu rastu dieťaťa. Priberá 1.0-1.5kg/rok a ročne vyrastie len 5-7 cm. Je to obdobie, v ktorom dochádza k tzv. socializácii. Chorobnosť detí nie je vysoká, ale deti v kolektíve sú častejšie choré než tie, čo sú vychovávané doma (1). Po nástupe do kolektívu sa chorobnosť zvyšuje v dôsledku nového prostredia s novými antigénmi, s ktorými sa jedinec doposiaľ nestretol. Imunitná sústava nie je ešte dokonalo vyvinutá, pretože mu chýba imunologická „pamäť“. Častým prejavom sú ochorenia horných dýchacích ciest – kašeľ a nádcha. Motorika je dobre rozvinutá, dieťa sa učí komplikovanejšie návyky. Toto obdobie je vhodné na učenie športových aktivít. Dieťa je veľmi zvedavé, pýta sa množstvo otázok, ktoré rozvíjajú jeho myslenie. Okolo 4. roku života sa objavuje obdobie vzdoru, kde dieťa hľadá hranice a chce poukázať na svoju nezávislosť.

Materiál a metodika

Monitoring zdravotného stavu detí v predškolskom veku sa uskutočnil v období od mája 2014 do septembra 2015. Vykonali sme prieskum pomocou dotazníkovej metódy. Dotazník, ktorý bol súčasťou projektu „Zdravá škôlka“. Prieskumu sa zúčastnilo 45 detí v predškolskom veku z Materskej škôlky, Bazovského 4 v Bratislave-Dúbravka.

Výsledky

Chorobnosť

Otázka: Ako často býva Vaše dieťa choré?

Chorobnosť 45 detí opýtaných respondentov: Jedenkrát ročne sú choré 4 deti. Dvanásť škôlkarov je za rok chorých 2-3x. Päť jedincov zasiahne choroba 4x ročne. Sedem detí je postihnutých 6x za rok na ochorenia respiračnej sústavy. Tri deti sú choré 12x ročne. Štyria rodičia ďalej odpovedali, že ich dieťa je choré ,,často“ alebo ,,zriedka“, bližšie túto odpoveď nekomentovali, preto nevieme udať presnú číselnú hodnotu. Šesť respondentov neodpovedalo.

Otázka: Ktoré dýchacie cesty postihuje choroba najčastejšie?

Horné dýchacie cesty postihuje 43 škôlkarov. Ochorenie dolných dýchacích ciest malo jedno dieťa. Na túto otázku neodpovedal jeden rodič.

Otázka: Bolo Vaše dieťa menej choré pred nástupom do škôlky?

Zo štatistických údajov zo škôlky v Dúbravke odpovedalo 8 rodičov áno a 37 opýtaných tvrdí, že nie, chorobnosť sa zvýšila.

Na otázku či je dieťa náchylné na choroby rodičia odpovedali nasledovne: 19 rodičov odpovedalo áno, 21 respondentov odpovedalo negatívne a 5 rodičov neodpovedalo.

Otázka: Odkiaľ predpokladáte, že Vaše dieťa najčastejšie získa chorobu?

Miestom nákazy je v 34 prípadoch materská škola. Tri prípady sa infikovali od rodinných príslušníkov. Šesť zo 45 respondentov odpovedalo, že nákazu získalo z okolia (ihrisko, nákupné centrum. Dvaja rodičia na túto otázku neodpovedali.

Na otázku terapie respondenti odpovedali nasledovne: u 5 jedincov boli indikované kvapky do nosa, 2 užívali kvapky na kašeľ, jeden jedinec bral antibiotiká bez akejkoľvek inej terapie. Kombinácia kvapiek do nosa a do uší malo 16 detí. Antibiotiká v rôznych kombináciách s kvapkami do nosa a kvapkami na kašeľ užívalo spolu 19 škôlkarov. Dvaja respondenti na položenú otázku neodpovedali.

Športové aktivity

Otázka: Športuje Vaše dieťa pravidelne?

Na túto otázku odpovedalo 13 respondentov áno, 23 odpovedí bolo negatívnych a 9 rodičov neodpovedalo.

Na otázku: Čo robí vaše dieťa vo voľnom čase, nikto z opýtaných neodpovedal ,,nič“. Všetci respondenti označili buď športové krúžky, bicyklovanie, hru na ihrisku, maľovanie, tancovanie alebo učenie sa cudzích jazykov.

Pri otázke ako často chodia rodičia s deťmi na prechádzku týždenne, bolo iba 13 respondentov odpovedajúcich ,,každý deň“. 2-3x týždenne chodí na prechádzku 14 odpovedajúcich. 15 rodičov chodí 5-7x týždenne na prechádzky.

Výživa

Výsledky odpovedí na otázku o konzumácii jogurtov dopadli nasledovne: 26 rodičov odpovedalo áno, každý deň má ich dieťa jogurt. 19 respondentov odpovedalo negatívne.

Tridsaťsedem opýtaných odpovedalo áno na otázku, či ich dieťa každodenne má čerstvé ovocie. Negatívnych odpovedí bolo 8.

Otázka: Má Vaše dieťa nadváhu? Na túto otázku odpovedali všetci rodičia. Jeden rodič uviedol, že jeho dieťa má obezitu, 44 opýtaných uviedlo, že ich dieťa nie je obézne, ani nemá nadhmotnosť.

Alergie

Súčasťou dotazníka boli aj otázky týkajúce sa alergií. Vyplýva z neho, že 33 detí netrpí alergiou. Zvyšných 12 jedincov alergiou trpí.

Diskusia

Aj napriek nepriaznivým štatistikám ako vo svete, tak i na Slovensku, deti z Materskej škôlky, Bazovského 4 v Bratislave majú veľmi dobré výsledky.

Prechod z domáceho prostredia do kolektívu má dopad na chorobnosť jedinca. Až 37 detí zo 45 bolo menej choré pred nástupom do MŠ a 19 má vyššiu náchylnosť k chorobám. V 34 prípadoch je miestom získania infekcie MŠ. V chorobnosti dominujú ochorenia horných dýchacích ciest postihnúcich až 43 detí. Podľa Úradu verejného zdravotníctva v roku 2016 vo veku 0-5 rokov bolo na akútne respiračné ochorenia (ARO) postihnutých 5/100 000 detí (2). Kvaerner K.J., Nafstad P., Jaakkola J.J, (2000), sledovali postihnutie dýchacích ciest detí v predškolskom veku. Ich výsledky sú zhodné s našimi (3). V ich súbore dominovali ochorenia horných dýchacích ciest. Zistili, že najčastejšie sa vyskytujú u detí vo veku 4 rokov. Chorobnosť pri prechode z domáceho prostredia do škôlky je prirodzená a je nevyhnutná pre správny vývoj imunitného systému.

Mnoho štúdií tvrdí, že podávanie antibiotickej liečby v rannom veku, t. j. prvých 6 mesiacov života, je asociované s alergiami a s astmou bronchiale. Túto skutočnosť potvrdzuje štúdia Kari a Risnes, (2010), kde analýza potvrdila súvislosť medzi vznikom alergii a astmy po podávaní antibiotickej terapie. Percento zvýšenia nie je výrazné, ide o 1.89 %, kde deti mali vyššiu incidenciu astmy a u 1.59 % skúmaných vznikla kožná alergia (4). Výsledky z MŠ taktiež dokazujú, že vysoké percento detí užíva antibiotiká. Výsledky o užívaní antibiotík prvých 6 mesiacov života nie sú známe, ale keď sa pozrieme na aktuálnu štatistiku, percentá užívania ATB v predškolskom veku sú pomerne vysoké. V súvislosti s výsledkami alergií môžeme predpokladať dve skutočnosti. Buď tieto deti v rannom detstve ATB neužívali, alebo im vzhľadom na nízky vek prejav z užívania nestihol vzniknúť.

Celosvetovo má incidencia alergií stúpajúcu tendenciu. Podľa WHO sú štvrté v rebríčku najčastejších ochorení. Od roku 2015 približne každý druhý Európan je alergik. Najčastejším typom sú respiračné alergie. Z nášho súboru respondentov má necelá 1/3 detí alergiu, čo predstavuje zo všetkých opýtaných necelých 27 %. Podľa „American Academy of Allergy Asthma and Immunology“ , (2012), v rokoch 2009-2010 z 38 480 amerických detí zapojených do prieskumu týkajúcich sa alergií na jedlo, hmyz, kožné a respiračné alergií, tých vo vekovej skupine 3-5 rokov je až 9 % alergických na potraviny a 11% jedincov má kožné alergie (5). „American College of Allergy, Asthma and Immunology“ , (2004), tvrdí, že najčastejšími alergiami na potraviny sú arašidy, vajíčka, mlieko a mliečne výrobky (6). Deti z MŠ v Dúbravke dosahujú lepšie výsledky ako udávajú spomínané štatistiky.

Najnovšie výskumy ukazujú na nedostatok stravovacích návykov. Hoci sa o zdravej výžive veľa hovorí, rodičia však nevedia, čo majú pod týmto výrazom rozumieť. Domáce prostredie zohráva jednu z najdôležitejších úloh v návykoch stravovania. Pokiaľ jedinec nie je schopný rozhodovať sám za seba, výber potravín je v rukách rodičov.

Zdravá výživa zahŕňa aj pitný režim. Voda tvorí okolo 60 % dospelého organizmu. Množstvo vody u detí je však vyšší. Rovnako je i vyšší obrat vody v organizme, a preto sú deti rizikovou skupinou. Netreba podceňovať množstvo prijatých tekutín, odporúča sa 1.7 l vody (nie sladených nápojov s vysokým obsahom sacharidov).

Podľa „Centres of Disease Control and Prevention“, (2014), má konzumácia ovocia u detí zvyšujúcu tendenciu, od roku 2003 narástla o 67 %, avšak stále nie je dostatočná (7). V porovnaní s výsledkami z materskej školy je celosvetový stav horší. ,,Daily Mail“ , (2014), uvádza, že nízky trend konzumácie mliečnych výrobkov, ovocia a zeleniny si všimla aj Európska Únia. Návrh na dotáciu školských

zariadení vo všetkých členských štátoch EÚ je už zahrnutý aj v európskom programe, ktorý má podporiť konzumáciu ovocia, zeleniny a mliečnych výrobkov (8).

V roku 2012, v rozmedzí 2-5 rokov malo obezitu 8.4 % amerických detí v predškolskom veku (9). Je to na daný vek veľmi vysoké číslo. Z detí v sledovanej škôlke má obezitu iba 1 jedinec, ktorý predstavoval 2 % z celého súboru. Tieto výsledky sú uspokojujúce, avšak treba si uvedomiť, že súbor tvorí malé percento detí z celého Slovenska.

Nemali by radšej zvýšiť spotrebu ovocia a zeleniny? Problémom však nie sú iba zlé stravovacie návyky, ale nedostatok športových aktivít. Deti často preferujú hru na počítači či na mobile, žiaľ, fyzická aktivita je v čoraz viac v úzadí.

Šimonek, (2006), definuje pohybovú aktivitu ako každú pohybovú činnosť, ktorá v dostatočnej miere zvyšuje požiadavky na funkcie organizmu, vyžadujúcu energetický výdaj nad úroveň výdaja v pokoji. Zaraďujeme sem všetky pracovné, záujmové a telesno-športové aktivity (10).

Pre dôležitosť pohybu vplývajúcu na dieťa sme sa zameriavali na otázky, či dieťa športuje a v akej týždennej frekvencii chodí aspoň na prechádzky. Z výsledkov vyplýva, že osveta dôležitosti pohybu je dostatočná. Pozitívom je, že až 15 detí je na prechádzke takmer denne a 14 detí 2-3x týždenne. Pre porovnanie „National Association for Sport and Physical Education“, (1999), tvrdí, že iba 1 z 3 amerických detí vykonáva fyzickú aktivitu denne (11). Naše výsledky sú uspokojujúce, otázkou však ostáva, či sú rodičia schopní zabezpečiť pravidelnosť fyzickej aktivity aj v neskoršom vývine dieťaťa, kedy sa za posledné roky do popredia dostávajú sedavé aktivity v podobe televízorov a počítačových hier. Podľa súčasných štatistík americké deti vo veku 1-18 rokov strávia približne 7,5 hodiny pred obrazovkami. Aj pre tento problém, nedostatok pohybu v neskoršom veku, dosahuje obezita také epidemické rozmery.

Zoznam použitej literatúry:

1. KAPELLEROVÁ A. a spol.: Propedeutika detského lekárstva. Bratislava : Univerzita Komenského, 2002. 292 s. ISBN 80-223-1924-5
2. MIKAS J.: Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky. Informácia o výskyte akútnych respiračných ochorení a chrípky a chrípke podobných ochorení v Slovenskej republike za 1. kalendárny týždeň 2017, 2017. www.uvzsr.sk/index.php?option=com_content&view=article&id=3028:informacia-onvyskyte-akutnych-respiranych-ochoreni-anchripky-anchripke-podobnych-ochoreni-v-slovenskej-republike-za-1-kalendarny-tyde-2017&catid=58:epidemiologicka-situacia&Itemid=64
3. KVAERNER K.J., NAFSTAD P., JAAKKOLA J.J.: NCBI. Upper respiratory morbidity in preschool children: a cross-sectional study, 2000.
4. KARI R, RISNES et al.: Americal Journal of Epidemiology. Antibiotic Exposure by 6 Months and Asthma and Allergy at 6 Years: Findings in a Cohort of 1,401 US Children, 2010.
5. AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY.: Allergy Statistics, 2012. www.aaaai.org/about-aaaai/newsroom/allergy-statistics
6. AMERICAN COLLEGE OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY.: Children and Allergies, 2014. www.acaai.org/allergies/who-has-allergies/children-allergies
7. CENTRES OF DESEASE CONTROL AND PREVENTION: Progress on Children Eating More Fruit, Not Vegetables, 2014. www.cdc.gov/vitalsigns/fruit-vegetables/

8. MAIL ONLINE: Enjoy a yogurt at school? Hard cheese, says EU: Eurocrats want to ban snacks in 'healthy eating' campaign, 2014.www.dailymail.co.uk/news/article-2554924/Enjoy-yogurt-school-Hadr-cheese-says-EU-Eurocrats-want-ban-snacks-healthy-eating-campaign.html
9. CENTRES OF DESEASE CONTROL AND PREVENTION: Childhood Obesity Facts, 2011. cdc.gov/obesity/data/childhood.html
10. ŠIMONEK J: Športové záujmy a pohybová aktivita v dennom režime a ich vplyv na prevenciu drogových závislostí detí a mládeže. In: Štúdie III. Nitra: Pedagogická fakulta UKF, 2006. s. 7-102.
11. NATIONAL ASSOCIATION FOR SPORT AND PSYSICAL EDUCATION. The Fitness Equation: Physical Activity + Balanced Diet = Fit Kids. Reston, VA: National Association for Sport and Physical Education, 1999.
12. DAVIES JR: Alergie a senná rýma. Banská Bystrica: Grada, 1999. 88 s.
13. ZACHAR D: Výživa človeka I., Zvolen: TU, 2006. 265 s
14. ŠAŠINKA M, ŠAGÁT T, KOVÁCS L, a spol.: Pediatria: zväzok 2. Bratislava: Herba, 2007. 741-1450 s.
15. ŠAŠINKA, M., ŠAGÁT, T., KOVÁCS, L., a spol.: Pediatria: zväzok 1. Bratislava: Herba, 2007. 741-1450 s.
16. LONGMORE M et al.: Oxford Handbook of Clinical Medicine. UK: Oxford University Press, 2012. 862 s.
17. KOVÁCS L. a spol.: Pediatria. Bratislava: Arete, 2010. 412 s.
18. KOVÁCS L. a spol.: Pediatrická propedeutika. Bratislava: Arete, 2010. 123 s.
19. LEŠŤAN M: Imunitný systém, 2015. www.alergoimun.sk/index.php/odborne-temy/imunitny-system
20. KOVÁCS L et al.: Nové trendy vo výžive detí. Bratislava, 2009. www.zzv.sk/publikacie/nove-trendy-vo-vyzive-deti
21. LEANN, LB, FISHER JO: Development of Eating Behaviors Among Children and Adolescents, 1998. Pediatrics 1998;101: 539-549.
22. WORLD HEALTH ORGANISATION.: Physical activity and young people www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet_young_people/en/
23. LEVIN S, LOWRI R, BROWN RRD et al.: Physical Activity and Body Mass Index Among US AdolescentsYouth Risk Behavior Survey 1999. Arch Pediatr Adolesc Med. 2003; 157(8): 816-20
24. ABDALLAH C, Acute epiglottitis: Trends, diagnosis and management, Saudi J Anaesth. 2012 Jul-Sep; 6(3): 279–281

4. Aterogénny index plazmy je pozitívne asociovaný s rizikom smrti u starších žien – 10-ročná follow up štúdia

Rúth Báneszová, Mária Bisahová
(všeobecné lekárstvo, 6.ročník)
Spoluautori: Sabaka Peter, Bendžala Matej, Čaprnda Martin, Komorníková Andrea, Dukát Andrej

Školiteľ: MUDr. Peter Sabaka, PhD
I. Interná klinika LF UK, Univerzita Komenského v Bratislave

Úvod

Napriek pokrokom liečby a prevencie, kardiovaskulárne choroby naďalej ostávajú vedúcou príčinou smrti v európskych krajinách (0).Väčšina kardiovaskulárnych príhod sa vyskytuje u pacientov starších ako 60 rokov (1). Existuje mnoho dôkazov spájajúcich dyslipidémiu s vysokou koncentráciou lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) a nízkou koncentráciou lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL) s vývojom a progresiou kardiovaskulárnych chorôb (3,3). Starší pacienti však predstavujú špecifickú populáciu z hľadiska hodnotenia kardiovaskulárneho rizika, zrejme vďaka polymorbidite s efektom viacerých modifikujúcich faktorov. Štúdie doposiaľ nepreukázali jasnú spojitosť medzi kardiovaskulárnym rizikom a koncentráciou LDL v geriatrickej populácii a veľká metaanalýza dokonca poukázala na negatívnu asociáciu koncentrácie LDL s rizikom smrti u seniorov (5). Koncentrácia LDL teda nie je vhodná na odhadovanie kardiovaskulárneho rizika v populácií pacientov s vyšším vekom.

Aterogénny index plazmy (AIP) je logaritmus podielu koncentrácie triacylglycerolu k HDL a predstavuje užitočný marker kardiovaskulárneho rizika (6). AIP totiž úzko koreluje s plazmatickou koncentráciou malých denzných LDL častíc (7). Tie sú významne asociované s rizikom rozvoja kardiovaskulárnych ochorení (7). Vzťah medzi AIP a prežívaním u geriatrickej populácie nebol doposiaľ skúmaný. Našim cieľom bolo zistiť vzťah AIP a mortality v populácií pacientov nad 60 rokov a overiť hypotézu, že AIP by mohol predstavovať lepší prognostický faktor než koncentrácia LDL alebo celkový cholesterol u seniorov.

Materiál a metodika

Pacienti a dizajn: Uskutočnili sme prospektívnu observatívnu štúdiu populácie pacientov II. internej kliniky Lekárskej Fakulty Univerzity Komenského v Bratislave.

Pacienti starší ako 60 rokov boli náhodne vybraní zo všetkých hospitalizovaných a nehospitalizovaných na klinike medzi rokmi 2006 a 2007. Pri zaradení boli zozbierané demografické a antropometrické dáta, farmakologická anamnéza a osobná anamnéza. Plazmatické LDL, HDL, celkový cholesterol a koncentrácia TAG boli vyšetrené z venóznej krvi u nalačno (minimálne 12 hod. lačnenie). Pacienti s anamnézou onkologického ochorenia okrem dlhodobej remisie (minimum 5 ročná remisia), cirhózy pečene, Cushingovho syndrómu, kortikoterapie, nekontrolovaného hypotyreoidizmu alebo hypertyreoidizmu, chronickou obličkovou chorobou vyžadujúcou transplantáciu, alkoholici a drogovo závislí a pacienti s malabsorpčným syndrómom boli vylúčení. Prežívanie alebo dátum smrti boli stanovené 10 rokov po prijatí z národného registra.

Zber a spracovanie krvi: Krv bola odobraná systémom Vacutainer z vena cubiti. Po odobratí boli vzorky uložené pri izbovej teplote po dobu 30 min a následne boli centrifugované (10 min, 3000 rpm). Supernatant bol skladovaný pri 4st. C a spracovaný v priebehu 8 hodín.
Biochemická analýza: Celkový cholesterol, LDL, HDL, a TAG boli určené enzymatickou kolorimetrickou metódou(Cobas Mira Plus, Roche Diagnostics GmbH, Montclair, NJ, USA).
Štatistická analýza: deskriptívne dáta sú prezentované ako priemer ± smerodajná odchýlka. Priemery kvantitatívnych premenných boli porovnané použitím T-testu (pri normálnom rozložení) alebo Mann-Whitney testu ak neboli normálne distribuované. Normálne rozloženie bolo overené použitím Kolmogorov-Smirnovho testu. Asociácia LDL, HDL, non-HDL, TAG a AIP s prežívaním bola hodnotená použitím multivariantnej Coxovej regresnej analýzy. Analýza zahŕňala adjustáciu na vek, fajčenie, užívanie statínov, anamnézu diabetes mellitus, infarktu myokardu, PAOO a NCMP. P hodnoty menšie ako 0.05 boli považované za signifikantné.
Etika: Všetci pacienti podpísali informovaný súhlas. Štúdia bola vykonaná v súlade s etickými princípmi pre biomedicínsky výskum stanovenými Helsinskou deklaráciou.

Výsledky
500 pacientov bolo regrutovaných a 473 pacientov (226 mužov a 247 žien) bolo zaradených do štúdie. Základná charakteristika participantov je uvedená v tabuľke 1.

Tabuľka 1: charakteristika súboru

	muži (n = 226)	ženy (n = 247)	p
Vek (years)	72,17 ± 8,678	73,93 ± 9,118	0,341
BMI (kg/m2)	27,22 ± 6,470	27,50 ± 5,366	0,644
Prežívanie (mesiace)	61,05 ± 45,609	74,68 ± 42,510	< 0,05
TAG (mmol/l)	1,39 ± 0,679	1,53 ± 0,826	< 0,05
Cholesterol (mmol/l)	4,17 ± 1,100	4,71 ± 1,218	0,210
LDL (mmol/l)	2,52 ± 0,843	2,74 ± 0,916	0,428
HDL	1,03 ± 0,340	1,26 ± 0,479	< 0,05
non-HDL (mmol/l)	3,14 ± 1,220	3,44± 1,127	< 0,05
AIP	0,11 ± 0,270	0,07 ± 0,326	< 0.05
Inafarkt myokardu (%)	27,2	13,4	< 0.001
PAOO (%)	17,1	15,5	0.63
Diabetes mellitus (%)	44,2	34,0	< 0.05
NCMP (%)	16,4	13,8	0.78
Statíny v liečbe (%)	28,8	33,2	0.07
Zomrelo (%)	65,5	46,6	< 0.05

AIP – aterogénny index plazmy, BMI – index telesnej hmotnosti, HDL – lipoproteíny vysokej hustoty, LDL – lipoproteíny nízhej hustoty, PAOO – periférne arteriové obliterujúce ochorenie, TAG – triacylglycerol

Tabuľka 2: Coxova multivariantná regresná analýza.

	Pohlavie	p	Exp(B)	95% CI of Exp(B)
AIP	muži	0,801	1,087	0,570 - 2,072
	ženy	< 0.05	2,149	1,160 - 3,984
TAG	muži	0,806	1,031	0,809 - 1,313
	ženy	0,527	1,087	0,839 - 1,408
LDL	muži	0,997	1.000	0,812 - 1,232
	ženy	0,730	0,954	0,731 - 1,180
HDL	muži	0,475	1,223	0,704 - 2,125
	ženy	< 0.05	0,555	0.351 - 0.878
non-HDL	muži	0,744	1,028	0,869 - 1,217
	ženy	0.556	0,945	0,782 - 1,141
Cholesterol	muži	0,638	1,040	0,883 - 1,226
	ženy	0,152	0,869	0,717 - 1,053

AIP – aterogénny index plazmy, HDL – lipoproteíny vysokej hustoty, LDL – lipoproteíny nízhej hustoty, TAG – triacylglycerol

Regresná analýza: Použitím multivariantnej Coxovej regresie pri adjustácii na vek, fajčenie, anamnézu diabetes mellitus, infarktu myokardu, NCMP, chronického obliterujúceho ochorenia dolných končatín a užívania statínov sme pozorovali štatisticky významnú asociáciu rizika smrti z akejkoľvek príčiny s AIP a HDL u žien. Nárast rizika bol asociovaný s poklesom HDL a nárastom AIP. U mužov nebolo riziko smrti asociované so žiadnym zo sledovaných rizikových faktorov (tabuľka 2).

Diskusia

Použiteľnosť tradičných lipidových rizikových faktorov ako koncentrácia LDL a celková koncentrácia choelsterolu v geriatrickej populácii je obmedzená a asociácia LDL s kardiovaskulárnym rizikom u starších pacientov je v súčastnosti predmetom veľmi živej debaty (3,3). V tejto štúdii sme po prvýkrát preukázali, že aterogénny index plazmy je použiteľný ako prognostický marker u žien nad 60 rokov a to nezávisle od rizikových faktorov ako sú fajčenie, užívanie statínov, anamnéza infarktu myokardu, NCMP, diabetes mellitus a periférneho arteriálneho obliterujúceho ochorenia.

AIP bol vyvinutý ako prognostický marker, ktorý mal lepšie odzrkadľovať kardiovaskulárne riziko ako samotná koncentrácia triacylglycerolu, LDL alebo HDL. AIP totiž úzko koreluje s koncentráciou malých denzných LDL, ktoré sú považované za významne aterogénne (7). Existujú dôkazy, že malé denzné LDL sú u starších pacientov dobrým prediktorom fatálneho infarktu myokardu a rozvoja vaskulárnej demencie (9).

AIP je taktiež funkciou koncentrácie triacylglycerolu. Jeho vysoká hladina bola tiež identifikovaná ako marker zvýšenej mortality v populácii nad 60 rokov (10). V našej populácii sme ale asociáciu triacylglycerolémie s rizikom smrti nenašli.

AIP je funkciou koncentrácie HDL. Nízka koncentrácia HDL bola v niektorých prácach asociovaná z rizikom rozvoja demencie a cievnych mozgových príhod u starších pacientov (11,12). My sme pozorovali asociáciu nárastu rizika smrti z akejkoľvek príčiny s poklesom koncentrácie HDL u žien.

Ako už bolo uvedené vyššie, LDL v mnohých štúdiách nie je asociované s rizikom smrti u seniorov (5). K rovnakému záveru sme prišli i v našej štúdii. My však nepredpokladáme, že je za týmto fenoménom chýbanie negatívnych vplyvov vysokej koncentrácie LDL u seniorov, ale skôr efekt polymorbidity a množstva modifikujúcich faktorov pôsobiacich v populácii starších pacientov. Túto teóriu potvrdzuje aj fakt, že statíny sú aj u starších pacientov efektívne v prevencii kardiovaskulárnej smrti (3).

U mužov sa nám nepodarilo preukázať vzťah AIP alebo HDL s mortalitou. Predpokladáme, že to bolo spôsobené vyšším výskytom komorbidít v našej mužskej populácii. Vzhľadom na dizajn práce sme si za end point zvolili smrť z akejkoľvek príčiny, nie kardiovaskulárnu smrť. To však nepovažujeme za výraznú limitáciu, keďže je smrť z akejkoľvek príčiny považovaná autoritami za tvrdší end point (13).

Zoznam použitej literatúry:

1. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. Eur Heart J. 2014; 35(42):2950-9.
2. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation. 2009; 119(3):e21-181.
3. Pedro-Botet J, Climent E, Chillarón JJ et al. Statins for primary cardiovascular prevention in the elderly. Journal of Geriatric Cardiology : JGC. 2015; 12(4):431-438.
4. Tikhonoff V, Casiglia E, Mazza A et al. Low-density lipoprotein cholesterol and mortality in older people. J Am Geriatr Soc. 2005; 53(12):2159-64.
5. Ravnskov U, Diamond DM, Hama R et al. Lack of an association or an inverse association between low-density-lipoprotein cholesterol and mortality in the elderly: a systematic review. BMJ Open. 2016; 6(6):e010401.
6. Dobiásová M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). Clin Biochem. 2001; 34(7):583–8.
7. Dobiášová M, Frohlich J, Šedová M, Cheung MC, Brown BG. Cholesterol esterification and atherogenic index of plasma correlate with lipoprotein size and findings on coronary angiography. Journal of Lipid Research. 2011; 52(3):566-571.
8. Toft-Petersen AP, Tilsted HH, Aarøe J et al. Small dense LDL particles - a predictor of coronary artery disease evaluated by invasive and CT-based techniques: a case-control study. Lipids in Health and Disease. 2011; 10:21.
9. Watanabe T, Koba S, Kawamura M et al. Small dense low-density lipoprotein and carotid atherosclerosis in relation to vascular dementia. Metabolism. 2004; 53(4):476-82.
10. Bathum L, Depont Christensen R, Engers Pedersen L, Lyngsie Pedersen P, Larsen J, Nexøe J. Association of lipoprotein levels with mortality in subjects aged 50 + without previous diabetes or cardiovascular disease: A population-based register study. Scandinavian Journal of Primary Health Care. 2013; 31(3):172-180.
11. Curb JD, Abbott RD, Rodriguez BL et al.. High density lipoprotein cholesterol and the risk of stroke in elderly men: the Honolulu heart program. Am J Epidemiol. 2004; 160(2):150-7.

12. Zuliani G, Cavalieri M, Galvani M et al. Relationship Between Low Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol and Dementia in the Elderly. The InChianti Study. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences. 2010; 65A(5):559-564.
13. Lauer MS, Blackstone EH, Young JB, Topol EJ. Cause of death in clinical research: time for a reassessment?. J Am Coll Cardiol. 1999; 34(3):618-20.

5. Vplyv civilizačných ochorení rodičov na zdravie ich detí v predškolskom veku

Lucia Soldanová
(Všeobecné lekárstvo, 6. ročník)

Školiteľ: doc. MUDr. Ingrid Brucknerová, PhD.
Neonatologická klinika intenzívnej medicíny LFUK a DFNsP Bratislava

Úvod

Životný štýl detí a mládeže sa mení. Konzumácia kalorických a mastných jedál a nedostatok pohybových aktivít sú najčastejšou príčinou civilizačných ochorení (hypertenzia, diabetes mellitus, obezita, fajčenie) (5,10). V súčasnosti predstavujú rastúci zdravotný problém. U detí v predškolskom a školskom veku je to závislosť na televízii, počítačových a internetových hrách. Ak civilizačné choroby trápia už deti v predškolskom veku, vo väčšine prípadov môžu za to rodičia. My sme sa v našej práci venovali deťom v predškolskom veku.

Materiál a metodika

Analýza bola vykonávaná spracovaním údajov dotazníkovou metódou. Dotazník, ktorý bol súčasťou projektu „Zdravá škôlka“ bol adresovaný rodičom detí predškolského veku, ktorí navštevujú Materskú školu (MŠ) Bazovského 4, Bratislava-Dúbravka v období máj 2014-september 2015.
Cieľom našej analýzy bolo zistiť výskyt civilizačných ochorení (hypertenzia, diabetes mellitus, obezita , fajčenie) u detí v predškolskom veku v sledovanej skupine. Sledovanú skupinu tvorilo 45 detí predškolského veku (3-6 rokov) a 37 párov rodičov detí vo veku 20-55 rokov. Rodičia a deti neboli rozlišované podľa pohlavia.

Výsledky

Zisťovali sme % zastúpenie sledovaných informácií v jednotlivých skupinách.
V našom dotazníku sme sa pýtali rodičov detí na nasledujúce otázky:
Otázka č. 1: **Máte vysoký krvný tlak?**
V sledovanej skupine rodičov sme sa dozvedeli, že 4 rodičia (10,81 %), ostatných 33 rodičov (89,19 %) odpovedalo záporne.
Otázka č. 2: **Máte cukrovku?**
V sledovanej skupine rodičov sme zistili, že iba 1 z páru rodičov (2,7 %) má cukrovku a 36 rodičov ju nemá (97,3 %).
Otázka č. 3: **Má vaše dieťa cukrovku?**
Výskyt diabetu sa nepotvrdil. Ani jedno zo 45 detí nemalo cukrovku.
Otázka č. 4: **Máte nadváhu?**
V sledovanej skupine rodičov sme zistili, že nadváhu má viac ako 27 % rodičov.
Otázka č. 5: **Má vaše dieťa nadváhu?**
V sledovanej skupine iba 1 dieťa je obézne (2 %) a ostatné deti, ktorých bolo 44 (98 %), nadváhu nemali.
Otázka č. 6: **Fajčíte?**
V sledovanej skupine rodičov až 32,43% pravidelne fajčí a 67,57% nefajčí.

Otázka č. 7: **Športujete pravidelne?**
Pravidelne vo voľnom čase športuje 14 rodičov (37,84 %), nedostatok pohybu pociťuje až 23 rodičov (62,16 %).
Otázka č. 8: **Máte ochorenie srdca?**
Ochorenie srdca majú 3 rodičia (8,11 %) , 34 rodičov (91,89 %) má zdravé srdce.

Diskusia

Životný štýl detí, najmä malých a najmenších, je závislý predovšetkým na spôsobe života rodiny. Návyky zdravého životného štýlu a zdravie podporujúceho správania je potrebné vytvárať v predškolskom veku, kedy sa upevňujú najtrvalejšie. Najľahšie sa vytvárajú spontánne, priamou skúsenosťou dieťaťa, čiže tým, že okolo seba vidí príklady zdravého správania a že žije v zdravo utváraných podmienkach (6).

Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) tvrdí, že počet detí trpiacich obezitou sa za posledných 30 rokov zdvojnásobil a u adolescentov dokonca strojnásobil (12). Zároveň uvádza, že v roku 2011 sa počet detí s nadváhou, mladších ako 5 rokov, stúpol na viac ako 40 miliónov (2).

Obezita je ochorenie, u ktorého je prevencia účinnejšia ako liečba. Prvým predpokladom je včasné zistenie sklonu k nadváhe. Keď je medzi rodičmi jeden obézny, ich **dieťa má 50 % pravdepodobnosť** stať sa obéznym. Keď sú obidvaja rodičia obézni, môžeme očakávať až 80 % pravdepodobnosť výskytu obezity u dieťaťa. Deti týchto rodičov by mali byť čo najrýchlejšie podchytené pri pravidelnej lekárskej prehliadke (4).

Pred dvadsiatimi rokmi boli diabetici v predškolskom veku raritou, dnes ich máme čím ďalej, tým viac. Podieľa sa na tom aj fakt, že keď sa kedysi skombinovala dedičná dispozícia na vznik cukrovky od otca i matky, tak sa zväčša tehotenstvo nepodarilo udržať.

Dnes sa však už tieto deti rodia a cukrovka sa u nich prejaví veľmi skoro. Predpokladaná dĺžka života detí s diabetom sa znižuje až o 15 rokov (7).

Naším hlavným cieľom bolo poukázať na závažnosť problematiky a vzbudenie záujmu u širokej verejnosti. Správna výživa dieťaťa v predškolskom veku je odrazovým mostíkom pre zdravie v neskoršom veku. Rodičia by mali hlavne dbať na to, aké jedlo dieťaťu ponúkajú.

Dieťa v predškolskom veku napodobňuje správanie rodičov, a stravovanie nie je výnimkou. Rodičia by mali byť preto,vždy **vzorom** pre svoje dieťa. **Dieťa sa môže stať obéznym** v priebehu svojho vývoja, vplyvom dedičnosti, výchovným pôsobením rodiny, vplyvom psychosociálnych a kultúrnych podmienok spoločnosti, v ktorej žije. V rodine, kde sú obézni rodičia, je veľmi pravdepodobné, že budú obézne aj deti. Dedí sa však predispozícia.Takže, či sa ochorenie u dieťaťa prejaví alebo nie, závisí od viacerých ďalších faktorov.

U obéznych detí sa hypertenzia vyskytuje až 3x častejšie ako u primerane vážiacich detí (1).

Najnovšie zverejnená štúdia Európskej únie hovorí, že každé tretie dieťa trpí nadváhou či obezitou. Spolu s poklesom pravidelného pohybu a zlým stravovaním sa toto ochorenie stáva časovanou bombou. Štatistiky vravia, že 60 až 80 % všetkých detí si vysokú váhu prenáša do dospelosti. Príčiny obezity sú vo viac ako 96 % spôsobené zlým stravovaním a nízkou pohybovou aktivitou (11).

Jedným z najväčších zdravotných problémov ľudí 21. storočia je obezita, ktorá spôsobuje úmrtie, skracuje priemernú dĺžku života o šesť rokov a je príčinou vzniku chronických chorôb.

Na Slovensku evidujeme 5 % detí nadváhou a až 12 % obéznych detí (1). V našej skúmanej skupine bolo 45 detí predškolského veku a 37 párov rodičov. Zistili sme, že v našej vzorke vybraných detí v predškolskom veku, nie je situácia taká kritická. Nepotvrdili sme výskyt cukrovky v našej sledovanej skupine. Iba 1 dieťa malo nadváhu, ktoré bolo dieťaťom rodičov s nadváhou. Dieťa s nadváhou je sledované u detského lekára a malo by byť vyšetrené detským endokrinológom, aby sme vylúčili organický podklad obezity. Prísna redukčná diéta môže viesť v detskom veku k spomaleniu rastu.

V posledných rokoch bol vo svete zaznamenaný trend nárastu nadváhy a obezity u detí. V Austrálii je to každé štvrté dieťa a v USA až každé tretie. Deti sú telesne menej aktívne, pobyt vonku pri hrách, ako je futbal alebo skákanie cez švihadlo sa zamenil za nekonečné vysedávanie pred počítačom a televizorom v kombinácii s konzumáciou nezdravých potravín (8).

Nezdravému stravovaniu holduje na Slovensku aj veľké množstvo detí, obézne je približne každé desiate dieťa, pričom každé piate dieťa má nadváhu. Odhaduje sa, že okolo 150 miliónov detí a adolescentov na svete trpí obezitou. Veľa rodičov, buď nemá srdce, zakázať svojim deťom sladké dobroty, alebo sa im sami pokúšajú naordinovať diétu. Štatistika obéznych detí a tínedžerov hospitalizovaných v nemocniciach za roky 2009 -2011 jasne ukazuje, že najviac bolo 5 až 14-ročných detí, ktoré sa liečili na obezitu (9).

Z výsledkov rodičov detí sme zistili, že je alarmujúci hlavne výskyt ***nadváhy a nadmerného fajčenia***, čo bude mať určite vplyv aj na generácie detí, ktoré s nimi žijú.

Deti, ktoré športujú, sú šťastnejšie, sebavedomejšie, netrpia úzkosťou ani depresiami.

Rodinné prostredie hrá podstatnú úlohu vo formovaní stravovacích zvyklostí a spôsobu fyzickej aktivity dieťaťa. Mnohé vzory správania sa vytvárajú už v prvých rokoch života. Tieto preberajú deti od svojich rodičov a zvyky pretrvávajú aj v ďalších obdobiach života.Úpravu spôsobu stravovania a miery fyzickej aktivity dieťa znáša omnoho ľahšie, ak sa týmito princípmi riadi aj jeho rodina a priatelia (3).

Prevencia obezity je vždy účinnejšia ako jej liečba. Vzhľadom na rodinný výskyt obezity je dôležité sledovať deti obéznych rodičov a predchádzať obezite u nich. Prevencia začína od narodenia. Dojčené deti majú výrazne nižši sklon k obezite, ako deti živené umelým mliekom. V neskoršom veku je dôležité upraviť pomer príjmu a výdaja. Dôležitý je pohyb detí na čerstvom vzduchu. Počas celého detského veku je dôležité udržať správnu hmotnosť dieťaťa (1).

Zoznam použitej literatúry:

1. ANTOŠOVÁ M.: Obezita u detí. [cit. 9. 2. 2017]. www.choredieta.sk/index.php/vyziva-chore-dieta/vyziva-poruchy-vyzivy/obezita-u-deti.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). "Obesity prevalence among low-income, preschool-aged children-United States, 1998-2008." MMWR. Morbidity and mortality weekly report 58.28 (2009): 769.
3. DOAK C.M., Visscher T.L.S., Renders C.M., Siedell J.C.: The prevention of overweight and obesity in children and adolescents: a review of interventions and programmes. Obesity Reviews 7, 2006, 111–136.
4. FORT: Obezita-civilizačné ochorenie v súčasnosti. www.zamakaj.sk/blogy/obezita-civilizacne-ochorenie-sucastnosti-01-04-2013/).

5. FREEDMAN D.S., Khan L.K., Dietz W.H., Srinivasan S.R., Berenson G.S.: Relantionship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: The Bogalusa Heart Study. Pediatrics.2001;108: 712-718.
6. HAVLÍNOVÁ M. et al. 1995. Zdravá Materská škola. Praha, 1995.
7. KOPČÍKOVÁ M.: Cukrovka v detskom veku. detskechoroby.rodinka.sk/detske-choroby/brucho/traviaca-sustava/cukrovka-v-detskom-veku/.
8. MANN J. – TRUSWELL STEWART. A. 2007. Essentials of Human Nutrition. Oxford University Press Inc., New York, 207. 599 s.
9. NEZNÁMY: Slovensko straší obezita: Množstvo detí a mladých ľudí sa kŕmi k smrti. 2013. vysetrenie.zoznam.sk/cl/1000655/1341591/Slovensko-strasi-obezita--Mnozstvo-deti-a-mladych-ludi-sa-krmi-k-smrti.
10. OGDEN C.L., Flegal K.M., Carroll M.D., Johnson C.L. :Prevalence and trends in overweight among US children an adolescents, 1999-2000. JAMA.2002;288: 1728-1732
11. SERDULA M.K., a spol. Do obese children become obese adults? A review of the literature. Preventive medicine 1993; 22(2): 167-177
12. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. No. 894

6. Veľkosť lipoproteínových častíc u pacientov s akútnym koronárnym syndrómom

Michal Pečík
(všeobecné lekárstvo, 4. ročník)
Spoluautori: Prof. MUDr. Juraj Payer, PhD., MPH, FRCP[1] ,MUDr. Lucia Mistríková[3], MUDr. Peter Sabaka, PhD.[2]

Školiteľ: Prof. MUDr. Andrej Dukát, CSc.[1]
[1]V. interná klinika LF UK a UN Bratislava, [2] I. interná klinika LF UK a UN Bratislava, [3]Východoslovenský ústav srdcových a cievnych chorôb, Košice.

Úvod

Pomerne známou je úloha celkového, ako aj nízkodenzitného cholesterolu (LDL) v etiológií vzniku akútneho koronárneho syndrómu (AKS). Za najaterogénnejšie sa doposiaľ považujú malé denzné LDL. Úloha veľmi nízkodenzitných (VLDL) a intermediárnych lipoproteínových častíc (IDL) nebola doposiaľ celkom objasnená. A to aj napriek predpokladu, že ide o nositeľov výrazného aterogénneho potenciálu. Zároveň sa stále pochybuje, či sú hladiny lipidového spektra dostatočne stále na to, aby sa robila ich rutinná analýza u pacientov v akútnej fáze AKS a na jej základe sa rozhodovalo o hypolipidemickej liečbe [1-8]. V klinickej praxi sa preto pomerne často u pacientov toto vyšetrenie neindikuje. A to aj napriek platným odporúčaniam.

Materiál a metodika

V našom súbore 60 pacientov (46 mužov a 14 žien v priemernom veku 47.2 rokov) sme vykonali bedside analýzu celého lipidového spektra. Išlo o pacientov, ktorí boli prijatí do kardiocentra ku primárnej perkutánnej koronárnej intervencii (PCI) z dôvodu akútneho infarktu myokardu (AIM) klasifikácie STEMI (s eleváciami ST segmentu na elektrokardiograme). Práve AIM typu STEMI tvoril v našej štúdii hlavné inklúzne kritérium pre zaradenie pacientov do študijnej skupiny. Analýza bola realizovaná pomocou metodiky Lipoprint Quantimetrix System. Metodika je schválená FDA na kompletné stanovenie lipidového spektra v biologických systémoch, vrátane človeka. Hlavné rizikové faktory u našich pacientov boli fajčenie, systémová arteriálna hypertenzia, diabetes mellitus a pozitívna rodinná anamnéza v súvislosti s kardiovaskulárnymi udalosťami. Kontrolný súbor tvorilo 30 zdravých dobrovoľníkov. Podrobné charakteristiky pacientov a kontrolnej skupiny sú uvedené v tabuľke č.1. Získané hodnoty kvantitatívnych premenných s normálnou distribúciou uvádzame ako priemery so smerodajnými odchýlkami (SD), hodnoty bez normálnej distribúcie sú uvedené ako mediány so štandardnou chybou (SE). Normálna distribúcia bola posúdená pomocou Kolmogorovovho – Smirnovovho testu. Rozdiely priemerov medzi pacientami a kontrolnou skupinou sa pri normálnej distribúcií porovnali pomocou T – testu. V prípadoch nerovnomernej distribúcie pomocou Mann – Whitneyovho U testu. Štatistické rozdiely medzi premennými sa zisťovali pomocou Pearsonovho chí – kvadrátového testu. Všetci pacienti podpísali informovaný súhlas s vyšetrením, ako aj s primárnou PCI. Jedného pacienta sme zo štúdie vylúčili pre rozvoj kardiogénneho šoku a smrti.

Tab. 1: Charakteristika pacientov a kontrolnej skupiny. BMI – body mass index, DM – diabetes mellitus, AH – arteriálna hypertenzia, RA – rodinná anamnéza

	Pacienti (n=60)	Kontrolná skupina (n=30)	p
Vek	47.20 ± 5.30	40.52 ± 6.72	0.64
Muži / ženy	46/60...76.67 %	22/30...73.33 %	1.0
BMI	28.08 ± 5.07	27.89 ± 5.70	0.81
Fajčenie	40/60...66.67 %	22/30... 73.33 %	0.86
DM	6/60...10 %	negat.	-
AH	20/60...33.33 %	negat.	-
Pozitívna RA	12/60...20 %	negat.	-
Cholesterol (s)	4.28 ± 0.60	4.25 ± 0.54	-
Triacylglyceridy (s)	1.44 ± 0.40	1.15 ± 0.39	-

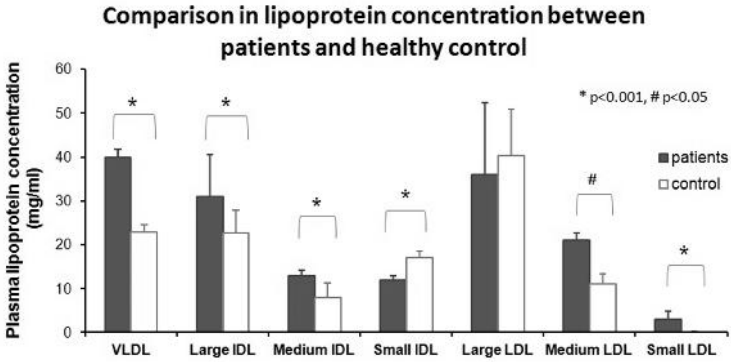
Výsledky

Pri prijatí do kardiocentra za účelom vykonania PCI boli stanovené hodnoty kreatínkinázy 33.04 ± 33.31 µkat/l, troponínu T 19.61 ± 124.45, ejekčnej frakcie ľavej komory srdca (EF) 45 ± 10.03%. Pri selektívnej koronarografii bol u piatich pacientov (8.33%) preukázaný nesignifikantný nález na koronárnych artériách. U väčšiny pacientov (39 = 65%) bolo preukázané jednocievne postihnutie. V ostatných prípadoch išlo o dvojcievne postihnutie (12 = 20%), u štyroch pacientov (6.7%) bolo zistené trojcievne postihnutie. Následne bola vykonaná PCI. Zavedenie stentu bolo realizované u najväčšieho počtu pacientov (51 = 85%), aorto – koronárny bypass (CABG) bol realizovaný u 1 pacienta (0.17%). U dvoch pacientov došlo ku aspirácií vzniknutého trombu (3.33%). Zvyšných šesť pacientov (10%) ostalo bez intervencie. Analýzou lipidového spektra sme dospeli ku výsledku štatisticky signifikantného vzostupu LDL častíc strednej veľkosti v porovnaní s kontrolami. Zaujímavá bola detekcia vysoko aterogénnych malých denzných LDL častíc, ktoré sa v kontrolnej skupine nevyskytovali. V detekcii veľkých LDL častíc neboli štatisticky signifikantné rozdiely medzi skupinami. Novým zistením bol štatisticky signifikantný vzostup VLDL častíc, rovnako tak veľkých a stredne veľkých IDL častíc. Zaujímavým bolo taktiež zistenie štatisticky signifikantného poklesu veľkých a stredne veľkých HDL častíc oproti kontrolnej skupine. Malé HDL častice nevykazovali rozdiely medzi skupinami. Pri porovnaní lipidového spektra s laboratórnymi špecifikáciami klinického stavu pacientov (EF ľavej komory, hladina Troponínu, koronarografický nález pri selektívnej koronarografii) nebola preukázaná štatisticky signifikantná korelácia. Namerané hodnoty celého lipidového spektra uvádza tabuľka č. 2.

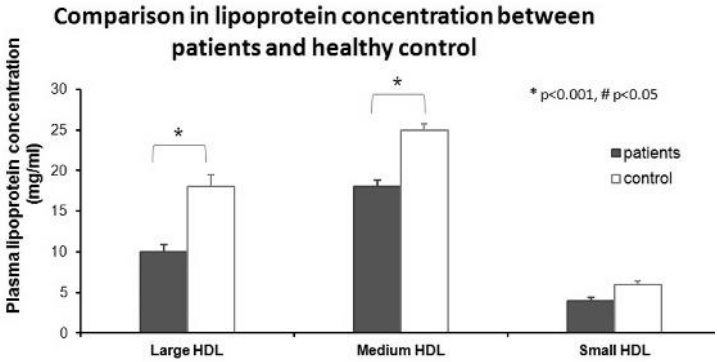
Grafické znázornenie výsledkov obsahujú grafy 1 a 2.

Tab. 2: Hodnoty lipidového spektra u pacientov a v kontrolnej skupine.

	Pacienti (n=60)	Kontrolná skupina (n=30)	p
VLDL	40.00 ± 1.72	23.00 ± 1.64	< 0.0001
veľké IDL	31.03 ± 9.40	22.71 ± 5.22	< 0.0001
stredné IDL	13.00 ± 1.23	8.00 ± 3.30	< 0.0001
malé IDL	12.00 ± 0.91	17.00 ±1.65	< 0.0001
veľké LDL	35.93±16.42	40.23 ±10.60	0.1905
stredné LDL	21.00 ± 1.71	11.00 ±2.34	< 0.05
malé LDL	3.00 ±1.79	0.00 ±0.28	< 0.001
veľké HDL	10.00 ± 0.89	18.00 ± 1.53	< 0.0001
stredné HDL	18.00 ± 0.79	25.00 ± 0.73	< 0.0001
malé HDL	4.00 ± 0.43	6.00 ± 0.47	0.07



Graf 1: Spektrum VLDL, IDL a LDL častíc u pacientov a v kontrolnej skupine.



Graf 2: Spektrum HDL častíc u pacientov a v kontrolnej skupine.

Diskusia

Je známe, že dyslipidémia je jeden z najzávažnejších a zároveň hlavných etiologických agens zodpovedných za patofyziologický mechanizmus vzniku AKS na podklade procesu aterotrombotických zmien v lúmene koronárnych artérií [1,2]. Z tohto dôvodu je včasná diagnostika a liečba dyslipidémie kľúčová. Priaznivo ovplyvňuje včasnú a dlhodobú prognózu. Podľa platných odporúčaní pre manažment AIM klasifikácie STEMI má byť použitie statínov [3] neoddeliteľnou súčasťou celkového manažmentu, rovnako tak aj stanovenie sérových lipidov po prijatí pacienta do kardiocentra. Liekom voľby je Atorvastatín v dávke 80 mg p.o. a to čo najskôr, pričom liečbu treba podávať dlhodobo [11]. Tento postup preukázal pokles morbidity a mortality, v prípade, že sa hypolipidemická liečba zaháji bezodkladne, pri prijatí – teda ešte v akútnej fáze rozvoja AKS. A to práve na základe údajov získaných z variability lipidového spektra vo včasnej fáze AKS u pacientov podstupujúcich primárnu PCI [6,7]. Aj výsledky našej štúdie poukazujú na výrazné štatisticky signifikantné zmeny v lipidovom spektre u týchto pacientov, oproti zdravým jedincom v kontrolnej skupine. Práve analýza celého lipidového spektra už v akútnej fáze a následné sledovanie jeho dynamiky môže poslúžiť ako dostatočne senzitívny a špecifický nástroj na nastavenie hypolipidemickej liečby [8,9]. Aj napriek tomu sa však v súčasnej klinickej praxi stretávame s tým, že pacienti prijatí do nemocnice vo včasnej fáze AKS nemajú indikované vyšetrenie sérových lipidov. Dôvodom je pravdepodobne pretrvávanie predstavy nespoľahlivosti týchto meraní z dôvodu včasného poklesu hladín celkového a LDL cholesterolu [4,5]. Aj v našej štúdií však vidíme, že najmä hladiny vysoko aterogénnych malých denzných LDL častíc, môžu byť pomerne dobrým ukazovateľom, nakoľko nedochádza ku ich poklesu, práve naopak. Taktiež štúdia LUNAR preukázala, že zmeny sérových hladín lipidov v prvých štyroch dňoch akútnej fázy AKS sú pomerne stabilné a môžu slúžiť ako návod na nastavenie hypolipidemickej liečby u týchto pacientov [10]. Vzhľadom na získané výsledky z našej štúdie môžeme konštatovať, že u pacientov s AKS klasifikácie STEMI je vhodné analyzovať celé spektrum lipoproteínových častíc v sére, nakoľko sa ich hladiny javia ako stabilné. Táto analýza s následným nastavením pacientov na individuálnu hypolipidemickú liečbu aj v rámci nových terapeutických možností (kombinácia statínu a PCSK – 9 inhibítora) u nich môže priniesť zníženie vysokého reziduálneho rizika [12].

Zoznam použitej literatúry:

1. Fuster, V., Kovacic, J.C.: Acute coronary syndromes. Pathology, diagnosis, genetics, prevention, and treatment. Circ Res. 114, 2014, 1847-51.
2. Miller, M.: Lipid levels in the post-acute coronary syndrome setting. J Am Coll Cardiol. 51, 2008, 1446 -47.
3. Pitt, B., Loscalzo, J.: Y´cas J. Lipid levels after acute coronary syndromes. J Am Coll Cardiol. 51, 2008, 1440-45.
4. Hoefner, D.M., Hodel, S.D., O´Brien, J.F. et al.: Development of a rapid quantitative method for LDL subfractions with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL system. Clin. Chem. 472, 2001, 266-74.
5. Goliasch, G., Oravec, S., Bleeberger, H. et al.: 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. 42, 2012, 631-36.
6. Gardner, C.D., Fortmann, S.P., Krauss, R.M.: Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. JAMA. 276, 1996, 875-81.

7. Campos, H., Genest, J.J., Blijevens, E. et al.: Low density lipoprotein particle size and coronary heart disease. Artherioscler Thromb Vasc Biol. 12, 1992, 187-95.
8. Austin, M.A., Breslow, J.L., Hennekens, C.H. et al.: Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. JAMA. 260, 1988, 1917-21.
9. Balci, B.: The modification of serum lipids after acute coronary syndrome in clinical practice. Curr Cardiol Rev. 7, 2011, 272-76.
10. Barth, J.H., Jackson, B.M., Famn, A.J. et al.: Change in Serum Lipids after Acute Coronary syndromes: Secondary Analysis of SPACE ROCKET Study Data.Clin Chemistry. 56, 2010, 1592-98.
11. Hricák V.: Podstatné okruhy z nových odporúčaní pre manažment akútneho infarktu myokardu s eleváciou ST – STEMI. Via pract., 2013, 10(5): 175–176.
12. Gencer, B., Montecucco, F., Nanchen, D. et al.: Prognostic value of PCSK9 levels in patients with acute coronary syndromes. Eur Heart J. 37, 2016, 546-53.

7. Peri a postoperačný manažment primárnej hyperparatyreózy

Karin Molnárová
(všeobecné lekárstvo, 5.ročník)
Spoluautori: Michaela Huťanová

Školiteľ: MUDr. Králik Róbert, PhD.
Klinika onkologickej chirurgie LF UK a OÚSA, Bratislava

Úvod

Primárna hyperparatyreóza je pomerne časté ochorenie. Častejšie postihuje ženy ako mužov. Vo väčšine prípadov je pacientom zistená náhodná hyperkalcémia, ale ochorenie sa môže manifestovať aj symptómami. Cieľom lekárov je zdiagnostikovať a následne odstrániť príčinu primárnej hyperparatyreózy.

Po úspešnom odstránení patologického prištítneho telieska je dôležité včas odhaliť skupinu pacientov, u ktorých vznikla pooperačná hypokalcémia a začať substitučnú liečbu vápnikom.

Materiál a metodika

Náš súbor pozostával zo skupiny 39 pacientov, ktorým sme retrospektívne spracovali zdravotnú dokumentáciu. Pacienti boli sledovaní v časovom období 1.1.2015-31.12.2015. Títo pacienti boli odoslaní na kliniku Onkologickej chirurgie OÚSA-LFUK v Bratislave, za účelom operačného doriešenia primárnej hyperparatyreózy.

Pacientom sme sledovali hladinu parathormónu predoperačne, perioperačne (15 min po operačnom odstránení adenómu) a jeden deň po operácii, na základe ktorej chirurg hodnotí úspech operácie.

Pokles hladiny parathormónu sme rozdelili do troch skupín. Prvá skupina mala pokles hladiny parathormónu o polovicu (v porovnaní k predoperačnej hodnote parathormónu). Druhá skupina dosiahla fyziologické hodnoty hladiny parathormónu v krvi (10-65 pg/ml). A tretia skupina mala hodnotu hladiny parathormónu do 30 pg/ml. Rovnako sme sledovali hladinu vápnika pred operáciou, po operácii a 1 týždeň po operácii.

Výsledky

Skupina pacientov pozostávala z 35 žien a 4 mužov. Medián veku bol 64 rokov ,vo vekovom rozpätí 34-80rokov.

14 pacientov (36%) malo prítomné symptómy, ako sú osteoporóza, nefrolitiáza, žlčníkový záchvat, bolesť kostí, únava, slabosť a 25 pacientom (64%) bola zistená hyperkalcémia náhodne.

90% pacientom bola zdiagnostikovaná primárna hyperparatyreóza na základe scintigrafického vyšetrenia a 10% pacientom na základe USG vyšetrenia.

Medián pre hladinu vápnika z vyšetrovanej krvi bol 2,75 mmol/l (2,44-2,75 mmol/l) a medián pre hladinu parathormónu bol 137 pg/ml (8,71-486,2 pg/ml). 10 pacientov užívalo Mimparu.

Následné chirurgické riešenie pozostávalo z exstirpácie telieska , poprípade teliesok. 33 pacientom (85%) bolo identifikované jedno teliesko, ktoré bolo následne aj odstránené. 6 pacientom (15%) boli identifikované 2 telieska, z toho 2om pacientom vybrali jedno a 4om pacientom obe telieska. 34

pacientov (87%) podstúpilo unilaterálnu a 5 pacientov (13%) podstúpilo bilaterálnu operáciu. Histologicky malo adenóm verifikovaných 36 pacientov (92%), hyperpláziu mali 2 pacienti (5%) a bez patologického nálezu bol jeden pacient (3%).

V dlhodobom sledovaní hladiny vápnika (norma 2,15-2,55 mmol/l) bolo hypokalcemických 7 pacientov, hyperkalcemickí boli 3 pacienti a 29 pacientov bolo normokalcemickych. Pacienti dostávali štandardnú minimálnu dávku suplementácie vápnika (2tbl za deň).

Taktiež sme porovnávali hladiny parathormónu predoperačne a 1 deň po operácii. Pričom sledujeme hlavne pokles hladiny parathormónu o

a) polovicu z pôvodnej hodnoty hladiny parathormónu (zo vzorky 38 pacientov, 5tim nepoklesla hladina parathormónu o polovicu a 33 pacientom poklesla)

b) hladina parathormónu vo fyziologickom rozpätí 10-65 pg/ml (11pacientov nemalo hodnoty vo fyziologických hodnotách a 27 malo)

c) hladina parathormónu do 30 pg/ml (10 pacientov nedosiahlo túto hodnotu a 28 dosiahlo)

Tab.1: Porovnávanie poklesu hladiny parathormónu nameraného predoperačne s hodnotami hladiny parathormónu jeden deň po operácii. (súbor 38 pacientov)

PTH: parathormón

pokles hladiny PTH o polovicu	fyziologická hodnota PTH	do 30 pg/ml
5 nepoklesol (13%)	11 nemalo (29%)	10 nemalo (26%)
33 poklesol (87%)	27 malo (71%)	28 malo (74%)

Tab.2: kalciový status pacientov po operácii (fyziologická hodnota vápnika v krvi je 2,15-2,55 mmol/l)

Hypokalcémia	Normokalcémia	Hyperkalcémia
7 pacientov (18%)	29 pacientov (74%)	3 pacienti (8%)

Diskusia

Operáciu primárnej hyperparatyreózy hodnotíme ako úspešnú, keď hladina parathormónu poklesne o polovicu (ktorú porovnávame ku hodnote parathormónu predoperačne) po vybratí patologického prištítneho telieska. Z dlhodobého hľadiska cieľom liečby primárnej hyperparatyreózy je dosiahnuť dlhodobú normokalcémiu. Pretrvávaním hyperkalcémie hodnotíme operáciu ako neúspešnú, nakoľko je prítomné ešte jedno patologické prištítne teliesko, ktoré ostalo u pacienta.

V prípade hypokalcémie, ktorá so sebou prináša určité riziká pre pacienta, ako sú parestézie a kŕče, si takýto stav vyžaduje zvýšenú lekársku starostlivosť. Pacientom sa medikamentózne substituuje vápnik, pravidelne sa monitoruje hladina vápnika v krvi a pacienti sú aj pod častejšou a prísnejšou kontrolou lekára až do ustálenia hladiny vápnika vo fyziologickom rozpätí. Patologické prištítne teliesko utlmí fyziologickú funkciu a zdravú produkciu prištítneho telieska, čo má za následok vznik hypokalcémie. V našom súbore malo 6 pacientov hypokalcémiu.

Pokles hladiny parathormónu pod 30 pg/ml po 15 minútach po odstránení adenómu prištítneho telieska sa ukazuje ako rizikový faktor pre vznik pooperačnej hypokalcémie. 5 pacienti mali hodnotu

hladiny parathormónu po 15 minútach nižšiu ako 30 pg/ml a 1 pacient mal vyššiu hodnotu hladiny parathormónu. Pacientom s nižšou hladinou parathormónu ako 30 pg/ml po 15 minútach je dôležité častejšie vyšetrovať hladinu vápnika a cielene sa pýtať na subjektívne ťažkosti.

Záver

Odstránením patologického prištítneho telieska dochádza k poklesu hladiny parathormónu a hladiny vápnika. Pokles hladiny parathormónu pod 30 pg/ml po 15 minútach po odstránení adenómu sa ukazuje ako rizikový faktor vzniku pooperačnej hypokalcémie.

8. Atrial fibrillation and anticoagulation treatment

Stylianos-Chrysovalantis Daios
(general medicine, 6th year)

Supervisor: MUDr. Martin Caprnda PhD
1st Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University

Introduction

Atrial fibrillation (AF) is a supraventricular arrhythmia characterized electrocardiographically by low-amplitude atrial oscillations and irregularly irregular ventricular rhythm (1). It is common in elderly population (approximately 10% of patients older than 70 years). According to the presentation and duration of AF several subtypes can be distinguished: paroxysmal, persistent and permanent AF. Regardless of the duration, AF is one of the major causes of heart failure, cardioembolic (CE) stroke and systemic embolism, and sudden death in the world.

To assess the risk of CE stroke and systemic embolism various scoring systems are used, most recent one is CHADS-VASc score. To prevent such events, anticoagulation (AC) medications are used in AF patients with high risk score. However, use of AC medication also means increased risk of bleeding complications. Available AC medications are vitamin K antagonists (warfarin), low molecular weight heparins (LMWH) and so-called novel oral anticoagulants (NOACs), which are direct oral inhibitors of coagulation factor IIa (dabigatran) or coagulation factor Xa (rivaroxaban, apixaban). However, some of the patients use antiplatelet drugs (AP), such as aspirin, clopidogrel instead of AC medications, because they were associated with lower bleeding risk in the past (2).

The aim of this study was to analyse patients with AF hospitalized at the 1st Department of Surgery Comenius University Hospital in Bratislava (1DS) while focusing at their antithrombotic therapy and risk of bleeding.

Materials and methods

We conducted a retrospective analysis of patients examined by internist while being hospitalized at 1DS from January to December 2015. Of the total number of patients (778 patients; 391 M, 378 F) we have selected 396 older than 50 years. In every patient we analysed available documentation to identify the type of antithrombotic medication, type of AF according to duration and to calculate CHADS-VASc score. According to CHADS-VASc score we divided patients into “lone AF” group (with no risk factors for CE event except female sex), “low risk” group (1 other risk factor than female sex) and “high risk” group (more than 1 risk factor except female sex).

We have also analysed the reason for hospitalization, focusing mostly on acute hospitalizations due to bleeding events. Afterwards we compared the patients hospitalized due to acute bleeding event (BG – bleeding group, 22 pts) compared to other emergently hospitalized patients (OG – other group, 41 pts).

Data were entered in MS Excel tables and statistics was calculated by SPSS for Windows. We used arithmetic mean and standard deviation to describe continuous variables and percentages for categorical ones. Comparison of groups was done by Student’s t-test (continuous variables) and chi-square test (categorical variables). Values of $p<0.05$ were deemed statistically significant.

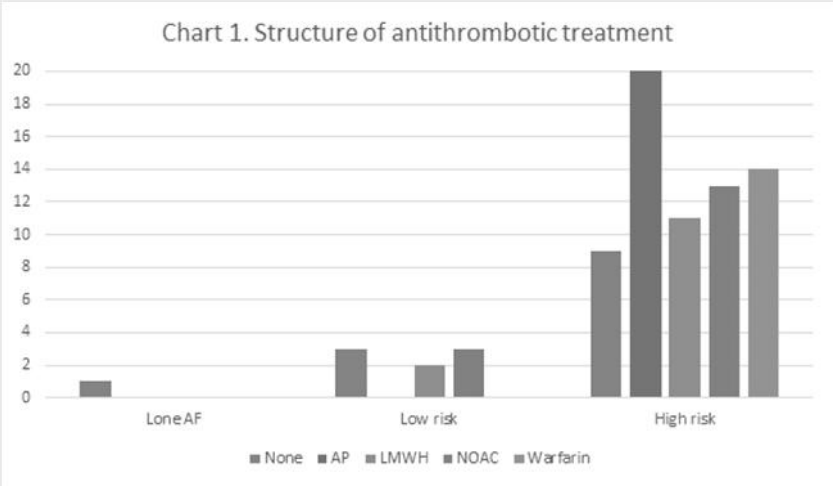
Results

We found 73 patients (35 M, 38 F) older than 50 years with diagnosis of AF (9.4% of total number, 18.4% in the age subgroup). The mean age of patients with AF was 76.4 ± 9.1 years, while those without AF were 66.9 ± 10.8 years old (p<0.001).

Majority (86.3 %) of the patients with AF was hospitalized for emergent reasons, mostly bleeding (22 pts) and observation after head trauma. The remaining patients (13.7 %) were hospitalized for planned operations.

Of 73 patients with history of AF 38 patients had AF on ECG at the time of admission, 19 patients had sinus rhythm, 11 patients had pacemaker rhythm and in 5 patients we found no available information about rhythm. Average CHADS-VASc score was 3.99±1.79.

Most common antithrombotic treatment were antiplatelet drugs (n=20), NOACs (n=16), warfarin (n=14) and LMWH (n=13). No antithrombotic treatment was in 9 patients and in 1 patient we could not retrieve the information. Structure of antithrombotic treatment according to CHADS-VASc score is shown in Chart 1. We had only 1 patient with lone AF, who was taking no antithrombotic treatment. Patients in “low risk” group were on no treatment (n=3), had LMWH (n=2) or NOACs (n=3). However, majority of the patients were in “high risk” group.



We compared the patients with AF hospitalized due to bleeding with patients hospitalized for other emergent causes. The results of the comparison are shown in Table 1.

Discussion

AF is the most common arrhythmia in the population. In our study 9.4% of patients hospitalized at 1DS had AF, when we focused only on the older patients, the prevalence increased to 18.4%. Patients with AF were older than patients without AF. Majority of the AF patients had CHADS-VASc score higher than 1 (in females higher than 2) and were indicated for AC treatment according to ESC guidelines (2). However, there were 20 patients in this group treated by antiplatelet agents, which

are currently not indicated in prevention of CE events in patients with AF (2) and 9 patients were taking no AC treatment.

Analysis of emergently hospitalized patients showed that patients admitted due to bleeding compared to other admission reasons were surprisingly not different in age, also there were no differences in CHADS-VASc score and duration of hospitalization. Patients in bleeding group were slightly more often treated by Warfarin and less often by LMWH, there was no significant difference in antiplatelet drugs and NOACs use. However there was no difference in patients' survival between those groups, with only 1 fatal event in the bleeding group (patient was treated by aspirin) and 2 other fatal events. This is in accordance with results of clinical studies with NOACs, which have shown lesser amount of serious and fatal bleeding events in patients treated by NOACs compared to warfarin (2).

Table 1. Comparison of patients hospitalized due to emergent bleeding and other emergent causes.

Parameter	**Bleeding group**	**Other causes group**	**Significance**
No. of patients	22	41	
Age	74.8±10.1	78.3±8.0	p=0.131
Duration of hospitalization	7.4±5.4	10.1±8.6	p=0.187
CHADS-VASc	3.73±1.78	4.24±1.87	p=0.292
Antithrombotic medications	Antiplatelet 6/22 (27.3%) LMWH 2/22 (9.1%) NOAC 5/22 (22.7%) Warfarin 5/22 (22.7%) None 3/22 (13.6%) Unknown 1/22 (4.5%)	Antiplatelet 12/41 (29.3%) LMWH 9/41 (22.0%) NOAC 9/41 (22.0%) Warfarin 7/41 (17.1%) None 4/41 (9.8%) Unknown 0/41 (0.0%)	p=0.597
Survival	1/22 (4.9%)	2/41 (4.5%)	P=1.000

References

1. Morady F, Zipes DP. Atrial Fibrillation: Clinical Features, Mechanisms and Management. In: Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow RO. Braunwald's Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine. Elsevier Ltd, Oxford, 2014, 798-813
2. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. Eur Heart J. 2016 Oct 7; 37(38): 2893-2962.

9. Štatistické vyhodnotenie vybraných somatických parametrov novorodenca na 1. deň veku a ich porovnanie

Jana Brucknerová, Lucia Lauková
(všeobecné lekárstvo, 1. ročník)

Školiteľ: PhDr. Michal Trnka, PhD.[1], doc. MUDr. Ingrid Brucknerová, PhD.[2]
[1] Ústav lekárskej fyziky, biofyziky, informatiky a telemedicíny LF UK, Bratislava; [2] Neonatologická klinika intenzívnej medicíny LF UK a DFNsP, Bratislava

Úvod

Vývin jedinca je mnoho rokov sledovaný už od jeho prenatálneho veku. Somatické faktory sú ovplyvňované vývojom ľudstva a životnými podmienkami jedinca. Gestačný vek, pôrodná hmotnosť a pôrodná dĺžka patria medzi základné charakteristiky každého novorodenca.
Donosený novorodenec váži priemerne 3200 gramov, novorodenci s hmotnosťou pod 2500 gramov sú označovaní ako novorodenci s nízkou pôrodnou hmotnosťou a novorodencov nad 4000 gramov označujeme ako hypertrofických. Po pôrode nastáva fyziologický pokles hmotnosti o 100 až 300 gramov (5-10 %). Znovu nadobudnutie hmotnosti nastáva do 2 týždňov.

Priemerná hodnota pôrodnej dĺžky novorodenca je 50,5 cm pre chlapcov a 49,9 cm pre dievčatá. Počas prvého roku výška vzrastie asi o polovicu pôrodnej dĺžky, v druhom roku sa zväčší o 12 cm za rok, do piatich rokov asi o 7 cm za rok a neskôr o 5 až 6 cm ročne až do pubertálneho veku.

Pri posudzovaní a meraní dĺžky a hmotnosti môžeme použiť rôzne fyzikálne metódy. Na posúdenie individuálneho rastu a vývinu používame vlastné normy, priemerné hodnoty získané vyšetrením väčšieho súboru zdravých detí. Normy získame pomocou dvoch matematicko-fyzikálnych spôsobov: získaním priemerných hodnôt a smerodajnou odchýlkou alebo hodnotením percentilovou metódou. Na základe získaných údajov zo štatistického vyhodnotenia veľkých skupín detí vzniknú tabuľky a diagramy. Tabuľky s vypočítaným tzv. skóre smerodajnej odchýlky (smerodajnej deviácie; SDS čiže Z skóre) využívajú metódu priemeru a smerodajnej odchýlky. Smerodajná odchýlka je mierou rozptylu skúmaného znaku v súbore okolo priemeru a uvádza o koľko sa môžu hodnoty líšiť od priemeru, aby sa ešte pokladali za normálne. Hodnoty mimo tohto rozptylu sa pokladajú za podpriemerné alebo nadpriemerné.

Na dlhodobé sledovanie rastu používame rastové/hmotnostné diagramy vyjadrené v percentilovej sieti (1).

Percentilová metóda je metódou na posúdenie somatických ukazovateľov. Daný rozmer vyjadrujeme v percentuálnych hodnotách primeraných určitému veku (hodnota 3., 16., 25., 50., 75., 84., 97. percentilov alebo sa uvádza celé číslo 10 a 90 namiesto 16 a 84. Percentilová metóda vychádza z hodnotenia súboru detí, pričom na jednej strane graf/tabuľka začína najnižšími hodnotami znaku a na druhej strane končí najvyššími hodnotami sledovaného znaku. Rozpätie 3.-97. percentilu zodpovedá hodnote priemeru ±2 sigmy. Každé pohlavie má svoje tabuľky.

Gestačný týždeň ovplyvňuje vývoj jedinca a jeho somatické faktory. Vedci už dlhodobo porovnávajú výsledky vývinu jedinca na rôznych miestach sveta (2, 3, 4). Všeobecne uznávané normy komplexne uvádzajú grafy podľa Fentona z roku 2003 a 2013 (5, 6). Časová aktualizácia, ktorej údaje boli zozbierané z rokov 1991-2007, bola publikovaná v apríli 2013. Súbor detí tvorilo 3 986 456

novorodencov v rozpätí od 20. gestačného týždňa po donosených jedincov. Táto vzorka bola zložená len zo zdravých jedincov z Nemecka, Austrálie, Kanady, Spojených štátov amerických, Talianska a Škótska (6). Cieľom vytvorenia Fentonových grafov bolo zjednotenie rastových a hmotnostných kriviek s rastovými štandardmi Svetovej zdravotnej organizácie (WHO) a na presnejšie vyjadrenie gestačného týždňa (6).

Materiál a metodika

Sledovanú skupinu tvorilo 2331 novorodencov prijatých na Neonatologickú kliniku intenzívnej medicíny Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave (NKIM LF UK) v rokoch 2012-2016 (n=2331).

Vybrané somatické znaky (pôrodná hmotnosť/gramy, pôrodná dĺžka/centimetre, gestačný vek/týždeň) sme získali retrospektívnou analýzou z prepúšťacích správ novorodencov. Na analýzu a sumarizáciu údajov sme použili kontingenčné tabuľky a grafy. Cieľom našej práce bolo získané údaje porovnať s hmotnostnými a rastovými krivkami podľa Fentona z roku 2013 (6). Štatisticky sme súbor dát spracovávali v programe Microsoft Excel.

Výsledky

Sledovaný súbor tvorilo 2331 novorodencov, z toho predčasne narodených bolo 1061 a 1270 donosených novorodencov (priemerná pôrodná hmotnosť: chlapci – 2645,2 g, dievčatá – 2443,79g; priemerná pôrodná dĺžka: chlapci – 45,82 cm, dievčatá – 44,71 cm; spontánny pôrod – 1282 novorodencov, pôrod cisárskym rezom –1049 novorodencov). Rozdelenie podľa zrelosti a pohlavia uvádza Tab. 1.

Tab. 1: Rozdelenie novorodencov podľa zrelosti
skratky: g. t. – gestačný týždeň

Rozdelenie novorodencov podľa zrelosti						
	Nedonosení novorodenci				**Donosení novorodenci**	
	hranične zrelí (≥36+6-<37 g. t.)	ľahko nezrelí (≥31-<36 g. t.)	veľmi nezrelí (≥27-<31 g. t.)	extrémne nezrelí (<27 g. t.)	pôrod v termíne (≥37-<41 g. t.)	pôrod po termíne (≥41 g. t.)
Chlapci	93	255	155	88	691	77
Dievčatá	65	226	113	66	451	51
Spolu	158	481	268	154	1142	128

Pri detailnej analýze súboru hypertrofických novorodencov nad 97. percentil pre vek a pohlavie podľa Fentona sme zistili 72 hypertrofických novorodencov (v 8 prípadoch bol potvrdený diabetes mellitus/gestačný diabetes u matky).

Pri detailnej analýze súboru prenatálne hypotrofických novorodencov pod hodnotu 3. percentil pre vek a pohlavie podľa Fentona sme zistili 71 hypotrofických novorodencov (v 6 prípadoch mala matka závažnú hypertenziu; v 7 prípadoch – viacplodová gravidita; v 3 prípadoch – nikotinizmus matky).

Diskusia

Prenatálny vývoj je významné obdobie života človeka. Vývoj novorodenca môže byť sprevádzaný rôznymi komplikáciami, čo sa odzrkadlí na jeho zdraví a vybraných somatických faktoroch ako je hmotnosť a výška.

Fentonové grafy vyjadrujú vzájomnú závislosť medzi pôrodnou hmotnosťou a výškou a gestačným vekom novorodenca a následne sú rozdelené podľa pohlavia (6).

Získané údaje pôrodnej hmotnosti a pôrodnej dĺžky sme porovnali s hmotnostnými a rastovými krivkami podľa Fentona z roku 2013. Zistili sme, že obe grafické znázornenia sa vzájomne prekrývajú. Nezistili sme výrazné rozdiely v hodnotách sledovaných parametrov. Predpokladáme, že získaný výsledok je daný tým, že podkladom na vypracovanie grafov podľa „Fentona“ boli údaje získané aj z európskej populácie novorodencov. Potvrdili sme rozdiel v hodnotách pôrodnej hmotnosti a dĺžky medzi pohlaviami.

Rizikové faktory môžu podstatne ovplyvniť vývin jedinca. Rast plodu počas vnútromaternicového vývinu ovplyvňuje množstvo faktorov: genetická výbava každého jedinca, rasová a národnostná príslušnosť, vonkajšie faktory prostredia (žiarenie, sociálne pomery), zo strany matky (životospráva, výživa, zloženie stravy, ochorenie matky – diabetes mellitus, chronické ochorenie pľúc, obličiek, pečene, málokrvnosť, dlhodobá medikamentózna liečba, návykové látky – cigarety, alkohol, drogy), zo strany plodu (chromozómové anomálie, viac plodová gravidita, infekcia, hormóny, rozdielne krvné skupiny a Rh faktor), zo strany placenty (príliš malá placenta, nedostatočná funkcia, znížený prísun kyslíka, vitamínov a živín).

V našej práci sme analyzovali výskyt niektorých rizikových faktorov: nikotinizmus, hypertenzia, gestačný diabetes a diabetes matky, ktoré by mohli byť príčinou rozvoja závažnej prenatálnej hypertrofie alebo hypotrofie. Naše zistené výsledky výskytu rizikových faktorov prenatálnej hypertrofie sa stotožňujú s najčastejšími príčina jej vzniku (7). V našom súbore prenatálne hypertrofických novorodencov nad 97. percentil pre vek a pohlavie podľa Fentona sme zo 72 novorodencov potvrdili v 8 prípadoch diabetes mellitus/gestačný diabetes u matky. Gestačný diabetes mellitus vzniká najčastejšie na rozhraní druhého a tretieho trimestra. V krvi je prítomné normálne množstvo inzulínu s postupom tehotenstva sa sťažuje jeho schopnosť uplatnenia sa pri prechode glukózy z krvi do buniek. Príčinou je zvyšovanie hladiny tehotenských hormónov, ktoré produkuje placenta. Nadmerný prestup glukózy cez placentu spôsobuje stimuláciu tvorby inzulínu u plodu. Stav metabolickej kompenzácie matky s diabetes mellitus počas tehotenstva výrazne ovplyvňuje rast plodu.

Pri detailnej analýze súboru prenatálne hypotrofických novorodencov pod hodnotu 3. percentilu pre vek a pohlavie podľa Fentona sme zistili 71 hypotrofických novorodencov, v 6 prípadoch mala matka závažnú hypertenziu, v 7 prípadoch išlo o viacplodovú gravidita a v 3 prípadoch matka počas tehotenstva fajčila viac ako 20 cigariet denne. Fajčenie tehotnej ženy ovplyvňuje negatívne vývoj a zdravie plodu, a to priamo transplacentárnym prenosom chemických substancií, nikotínu, ako aj nepriamo nepriaznivými zmenami fyziologických funkcií budúcej matky, predovšetkým zníženou dodávkou kyslíka do placenty s možnosťou hypoxie plodu. Nastáva to v dôsledku pevného viazania CO_2 na hemoglobín, čo zabraňuje prenášaniu kyslíka (8). Hypertenzia matky ovplyvňuje veľkosť prietoku krvi cez placentu.

Viaceré štúdie poukázali na to, že fajčenie tehotnej ženy zvyšuje riziko spontánneho potratu a to až o 28%, ako aj predčasného pôrodu. Deti fajčiacich matiek majú nižšiu pôrodnú hmotnosť (8), pričom tu

existuje negatívna korelácia s intenzitou fajčenia. V priemere jedna cigareta denne znižuje hmotnosť novorodenca približne o 12 gramov, t. j. fajčenie 16 cigariet denne vedie k zníženiu pôrodnej hmotnosti dieťaťa asi o 200 gramov (9). V tomto smere je najškodlivejšie fajčenie v druhom a treťom trimestri, čo poukazuje na význam ukončenia fajčenia ešte na začiatku tehotenstva. Vrodené chyby novorodencov sú častejšie v porovnaní s nefajčiarkami, úmerne množstvu vyfajčených cigariet matky počas tehotenstva.

Najpresnejšie porovnanie hodnôt somatických charakteristík novorodenca by bolo na základe diagramov a kriviek pre danú krajinu vzhľadom na množstvo rozdielov medzi krajinami, vo výžive ako aj medzi rasami a kontinentmi. V súčasnosti využívame grafy, ktoré vznikli na základe spracovania údajov od viac ako 3,5 milióna zdravých novorodencov z 3 kontinentov a zo 6 krajín. V budúcnosti by sme chceli vypracovať slovenské štandardy, ktoré by najlepšie vyjadrovali reálnu charakteristiku narodených novorodencov.

Zoznam použitej literatúry:

1. Košťalová L, Kovács L, (Eds.) Úvod do pediatrie.1. vydanie. Bratislava, Univerzita Komenského v Bratislave, 2005: 1-144.
2. Schack-Nielsen L, Mølgaard Ch, Sørensen Thorkild IA, Greisen G, Michaelsen KF. Secular Change in Size at Birth from 1973 to 2003: National Data from Denmark. Obesity 2006; 14(7): 1257-1263
3. Odlind V, Haglund B, Pakkanen M, Otterblad Olausson P. Deliveries, mothers and newborn infants in Sweden, 1973-2000. Trends in obstetrics as reported to the Swedish Medical Birth Register. Acta Obstet Gynecol Scand. 2003; 82(6): 516-28.
4. Skjaerven R, Gjessing HK, Bakketeig LS. Birthweight by gestational age in Norway. Acta Obstet Gynecol Scand 2000; 79(6): 440-9.
5. Fenton RT. A new growth chart for preterm babies: Babson and Benda's chart updated with recent data and a new format. BMC Pediatrics 2003; 3:13.
6. Fenton RT, Kim, HJ. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. BMC Pediatrics 2013; 13: 59.
7. Brucknerová I. Neonatology. Simple & Easy, Part 1. Bratislava, Univerzita Komenského v Bratislave, 2014: 1-145.
   Gender, Women, and the Tobacco Epidemic: 9. Pregnancy and Postpartum Smoking Cessation. 175-188. www.who.int/tobacco/publications/gender/en_tfi_gender_women_ pregnancy_postpartum_smoking_cessation.pdf.
8. Wald NJ, Hackshaw AK. Cigarette smoking: An epidemiological overview. Br Med Bull. 1996; 52(1): 3-11

10. Využitie acelulárnej dermálnej matrix v procese rekonštrukcie prsníka

Martina Chotárová
(všeobecné lekárstvo, 5. ročník)

Školiteľ: MUDr. Martin Boháč, Ph.D, MHA, FEBOPRAS
Klinike plastickej, rekonštrukčnej a estetickej chirurgie LF UK a UN Bratislava

Úvod

Veľká časť rekonštrukcií prsníka u žien, ktoré podstúpili mastektómiu sa uskutočňuje pomocou expandér/implantátu. Tento spôsob rekonštrukcie, vyžaduje dostatočné množstvo kvalitného tkaniva pacientky, na prekrytie expandéru/implantátu. Pacientky ktoré podstúpili mastektómiu majú väčšinou nedostatok vlastného plnohodnotného tkaniva na prekrytie vkladnaého implantátu.

Acelulárna dermálna matrix (ADM) slúži ako ďalšia protektívna vrstva pri expander/implantát rekonštrukciách najmä ako výstuha dolného pólu rekonštruovaného prsníka. Zabezpečuje vyššiu bezpečnosť, skracuje dobu expanzie expandéru a zlepšuje estetický výsledok rekonštrukcie. ADM je kožný štep allogénneho alebo xenogénneho pôvodu, zbavený akýchkoľvek buniek darcu procesom de-epidermizácie a decelularizácie zároveň so zachovaním extracelulárnej dermálnej matrix (ECM). Po implantácii sa matrix správa ako výstuha je revaskularizovaná a osídlená mezenchýmovými a endotelovými bunkami pacienta. ADM bola označená za najvýznamnejšiu inováciu, ktorá má vplyv na rekonštrukciu pomocou implantátov za posledné roky.(1)

V našej štúdii, sme analyzovali pooperačné výsledky a inkorporáciu ADM z histologického hľadiska, pripravenej novou metódou u 22 pacientok (26 prsníkov). Pacientky podstúpili v našej štúdii dvojdobú rekonštrukciu prsníka, najprv s aplikáciou expandéru a následne s výmenou za implantát.

Materiál a metodika

V štúdii boli sledované pacientky, ktoré podstúpili rekonštrukciu prsníka pomocou expandér/implantátu a ADM v období 16 mesiacov na Klinike plastickej, rekonštrukčnej a estetickej chirurgie LF UK a UN Bratislava. Súčasne bola realizovaná histologická analýza všetkých perioperačne získaných vzoriek ADM pri výmene expandéru za implantát na Ústave histológie a embryológie LF UK. Hlavný operatér bol MUDr. Martin Boháč, Ph.D, MHA, FEBOPRAS. Boli použité výlučne ADM z Centrálnej tkanivovej banky (CTB). Štúdia bola schválená etickou komisiou UNB Ružinov (UHB/006/2015/MB). Všetci pacienti, ktorí tvoria podklad pre štúdiu boli plne informovaní o jej charaktere, jej účelovosti a následne podpísali informovaný súhlas. Klinická štúdia je zaregistrovaná na ClinicalTrials.gov (NTC02835781)

Informácie o pacientoch do štúdie, zahŕňajúce osobné údaje a operačný resp. pooperačný management sme získali zo zdravotnej dokumentácie.

ADM bola pripravená Centrálnou tkanivovou bankou Kliniky popálenín a rekonštrukčnej chirurgie LF UK a UN Bratislava. CTB vyvinula novú metódu decelularizácie allogénnej čerstvo získanej, alebo zmrazenej dermy od mŕtvych darcov. Štepy boli získané a spracované podľa štandardných operačných predpisov CTB.

Operácie boli vykonané v celkovej anestézii. V prvej dobe operácie, bol operačný prístup cez jazvu po mastektómii s jej súčasnou excíziou. Pokračujúc s disekciou podkožného priestoru, ktorý siaha kaudálne až po novonaplánovanú submammárnu ryhu predoperačne zaznačenú na koži pacientky súmerne podľa druhostranného prsníka. Identifikáciou spodného okraju veľkého prsného svalu /musculus pectoralis major a jeho následnou mobilizázia/elevácia sa vytvorí priestor pre vloženie expandéru/implanátu. ADM je všitá na spodný okraj elevovaného veľkého prsného svalu a jej distálny okraj je fixovaný k hrudnej stene v budúcej inframammárnej ryhe. Z laterálneho prístupu bol vložený do vzniknutého priestoru prázdny expander (Mentor, Irvine, California/USA). Pomocou magnetickej navigácie a značenia cez expandérový port bol expandér injekčne plnený fyziologickým roztokom do takej miery, ako povoľovalo kožné tkanivo. Dopĺňanie expandéru ďaľej pokračovalo ako ambulantný zákrok.

Druhá doba operácie výmena expandéru za implantát bola vykonaná, po úspešnej expanzii tkaniva rekonštruovaného prsníka na požadovanú veľkosť. Prístup bol opäť cez jazvu po predchádzajúcej operácii. Počas operácie boli odobraté vzroky plnej hrúbky tkanív na biopsiu z implantovanej ADM.

Výsledky

Z 22 pacientiek, 18 podstúpilo unilaterálnu rekonštrukciu prsníka, 4 pacientky podstúpili bilaterálnu rekonštrukciu. Tri pacientky, ktoré podstúpili bilaterálnu rekonštrukciu, podstúpili kontralaterálnu profylaktickú mastektómiu s okamžitou rekonštrukciou. Ostatné pacientky boli po primárnej mastektómii pre karcinóm prsníka s následnou adjuvantnou liečbou, rekonštrukciu mohli podstúpiť po 2 rokoch trvajúcej remisii ochorenia. Priemerný vek pacientok v čase operácie bol 48 rokov. Najmladšia pacientka mala 30 rokov a najstaršia 69. Priemerný operačný čas prvej doby unilaterálnej rekonštrukcie bol 79 minút (v rozmedzí 60 minút až 105 minút). Priemerná celková veľkosť ADM použitej pri jednom prsníku bola 273 cm^2 (v rozmedzí 155 až 665 cm^2). Priemerné naplnenie expandéru prsníka bolo 389 ml (v rozmedzí 155 až 690 ml). Priemerné obdobie výmeny expandéru za implantát bolo 5,9 mesiacov (v rozmedzí od 3 do 12 mesiacov). Priemerné sledovanie pacientiek po vložení ADM bola 12.6 mesiaca (v rozmedzí 4 až 21 mesiacov).

V našom súbore sme zaznamenali komplikácie u troch pacientok, ktoré vyžadovali daľšiu intervenciu, 2x sa vyskytla infekcia a 1x defigurácia expandéru. Komplikácie v zmysle tvorby serómu, hematómu alebo kapsulárnej kontraktúry, migrácii implantátu sme nepozorovali.

Prvým 10 pacientkam bola implantovaná ADM bazálnou membránou naliehajúc na expandér. Ostatným pacientkam bola ADM aplikovaná bazálnou membránou smerom k podkožnému tkanivu. Z histologického hľadiska nebol zistený rozdiel v penetrácii ciev ADM vzhľadom na jej orientáciu a vzťahu bazálnej membrány

V kontrolných vzorkách ADM z CTB boli prítomné nepravideľné zväzky kolagénových vlákien, retikulárna vrstva dermis ale bez prítomnosti akýchkoľvek buniek alebo ciev. Mikroskopickou analýzou vzoriek získaných biopsiou počas výmeny expandéru za implantát, bola potvrdená inkorporácia ADM do okolitého podkožného tkaniva bez prítomnosti imunitnej reakcie. Iba veľmi malé množstvo lymfocytov bolo prítomných v blízkosti novovytvorených ciev. Cievna novotvorba sa sústreďévala prevažne na periférii. Imunohistochemicky bola potvrdená prítomnosť endotelových buniek aj v centrálnejšej časti ADM u jednej pacientky a taktiež aj prítomnosť lymfatických ciev. Aj po dlhšom období vykazovala ADM prítomnosť kolagénových zväzkov.

Diskusia

Primárnym cieľom našej štúdie bolo overiť využitie allogénnej ADM pripravenej v CTB v dvojdobej rekonštrukcii prsníka. Naša štúdia zahŕňala 22 pacientok a 26 zrekonštruovaných prsníkov za časové obdobie 1.5 roka. Kohorta pacientok bola menšia v porovnaní s ostatnými štúdiami, kde používajú komerčne pripravené ADM.(2,3)

Pri použití ADM sme zistili spojitosť s väčším peroperačým expanzným objemom a skrátením obdobia expanzie expandéru. Tieto zistenia sa zhodujú so zisteniami iných štúdii, ktoré používajú komerčne pripravené ADM.(4-6) Nízky výskyt infekčných komplikácii v našej štúdii 3,8% nie je v zhode s vyššími incidenciami (2,7), ktoré vykazujú zahraničné štúdie používajúce komerčne pripravené ADM. Taktiež sa v našej štúdii nepotvrdili vyššie incidencie iných pooperačných komplikácii ako sú tvorba hematómu, serómu, kapsulárnej kontraktúry ani migrácia implantátu.

ADM umožňuje chirurgovi lepšiu kontrolu pozície pri vkladaní expandéru/implantátu, hlavne v inframammárnej ryhe, umožňuje tiež vytvoriť ptotický charakter dolného pólu rekonštruovaného prsníka. Takto prekrytý expandér/implantát je odolnejší voči extrúzii(8), menej hmatateľný, vidteľný a estetický výsledok je taktiež zlepšený. Aj keď používanie ADM predstavuje efektívny prostriedok pre plastického/rekonštrukčného chirurga, práca s ňou si vyžaduje určitú skúsenosť, aby sa dosiahli požadované výsledky. Existujú isté odporúčania vychádzajúce z klinickej praxe, ktoré môžu pomôcť vyhnúť sa prípadným pooperačným komplikáciám. Častejšie pooperačné komplikácie boli zaznamenané u morbídne obéznych pacientok, pacientok ktoré podstúpili rádioterapiu, alebo u pacientok, ktoré fajčia a to v zmysle ohrozenia cievneho zásobenia laloku.

V našej štúdii, bola histologickou analýzou potvrdená prítomnosť veľkého počtu fibroblastov ako aj proces neovaskularizácie, avšak neboli morfologicky prítomné známky rejekcie. Naše zistenia sú podobné výsledkom publikovaných Bullocksom. Bullocks identifikoval krvné cievy a živé bunky prítomné v ADM po 7 mesiacoch od implantácie(9) Z experimentov na zvieratách, je dobre známy proces revaskularizácie a bunkovej infiltrácie ADM, ktorý je závislý od typu použitej ADM. Zatiaľ však nie mnoho štúdií, ktoré by prinášali podobné informácie o integrácii ADM u ľudí. V našej štúdii sme tiež dokázali u jedinej pacientky prítomnosť lymfatických ciev v ADM 7 mesiacov po implantácii. Cheburino et al. a aj Wong et al. vo svojich štúdiach na potkanoch zistili, že vývoj krvných ciev je asociovaný s tvorbou ciev lymfatických.(10,11) Žiadne štúdie neboli schopné doteraz preukázať lymfangiogenézu u ľudí.

Primárnym cieľom našej štúdie bolo objektívne zhodnotiť výsledky použitia ADM pripravenej CTB v rekonštrukcii prsníka pomocou implantátu. Táto štúdia je jednou z prvých, ktorá hodnotí bezpečnosť a efektívnosť ADM pripravenej novou metódou v rekonštrukcii prsníka. Zistené výsledky potvrdili bezpečnosť a efektívnosť novej nami použitej ADM.

Naša štúdia bola podporená VEGA grantom č. 1/0297/14 z Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej Republiky

Zoznam použitej literatúry:

1. Nahabedian MY. Acellular dermal matrices in primary breast reconstruction: principles,concepts, and indications. Plast Reconstr Surg 2012;130:44S–53S.
2. Forsberg CG, Kelly DA, Wood BC, et al. Aesthetic outcomes of acellular dermal matrix intissue expander/implant-based breast reconstruction. Ann Plast Surg 2014;72(6):S116-20.

3. Zhong T, Temple-Oberle C, Hofer SO, et al. The Multi Centre Canadian Acellular DermalMatrix Trial (MCCAT): study protocol for a randomized controlled trial in implant-based breastreconstruction. Trials 2013;14:356.
4. Lanier ST, Wang ED, Chen JJ, et al. The effect of acellular dermal matrix use on complication rates in tissue expander/implant breast reconstruction. Ann Plast Surg 2010;64:674-678.
5. Bindingnavele V, Gaon M, Ota KS, et al. Use of acellular cadaveric dermis and tissueexpansion in post- mastectomy breast reconstruction. J Plast Reconstr Aesthet Surg2007;60:1214-8.
6. Namnoum JD. Expander/implant reconstruction with Allo- Derm: recent experience. PlastReconstr Surg 2009;124:387-94.
7. Chun YS, Verma K, Rosen H, et al. Implant-based breast reconstruction using acellular dermal matrix and the risk of postoperative complications. Plast Reconstr Surg 2010;125:429-36.
8. Zienowicz RJ, Karacaoglu E: Implant-based breast reconstruction with allograft. Plast Reconstr Surg 2007;120:373–381.
9. Bullocks JM. DermACELL: a novel and biocompatible acellular dermal matrix in tissue expander and implant-based breast reconstruction. Eur J Plast Surg 2014;37(10): 529-538.
10. Cherubino M, Pellegatta I, Tamborini F, et al. Evaluation of lymphangiogenesis in acellulardermal matrix. Indian J Plast Surg 2014;47(3):318-24.
11. Wong AK, Schonmeyr B, Singh P, et al. Histologic analysis of angiogenesis and lymphangiogenesis in acellular human dermis. Plast Reconstr Surg 2008;121(4):1144-52.

11. Amniotic membrane covering defects in patients with orbital and epibulbar lesions

Neofytos Mavris
(General medicine, 5. Year)

Supervisor: assoc. prof. Mgr. MUDr. Furdová Alena, PhD., MPH, MSc
Department of Ophthalmology, Comenius University in Bratislava

Introduction

Amniotic membrane (AM), or amnion, is the innermost layer of the three-layered fetal membrane. It consists of a single layer of cuboidal to columnar epithelium, a thick basement membrane and an avascular stromal matrix.[1, 2, 5]

The use of live fetal membrane was first noted in ophthalmology by De Roth in 1940 with unfavorable outcome. Since then, AM transplantation (AMT) has been used as a temporary tissue bandage or permanent graft for various corneal and conjunctival surface reconstructions: pterygium, bulbar conjunctival reconstruction, symblepharon, cunjuctivochalasis, persistent corneal epithelial defect with or without ulceration, partial or total limbal stem cell deficiency, chemical or thermal burns, Stevens - Johnson syndrome, bullous keratopathy and band keratopathy. [1, 2, 5]

The basement membrane component of amniotic membrane is similar in composition to the conjunctiva, where both contain laminin, fibronectin, and collagen type IV and VII. For this reason, current theory suggests that the basement membrane acts as a substrate, which enhances epithelial cell migration, attachment, and differentiation.[1, 2]

In addition, amniotic membrane inhibits stromal inflammation by inducing inflammatory cell apoptosis.[1, 2, 5] Also, it reduces pain[6] and corneal neovascularization by the presence of antiangiogenic proteins in AM.[5, 7] Furthermore, the stromal matrix includes of a unique protein that restrains transforming growth factor (TGF)-β signaling, which suppresses myofibroblast differentiation of normal fibroblasts and therefore reduces scar formation. This action assists healing for conjunctiva reconstruction, epithelial defects, and stromal ulceration. Finally, there is lack of rejection as a result of the low immunogenicity of the tissue. [1, 2]

Currently, in practice there are two important methods for preparing and storing the membrane. The first method applies freezing of cleaned fresh membrane at −80 °C in either phosphate-buffered saline in dimethylsulphoxide (PBS DMSO) or in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) with glycerol. The second method uses freeze drying of the membrane and rehydration before use. In addition, developing countries use fresh unpreserved membrane. This is uncommon in the Western countries due to strict laws requiring HIV, hepatitis B, C, and HTLV tests on the donor serum at the time of obtaining the membrane and the HIV test repeated 6 months later to cover the window period. This has as a result of membrane quarantine for 6 months. [3]

In this report we analyze the indications and most frequent use of AMT.

Materials and methods

Retrospective analysis of all patients who underwent amniotic membrane transplantation at the Department of Ophthalmology Faculty of Medicine and UN Bratislava during years 2013 – 2016 were included. AMT was used in various ocular surface abnormalities in patients with persistent epithelial defects, and patients in whom the integrity of the eye was vulnerable by accident and conservative medical care has been unable to stabilize the condition.

We used three techniques, after retro bulbar or general anesthesia:

a) Onlay technique- AM was placed on the ocular surface as a temporary tissue bandage for one to two weeks and then it was cleared away. This way we increased epithelialization and decreased inflammation due to AM's biological properties. This resulted in faster wound healing in conditions varying from acute burns to acute herpetic keratitis.

b) Inlay technique- AM was used as a permanent graft for membrane substitution.

Firstly, debris from the base of the wound was removed. Then AM was sewn in with interrupted 10-0 Nylon sutures with episcleral bites around the limbus. The basement membrane was facing outwards (epithelial side up). Multiple layers of AM were used to treat deep corneal ulceration and small corneal perforations. Subsequently, a bandage contact lens was put in place, and discarded after epithelialization.

c) Inlay and onlay technique- we combined the two techniques to attain the most beneficial outcome, especially in significant disorders as in extensive corneal ulceration.

We evaluated the indications of amniotic membrane transplantation, attained the number of transplants, failures, and re-transplantation of the membrane and calculated the percentage frequency of AMT for each ocular disease.

Results

In a group of 91 patients, women formed the predominant number of patients, 48 women =52.8%, versus 43 males who made the 47.2 % of the patients. The left eye was affected in 50 patients (54.9 %). The most common ocular disorder that lead to AMT was corneal ulcer consisting 41% of all disorders. The rest with descending order were: bullous keratopathy (16%), ulcer after herpetic keratitis (9%), injury or wound penetration (7%), ulcers caused by paresis of facial nerve (7%), sicca syndrome (6%), non-wettable spot (4%), ectropium and trichiasis (3%), condition after excision of infiltrating basal cell carcinoma (2%), and post-radiation keratitis (2%). [(Fig. 1, Fig. 2)]

To a large extend, favorable prognosis was seen when an undamaged, intact surface epithelium has formed on ocular surface with reduced inflammation. In general, 20% of the patients required re-transplantation of AM mostly due to complications and infections.

Fig. 1 Indications for amniotic membrane transplantation in 91 patients at the Dept. of Ophthalmology

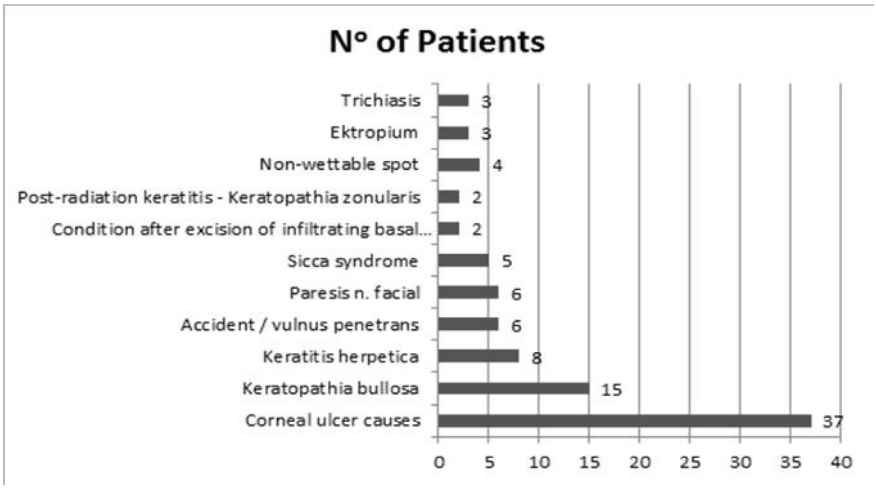
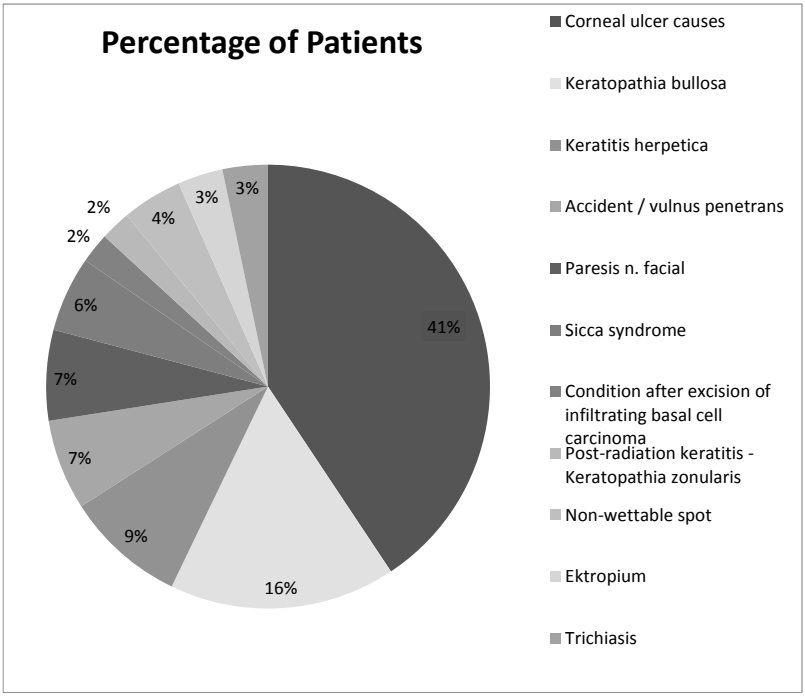


Fig. 2 Percentage of indications in patients with amniotic membrane transplantation at the Dept. of Ophthalmology



Discussion

Nowadays, AMT is undoubtedly approved and applied by ocular surface surgeons. Considering the resilient and easy to use tissue, the non-intraocular techniques, and the lack of rejection due to low immunogenicity, is an advantageous, attractive, and favorable surgical option in ocular reconstruction. The intraoperative and postoperative complications are insignificantly low, [10] and the chance of contamination is considerably reduced since it consists of nonspecific, antimicrobial effects against viruses and bacteria. [8] Also, it was clinically supported that the bactericidal effect of AM can be prolonged by soaking it with antibiotics, which effectively eliminate pathogens as in infectious keratitis.[7]

AM has anti-cicatricial activity which prevents necrosis and scarring formation.[8] It also decreases inflammation of the ocular surface by suppressing certain inflammatory cytokines. Thus, when the AM stroma is applied, polymorphonuclear and mononuclear cells attach on it very quickly, which induces inflammatory cell apoptosis, making it useful for treating acute chemical burns. [6, 8] Moreover, AMT was found to act as a pain relief in treating chemical burns, painful bullous keratopathy, and pain aroused at the time of irradiation therapy for ocular tumors. [6, 7]

The choice between using onlay and inlay technique, or even both combined, always depends on the current condition. Onlay technique is indicated in conditions varying from acute thermal/chemical burns to acute herpetic keratitis, whereas inlay technique is indicated in persistent epithelial defects, corneal ulceration or covering defects following excision of conjunctival tumors.[4] It was found that inlay method enhances wound closure by inducing adjacent recipient epithelial cells drift onto the AM [8]. Also, it differentiates these epithelial cells into conjunctival and corneal epithelial cells. [8] The use of both inlay and onlay, also called sandwich technique, is the most favorable method with topmost success rates (65%-80%). [4] Here the onlay AM preserves the inlay AM, and supports its epithelialization, and is indicated in significant disorders of the ocular surface such as deep and extensive corneal ulceration. [4]

AMT accomplishment is determined by the underlying problem, [9] and early AMT has higher success rates.[4] Applying AM early is fundamental in treating inflammation and reducing the risk of development of persistent epithelial defect and scarring. [11] Even though its use in ocular reconstructions continues to expand, disorders of the cornea are one of the most common indications of AMT, accounting for 41% of our cases. AM is clinically applied as a basement membrane substitute in patients with persistent epithelial defects both with and without corneal ulceration. Regardless of the various conservative and surgical techniques, treating corneal ulcers remains a challenging task for ophthalmologists. In general, minor epithelial lesions recover without any complications, except if they are untreated or maltreated. In such cases, they can lead to corneal ulceration, descemetocele, or even perforation.[4] AMT can benefit from the induction of ptosis of the upper eyelid to reduce its exposure by the use of Botox injection,[4] or by temporary tarsorrhaphy to confine the lid fissure in patients with insufficient blinking.[7]

The hopeful and encouraging results of AMT have settled it as an important treatment of ocular surface lesions. For this reason, advancements have been made available for a more convenient, simple, and accessible operation for the patient. Such improvements are technological progress in tissue handling, new conserving forms like the low-heat dehydrated AM, and the suture-less treatments with fibrin glue.[10]

Conclusion

Amniotic membrane is a fundamental choice for covering and treating several ocular surface lesions when conservative methods of treatment fail.[12] It is mostly indicated in the treatment of corneal ulcer. Additionally, it promotes epithelialization and decreases inflammation which prevents the procedure of a more complicated and complex treatment, such as keratoplasty.[12]

Furthermore, early application of amniotic membrane is crucial in successfully healing severe ocular inflammation, whereas delaying the procedure can result in development of persistent corneal epithelial defect. With early treatment, we diminish the chances of scarring and irreversible chronic changes in the eye. [11]

References:

1. Alisa K, Roy SC. Preserved Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. US Ophthalmic Review, 2007, 3:35-7
2. Augusto AB, C T Pillai, Harminder SD. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. Br J Ophthalmol 1999; 83:399–402
3. Rahman I, Said DG, Maharajan VS, Dua HS. Amniotic membrane in ophthalmology: indications and limitations. Eye (2009) 23, 1954–1961
4. Meller D, Pauklin M, Thomasen H, Westekemper H, Steuhl KP. Amniotic membrane transplantation in the human eye. Dtsch Arztebl Int. 2011; 108:243-248.
5. Yildiz EH, Nurozler AB, Ozkan Aksoy N, Altiparmak UE, Onat M, Karaguzel H. Amniotic membrane transplantation: indications and results. Eur J Ophthalmol. 2008; 18:685-690
6. Sheha H, Liang L, Li J, Tseng SC. Sutureless amniotic membrane transplantation for severe bacterial keratitis. Cornea. 2009; 28:1118-1123.
7. Liu J, Sheha H, Fu Y, et al. Update on amniotic membrane transplantation. Expert Rev Ophthalmol. 2010 5:645-661.
8. Thatte S. Amniotic membrane transplantation: an option for ocular surface disorders. Oman J Ophthalmol. 2011; 5:67-72.
9. Burman S, Tejwani S, Vemuganti GK, Gopinathan U, Sangwan VS. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: A review of current indications. Cell Tissue Bank 2004; 5:161-75
10. Duchesne B, Tahi H, Galand A. Use of human fibrin glue and amniotic membrane transplant in corneal perforation. Cornea 2001; 20:230-2.
11. Davidian M. Amniotic membrane for ocular inflammation. Ophthalmology Management, Volume: 17, Issue: May 2013, page(s): 30 - 33
12. Krcova L, Stanislavova M, Pesko K, Furdova A, Koller J. Moznosti pouzitia amniovej membrany- nase skusenosti. Ceska a slovenska ofthalmologie. 72, 2016, No. 6: 204-209

12. Výsledky tónovej audiometrie pri rôznych typoch kochleárnej implantácii

Peter Buček
(všeobecné lekárstvo, 5. ročník)
Spoluautor: doc. MUDr. Zuzana Kabátová, CSc.

Školiteľ: Prof. MUDr. Milan Profant, CSc.
Klinika otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LF UK a UNB

Úvod

Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie trpí celosvetovo poruchou sluchu 360 miliónov ľudí a 32 miliónov z nich sú deti.[1] Hluchotu možno definovať na základe prahového tónového audiogramu ako poruchu sluchu, pri ktorej je priemer prahov pre čisté tóny na rečových frekvenciách 500 Hz, 1000 Hz a 2000 Hz väčší ako 90–95 dB na lepšie počujúcom uchu. Na základe prahového tónového audiogramu sa rozlišujú dva druhy hluchoty: 1. úplná hluchota (nepercipuje žiadne zvuky) a 2. praktická hluchota (percipuje zvuky s vysokou intenzitou najčastejšie s frekvenciou 250 Hz, 500 Hz a 1000 Hz).[2]

Etiológia hluchoty je veľmi pestrá. Podľa etiopatogenézy rozlišujeme dva základné druhy hluchoty – vrodenú (dedičnú) a získanú v rôznych obdobiach života. Získaná hluchota môže vzniknúť počas vývoja plodu, pri pôrode, v ranom detstve alebo aj v dospelosti.[3]

V tejto práci sme analyzovali výsledky u pacientov, ktorých obojstranná ťažká porucha sluchu až hluchota bola riešená pomocou kochleárneho implantátu (KI). KI je elektronické zariadenie, ktoré umožňuje pacientovi vnímať zvukové informácie *vďaka* priamej elektrickej stimulácii sluchového nervu v kochlei. Implantát sa skladá z vonkajšej a vnútornej časti. Medzi vonkajšie časti patrí rečový procesor, mikrofón a vysielacia cievka. V dnešnej dobe *vďaka malým rozmerom sú tieto časti umiestnené za uchom pacienta.* Prijímač, vnútorná časť KI, je chirurgicky implantovaná do šupiny spánkovej kosti. Z prijímača sú vedené elektródy do kochlei a elektrické signály vychádzajúce z elektród stimulujú nervové zakončenia sluchového nervu. Sluchový nerv vedie tieto signály *ďalej* po sluchovej dráhe až do sluchových centier, kde sú rozoznávané ako zvukový vnem.[4]

Materiál a metodika

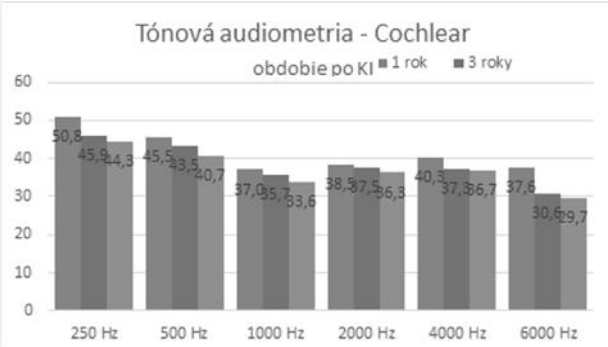
V súbore bolo 248 nepočujúcich, ktorí sú v trvalej starostlivosti Kliniky otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNB v Bratislave a mali implantovaný KI od firmy Med-El (implantáty C40, C40+, Pulsar, Sonata, Concerto) alebo Cochlear (implantáty Nucleus). V pooperačnom období sú užívatelia KI pravidelne sledovaní. Efekt kochleárnej implantácie sa vyšetruje vo voľnom poli. Vyšetrenie sluchu vo voľnom poli prebieha v miestnosti, ktorá je zvukovo izolovaná a nedochádza v nej k odrazom zvuku. Ako stimul z reproduktorov sa používa tón s frekvenciou 250- 6000 Hz alebo reč (slovná audiometria). Sluch je vo voľnom zvukovom poli vyšetrovaný binaurálne. To umožňuje vyšetrenie prahu sluchu a prahu porozumenia aj s KI.[2] Vo vyšetrovanom súbore pacientov sme sledovali výsledky prahových hodnôt tónovej audiometrie na frekvenciách: 250 Hz, 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz, 4000 Hz, 6000 Hz a slovnej audiometrie (stimul 60 dB a šum 40 dB, resp. maximálna diskriminácia reči). Na vyhodnotenie sa použili výsledky tónovej a rečovej audiometrie po uplynutí 1, 3 a 5 rokov od

zavedenia KI. Umožnilo to porovnať efekt KI v čase a sledovať do akej miery zlepšil daný KI počutie a porozumenie reči a tým aj kvalitu života.

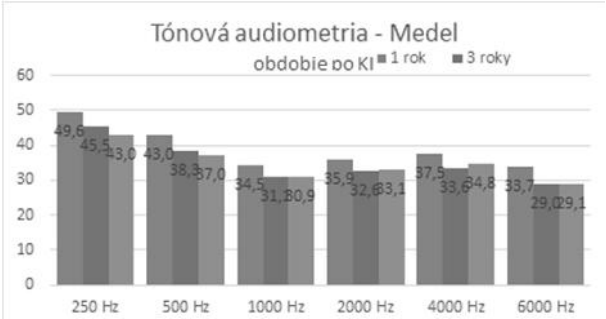
Výsledky

Cieľom práce bolo porovnať výsledky prahovej tónovej a rečovej audiometrie u pacientov, ktorým bol implantovaný jeden z dvoch typov KI a zistiť, ktorý z implantátov prináša vyšší benefit pacientovi. Po prvom roku používania KI sme nezistili štatisticky významné rozdiely medzi uvedenými typmi implantátov pri vyšetrení prahu sluchu pomocou prahovej tónovej audiometrie vo voľnom poli. Po 3 rokoch používania KI bol prah sluchu u pacientov s implantátom Medel na frekvenciách 500-6000Hz nižší v rozsahu 1,6-5,2dB oproti pacientom s implantátom od firmy Cochlear, po 5 rokoch sa rozdiel zmenšil najmä na frekvencii 6000 Hz. Pri vyšetrení rečovou audiometriou pacienti s implantátmi Medel dosiahli lepšie porozumenie reči vo všetkých sledovaných obdobiach. Konkrétne pri vyšetrení porozumenia reči v šume (stimul 60 dB a šum 40 dB) v 1. roku po implantácii bolo porozumenie lepšie o 4,5% , v 3. roku o 10,6% a v 5. roku o 7,8% oproti výsledkom rečovej audiometrie u používateľov s implantátom Nucleus.

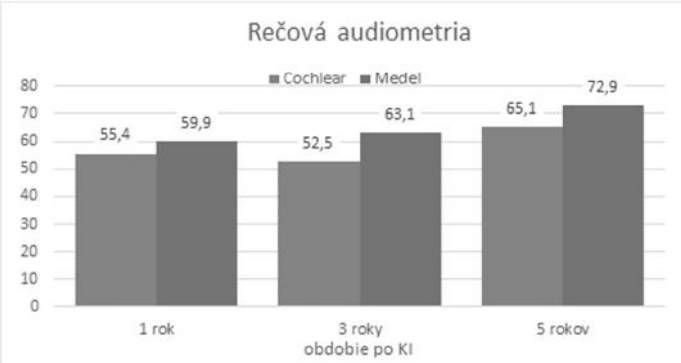
Graf 1: Výsledky tónovej audiometrie - Cochlear



Graf 2: Výsledky tónovej audiometrie - Medel



Graf 3: Výsledky rečovej audiometrie oboch typov KI



Diskusia

Napriek tomu že naše výsledky prahovej tónovej a rečovej audiometrie vo voľnom poli vyšli v prospech KI od firmy Med-El, treba brať do úvahy vysokú variabilitu v rámci nami sledovaných skupín. Porucha sluchu užívateľov KI v porovnávaných skupinách mala rôznu etiopatogenézu, pri získaných poruchách sluchu boli rozdiely v dĺžke jej trvania. Rozdielny bol aj vek v čase implantácie u detí s vrodenými poruchami sluchu. Tieto faktory majú vplyv na výsledok kochleárnej implantácie, čo potvrdili aj mnohí iní autori zahraničných štúdií.

Záver

Výsledky kochleárnej implantácie v našom súbore potvrdzujú vysokú kvalitu všetkých kochleárnych implantátov používaných na Klinike otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNB v Bratislave a ich prínos u pacientov s obojstrannou ťažkou poruchou sluchu až hluchotou. Efekt KI je veľmi variabilný, závisí od mnohých faktorov a pridružených postihnutí. V tejto práci sa nezistili výrazné rozdiely medzi jednotlivými typmi implantátov Medel a Nucleus.

Zoznam použitej literatúry :

1. Anonym., Deafness and hearing loss, WHO, 2017 www.who.int/mediacentre/factsheets /fs300/en/
2. Kabátová Z., Profant M. a kol., Audiológia, Grada Publishing a.s. 2012
3. Jakubíková J. a kol., Detská audiológia 0 - 4 roky, Slovak Academic Press 2006
4. Cooper H., Cochlear Implants: A Practical Guide, 1nd Edition. London, Whurr Publishers 1991

13. Congenital abnormalities of face in newborns

Koukouvitaki Maria
(general medicine, 4th year)

Supervisor: Assoc. prof. MUDr. Brucknerova Ingrid, PhD.
Neonatal Department of Intensive Medicine, Bratislava

Introduction

Congenital disorder is a condition existing at or before birth regardless of cause. Those characterized by structural deformities are termed "congenital anomalies" and involve defects in a developing fetus. Any substance that causes birth defects is known as a teratogen. Some disorders can be detected before birth through prenatal diagnosis (screening) (1, 2). Cleft lip, cleft lip and palate, and isolated cleft palate, are collectively termed oral clefts and are the most common congenital anomalies of the head and the neck (2.1 per 1000 live births). Environmental and genetic factors have been implicated as causes (3, 4). Prenatal maternal use of tobacco and alcohol may increase risk. Having one affected child increases risk of having a second affected child. Syndromic oral clefts (OCs) are those present in patients with recognized congenital syndromes or with multiple congenital anomalies. Are typically caused by chromosome abnormalities and defined as monogenic syndromes. Nonsyndromic (isolated) OCs are those present in patients without associated anomalies or developmental delays. A number of different gene mutations can cause the phenotype, including mutations of some of the genes that are involved with syndromic OCs, which suggests there is significant overlap between syndromic and nonsyndromic OCs (5). Micrognathia is a term for a lower jaw that is smaller than normal and may occur in more than 700 genetic syndromes. In some cases, the jaw is small enough to interfere with the infant's feeding, often corrects itself during growth (6). Pierre Robin sequence is a common manifestation of micrognathia characterized by a U-shaped cleft soft palate and upper airway obstruction caused by glossoptosis, conductive hearing loss may also be present. Agnathia, congenital absence of the condyloid process and sometimes the coronoid process, the ramus, and parts of the mandibular body is a severe malformation. The mandible deviates to the affected side, resulting in severe malocclusion; the unaffected side is elongated and flattened. Abnormalities of the external, middle, inner ears, temporal bone, parotid gland, masticatory muscles, and facial nerve often coexist (4). Syndromes to be considered include agnathia-holoprosencephaly, otocephaly, a severe form of cerebrocostomandibular syndrome, and Ivemark syndrome (1). Congenital facial paralysis is uncommon, may cause multiple problems for the newborn, such as difficulty with nursing and incomplete eye closure. If does not resolve, it may affect the child’s future speech, expressions of emotion, and mastication. Congenital facial paralysis is classified as traumatic or developmental, unilateral or bilateral, and complete or incomplete (paresis) (7). Facioscapulohumeral muscular dystrophy is a disorder characterized by muscle weakness and wasting (atrophy). This condition gets its name from the muscles that are affected most often: those of the face (facio-), around the shoulder blades (scapulo-), and in the upper arms (humeral). The signs and symptoms of facioscapulohumeral muscular dystrophy usually appear in adolescence. However, the onset and severity of the condition varies widely. Milder cases may not become noticeable until later in life, whereas rare severe cases become apparent in infancy or early childhood at birth, infants present with facial diplegia, however, lateral gaze is intact. Later in

childhood, distal progressive myopathy develops. Intelligence and life span are normal and the spectrum of disability is broad (8).

Materials and methods

Retrospective analysis of patient documents admitted to Neonatal Department of Intensive Medicine in 2012-2016 with the aim to form a group of patients with visible congenital abnormality of face, to find information about confirmation of diagnosis (prenatal/postnatal), to analyze patients' other abnormalities and the influence of face abnormalities to postnatal adaptation.

Results

Analysis of our results is present in Tab. 1.

Tab. 1 Characteristics of patients

Abbreviations: spont. – spontaneous, g – grams, cm – centimeters

child No	**maturity (g. w.)**	**birth weight birth length**	**establishment of diagnosis**		**face deformities**	**other anomalies postnatal complications**
			pre-natal	post-natal		
1	37 Cesarean section	2270 g 46 cm	✓		-complete left cheilognathopalatoschisis	- hyperpigmentation of scrotum - respiratory insufficiency
2	26 Cesarean section	965 g 29 cm		✓	-cleft of hard and soft palate -unilatelar cleft of lip	- infection
3	37 spont.	2260 g 45 cm	✓		-bilateral cheilognathopalatoschisis -microphtalmia	- hypoplasia of vermis cerebelli - interventricular septal defect in heart - suspicion for Patau syndrome - polydactylia, malformation of genitals - respiratory insufficiency
4	34+2 Cesarean section	1970 g 43 cm		✓	- cleft of soft palate - coloboma of eyelid - microstomia, hypomimia - micrognathia	- deformation of upper extremities, - narrowing of hearing canal - bradycardia
5	41 spont.	3000 g 49 cm	✓		- bilateral cheilognathopalatoschisis	- diabetes mellitus - respiratory

						insufficiency - feeding problems
6	35 Cesarean section	2040 g 45 cm		✓	- bilateral cheilognathopalatoschisis	- tetralogy of Fallot - anemia - hypospadia - ventricular septal defect - respiratory insufficiency
7	39 Cesarean section	2760 g 49 cm		✓	- hypoplasia of musculus orbicularis oris and musculus depresor labii inferior - asymmetry of lower lip	- stenosis of aortic isthmus - hyperfixation of duodenum - omphalocele - foramen ovale appertum - postnatal hypotrophy
8	38 spont.	2130 g 44 cm	✓		- bilateral cheilognathopalatoschisis - central protrusion of hard and soft palate of lip - microcephaly	- deformity of ear - ventricular septal defect - respiratory problems
9	41 spont.	2840 g 48 cm	✓		- bilateral cheilognatopalatoschisis - absent ophalmic bulbus - hypoplastic orbita - keratopathy, lagophtalmus - intraretinal hemorrhages - hyperplastic iris - dysgenesis of cornea - lack of lower palpebral	- oligohydramnion - hypoxic-ischemic encephalopathy - sideropenic anemia - chronic dyspepsia - respiratory insufficiency
10	38 spont.	2650 g 47 cm	✓		- left complete cheilognathopalatoschisis - dacryoadenitis	- Down syndrome - hypotonic syndrome - feeding problems - interventricular septal defect
11	40 Cesarean section	2000 g 45 cm	✓		- medial cheilognathopalatoschisis - one common nasal opening - microcephaly	- Patau syndrome - cyst in brain - polydactylia, syndactylia - malformation of annus - ductus arteriosus - respiratory problems

12	34 Cesarean section	2920 g 48 cm		✓	-left cheilognathopalatoschises -acute purulent conjuctivitis	- polydactylia - asymmetric genitals, agenesis of left kidney - cardiac dysrhythmia
13	37 spont.	3050 g 48 cm	✓		- bilateral cheilognathopalatoschisis - dysplasia of right part of maxilla - cleft of right eye	- prematurity
14	41 spont.	3470 g 51 cm	✓		- complete cheilognathopalatoschisis - protrusion, rotation of premaxilla	- interventricular septal defect - bradycardia - respiratory insufficiency

Discussion

The most common congenital abnormality of face in our group of patients was cheilognathopalatoschisis (93 %) which is an expected finding because it appears in 2.1 per 1000 live births (5). Exept from oral clefts, other congenital abnormalities of face in our group of patient and also in the group of patients studied for the Assiut University hospital's research were microcephaly, microstomia, hypomimia, micrognathia, keratopathy, lagophthalmus, intraretinal hemorrhages, protrusion and rotation of maxilla (2). Only patient number 13 had positive family history. It is known that the highest incidence for all facial anomalies is when family history is positive (2). We presumed that environmental and genetic factors have been implicated as causes (3). Gestational exposures to alcohol, cigarette smoking, steroids, rubella, anticonvulsants and hypoxia have all been associated with cleft palate. Advanced paternal age, parental folate deficiency, and hypoxia are associated with an increased risk of cleft lip or palate, as it is mentioned on Kosowski and coauthors article (1). We found chromosomal abnormalities, trisomy 21 and suspicion for Patau syndrome (which was not confirmed because parents didn't agree with genetic investigation). Clefts are typical findings in newborns with trisomies (4). Furthermore, the majority 65 % of our patients had respiratory and feeding problems due to complete cleft of lips and palate. Other complications were consequences of added congenital abnormalities.

We confirmed what is mentioned in Neonatology Simple and easy book, that the care for a child with Down syndrome must be multidisciplinary, genetic counseling, general practitioner for children and adolescents, surgeon, cardiologist, neurologist, speech therapist, ophalmologist, otorinolaryngologist and physiotherapist (4). Prognosis of all children depends on character of abnormality a genetical background. Treatment and care for each child must be multidisciplinary (4).

References:

1. Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton: Berne and Levy Physiology, updated edition. Sixth edition: 2010: 1-835.
2. Milan Buc: Basic and Clinical Immunology:. Bratislava, Comenius University, 2014: 1-305.
3. Vasudeva N, Mishra HS: Textbook of human histology with color atlas and practical guide. Inderbir Singh, Jp Medical Ltd; 8th ed. edition 2016. 300 pp.

4. Brucknerová I. Neonatology. Simple & Easy. Part 1. Bratislava, Comenius University, 2014: 1-145.
5. Kosowski TR, Weathers WM, Wolfswinkel EM, Ridgway EB. Cleft Palate. Semin Plast Surg 2012; 26(4): 164-169.
6. Venkatesh R. Syndromes and anomalies associated with cleft. Indian J Plast Surg. 2009; 42(Suppl): S51-S55.
7. Kenneth W Lindsay, Ian Bone, Gerait Fuller: Neurology and neurosurgery illustrated. Fifth edition, Churchill livingstone Elsevier: 2010: 158-172,.
8. Harsh Mohan. Pathology quick review and MCQs: Based on Harsh Mohan's textbook of Pathology Seventh edition, fourth edition, Jaypee Brothers medical publishers (P) Ltd.: 2015: 569-589.

14. Evaluation of facial soft tissues in diagnostics of orthodontics

Olga Gkeka
(6th year dentistry student)

Supervisor: MUDr. Andrej Thurzo, PhD
Department of Orthodontics Comenius University Bratislava

Introduction

In orthodontics the primary task of the clinician is to identify the problem and its etiology. Only when the diagnosis is made the treatment planning can be formulated. Diagnosis involves the development of comprehensive and concise database, sufficient to understand patient's problem, in order to fix it

For the correct diagnosis in orthodontics both hard and soft tissues are of great importance since both types of tissues are able to cause an orthodontic anomaly. In the past, hard tissues were measured by lateral cephalometric x-ray analysis, a reliable method used even nowadays. Soft tissues on the other hand were not easy to be measured since there were not any reliable methods. The evolution of technology in medicine has given the chance to modern orthodontics to upgrade the essential diagnostic tools needed.

The essential diagnostics used in orthodontics are, the case history, the clinical examination of the patient (extraoral, intraoral, temporomandibular joint examination), the study models in order to study them later for treatment planning, facial and intraoral photographs of the patient (smiling, not smiling, profile, ¾, and en face view), and radiographic imaging or cone beam computed tomography scan (CBCT) and facial scan.

The nonessential or supplementary diagnostics are specialized diagnostic measures used if the doctor suspects a certain condition and needs extra diagnostics to confirm. These are the specialized radiographs, the electromyographic examination, hand wrist radiographs and Cervical Vertebrae Maturation (CMV) method (for estimation of skeletal age), CT or MRI scans, endocrine or blood tests and biopsy.[5]

Measurement of the facial structures before an orthodontic treatment is undoubtedly a very important procedure which contributes to the correct diagnosis of each case and the appropriate treatment planning According to recent statistics of the American Association of Orthodontics the percentage of people undergoing orthodontic treatment is rising every year. The matter of the "perfect smile" is of high importance and since the demand of the population is rising new technologies have been discovered for the best result possible. In order for this to happen soft tissue measurement is an integral part of the diagnosis in orthodontics. [4]

In this project we are going to evaluate the accuracy of the soft tissues measurement done multiple times and the variability of the results.

Materials and methods

First step in soft tissue measurements is to obtain the extraoral facial scans of the patient. These are a set of images taken and later analyzed to measure the distances of the facial structures.

With the help of “Anatomage” program the facial scans are analyzed, specific points are marked by the doctor and the between them distances are measured digitally to achieve integrity.

Before marking of the points one has to put the facial scan in correct position by arranging the x-x’, y-y’ and z-z’ axis. By doing that we make sure that all measurements have taken place in a correct plane and there is no misalignment of the face.

After, the doctor has to mark the points on the face. For the soft tissue measurements the following points are essential:

- Upper soft tissue profile: a line of the patient’s profile extending from trichion until the upper lip
- Lower soft tissue profile: a line of patient’s profile extending from lower lip until the neck
- Soft Menton (Me): located on the lowest point of chin
- Subnasale: located below the nose on the facial midline.
- Soft Glabella (G): maximal convexity of the forehead in soft tissues.
- Trichion (Tr): the place where the line of hair begins
- Septum Nasi Frontalis Inferioris (SNFI) : lowest point of nose
- Soft Nasion (Na): the midpoint of the soft tissue contour of the base of the nasal root at the level of frontonasal suture

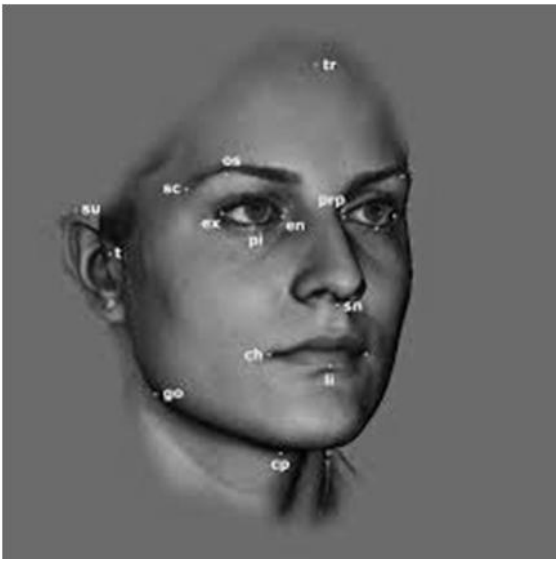


Figure 1 Soft tissue points needed for facial measurement (Trichion,Subnasale) [4]

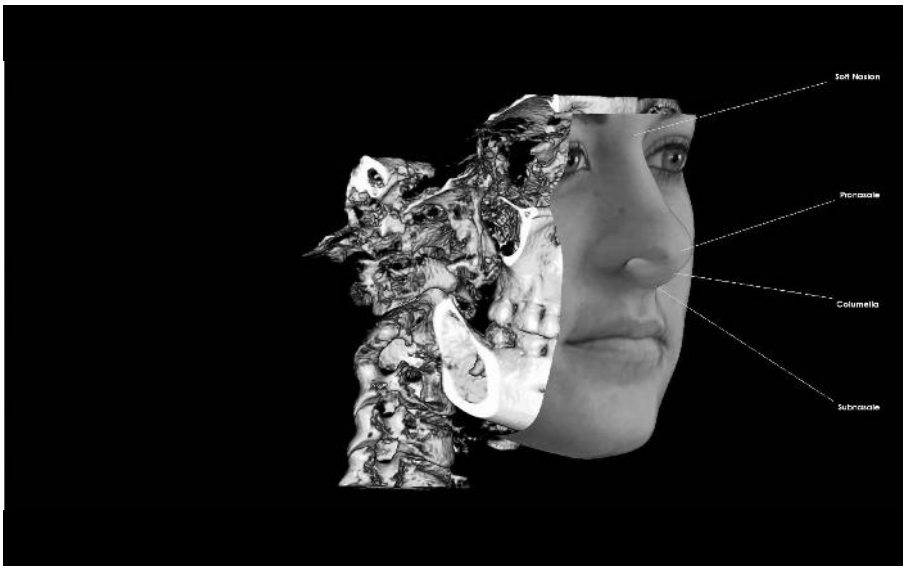


Figure 2 Soft tissue points needed for facial measurement (soft nasion, subnasale, pronasale) [3]

Figure 3 E-plane in relation to upper and lower lip [2]

When the marking of the points is finished the program analyzes the points and measures the distances and angles formed between the soft tissues. The obtained numbers relate to important angles and ratios present in the face. Those are firstly the lower lip to E-plane (Esthetic plane) and upper lip to E-plane distance. The E-plane is a line drawn from the tip of nose to the tip of chin and the closer to the "E" plane the lips are, in some cases even being anterior to the plane, the lips and teeth will dominate the smile with the nose and chin appearing weak. And the farther behind the plane the lips are, the more likely the nose and chin will dominate the smile.
Secondly the soft tissue angle, which is the angular measurement of a line drawn from soft tissue nasion where the sella-nasion line crosses the soft tissue profile, to the soft tissue chin at a point overlying the hard tissue suprapogonion. This chin point is chosen because of bone stability here during growth. The normal value is 91° with an acceptable range of ±7.

Thirdly, the nasolabial angle is formed by the upper lip anterior and collumela at subnasale. The normal range is 85°-105°. In women this angle is bigger. Increased values are also typical in retroclined maxillary anteriors and decreased results in proclined maxillary anteriors or prognathic maxilla.

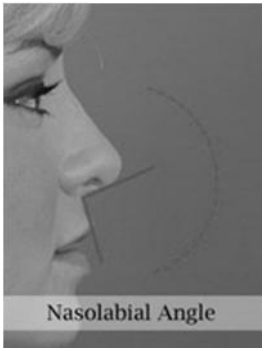


Figure 4 Nasolabial angle [2]

Fourthly, the nasion forms the apex of the nasofrontal angle formed by intersection of two lines, a tangent to glabella (G-Na) and the other tangent to pronasale (Pn-Na).

Fifthly, the mentolabial angle is formed by the lower lip anterior and menton.

Last but not least the ratio between upper and lower face is also measured. This measurement is important for patients with open bite, deep bite, or surgical cases where the upper and lower face proportions change after the orthodontic treatment.

All of the above mentioned angles and distances have a degree of variability. This means that in case of measuring one face multiple times the results will not be the same, but in some degree this difference in results is normal.

Table 1 degree of variability in measured distances and angles

Distances & angles measured	**Degree of variability**
Lower lip to e-plane	±1.93
Upper lip to e-plane	±1.50
Nasolabial angle	±6.00
Nasofrontal angle	±2.00
Maxilla/mandible ratio	±0.04
Mentolabial angle	

Results

After multiple measurements on the same face, done with the above mentioned method by one examiner the results of the measurements are the following.

Table 2 results of measurements of the same face by Anatomage program

	1	2	3	4	5
Lower lip to e-plane	1.69	1.09	0.97	1.22	1.41
Upper lip to e-plane	-2.04	-3.29	-3.54	-2.42	-1.85
Nasolabial angle	114.15	120.16	116.01	116.55	116.24
Nasofrontal angle	147.66	147.77	142.69	145.46	146.49
Max./mand. R	0.59	0.54	0.51	0.54	0.49
Mentolabial angle	119.62	142.95	122.05	127.72	123.99

Discussion

As it results from the outcome of the measurements, this method of measurement facial structures is a reliable method. As in all digital measuring systems Anatomage too has a degree of variability in the results which does not exceed the normal range. Soft tissue analysis prior orthodontic treatment is an important tool any orthodontist should use.

3D facial scan analysis is an easy procedure which gives the doctor a diffrerent, more precise perspective of the human tissues (hard and soft tissues) and makes the study of each case much more easy. It takes less time than studying a cephalometric x-ray, the patient doesn't have to unergo radiation for the measurements and all the files are stored in a computer which makes this procedure also environmental friendly.

References:

1. Zecca, Piero Antonio et al. "Correlation Assessment between Three-Dimensional Facial Soft Tissue Scan and Lateral Cephalometric Radiography in Orthodontic Diagnosis." International Journal of Dentistry 2016 (2016): 1473918

2. Frank Spear. Evaluating Facial Esthetics: The Esthetic Plane , 2017, www.speareducation.com/spear-review/2013/08/evaluating-facial-esthetics-the-esthetic-plane
3. Anu E. Kaipainen, Kevin R. Sieber, Rania M. Nada, Christos Katsaros et al. Regional facial asymmetries and attractiveness of the face. European Journal of Orthodontics, 2016, 38(6)
4. Predko-Engel, M.Kaminek, K. Langova, P.Kowalski, P.S. Fudalej. Relability of Cervical Vertebrae Maturation (CMV) method. Bratislava Medical Journal, 2015, 116(4), 222-226

15. Evaluation of airway in pre- and postoperative phase in patients with sleep apnoe

Georgia Fountoulaki
(Dentistry,6th. year)

Supervisor: MUDr. Andrej Thurzo, PhD, MPH, MHA
Department of orthodontics, Bratislava

Introduction

Airway disorders are mainly caused due to malocclusions, hereditary airway morphological and dimensional variations. Obstruction of the airway is caused due to the posterior position of hard and soft oral tissues and the result is sleep apnea. Surgical treatment is indicated mostly in severe cases where the symptoms prevail contributing in breathing difficulties. Symptoms of sleep apnea are daytime sleepiness or fatigue, dry sore throat upon awakening, headaches in the beginning of the day, impairment in intellectual level such as trouble concentrating, irritability or incapability to remember properly. Furthermore, symptoms in childhood may vary from bedwetting, oral breathing, excessive sweating at night, and movement of the ribcage inwards with inhaling to learning and behavioral disorders. Those kinds of disorders affect elementary school performance, cognitive ability as long as interest, therefore signs are misinterpreted and true disorder of sleep apnea masquerades1. Major problem is decreased oxygen level circulating in cavity over constrictive point without facilitating oxygen to pass in respiratory tract as long as the interrupted breathing itself. Both factors lead into stress mode of metabolism resulting further in hypertension, heart disease and cognitive disabilities such as memory impairment, mood instability as long as incapability to perform on social skills and even daily routine2. Existing problem was the measurement of the airway obstruction. There was no existing method for taking impression of the airway so diagnosis of sleep apnea was achieved by patients' history, polysomnography and physical examinations3. Other methods were cephalometry, rhino endoscopy and tomography. Airway measuring technique is of vital need and is based on already existing medical methods such as cone beam computed tomography4.

Materials and methods

Cone beam computed tomography is widely used in the field of dentistry and in orthodontics to obtain three-dimensional (3D) images of patients[5]. The malocclusion is evaluated as divergences on the x-y-z planes of space which are coronal, sagittal and axial. In the past doctors were able to see that there was an existing obstruction in the airways some millimeters or centimeters but the precise determination of the airway volume was unfavorable. The obsolete 2D lateral cephalographs, posterior-anterior cephalographs and panoramic radiographs opened their way to 3D imaging overcoming low resolution, imaging errors and superimposition of structures allowing calculation of the cross sectional areas of the airway. The tool that contributed in solving evaluation problems is the software Invivo 5 Anatomage. It is a highly expensive program where module 3D analysis is made by mouse-clicking points on patient's CBCT. It is an extremely developed 3D cephalometric markup with combination of analytic system and high precision using automatic ways that recognize the surface cephalometric points of the patient. There are standard points that are used by the program

but also other points can be customized. Necessary for comprehending Invivo 5 Anatomage is specific knowledge of the material such as precise handling and specific orders provision. The volume measurement which is the biggest request here is achieved by clicking of 4-5 points across the length of airway as seen in the software. Right click provides the command of the final result which is the volume of the air that is trapped or that can pass through the airway[6].

Results

Patient case No.1 is a 17year old male with multiple fractures of maxilla and mandible in young age which led into pathologic and totally abnormal development of both jaws. As a result airway was extremely narrowed by a value of 2mm available. Anatomy of airway and soft tissues were not favorable to healthy breathing. His condition was severe and total obstruction was expected in short time. Orthodontic treatment was necessary in combination to surgery. Using software Invivo 5 Anatomage reference points and results were easy to be emphasized and difference between pre and postoperative phase was a theme of major importance. Opening CBCT scan via Anatomage and following the procedure of measurement of airway the color differences that appear make airway visible and well read.

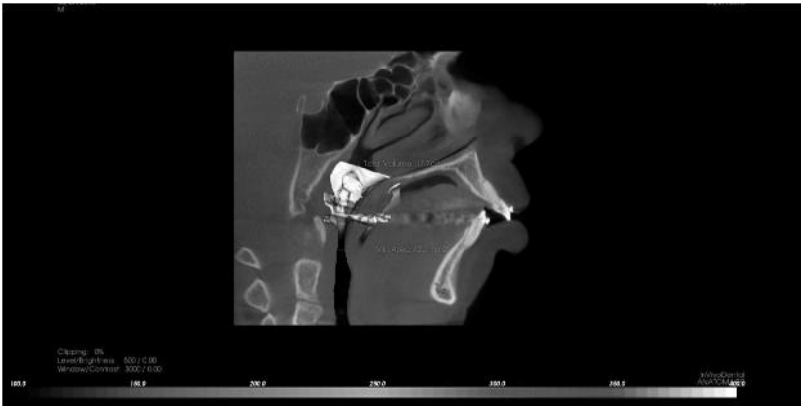


Figure 1: Evaluation of the airway preoperatively using Anatomage.

Color indication provides information about the level of obstruction. Below the level of occlusal plane projection the airway constriction was 2mm and seen in red color. The volume of the air in the minimal area was 42,1 mm^2 and total volume of 17,7cc. All measurements are done by Invivo 5 Anatomage and the first point was the opening of airway. Surgery was urgent due to severity of the progress of sleep apnea. He experienced fatigue, during day somnia, insomnia, difficulties in focusing and lack of general mental awareness. The surgery that the patient underwent was clockwise rotation of maxilla and anticlockwise BSO which stands for bilateral sagittal osteotomy in combination of mandibular distraction[7]. After the surgery patient was swollen submandibulary but the results were obvious.

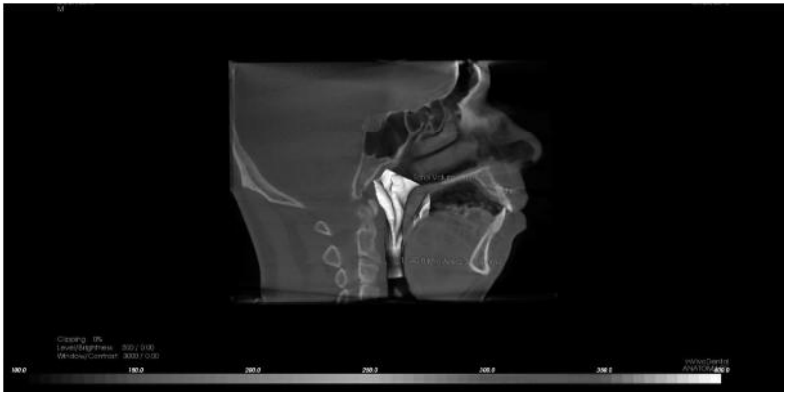


Figure 2: Evaluation of the airway postoperatively using Anatomage

After the treatment airway volume has a value of 341,5mm^2 bluish to white color which is above normal values. The most constricted point was 11,4mm and the airway volume was 40,7cc. The postoperative change was at a value of 299,4mm^2. Symptoms of sleep apnea have almost faded away and patient is able to sleep again well. The following figure shows us the comparison between preoperative and postoperative CBCT scan. Preoperatively the narrowest airway point was 2mm a value impossible to live with because it is almost complete obstruction compared to postoperatively CBCT scan where the narrowest point is sufficient for proper breathing.

Visible comparison of the two CT scans before operation and after treatment.

Figure 3: Comparison of pre and postoperative CT scan airway measurements

Patient No.1 is about to undergo more surgeries in order to improve the external features. Unfortunately, the airway obstruction has no totally subsided and repeated obstructions will occur in the future due to aging and tissue retraction.

Discussion

Airways measurement was impossible till the innovation of the program of Anatomage which gave doctors the free tool by which everything would be easier. A single full scanning of the patient's head, in combination with certain software manipulations allow us to recreate orthodontic planes and focus on the desired ones in order to achieve a proper understanding, diagnosis and treatment according to several perspectives. Superimposition inherent in older plain film studies have given their place to modern landmarks localization by the use of Cone Beam CT. The software allows the preview of all head imaging in several anatomical planes but foremost it allows the 3D reconstruction of the head by creating new iconic orthodontic models and virtual imaging and maximum intensity projections. 3D has entered our lives in the most dominant way and in the following years the development and evolution will be higher.

Acknowledgements

All CBCT scans are property of Dr. Andrej Thurzo without whom nothing would be possible. Measurements were made at Printevňa LFUK, Sasinkova 4.

References:

1. Friedman, M. Sleep Apnea and Snoring: Surgical and Non-Surgical Therapy. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier;2009
2. Joan McCormick, Obstructive and Central Sleep Apnea (Otolaryngology Research Advances) Chapter 2: Approach To The Snoring Patient, L.Sacchetti P. Mangiardi.,Medical Center, Chicago Illinois,2012: 35-47
3. Laura Mitchell: Introduction to Orthodontics: Chapter 20: Adult orthodontics,S. J. Littlewood. British Dental Journal, June 2013.
4. De Vos W, Casselman J, Swennen GRJ. Cone-beam computerized tomography (CBCT) imaging of the oral and maxillofacial region: a systematic review of the literature. Int J Oral Maxillofacial Surgery 2009 Jun ;38(6):609-625
5. Hilgers ML, Scarfec WC, Scheetz JP, Farman AG. Accuracy of linear temporomandibular joint measurements with cone beam computed tomography and digital cephalometric radiography. Am J Orthodontics Dentofacial Orthopaedics 2005;128:803-811
6. Orthodontics: Basic Aspects and Clinical Considerations: Chapter 8: Three-Dimensional Imaging and Software Advances in Orthodontics Ahmed Ghoneima, Eman Allam, Katherine Kula and L.Jack Windsor.
7. Caloss R, Atkins K, Stella JP (2007) Three-dimensional imaging for virtual assessment and treatment simulation in othognathic surgery. Oral Maxilofacial Surgery Clinic North Am 19:287-309

16. Populačné vyhodnocovanie proporcií tváre prostredníctvom 3D skenov

Bronislava Lenčuchová
(zubné lekárstvo, 5. ročník)

Školiteľ: MUDr. Andrej Thurzo, PhD., MPH, MHA
Oddelenie čeľustnej ortopédie, Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LF UK a OÚSA

Úvod

Skúmanie proporcií tváre má bohatú históriu, počínajúc v renesancii, kedy sa umelci snažili priblížiť takzv. dokonalej proporcii: Zlatému rezu. V dnešnej dobe sa mu venuje pozornosť hneď v niekoľkých medicínskych odvetviach (plastická chirurgia, estetická medicína, stomatológia, maxilofaciálna chirurgia, čeľustná ortopédia atď.) Vychádza z kefalometrie, čo je proces merania polohy a vzťahov kefalometrických bodov na hlave človeka. Tieto sú pevne stanovené dohodou. Najčastejšie sú to metricky relevantné štruktúry určujúce referenčné línie a ich vzájomné uhly. Rozlišujú sa body na tvrdých aj mäkkých tkanivách. Samotná analýza si najprv vyžaduje lokalizáciu kefalometrických bodov na konkrétnej hlave subjektu. Spôsob stanovenia polohy kefalometrických bodov prešiel vývojom od kontaktných nástrojov cez teleröntgenologické snímky až po najnovšiu analýzu 3D modelu tváre (1). Po lokálizácii sa vypočítajú vzájomné vzdialenosti bodov, priebeh a prieniky rovín, veľkosti referenčných uhlov. Namerané hodnoty sú porovnané s populačným štandardom. Tento je pre každú vekovú či etnickú skupinu špecifický. Cieľom tejto práce bolo stanoviť priemerné hodnoty šiestich vybraných kefalometrických veličín mäkkých tkanív v skupine pozorovaných subjektov.

Materiál a metodika

Pozorovaných bolo 21 dobrovoľníkov vo veku 19-29 rokov, ktorí nepodstúpili čeľustno-ortopedickú, chirurgickú, ani žiadnu inú intervenčnú terapiu v tvárovej oblasti. Na Ústave simulačného a virtuálneho medicínskeho vzdelávania Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave boli zhotovené trojdimenzionálne snímky nasledovným spôsobom: Subjekt bol posediačky, pozerajúc rovno pred seba odfotený štyrmi fotoaparátmi Canon EOS 1000D, ktoré sú párovo umiestnené na účelnom, 60cm širokom stojane a tvoria stereofotogrametrický tvárový skener. Tento takto snímal subjekt z obidvoch strán v uhle 30°, resp. z poloprofilu, čo je situácia, z akej je človek v bežnom živote pozorovaný najčastejšie. Vlasy a oblečenie by nemali prekrývať žiadne relevantné štruktúry (vlasy by mali byť za ušami, subjekt by nemal mať na sebe napr. šál). V záujme správneho zachytenia submandibulárnej oblasti je vhodné, aby subjekt mal zdvihnutú bradu.

Snímky vytvoril a spracoval softvér DI3D Capture. Zo získaných snímok bol zhotovený jeden trojrozmerný model, ktorý sa vyexportoval do formátu .obj pomocou DI3D View. 3D model bol analyzovaný THURZO SOFT protokolom kefalometrickej analýzy v programe Invivo5 od firmy Anatomage Medical. Bodovanie vykonávala vyšetrujúca osoba. Polohu vyznačených bodov a ich vzťahy program udal tabuľkou a grafom znázorňujúcim odchýlku od už stanovenej normy pre kaukazskú rasu poskytnutou softvérom Invivo5. Skúmaných bolo 6 konkrétnych veličín: Lower Lip to E-Plane, Upper Lip to E-Plane, nazolabiálny uhol, nazofrontálny uhol, pomer výšky maxillárnej a mandibulárnej výšky dolnej tretiny tváre a mentolabiálny uhol.

Lower Lip to E-Plane predstavuje vzdialenosť dolnej pery od estetickej línie podľa Rickettsa (spojnica špičky nosa a najnižšieho bodu brady - menton). Upper Lip to E-Plane vyjadruje vzdialenosť hornej pery od vyššie spomínanej roviny. Tieto reprezentujú relatívnu polohu pier, pričom dolná pera by mala byť priemerne 2mm za estetickou rovinou, horná pera o trochu dorzálnejšie.

Nazolabiálny uhol určujú body columella-subnasale-labialis superior, nazofrontálny uhol je definovaný bodmi glabella-nasion-dorsum nasi a mentolabiálny uhol je daný prostredníctvom bodov labiale inferius-supramentale-pogonion. Nazolabiálny a mentolabiálny uhol vyjadrujú vzájomný vzťah pier, nosa a brady. Nazofrontálny uhol predstavuje priestorový vzťah hornej a strednej tretiny tváre v rámci profilu.

Maxillárna výška dolnej tretiny tváre je vzdialenosť medzi subnasale a stomion superius, mandibulárna výška dolnej tretiny tváre je vzdialenosť medzi stomion inferius a menton. Pomer maxillárnej a mandibulárnej výšky podáva informáciu o proporcionalite dolnej tretiny tváre.

Namerané hodnoty sa preniesli do softvéru Microsoft Excel, kde boli spriemerované a vyhodnotené formou grafu.

Výsledky

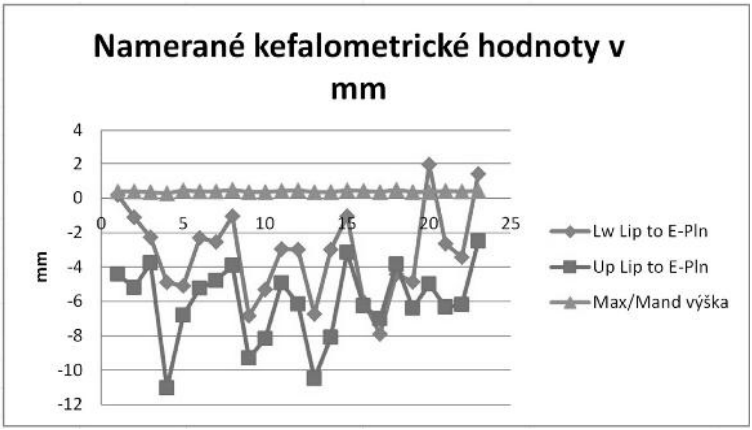
Len v jednom zo šiestich pozorovaných veličín boli proporcie pozorovaných subjektov v rámci populačnej normy: v pomere maxillárnej a mandibulárnej výšky dolnej tretiny tváre.

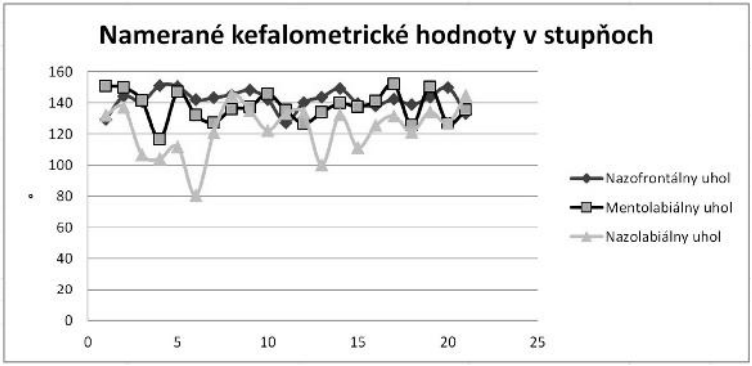
Tab. č. 1: Výsledky meraní pozorovaných parametrov

	Lw Lip to E-Pln	Up Lip to E-Pln	Max/Mand výška	Nazofrontálny uhol	Mentolabiálny uhol	Nazolabiálny uhol
1	0,19	-4,41	0,39	129,09	150,72	132,08
2	-1,12	-5,19	0,4	144,2	149,63	136,87
3	-2,28	-3,77	0,37	140,6	141,41	106,59
4	-4,88	-11,04	0,3	150,99	116,55	103,97
5	-5,1	-6,82	0,44	150,36	146,82	111,61
6	-2,32	-5,25	0,39	142,04	132,06	80,51
7	-2,55	-4,8	0,39	143,17	127,16	120,95
8	-1,05	-3,91	0,48	145,13	135,82	145,13
9	-6,85	-9,3	0,34	148,02	137,16	135,15
10	-5,32	-8,15	0,36	142,07	145,78	122,22
11	-2,94	-4,93	0,41	127,13	135,04	132,96
12	-3	-6,14	0,45	140,09	126,55	133,47
13	-6,74	-10,49	0,34	143,54	133,72	99,98
14	-2,99	-8,1	0,36	149,06	139,63	132,18
15	-1,04	-3,15	0,45	139,54	137,33	111,1
16	-6,03	-6,27	0,41	138,05	141,1	125,37
17	-7,88	-7,01	0,37	142,1	151,95	131,41
18	-4,42	-3,85	0,48	138,83	125,39	121,08
19	-4,85	-6,4	0,37	143,5	150,02	134,11
20	1,96	-4,98	0,35	149,8	126,69	126,81
21	-2,63	-6,31	0,43	132,93	135,27	144,76
Priemer	-3,420952381	-6,203333333	0,394285714	141,9161905	137,4190476	123,2528571
Norma	1,4±2mm	-2,5±1,5mm	0,42±0,04mm	136°±2	104°±8	99°±8

V skupinách Lw Lip to E-Pln, Up Lip to E-Pln, mentolabiálnom uhle, nasofrontálnom a nasolabiálnom uhle sa hodnoty od stanovenej normy odlišovali. U každého subjektu je v týchto hodnotách pozorovateľná vzájomná korelácia.

Najväčšie rozdiely hodnôt v rámci parametra boli pozorované v nazolabiálnom uhle, najmenšie v Max/Mand výške.





Grafy č. 1 a 2: Vzájomná závislosť nameraných hodnôt

Diskusia

Výrazná odlišnosť nameraných hodnôt od použitých referenčných hodnôt je pozoruhodná.

Zvolené veličiny spolu bezprostredne súvisia - všetky referujú o profile jedinca; Lw Lip to E-Pln, Up Lip to E-Pln, mento- a nasolabiálny uhol o polohe pier vzhľadom na okolité štruktúry v rámci profilu, najmä na nos a bradu (Rickettsova estetická línia). Vypovedajú o konkavite alebo konvexite ústneho profilu jedinca (2,3). Podľa použitej stanovenej normy pre kaukazskú rasu je hodnota Lw Lip to E-Pln 1,4±2mm, resp. dolná pera by sa mala nachádzať zhruba na estetickej línii (tangente nosa a brady), zatiaľ čo horná pera, o ktorej informuje Up Lip to E-Pln = -2,5±1,5mm, by mala prebiehať za touto rovinou.

Názory autorov sa tu v otázke používanej normy rozchádzajú, napríklad Kamínek a Bachratý(2,3) udávajú hodnotu Lw Lip To E-Pln = -2 ± 2mm a priemernú vzdialenosť hornej pery od estetickej línie o málo väčšiu (dorzálnejšie). Weber (4) zase udáva pre Lw Lip to E-Pln hodnotu 0 – 2mm, pre Up Lip to E-Pln = -1 - -4mm. Prirodzene rozdiel spôsobuje aj pozorovaná vzorka populácie, ktorá je značne variabilná i v rámci kaukazskej rasy.

Mentolabiálny uhol súvisí s negatívnou hodnotou Lw Lip to E-Pln, jeho vysoká hodnota je zapríčinená dorzálnym postavením dolnej pery oproti soft pogonionu. Vysoká hodnota nasolabiálneho uhla referuje o dorzálnom postavení hornej pery oproti nosu jedinca. Veľký nasofrontálny uhol je zase podmienený prítomnosťou výrazného nosa.

Tieto zistenia vypovedajú o vysokom výskyte vpadnutého profilu (retrofacies) v pozorovanej skupine (2,3,5). Túto tvorili najmä študenti zubného a všeobecného lekárstva vo vekovom rozpätí 19-29 rokov.

Mnoho štúdií sa zaoberalo vzťahom tvárových proporcií (6,7,8,9,10,11), ktoré sú vnímané ako estetické (7,8,9), dokonca dôveryhodne pôsobiace (10). Zaujímavosťou ale zostáva fakt, že hoci tvárové proporcie považované za najatraktívnejšie sú tie vykazujúce priemerné hodnoty (11), zároveň týmito proporciami disponuje len minimálne percento populácie.

Záverom teda možno konštatovať, že vnímanie ideálnych proporcií ako krásnych do určitej miery určuje aj ich jedinečnosť.

Zoznam použitej literatúry:

1. THURZO, A., et al. Digital and manual cephalometric analysis. Bratislavske lekarske listy, 2009, 111.2: 97-100.
2. KAMÍNEK, Milan et al. Ortodoncie. 1. vyd. Praha: Galén, 2014.
3. BACHRATÝ, Anton; BACHRATÁ, Ľudmila. Čeľustná ortopédia. Bratislava : Univerzita Komenského Bratislava, 1999.
4. WEBER, Thomas et al. Memorix zubního lékařství. 2. vyd. Praha : Grada, 2012.
5. PROFFIT, William; FIELDS, Henry W.; SARVER, David M. Contemporary Orthodontics. 4. vyd. St. Louis : Mosby Elsevier Health Sciences, 2007.
6. FERNÁNDEZ-RIVEIRO, Paula, et al. Angular photogrammetric analysis of the soft tissue facial profile. The European Journal of Orthodontics, 2003, 25.4: 393-399.
7. MILUTINOVIC, Jovana; ZELIC, Ksenija; NEDELJKOVIC, Nenad. Evaluation of facial beauty using anthropometric proportions. The Scientific World Journal, 2014, 2014.
8. GAUTAM, G.; SHASHIKALAKUMARI, V.; GARG, Garima. Facial attractiveness influenced by lower face vertical proportions and mandibular prominence.Orthodontic Waves, 2013, 72.1: 30-35.
9. FAN, Jintu, et al. Prediction of facial attractiveness from facial proportions.Pattern Recognition, 2012, 45.6: 2326-2334.
10. KLEISNER, Karel, et al. Trustworthy-looking face meets brown eyes. PLoS One, 2013, 8.1: e53285..
11. LANGLOIS, Judith H.; ROGGMAN, Lori A. Attractive faces are only average. Psychological science, 1990, 1.2: 115-121.

17. Ľudský papilomavírus v etiopatogenéze orofaryngeálneho karcinómu

Tomáš Kovačič
(všeobecné lekárstvo, 5. ročník)

Školiteľ: MUDr. Patrik Štefanička, PhD.
Klinika otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNB

Úvod

Orofaryngový karcinóm asociovaný s ľudským papilomavírusom je celosvetovo na vzostupe. Za posledné polstoročie stúplo zastúpenie HPV pozitívnych orofaryngových skvamocelulárnych karcinómov (Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma - OPSCC) v Európe a USA z pôvodných 20% na 70% u mužov pod 50 rokov veku, pričom klesá výskyt non-HPV-asociovaných karcinómov s klesajúcim trendom fajčenia (1). Infekcia začína vstupom vírusu na bazálnu vrstvu skvamocelulárneho epitelu orofaryngu. Po integrácii genómu vírusu do bunky dochádza vplyvom vírusových onkoproteínov E6 a E7 k dysregulácii bunkového cyklu, k narušeniu reparácie DNA a nedochádza k apoptóze v prípade ťažkého poškodenia DNA hostiteľskej bunky (2). Orofaryngeálne SCC asociované s HPV sa prezentujú spravidla nízkym T štádiom, s malým až okultným primárnym nádorom. Mávajú v čase diagnózy pokročilejší N nález, často ako prvý klinický príznak. HPV asociované nádory vychádzajú z lymfoepitelového tkaniva, vyznačujú sa nediferencovanou, bazaloidnou alebo cystickou štruktúrou, s fokálnou alebo neprítomnou keratinizáciou. V súčasnosti je najdostupnejšou metódou testovania integrovanej HPV infekcie imunohistochemické vyšetrenie p16 proteínu, ako náhradného biomarkera vírusovej aktivity.

Cieľom predkladanej práce ŠVOČ je podať obraz o výskyte novodiagnostikovaných HPV pozitívnych orofaryngových karcinómov na Klinike otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNB za roky 2013 - 2016. Práca sa pokúša priblížiť súvislosť vírusovej etiológie karcinómov orofaryngu vo vzťahu k veku, pohlaviu a klinickým parametrom.

Materiál a metodika

Retrospektívne som analyzoval súbor pacientov s diagnózou karcinómu orofaryngu liečených na Klinike otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UN v Bratislave od 1.1.2013 do 31.12.2016. Údaje o pacientoch som získaval zo zdravotných záznamov pacientov a z nemocničného informačného systému. Kritériom na zaradenie do súboru bol histologicky potvrdený skvamocelulárný karcinóm orofaryngu s podoblasťami s diagnózami podľa MKCH C01, C05, C09, C10. Súčasne som vyhodnocoval výsledok imunohistochemického vyšetrenia p16 onkoproteínu. Podľa tohto náhradného biomarkera som pacientov s p16 pozitívnym nálezom hodnotil ako HPV pozitívnych a s p16 negatívnym nálezom ako HPV negatívnych. Vo väčšine prípadov je pozitivita p16 vyjadrená difúznou nukleárnou a cytoplazmatickou p16 imunoreaktivitou. Analyzoval som výskyt karcinómu orofaryngu v danom období, lokalizáciu, T a N nález, vo vzťahu k integrovanej HPV infekcii. Porovnával som vek, pohlavie u HPV pozitívnych a HPV negatívnych pacientov s OPSCC. Hodnotil som indikovanú primárnu liečebnú modalitu, výsledky celkového prežívania podľa záznamov o úmrtí alebo podľa posledného kontaktu s pacientom.

Klinické štádium tumoru sa určuje podľa TNM klasifikácie, štádiá T1 a T2 s negatívnym uzlinovým nálezom (N0) predstavujú včasné štádium, pokročilé štádium je podmienené pozitívnym uzlinovým nálezom (N+), alebo rozsahom primárneho tumoru T3 a T4.

Výsledky

Súbor predstavoval 175 pacientov s karcinómom orofaryngu, z toho 129 (74%) pacientov s dostupným imunohistochemickým vyšetrením p16 proteínu. 52 (40%) pacientov bolo pozitívnych, 77 (60%) negatívnych. Počet liečených HPV + a HPV- pacientov s karcinómom orofaryngu v jednotlivých rokoch je uvedený v grafe 1.

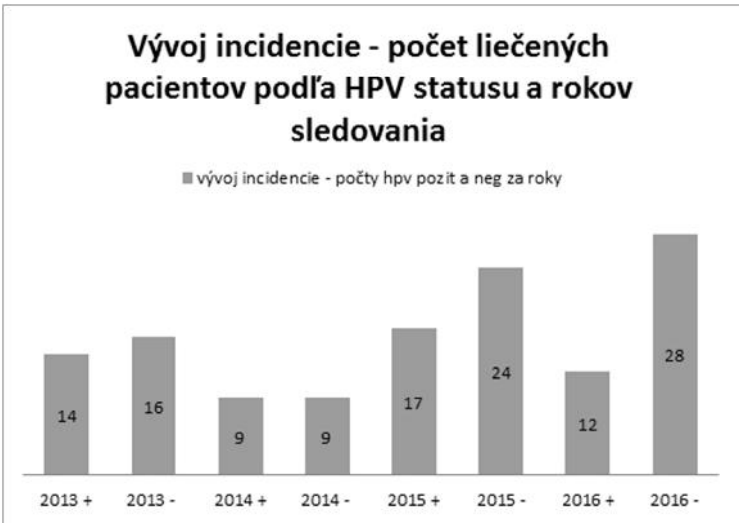
V súbore HPV pozitívnych pacientov sa nachádzalo 45 (86,5%) mužov a 7 (13,5%) žien, v súbore HPV negatívnych 63 (81,8%) mužov a 14 (18,2%) žien. Zastúpenie pohlaví v súboroch je uvedené v grafe 2.

Priemerný vek v čase stanovenia diagnózy bol 61,5 roka u p16 pozitívnych pacientov, u p16 negatívnych 59 rokov, medián veku bol 60 rokov u obidvoch skupín.

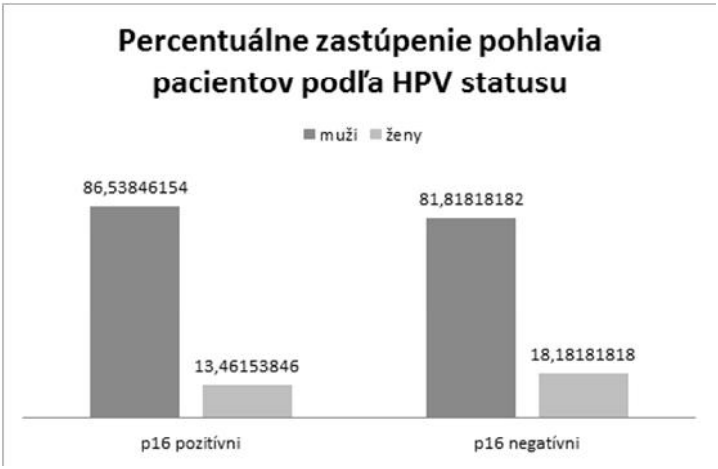
Lokalizácia primárnych nádorov p16+ bola v 32% v koreni jazyka, 54% v podnebnej mandli, v bočnej stene orofaryngu v 14%, v ostatných lokalizáciách 4%. Nádory p16 negatívne vychádzali z koreňa jazyka v 23,3%, z podnebnej mandle v 24,7%, z bočnej steny orofaryngu v 28,6% a z ostatných lokalizácií (podnebie, zadná stena) v 23,4% prípadov.

Klinické štádium bolo prevažne pokročilé u HPV+ aj HPV- pacientov s karcinómom orofaryngu, predstavovalo 90,4% p16 pozitívnych prípadov a 87% p16 negatívnych. Včasné klinické štádium malo 7,7% p16+ nádorov a 11,7% p16-. Včasný T nález (T1/T2) malo 52% p16 pozitívnych a 39% p16 negatívnych pacientov, pokročilý (T3/T4 nález) malo 48% p16 pozitívnych a 61% p16 negatívnych pacientov. Pozitívny uzlinový nález v čase diagnózy malo 84,6% p16 pozitívnych pacientov a 72,7% p16 negatívnych. N0/N1 nález malo z p16 pozitívnych pacientov 32%, N2/N3 nález bol u 67%. P16 negatívni pacienti boli v štádiu N0/N1 v 42,8% prípadov, v N2/N3 v 57,2%. V obidvoch skupinách bolo najčastejšie štádium N2, u 57,7% p16 pozitívnych a 48% p16 negatívnych pacientov.

Priemerná dĺžka sledovania po liečbe bola 14 mesiacov. Primárna chirurgická terapia bola častejšia u p16+ pacientov, absolvovalo ju 38% pacientov, 28,6% p16 negatívnych pacientov. Celkové prežívanie od stanovenia diagnózy po úmrtie alebo stratu kontaktu s pacientom bolo po 24 mesiacoch u HPV pozitívnych pacientov 26,9%, u HPV negatívnych 19,5%. U p16 negatívnych pacientov bolo 61% fajčiarov, u p16 pozitívnych bolo 34,6% fajčiarov.



Graf č.1: Počet liečených HPV + a HPV- pacientov s karcinómom orofaryngu v jednotlivých rokoch



Graf č.2: Zastúpenie pohlaví v súboroch

Diskusia

Zastúpenie p16 pozitívnych pacientov s karcinómom orofaryngu bolo variabilné medzi vekovými skupinami. HPV pozitívni pacienti boli najčastejšie diagnostikovaní v šiestom decéniu, HPV negatívni pacienti v siedmom decéniu. Absolútny počet má náznak zvyšujúcej sa incidencie, ale kolísajúca incidencia p16 pozitivity nesleduje časovo stúpajúci trend ako je opisovaný v literatúre, čo sa dá prisudzovať relatívne malému rozsahu posudzovaného súboru. Z rovnakého dôvodu sa zhodujú mediány veku porovnávaných skupín (60 rokov). Pacienti s p16 pozitívnym karcinómom orofaryngu predstavujú 40% tohto súboru, čo koreluje s výskytom HPV pozitívnych karcinómov orofaryngu

v Európe (3). Typický pacient s HPV pozitívnym karcinómom orofaryngu je muž v strednom veku, nefajčiar (4). V súbore p16+ pacientov podľa očakávania dominovali muži, nefajčiari (66,6%) vo vekovom rozmädzí 50-59 rokov. Pacienti s HPV+ karcinómami bývajú oproti HPV- častejšie vyššieho dosiahnutého vzdelania s vyšším socioekonomickým statusom. Štúdie uvádzajú koreláciu HPV+ OPSCC s rizikovým sexuálnym správaním a abúzom marihuany, naopak nevykazujú kauzalitu s nikotinizmom ani abúzom alkoholu. Úloha fajčenia v etiológii konvenčných non-HPV asociovaných OPSCC, ako aj nižšie zastúpenie fajčiarov medzi HPV pozitívnymi pacientmi potvrdzovali trend opisovaný v literatúre (5,6).

V predkladanej práci sa potvrdzuje včasnejší staging primárneho tumoru u HPV asociovaných karcinómov, ako aj pokročilejší uzlinový nález. Klinické štádium pacientov s p16 pozitívym karcinómom orofaryngu bolo vyššie od p16 negatívnych, čo odzrkadľuje pokročilejší uzlinový nález. HPV status je do budúcnosti vhodným kritériom k voľbe terapie, nakoľko sa pri HPV+ OSCC jedná o špecifický nádor s odlišným správaním oproti konvenčným HPV neasociovaným nádorom. HPV pozitívni pacienti lepšie odpovedajú na liečbu, s nižším rizikom rekurencie alebo smrti, hoci incidencia sa zvyšuje (6,7). Výsledky prežívania pacientov v našom súbore vzhľadom na rozsah súboru a retrospektívnu povahu analýzy možno hodnotiť len veľmi limitovane. Práca sa pokúša poukázať na význam HPV statusu ako najvýznamnejšieho prognostického faktora pri karcinóme orofaryngu a systematizované zavádzanie jeho vyšetrenia na pracovisku ako na progresívny prístup, ktorý môže v budúcnosti umožniť cielenejšiu a efektívnejšiu terapiu týchto pacientov podľa HPV stavu.

Zoznam použitej literatúry:

1. Štefanička P. Ľudským papilomavírusom asociovaný karcinóm orofaryngu. Onkológia (Bratisl.), 2015; roč. 10(3): 189-192
2. Sathish N, Wang X, Yuan Y. Human Papillomavirus (HPV)associated Oral Cancers and Treatment Strategies. J Dent Res. 2014 Jul;93(7 Suppl):29S-36S.
3. Gillison ML, Castellsaqué X, Chaturvedi A. Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. Int J Cancer. 2014;134(3):497-507.
4. Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. Oral Oncol. 2014 May;50(5):380-6
5. Dahlstrom K, Bell D, Hanby D. Socioeconomic characteristics of patients with oropharyngeal carcinoma according to tumor HPV status, patient smoking status, and sexual behavior. Oral Oncol. 2015 September ; 51(9): 832–838.
6. Kwon HJ, Brasch HD, Benison S. Changing prevalence and treatment outcomes of patients with p16 human papillomavirus related oropharyngeal squamous cell carcinoma in New Zealand. Br J Oral Maxillofac Surg. 2016 Oct;54(8):898-903.
7. Jeffrey F. Krane (2013) Role of Cytology in the Diagnosis and Management of HPV-Associated Head and Neck Carcinoma. Acta Cytologica 2013;57:117–12

18. Gingival recession and gum graft surgery: a review

Xanthopoulou Vithleem
(Dentistry, 6th. year)

Supervisor: MUDr. Amir Amiry Manesh, PhD
Department of periodontology LF UK, Bratislava

Introduction

The aim of this article is to represent a review about gingival recession, etiology, diagnosis and possibilities of treatment procedures. Gum recession is the process in which the destruction of the marginal gingiva and the epithelial attachment will result in root exposure. It manifests in people with very good oral hygiene or bad oral hygiene and increases with age. In many cases, patients can not easily understand that have gingival recession but they just see their tooth to be longer or feel dental hypersensitivity. [1] It is important to mention that exist two different types of gum tissue biotypes. According to Ochsenbien and Ross (1969) the thick gum tissue biotype occurs and the thin one. Thin biotypes are more prone to undergo recession in comparison to thick biotype. [2] Currently accepted procedures for root coverage include coronally advanced flap, free mucosal graft, sub epithelial connective tissue graft, guided tissue regeneration and acellular dermal matrix. [3] The predictability of coverage of the exposed root surface is influenced by many factors, including whether the gingival margin is apical to the mucogingival junction (MGJ), whether there is loss of interalveolar septa or interdental gingiva, and the extent of tooth malposition. [4]

Materials and methods

By review of the literature about patients diagnosed with gingival recession, treatment plan for choosing of the best therapeutic method is revealed. *The first step for the selection of treatment of gingival recession* is to find the etiologic factors. According to different bibliographic sources one theory is that the inadequate zone of attached gingiva will facilitate the subgingival plaque formation and would favor the attachment loss and the soft tissue recession. Another theory is that possible factors could be uneven atrophy of the gingival margin, direct trauma such as accidents or biting of fingernails, vigorous toothbrushing, gingival lesions associated with plaque induced inflammation, subgingival restorations, maloclusion, malposition of teeth, destructive periodontal disease not only on facial aspects but also in proximal sites of the tooth and thin or absent alveolar bone, so called bone dehiscence along with delicate gingival tissue. [3], [5] Marginal tissue recession is associated also with orthodontic treatment. A slight gingival recession and loss of attachment can be found in incisors frontal proclination and in lateral movements of posterior teeth. The contributing factors in that case are also the poor oral hygiene, thin gingival and bone biotype and the presence of gingival inflammation, that together with wrong orthodontic treatment force can result in marginal tissue recession. [6] *Then the periodontologist must differentiate the type of the recession.* According to *Miller*, recession defects are classified in class I, II where there is 100% root coverage. In class III where there is partial root coverage and in class IV the root coverage cannot be predicted even if in some cases is successful. [7]

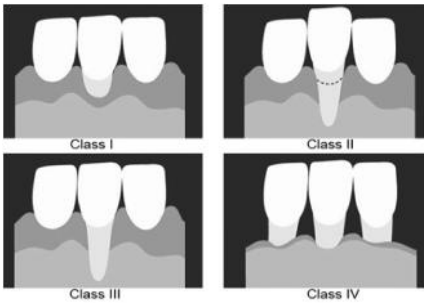


Figure 1: Miller's Classification

CLASSIFICATION OF MARGINAL TISSUE RECESSION.*	
CLASSIFICATION	**CRITERIA**
Class I	Marginal tissue recession that does not extend to the mucogingival junction
Class II	Marginal tissue recession that extends to or beyond the mucogingival junction, with no periodontal attachment loss (bone or soft tissue) in the interdental area
Class III	Marginal tissue recession that extends to or beyond the mucogingival junction, with periodontal attachment loss in the interdental area or malpositioning of teeth
Class IV	Marginal tissue recession that extends to or beyond the mucogingival junction, with severe bone or soft-tissue loss in the interdental area and/or severe malpositioning of teeth
* Source: Miller.[40]	

Table 1: classification according to extend of marginal tissue recession and involvement or not of the bone

Another classification according to Sullivan and Atkins (1968) is concentrated on recession involving mandibular incisor teeth using the following descriptive terms to classify recession into four groups: narrow, wide, shallow and deep.

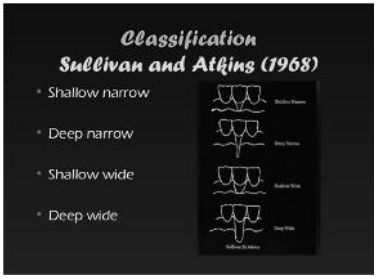
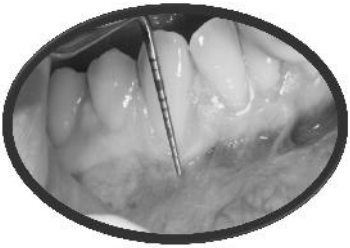


Figure 2: The classification of gingival recession according to Sullivan and Atkins divides the recession of mandibular incisors in four groups: narrow, wide, shallow and deep.

Picture 1a: etiologic factor is orthodontic treatment

Picture1b: Gingival classification Miller I and Sullivan and Atkins shallow wide



Before selection of the proper treatment, the periodontologist must identify if will do the gum graft surgery or not. He/she has to perform the surgery if present areas of progressive recession or areas in which orthodontic procedures may produce lingually tipping of tooth, resulting in buccal displacement of the roots. Furthermore a gum graft surgery should be achieved when the recession causes esthetic discomfort to the patient, when the root exposure causes tooth sensitivity and also while occur areas which need restorative treatment and the margins of the restorations are going to be placed subgingivally, because the biologic width of connective tissue attachment can be impinged. The percentage of bone loss and the amount of tissue in donor area should be evaluated as well. If all these requirements are met to do the surgery, then the parameter of smoking should be examined, because it slows down the healing process of the wound. So if the patient is a smoker, must limit it at least 1 week before the operation and 1 month after the surgical procedure. Prior to any surgery, the 1st hygiene phase should take part. Patient's education is of greatest importance in order for the treatment plan to become successful. Moreover, the exposed root surface has to be treated, in order to be "cleaned" by the bacterial biofilms that is covered. Also if filling is present in the root, it would be better to be removed before root coverage, without meaning that it's presence prohibits a successful outcome of the surgery. Both restored and non-restored sites show significant increase in probing depth. [9]

Data collected from medical records show that the best predictability (95%) for complete root coverage in Miller's class I, II is the sub-epithelial connective tissue graft. In the following tables there is a summary of all gum graft surgery options and tissue grafts that can be utilized. [3]

PEDICLE FLAP PROCEDURE

Advanced flap procedures	**Rotational flap procedures**
Coronally repositioned flap	Laterally sliding flap
Semilunar coronally repositioned flap	Double papilla procedure
Laterally moved, coronally advanced flap	Oblique rotated flap
Recombined with a barrier pedicle soft tissue procedures membrane	
Pedicle soft tissue procedures combined with enamel matrix proteins	

FREE SOFT TISSUE GRAFT PROCEDURES

Connective tissue graft	**Epithelialized soft tissue graft**
Connective tissue graft combined with a coronally advanced flap	
The envelope technique	
The tunnel technique	

TYPES OF SOFT TSSUE GRAFTS

Autograft	Allograft
Gingival graft	Acellular dermal matrix
Connective tissue graft	

Indisputably, the survival of a graft is determined by the maintenance of rich blood supply. The blood is supplied by the adjacent and subject bone and the vessels of the surrounding mucosa. It is really important the presence of significant bone volume and soft tissue. In thick gingiva there are more intact vessels for the nutrition of the graft, so if it's thickness is more than 1mm there are more chances for a successful surgery. Fixing of graft is essential between the adjacent bone, root and graft, and must be achieved, otherwise the graft will be necrotized. [10]

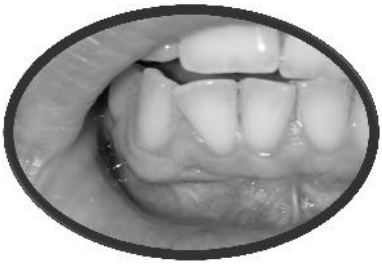
Picture 2a and 2b: free gingival graft

Picture 3: Large and thick CTG after palatal harvesting

Results

Aim is to achieve root coverage for long term treatment for a functional and esthetical reason. It can be reached by correct surgical technique and also by avoiding long term shrinkage of the graft. Finally the outcome of the gum graft surgery procedures can be determined by different factors such as good oral hygiene and post operative homecare which is mandatory, so the patient must have periodical recalls in the dental office for proper plaque control, correct tooth brushing technique on the operation site. Soft diet until the first recall is suggested. In order to reach this result the covering of root should be done up to the level of cemento-enamel junction with probing depth less than 2mm and no bleeding on probing. Influence of the outcome is the flap tension as well. The higher the flap tension, the lower the recession depth. [8]

Picture 4a: recall after 14 days



Picture 4b: recall after 1 year

Picture 4c: follow up after 1.5 year

Conclusion

Careful examination of oral and periodontal tissues should be done from the dentists in order to find the exact causes that lead to gingival recession, to select the proper type of treatment, to estimate the preferred outcome of the surgery and have a successful result. Patients cooperation and of course post operative care have great importance as well. Success is also in close relation with patient education. The technique that has shown the best predictability (95%) of root coverage in Millers class I & II classification is the sub- epithelial connective tissue graft. So the stability, function and esthetic of the graft is achieved as it was presented in the pictures above.

References:

1. Niklaus P. Lang and Jan Lindhe. 2015. Clinical Periodontology and Implant Syrgery. 6th edition. Wiley Blackwell 2015. 556

2. Gorman WJ. Prevalence and etiology of gingival recession. J Periodontol. 1967;38:316–22.
3. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA (2012). Carranza's clinical periodontology (11th ed.). St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders. pp. 111–126.
4. Zeinab Rezaei Esfahrood, DDS, MS n Mahdi Kadkhodazadeh, DDS, MS n Mohammad Reza Talebi Ardakani, DDS, MS, Gingival biotype: a review, General Dentistry, July 2013
5. Kassab MM, Cohen RE. The etiology and prevalence of gingival recession. J Am Dent Assoc.2003;134:220–5.
6. JOSS-VASSALLI I, GREBENSTEIN C, TOPOUZELIS N, SCULEAN A, KATSAROS C. Orthodontic therapy and gingival recession: a systematic review. Orthod Craniofac Res. 2010; 13: 127-141.
7. Miller PD., Jr A classification of marginal tissue recession. Int J Periodont Rest Dent. 1985;5:8–13.
8. LEANDRO CHAMBRONE AND DIMITRIS N. TATAKIS: Periodontal Soft Tissue Root Coverage Procedures: A Systematic Review From the AAP Regeneration Workshop
9. Langer B, Langer L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. J Periodontol. 1985;56(12):715-720.
10. Nitin Khuller. Coverage of gingival recession using tunnel connective tissue graft technique. Journal of Indian Society of Periodontology.

19. Determinujúce faktory výsledkov liečby u pacientov s lymfómovým ochorením v oblasti oka a očnice

Anna Marková
(všeobecné lekárstvo, 5. ročník)

Školiteľ: doc. MUDr. Mgr. Alena Furdová, PhD., MPH[1]
[1]Klinika oftalmológie LF UK a UN, Bratislava

Úvod

Lymfóm postihujúci oblasť očnice je zriedkavo sa vyskytujúcim ochorením, avšak v uplynulých rokoch so stúpajúcim výskytom. Najčastejším typom v danej lokalizácii je non-Hodgkinov lymfóm (NHL), ktorý sa delí na ďalšie podtypy indolentného alebo agresívneho charakteru. Spomeniem tie najčastejšie sa vyskytujúce lymfómy v opisovanej oblasti. K indolentným lymfómom patria MALT (mucosa associated lymphoid tissue) lymfóm, folikulový lymfóm (FL) a lymfoplazmocytový lymfóm (LPL). Medzi lymfómy agresívneho charakteru patria difúzny veľkobunkový B-lymfóm (DLBCL), lymfóm z plášťových buniek (mantle cell lymphoma – MCL) a Burkittov lymfóm (BL). (1,2,3)

Orbitálny lymfóm môže byť z hľadiska výskytu primárny (pri jeho prvotnom vzniku v oblasti očnice) a sekundárny (keď je asociovaný s metastatickou diseminácíou nádoru z extraorbitálneho ložiska). Na základe spomenutých skutočností sa pristupuje aj k liečbe lymfómu. Dôležitým určujúcim faktorom voľby terapie je stupeň diferencovanosti nádoru, rozsah nádorového ochorenia a klinický staging podľa AJCC z roku 2009 (American Joint Committee on Cancer, Chicago, Illinois), tzv. TNM klasifikácia. (2,4)

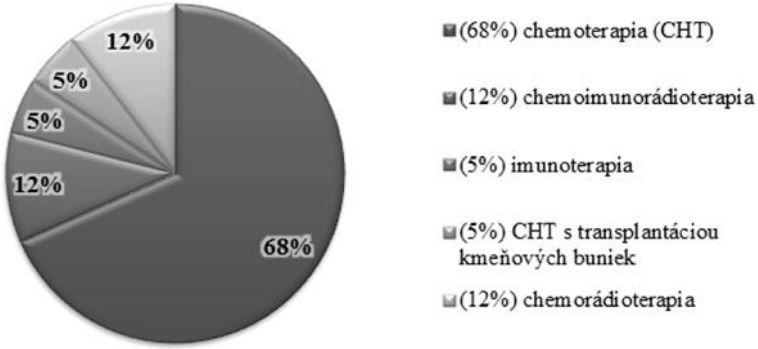
Materiál a metodika

Analyzovali sme 31 pacientov evidovaných na Klinike oftalmológie LF UK a UN Bratislava za obdobie od 1. januára 2009 do 31. decembra 2016 s diagnostikovaným non-Hodgkinovým lymfómom lokalizovaným v okolí očnice. Pozorovanie bolo zamerané na charakteristiky ochorenia determinujúce indikáciu terapie a následné výsledky a prípadné nežiaduce účinky, ktoré priniesla liečba.

Výsledky

V sledovanom súbore pacientov bolo potvrdené ochorenie na základe histopatologického vyšetrenia z biopsie, resp. excízie z oblasti spojovky alebo po orbitotómii.

Systémová terapia bola zahájená u pacientov v II. a vyššom štádiu ochorenia podľa Ann Arbor systému a z celkového počtu liečených tvorila 61,3% (**Graf č.1**). Samotná lokálna terapia v zmysle chirurgickej intervencie, aplikácie mitomycínu-C, kortikosteroidných kvapiek do spojovkového vaku bola vykonaná v 38,7% pacientov. Po chirurgickom zákroku do spojovky pacienti popisovali ťah v oblasti sutúr. Po orbitotómii sa vyskytovala pseudoptóza horného viečka a diplopia. Zraková ostrosť u pacientov pred operáciou (excízia, orbitotómia) a po operácii pri prvej kontrole bola nezmenená. Nežiaduce účinky rádioterapie akútneho charakteru v zmysle postradiačnej keratopatie a iritácie bulbu boli v 1 prípade. Recidívy sa vyskytli u 5 pacientov, čo predstavuje 16% pozorovaných (**Tab.č.1**).



Graf č.1: Zastúpenie použitých foriem systémovej terapie u pacientov v %

Tab. č.1:

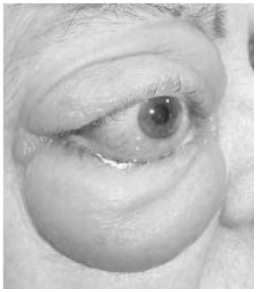
pacient	vznik recidívy (počet rokov od remisie)	typ lymfómu	lokalizácia	vzhľadom k pôvodnej lokalizácii
1.	4	**MALT**	spojovka	rovnaká
2.	4	MCL	orbita	rovnaká
3.	4	FL	orbita	druhé oko
4.	3	**MALT**	spojovka	rovnaká + druhé oko
5.	2	MCL	orbita	rovnaká

MALT - mucosa associated lymphoid tissue lymfóm, FL - folikulový lymfóm, MCL - lymfóm z plášťových buniek (mantle cell lymphoma)

Za sledované obdobie zomrelo 5 pacientov v dôsledku závažnej generalizácie lymfómového ochorenia. Zo súboru pacientov sa u dvoch pozorovala iná malignita ako lymfóm (**Tab.č.2**).

Tab. č.2:

iná malignita	čas diagnostiky vzhľadom k diagnóze lymfómu
tumor kaudy pankreasu	súčasne
karcinóm pažeráka a žalúdka	po 1,5 roku



Obr. č.1: MALT lymfóm s plazmocytovou diferenciáciou infiltrujúci tkanivo očnice (foto– A. Furdová)

Diskusia

Pre ochorenia patriace k malígnym lymfómom je charakteristická mnohotvárnosť biologického priebehu a odlišnosť terapeutických postupov u každej nozologickej jednotky. Liečba lymfómu v oblasti orbity pozostáva zo štyroch hlavných modalít, ktorými sú chirurgická intervencia, rádioterapia, chemoterapia a imunoterapia. Voľba liečebnej metódy závisí od gradingu a stagingu ochorenia. (2,5)

Chirurgická excízia lymfómu v okolí očnice je terapeutickou no zároveň i diagnostickou metódou. Chirurgická intervencia v monoterapii sa neukazuje ako postačujúca, často totiž dochádza k obávaným relapsom ochorenia. Podkladom pre relaps je pozostatok nádorových buniek v mieste excízie. V dôsledku toho sa napr. pri lymfóme spojovky aplikuje do miesta excízie mitomycin-C vo forme kvapiek, ktorý predstavuje chemoterapeutikum s antiproliferatívnym účinkom na rýchlo sa deliace zostatkové nádorové bunky, čím znižuje riziko možného relapsu ochorenia. Pri orbitálnej lokalizácii lymfómu sa pristupuje k adjuvantnej rádioterapii s kuratívnym potenciálom po prvotnej chirurgickej intervencii. (2,7)

Rádioterapia je pre lokalizovanosť väčšiny lymfómov okolia orbity bežnou a preferovanou liečebnou metódou. V radiačnom poli musí byť zahrnutá celá orbita, bez ohľadu na to do akej miery je orbita infiltrovaná. Tento postup znižuje riziko relapsu v miestach bez infiltrácie. Kuratívna dávka je pre low-grade tumor 25 – 35 Gy a pre high-grade tumor 30 – 40 Gy. Pri použití vyšších dávok ako 35 Gy vznikajú závažné komplikácie ako napr. katarakta. Jej vzniku je možné predísť tienením šošovky, avšak iba vtedy, keď tumor nie je v predpokladanom tieni. (7)

Chemoterapia je zvyčajne rezervovaná pre nádory v II. a vyššom štádiu, najmä však pre III. a IV. štádium. Zahájenie chemoterapie je možné po chirurgickom zákroku, v kombinácii s rádioterapiou alebo vo forme monoterapie. Chemoterapia aplikovaná samostatne alebo v kombinácii s rádioterapiou predstavuje liečebný štandard pre lymfómy lokalizované extraorbitálne. Primárnou liečebnou modalitou pre agresívne extranodálne lymfómy je systémová terapia. Indukčná agresívna chemoterapia sledovaná transplantáciou krvotvorných kmeňových buniek bola preskúmaná u pacientov s MCL. Autológna alebo alogénna transplantácia kmeňových buniek môže viesť u agresívnejších lymfómov k lepšiemu dosiahnutiu remisie. (2,6,7)

Imunoterapia je využívaná u nádorov exprimujúcich určitý antigén, proti ktorému je pri terapii namierená protilátka. Liečba zahŕňa použitie látky rituximab, ktorá je využívaná u CD20 pozitívnych tumorov akým je MALT lymfóm. Hlavným nedostatkom rituximabu v monoterapii sú časté relapsy.

Na to, aby sa predišlo relapsom, bol pridaný podporný liečebný režim, ktorý bol naplánovaný na 2 roky a podával sa každé 2 mesiace. (2)

Podobné postupy v terapii boli použité aj u našich pacientov, pričom bola dosiahnutá parciálna až celková remisia v závislosti od histopatologického typu nádoru. Následne sa stav pacientov stabilizoval do bezpríznakového charakteru, avšak v 5 prípadoch došlo k relapsu.

Naviac v zahraničných štúdiách z rokov 2011 a 2013 bola dokázaná efektivita intraléziónálne aplikovanej injekcie rituximabu v liečbe primárneho lymfómu v okolí orbity. Použiteľnosť danej terapie vyzerá sľubne u lézie lokalizovanej vpredu, naopak u lézii v mediálnej a zadnej časti orbity už nie je efektivita rovnaká, nakoľko dochádzalo k inkompletnej alebo k žiadnej odpovedi. Liečba intraorbitálnou injekciou rituximabu je perspektívnou aj vďaka minimalizácii systémových nežiaducich účinkov formou podania a použitím nízkej dávky narozdiel od vysokých dávok podávaných intravenózne. (8,9)

Lymfóm je liečiteľné ochorenie, nie všetky jeho typy sú však úplne vyliečiteľné. Pacienti môžu s ochorením prežiť vďaka terapii mnoho rokov aj bez ťažkostí. Príkladom z nášho súboru môže byť pacient, u ktorého v závere roka 2016 uplynulo 14 rokov od prvého zdiagnostikovnia lymfómu.

Zoznam použitej literatúry:

1. Marková A., Determinanty rozvoja extranodulárnej formy non-Hodgkinovho lymfómu v oblasti očnice, Zborník vedeckých prác 2016, s. 22 – 26.
2. Sharma T., Kamath M. M., Diagnosis and Management of Orbital Lymphoma (American Academy of Ophthalmology) EyeNet Magazine [online]. June 2015, www.aao.org
3. Smita Menon-Mehta, MBBS, DO, FRCS: Ocular Lymphoma, [online]. 2015, www.medscape.com
4. Coupland S. E., White V. A., Rootman J. et al., A TNM-Based Clinical Staging System of Ocular Adnexal Lymphomas, [online], 2009, www.archivesofpathology.org
5. Kafková A., Folikulový lymfóm, Via practica [online], 2008, www.solen.sk
6. Karcioglu Zeynel A., Orbital Tumors: Diagnosis and Treatment, Springer, 516 s.
7. Yahalom J., Illidge T., Specht L. et al., Modern Radiation Therapy for Extranodal Lymphomas: Field and Dose Guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group. [online]. Jan 2015,
8. G. Savino, R. Battendieri, L. Balia, et. al., Evaluation of intraorbital injection of rituximab for treatment of primary ocular adnexal lymphoma: A pilot study, [online]. June 2011
9. Savino, G., Battendieri, R., Gari, M. et al., Long-term outcomes of primary ocular adnexal lymphoma treatment with intraorbital rituximab injections (J Cancer Res Clin Oncol) [online]. April 2013,

10. 20. Príprava hybridného hydrogélu pre bioprinting orálneho epitelu a kože

Filip Peťko
(všeobecné lekárstvo, 1.ročník)

Spoluautori: Tomáš Havran[1], Johan Filo[1], Maroš Čižmár[1]
Školiteľ: MUDr. Andrej Thurzo, PhD, MPH, MHA[1]
[1] Ústav simulačného a virtuálneho medicínskeho vzdelávania

Úvod

Momentálne nie je špecifická definícia termínu "Bioprinting". Vedci vyskúmali množstvo prístupov zachovať žijúce bunky s biomateriálmi v podobnom nažívaní priameho vytvárania 3D štruktúr. Definícia bioprintingu bola prvýkrát navrhnutá na Univerzite v Manchestri s názvom: University of Manchester Institute of Science and Technology v Septembri v roku 2004. Bioprinting je definovaný ako: Použitie materiálových procesov prenosu pre vzorovanie a montáž biologicky relevantných materiálov - molekuly, bunky, tkanivá a biodegradačné biomateriály so stanovenou organizáciou s cieľom dosiahnuť jednu alebo viac biologických funkcií. Toto je otvorená definícia, kde bioprinting je označovaný ako sled techník namiesto jednotného prístupu (1).

V súčastnosti je možné previesť biologický materiál na substrát s konečným vyhotovením 3D štruktúry. Môže to byť považované ako bioprintingová technológia. Hlavným cieľom Bioprintingu je zhotoviť žijúce a funkčné tkanivá a orgány, ktoré budú transplantované do ľudského tela. V. Mironov uviedol ďalší termín: "Orgánové tlačenie" a možná definícia je: " Počítačom podporované 3D tkanivové inžinierstvo žijúcich orgánov založených na základe spontánnych uložení buniek a hydrogélov s princípom vlastnej montáže (2).

Hydrogély sa používajú pri mnohých biomedicínskych aplikáciach, vrátane popáleninových krytí, bunkovej enkapsulácie alebo aplikáciách podávania liekov. Nedávno sa hydrogély stali atraktívnymi v oblasti regeneratívnej medicíny, kde sa ako biokompatibilné matrice používajú pri regenerácii a oprave veľkého množstva rôznych tkanív (3).

Pri regenerácii orálneho epitelu a kože pomocou bioprintingu sa najčastejšie používa kolagénový hydrogél ako matrica, do ktorej sa vkladajú fibroblasty a keratinocity. Kolagén je hlavný štrukturálny proteín extracelulárneho priestoru v rôznych spojivových tkanivách živočíšnych tiel (4).

Predpokladom na to, aby sme mohli začať výskum s použitím bioprintera INKREDIBLE na regeneráciu orálneho epitelu a kože, je mať vhodný hydrogél ako matricu. Na to aby náš výskum priniesol nové výsledky sme sa rozhodli vytvoriť vlastný protokol na výrobu takéhoto hydrogélu, ktorého základ vychádza z publikovaného protokolu na stránke www.ibidi.com (5). Vďaka podobnosti medzi orálnym epitelom a kožou môže byť vývoj obidvoch týchto tkanív prevedený podľa rovnakého protokolu s využitím rovnakého hydrogélu. (6)

Materiál a metodika

Pri výrobe hydrogélu sme použili kyselinu octovú, kyselinu sírovú, destilovanú vodu, hydroxid sodný, fenolftaleín, Chitosan, Chondrotín a Alginát. Na začiatku sme urobili päť roztokov kyseliny octovej, do ktorej sme primiešavali kolagén. Ani jedno stanovené množstvo sa nerozpustilo v dôsledku slabej

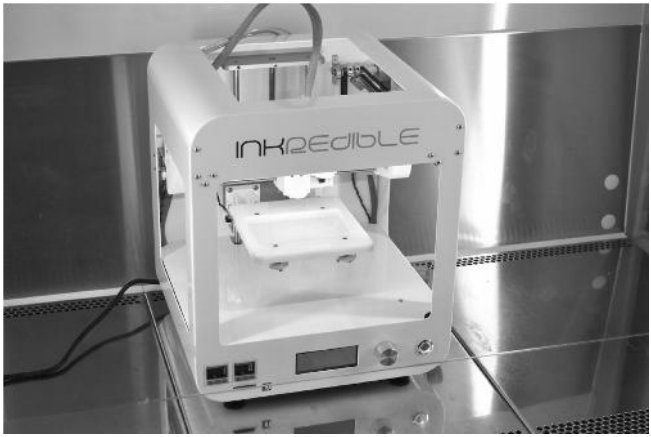
kyseliny. Začali sme pracovať s kyselinou sírovou, čo sme využili pri rozpúšťaní kolagénu. Spočiatku sme použili hydrolizovaný práškový kolagén. Avšak, žiadne množstvo sa nám nerozpustilo. Pri opakovanom postupe sme neskôr použili živočíšny kolagén. Vytvorený roztok sme vložili do chladničky. Po 24 hodinách sme pozorovali výsledné rozpustené množstvo. V grafe je znázorenených päť pokusov, ktoré sme zrealizovali. Následne sme roztoky zneutralizovali hydroxidom sodným a primiešali fenolftaleín pre indikáciu pH. Za stáleho miešania zneutralizovaných roztokov pridáme Chitosan a Chondrotín. Po chvíli sme pridali chlorid vápenatý, ktorý zabezpečí crosslinking a samotnú kompatibilitu hydrogélu. Po rozpustení všetkých zložiek ako finálnu prísadu odmeriame 0.4g-0.8g Alginátu pre dobrú konzistenciu a biokompatibilitu. Roztoky sme nechali odstáť po dobu 24 hodín pri teplote 3 - 4°C. Následne sme celé množstvo podrobili centrifugácií a v skúmavke nám vznikli štyri rôzne množstvá hustoty daného roztoku. Horná vrstva, voda, gél a usadenina. Najdôležitejšia časť pre nás bol gél. Mal potrebnú konzistenciu, zloženie a formovateľnosť. Množstvo gélu, ktoré sme dostali, sme následne dôkladne uskladnili. Pri výrobe kolagénového hydrogélu sme zachovali určité zásady ovplyvňujúce výsledné zloženie a viskozitu hydrogélu.

1) Lepšie je riediť kyselinu roztokom hydroxidu s malým počtom molov (1-2M), pretože pri 4M a viac vznikajú zrazeniny kolagénu.

2) Alginát, ktorý sypeme do roztoku ako posledný, pridávame v malých množstvách (0.1g), až dovtedy, kým nedosiahneme naše vopred stanovené množstvo 0.4-0.8g

3) Alginát pridávame v časovom intervale každých 5 minút a v prípade, že by sa javil ako nerozpustný pri miešaní na magnetickom miešadle, treba zvyšné množstvo rozmiešať ručne alebo mixérom.

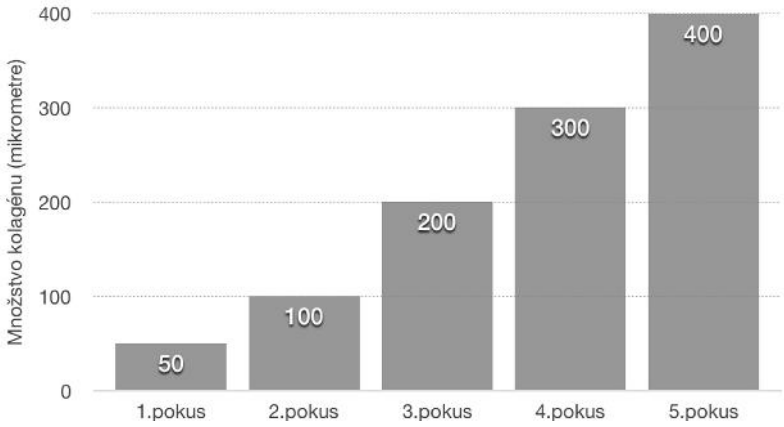
Na odskúšanie vyrobeného hydrogélu, či je možné ho použiť na samotnú tlač, sme použili bioprinter INKREDIBLE of firmy Cellink, ktorý pracuje na princípe pneumatickej mikroextrúzie. Ako softvérové rozhranie používa Repetier Host, ktorého nastavenie sme upravili podľa vlastností bioprintera a vygenerovali sme G-code na tlač jednoduchej kocky 5x5x5 mm. Do jednej z hláv tohto bioprintera sme vložili zásobník naplnený hygrogélom č.5. Pred samotnou tlačou je dôležité presne nakalibrovať zariadenie, zapojiť kompresor do inej siete a nastaviť tlak. Na tlač sme použili tlak 24 kPa. Kocku sme tlačili na petriho misku.



Obrázok 1: Cellink INKREDIBLE (7)

Výsledky

Pomocou kyseliny sírovej a hydroxidu sme namiešali roztoky s menším množstvo molov, pretože pri 4 a viac molovom roztoku sa kolagén zrazil. Najvyhovujúcejšie množstvo kolagénu bolo 0.5g/20ml roztoku. Po zneutralizovaní hydroxidom sodným sme pridali 0.1g chitosanu, 0.1g chondrotínu a 0.1g chloridu vápenatého. Pri podávaní Alginátu do roztoku za stáleho miešania, sme pridávali 0.1g každých päť minút, až kým sme nedosiahli naše požadované výsledné množstvo 0.5g/20ml. Pri rýchlom podávaní sme pozorovali hrudkovité štruktúry, ktoré sa javili ako nerozpustiteľné. Po vyrobení roztoku, sme ho centrifugovali 20 minút a uskladnili v chladničke po dobu 24 hodín. Vytvorený hydrogél sme skúšali experimentálne vytlačiť na biotlačiarni. V počítači sme si namodelovali kocku, ktorú sa nám podarilo vytlačiť. Držala svoj tvar, mala požadovanú konzistenciu a bola biokompatibilná, čo vyhovovalo naším požiadavkám.



Graf 1 Množstvo živočíšneho kolagénu (mikrometre) v roztokoch

Diskusia

V porovnaní so štúdiou Alginate-Collagen Fibril Composite Hydrogel, 2015 (8) zaoberajúcou sa výrobou hydrogélu, je tento hydrogél jedinečný svojou viskozitou. V štúdiách na jednej strane dosiahli požadovaný hydrogél so správnych chemickým zložením, ale nedosiahli pevnosť, ktorú požadovali za správnu. Začali sme pracovať s kyselinou octovou ako v spomínaných štúdiách, avšak prešli sme na kyselinu sírovú, pretože práve ona bola schopná rozpustiť živočíšny kolagén. Po pridaní kolagénu, chitosanu a chondrotínu do roztoku, sme síce dosiahli chemicky požadovanú zmes, avšak bez schopnosti udržať ju vo vyformovanom tvare. Druhý významný krok spočíval v pridaní alginátu, čo zabezpečilo premenovanie kolagénového hydrogélu na hybridný hydrogél, kedže pomer kolagénu a alginátu je približne 1:1. Alginát je polysacharid a v našom hydrogély zapezpečil určitú formu viskóznej vlastnosti a nespôsobil toxicitu materiálu. V dnešnej dobe je momentálne bežne dostupný kolagénový alebo hybridný hydrogél, avšak tieto namiešané hydrogély sú cenovo neporovnateľne

vyššie ako náš vyrobený hybridný hydrogél. Veľkou výhodou je aj dostupnosť. Výroba hybridného hydrogélu trvá približne šesť až sedem hodín. Pri objednaní namiešaného hydrogélu by sme čakali dlhé týždne, čím by sa časovo predlžovala doba vytlačenia buniek kože alebo orálneho epitelu.

Záver

Hydrogél používame na biotlač, ktorý v budúcnosti budeme simultánne tlačiť so živými bunkami. Vytvorili sme biokompatibilný, netoxický a štruktúrny hydrogél s požadovanou biodegradabilitou. Kolagénový hydrogél budeme používať ako prostredie pre bunky, kde neskôr budú proliferovať a migrovať. Momentálne pracujeme na rôznych projektoch ako je orálny epitel alebo koža, kde využívame spomínaný hydrogél či už v teoretických alebo praktických rovinách a naďalej zdokonaľujeme zloženie prostredníctvom aditív, ktoré pridávame do hydrogélu.

Zoznam použitej literatúry:

1. ATALA, Anthony. Essentials of 3D biofabrication and translation. Winston-Salem, NC, USA: Academic Press. 2015. 422 s.
2. CHUA, Chee Kai, YEONG, Wai Yee. Bioprinting Principles and Applications. Singapore: World Scientific. 2015. 269 s.
3. Murphy SV, Skardal A, Atala A. 2012. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. J Biomed Mater Res Part A 2012:00A:000–000.
4. Di Lullo, Gloria A.; Sweeney, Shawn M.; Körkkö, Jarmo; Ala-Kokko, Leena & San Antonio, James D. (2002). "Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen". J. Biol. Chem. 277 (6): 4223–4231.
5. Fabrication of Collagen I Gels. ibidi.com/search-results/?q=Fabrication%20of%20Collagen
6. Sasaki R, Yamato M, Takagi R, Ohki T, Matsumine H, Okano T, Ando T. 2012. Punch and spindle-shaped biopsies for collecting oral mucosal tissue for the fabrication of transplantable autologous epithelial cell sheets. J Biomed Mater Res Part A 2012:100A:2849–2854.
7. CELLINK. www.crunchbase.com/organization/cellink-2#/entity
8. BANIASADI Mahmour and MAJID Minary-Jolandan. Alginate-Collagen Fibril Composite Hydrogel. University of Texas at Dallas, USA. 2015. ISSN: 1996-1944.

21. Behavioral changes in chronic kidney disease in mice

Rafael Ján Sepp
(general medicine, 2nd year)

Supervisor: MUDr. Mgr. Július Hodosy, MPH, PhD.
Institute of molecular biomedicine, Medical faculty, Comenius university

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is defined as a progressive loss of kidney function over a period. Regarding pathological decrease in glomerular filtration rate, it is divided into five stages, marked G1-G5, with G1 being the mildest form of malfunction and G5 accounting for most severe stage, the latter also reffered to as end-stage renal disease. With the increasing number of elder people, the greater prevalence of CKD is seen.

Numerous studies in patients experiencing some stage of CKD showed connection between decreased renal function and some sort of cognitive decline, mainly in stage G4 and G5. Review article of *Etgen, T.* discussed major studies dealing with cognitive impairment and dementia association with renal insufficiency, stating CKD as a potential determinant of cognitive disorders in humans (1). However, these studies were associative and did not show causality between cognitive damage and CKD.

Experimental studies on mice proved relation between CKD and behavioral alterations. Different types of CKD induction were used. Motor and behavioral aspects were examined by *M.K. Mazumder et al.* where it has been shown that CKD mice in forced swim test

were significantly more immobile than control group (2). *B.H. Ali et al.* also investigated depression-like state in mice using forced swim test and tail suspension test, where CKD mice appeared more depressive than the control group (3). However, results measuring behavioral changes are still not convincing, therefore further studies are needed to shed light on the mechanism of how CKD influence behavior. Because of the results of human and animal studies, there are some indices pointing that cognitive impairment might be psychologically induced rather than a consequence of elevated uremic toxins. However, this theory was neither confirmed nor is well understood.

The aim of this study was to evaluate whether CKD in mice can alter chosen behavioral traits.

Materials and methods

Thirty white, CD-1 male adult mice (*Anlab, Prague, Czech Republic)* were used for experiment. The mice were kept in twelve hours light-twelve hours dark cycle. Every cage contained five mice. Access to food and water was ensured on ad libidum basis. Mice were randomly divided into two groups, the control (*ctrl)* and the adenine-induced CKD (*a-iCKD*) group. Each group consisted of fifteen animals.

Tap water was administered to the *ctrl* group. Adenine samples were prepared according to an established model described by (4). *A-i CKD* models were given adenine (*Adenine hydrochloride hydrate, ≥99 %, Sigma-Aldrich, USA*) dissolved in tap water, one dose being 100 ml/kg. Frequency of application for both group was every day for three weeks. Intraperitoneal injection was used for application of substances for each group.

Behavioral changes were investigated by the *open field (OF)* and the *elevated zero maze (EZM)* tests (5). Outputs were recorded and automatically analyzed by video tracking software *EthoVision XT v10 (Noldus, Netherlands).*

For *OF* test, plastic square-shaped maze with top wall absent was used. One side of square was 100 cm in length. Walls were 50 cm high. The area within the maze was virtually divided into center zone and periphery.

The *EZM* apparatus consisted of circular runway, with 50 cm in diameter and 5 cm arm width. It was divided in four equal parts, two of them being closed with walls, two of them being opened. Closed parts and open parts were located at the exact opposite poles of ring-like maze.

OF and *EZM* both served to determine locomotor activity and anxiety level. In *OF* test, locomotor activity was measured by the total distance moved and velocity. Time spent in the center zone serves as a marker of the anxiety level. The greater time spent in the center zone indicated lower anxiety level.

In *EZM* test, anxiety was determined by four features. *Latency time to first exit* directly correlated with anxiety level, i.e. more time it took a mouse to enter an open arm, the more anxiety-like behavior was assessed to the subject. *Number of open-arm exits* was analyzed, with greater number of exits accounting for less anxiety level. *Time spent on open arms* was evaluated as anxiety-level indicator, where longer time was regarded as smaller anxiety.

Retroorbital collection was used to obtain blood samples under general inhalation anesthesia by Isoflurane (6). Concentrations of creatinine and urea in plasma were measured by commercially available kits (*Arbor Assays, Ann Arbor, USA).*

For statistical analysis of acquired data, *GraphPad Software* was used. A *t-test* was used to evaluate behavioral changes represented by different values in locomotor activity and anxiety-level for each group. Data is presented as mean ± SEM. P<0.05 was considered to be significant.

Results

A-i CKD mice had proved to have significantly increased creatinine plasma level than *ctrl* group, therefore a model for induction CKD was effective.(7) Blood urea nitrogen was 3-fold higher in *a-i CKD* group than in the *ctrl* group.

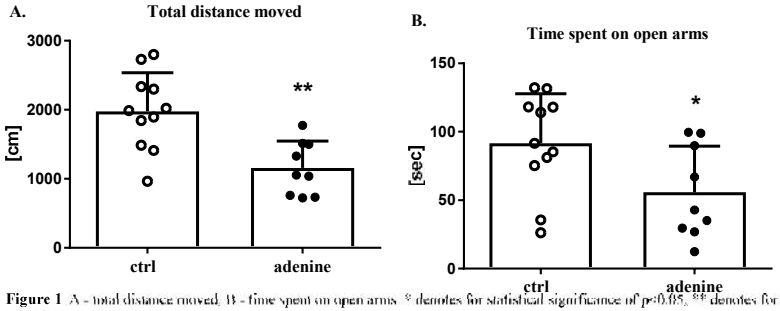


Figure 1 A - total distance moved. B - time spent on open arms. * denotes for statistical significance of p<0.05, ** denotes for statistical significance of p<0.01.

No statistically significant difference was shown in latency time to first exit between two groups. Reviewing number of exits to open arms, *a-i CKD* mice entered an open arm two-fold less than *ctrl* group (*p<0.01*). Time spent in open arms was decreased by 40% in *a-i CKD* group compared to the *ctrl* group (Fig.1B; $p<0.05$). *A-I CKD* group accounted for 1159±129.4 cm in total distance moved, which proved to be significantly higher when compared to the ctrl group (Fig.1A; *p<0.01*).

Discussion

In our experiment, the adenine induced CKD model was proved to be efficient. Additionally, the CKD mice appeared to be significantly less active in terms of locomotion. Also, more anxiety was seen in *a-I CKD* group than in the *ctrl* group as evaluated by both open field and the elevated zero maze. This is in contrast to study of *Tóthová et al.* The outputs of this study claimed that CKD is in relation with the behavioral changes in mice (8).

Indeed, this experiment showed certain limitations. First, more animals would be needed for higher statistical value of acquired data. It may also be stated that different approaches to testing methods in studies together with various analyzing programs can both influence the output of a certain study. To get better understanding on what can be further done to help patients suffering CKD, more studies are need to be carried out on humans (9).

In conclusion, according to our experiment the CKD should be considered while evaluating behavioral changes. However, there is still not enough evidence on exact mechanisms by which decreased renal function alters behavior and thus affect the patients quality of life.

References:

1. Etgen T: Kidney disease as a determinant of cognitive decline and dementia. Alzheimers Res Ther 2015; 7(1): 29.
2. Mazumder MK, Giri A, Kumar S, Borah A: A highly reproducible mice model of chronic kidney disease: Evidences of behavioural abnormalities and blood-brain barrier disruption. Life Sci 2016; 161: 27-36.
3. Ali BH, Ramkumar A, Madanagopal TT, Waly MI, Tageldin M, Al-Abri S, Fahim M, Yasin J, Nemmar A: Motor and behavioral changes in mice with cisplatin-induced acute renal failure. Physiol Res 2014; 63(1): 35-45.
4. Al Za'abi M, Al Busaidi M, Yasin J, Schupp N, Nemmar A, Ali BH: Development of a new model for the induction of chronic kidney disease via intraperitoneal adenine administration, and the effect of treatment with gum acacia thereon. Am J Transl Res 2015; 7(1): 28-38.
5. Bailey K, Crawley J, Anxiety-Related Behaviors in Mice, in Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, J. Buccafusco, Editor. 2009, CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, Florida, USA. p. 77-103.
6. Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. Lab Anim 1993; 27(1): 1-22.
7. Lopez-Giacoman S, Madero M: Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. World J Nephrol 2015; 4(1): 57-73.
8. Tothova L, Babickova J, Borbelyova V, Filova B, Sebekova K, Hodosy J: Chronic renal insufficiency does not induce behavioral and cognitive alteration in rats. Physiol Behav 2015; 138: 133-40.

9. Bracken MB: Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. J R Soc Med 2009; 102(3): 120-2.

22. Môže mať DNA z potravy vplyv na ľudský organizmus?

Ondrej Lengyel, Martina Karovičová
(všeobecné lekárstvo, 4. ročník, všeobecné lekárstvo, 3.ročník)
Spoluautori: Barbora Konečná[1], Peter Celec[1]

Školiteľ: Barbora Konečná[1]
[1]Ústav molekulárnej biomedicíny LFUK

Úvod

Do ľudského tela sa dostáva cudzorodá DNA viacerými spôsobmi ako napr. baktériami, inhalovaným peľom, ale najväčšia časť pochádza z potravy [1].Všeobecne sa predpokladá, že v gastrointestinálnom trakte je následne štiepená na nukleotidy a aminokyseliny. Nukleotidy su rozštiepené na nukleozidy a tie na jednotlivé dusíkaté bázy, kyselinu fosforečnú a pentózu. Avšak v roku 2013 Spisak a kol. popísali prechod celých neporušených génov extracelulárnej DNA z rastlinnej potravy (paradajky a iné) cez sliznicu čreva u pacientov s abnormálnym črevným vstrebávaním. Keďže chloroplasty obsahujú DNA, ktorá je cudzia pre ľudský organizmus, existuje predpoklad, že absorbovaná DNA môže pre ľudské telo pôsobiť prozápalovo. Podobne Mittra a kol. v roku 2015 dokázali, že cudzorodá DNA sa môže inkorporovať do DNA zdravých buniek a spúšťať v nich apoptotický proces, starnutie či malígnu transformáciu hostiteľskej bunky [2]. Cieľom tejto štúdie bolo pozorovať dynamiku DNA z chloroplastov špenátu v krvnej plazme a taktiež vplyv tejto DNA na celkovú koncentráciu extracelulárnej DNA (ecDNA) ako aj na aktivitu deoxyribonukleázy (DNázy). DNáza v plazme je enzým, ktorý rozkladá cirkulujúcu DNA[5].

Vzhľadom na to, že významnú časť DNA prijímame v surovej, tepelne neupravovanej strave [1], je tento poznatok obzvlášť dôležitý pre vegetariánov, vegánov a ľudí so zvýšeným príjmom takejto stravy ako aj pre ľudí so zápalovými ochoreniami črevnej sliznice, kedy je sliznica čreva priepustnejšia pre DNA v porovnaní s fyziologickým stavom. Na druhú stranu, zistenie, že cpDNA sa nevstrebáva z potravy do krvi nám pomôže lepšie sa orientovať v obávanom riziku geneticky modifikovaných (GMO) potravín. Ak by sa DNA z konvenčných rastlín vo forme potravy nevstrebávala do krvi, predpokladá sa, že sa nebude ani DNA z GMO rastlín.

Materiály a metodika

Tabuľka 1. Prehľad probandov podľa pohlavia a priemerných hodnôt veku, výšky, váhy a BMI.

Pohlavie	Muži 12; Ženy 10
Priemerný vek [roky]	22,5
Priemerná výška [cm]	175
Priemerná váha [kg]	70
Priemerný BMI	22,5

BMI = body mass index

Štúdie sa zúčastnilo 22 probandov pričom 24 hodín predtým vylúčili zo stravy ovocie a zeleninu. Charakteristiky probandov sú uvedené v Tabuľke 1. Krv bola odoberaná do skúmavky obsahujúcej

heparín za účelom získania plazmy. Po prvom odbere krvi v čase 0 všetci probandi vypili 3 dcl koktejlu, ktorý sa pripravil zmixovaním 2 ingrediencií: vody a špenátu v pomere 1000ml/200g, t.j. 60g špenátu na osobu. Na účel homogenizácie bol použitý mixér G21 perfect smoothie blender vitality s výkonom 1680W a 32000 ot/min. Následne sa u všetkých probandov realizoval druhý odber po jednej hodine od vypitia rovnakým spôsobom. Tretí odber bol u rôznych probandov realizovaný v rôznych časoch, a to buď po dvoch, troch, štyroch alebo piatich hodinách od vypitia špenátu. Všetky vzorky krvi boli centrifugované 10 minút na 2000g pre odstránenie krvných buniek a následne bol odobratý supernatant centrifugovaný na 16000g 10 min 4°C pre odstránenie apoptotických teliesok.

Izolácia ecDNA

EcDNA bola izolovaná zo 400µl ľudskej plazmy použitím QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko) podľa odporúčaného protokolu od výrobcu. DNA bola skladovaná v -20°C pred ďalšou analýzou.

Meranie ecDNA

Qubit Fluorometer a Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, LA, California, USA) bol použitý na meranie celkovej extracelulárnej DNA izolovanej z plazmy.

Meranie DNázovej aktivity

DNázová aktivita bola vo vzorkách plazmy meraná jednoduchou radiálnou enzýmovou difúznou (SPRED) metódou použitím 1% agarózového gélu obsahujúceho DNA v koncentrácii 5mg/ml. Do gélu sa tiež pridali roztoky TRIS-HCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, aby sa vytvorili vhodné podmienky pre aktivitu enzýmu. Z každej vzorky boli 3µl plazmy pipetované do pripraveného gélu, a následne počas noci inkubované na 37˚C v tme. Enzým DNázy I bol riedený pre vytvorenie kalibračnej krivky. Priemery kruhov boli merané ImageJ softvérom.

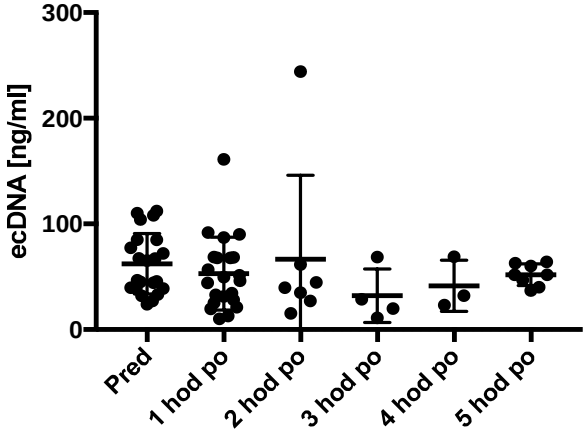
Kvantifikačná PCR amplifikácia rbcL fragmentu

Kvantifikačná PCR bola prevedená na stroji Mastercycler realplex 4 (Eppendorf, Hamburg, Nemecko) za použitia navrhnutého setu primérov *rbcL*-F3 a *rbcL*-R3 [4]. Celkový objem reakcie predstavoval 15ul, do ktorého bol pridaný SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA) a 3ul DNA extraktu. PCR podmienky boli nasledovné: 98˚C 3 min, 35 cyklov 98˚C 10 s, 57˚C 30 s a 72˚C 30s s konečným krokom extenzie.

Výsledky

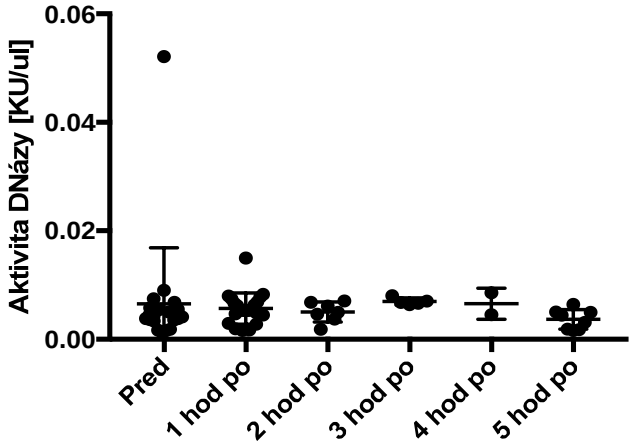
U probandov sa sledovala dynamika vstrebávania chloroplastovej DNA (cpDNA) z potravy do krvi, hodnoty celkovej ecDNA, ako aj dynamika aktivity DNázy v plazme.

Prítomnosť cpDNA v plazme nebola detekovaná v žiadnej vzorke nezávisle od času odberu. Ako “house-keeping” gén bol použitý β-globín, ktorý bol prítomný v každej vzorke. Priemerná hodnota hladiny ecDNA neukázala významné rozdiely medzi skupinou +0h, +1h a +2 ,3, 4, 5h (62,2 ng/ml vs. 53,0 ng/ml vs. 44,54 ng/ml; p=n.s.) (Obr.1).



Obr.1 Meranie extracelulárnej DNA v plazme. Hodnoty extracelulárnej DNA (ecDNA) sa nezmenili po vypití koktejlu v porovnaní s hodnotami pred vypitím koktejlu (p=n.s.).

Meranie aktivity DNázy v plazme neukázalo štatisticky významné rozdiely medzi odbermi u žiadneho probanda +0h, +1h a +2, 3, 4, 5h (0,0065 KU/ul vs. 0,0057 KU/ul vs. 0,0056 KU/ul) (Obr.2).



Obr.2 Meranie DNázovej aktivity v plazme. Hodnoty aktivity deoxyribonukleázy (DNázy) sa nezmenili po vypití koktejlu v porovnaní s hodnotami pred vypitím koktejlu. (p=n.s.)

Diskusia

Prítomnosť cpDNA nebola v plazme detekovaná v žiadnej vzorke. Nedá sa vylúčiť, že sa cpDNA vstrebáva, pretože najnižšie množstvo cpDNA, ktoré dokážeme detekovať pomocou PCR prístroja je cca 30 000 kopií cpDNA v jednom µl. Nižšie hodnoty v plazme nedokážeme zachytiť pomocou našej metodiky a prístroja. Vplyv na dynamiku vstrebávania mohol mať aj fakt, že probandi boli zdraví,

mladí ľudia, bez porúch trávenia, črevnej bariéry, funkcie exokrinného pankreasu či hepatálnej insuficiencie. Nepozorovali sme žiadne štatisticky významné rozdiely v hodnotách ecDNA v plazme pred a po vypití špenátového koktejlu, čo podporuje tvrdenie, že cpDNA sa nevstrebáva do cirkulácie v detekovateľnom množstve. DNA prijatá vo forme potravy bola štiepená DNázou z pankreatickej štavy, ako aj DNázou prítomnou v plazme. Avšak v našej štúdií sme nepozorovali žiadne zmeny v aktivite DNázy po vypití špenátu. Ak sa cpDNA vstrebáva do portálneho riečiska, mohla byť cestou vychytávaná a degradovaná v pečeni, kam prichádza väčšina absorbovaných živín. Črevná bariéra taktiež významne ovplyvňuje vstrebávanie DNA, pričom Spisak a kol. popísali zvýšené hladiny cudzorodej DNA v plazme u pacientov so zápalovým ochorením čreva alebo Kawasakiho chorobou.

Na základe našej štúdie môžeme konštatovať, že u zdravých ľudí sú obavy z nebezbečného vplyvu GMO potravín neopodstatnené. U zvierat bolo v štúdii z roku 2005 popísané vstrebávanie iba fragmentov génov, pričom nebol nájdený žiaden rozdiel medzi skupinou prasiat kŕmenou GMO sójou a konvenčnou kukuricou [3].

Zoznam použitej literatúry:

1. Spisák S, Solymosi N, Ittzés P, Bodor A, Kondor D, et al. (2013) Complete Genes May Pass from Food to Human Blood. PLoS ONE 8(7)
2. Mittra I, KhareNK, Raghuram GV, ChaubalR, Khambatti F, Gupta D, Gaikwad A, PrasannanP, Singh A, Iyer A, SinghA, UpadhyayP, Nair NK, Mishra PK and Dutt A 2015 Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. J. Biosci. 40 (91–111).
3. Mazza R1, Soave M, Morlacchini M, Piva G, Marocco A. Oct. 2005. Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. Transgenic Res.
4. Hitomi S. Kikkawa1. Kouichiro Tsuge1. Ritsuko Sugita1. 2016. Real-Time PCR Quantification of Chloroplast DNA Supports DNA Barcoding of Plant Species. Springer Science+Business Media New York 2016
5. Tamkovich SN1, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, Laktionov PP. 2006 Sep, Circulating DNA and DNase activity in human blood. Ann N Y Acad Sci. 1075:191-6.

23. Efekt ivabradínu na remodeláciu srdca a aorty pri zlyhaní srdca indukovanom izoprenalínom

Peter Stanko[1]
(všeobecné lekárstvo, 5. ročník)
Spoluautori: doc. MUDr. Michaela Adamcová, PhD.[2]; Mgr. Kristína Krajčírovičová[1]; Mgr. Silvia Aziriová, PhD.[1]; MUDr. Kristína Repová, PhD.[1]; MUDr. RNDr. Ľudovít Paulis, PhD.[1,3]

Školitelia: prof. MUDr. Fedor Šimko, CSc.[1,4]; MUDr. Tomáš Baka[1]
[1]Ústav patologickej fyziológie LF UK; [2]Ústav fyziológie, Lekárska fakulta v Hradci Králové, Karlova Univerzita, Česká Republika; [3]Ústav normálnej a patologickej fyziológie SAV; [4]III. Interná klinika LF UK a UN Bratislava

Úvod

Zlyhanie srdca je stav s vysokou prevalenciou a veľmi zlou prognózou. Napriek tomu, že už 20 rokov existuje rad účinných liekov na terapeutickú intervenciu u pacientov so zlyhaním srdca, reziduálna mortalita ostáva vysoká a hľadanie nových ciest terapie patrí medzi principiálne otázky kardiológie (1).

Po viac ako 10 rokoch neúspešných klinických pokusov dokázal ivabradín v štúdii SHIFT redukovať sumu mortality a hospitalizácie o takmer 18%. Ivabradín je blokátor I_f kanálu v sinoatriálnom uzle, ktorý navodzuje zníženie srdcovej frekvencie bez ovplyvnenia sympatikového nervového systému. Bradykardizujúci efekt ivabradínu sa považuje za rozhodujúcu terapeutickú vlastnosť tejto látky (2). V nedávnych rokoch sa však objavujú údaje, že ivabradín má aj iné efekty ako redukcia frekvencie, ktoré by mohli participovať na jeho terapeutickom benefite. Je známe, že jedným z ústredných vlastností účinných protektív pri zlyhaní srdca ako sú ACE-inhibítory (3), blokátory angiotenzínového receptoru typu 1 (AT-1), alebo inhibítory aldosterónových receptorov je inhibícia progresívnej remodelácie ľavej komory srdca (4). Naším cieľom bolo zistiť, či je ivabradín schopný modifikovať remodeláciu srdca a aorty na modeli srdcového zlyhania indukovaného chronickým podávaním izoprenalínu.

Materiál a metodika

Skupiny zvierat, aplikácia farmakologicky aktívnych látok

12 týždňové potkany, samce – kmeň Wistar – sa rozdelili do 4 skupín (n=10):

1. skupina: kontrola (K),

2. skupina: ivabradín [10 mg/kg/deň] (Iv),

3. skupina: izoprenalín [5 mg/kg/deň] (Izo),

4. skupina: izoprenalín a ivabradín [5 mg/kg/deň a 10 mg/kg/deň] (Izo+Iv).

Ivabradín sa podával 7 týždňov v pitnej vode, pričom pre zachovanie správneho dávkovania bola koncentrácia upravovaná podľa aktuálnej spotreby vody. Izoprenalín sa podával intraperitoneálne 6 týždňov (so začiatkom 1 týždeň po predliečbe ivabradínom).

Priebežné meranie systolického tlaku krvi a srdcovej frekvencie počas experimentu

Počas 7 týždňov trvania experimentu sa potkanom v pravidelných intervaloch (1x za týždeň) neinvazívnou pletyzmografickou metódou (metóda tail-cuff) meral systolický tlak krvi (STK) a srdcová frekvencia (pulz).

Odber tkanivových vzoriek a ich histologické a biochemické spracovanie

Po 7 týždňoch trvania experimentu sa potkany usmrtili a odobrali sa vzorky orgánov (srdce a hrudná aorta) pre ďalšie histologické a biochemické spracovanie. Vzorky ľavej komory sa ihneď po odbere zmrazili tekutým dusíkom na -80 °C a pri tejto teplote sa uskladnili do ich ďalšieho spracovania. Vzorky z aort sa fixovali v 4% roztoku formaldehydu, zaliali do parafínu a narezali na 5 µm hrubé rezy. Tkanivové rezy sa ofarbili hematoxylínom a eozínom a pikrosíriusovou červenou.

Morfometrické vyšetrenie hrudnej aorty

Tkanivové rezy aorty sa vyšetrili pomocou svetelnej mikroskopie (mikroskop: Nikon-119, ku ktorému bola pripojená kamera s vysokým rozlíšením: GKB, CC8706S, Taiwan) a následne sa morfometricky spracovali použitím softvéru ImageJ (National Institute of Health, USA). Zmerala sa hrúbka steny aorty (intima + media) v mm (5).

Histologické stanovenie kolagénov v aorte

Tkanivové rezy aorty sme ofarbili pikrosíriusovou červenou. Použitím polarizovanej mikroskopie a softvéru ImageJ sa stanovilo percentuálne zastúpenie kolagénov typu I a III v analyzovanom výseku médie aorty a následne sa vypočítal pomer zastúpenia kolagénu I a III (6).

Biochemické vyšetrenie vzorky z ľavej komory srdca

Zo vzoriek z ľavej komory sa po izolácii kolagénov stanovili koncentrácia hydroxyprolínu (mg hydroxyprolínu na g tkaniva ľavej komory) a obsah hydroxyprolínu (mg hydroxyprolínu v ľavej komore) v solubilnom, nesolubilnom a celkovom kolagéne (7).

Štatistická analýza

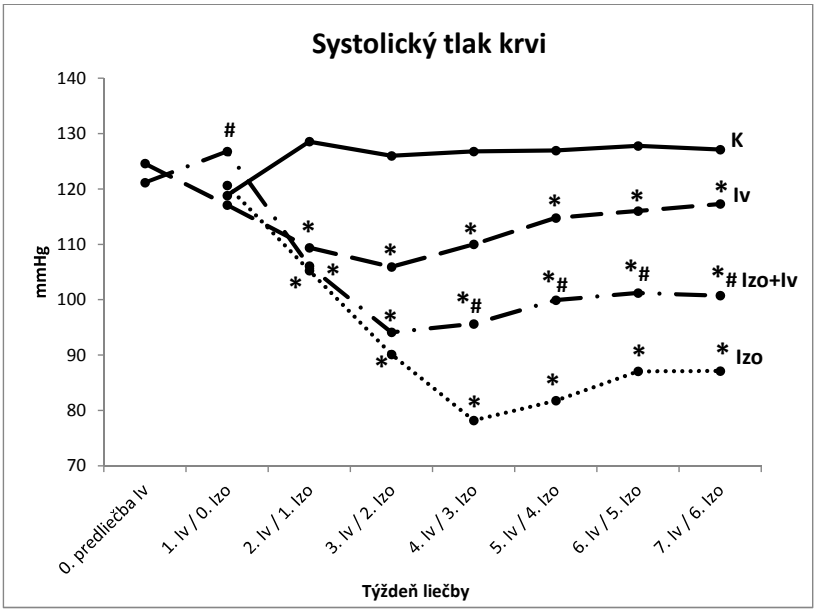
Výsledky sa vyjadrili ako priemer±štandardná chyba priemeru. Rozdiely sa považovali za signifikantné, ak $p < 0,05$. Na štatistické hodnotenie sa použili ANOVA a Bonferroni test.

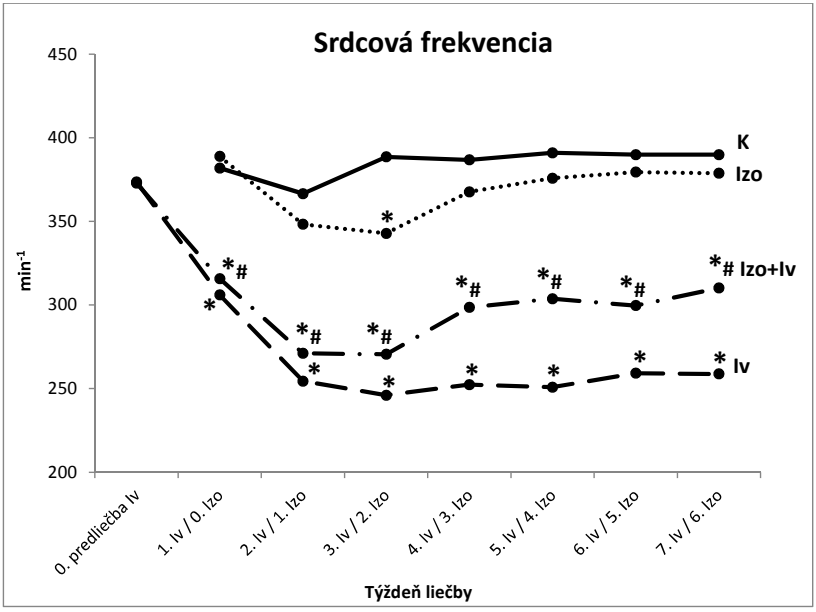
Výsledky

Po 7 týždňoch trvania pokusu bol STK u kontrol 127,1±0,4 mmHg. STK signifikantne klesol po podaní ivabradínu o 8% ($p < 0,05$) aj po podaní izoprenalínu o 31% ($p < 0,05$). Ivabradín pridaný k izoprenalínu zvýšil STK o 16% (Obr. 1).

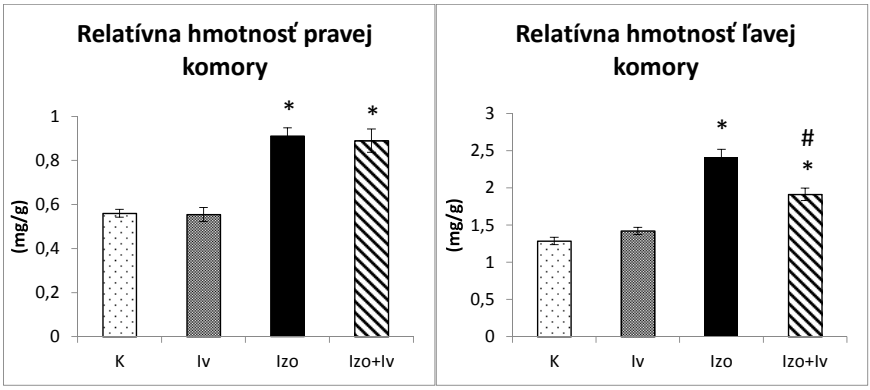
Srdcová frekvencia u kontrol po 7 týždňoch trvania pokusu bola 390±1 min^{-1}, pričom podanie izoprenalínu nemalo signifikantný vplyv. Podanie ivabradínu redukovalo srdcovú frekvenciu v oboch skupinách (v Iv aj v Izo+Iv), a to v skupine Iv o 34% a v skupine Izo+Iv o 18% (Obr. 1).

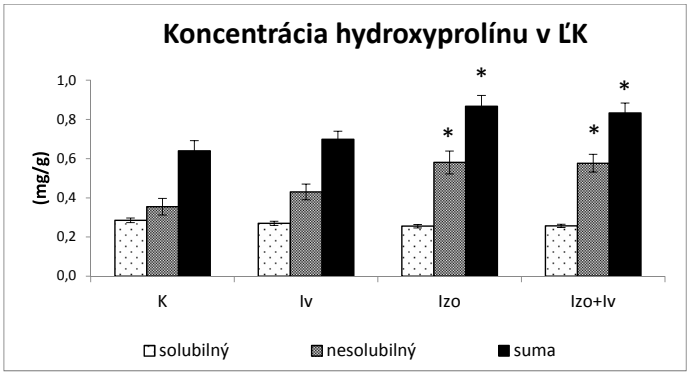
Relatívna hmotnosť ľavej komory (pomer hmotnosti ľavej komory k hmotnosti tela) bola u kontrol 1,29±0,05 mg/g. Izoprenalín ju zvýšil o 87%. Ivabradín v izoprenalínovej skupine redukoval relatívnu hmotnosť ĽK o 21%. Relatívna hmotnosť pravej komory bola u kontrol 0,56±0,02 mg/g. Izoprenalín ju zvýšil o 63%. Ivabradín v izoprenalínovej skupine nemal vplyv na relatívnu hmotnosť pravej komory (Obr. 2).

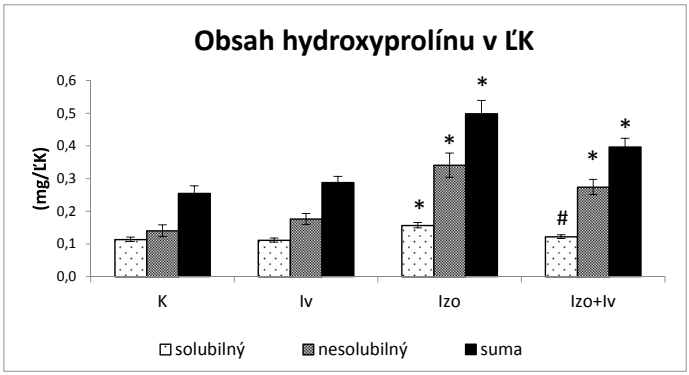




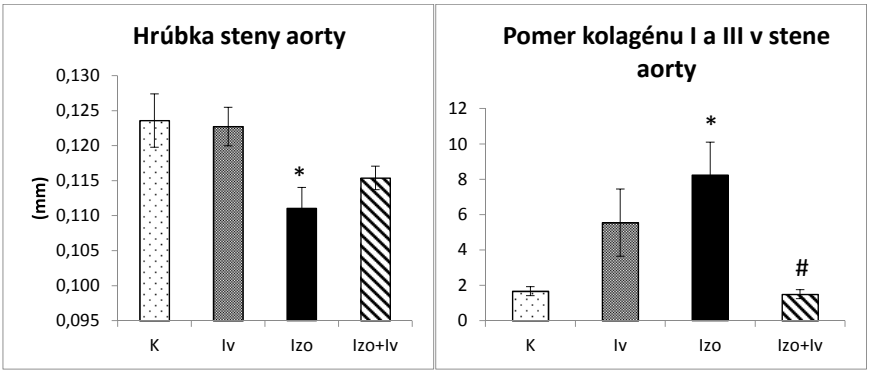
Obr. 1 Systolický tlak krvi a srdcová frekvencia. K – kontrola, Iv – ivabradín, Izo – izoprenalín; * p<0,05 vs. K, # p<0,05 vs. Izo







Obr. 2 Relatívna hmotnosť pravej komory, relatívna hmotnosť ľavej komory a koncentrácia a obsah hydroxyprolínu v ľavej komore. K – kontrola, Iv – ivabradín, Izo – izoprenalín, ĽK – ľavá komora; * $p<0,05$ vs. K, # $p<0,05$ vs. Izo



Obr. 3 Hrúbka steny aorty a pomer kolagénu I a III v stene aorty. K – kontrola, Iv – ivabradín, Izo – izoprenalín; * p<0,05 vs. K, # p<0,05 vs. Izo

Obsah solubilného hydroxyprolínu v ľavej komore bol u kontrol 0,11±0,01 mg, obsah nesolubilného hydroxyprolínu 0,14±0,02 mg a obsah celkového hydroxyprolínu 0,26±0,02 mg. Izoprenalín zvýšil koncentráciu solubilného (o 38%), nesolubilného (o 142%) aj celkového hydroxyprolínu (o 96%). Ivabradín v izoprenalínovej skupine znížil obsah solubilného (o 22%), nesolubilného (o 20%) aj celkového hydroxyprolínu (o 20%) (Obr. 2).

Koncentrácia solubilného hydroxyprolínu v ľavej komore bola u kontrol 0,29±0,01 mg/g, koncentrácia nesolubilného hydroxyprolínu 0,36±0,04 mg/g a koncentrácia celkového hydroxyprolínu 0,64±0,05 mg/g. Izoprenalín zvýšil koncentráciu nesolubilného (o 64%) aj celkového hydroxyprolínu (o 36%). Ivabradín v izoprenalínovej skupine neovplyvnil koncentráciu jednotlivých typov hydroxyprolínov (Obr. 2).

Hrúbka steny hrudnej aorty bola u kontrol 0,124±0,004 mm. Izoprenalín signifikantne znížil hrúbku steny aorty o 11%, pričom ivabradín v izoprenalínovej skupine hrúbku neovplyvnil. Pomer kolagénu I a III v stene hrudnej aorty bol u kontrol 1,67±0,26. Izoprenalín tento pomer signifikantne zvýšil (o 394%), kým ivabradín v izoprenalínovej skupine ho znížil na úroveň kontrolných zvierat (o 82%) (Obr. 3).

Diskusia

Podávanie izoprenalínu indukovalo vývoj zlyhania srdca sprevádzaného hypertrofiou ľavej aj pravej komory a výrazným poklesom systolického tlaku krvi. Súčasne dochádzalo k poklesu hrúbky steny aorty. V ľavej komore nastala fibrotická prestavba v zmysle zvýšenia obsahu solubilného, nesolubilného aj celkového kolagénu a v aorte sa zvýšil pomer kolagénu I a III. Podávanie ivabradínu znížilo relatívnu hmotnosť ľavej, ale nie pravej komory a redukovalo obsah (ale nie koncentráciu) kolagénu v ľavej komore. Relatívne pozitívne štrukturálne zmeny v srdci následkom podávania ivabradínu sa premietli do zlepšenia hemodynamickej situácie v zmysle zvýšenia systolického tlaku krvi.

Katecholamíny sú rozhodujúcou zložkou stresom indukovanej hormonálnej aktivácie, ktoré zvyšujú srdcový výdaj a zlepšujú perfúziu periférnych tkanív. Avšak excesívna produkcia katecholamínov alebo ich exogénne podávanie môžu mať škodlivé následky. Podávanie syntetického katecholamínu

izoprenalínu vyvoláva preťaženie kardiomyocytov kalciom a predstavuje spoľahlivý model hypertrofie a dysfunkcie ľavej komory (srdcového zlyhania) (8,12). Tento model sa často používa na farmakologické testovanie kardioprotektívnych látok. Medzi účinné farmakologické intervencie na modeli izoprenalínového poškodenia srdca patrí podávanie taurínu (9), fenofibrátu (10) alebo laktoferínu (11). Na našom pracovisku sa ako účinné protektívum voči zlyhaniu srdca prezentoval melatonín, ktorý nielen redukoval excesívnu fibrózu a oxidačný stres, ale výrazne redukoval mortalitu pri izoprenalínom indukovanom srdcovom zlyhaní (12).

Ivabradín predstavuje nádej v terapii srdcového zlyhania. Tento inhibítor I_f kanálu v sinoatriálnom uzle prostredníctvom svojho bradykardizujúceho účinku výrazne zlepšil nielen hemodynamiku zlyhávajúcich pacientov, ale aj sumu morbidity a mortality (13). V našom experimente na izoprenalínom indukovanom srdcovom zlyhaní ivabradín výrazne redukoval zvýšenú srdcovú frekvenciu a signifikantne zlepšil vývrhový objem ľavej komory, čo sa premietlo do zvýšenia systolického tlaku krvi. Hoci hmotnosť pravej komory zostala nezmenená, výrazná redukcia hmotnosti ľavej komory indikuje schopnosť ivabradínu indukovať regresiu hypertrofie. Hoci ivabradín neredukoval koncentrácie jednotlivých typov kolagénu v ľavej komore, obsah všetkých typov kolagénu sa po ivabradíne znížil. Okrem bradykardizujúceho účinku ivabradínu by sa na týchto pozitívnych štrukturálnych zmenách ľavej komory mohla podieľať skutočnosť, že ivabradín signifikantne redukoval pomer kolagénu I a III v tkanive aorty. Keďže kolagén I je zodpovedný za tuhosť aorty a naopak kolagén III je reprezentantom jej elastických vlastností, redukcia pomeru kolagénu I a III signalizuje tendenciu k zlepšeniu elastických vlastností aorty, a tým k redukcii afterloadu.

Záverom konštatujeme, že na izoprenalínom indukovanom modeli zlyhania srdca ivabradín naznačil jasný trend k znižovaniu remodelácie ľavej komory a k zlepšeniu štrukturálnych vlastností aorty. Zníženie patologickej remodelácie spolu s redukciou srdcovej frekvencie by sa mohlo podieľať na terapeutickom benefite ivabradínu pri srdcovom zlyhaní.

Záver

1. Ivabradín pridaný k izoprenalínu znížil srdcovú frekvenciu a zvýšil STK, čo je dôkazom pozitívneho hemodynamického vplyvu ivabradínu v zmysle zlepšenia čerpacej funkcie srdca.
2. Pozitívny hemodynamický vplyv ivabradínu v izoprenalínovej skupine je pravdepodobne potencovaný zlepšením elastických vlastností steny aorty (v dôsledku zníženia pomeru kolagénu I a III v jej stene), čo svedčí pre antiremodelačný efekt ivabradínu uplatňujúceho sa v stene aorty s potenciálnym znížením afterloadu.
3. Ivabradín v izoprenalínovej skupine redukoval relatívnu hmotnosť ĽK a obsah všetkých druhov kolagénu, čo naznačuje jeho protektívny účinok proti remodelácii ľavej komory.

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0071/15.

Zoznam použitej literatúry:

1. Simko F, Pechanova O, Krajcirovicova K, Matuskova J, Pelouch V, Adamcova M, Paulis L: Effects of captopril, spironolactone, and simvastatin on the cardiovascular system of non-diseased Wistar rats. Int J Cardiol 2015; 190: 128-30.
2. Simko F, Baka T, Paulis L, Reiter RJ: Elevated heart rate and nondipping heart rate as potential targets for melatonin: a review. J Pineal Res 2016; 61(2): 127-37.

3. Simko F, Simko J, Fabryova M: ACE-inhibition and angiotensin II receptor blockers in chronic heart failure: pathophysiological consideration of the unresolved battle. Cardiovasc Drugs Ther 2003; 17(3): 287-90.
4. Simko F: Statins: a perspective for left ventricular hypertrophy treatment. Eur J Clin Invest 2007; 37(9): 681-91.
5. Simko F, Repova K, Krajcirovicova K, Aziriova S, Paulis L, Baka T: Remodelling of the aorta and kidney in L-NAME-induced hypertension in rats: comparison of the protective effect of ivabradine with captopril and melatonin. Diabetologia 2015; 58(Suppl 1): 547.
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: 45-9.
7. Simko F, Pechanova O, Repova Bednarova K a spol.: Hypertension and cardiovascular remodelling in rats exposed to continuous light: protection by ACE-inhibition and melatonin. Mediators Inflamm 2014; 2014: 703175.
8. Simko F, Pechanova O: Remodelling of the heart and vessels in experimental hypertension: advances in protection. J Hypertens 2010; 28 Suppl 1: 1-6.
9. Yang Q, Yang J, Wu G, Feng Y, Lv Q, Lin S, Hu J: Effects of taurine on myocardial cGMP/cAMP ratio, antioxidant ability, and ultrastructure in cardiac hypertrophy rats induced by isoproterenol. Adv Exp Med Biol 2013; 776: 217-29.
10. Althurwi HN, Elshenawy OH, El-Kadi AO: Fenofibrate modulates cytochrome P450 and arachidonic acid metabolism in the heart and protects against isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. J Cardiovasc Pharmacol 2014; 63(2): 167-77.
11. Mladenka P, Semecký V, Bobrovová Z a spol.: The effects of lactoferrin in a rat model of catecholamine cardiotoxicity. Biometals 2009; 22(2): 353-61.
12. Simko F, Bednarova KR, Krajcirovicova K a spol.: Melatonin reduces cardiac remodeling and improves survival in rats with isoproterenol-induced heart failure. J Pineal Res 2014; 57(2): 177-84.
13. Aziriova S, Repova K, Krajcirovicova K a spol.: Effect of ivabradine, captopril and melatonin on the behaviour of rats in L-nitro-arginine methyl ester-induced hypertension. J Physiol Pharmacol 2016; 67(6): 895-902.

24. Pohlavné rozdiely v markeroch oxidačného stresu u pacientov po náhlej cievnej mozgovej príhode

Bc. Petra Pazderová
(Fakulta matematiky, fyziky a informatiky UK v Bratislave)
Spoluautori: Ingrid Žitňanová [1]

Školiteľ: doc. Ing. Ingrid Žitňanová, PhD. [1]
[1]Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UK v Bratislave,

Úvod

Náhla cievna mozgová príhoda (NCMP) je akútna neurologická dysfunkcia cievneho systému spôsobená znížením až zastavením prívodu zdrojov energie (kyslíka a glukózy) do mozgu. Tento proces môže byť vyvolaný buď upchatím cievneho systému (trombom, embolom) alebo prasknutím cievy, a následným zakrvácaním do priľahlej oblasti [1]. V patogenéze vzniku a rozvoja NCMP zohráva úlohu oxidačný stres, na ktorý sú neuróny ako vysoko metabolicky aktívne bunky mimoriadne citlivé. Oxidačný stres predstavuje nerovnováhu dvoch systémov prooxidant- antioxidant v prospech prooxidanta. Tento vzniká v nervovom tkanive pri nízkej hladine endogénnych antioxidačných enzýmov, ako aj v prítomnosti vysokého množstva polynenasýtených vyšších karboxylových kyselín, ktoré sú terčom pre voľné radikály (VR). K tvorbe reaktívnych metabolitov kyslíka (RMK) prispieva tiež vysoká hladina kyslíka a iónov železa v mozgu [2]. Na eliminácii a detoxikácii ďalších metabolitov vznikajúcich v mozgu, ako napr. β-amyloid (Aβ), sa podieľa cerebrospinálna tekutina cirkulujúca v mozgových komorách. Táto je zdrojom ochranných enzýmov, ktorých aktivita je pri produkcii Aβ modulovaná pohlavnými hormónmi. Bolo dokázané, že 17β-estradiol a 5α-dihydrotestosterón priamo znižujú oxidačný stres indukovaný Aβ. Metabolizmus Aβ je u žien a mužov rozdielny, čo vytvára predpoklad pre rôzne pôsobenie oxidačného stresu v rámci pohlaví [3].

V našej štúdii sme sledovali celkový antioxidačný status pacientov po NCMP, koncentrácie karbonylov proteínov – markerov oxidačného poškodenia proteínov a lipoperoxidov – markerov oxidačného poškodenia lipidov. Cieľom našej práce bolo zhodnotiť vplyv oxidačného stresu v patogenéze NCMP sledovaním markerov oxidačného stresu u pacientov po NCMP v troch časových intervaloch: do 24 h po NCMP, týždeň po NCMP a 3 mesiace po NCMP. Sledované parametre sme porovnávali s ohľadom na vek a pohlavie jedincov.

Materiál a metodika

Sledovaná populácia:

Do štúdie bolo zapojených 81 zdravých dobrovoľníkov (priemerný vek 64,91 roka ± 9,01) (36 mužov a 45 žien) a 82 pacientov po NCMP (priemerný vek 68,70 ± 15,90) (45 mužov a 36 žien). Pre určenie dynamických zmien vo vyšetrovaných parametroch bola krv pacientom odobraná v troch časových intervaloch: v deň NCMP (82 vzoriek), 7 dní po NCMP (53 vzoriek, 23 žien a 30 mužov) a 3 mesiace po NCMP (17 vzoriek, 5 žien a 12 mužov). Krv bola pacientom a zdravým kontrolám odobratá na I. Neurologickej klinike Fakultnej nemocnice v Bratislave, kde boli zároveň zaznamenané aj všetky

biochemické a hematologické parametre pacientov po NCMP. Táto štúdia bola schválená etickou komisiou.

Sledované parametre:

Plazma – vzorky krvi s antikoagulantom EDTA (etyléndiamíntetraoctová kyselina) boli centrifugované po dobu 5 min. pri 1200xg, pri 4°C. Plazma bola uskladnená pri -80°C a použitá na stanovenie markerov oxidačného stresu (karbonylov proteínov, lipoperoxidov) a celkovej antioxidačnej kapacity.

Stanovenie koncentrácie karbonylov proteínov

Na stanovenie koncentrácie karbonylov proteínov v krvi sme použili komerčný kit: OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit, USA – kat.č. STA-310 [4].

Stanovenie lipoperoxidov v plazme

Pri stanovení hladín lipoperoxidov sme použili metódu [5].

Stanovenie antioxidačnej kapacity plazmy

Celkovú antioxidačnú kapacitu plazmy sme stanovili dekolorizačnou TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) metódou [6].

Štatistické analýzy

Primárna analýza dát

Namerané hodnoty sme vyjadrili ako medián a interkvartilové rozmedzie (IQR). Na posúdenie normality dát sme okrem vizuálneho zhodnotenia a popisnej štatistiky použili Shapiro-Wilkov test normality. Dáta s odchýlkami od normality sme transformovali. Používali sme predovšetkým logaritmické transformácie a rebrík mocnín.

Testovanie štatistických rozdielov medzi sledovanými parametrami

Pri porovnaní štatistických rozdielov nameraných hodnôt v experimentálnych vzorkách sme použili Studentov dvojvýberový nepárový t-test, pri porovnaní kontrolnej skupiny a pacientov po NCMP (odber A) v prípade normálne rozdelených dát (po transformácii) analýzu variancie (ANOVA) pre analýzu opakovaných odberov v rámci jednej skupiny. Neparametrický Mann-Whitney test sme použili pre analýzu dát dvoch rozdielnych skupín (kontrola a NCMP A) s odchýlkami od normality a neparametrický Wilcoxonov test pre analýzu párových odberov v rámci jednej skupiny s nenormálnou distribúciou. Na porovnanie viacerých asymetrických párových odberov sme použili aj Friedmanov test, ktorým sme naraz porovnali tri párové merania. Sledovanie vplyvu viacerých faktorov (vek, pohlavie, marker oxidačného stresu...) pri vzniku NCMP sme realizovali vytvorením modelov logistickej regresie. Závislosť nameraných dát s vekom sme kvôli odchýlkam od normality testovali Spearmanovou koreláciou. Testovali sme na hladine významnosti $\alpha = 0,05$.

Všetky štatistické, ako aj grafické vyhodnocovania sme robili v programe *Microsoft Office Excel 2010, StatsDirect® 2.7.2.*

Výsledky

Základný prehľad nameraných koncentrácií sledovaných parametrov a aktivít enzýmu spolu s vekom pacientov, kontrol a celkovým počtom jedincov zapojených do štúdie uvádzame v tab. 1.

Tabuľka 1: Vek a antioxidačný status pacientov a zdravých kontrol zaradených do štúdie

	Kontrola	NCMP A	NCMP B	NCMP C
Počet	77	81	57	17
Vek	66 (61 – 71)	68 (60 - 83)	71 (59 - 83)	60 (47 – 66)
Ženy/Muži	46/31	36/45	26/31	5/12
TEAC [mmol/l]	1,32 (0,35 – 2,34)	1,64 (0,73 – 2,39)	1,10 (0,59 – 2,24)	2,73^{AB} (2,38 – 3,40)
TEAC – ženy	1,54 (0,53 – 2,53)	1,71 (0,84 – 2,28)	1,20 (0,27 – 2,27)	2,80 (2,33 – 2,92)
TEAC – muži	0,89 (0,33– 2,31)	1,36 (0,61 – 2,46)	0,98 (0,66 – 2,03)	2,63^{A} (2,39 – 3,64)
Karbonyly [nmol/mg]	0,08 (0,07 – 0,10)	0,23**** (0,11 – 0,34)	0,24 (0,146 – 0,525)	0,08 (0,019 – 0,192)
Karbonyly ženy	0,082 (0,07 – 0,09)	0,23**** (0,14 – 0,37)	0,27 (0,15 – 0,56)	0,08 (0,02 – 0,26)
Karbonyly muži	0,09 (0,07 – 0,13)	0,25*** (0,09 – 0,33)	0,24 (0,15 – 0,40)	0,08 (0,01 – 0,18)
Lipoperoxidy [nmol/ml]	43,70 (23,95 – 63,74)	54,42* (29,07 – 74,52)	43,62^{A} (20,86 – 62,92)	44,37^{AA} (29,70 – 57,60)
Lipoperoxidy ženy	40,16 (22,04 – 45,35)	49,40* (29,73 – 61,45)	41,06 (20,87 – 60,65)	41,75 (32,26 – 57,60)
Lipoperoxidy muži	47,65 (25,98 – 68,35)	56,25 (27,38 – 78,08)	45,58^{A} (18,62 – 67,47)	42,20^{AA} (27,36 – 51,57)

Dáta sú prezentované ako medián a interkvartilové rozmedzie (IQR), (1. kvartil – 3. kvartil): A – prvý odber, B – druhý odber, C – tretí odber; TEAC – celková antioxidačná kapacity plazmy; ****$p < 0,0001$ vs. kontrola; * $p < 0,05$ vs. kontrola; ^{A} $p < 0,05$ vs. NCMP A; ^{AA} $p < 0,01$ vs. NCMP A; ^{B} $p < 0,05$ vs. NCMP B; Mann-Whitney U test.

Spearmanova korelácia

Koreláciami medzi sledovanými markermi oxidačného stresu (lipoperoxidy, karbonyly proteínov) a antioxidačnou kapacitou plazmy s vekom sme zaznamenali v odbere A signifikantný pokles celkovej antioxidačnej kapacity s vekom u mužov vo veku do 55 rokov ($p = 0,003$). Pacientom po NCMP sa s vekom signifikantne znižovali hladiny lipoperoxidov ($p = 0,005$). Tento trend bol zaznamenaný aj po rozdelení odberu A podľa veku, ale len v skupine pacientov nad 55 rokov ($p = 0,028$). V odbere B a C sme nezaznamenali žiadne signifikantné korelácie sledovaných parametrov s vekom.

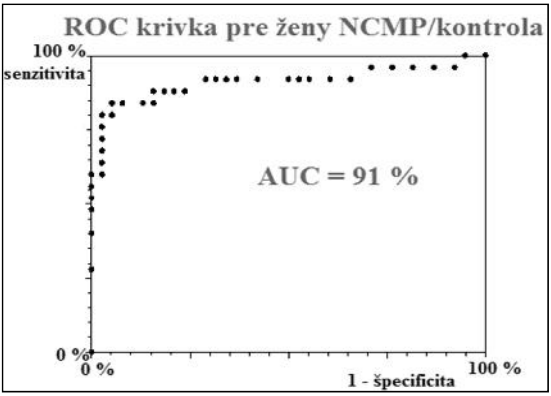
Tabuľka 2: Spearmanove korelácie markerov oxidačného stresu s vekom

	rho (ρ)	p
TEAC/vek (muži (odber A); do 55 rokov)	-0,8667	0,003
Lipoperoxidy/vek (odber A; nad 55 rokov)	-0,3358	0,028
Lipoperoxidy/vek (odber A; celá skupina)	-0,3806	0,005

Logistická regresia

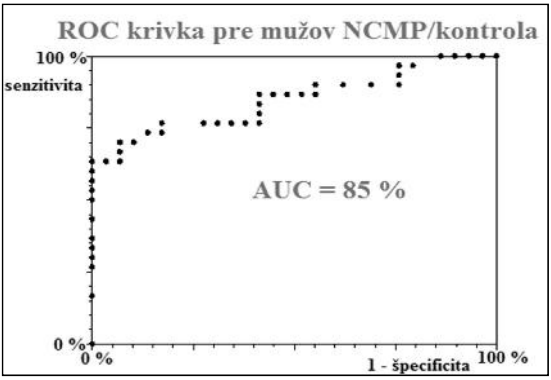
Použitím logistickej regresie sme pri analýze odberu A a kontrolnej skupiny medzi možné prediktory NCMP zahrnuli celkovú antioxidačnú kapacity plazmy, koncentrácie lipoperoxidov a karbonylov proteínov a vek jedincov. Vytvorili sme matematický model osobitne pre mužov a ženy.

Ženy po NCMP mali v porovnaní s kontrolnou skupinou žien signifikantne vyššie hladiny karbonylov proteínov (OR > 100; p = 0,004) a vyšší vek (OR = 1,1; p = 0,019). Ženy po NCMP mali zároveň vyššie hladiny lipoperoxidov a nižšiu celkovú antioxidačnú kapacitu plazmy. Celková výkonnosť vytvoreného modelu bola 90 %. Model so zahrnutými prediktormi signifikantne vylepšoval výsledok v porovnaní bez nich (p < 0,0001) s vysokou zhodou s nameranými dátami (p = 0,9473; Goodness of fit test). Pozitívna prediktívna hodnota testu vo vytvorenom modeli bola 95,24 % a negatívna prediktívna hodnota 88 %. Pre deliaci bod cutoff = 0,5 bola senzitivita 80 % a špecificita 97 % (graf 1).



Graf 1: ROC krivka (Receiver Operating Characteristic) žien (čierne body): vyjadruje vzťah medzi senzitivitou a špecificitou testu; AUC – oblasť pod krivkou zahŕňa 91 % dát.

V modeli logistickej regresie pre mužov sme zaznamenali signifikantné prediktory NCMP: vyššie hladiny karbonylov proteínov (OR > 100; p = 0,0009), vyššie hladiny lipoperoxidov (OR = 1,03; p = 0,03) a vyššiu celkovú antioxidačnú kapacitu plazmy (OR = 2,34; p = 0,19). Vyšší vek bol u mužov zaznamenaný ako nesignifikantný ochranný faktor NCMP. Celková výkonnosť testu pre správne zaradenie jedinca do skupiny NCMP/kontrola bola 80 %. Model so zahrnutými prediktormi signifikantne zlepšoval výsledok v porovnaní bez nich (p < 0,0001) s dobrou zhodou s nameranými dátami (p = 0,526; Goodness of fit test). Pozitívna prediktívna hodnota testu bola 85 % a negatívna prediktívna hodnota 76 %. Pre deliaci bod cutoff = 0,5 sme dostali hodnotu senzitivity 73,3 % a špecificity 86 % (graf 2).



Graf 2: ROC krivka (Receiver Operating Characteristic) mužov (čierne body): vyjadruje vzťah medzi senzitivitou a špecificitou testu; AUC – oblasť pod krivkou zahŕňa 85 % dát.

Diskusia

V štúdii sme sa zamerali na rozdiely v oxidačnom strese medzi mužmi a ženami po NCMP, ako aj medzi zdravými jedincami a pacientmi po NCMP. Zaznamenali sme signifikantný vplyv veku pri vzniku a rozvoji NCMP. Po rozdelení sledovaných skupín podľa pohlavia sme z modelov logistickej regresie zistili, že vyšší vek u žien pôsobí ako rizikový faktor vzniku NCMP. Naopak, u mužov sa vyšší vek prejavil ako faktor protektívny. Zvýšená citlivosť žien k oxidačnému poškodeniu bola zaznamenaná už od 55. roka života a môže byť asociovaná s poklesom expresie, ako aj celkovej funkcie od vápnika závislého draslíkového kanála, ktorý zohráva kľúčové úlohu pri ochrane organizmu pred myokardiálnym infarktom a NCMP [7]. Pokles expresie tohto kanála nebol u mužov vyššieho veku zaznamenaný. U žien v menopauze bol síce vyzdvihnutý pozitívny účinok podávania estrogénov vzhľadom k zlepšeniu antioxidačného statusu, tento vplyv sa ale po 61. roku života stráca. Navyše, v populácii starších mužov (nad 70 rokov) boli zvýšené hladiny estradiolu považované za rizikový faktor vzniku NCMP, zatiaľ čo testosterón sa v tomto veku za rizikový faktor vzniku NCMP nepokladal [8, 9]. U starších pacientov (ženy aj muži) bola zdokumentovaná hypertenzia ako hlavný rizikový faktor vzniku NCMP [10]. Nebezpečná je predovšetkým diastolická hypertenzia modulovaná oxidačným stresom, ktorej príčinou môže byť buď zníženie citlivosti alfa podjednotky draslíkového kanála ku vápniku vplyvom reaktívnych metabolitov kyslíka alebo strata citlivosti beta podjednotky počas hypoxie tkaniva [7].

V našej štúdii sme zaznamenali dynamické zmeny celkovej antioxidačnej kapacity plazmy, ktorej hodnoty sa v celej skupine jedincov po NCMP (odber A) signifikantne nelíšili od hodnôt antioxidačnej kapacity plazmy kontrol. Pokles antioxidačnej kapacity plazmy pacientov po NCMP nastal týždeň po príhode (odber B) v porovnaní s odberom A. Tento môže byť asociovaný so snahou antioxidantov eliminovať voľné radikály, ktoré sa vytvorili v organizme počas ataku NCMP. Signifikantný vzrast celkovej antioxidačnej kapacity sme u pacientov zaznamenali 3 mesiace po NCMP (odber C). Pozitívny rast antioxidantov plazmy môže byť ovplyvnený podávaním antioxidantov, ako aj celkovou zmenou stravovania. Bol dokázaný pozitívny vplyv enterálneho podávania nízkomolekulových antioxidatov (vitamínu C, E) v priebehu jedného mesiaca [11], ako aj pozitívny účinok podávania farmakologicky

účinných látok (albumín, statíny, minocyklín) z hľadiska redukcie oxidačného stresu u pacientov po NCMP [12].

Pacienti po NCMP mali signifikantne zvýšené hladiny karbonylov proteínov plazmy v porovnaní s kontrolnou skupinou. Podobne zvýšené hladiny karbonylov sme zaznamenali u oboch pohlaví. V obdobnej štúdii zvýšené hladiny karbonylov proteínov u pacientov po akútnej ischemickej NCMP pozitívne korelovali s rozsahom neurologického poškodenia [13]. Zvýšené hladiny boli zaznamenané aj u pacientov s hypertenziou [14]. Týždeň po NCMP zvýšené hladiny karbonylov stále pretrvávali, neboli zaznamenané žiadne signifikantné rozdiely v porovnaní s odberom vykonaným do 24 h. Pokles karbonylov bol zaznamenaný tri mesiace po NCMP, čo môže byť asociované so vzrastom antioxidačnej kapacity plazmy.

V našej štúdii sme tiež zaznamenali signifikantne vyššie hladiny lipoperoxidov u pacientov po NCMP (odber A) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Vyššie hladiny lipoperoxidov boli zaznamenané u oboch pohlaví. Pokles lipoperoxidov sme zaznamenali týždeň po NCMP (odber B), ale predovšetkým po troch mesiacoch od NCMP (odber C). Podobné výsledky boli zaznamenané v štúdii, kde zmeny lipoperoxidov v čase nepriamo úmerne korelovali so zmenami hladín celkovej antioxidačnej kapacity plazmy [15]. Signifikantné zmeny v priebehu času sme zaznamenali najmä v mužskej populácii.

V našej štúdii sme zaznamenali negatívnu koreláciu antioxidančnej kapacity plazmy s vekom u mužov po NCMP (odber A) do 55 rokov. Znížená funkcia antioxidatov (superoxiddismutázy) s vekom bola zaznamenaná v hippocampe u starších hlodavcov v porovnaní s mladšími dospelými jedincami. Pozitívne účinky SOD sa prejavujú predovšetkým v ochrane neurónov pri ischemickom ataku [16]. Negatívne vekové korelácie sme zaznamenali aj s lipoperoxidmi v celej skupine pacientov po NCMP (odber A), ako aj po rozdelení skupín podľa veku, a to v skupine pacientov starších ako 55 rokov. Oxidačné poškodenie lipidov sa s vekom prirodzene zvyšuje ako dôsledok poklesu ochranných proteínov v krvi [17]. Vyššie hladiny lipoperoxidov sú priamo asociované so vznikom hypertenzie a kardiovaskulárnych ochorení. Nami zistené vyššie hladiny lipoperoxidov u mladších pacientov po NCMP môžu byť preto dôkazom signifikantného vplyvu oxidačného stresu pri vzniku a rozvoji NCMP.

Vytvorením modelov logistickej regresie pre mužov a ženy sme zaznamenali u žien signifikantný vplyv veku a karbonylov proteínov pre vznik NCMP. U mužov bol naopak vyšší vek zaznamenaný ako protektívny faktor NCMP. Hlavnými prediktormi vzniku NCMP boli zvýšené hladiny karbonylov proteínov, nižší vek a vyššia antioxidačná kapacita plazmy. Rozdielne výsledky pre mužov a ženy získané z modelov logistickej regresie poukazujú na signifikantné pohlavné rozdiely v markeroch oxidačného stresu, ako aj veku pri vzniku NCMP.

Poďakovanie

Táto práca bola financovaná z prostriedkov grantu Ministerstva zdravotníctva MZ 2012/10-UKBA-10.

Výsledky prezentované v tejto práci sú súčasťou nasledovanej publikácie s impakt faktorom 4.492.

Žitňanová I, Šiarnik P, Kollár B, Chomová M, Pazderová P, Andrezálová L, Ježovičová M, Koňariková K, Laubertová L, Krivošíková Z, Slezáková L, Turčáni P. Oxidative Stress Markers and Their Dynamic Changes in Patients after Acute Ischemic Stroke. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:9761697.

Zoznam použitej literatúry:

1. Thom T, a kol. Heart disease and stroke statistics: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation. 2006. 113 (6). 85–151.
2. Bréton RR, Rodriguéz JCG: Exitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke. In Tech. 2012. 29-50.
3. Costa AR, a kol. Sex hormones protect against Amyloid-β induced oxidative stress in the Choroid Plexus Cell Line Z310. 2016. Journal of Neoroendocrinology. 28 (9).
4. Cell Biolabc Inc: OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit. Product Manual. USA. 2006. Item Number STA 310.
5. El-Saadani M, a kol. Spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. Journal of Lipid Research. 1989. (30). 627-630.
6. Re R, a kol. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 1999. 26 (9/10). 1231-1237.
7. Sentí M, a kol. Protective Effect of the KCNMB1 E65K Genetic Polymorphism Against Diastolic Hypertension in Aging Women and Its Relevance to Cardiovascular Risk. Clinical Research. 2005. 97 (12). 1360-1365.
8. Abbott RD, a kol. Serum estradiol and risk of stroke in elderly men. Neurology. 2007. 68 (8). 563-568.
9. Sheikh N, a kol. Relationship between Estradiol and Antioxidant Enzymes Activity of Ischemic Stroke. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2009. 841468.
10. Park TH, a kol. Identifying Target Risk Factors Using Population Attributable Risks of Ischemic Stroke by Age and Sex. Journal of Stroke. 2015. 17 (3). 302-311.
11. Crimi E: The beneficial effects of antioxidant supplementation in enteral feeding in critically ill patients: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Anesthesia and Analgesia. 2004. 99 (3). 857-863.
12. Hanafy KA, Selim MH: Antioxidant strategies in neurocritical care. Neurotherapeutics. 2012. 9 (1). 44-55.
13. Moon GJ, a kol. Antioxidant effects of statins in patients with atherosclerotic cerebrovascular disease. Journal of Clinical Neurology. 2014. 10 (2). 140-147.
14. Correa MC, a kol. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2008. 62 (5). 317-324.
15. Demirkaya S, a kol. Malondialdehyde, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in peripheral blood erythrocytes of patients with acute cerebral ischemia. European Journal of Neurology. 2001. 8 (1). 43-51.
16. Yoon DK, a kol. Comparative study on Cu,Zn-SOD immunoreactivity and protein levels in the adult and aged hippocampal CA1 region after ischemia-reperfusion. Brain research. 2006. 1092 (1). 214-223.
17. Argüelles S, a kol. In vitro and in vivo protection by melatonin against the decline of elongation factor-2 caused by lipid peroxidation: preservation of protein synthesis. Journal of pineal research. 2012. 53 (1). 1-10.

25. Úloha imunitného systému v procese vzniku nádorov hrubého čreva

Erika Gaálová
(všeobecné lekárstvo, 4 roč.)

Školiteľ: MUDr. Pavol Janega, PhD.
Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta UK, Bratislava; Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, SAV; Medirex Group Academy n.o., Bratislava

Úvod

Kolorektálny karcinóm (KRK) patrí medzi najčastejšie sa vyskytujúce onkologické ochorenia so stále vysokou mortalitou – dosahuje 8% zo všetkých úmrtí na nádorové ochorenia. Na vzniku KRK sa podieľajú tak environmentálne, ako aj genetické faktory. Nádorová transformácia je výsledkom postupného hromadenia sa genetických a epigenetických zmien, ktoré vedú k transformácií povrchového epitelu hrubého čreva na adenokarcinóm. Tieto zmeny môžu byť vrodené (zodpovedné za vznik hereditárnej formy KRK) alebo získané (vznik sporadickej formy KRK) (7).

Dôležitú úlohu vo vývoji nádorov zohráva aj imunitný systém organizmu. Hromadenie sa tumor špecifických mutácií v bunkách počas nádorovej transformácie vedie k vzniku neoantigénov, ktoré aktivujú imunitný systém pacienta (1). Za normálnych okolností sa imunitný systém sa snaží potlačiť nádorovú progresiu buď zničením nádorových buniek alebo inhibíciou ich rastu. Efektorovými bunkami protinádorovej aktivity vrodeného imunitného systému sú NK-bunky, neutrofily a makrofágy, aktivujú sa aj mechanizmy získanej imunity, B- a T- lymfocyty, ktoré zabezpečujú humorálnu a bunkovú imunitu. Tumor-infiltrujúce lymfocyty (TIL) sú dôležitou súčasťou zápalového infiltrátu v nádorovom tkanive. Medzi TIL patria cytotoxické T-lymfocyty (CD8), NK-bunky, pomocné T-lymfocyty (CD4) a regulátorové T-lymfocyty (Treg), ktoré potláčajú a regulujú protinádorovú imunitnú odpoveď (8).

Na opačnej strane, imunitný systém môže aj podporiť nádorovú progresiu vyselektovaním rezistentných nádorových buniek, ktoré sú vhodné pre rast v organizme alebo sa podieľajú na vytvorenie imunosupresívného nádorového mikroprostredia(12). Práve schopnosť nádorových buniek kontrolovať imunitný systém a vznik imunitnej rezistencie umožňuje nádorovým bunkám uniknúť spod kontroly a podieľa sa na progresii nádorovej choroby (2).

Cieľom predloženej práce je posúdiť aktiváciu imunitného systému v nádoroch hrubého čreva so zameraním sa na fenotyp zápalových buniek.

Materiál a metodika

Analyzovali sme archívne formalínom fixované a v parafíne zaliate tkanivové vzorky nádorov hrubého čreva pochádzajúce z terapeutických a diagnostických bioptických odberov a archivované na Ústave patologickej anatómie LF UK v Bratislave. Vzorky boli histopatologicky posúdené a bola stanovená patologická diagnóza v zmysle platných kritérií WHO. Základný súbor tvorilo 21 prípadov kolorektálneho karcinómu, z toho 4 prípady dobre diferencovaného G1, 12 prípadov stredne diferencovaného G2 a 1 prípad nízkodiferencovaného G3 adekokarcinómu a 4 prípady

hlienotvoreného adenokarcinómu. Samostatne sme hodnotili miesta s nádorovým rastom a okolité, nádorom nepostihnuté tkanivo.

Hodnotili sme infiltráciu tkaniva zápalovými bunkami so zameraním sa na cytotoxické T-lymfocyty (CD8+), pomocné T-lymfocyty (CD4+) a histiocyty (CD68+). Ich prítomnosť bola hodnotená imunohistochemicky; v krátkosti odparafínované preparáty boli prepláchnuté 5 minút v PBS (fosfátmi pufrovanom fyziologickom soľnom roztoku s 10mM, pH 7,4). Tkanivové epitopy boli následne demaskované procesom revitalizácie s použitím Dako PT Link (Dako, Glostrup, Denmark); rezy boli inkubované v roztoku TRIS-EDTA (10mM TRIS, 1mM EDTA pH 9.0) pri teplote 98 °C počas 20 minút. Preparáty boli následne inkubované 60 minút s myšacou monoklonálnou protilátkou proti CD8 (ready to use, DAKO, Carpinteria, USA), proti CD4 (ready to use, DAKO, Carpinteria, USA) a proti CD68 (ready to use, DAKO, Carpinteria, USA). Po 3-násobnom prepláchnutí v PBS, boli preparáty inkubované 30 minút s Histofine polymérom proti myšacím proteínom (Nichirei Biosciences, Japonsko) a po opakovanom 3-násobnom prepláchnutí v roztoku PBS farbené 5 minút diaminobenzidínom (DAB+, DAKO, Carpinteria, USA). Preparáty boli následne krátko dofarbené hematoxylínom, aby sa zvýraznili jadrá buniek.

Preparáty boli hodnotené vo svetelnom mikroskope. Miera infiltrácie tkaniva zápalovými bunkami s príslušným fenotypom bola hodnotená kvantitatívne v 3 náhodných poliach s použitím histomorfometrického software ImageJ, v. 1.51g (3) a vyjadrená ako percento voči celkovej ploche. Výsledky boli vyhodnotené štatisticky použitím štatistického software Graph Pad Prism s použitím Mann-Whitneyovho neparametrického testu, hodnoty $p<0,05$ boli považované za signifikantné.

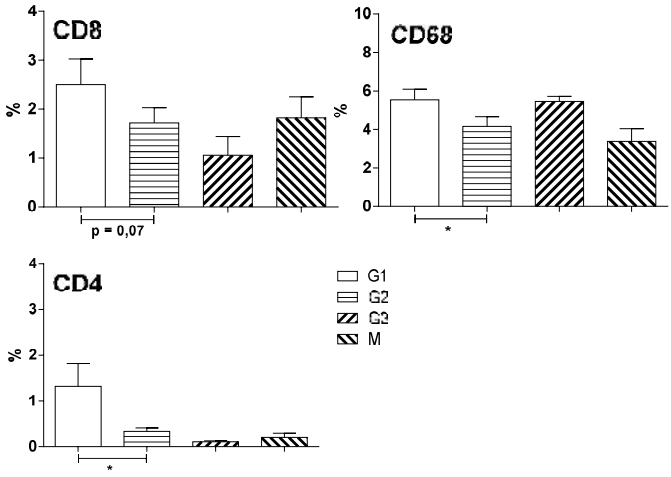
Výsledky

V nádoroch hrubého čreva ako aj v okolitom nepostihnutom tkanive pozorujeme prítomnosť tak CD8+ cytotoxických T-lymfocytov, CD4+ pomocných T-lymfocytov ako aj CD68+ histiocytov, sa dominanciu CD68+ buniek. Podiel jednotlivých buniek sa v závislosti od nádorovej transformácie nemení. So stúpajúcim gradingom nádoru (Tab.1, Obr.1) sme v našom súbore pozorovali signifikantný pokles CD4+ (1,3±0,5% v G1 verzus 0.33±0,08% v G2, $p<0.05$) ako aj CD68+ (5.5±0.56% v G1 verzus 4.1±0,51% v G2, $p<0.05$) zápalových buniek. Pokles CD8+ cytotoxických T-lymfocytov (2.5±0.52% v G1 verzus 1.7±0,3% v G2) bol na hranici štatistickej významnosti ($p=0.07$).

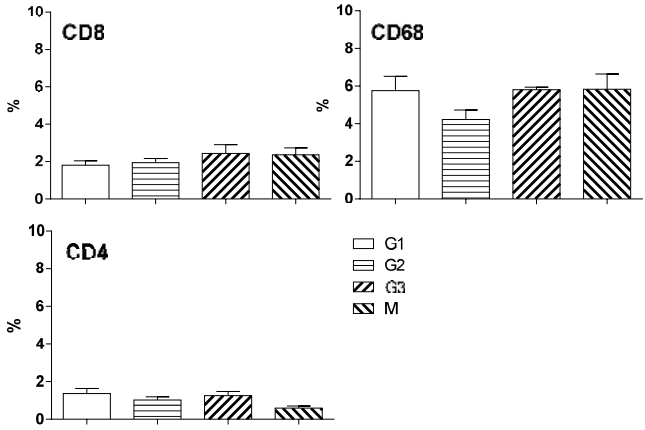
Nepozorovali sme žiadne zmeny v podiele jednotlivých typov lymfocytov v okolitom nádorom nepostihnutom tkanive (Tab.2). Nepozorovali sme odlišný profil zápalových buniek v súvislosti s mucinóznou diferenciáciou nádoru.

Diskusia

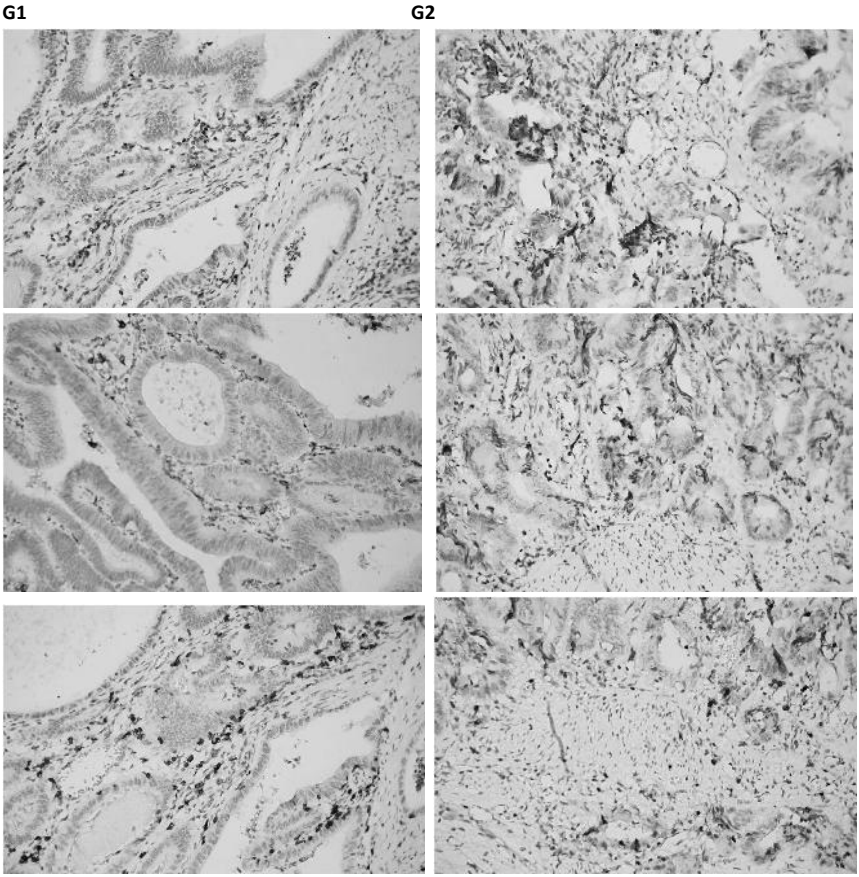
Už dávno sa vie, že imunitný systém hrá dôležitú úlohu v odpovedi organizmu na vývoj nádorov. Solídne tumory, vrátane nádorov hrubého čreva, sú často infiltrované rôznymi bunkami imunitného systému, čo sa potvrdilo aj histopatologickými štúdiami. Vieme, že chronický zápal patrí medzi rizikové faktory vzniku nádorov, čo prispieva k vytvoreniu imunosupresívného prostredia. Na druhej strane samotný nádor môže vyvolať imunitnú odpoveď. Za spúšťanie imunitnej odpovede zodpovedajú antigeny vzniknuté v procese nádorovej transformácie. Mnohé štúdie naznačujú, že množstvo a zloženie imunitných buniek v okolí nádoru môže mať prognostickú rolu. (8, 9)



Tab.1 Prítomnosť zápalových buniek v nádore hrubého čreva v závislosti od gradingu. So stúpajúcim gradingom nádoru sme v našom súbore pozorovali signifikantný pokles CD4+ pomocných T-lymfovytov, ako aj CD68+ histiocytov. Pokles CD8+ cytotoxických T-lymfocytov. * $p<0.05$, uvedené %±SEM



Tab.2 Prítomnosť zápalových buniek v okolitom nádorom nepostihnutom tkanive, v závislosti od gradingu pôvodného nádoru. uvedené %±SEM



Obr.1 Prítomnosť zápalových buniek v nádore hrubého čreva v závislosti od gradingu. So stúpajúcim gradingom nádoru sme v našom súbore pozorovali pokles CD4+ pomocných T- lymfovytov (A), ako aj CD68+ histiocytov (B). Pokles CD8+ cytotoxických T-lymfocytov (C) bol na hranici signifikantnosti

Tumor infiltrujúce lymfocyty (TIL) a makrofágy asociované s nádorom (TAM) sú lokalizované v zápalovom infiltráte nádorových ostrovčekov a taktiež v peritumorovej stróme.

TAM patria medzi dominantné zápalové bunky v nádorovej stróme a správajú sa ako modulátory mikroprostredia pomocou svojich cytokínov, chemokínov, rastových faktorov a angiogénnych faktorov (10). To súhlasí aj s nami pozorovanou dominanciou CD68+ zápalových buniek v nádorovom tkanive. Úloha TAM v nádore je dvojitá. TAM môžeme deliť do dvoch podskupín: M1 makrofágy zabezpečujú protinádorovú odpoveď a cytotoxicitu a makrofágy M2 podskupiny, ktoré naopak potlačením protinádorovej imunitnej odpovedi podporujú rozvoj nádoru (11).

Z TIL majú kľúčovú úlohu cytotoxické T-lymfocyty (CD8), ktoré môžu rozpoznať nádorové antigény prezentované APC bunkami, potom sa aktivujú pomocou kostimulátorových molekúl a následne synetizujú a vylučujú cytotoxické proteíny, tým sa snažia zničiť nádorové bunky. Vysoká hustota CD8 lymfocytov v nádorovom tkanive je spojená s lepšou prognózou ochorenia (10). Je zaujímavejšie v našom súbore sme pozorovali pokles CD8+ lymfocytov, ako aj ostatných pozorovaných zápalových buniek v závislosti od stúpajúceho gradingu s tým aj stúpajúcou agresivitou tumoru. Môže to podporovať predstavu o imunosupresívnom pôsobení nádorového mikroprostredia (4), ktoré môže byť kľúčovým faktorom k progresi choroby a pri vzniku vzdialených metastáz a ktorý bol pozorovaný v iných tumoroch (5). Súvislosť medzi poklesom CD3+ lymfocytov a vyššou agresivitou nádoru bola pozorovaná už v iných štúdiách v karcinóme endometria (13). Výraznejšia imunitná odpoveď koreluje aj s lepším prežívaním pacientov s KRK (14). Práve ovplyvnenie protinádorovej imunitnej reakcie otvára nové možnosti protinádorovej terapie (6).

Chirurgická resekcia je stále najúčinnejšou liečbou kolorektálneho karcinómu. Najmä v prípadoch pokročilého metastázujúceho nádoru, ako aj v prípadoch hereditárnych nádorov je potrebné hľadať aj doplňujúce terapeutické prístupy. Počet vedeckých dôkazov podporujúce dôležitosť imunitnej odpovede pri neoplastických chorobách sa stále zvyšuje. Predložená pilotná štúdia naznačuje, že v súvislosti so zvyšujúcim sa gradingom nádoru dochádza k poklesu intenzity protinádorovej imunitnej odpovede. Tento pokles môže byť následkom, ale aj príčinou progresia tumoru. Ovplyvnenie protinádorovej imunitnej odpovede predstavuje preto veľmi zaujímavý potenciálny terapeutický prístup.

Riešenie úlohy bolo čiastočne podporené projektom APVV-14-0318, „Analýza mikroRNA a charakterizácia expresie vybraných proteínov v cirkadiánnom kontexte ako prognostický biomarker pre kolorektálny karcinóm“

Zoznam použitej literatúry:

1. Schumacher, TN, Schreiber, RD: Neoantigens in cancer immunotherapy. Science 2015; 348(6230): 69-74.
2. Pardoll, DM: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 2012; 12(4): 252-264.
3. Abramoff, MD, Magelhaes, PJ, Ram, SJ: Image Processing with ImageJ. Biophotonics International 2004; 11(7): 36-42.
4. Naidoo, J, Page, DB, Wolchok, JD: Immune modulation for cancer therapy. Br J Cancer 2014; 111(12): 2214-2219.
5. Donahue, T, Lee, CY, Sanghvi, A, et al: Immunosuppression is an independent prognostic factor associated with aggressive tumor behavior in cutaneous melanoma. J Am Acad Dermatol 2015; 73(3): 461-466.
6. Cierna, Z, Mego, M, Miskovska, V, et al: Prognostic value of programmed-death-1 receptor (PD-1) and its ligand 1 (PD-L1) in testicular germ cell tumors. Ann Oncol 2016; 27(2): 300-305.
7. Mlkvá I.: Genetika tumorigenézy nádorov kolorekta (možnosti testovania a screeningovej predikcie dedičnej formy ochorenia – Lynchovho syndrómu) Klin Onkol 2016; 29 (Suppl 1): S55–S 61

8. de la Cruz-Merino L, Henao Carrasco F, Vicente Baz D, Nogales Fernández E, Reina Zoilo JJ, Codes Manuel de Villena M, Pulido EG: Immune microenvironment in colorectal cancer: a new hallmark to change old paradigms. Clin Dev Immunol. 2011;2011:174149
9. Curtis NJ, Primrose JN, Thomas GJ, Mirnezami AH, Ottensmeier CH.: The adaptive immune response to colorectal cancer: from the laboratory to clinical practice. Eur J Surg Oncol. 2012 Oct;38(10):889-96.
10. Colangelo T, Polcaro G, Muccillo L, D'Agostino G, Rosato V, Ziccardi P, Lupo A, Mazzoccoli G, Sabatino L, Colantuoni V: Friend or foe?: The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer. Biochim Biophys Acta. 2017 Jan;1867(1):1-18.
11. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P: Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. Nat Rev Clin Oncol. 2017 Jan 24
12. Ribas, A: Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. Cancer Discov 2015; 5(9): 915-919.
13. Cermakova, P, Melichar, B, Tomsova, M, et al: Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with endometrial carcinoma. Anticancer Res 2014; 34(10): 5555-5561.
14. Ogino, S, Nosho, K, Irahara, N, et al: Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. Clin Cancer Res 2009; 15(20): 6412-6420.

26. Vplyv podávania vitamínu C na vybrané charakteristiky ľudských erytrocytov

Juraj Krajčír, Katarína Kučerová, Jana Laceková
(všeobecné lekárstvo, 3. ročník)
Spoluautori: RNDr. Terézia Kalnovičová, CSc.[1], MUDr. RNDr. Angelika Púzserová, PhD.[2], RNDr. Ľubomíra Tóthová, PhD.[3], MUDr. Mgr. Rudolf Drábek[4]

Školiteľ: MUDr. Jana Radošinská, PhD.[4]
[1]I. neurologická klinika LF Univerzity Komenského v Bratislave, [2]Ústav normálnej a patologickej fyziológie SAV, [3]Ústav molekulárnej biomedicíny LF Univerzity Komenského v Bratislave, [4]Fyziologický ústav LF Univerzity Komenského v Bratislave.

Úvod

Erytrocyty sú krvné elementy potrebné pre výmenu dýchacích plynov. Pre kvalitu mikrocirkulácie a dostatočnú dodávku kyslíka do tkanív je dôležitá schopnosť erytrocytov meniť svoj tvar - deformabilita, nakoľko erytrocyty s priemerom 7,2 µm musia prejsť kapilárami s lúmenom okolo 3 – 4 µm. Táto vlastnosť významným dielom ovplyvňuje životnosť červených krviniek, krvný prietok a hemodynamiku ako takú. Je všeobecne akceptované, že od deformability erytrocytov závisí aj viskozita plnej krvi. Znížená deformabilita erytrocytov môže vyústiť do problémov s perfúziou tkanív, ich okysličením a následne do poškodenia orgánov (1).

Významným faktorom ovplyvňujúcim deformabilitu erytrocytov je produkcia oxidu dusnatého (NO). Tento dôležitý vazodilatant je tvorený nielen cievnym endotelom, ale aj samotnými červenými krvinkami. Inhibícia tvorby NO vedie k poškodeniu deformability erytrocytov, pričom donory NO ju normalizujú (2).

Vitamín C je esenciálna, vo vode rozpustná látka, ktorá sa v organizme podieľa na hydroxylácii prolínu a lyzínu v kolagéne, syntéze karnitínu, metabolizme tyrozínu, ale predovšetkým je veľmi významným antioxidantom. Sú známe práce, ktoré sledovali vplyv vitamínu C na deformabilitu erytrocytov v animálnych modeloch, resp. za *in vitro* podmienok (3, 4). Nie je známy jeho vplyv na deformabilitu erytrocytov a hemoreológiu krvi u ľudí (*in vivo* podmienky). Vzhľadom na túto skutočnosť sme sa v našom experimente zamerali na vplyv 3-týždňového podávania vitamínu C na deformabilitu erytrocytov a produkciu NO v erytrocytoch za súčasného monitorovania vybraných parametrov antioxidačného stavu a oxidačného stresu u zdravých mladých ľudí.

Materiál a metodika

Účastníkmi štúdie boli študenti medicíny obidvoch pohlaví vo veku 20 -33 rokov (n=20), ktorým sa odoberala venózna krv do skúmaviek obsahujúcich EDTA (Sarstedt) na začiatku experimentu a po 3 týždňoch trvajúcom podávaní L-formy vitamínu C (1000 mg/deň, NATURAL, s.r.o., Slovenská republika). Plná krv sa použila na stanovenie produkcie NO v erytrocytoch. Po centrifugácii zvyšnej krvi (850 g, 10 min, 4°C) sa odoberala plazma na biochemickú analýzu vybraných parametrov antioxidačného stavu a oxidačného stresu. Pelet tvorený erytrocytmi sa 3x premýval fyziologickým roztokom za účelom získania frakcie čistých erytrocytov, ktoré sa použili na meranie ich deformability.

Markery peroxidácie lipidov (thiobarbituric acid reactive substances - TBARS) boli merané spektrofotometricky. Z markerov karbonylového stresu boli stanovené produkty pokročilej glykácie (advanced glycation end-products - AGE) a fruktozamín. Pokročilé produkty poškodenia proteínov (advanced oxidation protein products - AOPP) sa merali ako marker oxidačného poškodenia proteínov. Za účelom informácie o antioxidačnom stave sa stanovila celková antioxidačná kapacita plazmy (total antioxidant capacity - TAC) a schopnosť plazmy redukovať železité anióny (ferric reducing antioxidant power FRAP). Pri všetkých meraniach sa postupovalo rovnako ako už bolo publikované (5).

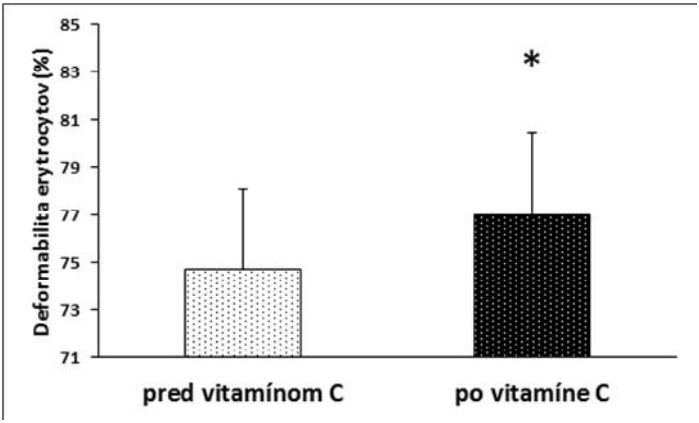
Deformabilita erytrocytov bola stanovená filtračnou metódou a prezentovaná je ako pomer počtu erytrocytov, ktoré prešli cez filter s pórmi o veľkosti 5 µm z celkového počtu erytrocytov pred filtráciou (6). Produkcia NO v erytrocytoch bola vizualizovaná pomocou fluorescenčnej sondy DAF-2 DA (diaminofluoresceín diacetát) a kvantifikácia fluorescenčného signálu bola vyhodnotená v programe ImageJ (6).

Všetky výsledky sú prezentované ako priemer ± smerodajná odchýlka. Normalitu dát sme otestovali Shapiro-Wilkovým testom. Rozdiely v dátach pred a po podávaní vitamínu C sme analyzovali párovým t-testom. Za štatisticky významné sme považovali tie s p hodnotou menšou ako 0,05.

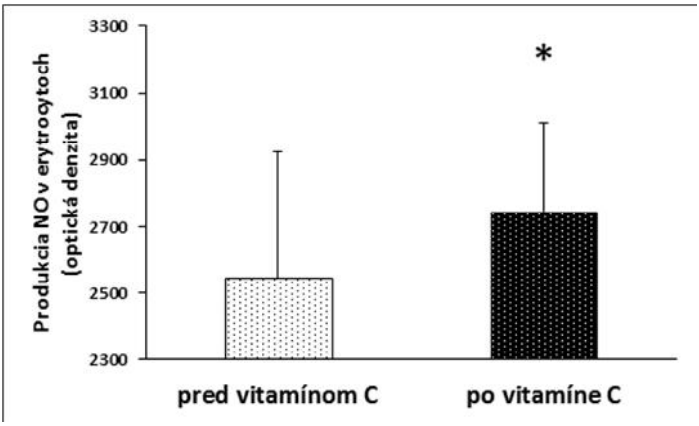
Štúdia bola posúdená a schválená Etickou komisiou LF UK a Univerzitnej nemocnice Bratislava dňa 15.2.2016.

Výsledky

Deformabilita erytrocytov bola po 3-týždňovom podávaní vitamínu C štatisticky významne zvýšená (graf č.1). Pri meraní produkcie NO v erytrocytoch sa po podávaní vitamínu C taktiež zaznamenal jej nárast (graf č. 2). Spomedzi šiestich markerov antioxidačného stavu a oxidačného stresu sme pozorovali signifikantné zmeny len pri fruktozamíne, ktorého koncentrácia v plazme sa po podávaní vitamínu C zvyšovala.



Graf 1: Deformabilita erytrocytov. Štatistická významnosť: *p<0,05 - porovnanie oproti deformabilite erytrocytov pred vitamínom C.



Graf 2: Kvantitatívne vyhodnotenie produkcie NO v erytrocytoch, ktorá je prezentovaná ako integrovaná optická denzita (t.j. suma pixelov v jednotlivých počítačom snímaných obrázkoch). Štatistická významnosť: *p<0,05 - porovnanie oproti produkcii NO v erytrocytoch pred vitamínom C.

Diskusia

V našej práci sme sa venovali účinkom vitamínu C na vybrané vlastnosti ľudských erytrocytov. Od ostatných, v databázach dostupných publikácií, sme sa odlíšili tým, že sme účinok vitamínu pozorovali za *in vivo* podmienok u ľudí. Staršie štúdie preukázali, že vitamín C redukuje mechanickú fragilitu a hemolýzu erytrocytov počas skladovania krvných konzerv (4). Zlepšenie deformability erytrocytov po podávaní vitamínu C bolo pozorované aj v animálnom modeli diabetes mellitus 1. typu (3). Považovali sme však za zarážajúce, že v bežnom živote tak často podávaný vitamín C ešte nikto neskúmal v súvislosti s deformabilitou erytrocytov u ľudí. Na možnú súvislosť medzi vitamínom C a deformabilitou erytrocytov u ľudí nepriamo poukázala len práca Tu a spol. (7), kde autori pozorovali nepriamo úmernú závislosť medzi koncentráciou vitamínu C v plazme a osmotickou fragilitou erytrocytov.

Podarilo sa nám dokázať, že deformabilita erytrocytov sa u mladých a zdravých ľudí po podávaní vitamínu C zlepšuje a táto zmena by mohla mať za následok aj zmeny vo viskozite plnej krvi. Viskozita krvi je totiž deformabilitou erytrocytov veľmi ovplyvnená (8).

Zlepšenie deformability erytrocytov po podávaní vitamínu C v našom experimente môže byť prinajmenšom čiastočne vysvetlené zvýšenou produkciou NO v erytrocytoch. Podobný priaznivý efekt na deformabilitu erytrocytov sprostredkovaný zvýšenou aktivitou NO-syntázy v erytrocytoch sa pozoroval u ľudí po fyzickej aktivite (9)

Parametre funkčnosti erytrocytov sme sledovali za súčasného monitorovania šiestich vybraných markerov antioxidačného stavu a oxidačného stresu, nakoľko nami podávanú dávku (1000 mg vitamínu C/deň) považujeme za vyššiu a vitamín C okrem svojho antioxidačného účinku môže za takýchto okolností pôsobiť aj prooxidačne. Za zaujímavé považujeme, že aj keď vitamín C v našom pokuse zvyšoval koncentráciu fruktozamínu v plazme, ostatné efekty vitamínu C môžeme označiť za „erytroprotektívne“.

Záverom by sme si dovolili zhrnúť, že 3-týždňové podávanie vitamínu C zdravým mladým ľuďom vylepšilo deformabilitu erytrocytov a produkciu NO v erytrocytoch. Tieto výsledky poukazujú na možné zlepšenie kvality mikrocirkulácie, ako aj hemoreológie vo veľkých cievach, po podávaní vitamínu C.

Hlavným sponzorom a donorom vitamínu C bola spoločnosť NATURAL s.r.o., veľkoobchod s výživovými doplnkami. Materiálne zabezpečenie výskumu bolo možné aj vďaka grantu VEGA SR 1/0032/14. Naše poďakovanie taktiež patrí laborantkám Fyziologického ústavu LF UK Dagmar Cigánekovej, Helene Bacigálovej a Jane Méryovej za vynikajúcu technickú podporu.

Zoznam použitej literatúry:

1. Radosinska J, Vrbjar N: The role of red blood cell deformability and Na,K-ATPase function in selected risk factors of cardiovascular diseases in humans: focus on hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia. Physiol Res 2016; 65: S43-54.
2. Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK: Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284: H1577-84.
3. Comu FM, Ozturk L, Alkan N a spol.: Investigation of the effects of propofol and vitamin C administration on erythrocyte deformability in rats with streptozocin-induced diabetes mellitus. Bratisl Lek Listy 2014; 115(7): 400-4.
4. Raval JS, Fontes J, Banerjee U, Yazer MH, Mank E, Palmer AF: Ascorbic acid improves membrane fragility and decreases hemolysis during red blood cells storage. Transfus Med 2013; 23(2): 87-93.
5. Janšakova K, Babíčkova J, Havrlentova M, Hodosy J, Kraic J, Celec P, Tothova L: The effects of anthocyanin-rich wheat diet on the oxidative status and behavior of rats. Croat Med J 2016; 57(2): 119-29.
6. Radosinska J, Mezesova L, Okruhlicova L, Frimmel K, Breierova E, Bartekova M, Vrbjar N: Effect of yeast biomass with high content of carotenoids on erythrocyte deformability, NO production and Na,K-ATPase activity in healthy and LPS treated rats. Clin Hemorheol Microcirc 2016; 64(2): 125-134.
7. Tu H, Li H, Wang Y, Niyyati M, Wang Y, Leshin J, Levine M: Low Red Blood Cell Vitamin C Concentrations Induce Red Blood Cell Fragility: A Link to Diabetes Via Glucose, Glucose Transporters, and Dehydroascorbic Acid. EBioMedicine 2015; 2(11): 1735-50.
8. Chien S: Determinants of blood viscosity and red cell deformability. Scand J Clin Lab Investig 1981; 41(S156): 7–12.
9. Suhr F, Brenig J, Müller R, Behrens H, Bloch W, Grau M: Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway. PLoS One 2012; 7(9): e45982.

27. Aeróbny a silový tréning špecificky ovplyvňujú hladiny vybraných bioaktívnych molekúl v cirkulácii a ich zmeny v odpovedi na akútnu fyzickú záťaž

Mikuláš Štofaňák
(všeobecné lekárstvo, 5. ročník)
Spoluautori: Mgr. Silvia Vallová,[1] Mgr. Zuzana Janáková,[1] Mgr. Denisa Maderová,[2] Mgr. Patrik Krumpolec,[2] prof. Mgr. Erika Zemková, PhD.,[3]Prof. MUDr. Dušan Hamar, PhD.,[3] Mgr. Jozef Ukropec, DrSc.,[2]doc. MUDr. Barbara Ukropcová, PhD.[1,2]

Školiteľ: doc. MUDr. Barbara Ukropcová, PhD.[1,2]
[1] Ústav patologickej fyziológie, Lekárska Fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava; [2]Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava; [3] Fakulta Telesnej Výchovy a Športu, Univerzita Komenského, Bratislava

Úvod

Cvičenie je účinný prostriedok prevencie a liečby mnohých chronických ochorení, avšak molekulárne mediátory a mechanizmy benefičných účinkov rôznych typov tréningu na zdravie sú len relatívne málo preskúmané. MikroRNA (miRNA) sú malé, 18-25 nukleotidové endogénne nekódujúce RNA, ktoré regulujú génovú expresiu na posttranskripčnej úrovni, a to prostredníctvom degradácie cieľovej mRNA alebo inhibíciou proteínovej translácie. Odhaduje sa, že miRNA regulujú 2/3 genómu, pričom jedna molekula miRNA môže priamo alebo nepriamo ovplyvniť stovky mRNA a proteínov. Takáto komplexná regulácia má veľký potenciál významne ovplyvniť mnohé fyziologické aj patofyziologické procesy(1).

MikroRNA sa v orgánoch a tkanivách podieľajú na regulácii širokého spektra fyziologických procesov, ku ktorým patria proliferácia, diferenciácia, metabolizmus, apoptóza či adaptácia na rôzne stimuly. Svalovo-špecifické mikroRNA významne ovplyvňujú vývoj, funkciu ako aj vznik ochorení kostrového svalstva a podieľajú sa aj na adaptácii svalu na cvičenie. V našej predchádzajúcej práci sme sledovali vplyv akútneho a pravidelného cvičenia na myokín irisín v cirkulácii a v kostrovom svale(2). Mozgový neurotrofický faktor, BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) je neurotrofín a myokín, ktorý je modulovaný aj fyzickou aktivitou a pokladá sa za jedného z koordinátorov komplexnej odpovede organizmu na cvičenie. BDNF môže byť regulovaný aj prostredníctvom niektorých svalovo-špecifických mikroRNA(3).

Cieľom našej štúdie je porovnať vplyv akútneho silového zaťaženia s proprioceptívnou stimuláciou na špecifické molekulárne parametre v cirkulácii u aeróbne alebo silovo trénovaných športovcov.

Materiál a metodika

Protokol štúdie bol schválený príslušnými etickými komisiami (Univerzitná nemocnica Bratislava UK, FTVŠ UK) a je v súlade s Helsinskou deklaráciou z roku 2000. Všetci probandi pred zaradením do štúdie podpísali informovaný súhlas.

Populáciu štúdie predstavujú 2 skupiny probandov: 1. aeróbne trénovaní vrcholoví športovci (triatlon, n=7), 2. silovo trénovaní vrcholoví športovci (cross fit, n=8). Telesné zloženie sme stanovili

pomocou kvadrupedálnej bioimpedancie (OMRON, Japonsko). Všetci športovci boli muži s priemerným vekom 23,53±0,73 rokov; BMI 23,86±0,56 kg/m^2; telesný tuk 18,06±1,08%, netuková telesná hmota 40,85±0,68% a viscerálny tuk 5,47±0,54%. Porovnanie aeróbne a silovo trénovaných športovcov je zhrnuté v tabuľke 1. Individuálne charakteristiky probandov sú uvedené v tabuľke 2

Tabuľka 1 Charakteristika individuálnych probandov.

	Trénovanosť	**Hmotnosť** [kg]	**BMI** [kg/m^2]	**Tuk** [%]	**Netuková svalová hmota** [%]	**Viscerálny tuk** [%]	**RMR** [kcal]
1	aeróbna	71,0	21	13,4	43,1	3	1656
2	aeróbna	82,0	22,7	19,6	39,3	4	1794
3	aeróbna	62,4	19,3	8,5	46,5	1	1556
4	aeróbna	88,1	23,2	20,3	38,2	5	1855
5	aeróbna	70,2	22,2	18,9	39,5	4	1628
6	aeróbna	86,6	26,4	23,1	38	8	1871
7	aeróbna	86,2	24,8	24,3	37	6	1853
8	silová	69,0	22,3	15,5	43,2	4	1656
9	silová	80,4	24	13	43,8	5	1801
10	silová	82,6	26,1	20,9	39,8	8	1832
11	silová	75,1	26	18,2	42,1	8	1750
12	silová	80,6	23,3	19,3	39,4	5	1771
13	silová	73,7	23,8	16,9	41,8	6	1706
14	silová	89,0	26,6	22	38,7	8	1908
15	silová	78,5	26,2	17	42,4	7	1792

BMI, Body Mass Index – Index telesnej hmotnosti; RMR, Resting Metabolic Rate – bazálny metabolizmus

Ráno v deň testu bola probandom do kubitálnej žily zavedená kanyla. Akútnu fyzickú záťaž predstavovala silová záťaž s opakovanou proprioceptívnou stimuláciou, 5x8 opakovaní s 2 minútovým intervalom odpočinku medzi opakovaniami a s frekvenciou 5 Hz. Akútna záťaž sa realizovala na lineárnom horizontálnom dynamometri typu leg press(4). Vzorky krvi boli odobraté pred cvičením v stave nalačno (bazál, 30 minút po kanylácii), ihneď po ukončení cvičenia (0 minúta), v 8 minúte a v 30 minúte po cvičení. Odobraté vzorky krvi sa centrifugovali bezprostredne po odbere (EDTA plazma: 3000g, 10min, 4°C) resp. po 30 minútach státia pri izbovej teplote (sérum: 3000g, 20min, 4°C). Vzorky séra a plazmy boli zamrazené do ďalšieho spracovania na -80°C. Sérum sa použilo na izoláciu mikroRNA, plazma na stanovenie BDNF (ELISA, Millipore).

Na izoláciu mikroRNA zo séra sme použili miRNeasy Mini Kit (Qiagen). Prepis do cDNA sme realizovali pomocou miScript II RT Kit (Qiagen), preamplifikáciu pomocou miScript PreAMP Kit (Qiagen). Vybrané mikroRNA sme kvantifikovali metódou real-time PCR a normalizovali na referenčný gén so stálou expresiou (miRNA-39) metódou delta CT.

Výsledky sme vyhodnocovali s použitím statistickeho softwaru JUMP. Použili sme testy one way ANOVA, párový a nepárový t-test. Hladina štatistickej významnosti bola stanovená na úrovni $p<0,05$.

Výsledky

Aeróbne a silovo trénovaní vrcholoví športovci mali porovnateľný vek a antropometrické parametre. Nezaznamenali sme štatisticky významný rozdiel v BMI, telesnom tuku, netukovej telesnej hmote a viscerálnom tuku medzi skupinou aeróbne a silovo trénovaných vrcholových športovcov (p>0,1) (tabuľka 2).

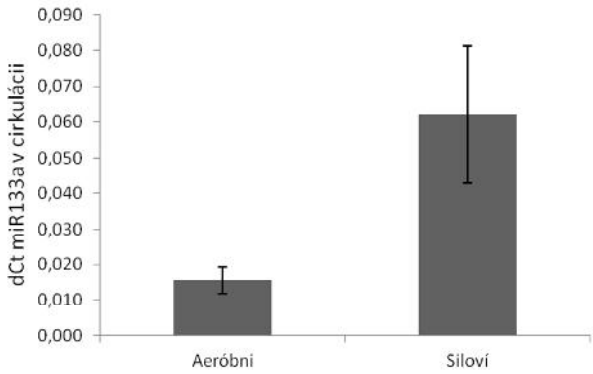
Tabuľka 2 Charakteristika populácie štúdie.

	Aeróbna trénovanosť	**Silová trénovanosť**
Vek [roky]	24,14 ±1,28	23±0,82
BMI [kg/m^2]	22,80±0,89	24,78±0,57
Telesný tuk [%]	18,30±2,10	17,85±1,03
Netuková telesná hmota [%]	40,23±1,28	41,40±0,66
Viscerálny tuk [%]	4,43±0,84	6,38±0,56
RMR [kcal]	1744,71±48,64	1777±27,20

Hodnoty sú uvedené ako priemer ± smerodajná odchýlka. BMI, Body Mass Index – Index telesnej hmotnosti; RMR, Resting Metabolic Rate – bazálny metabolizmus.

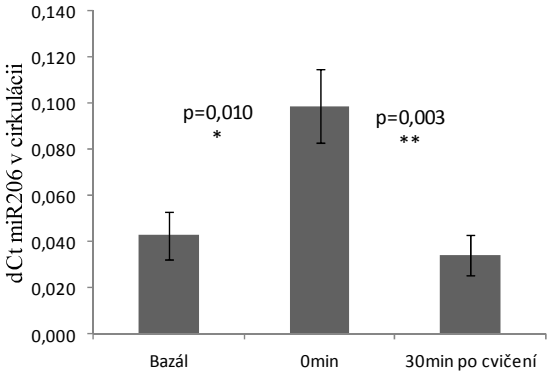
Zmeny vybraných mikroRNA v cirkulácii.

Pozorovali sme signifikantne vyššie hladiny mikroRNA-133a v cirkulácii v bazálnom stave (nalačno pred cvičením) u silovo trénovaných (cross fit) športovcov v porovnaní s aeróbne trénovanými (triatlon) vrcholovými atlétmi (p<0,05) (Graf1). Hladiny mikroRNA-206 v cirkulácii boli porovnateľné medzi aeróbne a silovo trénovanými atlétmi, nezaznamenali sme štatisticky signifikantný rozdiel (p>0,05).



Graf 1 Aeróbne trénovaní vrcholoví športovci: triatlon, n=7.
Silovo trénovaní vrcholoví športovci: cross fit, n=8. MikroRNA je normalizovaná na referenčnú mikroRNA-39. Hladina štatistickej významnosti p=0,03. Akútnu záťaž predstavovalo silové zaťaženie s proprioceptívnou stimuláciou na lineránom leg-press dynamometri.

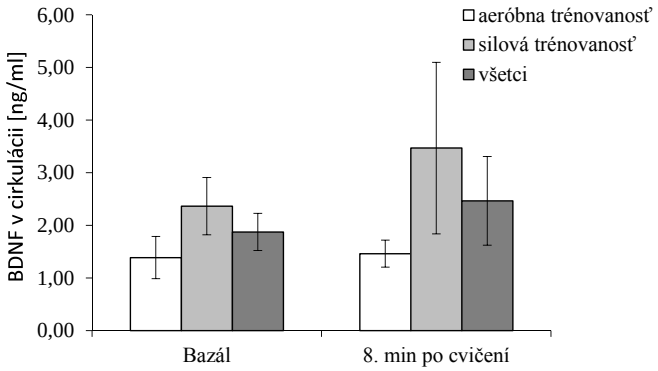
Hladiny svalovo-špecifickej mikroRNA-206 boli ovplyvnené akútnou fyzickou záťažou špecificky u aeróbne trénovaných vrcholových športovcov, u ktorých sme zaznamenali 2,5-násobné zvýšenie mikroRNA-206 bezprostredne po cvičení a návrat k pôvodným hodnotám v 30 minúte po cvičení (Graf2). MikroRNA-206 nebola vplyvom akútneho cvičenia zmenená u silovo trénovaných atlétov. Akútne cvičenie malo tendenciu znižovať hladiny mikroRNA-133a v cirkulácii u silovo trénovaných atlétov v bazálnom stave nalačno pred cvičením (0,062±0,019 vs. 0,017±0,014) ako aj v 30 minúte po cvičení, kedy sme zaznamenali 6-násobný pokles (0,062±0,019 vs. 0,009±0,02). Zmeny však neboli štatisticky signifikantné (p>0,05), čo môže súvisieť s nízkym počtom probandov a so značnou heterogenitou v rámci skupiny. MikroRNA-133 sa vplyvom akútnej záťaže nemenila u aeróbne trénovaných športovcov.



Graf 2 Vplyv akútnej fyzickej záťaže na hladiny mikroRNA-206 v cirkulácii u aeróbne trénovaných športovcov. Akútnu záťaž predstavovalo silové zaťaženie s proprioceptívnou stimuláciou na lineránom leg-press dynamometri. MikroRNA je normalizovaná na referenčnú mikroRNA-39. n=7/6/7 na skupinu (bazál pred cvičením / 0´ - bezprostredne po cvičení / 30´ - 30 minút po cvičení).

Zmeny neurotrofínu BDNF v cirkulácii.

Akútne cvičenie signifikantne nemenilo hladiny BDNF v cirkulácii (graf 3). Absencia významných zmien môže súvisieť s relatívne krátkym trvaním záťaže ako aj s malým množstvom probandov v skupine, čo predstavuje limitáciu štúdie.



Graf 3 Vplyv akútnej fyzickej záťaže na hladiny BDNF v cirkulácii u aeróbne a silovo trénovaných vrcholových športovcov.
Akútnu záťaž predstavovalo silové zaťaženie s proprioceptívnou stimuláciou na lineránom leg-press dynamometri. n=6 probandov na skupinu. BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor - mozgový neurotrofický factor. p>0,05.

Asociácie medzi mikroRNA, antropometrickými parametrami a BDNF.
Pozorovali sme negatívnu koreláciu medzi mikroRNA-133a a množstvom viscerálneho tuku (r=-0,84; p=0,016) a BMI (r=-0,79; p=0,034), a to špecificky u aeróbne trénovaných športovcov. Pozorovali sme tendenciu k asociácii medzi BDNF a Hladiny mikroRNA-133a v cirkulácii mali tendenciu pozitívne korelovať s hladinami neurotrofínu BDNF (r=0,56; p=0,07).

Diskusia
Aeróbne aj silové cvičenie vyvolávajú adaptačné zmeny v kostrovom svale a v iných orgánoch a tkanivách, ktoré sú do určitej miery charakteristickú pre daný typ tréningu. Špecifické zmeny potenciálnych molekulárnych mediátorov fyziologických účinkov aeróbneho a silového tréningu sú však zatiaľ len málo preskúmané.

V našej práci sme pozorovali vyššie bazálne hladiny mikroRNA-133a v cirkulácii u silovo trénovaných vrcholových športovcov (cross fit) v porovnaní s vrcholovými aeróbnymi atlétmi (triatlon), a nezistili sme rozdiely v mikroRNA-206. V predchádzajúcich štúdiách nepozorovali rozdiely v týchto mikroRNA v cirkulácii u silovo vs. aeróbne trénovaných atlétov. MikroRNA však na rozdiel od nás stanovovali v plazme, nie v sére, a typ silového tréningu bol odlišný. MikroRNA-133a zvyšuje proliferáciu myoblastov a môže sa podieľať na svalovej hypertrofii v odpovedi na silový tréning (5).

Zaujímavým zistením bolo zvýšenie hladín svalovo-špecifickej mikroRNA-206 v cirkulácii vplyvom akútnej fyzickej záťaže špecificky u aeróbne trénovaných atlétov. MikroRNA-206 sa podieľa na regenerácii svalu a je vo vyššej miere exprimovaná v oxidatívnych svalových vláknach(6). Jej zvýšenie môže súvisieť práve s vyšším obsahom tohto typu vláken vo svaloch triatlonistov. V štúdiách pozorovali zvýšenie mikroRNA-133a v cirkulácii bezprostredne po maratóne. Absencia podobnej zmeny v našej štúdii môže súvisieť so špecifickým krátkotrvajúcim zaťažením.

Neurotrofín a myokín BDNF zohráva dôležitú úlohu ako mediátor integrovanej odpovede na cvičenie, a to na úrovni kostrového svalu aj v CNS (7). V našej štúdii sme nepozorovali signifikantné zmeny v hladinách BDNF v plazme, čo môže byť spôsobené relatívne krátkym stimulom ako aj jeho špecifickým charakterom (silové cvičenie s opakovanou proprioceptívnou stimuláciou).

Asociácia medzi cirkulujúcim BDNF a mikroRNA-133a naznačuje existenciu spoločných regulačných mechanizmov, nedá sa vylúčiť ani priama regulácia mikroRNA-133a prostredníctvom BDNF, prípadne naopak. Úloha mikroRNA v regulácii BDNF či iných bioaktívnych molekúl a v sprostredkovaní adaptačnej odpovedi organizmu na cvičenie bude vyžadovať ďalší výskum.

Práca bola podporená grantom Európskej federácie na výskum diabetu (EFSD-Lilly Research Fellowship 2010, BU) a grantom agentúry VEGA 2/0174/12 (BU).

Zoznam použitej literatúry:

1. Zhong X, Coukos G, Zhang L. : miRNAs in human cancer. Methods Mol Biol. 2012;822:295-306
2. Kurdiova T, Ukropec J, Ukropcova B. a spol. : Effects of obesity, diabetes and exercise on Fndc5 gene expression and irisin release in human skeletal muscle and adipose tissue: in vivo and in vitro studies.J Physiol. 2014 Mar 1;592(5):1091-107
3. Andrie Koutsoulidou, Nikolaos P Mastroyiannopoulos, Denis Furling, James B Uney and Leonidas A Phylactou: Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. BMC Dev Biol. 2011; 11: 34.
4. Dušan Hamar: Universal Linear Motor Driven Leg Press Dynamometer and Concept of Serial Stretch Loading. Eur J Transl Myol. 2015 Aug 24; 25(4): 215–219.
5. Kirby TJ, McCarthy JJ.: MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation. Free Radic Biol Med. 2013 Sep;64:95-105
6. Shu Fang Cui, Wei Li,Jie Niu, a spol.: Acute responses of circulating microRNAs to low-volume sprint interval cycling. Front Physiol. 2015; 6: 311.
7. Erickson KI1, Voss MW, Prakash RS a spol.: Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Feb 15;108(7):3017-22

28. Student to student tutorial project in Physiology

Athina Ioanna Daponte, Amiria Dal Grande, Yuki Senoo, Fabian Schmitt
(General medicine, 4th year; general medicine, 4th year; general medicine 2nd year, general medicine 3rd year)

Supervisor: MUDr. Silvia Hnilicova, PhD.[1]
[1] Institute of Physiology, Comenius University Bratislava

Introduction

Student-to-Student Project (S2S) was developed by international students of Faculty of Medicine, Comenius University, to offer tutorials for younger classmates in near to peer teaching as a support of medical students who are one or more years senior to another trainee. The uniqueness of the project is that preclinical near to peer education is in literature rare, especially in Physiology and not commonly involves integration of preclinical and clinical skills (1-4).

S2S aimed to provide support for students with studying the most difficult topics as a supplementary class beside the full Course Physiology taught by the Faculty. The most important asset offered in the tutorial was the recent experience of the same material which had been studied by senior students for the same exam before. New innovative teaching methods were used in order to achieve higher level of understanding by increasing internal motivation of the participants.

The project is also beneficial for students-leaders since teaching is an important skill for future residency training and practice as an additional qualification.

Faculty and University as a whole can benefit from S2S by involving English speaking students to provide opportunities for them to participate at university activities.

Material and methods

The S2S program comprised of 4 tutorials in the first semester, delivered by senior medical students supervised by MUDr. Silvia Hnilicova, PhD. The selection of leaders was performed; criteria included great leadership skills, great academic performance, great motivation and willingness to teach determined by interview.

During the first semester 4 topics where taught: Blood, Nerve, Muscle, Respiratory, Gastrointestinal Physiology and Nutrition by minimum 2 student leaders according to the existing faculty's syllabus provided by the Institute of Physiology. Each session's goal was to revise the existing knowledge acquired from lectures and practicals and most importantly to enhance internal motivation for learning.

Additionally, student leaders provided information and instructions of how to study for test questions, exams, introduced new ways of studying in order to contextualize knowledge.

All sessions were conducted at the Simulation Center. Simulators as manikins and OSCE were used as an innovative idea and were well accepted by majority of students. Also other materials were used as online videos, handouts (printed revision of important points), power-point presentations and live experiments in Physics.

To evaluate both the students' and tutors' experiences after each of the S2S lectures, 3 different types of questionnaires for younger students were prepared; 1) Overall tutorial evaluation 2) Rating the lecture quality and the tutors and 3) Evaluation of tutorial helpfulness in post-test period.

The senior students filled the questionnaire to evaluate their personal experience.

Results

Preclinical students received 4 structured, three hour-long, evening tutorials for each module by 11 tutors. Two groups of preclinical students were taught in two different times. For each topic 2 sessions were held in Simulation Center.

20 anonymous answers (n=20) were collected from the 2nd year students who attended the tutorial. The answers to the questionnaire of the final tutorial evaluation are shown in Fig.1. In total 90% of the students answered that attending S2S tutorial helped them studying physiology. Furthermore, 85% indicated that it was worthwhile to attend and they would like to participate again. For 85% of students, tutorials increased their motivation to study.

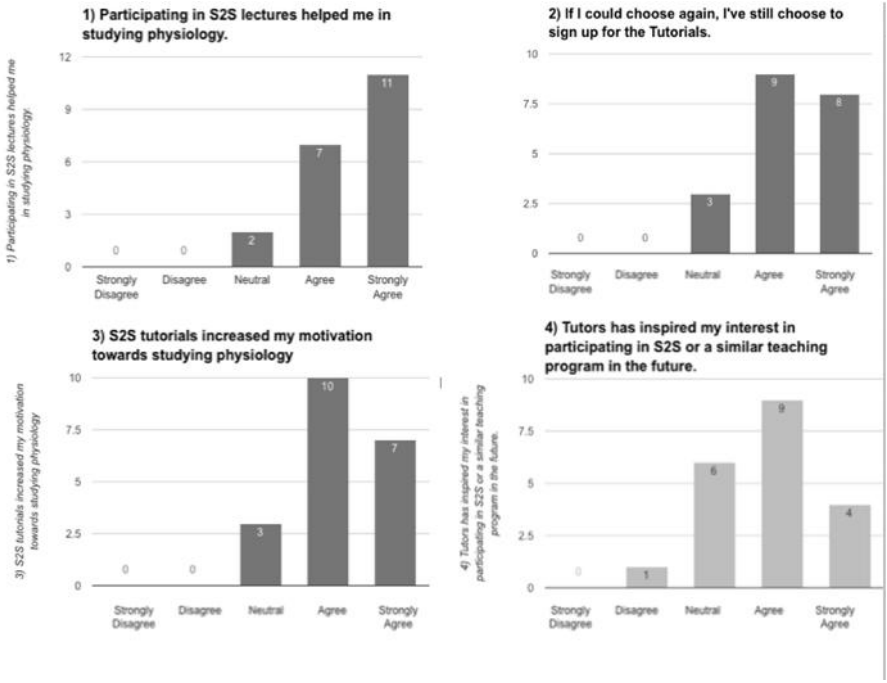


Fig. 1 Students' final evaluation

In total, 9 senior students (n=9) participated as tutor in S2S. 6 female students and 3 male students participated in the tutorial and the median year of the study was 4th academic year.

The categories of their questionnaire for tutors was divided into 3 groups; investigation of tutors' approach of learning, the evaluation of S2S tutorial experience as the tutor and the recommendation of change. 66.7% (n=6/9) students spent more than 10h for the preparation for the tutorial and other 33.3% (n=3/9) answered they spent 6-9h to prepare. The level of understanding in the subject of the tutors increased, to the question "Do you feel that you have obtained the better knowledge/understanding in the topic participated as a tutor?" 100% of the students answered "Yes". Level of understanding and preparedness among students and also due to the time limitation,

setting the priority in the knowledge to be transformed to the students were considered to be the key of successful lecture. 66.7% considered framework of understanding the whole topic as focus in their teaching, followed by pathophysiological explanation, explanation for the difficult part and other which all of these three were 11.1% each.

Discussion

S2S teaching program aimed to enhance student's inner motivation towards studying, to contextualize and integrate pre-clinical subjects also with their clinical use and gain the important information necessary for the finals. Subjective data in our study show that S2S succeeded in reaching the previous set goals and this becomes apparent with tutee feedback. It shows that tutorials helped in increasing their motivation towards studying and understanding (over 85% and 90% respectively).

Pre- clinical medical education is a vast field and not many initiatives like S2S exist so far (4-7). There are near-pear teaching programs in medical universities, but they mostly focus on one single preclinical Subjects, (e.g. Anatomy) or on clinical knowledge (suturing courses, history-taking courses) and also did not base on the students' idea who voluntarily and out of their own initiative supported by mentor teacher decided to contribute to the education of their peers. The evaluated data showed that near-peer teaching was shown to be beneficial for the outcome of the training.

The fact that tutors have recently went through the same process of learning while facing the same problems and anxieties, prepared them to better understand the tutees needs.

Medical teaching at our Faculty teaches preclinical subjects in isolation. Therefore, it imposes high cognitive demands on the student in order to integrate the subjects. Studies in this field showed that it was beneficial to provide more compact information during tutorials rather than the vast available literature (7).

The contextualization and integration of clinical knowledge with clinical cases was perceived as helpful by tutees. The aim was to introduce them to clinical and critical thinking and to apply the knowledge they already gained. This practical application helps to memorize and contextualized and enhances tutees inner motivation towards studying.

Moreover, benefits to tutors delivering near-peer teaching are well established. These range from skill and knowledge development to identity formation.

This is also homogenous with our collected data from feedback forms. All of the tutors felt that they increased and deepened their knowledge in the topic they prepared. Furthermore, tutors were able to gain experience in the field of teaching and to cope with direct or indirect feedback from their tutees. This could be on the one hand challenging but on the other hand it increases tutors' personal growth, identity and self-reflection.

As the project is carried out by students, concerns about quality and content of the tutorials may exist. Therefore, provided materials and content was supervised before each session by MUDr. Silvia Hnilicova, PhD. to ensure the high quality of provided information during the sessions. Furthermore, different educational styles were discussed in meetings and sessions of tutors with the supervisor of the project Dr. Hnilicova to enhance knowledge in the field of medical education.

Tutors reflected that they found it difficult to cover all information in the given time frame and this was also proven by students' feedback forms, in which they commented upon the length of the tutorials. It might be beneficial for the outcome and satisfaction of future tutorials to shorten the duration of the sessions.

Furthermore, tutors perceived it difficult to support all students equally in a heterogeneous group. Those who already obtained basic knowledge in the topic were ready for clinical cases and those who needed more explanation upon physiological principles halted the learning process of the other tutees. A possible solution for future tutorials could be, instead of providing two identical tutorials at different dates, to provide two different sessions. One focuses on physiological principles serving to enhance understanding and deepening of the preclinical knowledge, the other focuses on clinical cases and problems which covers only a short revision of physiological principles of the topic. This could further enhance the efficacy of the S2S tutorials and would enable the tutors to provide better support for individual students.
The ultimate aim for the program is to be continued in the future and to provide the opportunity for students to take initiative and discover creativity in medical education.

Conclusion

S2S was successfully established as a pilot program in near-to peer teaching at the Comenius University in Bratislava. From the results it can be concluded that the initial goals were fulfilled.
Future plans include extending the program also to the Slovak speaking program in order to involve the whole university and give equal opportunities for all students.
S2S is aimed to be continued in the future and should provide the opportunity for students, to not only attend the university but to be an active part of it.

References:

1. Bulte, C., et al.: Student teaching: views of student near-peer teachers and learners. 2007. Med Teach 29(6): 583-590.
2. Finn, G. M. and J. Garner:Twelve tips for implementing a successful peer assessment. 2011. Med Teach 33(6): 443-446.
3. Mayer, A. P., et al.: Long-term follow-up of a facilitated peer mentoring program. 2014 Med Teach 36(3): 260-266.
4. Yu, T. C., et al. : Medical students-as-teachers: a systematic review of peer-assisted teaching during medical school. 2016 Adv Med Educ Pract 2: 157-172.
5. Oliver, S. W., et al. :Near-peer teaching adds value to undergraduate medical education.2016 Med Teach 38(3): 317.
6. Qureshi, Z. U., et al. :Perceived tutor benefits of teaching near peers: insights from two near peer teaching programmes in South East Scotland.2013. Med Teach 35(3): 261-262.
7. Sammaraiee, Y., et al.:Peer-assisted learning: filling the gaps in basic science education for preclinical medical students. 2016 Adv Physiol Educ 40(3): 297-303.

29. Aplikácia Human Anatomy VR do Virtuálnej Anatomickej Učebne (VAU)

Autori: Tomáš Brngál[1], Bc.Miloš Svrček[2], Tung Cao Thanh[3]

Spoluautori: doc. MUDr. Eliška Kubíkova, PhD. [4], Bc. Michal Tkáč[5] , Bc. Filip Šandor[6], Bc. Lukáš Miškovský[6] ,Vojto Pozsonyi[7], Patrícia Drobná[8], MUDr. Jana Jakimová[4], Mgr. Vladislava Zohdi, PhD. [4]

([1]Všeobecné lekárstvo, 6.ročník; [2]FEI STU, 5.ročník; [3]Všeobecné lekárstvo, 1.ročník, [4] Anatomický ústav LFUK, [5]FF VŠMÚ, [6]FIIT STU, [7]Zubné lekárstvo,6.ročník, [8]Všeobecné lekárstvo, 2.ročník)

Školiteľ: MUDr. Andrej Thurzo, PhD.[1]

[1]Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LF UK a OÚSA, Bratislava

Úvod

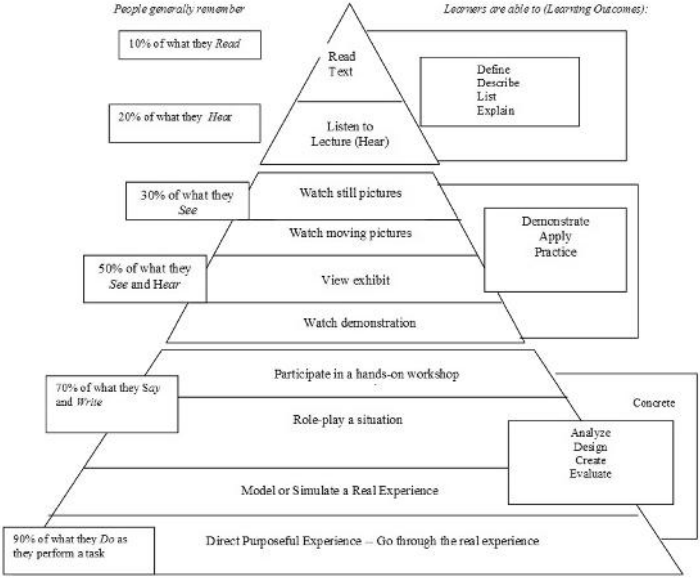
Virtuálna realita

Pojem virtuálna realita sa v poslednom čase čoraz viac dostáva do povedomia. Virtuálna realita je počítačom vytvorené prostredie, ktoré napodobňuje reálny svet alebo ho upravuje podľa požiadaviek pre danú oblasť využitia. Zmyslom virtuálnej reality je nahradenie znakov reálneho prostredia digitálnymi. Používateľ vníma prostredie zmyslami, najmä sluchom a zrakom. Interakciu s užívateľom zabezpečuje touchpad headsetu a zariadenie vytvárajúce 3D prostredie (v tomto prípade grafický čip smartfónu). [1]

Vzdelávanie vo virtuálnej realite

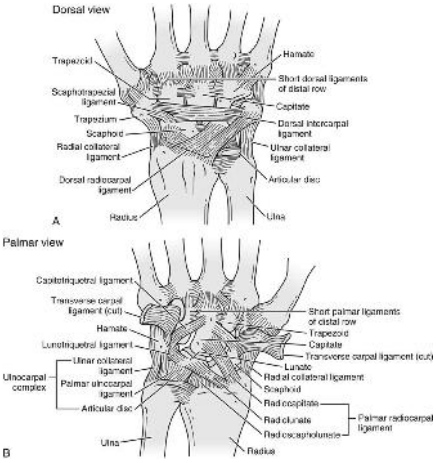
Spojenie technológií so vzdelávaním robí štúdium zaujímavejším a zároveň ho môže aj uľahčiť. Dnešní študenti často radi pri štúdiu využívajú e-learning, online kurzy, inštruktážne videá, aplikácie a pod. Ďalším krokom môže byť výučba vo virtuálne realite. Niekoľko škôl už VR technológiu začalo využívať. Prvé virtuálnu realitu začali využívať stredné školy a univerzity technického zamerania a architektúry [4], napr. stredná škola *Seven Oaks* alebo *Stanfordova univerzita* [5]. K prvým univerzitám na Slovensku patrí *Slovenská Technická Univerzita* (FIIT, FEI) a *Univerzita Komenského* (LF), na ktorej sme pomocou spoločností *Samsung*, *Virtual Medicine* a *Nadácie Tatrabanka* zriadili prvú virtuálnu anatomickú učebňu (VAU) [6]. V učebni sa študenti medicíny môžu učiť z aplikácie *Human Anatomy VR*. Táto aplikácia sa stala aj prvou plnohodnotnou VR anatomickou aplikáciou na mobilnej VR platforme. Sme presvedčení, že virtuálna realita má obrovské využite vo vzdelávaní a dokáže veľmi pomôcť pri výučbe. Podľa schémy vytvorenej Edgardom Daleom [7] si človek po dvoch týždňoch dokáže zapamätať 10 % z počutého, 20 % z čítaného a až 90% z toho, čo robil alebo simuloval. Nižšie vidíme celú schému:

Obr. 1 Schéma Edgara Dalea



Na základe týchto poznatkov by si študent s pomocou VR mohol zapamätať až 90% informácií. Z tohoto dôvodu predstavuje výučba vo VR pre študentov vysokých škôl veľkú výhodu. My sme sa zamerali na vzdelávanie študentov medicíny. Problémom pri učení anatómie môžu byť na priestorovú predstavivosť ťažkopádne klasické anatomické atlasy. Ako príklad uvádzame nižšie zobrazený obrázok anatómie zápästných ligament [8].

Obr. 2 Anatómia zápästných ligament



Pre študenta, ktorý s anatómiou len začína, môže byť náročné sa v týchto štruktúrach priestorovo zorientovať. Ďalším problémom môže byť aj možnosť dostať sa počas štúdia k preparácii všetkých anatomických štruktúr ľudského tela. Výhodou aplikácie je že sa sa študent vie dostať k všetkým štruktúram tela v 3D a môže si ju spustiť hocikedy a nespočetne veľa krát. Uvedomujeme si, že zatiaľ nedokážeme nahradiť preparáciu samotného tela, ale 3D interaktívnymi štruktúrami sa k nej vieme priblížiť.

Materiál a metodika

Virtuálnu Anatomickú učebňu na Anatomickom ústave LFUK sme vybavili zariadeniami *Samsung GearVR. Samsung GearVR* je headset ktorý sa používa spolu s jedným zo smartphone telefónov *Samsung S6/S7* (aj *Edge* verzie) vďaka čomu ho možno používať na zobrazovanie virtuálnej reality. Poskytuje 360° sledovanie hlavy pri nízkej odozve, a tým umožňuje plynulé rozhliadanie vo virtuálnom svete. Stereoskopické 3D zobrazuje hĺbku, mierku a paralaxiu. Pravé aj ľavé oko majú samostatný pararelný obraz so 96° zorným poľom, čo zabezpečuje, že vnímanie VR pôsobí na človeka reálne a prirodzene.

Tento headset sme si vybrali kvôli mobilnosti a jednoduchosti. Študenti sa tak môžu učiť kdekoľvek. Headset patrí do triedy high-end medzi mobilnými virtuálnymi realitami, čo nám umožnilo zobrazovať anatomické modely vo vysokej kvalite. Podporované smartphony [2] majú vysoké rozlíšenia 2560 x 1440 s hustotou pixelov do 577 PPI. Na headsete sa nachádzajú základne tlačidlá – späť, home a touchpad. Pomocou touchpadu umiestnenému na boku headsetu ovládame celú aplikáciu. Aplikáciu vyvíjal tím Virtual Medicine v grafickom engine *Unity 3D* [3] v jazyku *C Sharp*.

Obr. 3 Headset *Samsung Gear VR*

Technické špecifikácie	**Samsung Gear VR**
Zorné pole	96° field of view
Displej	2560 x 1440 pixel Super AMOLED
Obnovovacia frekvencia	60 Hz
Minimálne požiadavky	Galaxy Note 5, Galaxy S6/S7, S6/S7 Edge, and S6/S7 Edge+
Senzory	Gyroskop , Akcelerometer , Geomagnetic, proximity
Ovládače	54~70 mm
Ovládače	Touchpad, back button, volume key
Rozhranie	MicroUSB connection to Galaxy Note 5, S6, S6 Edge, S6 Edge+
Cena	63,99 €, plus cena telefónu

Výsledky

Práca, ktorú prezentujeme je výsledkom takmer trojročného vývojového úsilia tímu Virtual Medicine. Aplikácia *Human Anatomy VR* obsahuje všetky potrebné funkcie na učenie anatómie.

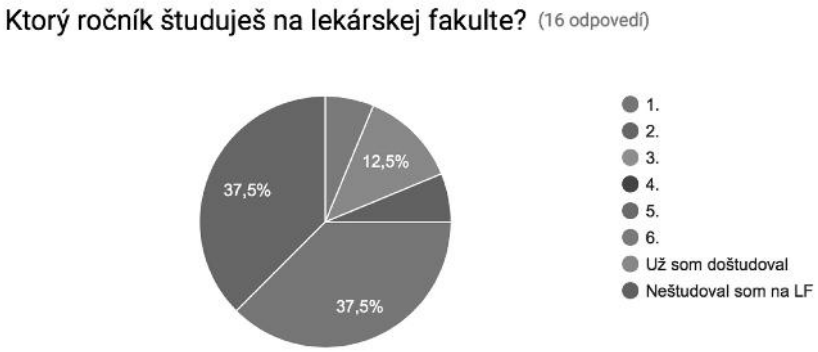
Študent sa po spustení aplikácie dostáva do virtuálneho 3D prostredia, v ktorom sa môže voľne pohybovať, pričom je schopný vnímať priestor v rozmedzí 360°. Priestorová ilúzia dáva používateľovi pocit, že sa nachádza v modernej miestnosti čo zvyšuje zážitok zo štúdia a navyše má pozitívny vplyv na jeho sústredenosť, keďže po nasadení VR headsetu ho nemôžu vyrušovať okolité vizuálne šumy. Študent je schopný zacieliť svoj kužeľ pozornosti iba na objekty, ktoré sú predmetom štúdia, čo môže výrazne zvýšiť efektivitu štúdia.

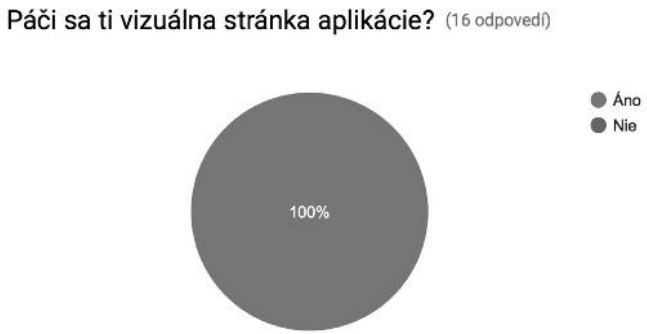
Významnou črtou našej aplikácie je interaktivita. Používateľ je schopný s anatomickým objektom otáčať v neobmedzenom smere a uhle, čo je veľmi dôležité pri predstavení si jednotlivých anatomických pomerov a pochopení ich priestorových interakcií vzhľadom k ostatným štruktúram. Po kliknutí na konkrétnu štruktúru sa zobrazí informácia o jej názve a ďalšie doplňujúce anatomické informácie Medzi základné funkcie patrí popis anatomických štruktúr s detailným komentárom, vďaka čomu môže naša aplikácia slúžiť aj ako anatomická učebnica. Pridaná hodnota oproti klasickému anatomickému atlasu je interaktívne, intuitívne otáčanie, vyberanie, pridávanie a zväčšovanie anatomických 3D štruktúr podľa vôle užívateľa. Jednou z dôležitých funkcií je aj prispôsobovanie si prostredia. Rozhodli sme sa pre vesmírny motív so zaujímavým dizajnom, aby sa študent cítil príjemne. Pre študenta, na ktorého by toto prostredie mohlo pôsobiť rušivo, sme pridali možnosť zmeniť si prostredie na čisto čierne, takže študované štruktúry maximálne vyniknú. Celá aplikácia je v anglickom a latinskom jazyku, a je pomocou VR Appstoru dostupná celosvetovo. Na testovanie vedomostí sme zaradili do aplikácie aj dva druhy testov, ktoré sú odmenené bodmi a zaujímavými bonusmi, napr. po získaní určitého počtu bodov je študent odmenený 3D modelom fonendoskopu vo VR. Našim cieľom je oživiť učenie anatómie, spraviť ho zábavnejšie a efektívnejšie.

Obr.4: Screenshot užívateľského rozhrania aplikácie Human Anatomy

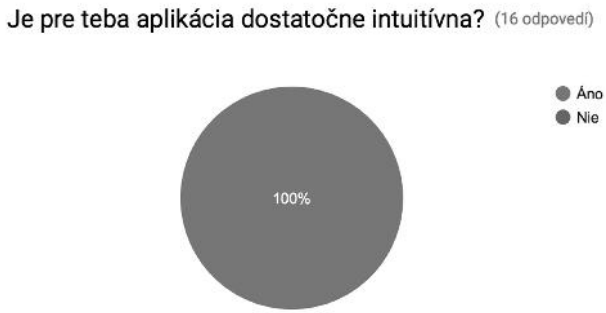
Záver

Z prieskumu, ktorý sme urobili pri otváraní VAU na vzorke 16 ľudí, z ktorých 75% bolo študentov 1. a 2. ročníka vyplýva, že aplikácia sa po vizuálnej stránke páči 100% respondentom.

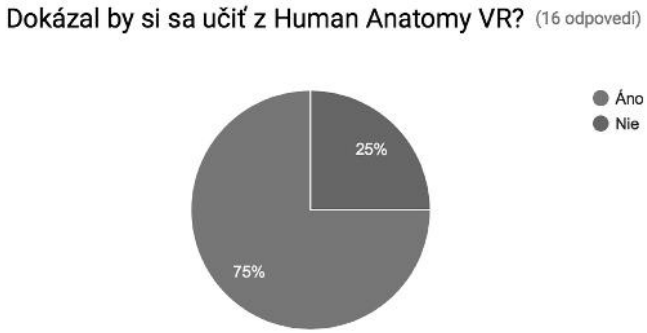




Taktiež 100% respondentov uviedlo, že aplikácia je pre nich intuitívna, čo znamená, že im nerobí problém ju ovládať.



Z verzie aplikácie ktorú sme študentom predstavili na začiatku decembra by sa už 75% respondentov dokázalo učiť.



Po zapracovaní pripomienok 25% študentov, ktorý by sa z nej ešte nedokázali učiť, bude náš výskum ďalej pokračovať v snahe vytvoriť pre študentov čo najlepšiu aplikáciu.

Zoznam použitej literatúry:

1. LANIER ,Jaron. What is Virtual Reality ? 2017 www.vrs.org.uk/virtual-reality/what-is-virtual-reality.html
2. McCann , John .Samsung Galaxy S7 review . 2017 January 16. www.techradar.com/reviews/phones/mobile-phones/samsung-galaxy-s7-1315188/review/3
3. Wikipedia . Unity 3D . 2016 october 18. sk.wikipedia.org/wiki/Unity_3D
4. LANIER ,Jaron. What is Virtual Reality ? 2017 February 25 . www.vrs.org.uk/virtual-reality-education/university.html
5. NOVACIC , Ines . How might virtual reality change the world? Stanford lab peers into future. 2015 June 18. www.cbsnews.com/news/how-might-virtual-reality-change-the-world-stanford-lab-peers-into-future
6. GAVENDOVÁ HARRY , Alžbeta . Lekárska fakulta UK v Bratislave otvára virtuálnu anatomickú učebňu, partnerom je i Samsung. 2016 december 8. www.mojandroid.sk/lf-uk-ucebna-virtualna-realita-anatomia-samsung/
7. Heidi Milia Anderson, Ph.D., Assistant Dean for Education Innovation, University of Kentucky. Dale's Cone of Experience.1969. www.queensu.ca/teachingandlearning/modules/active/documents/Dales_Cone_of_Experience_summary.pdf
8. CLINICALGATE . Forearm, Wrist, and Hand .2015 march 3 . clinicalgate.com/forearm-wrist-and-hand-2/

30. Vplyv elektromagnetického poľa generovaného základňou telefónu na aktivitu autonómneho nervového systému

Terézia Červenková, Katarína Redhammerová
(všeobecné lekárstvo, 3.ročník; všeobecné lekárstvo, 3.ročník)

Školiteľ: MUDr. Rastislav Važan, PhD.
Fyziologický ústav LFUK

Úvod

Čoraz viac sme v dnešnej dobe obklopení elektronickými zariadeniami generujúcimi elektromagnetické polia (EMP) rôznej intenzity. Medzi najrozšírenejšie určite patria mobilné telefóny, wifi zariadenia a základne bezdrôtových telefónov v bytoch, ktoré produkujú vysokofrekvenčné elektromagnetické žiarenie, označované niekedy tiež ako tzv. elektrosmog. Prirodzene teda vyvstáva otázka, či umelo vytvorené EMP nemôžu negatívne pôsobiť na živé organizmy vrátane človeka. Výskumy v tejto oblasti zahŕňajú v sebe sledovanie vplyvov EMP na najrôznejších úrovniach, od molekulárnej až po epidemiologické štúdie, pričom logicky sa predpokladá za zachytiteľný skôr efekt dlhodobého pôsobenia EMP. Jedným zo systémov tela, ktorý by mohol byť citlivý na pôsobenie EMP je určite aj autonómny nervový systém, na sledovanie aktivity ktorého je možné použiť tiež analýzu variability srdcovej frekvencie (HRV – heart rate variability). Práca Bortkiewicza a spol. naznačuje, že dlhodobé vystavenie sa stredno-frekvenčným EMP počas práce môže viesť k zmenám HRV, ktoré poukazujú na zmeny v autonómnej nervovej regulácii kardiovaskulárneho systému [1].

V našej práci sme pomocou HRV skúmali možný akútny efekt krátkodobého pôsobenia vysokofrekvenčného EMP generovaného základňou bezdrôtového bytového telefónu (tzv. pevnej linky) na autonómny nervový systém.

Materiál a metodika

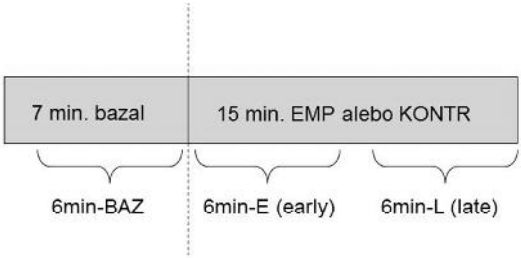
Súbor dobrovoľníkov tvorilo 21 zdravých mužov vo veku 19-24 rokov s BMI 18-27 kg/m^2. Meranie prebiehalo v jarných mesiacoch, vždy v čase od 8:00 do 10:00. Každý dobrovoľník podpísal informovaný súhlas. Dobrovoľníci boli inštruovaní, aby predvečer a ráno pred meraním nepili kávu, biely, zelený, čierny čaj, alkohol, energetické a kolové nápoje, aby nejedli horkú čokoládu. Nesmeli telefonovať dlhšie ako 5 minút a mali sa vyhnúť fyzickej aktivite. Ďalej si mali dať len ľahké raňajky, vyhnúť sa stresu a spať aspoň 7 hodín. Tieto podmienky boli preverené v dotazníku, ktorí probandi vypĺňali pred každým meraním.

Vlastné merania (záznam EKG) prebiehali v 2 termínoch (2 rôzne dni) pre každého účastníka. Raz bez použitia EMP (**kontrolný deň**) a raz s použitím EMP (**EMP deň**), pričom účastník nevedel, v ktorý deň bol generátor EMP zapnutý. Hodnoty EMP v experimentálnej miestnosti nepresahovali 5 µW/m^2 a po zapojení generátora EMP (základňa telefónu Siemens Gigaset S450) jeho hodnoty merané analyzátorom vysokofrekvenčných EMP – Gigahertz HF 32D presahovali 2000 µW/m^2. Počas záznamu EKG účastníci nesmeli hovoriť, ležali a sledovali relaxačné video s relaxačnou hudbou. Celý záznam trval vždy 22 minút, pričom v EMP deň sme na konci 7. minúty spustili generátor EMP, ktorý bol potom zapnutý až do konca merania. V kontrolný deň sme pokračovali bez aktivácie generátora EMP.

HRV sme analyzovali zo 6-minútových úsekov EKG záznamu pomocou softvéru LabChart AD Instruments. V našej štúdii sme potom sledovali nasledovné parametre: srdcovú frekvenciu (HR), RMSSD (square root of the mean squared differences of successive RR intervals), HFnu (high frequency normalised units), LFnu (low frequency normalised units) a LF/HF (pomer LF a HF). S určitým zjednodušením možno povedať, že RMSSD a HFnu sú považované za ukazovatele aktivity parasympatiku, zatiaľ čo LFnu a LF/HF za ukazovatele aktivity sympatiku.

Pri vyhodnocovaní sme porovnávali hodnoty parametrov z dňa merania s EMP a z dňa merania bez EMP, pričom sme vždy porovnávali hodnoty z príslušných fáz, t. j. hodnoty z úvodných fáz merania (označené ako **bazal**). Ďalej hodnoty z fáz po 7. minúte (kedy sa v EMP-deň spúšťal generator EMP; označené ako **early**) a hodnoty z fáz z konca merania po 7. minúte (označené ako **late**). Graficky znázornené na obr. 1.

Okrem celého súboru probandov sme sa v analýze zamerali aj na podskupiny sympatikotonikov (definovaných na základe priemernej srdcovej frekvencie počas úvodných fáz merania – nad 73/min; n = 7), parasympatikotonikov (pod 59/min; n = 6) a jedincov, ktorí sa v dotazníku označili za elektrosenzitívnych (n = 5).



Obr.1 Protokol merania s vyznačením fáz vyhodnocovania

Výsledky sú prezentované ako priemer ± stredná chyba priemeru (SEM). Spracované boli pomocou štatistického programu GraphPad InStat. Po teste normality rozdelenia dát (test Kolmogorov-Smirnov) sme použili párový t-test alebo neparametrický párový Wilcoxonov test. Kritérium signifikantnosti rozdielov: $p < 0,05$.

Výsledky

Všetky naše výsledky sú uvedené v tabuľke tab.1, z ktorej vidno, že sme nezaznamenali žiadny signifikantný rozdiel medzi EMP dňom a kontrolným dňom, a to nielen medzi fázami bazal (kde sme to predpokladali) ale aj medzi fázami early a fázami late (tab.1-časť A). Taktiež rozdelenie súboru probandov na sympatikotonikov (tab.1-časť B), parasympatikotonikov (tab.1-časť C) a tých, čo sa sami považujú za elektrosenzitívnych (tab.1-časť D), neviedlo k odhaleniu signifikantného rozdielu medzi EMP dňom a kontrolným dňom v týchto podskupinách.

Tab.1 Výsledky jednotlivých porovnaní pre celý súbor probandov, ako aj pre podskupiny sympatikotonikov, parasympatikotonikov a elektrosenzitivnych

A	**všetci probandi** (n=21)										
		HR	**(bpm)**	**HF**	**(nu)**	**RMSSD**	**(ms)**	**LF**	**(nu)**	**LF/HF**	
	bazal	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň
	priem ± SEM	66,48 ± 2,07	66,26 ± 2,17	49,43 ± 3,97	50,96 ± 3,79	61,05 ± 7,13	59,07 ± 7,56	46,83 ± 4,24	45,46 ± 3,98	1,39 ± 0,32	1,34 ± 0,36
	p		0,85		0,6		0,63		0,67		0,73
	early										
	priem ± SEM	65,74 ± 1,8	65,72 ± 1,98	47,45 ± 3,97	46,38 ± 3,72	62,75 ± 7,66	58,59 ± 7,86	47,78 ± 4,42	50,39 ± 3,82	1,51 ± 0,37	1,54 ± 0,34
	p		0,99		0,68		0,31		0,44		0,95
	late										
	priem ± SEM	64,82 ± 1,77	64,79 ± 2,02	45,39 ± 3,3	42,69 ± 3,13	62,93 ± 6,66	60,66 ± 7,78	51,29 ± 3,44	54,15 ± 3,29	1,52 ± 0,33	1,59 ± 0,26
	p		0,98		0,27		0,56		0,27		0,56
B	**sympatikotonici** HR nad 73/min (n=7)										
		HR	**(bpm)**	**HF**	**(nu)**	**RMSSD**	**(ms)**	**LF**	**(nu)**	**LF/HF**	
	bazal	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň
	priem ± SEM	76,57 ± 2,41	77,08 ± 2,38	44,22 ± 5,48	51,85 ± 7,01	38,78 ± 6,78	32,57 ± 6,02	52,14 ± 5,7	44,44 ± 6,84	1,57 ± 0,57	1,13 ± 0,36
	p		0,84		0,15		0,22		0,13		0,18
	early										
	priem ± SEM	74,39 ± 1,82	75,91 ± 2,13	43,47 ± 5,81	37,37 ± 4,03	39,18 ± 7,09	30,48 ± 4, 026	53,05 ± 5,88	59,40 ± 4,12	1,53 ± 0,46	1,82 ± 0,36
	p		0,52		0,09		0,2		0,098		0,22
	late										
	priem ± SEM	73,14 ± 2,18	75,21 ± 2,19	48,21 ± 6,81	42,25 ± 4,57	47,91 ± 9,66	34,15 ± 4,49	47,60 ± 6,95	54,05 ± 5,02	1,30 ± 0,4	1,47 ± 0,31
	p		0,37		0,18		0,14		0,19		0,58
C	**parasympatikotonici** HR pod 59/min (n=6)										
		HR	**(bpm)**	**HF**	**(nu)**	**RMSSD**	**(ms)**	**LF**	**(nu)**	**LF/HF**	
	bazal	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň
	priem ± SEM	56,64 ± 0,96	55,25 ± 1,37	57,07 ± 7,03	57,36 ± 6,44	99,70 ± 9,03	92,76 ± 11,32	38,21 ± 7,64	39,90 ± 7,13	0,80 ± 0,23	0,83 ± 0,24
	p		0,46		0,96		0,54		0,84		0,94
	early										
	priem ± SEM	57,07 ± 1,24	55,90 ± 1,44	59,84 ± 7,13	57,03 ± 6,34	103,43 ± 10,51	100,63 ± 9,86	31,61 ± 7,63	39,69 ± 6,45	0,61 ± 0,19	0,80 ± 0,2
	p		0,55		0,43		0,81		0,35		0,46
	late										
	priem ± SEM	57,23 ± 1,7	55,04 ± 1,47	52,71 ± 5,28	49,38 ± 6,84	95,99 ± 7,15	102,34 ± 12,41	43,99 ± 5,31	47,67 ± 6,53	0,94 ± 0,22	1,13 ± 0,25
	p		0,43		0,51		0,33		0,48		0,43
D	**elektrosenzitívni** (n=5)										
		HR	**(bpm)**	**HF**	**(nu)**	**RMSSD**	**(ms)**	**LF**	**(nu)**	**LF/HF**	
	bazal	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň	emp-deň	kont-deň
	priem ± SEM	75,58 ± 4,6	71,90 ± 3,74	39,16 ± 11,32	35,60 ± 8,83	41,80 ± 12,89	39,96 ± 9,22	57,67 ± 12,35	61,09 ± 9,28	2,67 ± 1,12	2,83 ± 1,3
	p		0,11		0,4		0,67		0,48		0,81
	early										
	priem ± SEM	73,97 ± 3,42	70,66 ± 3,24	31,48 ± 7,17	34,83 ± 10,38	36,04 ± 10,19	39,02 ± 9,37	66,07 ± 7,54	61,96 ± 10,83	3,10 ± 1,2	3,02 ± 1,2
	p		0,08		0,48		0,35		0,41		0,8
	late										
	priem ± SEM	72,84 ± 3,5	70,31 ± 3,45	33,05 ± 8,3	36,44 ± 8	41,26 ± 11,12	41,35 ± 9,72	63,97 ± 8,83	60,44 ± 8,63	2,98 ± 1,2	2,44 ± 0,98
	p		0,11		0,53		0,98		0,52		0,23

HR – srdcová frekvencia; HF - high frequency; LF - low frequency; RMSSD - root mean square of successive differences. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± stredná chyba priemeru (SEM). Hranica signifikancie $p<0.05$

Diskusia

V dnešnej dobe stále viac ľudí trpí nešpecifickými symptómami neznámeho pôvodu ako sú bolesti hlavy, poruchy spánku, nervozita, poruchy koncentrácie a pod. Tieto symptómy pritom mnohí spájajú s elektromagnetickým „znečistením“ prostredia. Pribúdajú tiež ľudia, ktorí sa považujú za elektrosenzitívnych. Títo udávajú, že v blízkosti elektrických zariadení generujúcich EMP alebo pri ich dlhšom používaní pociťujú napr. pískanie v ušiach, búšenie srdca, závrate, nevoľnosť, bolesti zubov, rozostrené videnie alebo iné symptómy [2].

Z nami získaných výsledkov je zrejmé, že za našich experimentálnych podmienok a pri našej veľkosti experimentálneho súboru, vysokofrekvenčné EMP nemá akútny vplyv na autonómny nervový systém, ktorý by bol detekovateľný prostredníctvom metodiky HRV. K podobným záverom dospeli aj Szemerszky a spol., ktorí poukazujú na to, že krátkodobá prítomnosť EMP nemá dopad na symptómy spájané s elektrosenzitivitou a že viac symptómov bolo zistených, ak sa probandi domnievali, že EMP je prítomné. Nevylučujú ani možnosť, že probandi, ktorí uviedli viac symptómov mohli byť vnímavejší

na niektoré senzorické podnety, ktoré spusteniu žiarenia predchádzali [5]. Vplyv krátkodobo pôsobiaceho EMP vyžarovaného mobilným telefónom na autonómnu moduláciu srdca nebol dokázaný ani v práci Barutcu a spol., ktorí skúmali vplyv EMP generovaného mobilným telefónom na HRV počas telefonátu a mimo neho [3], a ani Braune a spol., ktorých meranie vykazovalo pomalý, ale signifikantný nárast krvného tlaku avšak všetky ostatné parametre klesli alebo ostali konštantné. Analýza ukázala, že zmeny tlaku krvi a parametrov neboli závislé od EMP a teda ani výsledok tejto práce nepodporuje tvrdenia o vplyve (netermálnych účinkov) EMP na ANS u zdravých ľudí.[7]. Parazzini a spol. použili vo svojom experimente rest-to-stand protokol, aby zhodnotil vplyv EMP na autonómny nervový systém v pokoji a po ortostatickej aktivácii sympatiku. Nepozorovali síce žiadny efekt v ľahu avšak zistili signifikantný nárast hodnôt LF parametra a pokles priemerného RR intervalu počas pôsobenia EMP. Uzatvárajú, že EMP môže zosilniť už existujúcu aktivitu sympatiku, ale inak ho neaktivuje [6]. Naopak, Andrzejak a spol. vo svojej práci tvrdia, že telefónny hovor prostredníctvom mobilu môže ovplyvniť autonómny nervový systém, pričom aktivita parasympatiku vzrastá, zatiaľ čo aktivita sympatiku klesá. Priznávajú však, že zmeny HRV počas hovoru môžu byť spôsobené nielen EMP, ale možný je aj priamy vplyv rozprávania na HRV [4]. Zmeny dýchania počas rozprávania naozaj môžu výrazne ovplyvniť parametre HRV a efekt by tu mohlo mať tiež striedanie fáz rozprávania a počúvania počas telefonického rozhovoru.

Za hlavnú limitáciu nášho experimentu považujeme malý experimentálny súbor, a to najmä po rozdelení celého súboru na podskupiny sympatikotonikov, parasympatikotonikov alebo jedincov považujúcich sa za elektrosenzitívnych.

Naše výsledky nevylučujú možné efekty EMP pri dlhodobejšom alebo chronickom pôsobení, ako aj nevylučujú zmeny v autonómnom nervovom systéme, ktoré nie sú detekovateľné prostredníctvom HRV alebo zmeny v iných systémoch tela. Vzhľadom na celospoločenskú aktuálnosť problematiky možných vplyvov rýchlo pribúdajúcich zdrojov EMP na ľudské zdravie, bude potrebné aj tejto oblasti výskumu venovať náležitú pozornosť.

Záver

Krátkodobé pôsobenie vysokofrekvenčného EMP generovaného základňou domáceho bezdrôtového telefónu nemá efekt na pokojovú aktivitu autonómneho nervového systému sledovanú prostredníctvom HRV. Na odhalenie možných vplyvov vysokofrekvenčného EMP bude potrebné realizovať experimenty s dlhodobejším vystavením vysokofrekvenčnému EMP, na väčších experimentálnych súboroch a s využitím aj ďalších metodík na sledovanie aktivity autonómneho nervového systému.

Zoznam použitej literatúry:

1. Bortkiewicz A, Gadzicka E, Zmyślony M. Heart rate variability in workers exposed to medium-frequency electromagnetic fields. Journal of the Autonomic Nervous System. 1996;59:91-97
2. N.Leitgeb, J Schröttner. Electrosensibility and Electromagnetic Hypersensitivity. Bioelectromagnetics 24:387-394 (2003).
3. Barutcu I, Esen AM, Kaya D, Turkmen M, Karakaya O, Saglam M, a spol. Do mobile phones pose a potential risk to autonomic modulation of the heart? Pacing Clin Electrophysiol. 2011;34:1511–4.

4. Andrzejak R, Poreba R, Poreba M, Derkacz A, Skalik R, Gac P, a spol. The influence of the call with a mobile phone on heart rate variability parameters in healthy volunteers. Ind Health. 2008;46:409–17.
5. Szemerszky R, Gubányi M, Árvai D. a spol. Is there a connection between electrosensitivity and electrosensibility? A replication study. Int. J. Behav. Med. (2015); 22:755-63. doi:10.1007/s12529-015-9477-z
6. Parazzini M, Ravazzani P, Tognola G, Thuroczy G, Molnar FB, Sacchettini A, Ardesi G, Mainardi LT. Electromagnetic fields produced by GSM cellular phones and heart rate variability. Bioelectromagnetics. 2007;28:122–129. doi: 10.1002/bem.20275.
7. Braune S, Riedel A, Schulte–Monting J, Raczek J. Influence of a radiofrequency electromagnetic field on cardiovascular and hormonal parameters of the autonomic nervous system in healthy individuals. Radiation Research. 2002;158:352–356.

31. Vplyv kofeínu na činnosť mozgu

Martin Pekarčík
(všeobecné lekárstvo, 1.ročník)

Školiteľ: Mgr. Helena Svobodová[1], Ing. Erik Vavrinský, PhD[1,2]
[1]Ústav lekárskej fyziky, biofyziky, informatiky a telemedicíny LF UK, Bratislava; [2]Ústav elektroniky a fotoniky, FEI STU, Bratislava

Úvod

Témou našej študentskej vedeckej odbornej činnosti bolo meranie vplyvu kofeínu na činnosť mozgu pomocou elektroencefalografu.

Mozog ako živá hmota predstavuje pre ľudstvo jeden veľký neprebádaný otáznik a aj to bol jeden z dôvodov, prečo sme sa začali zaoberať danou problematikou.

Ľudský mozog obsahuje viac než 10^{10} neurónov, odhadovaný tok informácii do mozgu je 10^{9} $b.s^{-1}$ a z mozgu 10^{7} $b.s^{-1}$ [1]. Na sledovanie elektrickej aktivity mozgu slúži elektroencefalografia - EEG.

Ľudské zdravie je odpradávna ovplyvňované vonkajším pôsobením mechanických, chemických, biologických a fyzikálnych faktorov životného a pracovného prostredia a spôsobom nášho života. Jednému z týchto chemických faktorov (kofeínu) sme sa venovali aj v našom výskume.

Kofeín (1, 3, 7-trimethylxantín) je purinový alkaloid, patriaci do skupiny methylxantínov. Je to látka rôznych chutí, spôsobujúca fascinujúce deje odohrávajúce sa v mozgu. Prirodzene sa vyskytuje v kávových a kakaových bôboch, v listoch čajovníka či v bobuliach guarany, v kole lesklej (poprípade v kole pravej) a v ďalších rastlinách. Kofeín vplýva na každý organizmus rôzne. Pitie nápojov obsahujúcich kofeín má v určitej miere pozitívny, avšak na druhej strane aj negatívny dopad na ľudský organizmus. Ovplyvňuje funkcie kardiovaskulárneho, respiračného, renálneho a nervového systému. Má niekoľko mechanizmov účinku a patrí medzi najrozšírenejšie a najpoužívanejšie stimulátory na svete. Dokáže zrýchliť alebo naopak spomaliť tok informácií v mozgu. Kofeínové nápoje sa požívajú denno-denne, avšak ľudia stále nie sú stopercentne oboznamení o tom, čo im kofeín v tele spôsobuje.

Novodobé štúdie poukazujú na to, že kofeín môže zvýšiť výkon pamäte a to najmä pri riešení zdĺhavých, montónnych a opakujúcich sa úloh. Tiež existujú tézy,že vyšší príjem kofeínu môže naopak znížiť výkon, kvôli nadmernej stimulácii [2].

Priemerná konzumácia kávy je 3-5 šálok za deň, čo pred nás stavia otázky. Ako veľmi dané množstvo ovplyvňuje ľudský mozog? Má kofeín pozitívne účinky? Z dlhodobého hľadiska, nepoškodzuje našu pamäť?

Materiál a metodika

Pre stanovenie vplyvu kofeínu na mozog človeka sme vyšetrovaným osobám podávali kávový nápoj (18 g kávy v 3 dcl vody) a vyšetrovali sme jeho vplyv na pamäť a pozornosť. Doposiaľ sa experimentu zúčastnilo 6 osôb (3 boli muži a 3 ženy, vo veku 25,7±7 rokov), ktoré vykonávali vybrané psychologické testy [3]: (test na pamäť „Pexeso“, testy na pozornosť „Hľadaj páry“ a „Pozornosť 5x5A). Tieto testy robili bez užitia kofeínu a následne 45 minút, resp. 100 minút po požití kávového nápoja. Počas testu bola zaznamenávaná ich mozgová aktivita a samotné časové výsledky úloh.

Na záznam EEG sme využili bezdrôtovú helmu „Emotiv Epoc“ [4], ktorá prenáša merané dáta cez bluethooth priamo do PC.

Na online zobrazenie a ukladanie meraných dát slúži priložená aplikácia „EmotivControlPanel“. Na následnú analýzu sme využili program Labchart 7 [5]. Tento program bol vyvinutý na komplexnú analýzu fyziologických premenných. V našom konkrétnom prípade sme využili najmä nástroj na spektrálnu analýzu jednotlivých zložiek mozgových vĺn „Spectrum + Total power a Data pad“.

Analýza bola následne štatisticky spočítaná v Excely.

Z tejto komplexnej analýzy sme sa napokon zaujímali o úroveň zložky alfa a beta vln a ich pomeru k celkovej zložke EEG spektra.

Výsledky

V týchto prvotných testoch sme si dávali za úlohu hlavne overiť meracie zapojenie, vypracovať podrobný postup merania, navrhnúť metodiku spracovávania dát a vytypovať vhodné centrá mozgu, kde bude vplyv kofeínu preukázateľný. Z celého mozgu (telencefalonu) sa zatiaľ najzaujímavejšie výsledky ukazujú na frontálnych a temenných lalokoch.

Frontálne laloky sú súčasťou mozgových hemisfér. Sú zodpovedné za výkonné funkcie, myslenie, plánovanie, organizovanie, uvažovanie, rozhodovanie, pamäť na priestorové úlohy a riešenie problémov.

Temenné laloky sú taktiež súčasťou mozgových hemisfér, nachádzajú sa v parietalnej oblasti a sú zodpovedné najmä za priestorovú pamäť [6].

Podrobne sme zatiaľ stihli spracovať tieto dáta iba pri teste na pamäť a po 45 minútach od požitia kofeínu. Testy na pozornosť a po 100 minútach sú aktuálne spracovávané.

Užitím kávy po 45 min stúpne celková aktivita (pozadie) mozgových vĺn vo frontálnom laloku o 55%, pričom alfa aj beta vlny zostávajú približne na rovnakej úrovni. Zaujímavým výsledkom je rozličné správanie ľavej a pravej hemisféry. Na ľavej hemisfére stúpnu o 32% a na pravej až o 88%. To súvisí zrejme s tým, že pamäť a exekúcia sú sústredené dominantne v pravej hemisfére.

Ďalšia výrazná zmena nastáva v temennom laloku, kde pri zachovaní alfa a beta úrovne celková aktivita mozgových vĺn klesá približne na polovicu (51,4%), pričom nebadať zásadnejší rozdiel medzi ľavou a pravou hemisférou, čo súvisí s rovnomernou distribúciou priestorovej pamäte v ľavej a pravej hemisfére.

Taktiež je badateľný rozdiel medzi mužom a ženou v čelovom laloku, súvisí to s rôznou efektivitou pamäte pohlavia pre daný test (pexeso). U žien v čelovom laloku klesla činnosť ľavej časti z 81,2% na 73,8% (po požití kofeínu), čo nepredstavuje až taký enormný rozdiel a na pravej časti klesá aktivita mozgu zo 74,6% pred požitím kávy na 47,5%. V ľavom čelovom laloku u mužov vzrástla aktivita zo 65,5% na 83,85% a v pravom laloku klesla z 52,45% na 46,05%. Výsledné priemerné hodnoty rozdielu efektivity pamäte v čelovom laloku sú: pred požitím kávy u mužov 58,98% a u žien 77,9% a po 45 min. u mužov 64,95% a u žien 60,65%. Kde pozorujeme zvýšenie aktivity pozadia u mužov a klesanie u žien.

Diskusia

V našej odbornej práci sme sa snažili objasniť vplyv kofeínu na činnosť mozgu. Po vykonaní prvých 6-tich takzvaných skúšobných meraní, sme stanovili predbežnú metodiku, ktorej sa budeme chcieť

držať po celú dobu výskumu. Predbežnú metodiku sme vyhotovili na základe doposiaľ zanalyzovaných úloh na pamäť (pexeso) pred požitím kávy a po 45 minútach.

Zo začiatku sme mali dojem, že budú alfa aj beta mozgové vlny výrazne kolísať, avšak opak bol pravdou, vlny si udržiavali približne podobnú hodnotu s minimálnymi posunmi. Aspekt, ktorý spôsoboval stúpanie aktivity mozgu bolo najmä pozadie mozgových vĺn (celé frekvenčné spektrum). Detailné vyhodnotenie alfa a beta vĺn celého mozgu nám ozrejmilo to, že kofeín ovplyvňuje vo väčšej miere aktivitu tých častí mozgu, ktoré sú zodpovedné za pamäť pri priestorových úlohách, čiže pravú hemisféru vo frontálnej oblasti a obe hemisféry v temennej oblasti.

V pravom frontálnom laloku stúpne aktivita celého spektra vĺn takmer na dvojnásobok. V temennom laloku sa odohrával naopak pokles celkovej aktivity mozgu skoro na polovicu, pričom aktivita alfa a beta vĺn, čiže efektivita riešenia úloh oboch spomínaných centier zostáva zachovaná. Do popredia taktiež môžeme vyzdvihnúť rozdielnosť efektivity mozgu u dvoch rôznych pohlaví. Zatiaľ sa nám to podarilo zistiť po analýze pamäťového testu.

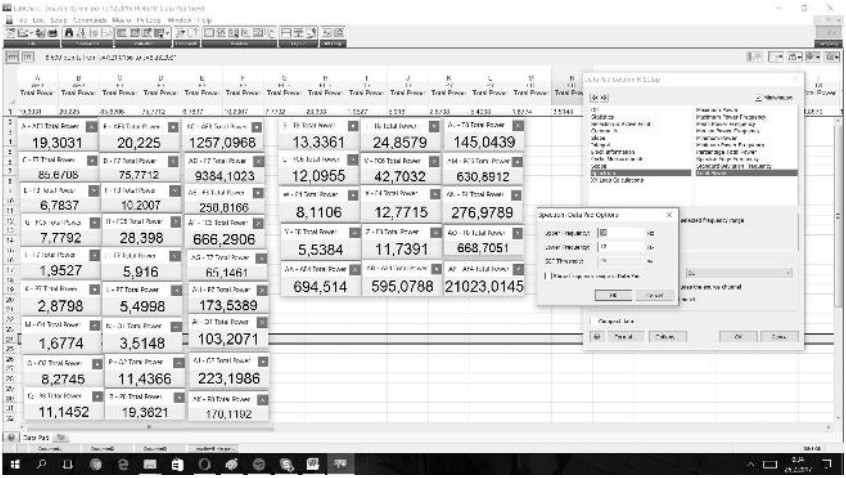
Súčasne s meraniami máme v pláne sledovať aj krvný tlak pomocou oscilometrickej metódy, pulz (pulzoximetrom) a dýchanie, z dôvodu prísunu možných doplňujúcich výsledkov.

Plány do dokončenia výskumu:

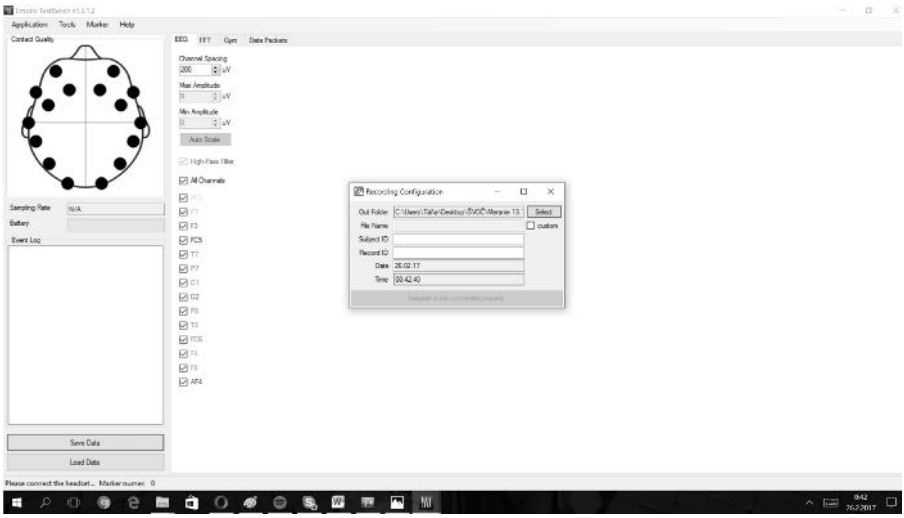
1. Popri pozorovani alfa a beta vĺn, by sme chceli v nasledujúcich experimentoch rozšíriť meranie o meranie krvného tlaku (oscilometrickou metódou), pulzu (pulzoximetrom) a respirácie (hrudným pásom) pred vypitím kávy, po 45 minútach a finálne aj po 100 minútach.
2. Okrem už spomínaných kofeínových nápojov plánujeme skúmať aj vplyv analgetík na intenzitu mozgu. Daná idea vyplýva, z poznatku, že majorita analgetík obsahuje vo svojej štruktúre vo veľkej miere zastúpený kofeín. Predpokladaná metodika by bola z dostatočnej miery podobná konceptu, ktorým sa snažíme uskutočňovať výskum doposiaľ. Vyšetrovaným osobám by sme podali analgetiká s liečivom nazývaným Paracetamol a to buď Paralen Extra (s vysokým obsahom kofeínu) alebo Panadol Extra, Coldrex Tablety a Valetol Tablety (kde je zastúpenie kofeínu výrazne nižšie). Taktiež by stálo za zamyslenie porovnať Panadol Extra, ktorý obsahuje (500 mg paracetamolu a 65 mg kofeínu v jednej filmom obalenej tablete) s Coldrex Tablety, ktorý obsahuje liečivá (paracetamol 500 mg, fenylefríniumchlorid 5 mg, kofeín 25 mg, monohydrát terpínu 20 mg, kyselina askorbová obalená etylcelulózou 38 mg, čo zodpovedá kyseline askorbovej (vitamín C) 30 mg v 1 tablete) a s Valetol Tablety obsahujúcim liečivá (300 mg propyfenazónu (propyphenazonum), 150 mg paracetamolu (paracetamolum) a 50 mg kofeínu (coffeinum) v 1 tablete) [7] [8] [9]. Rozhodujúcu úlohu by hralo množstvo kofeínu. Prikladáme odbornú literatúru, ktorá nám dopomohla k daným postupom [10] [11].

Podporené čiastočne grantom APVV-15-0763.

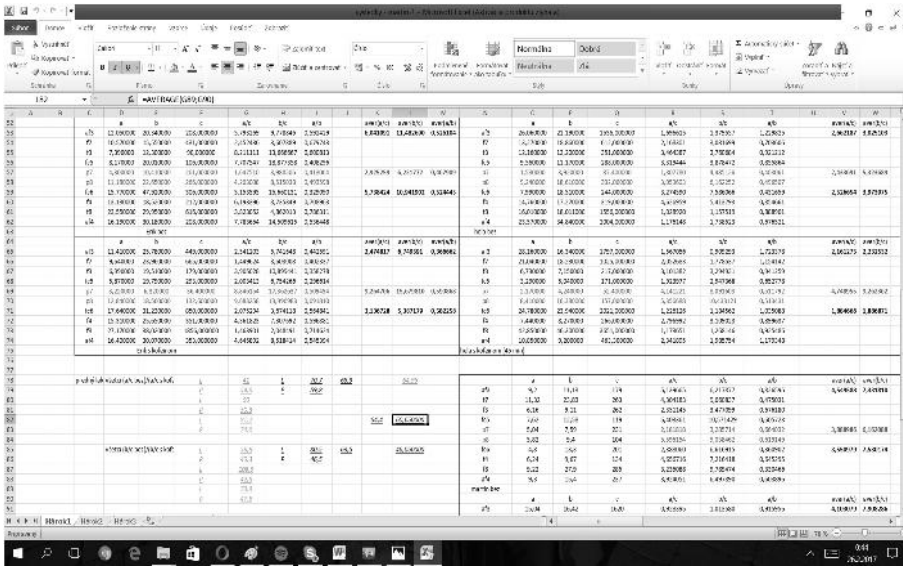
Grafy a obrázky



Obr. 1 Labchart 7-Data Pad (Total power a Spectrum Data Pad)



Obr. 2 Emotiv Testbench v 1.5.1.2



Obr. 3 Microsoft Exel analýza výsledkov

Obr. 4 Fotka z priebehu vypracovávania úloh

Zoznam použitej literatúry:

1. Kovačíková L., Meranie Fyziologických veličín, Bakalárska práca - Meranie fyziologických veličín, Ústav fotoniky a elektroniky, ev. č.: FEI-5390-5581, Slovenská Technická Univerzita v Bratislave, kapitola 6.2, str.29
2. Schmitt J.A.J. et al. (2005) General methodological considerations for the assessment of nutritional influences on human cognitive functions. European Journal of Nutrition, 44:459-464
3. I-PSYCHOLOGIA.SK, Psychologické testy. www.i-psychologia.sk/test.php
4. EMOTIVE, Epoc+. www.emotiv.com/epoc/
5. ADINSTRUMENTS, LabChart reader. www.adinstruments.com/products/labchart
6. Mallat, J., Marieb, N. E. (2005), Anatomie lidského těla, Brno: CP BOOKS, s.367
8. ADC Solutions s.r.o. ,Paralen Extra, Odborné údaje publikované na ADC.sk sú čerpané z databáz ADC Číselníka, ktorú prevádzkuje spoločnosť: PharmINFO spol. s r.o. na internete: https://www.pharminfo.sk.www.adc.sk/databazy/produkty/pil/paralen-extra-423146.html, Bratislava
9. ADC Solutions s.r.o. ,Coldrex Tablety, Odborné údaje publikované na ADC.sk sú čerpané z databáz ADC Číselníka, ktorú prevádzkuje spoločnosť: PharmINFO spol. s r.o. na internete: https://www.pharminfo.sk.www.adc.sk/databazy/produkty/pil/coldrex-tablety-539697.html, Bratislava
10. ADC Solutions s.r.o. , Valetol Tablety, Odborné údaje publikované na ADC.sk sú čerpané z databáz ADC Číselníka, ktorú prevádzkuje spoločnosť: PharmINFO spol. s r.o. na internete : https://www.pharminfo.sk. www.adc.sk/databazy/produkty/pil/valetol-108840.html, Bratislava
11. Sherman SM., Buckley TP. and coll., Caffeine Enhances Memory Performance in Young Adults during Their Non-optimal Time of Day, Front Psychol. 2016 Nov 14;7:1764. eCollection 2016.
12. Kammerer M. ,Jaramillo Ja . and coll., Effects of energy drink major bioactive compounds on the performance of young adults in fitness and cognitive tests: a randomized controlled trial. J Int Soc Sports Nutr. 2014 Nov 7;11(1):44.

32. Využitie keramiky v klasickej 3D tlači a bioprintingu

Lucia Krupanová
(zubné lekárstvo, 6.ročník)

Školiteľ: MUDr. Andrej Thurzo, PhD., MPH, MHA
LF.KSMCh – Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LF UK a OÚSA

Úvod

Stomatologická liečba straty zubov, ako aj maxilofaciálneho skeletu predstavuje aj v dnešnej dobre značný klinický problém. V súčasnosti je ošetrenie defektného chrupu možné pomocou rôznych protetických náhrad alebo pomocou implantátov. Tie však majú obmedzené indikácie. Žiadny z týchto spôsobov nepredstavuje plnohodnotný spôsob náhrady defektu.

Z tohto dôvodu sú ciele zubného tkanivového inžinierstva zamerané na hľadanie nového spôsobu liečby. Táto práca je zameraná na materiál, ktorý by mohol byť kľúčový nielen pre zubné tkanivové inžinierstvo, ale aj pre náhrady maxilofaciálneho skeletu. Týmto materiálom je keramika, ktorá má v súčasnosti bohaté stomatologické využitie. Snahou je využitie jej pozitívnych vlastností v ešte širšej stomatologickej praxi. Čo sa týka výroby, široké možnosti výroby a použitia môže priniesť 3D tlač.

3D tlač vychádza z CAD dát. Rozdielom je, že materiál sa postupne pridáva, nie obrába, resp. Odoberá, jako je tomu pri frézovacích systémoch, z čoho hneď vyplýva niekoľko pozitívnych vlastností, ako úspora materiálu, ale aj úplne nové tvarové možnosti výsledného produktu.

Práve 3D tlač keramiky, ktorej sa bude táto práva hlbšie venovať, by mohla byť prínosom aj pre terapeutické riešenie strát zubov a maxilofaciálneho skeletu.

Materiál a metodika

Prvotnou úlohou bolo namodelovanie 3D modelu scaffoldu na základe zadania scaffoldu o rozmeroch 10x10x3mm s pórovitosťou 0,3mm a hrúbkou stien 0,2mm. Po namodelovaní scaffoldu som stanovila materiál, z ktorého sa mal scaffold vytlačiť. Po analýze jednotlivých materiálov a ich vlastností, resp. možného použitia v orofaciálnej oblasti som sa rozhodla pre kombináciu materiálov hydroxyapatitu a trikalciumfosfátu v pomere 50:50. Ohľadne tlače sme oslovili firmu Lithoz s pomocou doc. Ing. Radovana Hudáka, PhD. a s MUDr. Andrejom Thurzom, PhD., MPH, MHA. Firmu som navštívila a po prehliadke pracoviska a oboznámení sa s ich fungovaním sa spustil proces 3D tlače. V nasledujúcich dňoch sa prebehlo vysterilizovanie scaffoldov a s pomocou RNDr. Ľuboša Danišoviča PhD. uskutočnilo testovanie scaffoldov.

Výsledky

Namodelovanie 3D modelu scaffoldu

Výber materiálu scaffoldu

Vybrala som si kombináciu hydroxyapatitu a trikalciumfosfátu v pomere 50:50.

Hydroxyapatit je materiál, ktorý je svojou anorganickou časťou veľmi podobný kosti. Preto je široko používaný v kostnej regenerácii **[1]**. Z toho vyplýva jeho vlastnosť biokompatibility. Ako sa Ing.

Radovana Hudáka, PhD. vyjadril, jeho negatívnou stránkou môže byť jeho krehkosť. Z toho vyplýva možný problém, napríklad pri použití ako implantátu. Hrozí prasknutie, pacient si musí dávať väčší pozor.

Trikalciumfosfát má pozitívne vlastnosti podobné s hydroxyapatitom, a síce biokompatibilitu a osteokonduktivitu. Vyskytuje sa v dvoch fázach, α a β. Tieto fázy majú identickú chémiu, ale rôzne kryštálové štruktúry. Obe fázy sú menej stabilné ako HAP a teda rozpustnejšie vo vodnom prostredí. β-TCP je považovaný i za osteokonduktívny, i za osteoinduktívny a vzhľadom k nízkej medzifázovej energii vzhľadom na apatit, môže spôsobiť precipitáciu apatitovej vrstvy po kultivácii vo vodných iónových roztokoch. β-TCP bol použitý vo väčšej miere v kostnej regenerácii ako α-TCP. Ing. Radovan Hudák, PhD.: ,,Avšak narozdiel od hydroxyapatitu je viac degradovateľný. My potrebujeme odhadnúť čas, kedy má byť scaffold degradovaný, aby sa tkanivá stihli vytvoriť, resp. prerásť. Je teda potreba regulovanej degradácie, väčšinou okolo 12-24 mesiacov.´´

Tieto dva materiály som si teda vybrala v snahe spojiť ich pozitívne vlastnosti.

Tlač a vytvrdzovanie 3D modelu – firma Lithoz

Prípravná fáza:

Firma Lithoz ako vývojár, výrobca a distribútor strojov a materiálov používaných na tvorbu 3D tlače vyvíja i svoj vlastný software, ktorý slúži ako vstupná brána ku samotnej tlači. Parametre, ktoré sa nastavili, boli prispôsobené konkrétnemu materiálu – v tomto prípade to bola zmes materiálov hydroxyapatitu a trikalciumfosfátu v pomere 50:50.

Po príprave materiálu nasledovala príprava stavebnej platformy, na spodok ktorej naniesli emulziu, ktorá slúžila ako pojítko na udržanie samotného modelu na platforme. Takto pripravenú platformu vložili do stroja CeraFab.7500.

V súčinnosti s týmito krokmi bola vložená do stroja nádoba so stavebnou emulziou, ktorá sa rozliala na rotačnú vaničku. Zospodu prístroja, kde je umiestnený svetelný zdroj, ktorý po prilepení stavebnej platformy na tekutú vrstvu osvetlí (vytvrdí) konkrétnu vrstvu v prierezе modelu. Po zhasnutí svetla (vytvrdení) sa stavebná platforma zdvihne o hrúbku jednej vrstvy a process sa opakuje (obr. 1). Tlačilo sa 10 modelov na jednej stavebnej doske.

Po zhruba šiestich hodinách sme mali hotové tzv. “green parts”, ktoré boli stále ,,nalepené” na stavebnej platforme a nemali požadované mechanické, ani geometrické vlastnosti. Diely boli drsné, nerovné a skoro vôbec sa nepodobali namodelovaným CAD dátam. Samotnú podobu nám zaručil postprocesing dielov pozostávajúci z chemického a jemného mechanického čistenia prebytočných obrysových ploch dielov, ktoré museli v prvom rade odstrániť zo stavebnej platformy.

Takto vyhotovený “green part” musel až do procesu sinterovania (vytvrdzovania) zotrvať v miestnosti so špeciálnym žltým svetlom, ktoré zaručovalo, že material nebude samostatne degradovať. Po nadstavení optimálnych parametrov vytvrdzovacej pece boli diely do nej vložené a vytvrdené.

Sterilizácia scaffoldov

Takto zhotevené scaffoldy boli následne vysterilizované γ žiarením v Ružinovskej nemocnici v Bratislave.

Kultivácia buniek

V experimente boli použité ľudské diploidné fibroblasty B-HNF-1, ktoré boli poskytnuté Ústavom lekárskej biológie vďaka RNDr. Danišovičovi.

Testovanie cytotoxicity materiálov

Na testovanie cytotoxicity materiálov bola použitá metóda priameho kontaktu. Všetky testy boli vykonané v triplikátoch. Scaffoldy boli umiestnené do kultivačných platní (24 jamkové) a boli premyté kultivačným médiom. Po jeho odsatí bolo pridané nové kultivačné médium. Následne boli scaffoldy kultivované 48 hodín pri teplote 37 ºC. Po 48 hodinách bolo z kultivačných platní odsaté kultivačné médium a následne boli na scaffoldy vysiate fibroblasty B-HNF-1.

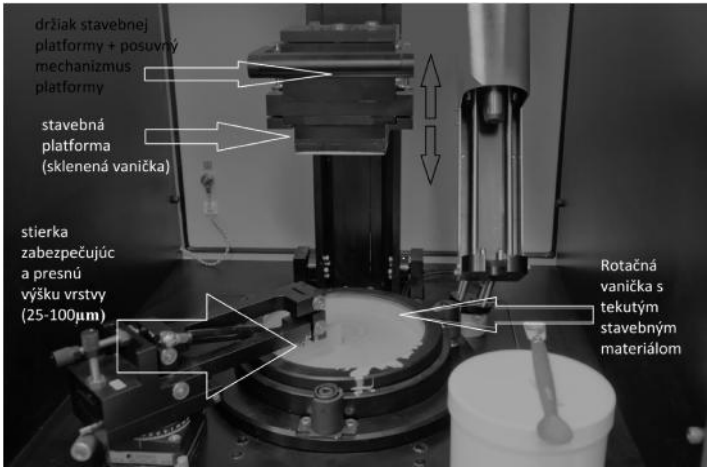
Týmto testom sme zistili, že nami testované materiály boli netoxické, bunky adherovali na ich povrch vrátane okolia a nepozorovali sme signifikantné zmeny na bunkách.

MTT- proliferačný test

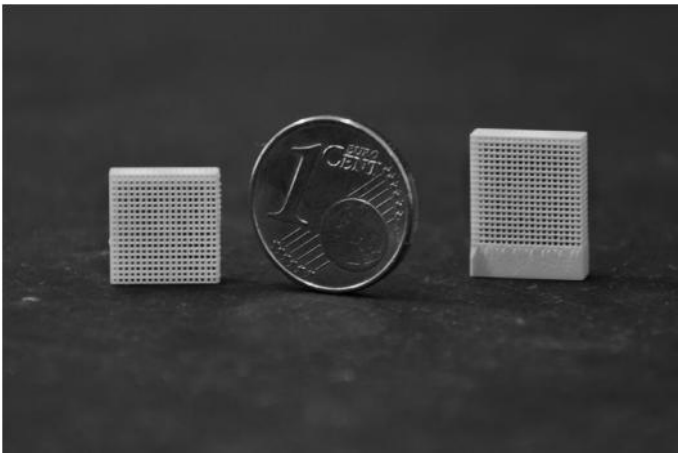
Scaffoldy boli pripravené spôsobom uvedeným vyššie. Boli na ne vysiate bunky a po 24, 48 a 72 hodinách bolo kultivačné médium odsaté a pridané čerstvé kultivačné medium. Po 3 hodinách kultivácie bola bunková priliferácia analyzovaná na základe farebnej zmeny pomocou spektrofotometra. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 490 nm. Ako negatívnu kontrolu sme použili bunky bez scaffoldu.

Proliferačný test MTT preukázal, že testované scaffoldy neovplyvňovali proliferáciu fibroblastov B-HNF-1. Pri všetkých meraniach dosahovali hodnoty kontrolnej skupiny.

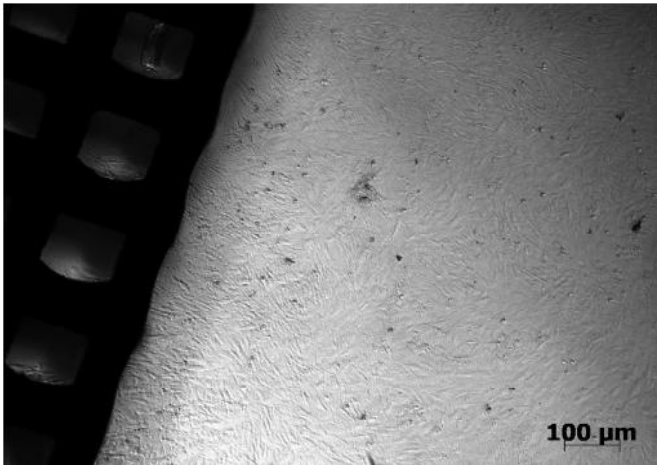
Obrazová príloha



Obr. 1 Pracovný priestor stroja CeraFab 7500. Zdroj: autor



Obr. 2 3D scaffold. Zdroj: autor



Obr. 3 Reprezentatívna mikrofotografia scaffoldu a buniek. Zdroj: RNDr. Ľuboš Danišovič

Diskusia

Podstatou tejto práce bolo navrhnúť biokompatibilný nosič, resp. v mojom prípade keramický scaffold, na ktorý môžu kmeňové bunky adherovať, rásť, množiť sa a tak postupne nahrádzať stratené tkanivo, a to či už mäkké tkanivo, kostné alebo zubné tkanivo. Z toho vyplýva možnosť vytvorenia ideálnej biokompatibilnej náhrady defektu.

Scaffold, resp. materiál z ktorého je vytvorený, musí byť netoxický, biologicky odbúrateľný a biokompatibilný **[2]**. Pórovistosť, povrchová štruktúra pórov, veľkosť a konštrukčná pevnosť sú nemenej dôležité. Scaffold nespĺňa len mechanickú funkciu, ale podporuje aj zachytávanie buniek, ich priliferáciu a diferenciáciu.

Konkrétne kombinácia trikalciumfosfátu a hydroxyapatitu môže byť veľkým prínosom pre medicínske využitie. Oba tieto keramické materiály v sebe nesú pozitívne vlastnosti pre použitie ako osteokonduktivita, vstrebateľnosť a biokompatibilita.

Možným negatívom keramiky môže byť riziko vzniku toxicity tohto materiálu po potrebnom vytvrdení. V našom prípade sa ale materiál po vytvrdení toxickým nestal a takisto nebola ovplyvnená proliferácia fibroblastov B-HNF-1, čím by sme mohli možné negatívum tohto materiálu vyvrátiť.

Pre postupné nahradenie strateného tkaniva scaffoldom spolu s bunkami je potrebná postupná degradácia scaffoldu, resp. materiálu, ktorý ho tvorí, aby sme aj týmto spôsobom predišli vytvorenie biofilmu. Je ale potrebné odhadnúť čas, kedy má byť scaffold degradovaný, aby vznikajúce tkaniva stihli defekt prerásť, resp. aby sa vôbec stihli vytvoriť. Hovoríme o tzv. potrebe regulovanej degradácie, ktorá je vo väčšine prípadov žiadaná v časovom horizonte 12-24 mesiacov. Aj pre dosiahnutie tejto vlastnosti, resp. schopnosti je spojenie hydroxyapatitu a trikalciumfosfátu výhodné. Trikalciumfosfát je degradovateľný viac ako hydroxyapatite, ktorý je stabilnejší a menej rozpustný.

Práca bola vypracovaná s podporou projektu APVV-14-0294 s názvom "Výroba a testovania náhrad tvrdých tkanív na mieru z hydroxyapatitu (HA) technológiou 3D tlače" , zodpovedným vedúcim projektu je doc. Ing. Radovan Hudák, PhD., Katedra biomedicínskeho inžinierstva a merania, Strojnícka fakulta Technickej univerzity v Košiciach.

Zoznam použitej literatúry:

1. SAMAVEDI, Satyavrata, Abby R. WHITTINGTON a Aaron S. GOLDSTEIN. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. Elsevier [online]. 2013, 9, 8037-8045
2. VOJTAŠŠÁK, Ján et al. Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. Neuroendocrinology Letters [online]. 2006, 27, 134-137

33. Prvé skúsenosti s masívnym paralelným sekvenovaním panelov génov v onkogenetike

Mgr. Lenka Dolešová
(patologická anatómia a súdne lekárstvo)
Spoluautori: M. Konečný [1], I. Mlkvá [3], A. Valachová [4], K. Závodná [1], J. Barošová [5], F. Cisárik [6], R. Behulová-Lohajová[2], V. Repiská [2]

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.
[1] Oddelenie lekárskej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava, [2] Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava, [3] Oddelenie klinickej genetiky UN BA, Nemocnica Staré Mesto, Bratislava, [4] Oddelenie lekárskej genetiky FN, Trenčín, [5] Genet s.r.o., Ambulancia lekárskej genetiky, Nitra, [6] Oddelenie lekárskej genetiky FNsP, Žilina

Úvod

Hereditárne onkologické syndrómy (HOS) vo všeobecnosti tvoria 5-10% prípadov zo všetkých nádorových ochorení a vyznačujú sa autozomálne dominantnou dedičnosťou s neúplnou penetranciou. Ich charakteristickými klinickými znakmi sú napr. viacnásobný výskyt nádorového ochorenia v rodine, nízky vek v čase diagnózy ochorenia, prítomnosť duplexných alebo bilaterálnych foriem malignít, či typické histopatologické charakteristiky. Medzi typické a najfrekventovanejšie dedičné onkologické syndrómy patria napr. hereditárny karcinóm prsníka a ovárií (HBOC), hereditárny nepolypózny karcinóm kolorekta (HNPCC), hereditárny difúzny karcinóm žalúdka a iné. S hereditárnymi onkologickými syndrómami sú asociované patologické varianty vo vysoko, stredne a nízkopenetratných génoch, ktoré sa odlišujú výškou rizika na vznik nádorového ochorenia. Ako modelový príklad vplyvu rizikových faktorov prezentujeme HBOC syndróm. V rámci aktuálnych trendov sa čoraz viac do popredia v diagnostike dostávajú techniky masívneho paralelného sekvenovania, ktoré asi ako jediné dokážu komplexne testovať viaceré HOS naraz a svojimi výhodami ako komplexnosť, rýchlosť a finančná náročnosť predstavujú relevantnú alternatívu ku klasickým postupom. Prípady karcinómu prsníka a ovárií, ktoré nesú mutácie v génoch *BRCA1/2* tvoria 5-10% všetkých diagnostikovaných prípadov týchto ochorení (1). Mutácie v génoch *BRCA1/2* sú zodpovedné za 20-25% hereditárnych prípadov karcinómu prsníka, pričom sú zároveň považované za gény s vysokou penetranciou pre vznik neoplázií prsníka a ovárií (2).

Materiál a metodika

Jednotlivé vzorky DNA boli izolované z periférnej krvi pomocou plne automatizovaného spôsobu izolácie na prístroji Magnesia®16. Pomocou kitu BRCA Hereditary Cancer MASTR Plus (Multiplicom), ktorý zahŕňa 26 génov asociovaných s HOS bola pripravená PCR knižnica, ktorá bola následne analyzovaná na prístroji MiSeq (Illumina).

Výsledky

V rámci skupiny pacientov s HBOC sme analyzovali celkovo 71 rodín. Probandi boli selektovaní na základe viacerých kritérií t.j.: sila rodinnej anamnézy, vek v čase diagnózy malignity, prítomnosť asociovaných typov nádorov a výskyt karcinómu ovárií. Celkovo sme vo vyšetrovanom súbore pacientov identifikovali 10 patologických variantov, čo predstavuje frekvenciu 14,1%. Zo súboru rodín sme vybrali 7 rodín, v ktorých sme detegovali vzácne varianty v asociovaných génoch vo vzorkách,

ktoré boli negatívne na prítomnosť *BRCA* mutácií. Prvá kazuistika prezentuje rodinu s identifikovanou nonsense mutáciou (p.Q439X) v strednepenetrantnom géne *CHEK2*. V rámci druhej kazuistiky by sme priblížili rodinu s identifikovanou mutáciou (p.G245S) v géne *TP53.* V tretej vyšetrovanej rodine sme detegovali variant (p.K219S*fs16) v géne *NBN*. V rámci štvrtej rodiny sme u probandky identifikovali patologický variant (c.8395del10) génu *ATM* a moderujúci nízkopenetrantný variant p.I157T v géne *CHEK2*. Piata kazuistika sa týka variantov (c.158G>A a c.3475T>C) identifikovaných v génoch *BARD1* a *PALB2*, ktorých proteíny sú interakčnými partnermi BRCA proteínov. Posledná kazuistika sa prezentuje rodinu s identifikovaným variantom (p.E293X) v géne *STK11.*

Diskusia

Celkovo sme vyšetrili uvedený panel 26 reparačných génov v 71 rodinách, pričom sme identifikovali mutácie mimo *BRCA1/2* génov v 10 z nich, čo prestavuje frekvenciu 14,1%, čo koreluje s údajmi uvedenými v dostupnej literatúre, kde je frekvencia výskytu variantov uvádzaná v rozmedzí 5-10%. Prvou prezentovanou kazuistikou je rodina s identifikovanou nonsense mutáciou v géne *CHEK2*. Mutácie v tomto géne sú v literatúre popísané najmä v prípadoch karcinómu prsníka a malígneho melanómu, čo je v korelácii s údajmi o našej analyzovanej rodine, keďže sme variant identifikovali v rodine s výskytom karcinómu prsníka a malígneho melanómu. Nonsense mutácie v uvedenom géne sa vyskytujú pomerne vzácne, v dostupnej literatúre sú popísané iba 4 typy takýchto variantov (3), pričom v slovenskej populácii sme doteraz identifikovali dve unikátne mutácie tohto typu. V rámci druhej kazuistiky sme vybrali rodinu s detegovanou mutáciou v HBOC vysokopenetrantnom tumorsupresorovom géne *TP53*. Mutácie v tomto géne sú asociované najmä s Li-Fraumeni syndrómom, s výskytom sarkómov, nádorov mozgu, avšak aj tumorov prsníka vo veľmi mladom veku. V prezentovanej rodine koreluje výskyt karcinómu prsníka v mladom veku s osobnou anamnézou probandky s nádorom prsníka diagnostikovanom vo veku 29 rokov, pričom u matky probandky bol diagnostikovaný už v 26 rokoch. U matkiných rodičov evidujeme taktiež výskyt nádorových ochorení avšak vo vyššom veku (66 a 46 r.). Teoreticky tak môžeme uvažovať aj o vzniku *de novo* mutácie u probandkinej matky. De novo mutácie v géne *TP53* sú v literatúre popísané, Gonzales a kol. (2009)(4) reportuje v 7%-nú frekvencii uvedených zmien. V rodine s výskytom výlučne karcinómu prsníka sme detegovali delečný patologický variant v géne *NBN*. Podľa Uzunoglu a kol. (2016) (5) sú mutácie v *NBN* géne asociované najmä s výskytom karcinómov prsníka. Prezentovaný patologický variant je podľa českej publikácie autorov Seemanová a kol. (2007)(6) považovaný za špecifický slovanský founder variant. V rámci 4. kazuistiky by sme chceli poukázať na možnú prítomnosť viacerých variantov so strednou/nízkou penetranciou. U testovanej probandky s diagnózou karcinómu prsníka sme identifikovali 2 varianty, a to deléciu v géne *ATM* a kontroverznú missense mutáciu v géne *CHEK2*. Zaujímavosťou je, že v rámci rodinnej anamnézy evidujeme v rodičovskej generácii prítomnosť týchto variantov u každého z rodičov a ich spojenie sa v ďalšej generácii, ktoré sa prejavuje prítomnosťou karcinómu prsníka. Spomínaný *ATM* variant bol identifikovaný aj v britskej populácii a pomerne vzdialenej brazílskej populácii. Druhý detegovaný variant p.I157Tv géne *CHEK2* je v literatúre naopak reportovaný pomerne diskutabilne. Podľa údajov v dostupných databázach je označovaný ako potenciálne patologický, avšak podľa niektorých literárnych zdrojov naopak ako benígny (7). Piata kazuistika prezentuje ďalší diskutabilný a nie celkom doriešený prípad prítomnosti dvoch potenciálne patologických variantov v nízkopenetrantných génoch *BARD1* a *PALB2*. Oba gény kódujú interakčné proteíny pre BRCA1/2 proteíny. Missense variant c.158G>A v géne *BARD1* nie je popísaný v dostupnej literatúre, ani databázach avšak je lokalizovaný v konzervovanej cysteín bohatej doméne, ktorá zodpovedá za správnu väzbu s proteínom BRCA1. Spomínaná mutácia je analógiou k

BRCA1 patologickému variantu p.C51G, ktorý je druhým najčastejšie detegovaným *BRCA1* patologickým variantom v strednej Európe. Analogicky teda predpokladáme kauzálny klinický dopad uvedeného *BARD1* variantu, najmä vzhľadom na jeho lokalizáciu v mieste väzby s BRCA1 proteínom. U testovanej probandky sme však identifikovali aj missense variant v géne *PALB2*, ktorý bol viacerými softvérmi predikovaný ako potenciálne patologický. Zaujímavé je, že v našom analyzovanom súbore sme doposiaľ neidentifikovali žiadnu inzerčno delečnú mutáciu v géne *PALB2*, pričom však v susednej českej populácii je frekvencia spomínaných mutácií na rovnakej úrovni ako frekvencia patologických variantov v géne *BRCA2* (8). Posledná prezentovaná kazuistika pojednáva o nonsense mutácii v géne *STK1/LBK1,* ktorého mutácie sú asociované s výskytom pomerne vzácneho Peutz-Jeghersovho syndrómu. Celkovo sme vyšetrovali na prítomnosť mutácií v *STK11* už 7 rodín, avšak kauzálnu mutáciu sme dokázali iba v tomto jednom prípade. Mutačná frekvencia tak predstavuje len 14,3%, čo je výrazný rozdiel oproti literárne publikovaným údajom na úrovni 70-90%, čo pravdepodobne súvisí s komplexnejším posudzovaním indikácií v zahraničí (9). V našom laboratóriu sekvenujeme paralelne gény *BRCA1* a *BRCA2* a v prípade negativity po selekcii u vzoriek analyzujeme panel 26 reparačných génov. Pri panelovom sekvenovaní je štandardne identifikované veľké množstvo DNA variantov. Preto je nevyhnutné klásť dôraz na proces klinickej interpretácie variantov, čo sa však spája s problémami ako napr. nedostatok relevantných databáz, či kontroverzné predikcie softvérov.

Zoznam použitej literatúry:

1. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D et al.: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994; 266{5182): 66–7.
2. Antoniou AC, Pharoah PD, Narod S et al.: Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies. J Med Genet 2005; {42): 602–603.
3. Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. J Clin Oncol 2008; 26{4):542-8.
4. Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D,Wen-Fong CY, Nguyen VQ, Han JH, Lowstuter K, Longmate J, Sommer SS et al.: Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. J Clin Oncol 2009; 27: 1250–1256.
5. Uzunoglu H, Korak T, Ergul E, Uren N, Sazci A, Zafer Utkan N, Kargi E, Triyaki C, Yirmibesoglu O: Association of the nibrin gene (NBN) variants with breast cancer. Biomedical Reports 2016; 4{3): 369-373.
6. Seemanová E, Jarolim P, Seeman P, Varon R, Digweed M, Swift M, Sperling K: Cancer Risk of Heterozygotes With the NBN Founder Mutation. J Natl Cancer Inst 2007; 99: {24): 1875-1880.
7. Cybulski C, Górski B, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Debniak T, Wokolorczyk D, Jakubowska A, Serrano-Fernández P, Dork T, Narod SA, Lubinski J: Effect of CHEK2 missense variant I157T on the risk of breast cancer in carriers of other CHEK2 or BRCA1 mutations. J Med Genet 2009; {462):132-5.
8. Janatova M, Kleibl Z, Stribrna J, Panczak A, Vesela K, Zimovjanova M, Kleiblova P, Dundr P, Soukupova J, Pohlreich P: The PALB2 gene is a strong candidate for clinical testing in BRCA1- and BRCA2-negative hereditary breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2013; 22{12):2323-32.
9. Beggs AD, Latchford AR, Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Aretz S, Bertario L, Blanco I, Bülow S, Burn J, Capella G, Colas C, Friedl W, Møller P, Hes FJ, Järvinen H, Mecklin JP, Nagengast FM,

Parc Y, Phillips RK, Hyer W, Ponz de Leon M, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Tejpar S, Thomas HJ, Wijnen JT, Clark SK, Hodgson SV: Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. Gut 2010; 59{7):975-86

34. Analýza sociálnej expozície hluku u vybranej vulnerabilnej populácie v Bratislave

Mgr. Alexandra Filová

Školiteľ: doc. MUDr. Ľubica Argalášová PhD., MPH
Ústav hygieny LF UK v Bratislave

Úvod

Environmentálny hluk býval často označovaný ako „zabudnutý polutant“. V súčasnej modernej spoločnosti sa však ukazuje ako významný rizikový faktor životného prostredia a zdravia, ktorému je potrebné venovať väčšiu pozornosť. Tento negatívny faktor životného prostredia sa odlišuje od iných škodlivín tým, že sa jeho hladiny stále zvyšujú a pôsobí na človeka neustále, teda aj v čase určenom na relaxáciu ako napríklad pri spánku. Sociálna expozícia je momentálne veľkým problémom, najmä u dospievajúcich a mladých dospelých.

Rôzne voľno časové aktivity (časté počúvanie hudby vysokej hlasitosti cez osobné hudobné prehrávače (OHP) a pravidelná návšteva podujatí s vysokou hlukovou expozíciou), môžu mať na jedincov sluchové (dočasný alebo trvalý posun prahu sluchu, strata sluchu), alebo nesluchové účinky (annoyance, poruchy spánku, nervozita, podráždenie, vysoký krvný tlak) (1, 2, 3, 4).

Dlhodobá expozícia pri hladinách A environmentálneho hluku (najmä hluku od dopravy) v rozmedzí 60 - 90 dB môže vyvolať nešpecifické reakcie celého organizmu, hlavne v sfére vegetatívnej, endokrinnej a regulačnej a s tým súvisiace poruchy (5).

Cieľom štúdie bola analýza sociálnej expozície hluku v skupine 20-25 ročných študentov vulnerabilných voči rušivým a obťažujúcim zdrojom hluku v exteriéri a interiéri. Výsledky poukázali na významnosť hluku z cestnej premávky a sociálneho hluku, ako aj na potrebu prevencie a intervencie v týchto vulnerabilných skupín.

Materiál a metodika

Použili sme validizovanú metodiku subjektívneho hodnotenia rušenia a obťažovania (tzv."annoyance"), porúch spánku a psychosociálnej pohody vo vzťahu k hlukovej expozícií. Respondenti vypĺňali validizovaný „Dotazník o obťažovaní hlukom“, kde sa pomocou 5-stupňovej škály vyjadrovali k jednotlivým otázkam, týkajúcich sa sluchových a nesluchových účinkov vyplývajúcich z hlukovej expozície. Zamerali sme sa najmä na rušenie spánku, obťažovanie hlukom z rôznych zdrojov a na interferenciu s bežnými dennými aktivitami. Na základe údajov získaných z cieleného validizovaného dotazníka sme hodnotili environmentálne, behaviorálne a psychosociálne faktory u študentov s trvalým alebo prechodným bydliskom v Bratislave.

Pri odhade expozičnej dávky sme použili metodiku podľa Portnuffa (6, 7). Respondenti subjektívne hodnotili intenzitu a frekvenciu expozície osobných hudobných prehrávačov (OHP). Zisťovali sme, aký typ slúchadiel preferujú (zasunuté do uší, alebo s mostíkom) a pri akej hlasitosti počúvajú svoje OHP. Takisto hodnotili ako často navštevujú podujatia s vysokou hlukovou expozíciou (napr. rockové koncerty, diskotéky, športové podujatia) a ako často robia hlučné domáce práce a či hrajú na nejaký hudobný nástroj.

Vo výskume sme použili aj metódu objektivizácie priamym meraním hladín zvuku pomocou analyzátora zvuku novej generácie s modulom pre frekvenčnú analýzu, integrujúcim zvukomerom Brüel-Kjaer typu 2250. Merania sme robili v exponovanej (ŠD Družba, Botanická ulica) a kontrolnej lokalite (ŠD Ľ. Štúra, Mlynská dolina).

Na záver sme zabezpečili v spolupráci s ORL špecialistom pre respondentov audiometrické a tympanometrické vyšetrenia na Poliklinike Mýtna v Bratislave. Pri vyšetrení bol použitý diagnostický digitálny audiometer MAICO MA 52, s ktorým sme stanovili prah sluchu pre čisté tóny.

Na vyhodnocovanie výsledkov sme použili metódy deskriptívnej, bivariantnej a multivariantnej štatistiky na zistenie vzájomných asociácií medzi faktormi životného štýlu, psychosociálnymi, biologickými, behaviorálnymi a environmentálnymi faktormi a štatistické programy Epi Info™, Verzia 7,1,1,1, 2013 a S-Plus 6,0.

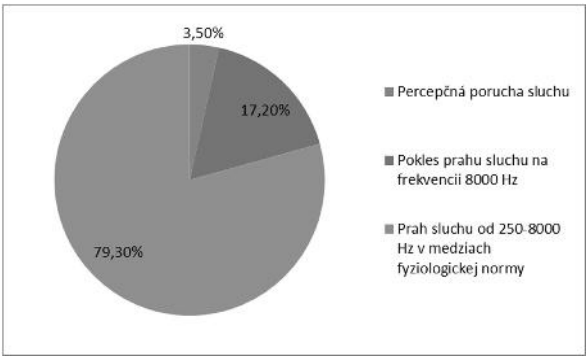
Dotazníky ako aj objektívne vyšetrenia boli dobrovoľné pre každého z oslovených. Účastník štúdie zároveň udelil súhlas s použitím informácií na vedecké účely.

Výsledky

Monitorovanie hladín akustického tlaku ukázalo, že v exponovanej lokalite sú zvýšené hladiny nad národné a medzinárodné limity najmä v popoludňajších hodinách v časových intervaloch od 17:00 do 18:00 a 20:00 do 21:00 (L_{Aeq}=67,6; 64,7 dB). Hladiny akustického tlaku v kontrolnej oblasti boli významne nižšie ($p<0,001$) (L_{Aeq}=53,4; 54,3 dB).

Štúdie sa zúčastnilo 837 vysokoškolských študentov (256 mužov a 581 žien, priemerný vek 23,09 ± 2,23) s trvalým, alebo prechodným bydliskom v Bratislave. 267 respondentov bývalo v študentskom domove exponovanom hlukom z cestnej dopravy a 570 v kontrolnej, tichej lokalite. Z celkovej vzorky 663 (79,2%) študentov uviedlo, že počúvali OHP v poslednom týždni priemerne 293 minút. Zaznamenali sme významný rozdiel v počúvaní OHP medzi exponovanou (86,9%), a kontrolnou skupinou (75,6%) ($p = 0,01$). Z užívateľov OHP 28,1% prekročili LAV (spodná akčná hodnota pre hluk v pracovnom prostredí = 80 dB). Najčastejšie používaný typ slúchadiel sú slúchadlá zasunuté do uší 90% v exponovanej skupine a 82% v kontrolnej skupine. Užívatelia slúchadiel zasunutých do uší mali najčastejšie nastavenú hlasitosť na strednú úroveň 73,2 dB. 32,7% respondentov z tejto skupiny prekročilo LAV. Používatelia slúchadiel s mostíkom mali najčastejšie nastavenú hlasitosť na svojich hudobných prehrávačoch na strednú hodnotu 76,4 dB. Z tejto skupiny 26,7% prekračovalo LAV. V exponovanej lokalite uviedlo používanie OHP za posledný týždeň 232 respondentov, teda 87%, pričom najčastejšie mali nastavenú hlasitosť na strednú úroveň, t.j. pri slúchadlách zasunutých do uší 73,2 dB (51% respondentov) a pri slúchadlách s mostíkom 76,4 dB (6% respondentov). V tejto lokalite 25% respondentov prekročilo LAV. V kontrolnej lokalite uviedlo používanie OHP za posledný týždeň 431 probandov, teda 76%, pričom mali najčastejšie svoje OHP nastavené na strednú úroveň (49% používateľov). V tejto lokalite 31% respondentov prekračovalo LAV. Rozdiely v počte študentov počúvajúcich OHP boli signifikantné ($p < 0,05$).

V spolupráci s ORL špecialistom sme uskutočnili audiometrické vyšetrenia na pilotnom súbore dobrovoľníkov – vysokoškolákov (n=29), ktoré naznačili posun sluchového prahu na vyšších frekvenciách u 20% probandov (Obr. 1).



Obr.1.: Preventívne audiometrické vyšetrenie

Zo spoločenských udalostí s vysokou hlukovou expozíciou najviac respondentov navštevovalo kino (301 študentov), kde trávili priemerne 194 minút do mesiaca. Druhou najnavštevovanejšou spoločenskou aktivitou boli diskotéky (250 študentov), kde strávili priemerne 457 minút do mesiaca. Treťou najpreferovanejšou aktivitou bola návšteva rockových koncertov (122 študentov), kde respondenti trávili priemerne 244 minút do mesiaca. Najviac času naši probandi (120) venovali návšteve športových podujatí, kde trávili priemerne 479 minút do mesiaca (Obr.2). Vysokoškoláci z exponovanej skupiny trávili v kine približne 244 minút do mesiaca, v porovnaní s probandmi z kontrolnej skupiny, ktorí trávili v kine mesačne v priemere 170 minút (p=0,08).

Obr.2.: Priemerná doba pobytu na spoločenských udalostiach s vysokou hlukovou expozíciou

Diskusia

V našom výskume 78,6 % respondentov uviedlo, že počúvalo OHP za posledný týždeň, pričom priemerná doba počúvania bola 293 minút a 30,7 % z užívateľov OHP prekročilo LAV. Na základe audiometrického vyšetrenia, pri zatiaľ vyšetrenom počte probandov, sme zaznamenali naznačený posun sluchového prahu vo vysokých frekvenciách

u 20% vyšetrených subjektov. Ide sa o vulnerabilnú skupinu mladých ľudí vo veku 20 až 30 rokov, ktorá si v prevencii sluchových postihnutí vyžaduje osobitnú pozornosť. Vyšetrovaný súbor plánujeme rozšíriť na 100 probandov a následne navrhnúť vhodné intervenčné postupy

Naše výsledky sú v súlade s výsledkami iných štúdií, ktoré uvádzajú, že 88-90 % adolescentov a mladých dospelých počúva OHP cez slúchadlá. Publikácie z posledných rokov hodnotili zvýšené riziko vzniku porúch sluchu v súvislosti s počúvaním OHP ako aj aktuálnu incidenciu nedoslýchavosti a tinitu. Prevalencia porúch sluchu spôsobených hlukom u adolescentov a mladých dospelých bola 17% až 29% (8). Prevalencia porúch sluchu spôsobených hlukom u adolescentov a mladých dospelých sa udáva v rozpätí 17 % až 29 % (9). Posun sluchového prahu ≥ 25 dB pri jednej alebo viacerých frekvenciách sa vyskytol u 7,3 % zo 177 probandov v Malajzii (10). V početnom súbore deviatakov zo základných škôl v Bavorsku (n = 1 843), bola prevalencia audiometrických zárezov iba 2,4 % a naznačila potrebu sledovať súbor longitudinálne alebo sa zamerať na staršie vekové skupiny, napríklad vysokoškolákov (11). Študenti v našej skupine exponovanej dopravným hlukom počúvali OHP častejšie než študenti z kontrolnej skupiny (možno sa tým snažia maskovať jeho účinky ako aj účinky iných zdrojov environmentálneho hluku). Avšak úroveň hlasitosti počúvania OHP nebola medzi skupinami signifikantne rozdielna.

Záver

Naše výsledky priniesli poznatky, že expozícia environmentálnemu hluku je v súčasnosti oveľa intenzívnejšia ako v minulosti, pretože s ním čoraz častejšie prichádzame do styku okrem hluku z dopravy aj pri oddychových voľno-časových aktivitách. Túto expozíciu ešte zvyšujú osobné hudobné prehrávače, ktoré sú v súčasnosti dostupné pre každého, či už formou mp3 prehrávača alebo smartfónu. Tejto problematike je potrebné venovať viac pozornosti, pretože počúvanie hudby prostredníctvom OHP je mimoriadne populárne, najmä medzi mladými dospelými. Týka sa to aj návštevy rôznych zábavných a rekreačných podujatí s vysokou hlukovou intenzitou (kino, koncerty, diskotéky, festivaly).

Bolo by vhodné zlepšiť vedeckú základňu pre manažment znižovania hladín hluku a monitorovanie dopadu na zdravie obyvateľov.

Táto práca bola realizovaná s podporou grantu UK/265/2016 Objektivizácia sluchových a nesluchových účinkov environmentálneho hluku z rôznych zdrojov u vybranej vulnerabilnej populácie.

Zoznam použitej literatúry:

1. Žiaran S., Ochrana človeka pred kmitaním a hlukom. Bratislava: Vydavateľstvo STU. 2008.
2. Fritschi L, Brown Lex A, Kim R, Schwela D, Kephalopoulos S., Burden of disease from environmental noise. Quantification of healthy life years lost in Europe. Geneva: WHO, 2011. 106 p. http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/e94888.pdf
3. Basner M., Babisch W., Davis A., Brink M., Clark C., Janssen S., Stansfeld S., Auditory and non-auditory effects of noise on health. Lancet. 2014; 383(9925):1325-1332. ISSN: 01406736
4. Filová, A., Samohýl, M., Argalášová, Ľ., Expozícia environmentálnemu hluku a jeho vplyv na zdravie obyvateľstva. Hygiena 2015 60(4): 155-162. ISSN: 1802-6281.
5. Berglund B, Lindvall T, Schwela DH (eds): Guidelines for Community Noise. Geneva: WHO 2000: 159.

6. Portnuff Cdf, Fligor Bj, Arehart KH., Teenage Use of Portable Listening Devices: A Hazard to Hearing? J Amer Acad Audiol, 2011; 22: 663-677.
7. Portnuff, CDF, Fligor BJ, Arehart KH., Self-report and long-term field measures of MP3 player use: How accurate is self-report? Int J Audiol, 2013; 52: 33-40.
8. Basner M, Brink M, Bristow A et al., ICBEN review of research on the biological effects of noise 2011-2014. Noise Health, 2015; 17 (75): 57-82.
9. Jeram S, Delfar N., Preliminary results of the study on usage of portable music players and future plans for public policy in Slovenia. 11th International Congress on Noise as a Public Health Problem (ICBEN) 2014, Nara, JAPAN.
10. Sulaiman AH, Seluakumaran K, Husain R., Hearing risk associated with the usage of personal listening devices among urban highschool students in Malaysia. Publ Health, 2013; 127: 710-715.
11. Twardella D, Perez-Alvarez C, Steffens T, et al. The prevalence of audiometric notches in adolescents in Germany: The Ohrkan-study. Noise Health, 2013; 15(67): 412-419.

35. Klozapín odlišne ovplyvňuje expresiu c-Fos proteínu vo vybraných mozgových oblastiach po vystavení akútnemu stresu a novému stresoru po predchádzajúcom predstresovaní

Mgr. Alena Černáčková[1]
(normálna a patologická fyziológia)
Spoluautori: RNDr. Jana Osacká, PhD.[2], Mgr. Ľubica Horváthová, PhD.[2], Mgr. Zuzana Majerčíková, PhD.[2], RNDr. Alexander Kiss, DrSc.[2]

Školiteľ: prof. MUDr. Boris Mravec, PhD.[1,2]
[1]Fyziologický ústav LF UK, Bratislava, SR [2]Laboratórium neurobiológie, Ústav experimentálnej endokrinológie BMC, SAV, Bratislava, SR

Úvod

Klozapín predstavuje archetypálne atypické antipsychotikum využívané na liečbu viacerých neuropsychiatrických ochorení (1). V súčasnej psychiatrickej praxi sa najčastejšie využíva ako liečivo druhej voľby u pacientov s chronickou schizofréniou neresponzívnou na iné antipsychotiká (2).

Klozapín prechádza hematoencefalickou bariérou do mozgu (3). Chemická štruktúra determinuje vlastnosti klozapínu ako širokospektrálneho ligandu (4). Toto antipsychotikum pôsobí antagonisticky na dopamínergické D2 receptory, ale na rozdiel od typických antipsychotík pri terapeutických dávkach obsadzuje len 40 – 60% dostupných D2 receptorov. Okrem toho má stredne vysokú afinitu k sérotonergickým 5-HT2A receptorom (1). Jedinečné vlastnosti klozapínu tak moduláciou neurotransmiterového metabolizmu v dopamínergických dráhach zabezpečujú jeho vysokú účinnosť, a to bez výskytu nežiaduceho extrapyramidálneho syndrómu, ako aj niektorých ďalších vedľajších účinkov charakteristických pre typické antipsychotiká (5).

Viaceré z mozgových oblastí, ktoré sú súčasťou dopamínergických dráh mozgu zároveň plnia úlohu v centrálnej reakcii na pôsobenie stresorov (napríklad mediálny prefrontálny kortex, laterálne septum). Navyše, antipsychotiká môžu okrem svojich cieľových štruktúr ovplyvňovať aj iné štruktúry centrálneho nervového systému, a tak modulovať ich aktivitu. Niektoré z týchto oblastí (napríklad paraventrikulárne jadro hypotalamu) sú pritom zapojené do riadenia stresovej reakcie organizmu (6). Na základe predchádzajúcich štúdií teda možno predpokladať, že stresová odpoveď organizmu by mohla byť modifikovaná účinkom antipsychotík.

Na potvrdenie našich hypotéz sme využili sledovanie expresie c-Fos proteínu v rôznych mozgových oblastiach. Protoonkogén *c-fos* patrí medzi gény skorej odpovede a zvýšenie jeho expresie sa preukázalo ako po podaní antipsychotík, tak aj po vystavení stresorom. Expresiu c-Fos proteínu preto môžeme považovať za vhodný marker na sledovanie interferencie pôsobenia skúmaných faktorov (7). V štúdii sme sa zamerali na sledovanie expresie c-Fos proteínu v 7 mozgových oblastiach, medzi ktoré patrili:

- oblasti spadajúce do dopamínergických dráh a predstavujúce cieľové štruktúry pre pôsobenie antipsychotík: dorzolaterálne (dlSep) a ventolaterálne septum (vlSep), *nucleus accumbens* – jadro (nAccJ) a obal (nAccO), dorzolaterálne (dlStr) a dorzomediálne striatum (dmStr) a mediálny prefrontálny kortex (mPFC).

- oblasti zapojené do riadenia stresovej odpovede organizmu: paraventrikulárne jadro hypotalamu (PVN), mPFC.

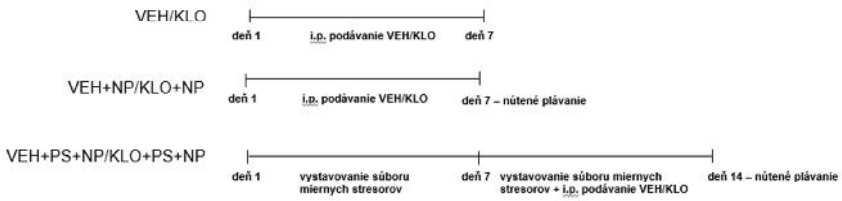
Materiál a metodika

Experimentálne zvieratá. 40 samcov potkanov kmeňa Wistar (hmotnosť 200 – 250 g pri dovoze; Charles River, Nemecko) bolo chovaných v klietkach samostatne za štandardných podmienok s *ad libitum* prístupom k vode a potrave.

Experimentálne skupiny. Na začiatku pokusu boli zvieratá rozdelené do 6 skupín:

- **skupina VEH**: zvieratá, ktorým bolo 7 dní intraperitoneálne (i.p.) podávané vehikulum (VEH, 0,1% roztok kyseliny octovej; Slavus, Slovensko, 100 µl/100 g hmotnosti zvieraťa, n = 4).
- **skupina KLO**: zvieratá, ktorým bol 7 dní i.p. podávaný klozapín rozpustený vo vehikule (KLO, 10 mg/kg hmotnosti, Sigma-Aldrich, Nemecko, n = 4).
- **skupina VEH+NP**: zvieratá, ktorým bolo 7 dní i.p. podávané VEH a posledný deň boli vystavené akútnemu stresu – nútenému plávaniu (NP, n=8).
- **skupina KLO+NP**: zvieratá, ktorým bol 7 dní i.p. podávaný KLO a posledný deň boli vystavené akútnemu stresu – NP (n=8).
- **skupina VEH+PS+NP**: predstresované zvieratá (PS, t.j. vystavené 13 dní súboru miernych stresorov – „stress preconditioning“), ktorým bolo 7 dní i.p. podávané VEH a posledný deň boli vystavené novému stresoru – NP (n=8).
- **skupina KLO+PS+NP:** predstresované zvieratá (PS, t.j. vystavené 13 dní súboru miernych stresorov – „stress preconditioning“), ktorým bol 7 dní i.p. podávaný KLO a posledný deň boli vystavené novému stresoru – NP (n=8).

Experimentálny dizajn. Zvieratám zo všetkých experimentálnych skupín bolo po dobu 7 dní podávané vehikulum, alebo klozapín. Zvieratá zo skupín VEH+PS+NP/KLO+PS+NP boli každý deň po dobu 13 dní vystavené jednému z nasledujúcich miernych stresorov: i/ znehybnenie: 30 – 90 min; ii/ pobyt v chladovej komore, 4°C: 30 min – 60 min; iii/ výmena klietok: cez noc; iv/ zahusťovanie (2 zvieratá boli umiestnené do jednej klietky): cez noc v/ open field: 5 min. Na konci experimentu boli zvieratá zo skupín VEH+NP/KLO+NP a VEH+PS+NP/KLO+PS+NP vystavené akútnemu, resp. novému stresoru, nútenému plávaniu, na 10 min pri teplote vody 23°C (obr.1).



Obr. 1: Schéma experimentálneho dizajnu
VEH – vehikulum, KLO – klozapín, NP – nútené plávanie, PS – predstresovanie („stress preconditioning“).

90 min po nútenom plávaní boli zvieratá anestezované i.p. podaním pentobarbitalu (60 mg/kg, Spofa, Česká republika) a následne transkardiálne perfundované (4% roztok paraformaldehydu v 0,1M fosfátovom pufri – PB, pH=7,4).Odobraté mozgy boli presýtené 30 % sacharózou a krájané použitím kryostatu (Reichert-Jung) pri teplote -23 °C na 30 µm hrubé koronárne rezy, ktoré boli zozbierané ako voľne plávajúce a následne imunohistochemicky farbené.

Imunohistochemický protokol zahŕňal: 1/blokovanie endogénnej peroxidázy 15 min inkubáciou rezov s 0,3% roztokom H_2O_2 (Sigma Aldrich, Nemecko) v 0,1M PB; 2/inkubáciu s primárnou králičou protilátkou proti c-Fos (Abcam, UK, 1:2000) na 48 hod; 3/inkubáciu s biotinylovanou sekundárnou protilátkou proti králičiemu IgG (VectorLab., USA, 1:500) na 90 min; 4/inkubáciu s avidín-biotín komplexom (ABC, Vector, USA, 1:250) na 90 min; 5/vizualizáciu c-Fos proteínu v acetátovom pufri (pH=6) obsahujúcom 0,0006% H_2O_2 pomocou 3,3´-diaminobenzidín tetrahydrochloridu (0,0625%, Sigma–Aldrich, Nemecko) a chloridu nikelnatého (2,5%, Sigma–Aldrich, Nemecko). Vizualizácia trvala pokým c-Fos – IgG – ABC komplex nezískal sýto čierne zafarbenie, ktoré označovalo aktivované neuróny. Rezy boli natiahnuté na podložné sklíčka, zakryté krycími sklíčkami a následne boli využitím svetelného mikroskopu (Scope.A1, Carl Zeiss) vybaveného digitálnou kamerou AxioCamERc5s zhotovené fotografie študovaných oblastí. Následne boli c-Fos-imunoreaktívne neuróny lokalizované v PVN (- 1,08 až - 1,56 mm od Bregmy), mPFC (3,24 až 2,76 mm od Bregmy), nAccJ, nAccO, dlSep, vlSep, slStr a dmStr (2,04 až 1,56 mm od Bregmy) na rezoch vyhodnocované bilaterálne na zviera a na rez (minimálne 3 rezy/zviera).

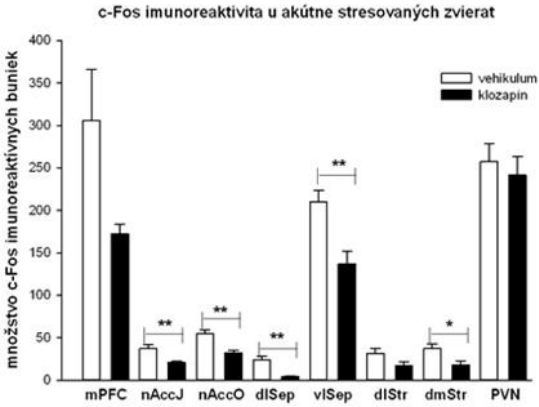
Aktivované neuróny boli počítané pomocou programu CellCounter1.2. Po spočítaní boli výsledky vyhodnotené Studentovym T-testom (SigmaStat). Všetky získané hodnoty sú uvádzané ako priemer ± SEM na skupinu. Vplyv bol považovaný za štatisticky signifikantný pri $p < 0,05$.

Výsledky

U zvierat, ktorým bol 7 dní podávaný klozapín sme zaznamenali signifikantné zvýšenie expresie c-Fos proteínu v PVN ($t(6)=14.66$; $p<0.0001$), mPFC ($t(6)=7.42$; $p=0.0003$), vlSep ($t(6)=14.86$; $p<0.0001$) a dlStr ($t(6)=2.45$; $p=0.0497$).

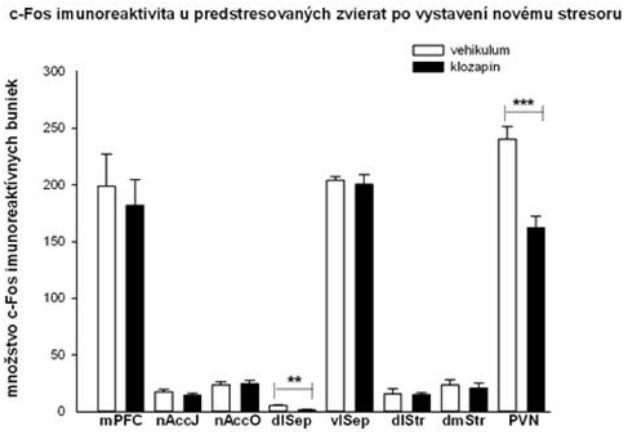
U zvierat, ktoré boli vystavené akútnemu stresu – nútenému plávaniu klozapín signifikantne znížil expresiu c-Fos proteínu v nAccJ ($t(11)=3.55$; $p=0.0045$), nAccO ($t(10)=3.91$; $p=0.0029$), dlSep ($t(11)=3.92$; $p=0.0024$), vlSep ($t(11)=3.61$; $p=0.0041$) a dmStr ($t(11)=2.67$; $p=0.022$, obr. 2).

U predstresovaných zvierat klozapín po vystavení novému stresoru signifikantne znižoval expresiu c-Fos proteínu v dlSep ($t(12)=3.68$; $p=0.0031$) a v PVN ($t(11)=5.17$; $p=0.0003$, obr. 3)



Obr. 2: Počet c-Fos imunoreaktívnych neurónov v skúmaných oblastiach mozgu po vystavení akútnemu stresu.

Počet c-Fos imunoreaktívnych neurónov v mediálnom prefrontálnom kortexe (mPFC), jadre (nAccJ) a obale *nucleus accumbens* (nAccO), dorzolaterálnom (dlSep) a ventrolaterálnom septe (vlSep), dorzolaterálnom (dlStr) a dorzomediálnom striate (dmStr) a paraventrikulárnom jadre hypotalamu (PVN). Hodnoty sú vyjadrené ako *priemer ± SEM*. (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *$p < 0,05$; Studentov T-test, SigmaStat).



Obr. 3: Počet c-Fos imunoreaktívnych neurónov v skúmaných oblastiach mozgu predstresovaných zvierat po vystavení novému stresoru.

Počet c-Fos imunoreaktívnych neurónov v mediálnom prefrontálnom kortexe (mPFC), jadre (nAccJ) a obale *nucleus accumbens* (nAccO), dorzolaterálnom (dlSep) a ventrolaterálnom septe (vlSep), dorzolaterálnom (dlStr) a dorzomediálnom striate (dmStr) a paraventrikulárnom jadre hypotalamu (PVN). Hodnoty sú vyjadrené ako *priemer ± SEM*. (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *$p < 0,05$; Studentov T-test, SigmaStat).

Diskusia

7-dňové podávanie klozapínu indukovalo expresiu c-Fos proteínu v mPFC, vlSep a dlStr. Tieto oblasti sú často cieľom štúdií zaoberajúcich sa účinkom antipsychotík, nakoľko patria do dopamínergických dráh mozgu a moduláciou ich neurotransmisie sprostredkovávajú svoje liečebné, ale aj vedľajšie účinky (1, 8). Zvýšenie expresie c-Fos proteínu v mPFC a vlSep sa spája s úpravou neurotransmisie v mezokortikálnej a mezolimbickej dopamínergickej dráhe a tak s úpravou negatívnych a pozitívnych príznakov schizofrénie (9, 10). Zvýšenie expresie c-Fos proteínu v dlStr bolo na druhej strane výrazne nižšie ako v dvoch predchádzajúcich oblastiach. Získané údaje sú v súlade s výsledkami predchádzajúcich štúdií, ktoré preukázali, že atypické antipsychotiká nezvyšujú neuronálnu aktivitu v striatálnych oblastiach (11). Zvýšenie aktivity v týchto oblastiach je však charakteristické pre typické antipsychotiká a spája sa s navodením nežiadúcich účinkov známych ako extrapyramidálny syndróm (5). Zvýšenie expresie c-Fos proteínu sme tiež zaznamenali v hlavnom integračnom centre stresovej reakcie – PVN. Podobné výsledky preukázali aj predchádzajúce štúdie zaoberajúce sa efektom atypických antipsychotík na expresiu c-Fos proteínu v PVN u experimentálnych zvierat (7).

Naša štúdia zároveň priniesla originálne výsledky týkajúce sa intreferencie pôsobenia stresu a antipsychotík. U akútne stresovaných zvierat klozapín signifikantne znižoval expresiu c-Fos proteínu v nAccJ, nAccO, dlSep, vlSep a dmStr. Nútené plávanie je považované za stredne silný stresor, ktorý signifikantne zvyšuje aktivitu rôznych mozgových oblastí (12). Klozapín interferoval s pôsobením núteného plávania predovšetkým v tých oblastiach, ktoré sú cieľovými štruktúrami liečebného účinku antipsychotík a zároveň sú responzívne na pôsobenie stresorov. Septum preukázateľne reaguje na pôsobenie stresorov psychického charakteru (6) a hoci *nucleus accumbens* nepredstavuje štruktúru typicky zapojenú do centrálnej stresovej reakcie, predchádzajúce štúdie preukázali, že môže zreteľne reagovať na stresujúce podnety (13). V prípade predstresovaných zvierat prebiehala interferencia s klozapínom po vystavení novému stresoru odlišne. Toto antipsychotikum signifikantne znížilo expresiu c-Fos proteínu v PVN a dlSep. Hoci nie je jasné, prečo má 7-dňové podávanie klozapínu odlišný efekt na zvieratá vystavené akútnemu stresu a na predstresované zvieratá vystavené novému stresoru, jedno z vysvetlení možno hľadať v zmenách metabolizmu dopamínergických dráh pri chronickom pôsobení stresorov. Predchádzajúce štúdie poukázali na zmeny v biochemických parametroch, ako sú napríklad hladiny tyrozínhydroxylázy vo ventrálnej tegmentálnej oblasti potkanov vystavených chronickému pôsobeniu stresorov (14).

Pomocou analýzy expresie c-Fos proteínu sme preukázali, že klozapín môže modulovať aktivitu viacerých mozgových oblastí ovplyvnenú pôsobením akútneho stresu, alebo nového stresora po predchádzajúcom predstresovaní. Na základe získaných výsledkov sa navyše zdá, že vplyv klozapínu na expresiu c-Fos proteínu v sledovaných mozgových oblastiach je závislý od dĺžky pôsobenia stresorov, prípadne aj ich intenzity.

Práca bola vypracovaná s podporou projektu VEGA 2/0069/12.

Zoznam použitej literatúry:

1. Iversen LL, Iversen SD, Bloom FE, Roth RH: Introduction to Neuropsychopharmacology. New York, Oxford University Press. 2009, 1-576.
2. McEvoy JP, Lieberman JA, Stroup TS a spol.: Effectiveness of clozapine versus olanzapine, quetiapine, and risperidone in patients with chronic schizophrenia who did not respond to prior atypical antipsychotic treatment. Am J Psychiatry 2006; 163(4):600-610.

3. Naheed M, Green B: Focus on clozapine. Curr Med Res Opin 2001; 17(3):223-229.
4. Wenthur CJ, Lindsley CW: Classics in chemical neuroscience: clozapine. ACS Chem Neurosci 2013; 4(7):1018-1025.
5. Geddes JR, Stroup TS, Lieberman JA: Comparative efficacy and effectiveness in the drug treatment of schizophrenia In: Weinberger DR, Harrison PJ: Schizophrenia, 3rd edition, Oxford: Wiley-Blackwell Publishing, Ltd. 2011, 485-514.
6. Emmert MH, Herman JP: Differential forebrain c-fos mRNA induction by ether inhalation and novelty: evidence for distinctive stress pathways. Brain Res 1999; 845(1):60-67.
7. Majercikova Z , Cernackova A, Horvathova L, Osacka J, Pecenak J, Kiss A: Effect of acute asenapine treatment on Fos expression in the forebrain structures under normal conditions and mild stress preconditioning in the rat. Brain Res Bull 2014; 108: 60-66.
8. Robertson GS, Fibiger HC: Effects of olanzapine on regional c-Fos expression in rat forebrain. Neuropsychopharmacology 1996; 14(2):105-110.
9. Jennings CA, Cluderay JE, Gartlon J, Cilia J, Lloyd A, Jones DN, Southam E: The effects of ziprasidone on regional c-Fos expression in the rat forebrain. Psychopharmacology (Berl) 2006; 184(1):13-20.
10. Robertson GS, Fibiger HC: Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. Neuroscience 1992; 46(2):315-328.
11. Sebens JB, Koch T, Ter Horst GJ, Korf J: Differential Fos-protein induction in rat forebrain regions after acute and long-term haloperidol and clozapine treatment. Eur J Pharmacol 1995; 273(1-2):175-182.
12. Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA: Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. Eur J Neurosci 2001; 14(7):1143-1152.
13. Abercrombie ED, Keefe KA, DiFrischia DS, Zigmond MJ: Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. J Neurochem 1989; 52(5):1655-1658.
14. Ortiz J, Fitzgerald LW, Lane S, Terwilliger R, Nestler EJ: Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. Neuropsychopharmacology 1996;14(6):443-52.

36. Salivárne markery v modeli akútneho zlyhania obličiek

Mgr. Alexandra Kovalčíková [1]
Spoluautori: Mgr. Marianna Gyurászová [1], Mgr. Jana Bábíčková PhD. [1], RNDr. Ľubomíra Tóthová PhD. [1,2], doc. MUDr. Ing. RNDr. Peter Celec, DrSc., MPH [1,3,4]

Školiteľ: RNDr. Ľubomíra Tóthová PhD. [1,2]
[1] Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava; [2] Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava; [3] Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava; [4] Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava

Úvod

Zvyšujúci sa výskyt akútneho zlyhania obličiek predstavuje globálny klinický problém (1). Akútne zlyhanie obličiek je charakterizované zníženou glomerulárnou filtráciou, čo vedie k nahromadeniu koncových produktov metabolizmu dusíka, močoviny a kreatinínu v organizme (2). Meranie koncentrácie močoviny a kreatinínu v plazme je najčastejšie využívaným spôsobom na hodnotenie funkcie obličiek a diagnostiku ich poškodenia (3). Existuje mnoho chirurgických a chemicky indukovaných animálnych modelov akútneho zlyhania obličiek (4,5). Bilaterálna nefrektómia je najčastejšie používaným chirurgickým modelom, pri ktorom dochádza k prudkému nárastu plazmatického kreatinínu a močoviny v priebehu 24 hodín (6–8). Existuje mnoho štúdii, ktoré hodnotili a stanovovali kreatinín a močovinu v moči a sére (9,10), avšak doposiaľ nebola publikovaná štúdia, ktorá by štandardizovala a hodnotila tieto markery v slinách.

V priebehu posledných 10 rokov sa záujem o slinu ako biologickú tekutinu prudko zvýšil v dôsledku menej invazívneho, ekonomickejšieho a jednoduchšieho spôsobu odberu a vyšetrenia v porovnaní s krvou. Zloženie slín je ovplyvnené mnohými faktormi ako sú potrava, činnosť žuvacích svalov, vek, orálne a extraorálne chorobné procesy a mnohé ďalšie. Analýza zloženia slín sa potenciálne môže využívať v klinickom výskume a v medicíne (11). Už v 70. rokoch bola u hemodialýzovaných pacientov s chronickými ochoreniami obličiek preukázaná pozitívna korelácia medzi plazmatickou a salivárnou koncentráciou kreatinínu (12).

Oxidačný stres je charakterizovaný ako nerovnováha medzi produkciou reaktívnych foriem kyslíka a antioxidačnou kapacitou buniek v prospech reaktívnych foriem kyslíka. Oxidačný stres spôsobuje aktiváciu redox-senzitívnych transkripčných faktorov, ktoré sú zapojené v procesoch zápalu a poškodení tkaniva (13,14). Niekoľko nezávislých štúdií potvrdilo zvýšené plazmatické koncentrácie markerov oxidačného stresu u pacientov s akútnymi a chronickými ochoreniami obličiek v porovnaní so zdravými probandami (15,16). Bolo preukázané, že slina môže byť alternatívnou diagnostickou tekutinou na meranie oxidačného poškodenia súvisiaceho s rôznymi ochoreniami ako skleróza multiplex, periodontitída či obštrukčné spánkové apnoe (17–19).

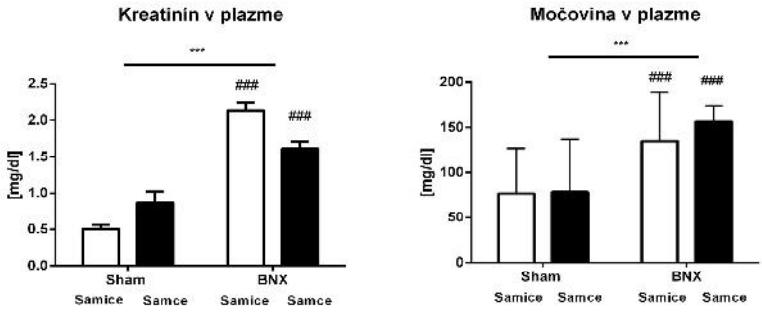
Vysoká interindividuálna a intraindividuálna variabilita bráni širšiemu klinickému využitiu slín na hodnotenie markerov obličkových funkcií. Identifikácia zdrojov variability pomocou experimentov by mohla pomôcť k ich zmierneniu, vyššej reprodukovateľnosti výsledkov a zavedeniu slín ako diagnostickej tekutiny v klinickej praxi. Dosiaľ neboli publikované štúdie, ktoré by hodnotili salivárne markery obličkových funkcií, kreatinín, močovinu a markery oxidačného stresu vo zvieracom modeli akútneho renálneho zlyhania.

Materiál a metodika

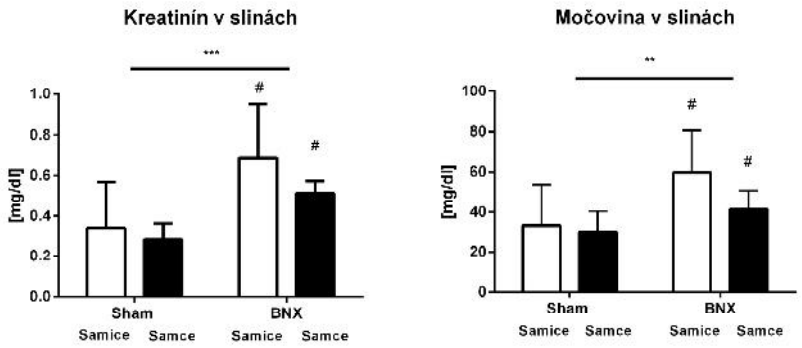
Samce (n=20) a samice (n=20) kmeňa 129SV4 boli rozdelené do dvoch skupín. Prvá skupina podstúpila sham operáciu. Druhá skupina podstúpila bilaterálnu nefrektómiu. Zvieratá boli uspané intraperitoneálnou aplikáciou ketamínu a xylazínu (100 mg/kg a 10 mg/kg, v pomere 3:1). Obličky boli odkryté pomocou retroperitoneálnych rezov. Pri bilaterálnej nefrektómii, obličkové pedikly boli podviazané stehom a pomocou rezu vykonaného distálne od stehov boli obličky odstránené. Sham operácia bola uskutočnená rovnakým spôsobom, ale pedikly neboli podviazané. Obličky neboli odstránené len dekapsulované. Dvadsaťštyri hodín po operácii boli zvieratá znovu uspané. Salivácia bola stimulovaná intraperitoneálnou aplikáciou pilokarpínu (0.5 μg/kg). Krv bola odobratá retroorbitálne. Sliny a plazma boli zamrazené na -20°C. Koncentrácia kreatinínu a močoviny v plazme a v slinách bola stanovená pomocou komerčne dostupného kitu (Arbor Assays, Ann Arbor, USA). Marker karbonylového stresu, pokročilé produkty glykácie (AGEs), marker oxidačného poškodenia lipidov, látky reagujúce s kyselinou tiobarbitúrovou (TBARS) a proteíny, ktoré boli použité na normalizáciu hodnôt, boli stanovené pomocou spektrofotometrických a fluorescenčných metód. Rozdiely medzi skupinami boli analyzované pomocou štatistického testu two-way ANOVA a Bonferroni pos-hoc t-testu. Dáta sú vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

Výsledky

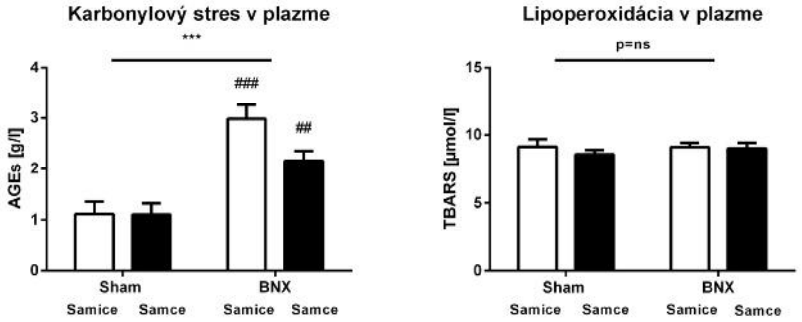
U myší, ktoré podstúpili bilaterálnu nefrektómiu sme v porovnaní s myšami, ktoré podstúpili sham operáciu pozorovali signifikantne vyššie koncentrácie kreatinínu a močoviny v plazme (obrázok 1). Podobne, u myší, s akútnym zlyhaním obličiek sme v porovnaní so sham kontrolami pozorovali signifikantne vyššie koncentrácie kreatinínu a močoviny v slinách (obrázok 2). V koncentráciách kreatinínu a močoviny sme však nepozorovali signifikantné rozdiely medzi pohlaviami. Plazmatické koncentrácie AGEs boli v porovnaní so sham kontrolami signifikantne vyššie u myší, ktoré podstúpili bilaterálnu nefrektómiu (obrázok 3). Medzi skupinami sme nepozorovali signifikantné rozdiely v plazmatickej koncentrácii TBARS (obrázok 3). Podobne, medzi skupinami sme nenašli signifikantné rozdiely v salivárnej koncentrácii AGEs a TBARS (obrázok 4).



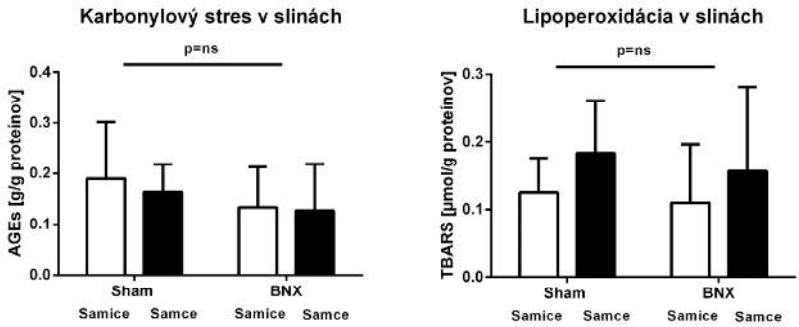
Obrázok 1. Plazmatická koncentrácia A: kreatinínu, B: močoviny 24 hodín po sham operácií alebo bilaterálnej nefrektómií (BNX). Koncentrácie kreatinínu a močoviny sú vyjadrené v mg/dl. Výsledky sú vyjadrené ako priemer + SD. *** p<0.001 v porovnaní so sham skupinami. ### p<0.001 v porovnaní so sham samicami alebo samcami.



Obrázok 2. Salivárna koncentrácia A: kreatinínu, B: močoviny 24 hodín po sham operácií alebo bilaterálnej nefrektómií (BNX). Koncentrácie kreatinínu a močoviny sú vyjadrené v mg/dl. Výsledky sú vyjadrené ako priemer + SD. *** p<0.001 v porovnaní so sham skupinami. ### p<0.001 v porovnaní so sham samicami alebo samcami.



Obrázok 3. Plazmatická koncentrácia A: pokročilých produktov glykácie (*AGEs)* B: látok reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou (*TBARS)* 24 hodín po sham operácií alebo bilaterálnej nefrektómií (BNX). Koncentrácia AGEs je vyjadrená v g/l, koncentrácia TBARS je vyjadrená µmol/l. Výsledky sú vyjadrené ako priemer + SD. *** p<0.001, p=ns (nesignifikantné) v porovnaní so sham skupinami. ## p<0.01, ### p<0.001 v porovnaní so sham samicami alebo samcami.



Obrázok 4. Salivárna koncentrácia A: pokročilých produktov glykácie (*AGEs)* B: látok reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou (*TBARS)* 24 hodín po sham operácií alebo bilaterálnej nefrektómií (BNX). Koncentrácia AGEs je vyjadrená v g/g proteínov, koncentrácia TBARS je vyjadrená µmol/g proteínov. Výsledky sú vyjadrené ako priemer + SD. Výsledky sú vyjadrené ako priemer + SD. p=ns (nesignifikantné) v porovnaní so sham skupinami.

Diskusia

Akútne obličkové zlyhanie je charakterizované ako prudký pokles obličkových funkcií, čo súvisí s neschopnosťou vylúčiť dusíkaté odpadové látky z plazmy. K tomuto zhoršeniu dochádza už v priebehu niekoľkých hodín alebo dní. Najčastejšie používanými markermi na hodnotenie funkcie obličiek sú močovina a kreatinín. Na objasnenie patomechanizmov akútneho zlyhávania obličiek sa používajú mnohé chirurgické a chemicky indukované modely. Najrozšírenejším chirurgickým modelom je bilaterálna nefrektómia, pri ktorej dochádza k rapídnemu nárastu kreatinínu a močoviny v plazme v priebehu 24 hodín. V poslednom desaťročí je slina ako biologická tekutina v centre pozornosti. Keďže zložky slín pochádzajú zo slinných žliaz, ale aj z krvi, jej analýza umožňuje identifikáciu markerov endokrinných, imunitných, zápalových či infekčných ochorení. U pacientov s chronickými chorobami obličiek bola tiež dokázaná možnosť stanovovania salivárnych markerov obličkových funkcií. Dosiaľ však neboli uskutočnené experimenty na zvieracích modeloch akútneho zlyhania obličiek. Preto cieľom našej práce bolo stanovenie koncentrácie salivárneho kreatinínu a močoviny v modeli bilaterálnej nefrektómie. U myší s akútnym poškodením obličiek sme v porovnaní s kontrolami pozorovali signifikantne vyššie koncentrácie kreatinínu a močoviny v plazme a v slinách. Podobne, u myší, ktoré podstúpili bilaterálnu nefrektómiu sme v porovnaní so sham skupinami našli signifikantne vyššie plazmatické koncentrácie markeru karbonylového stresu. V salivárnej koncentrácii markerov karbonylového a oxidačného stresu sme však nenašli signifikantné rozdiely medzi skupinami. Naše predbežné výsledky poukazujú na to, že salivárny kreatinín a močovina by mohli slúžiť ako markery na hodnotenie obličkových funkcií. Naša štúdia by mohla prispieť k objasneniu interindividuálnej a intraindividuálnej variability pri meraní salivárnych markerov funkcie obličiek, a tým napomôcť ich zavedeniu do bežnej klinickej praxe.

Táto práca bola podporená grantom Univerzity Komenského UK56/2016.

Zoznam použitej literatúry:

1. Kolhe N V, Muirhead AW, Wilkes SR, Fluck RJ, Taal MW. National trends in acute kidney injury requiring dialysis in England between 1998 and 2013. Kidney Int. International Society of Nephrology; 2015 Jul 29.
2. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. Lancet. 2012 Aug 25; 380(9843):756–66.
3. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Defining acute renal failure: physiological principles. Intensive Care Med. 2004 Jan; 30(1):33–7.
4. Balakumar P, Chakkarwar VA, Kumar V, Jain A, Reddy J, Singh M. Experimental models for nephropathy. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2008 Dec; 9(4):189–95.
5. Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, et al. Animal models of acute renal failure. Pharmacol Rep. 2012 Jan; 64(1):31–44.
6. Kim M, Park SW, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Isoflurane activates intestinal sphingosine kinase to protect against bilateral nephrectomy-induced liver and intestine dysfunction. Am J Physiol Renal Physiol. 2011 Jan 1; 300(1):F167-76.
7. Andres-Hernando A, Dursun B, Altmann C, Ahuja N, He Z, Bhargava R, et al. Cytokine production increases and cytokine clearance decreases in mice with bilateral nephrectomy. Nephrol Dial Transplant. 2012 Dec 1; 27(12):4339–47.
8. Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, He Z, Fang W, Thurman JM, et al. Acute renal failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine-mediated pulmonary injury. J Am Soc Nephrol. 2007 Jan 1; 18(1):155–64.
9. Miller WG, Myers GL, Ashwood ER, Killeen AA, Wang E, Thienpont LM, et al. Creatinine measurement: state of the art in accuracy and interlaboratory harmonization. Arch Pathol Lab Med. 2005 Mar;129(3):297–304.
10. Zuo Y, Wang C, Zhou J, Sachdeva A, Ruelos VC. Simultaneous determination of creatinine and uric acid in human urine by high-performance liquid chromatography. Anal Sci. 2008 Dec; 24(12):1589–92.
11. Lee Y-H, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. Am J Dent. 2009 Aug; 22(4):241–8.
12. Goll RD, Mookerjee BK. Correlation of Biochemical Parameters in Serum and Saliva in Chronic Azotemic Patients and Patients on Chronic Hemodialysis. Informa UK Ltd UK; 2009 Jul 7.
13. Greiber S, Müller B, Daemisch P, Pavenstädt H. Reactive oxygen species alter gene expression in podocytes: induction of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor. J Am Soc Nephrol. 2002 Jan; 13(1):86–95.
14. Quiroz Y, Ferrebuz A, Romero F, Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Feb 1; 294(2):F336-44.
15. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. Kidney Int. 2004 Mar; 65(3):1009–16.
16. Himmelfarb J, McMonagle E, Freedman S, Klenzak J, McMenamin E, Le P, et al. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. J Am Soc Nephrol. 2004 Sep 1; 15(9):2449–56.
17. Karlík M, Valkovič P, Hančinová V, Krížová L, Tóthová Ľ, Celec P. Markers of oxidative stress in plasma and saliva in patients with multiple sclerosis. Clin Biochem. 2015 Jan;48(1–2):24–8.

18. Baňasová L, Kamodyová N, Janšáková K, Tóthová Ľ, Stanko P, Turňa J, et al. Salivary DNA and markers of oxidative stress in patients with chronic periodontitis. Clin Oral Investig. 2015 Mar;19(2):201–7.
19. Celec P, Hodosy J, Behuliak M, Pálffy R, Gardlík R, Halčák L, et al. Oxidative and carbonyl stress in patients with obstructive sleep apnea treated with continuous positive airway pressure. Sleep Breath. 2012 Jun; 16(2):393–8.

37. Vplyv kompozície črevnej mikroflóry na efekt prebiotík

Mgr. Lenka Pálková[1]
(normálna a patologická fyziológia)
Spoluautori: Dr. Jos van der Vossen[2]; Prof. Bart Keijser[2]; Dr. Roy Montijn[2]; Dr. Frank Schuren[2]

Školiteľ: RNDr. Gabriel Minárik, PhD. [1, 3, 4]
[1]Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, Bratislava, [2]TNO, Netherlands Organisation for Applied Scientific Research, Zeist, Holandsko, [3]Katedra molekulárnej biológie, PriF UK, Bratislava, [4]Medirex Group Academy n.o., Bratislava

Úvod

Ľudský mikrobióm niekoľkonásobne prevyšuje počet buniek tela človeka [1]. Je neodmysliteľnou súčasťou ľudského tela nakoľko zabezpečuje mnohé esenciálne funkcie ako napríklad trávenie, metabolické procesy, imunitné reakcie, ochranu voči patogénom, homeostázu a integritu črevnej steny [2].

Pre správny vývoj mikrobiómu sú kľúčové prvé mesiace života dieťaťa. Práve v tomto období - na rozdiel od mikrobiómu dospelého človeka, ktorý je relatívne komplexný a stabilný [3] – je detský mikrobióm ešte nestály a náchylný na zmeny vplyvom rôznych faktorov. Dysbióza črevnej mikroflóry spôsobená jednak znížením jej diverzity alebo zmenou zloženia môže mať súvis s mnohými ochoreniami, ako napríklad diabetes melitus typu 1, obezitou, alergiou, astmou, nekrotizujúcou enterokolitídou, zápalovými ochoreniami tráviaceho traktu a kardiovaskulárnymi ochoreniami [4]. Na kompozíciu mikrobiómu vplývajú mnohé faktory, predovšetkým spôsob pôrodu, strava, prostredie a taktiež užívanie antibiotík [5]. Práve užívanie antibiotík do veľkej miery narúša mikroflóru a v súčasnosti predstavuje závažný problém. Jedným z prostriedkov na zmiernenie nepriaznivých vplyvov antibiotík sú prebiotiká – pre človeka nestráviteľné zložky potravy, ktoré sú selektívne fermentované určitým druhom baktérií (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp.), čím zabezpečujú špecifické zmeny v kompozícii a aktivite mikrobiómu, a tak poskytujú benefit pre hostiteľa [6].

Cieľom tejto štúdie bolo skúmať vplyv prebiotík na črevnú mikroflóru detí v prítomnosti antibiotík, pričom boli sledované rozdiely vplyvu v závislosti od zloženia mikroflóry.

Materiál a metodika

V štúdii boli použité vzorky mikrobiómu 14 zdravých detí vo veku 2.5-21 mesiacov. Na základe podobností v individuálnej kompozícii boli rozdelené do 3 skupín a následne spoolované.

Inokulá 3 typov črevnej mikroflóry boli anaeróbe kultivované v SIEM (z angl. Strandart Ileal Efflux Medium) médiu (Tritium microbiologie BV, Eindhoven, The Netherlands) obsahujúcom antibiotiká (amoxicilín, cefotaxim, clindamycín - 10 µg/ml) a prebiotiká (6´-O-sialyllaktóza, 3´-O-fucosyllaktóza, xylobióza, inulín a vivinal (70% GOS) - 4mg/ml)/ kontrolná skupina bez prebiotík. Kultivácia prebiehala za anaeróbnych podmienok 24 hod/37 ˚C.

Na izoláciu celkovej DNA bolo použitých 100µl kultúry, ktoré boli zmiešané s 500µl fenolu (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), 200µl lyzačného pufru (LGC, Berlin, Germany), 500µl 0.1mm zirkóniových guličiek (Biospec products, Bartlesville, Oklahoma), následne homogenizované a

scentrifugované. K 100µl vodnej fázy bolo pridaných 190µl bindings buffer, 10µl magnetických guličiek. Po odstránení supernatantu bol pelet premytý 200µl premývacieho pufru W1 a 130µl premývacieho pufru W2. DNA bola eluovaná do 65µl Elučného pufru (všetky reagencie: LGC, Berlin, Germany).

Z vyizolovanej DNA boli pomocou špecifických primerov na amplifikáciu V4 oblasti 16S RNA génov pripravené DNA sekvenačné knižnice. Tieto boli následne osekvenované pomocou MiSeq Reagent Kit V2 a Illumina MiSeq sekvenátora (Illumina, San Diego, California).

Získané data boli bioinformaticky analyzované a štatisticky spracované v programe GraphPaD Prism 6.0 (GraphPaD Software, La Jòlla, CA, USA). Na štatistickú analýzu dát bol použitý 2way Anova test, pričom za kritérium pre štatisticky významný výsledok bola považovaná hodnota $p<0,05$. Dáta sú prezentované ako priemer + štandardná odchýlka.

Výsledky

V úvodnej fáze experimentu bola stanovená kompozícia črevnej mikroflóry 17 individuálnych vzoriek od 14 probandov. Na základe podobností boli vzorky rozdelené do 3 skupín a spoolované (Tabuľka č. 1)

Tabuľka č. 1: Charakteristika mikrobiálnych poolov 1-3

Pool	Počet vzoriek	Vek probandov	Strava	Charakteristika mikroflóry
1	5	2,5 - 7 mesiacov	dojčenie, detské príkrmy, tuhá strava	↑ Bacteroides (44.01 ± 9.75%)
2	4	5 mesiacov	detské príkrmy a tuhá stravu	↓ Bacteroides (9.38 ± 1.17%), ↑ Bifidobacterium (44.92 ± 5.96%).
3	8	12 – 21 mesiacov	tuhá strava (1 dieťa dojčené)	↓ Bifidobacterium (1.33 ± 0.71%), ↑ Faecalibacterium (14.41 ± 4.30%), ↑ Blautia (11.32 ± 3.08%) a Roseburia (13.05 ± 4.33%)

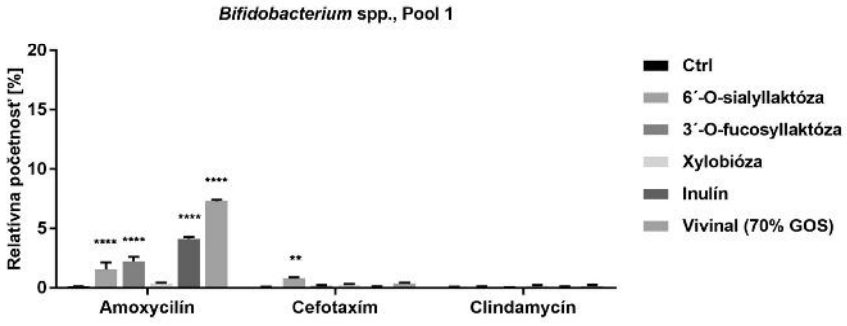
Následne boli sledované zmeny v mikrobiálnej kompozícii jednotlivých poolov pod vplyvom antibiotík a prebiotík, pričom sme sa zamerali predovšetkým na stanovenie zmeny relatívnej početnosti *Bifidobacterium* spp. (Obrázok č. 1).

Po kultivácii v prítomnosti amoxicilínu sme pozorovali signifikantné zvýšenie relatívnej početnosti *Bifidobacterium* spp. Oproti kontrole v poole 1 vplyvom 6´-O-sialyllaktózy ($p\leq0,0001$), 3´-O-fucosyllaktózy ($p\leq0,0001$), inulínu ($p\leq0,0001$) a vivinalu ($p\leq0,0001$), zatiaľ čo v poole 2 len vplyvom inulínu ($P=0,0198$) a vivinalu ($p\leq0,0001$). V poole 3 sme pozorovali signifikantné zvýšenie výskytu *Bifidobacterium* spp. vplyvom 6´-O-sialyllaktózy ($p\leq0,0001$), 3´-O-fucosyllaktózy ($p\leq0,0001$), xylobiózy ($p\leq0,0001$) a vivinalu ($p\leq0,0001$).

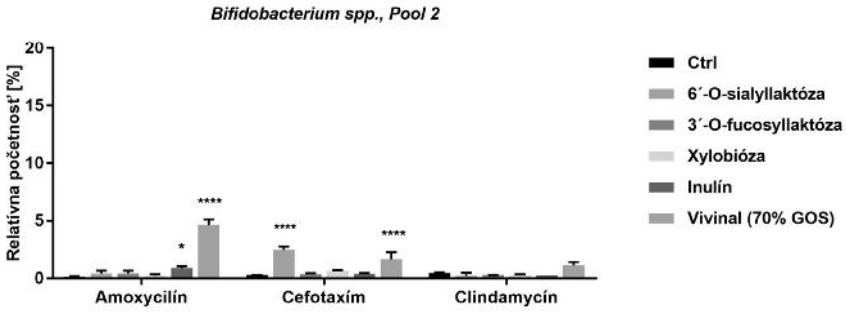
V prítomnosti cefotaxímu sme pozorovali signifikantne výšené zastúpenie *Bifidobacterium* spp. oproti kontrole v poole 1 iba v prítomnosti 6´-O-sialyllaktózy ($p=0,0019$), v poole 2 v prítomnosti 6´-O-sialyllaktózy ($p\leq0,0001$) a vivinalu ($p\leq0,0001$), a v poole 3 v prítomnosti 6´-O-sialyllaktózy ($p\leq0,0001$), 3´-O-fucosyllaktózy ($p=0,0084$), inulínu ($p\leq0,0001$) a vivinalu ($p\leq0,0001$).

Po kultivácii v prítomnosti clindamycínu sme nepozorovali signifikantné zvýšenie *Bifidobacterium* spp. oproti kontrole vplyvom žiadneho zo sledovaných prebiotík ani v jednom poole.

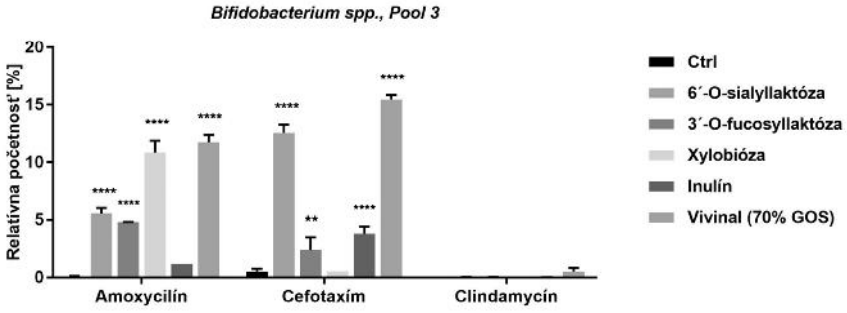
A.



B.



C.



Obrázok 1: Zastúpenie *Bifidobacterium* spp. v jednotlivých pooloch po kultivácii v prítomnosti antibiotík a prebiotík (hodnoty signifikancie vyjadrujú rozdiel voči kontrolnej vzorke daného antibiotika); A - Pool 1, B - Pool 2, C - Pool 3

Diskusia

Na rozdiel od genómu, ktorý je na 99,9% u ľudí totožný [7], mikrobióm vykazuje veľkú interpersonálnu variabilitu. Práve individuálne rozdiely v kompozícii mikroflóry, zdá sa, zohrávajú veľmi dôležitú úlohu v odpovedi na liečbu a ďalšie intervencie.

Viaceré štúdie publikované v poslednom období dokazujú, že zloženie mikroflóry do veľkej miery ovplyvňuje metabolizmus [8] a reakciu mikroflóry na stravovane [9]. V našej štúdii sme snažili imitovať interpersonálne rozdiely v zložení mikroflóry, vytvorením 3 rôznych bakteriálnych poolov. Podobne ako v spomínaných štúdiách sme pozorovali že variácie v kompozícii mikroflóry do veľkej miery ovplyvňujú zmeny v mikroflóre ako odpoveď na rôzne stimuly. Okrem celkovej kompozície mikroflóry v prítomnosti antibiotík a prebiotík sme sledovali predovšetkým efekt prebiotík na *Bifidobacterium* spp., ktorý bol v jednotlivých pooloch odlišný.

Pozorovania ukazujú, že mikrobióm môže byť dôležitým nástrojom pri personalizovanej medicíne, avšak stále sú potrebné ďalšie štúdie, tak ako aj vytváranie prediktívnych modelov.

Zoznam použitej literatúry:

1. R. Sender, S. Fuchs, and R. Milo, “Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body,” PLoS Biol., vol. 14, no. 8, pp. 1–14, 2016.
2. F. Guarner and J.-R. Malagelada, “Gut flora in health and disease,” Lancet, vol. 360, no. 9356, pp. 512–519, 2003.
3. E. A. Franzosa et al., “Identifying personal microbiomes using metagenomic codes,” Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 112, no. 22, pp. E2930–E2938, 2015.
4. S. Carding, K. Verbeke, D. T. Vipond, B. M. Corfe, and L. J. Owen, “Dysbiosis of the gut microbiota in disease,” Microb. Ecol. Heal. Dis., vol. 26, no. 191, pp. 1–9, 2015.
5. R. Martin et al., “Early-Life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota,” PLoS One, vol. 11, no. 6, pp. 1–30, 2016.
6. G. R. Gibson et al., “Dietary prebiotics : Current status and new definition Dietary prebiotics : current status and new definition,” Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods, vol. 7, no. 1, pp. 1–19, 2010.
7. D. A. Wheeler et al., “The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing.,” Nature, vol. 452, no. 7189, pp. 872–6, 2008.
8. D. Zeevi et al., “Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Article Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses,” Cell, vol. 163, pp. 1079–1094, 2015.
9. N. W. Griffin et al., “Prior Dietary Practices and Connections to a Human Gut Microbial Metacommunity Alter Responses to Article Prior Dietary Practices and Connections to a Human Gut Microbial Metacommunity Alter Responses to Diet Interventions,” Cell Host Microbe, vol. 21, no. 1, pp. 84–96, 2017.

38. Štúdium kandidátnych génov asociovaných s chemorezistenciou voči cisplatine u testikulárnych nádorov z germinatívnych buniek

Ing. Silvia Schmidtová[1,2]
(onkológia)
Spoluautori: prof. MUDr. Michal Mego, PhD.[2,3], RNDr. Ing. Katarína Kaľavská, PhD. [2,3], doc. RNDr. Ondřej Slabý, PhD.[4]

Školiteľ: Mgr. Lucia Kučerová, PhD.[1]
[1]Laboratórium molekulárnej onkológie, Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV; [2]Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave; [3]Jednotka translačného výskumu LF UK a NOÚ, Národný onkologický ústav, Bratislava; [4]Laboratórium molekulárnej onkológie – solídne nádory, CEITEC, Brno, Česká republika

Úvod

Testikulárne nádory zo zárodočných buniek (TGCTs) patria medzi najčastejšie solídne tumory u mužov vo veku 15-35 rokov. V roku 2007 bola na Slovensku incidencia testikulárnych nádorov 7,4/100 000, čo predstavuje 229 nových prípadov tohto ochorenia (1). Sú to malignity s dobrou liečiteľnosťou – spôsobenej najmä citlivosťou na cisplatinu. Kurabilita pri metastatickom ochorení dosahuje v súčastnosti 70 – 80 %, napriek tomu niektoré TGCTs vykazujú rezistenciu voči terapii (2). Molekulárna podstata chemorezistencie voči cisplatine u TGCTs nie je úplne známa, a preto pochopenie týchto mechanizmov môže predstavovať výrazný pokrok vo vývoji nových liečebných modalít alebo zlepšenie súčasných možností terapie (3).

Materiál a metodika

Chemikálie: Všetky použité chemikálie boli zakúpené v Sigma-Aldrich**,** ak nie je uvedené inak.

Kultivácia buniek: Komerčne zakúpené bunkové línie NTERA-2 a JEG-3 sa kultivovali vo vysoko-glukózovom DMEM médiu (PAA Laboratories GmbH) a línia NOY-1 (ovariálny Yolc Sac tumor) v RPMI médiu (PAA Laboratories GmbH) s L-glutamínom (2 mM), 10 %-ným fetálnym hovädzím sérom (Biochrom AG) a antibiotikami (penicilín, streptomycín, amfotericín). Bunkové línie rezistentné voči cisplatine boli pripravené dlhodobou kultiváciu (10 mesiacov) v narastajúcej koncentrácii cisplatiny. Morfológiu a proliferáciu buniek sme sledovali pomocou kinetického zobrazovacieho systému IncuCyte ZOOM^{TM}.

Testovanie citlivosti na chemoterapeutiká: Viabilita buniek po kultivácii v prítomnosti rôznych chemoterapeutík bola určená luminiscenčným testom (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega, CA, USA), ktorý meria hladinu ATP u metabolicky živých buniek. Bunky boli kultivované v 96-jamkových platničkách v kvadruplikátoch. Po 24-hodinovej adherencii boli k bunkám pridané chemoterapeutiká nariedené v rôznych koncentráciách. Bunková viabilita bola stanovená luminiscenčným testom 72 h po pridaní chemoterapeutík.

Analýza génovej expresie: Expresiu vybraných génov sme stanovili využitím kvantitatívnej real-time PCR (qRT-PCR, CFX96 PCR detekčný systém). RNA vzorky pre qRT-PCR boli izolované z buniek použitím kitu (NucleoSpin RNA II kit) a 100-200 ng RNA bolo reverzne transkribovaných pomocou

cDNA syntetizujúceho kitu (RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit). Ako referenčný gén bol použitý GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza).

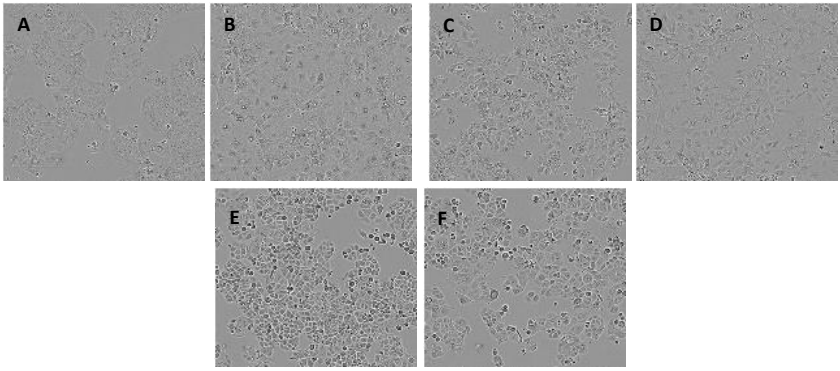
miRNA a snoRNA analýza: Na porovnanie expresie malých RNA („small RNAs“) u parentálnych a rezistentných bunkových línií sme použili mikročipy Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) obsahujúce 6599 prób pre ľudské malé RNA. Na každú analýzu bolo použitých 130 ng RNA vyizolovaných použitím kitu mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX). Koncentrácia a čistota RNA bola stanovená spektrofotometricky (A260/280 > 2.0, A260/230 > 1.8, Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Spracovanie výsledkov: Experimentálne výsledky boli spracované a vyhodnotené v programoch Microsoft Excel, BioRad, Calcusyn a IncuCyte ZOOM™ 2016A softvéri. Každý experiment bol opakovaný najmenej trikrát, uvedený je reprezentatívny výsledok. Hodnoty boli vyjadrené ako priemer z replikátov ± štandardná odchýlka.

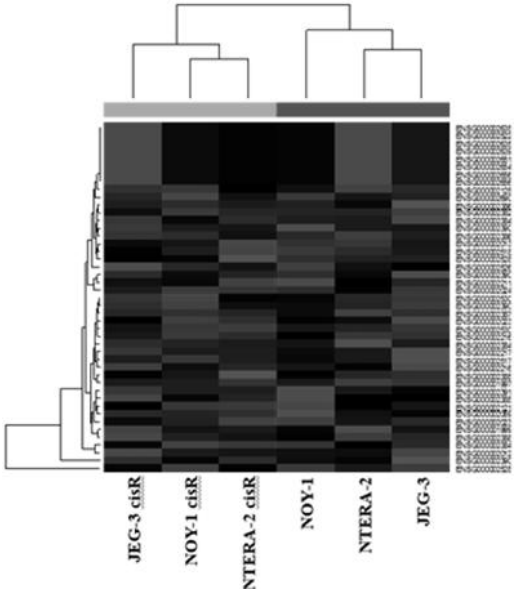
Výsledky

Dlhodobou kultiváciou buniek testikulárnych nádorov z germinatívnych buniek JEG-3 a NTERA-2 a buniek ovariálneho Yolc Sac tumoru NOY-1 vo zvyšujúcej sa koncentrácii cisplatiny sme pripravili bunkové línie rezistentné voči cisplatine. Citlivosť na cisplatinu bola stanovená meraním viability buniek luminiscenčným testom a získané hodnoty IC_{50} sa medzi parentálnymi a rezistentnými líniami líšili dvoj- až štvornásobne. Podobné hodnoty sme zaznamenali aj pri ovplyvnení buniek karboplatinou. U bunkových línií rezistentných voči cisplatine došlo k výraznej zmene morfológie (Obr. 1) a taktiež sa zmenila rýchlosť proliferácie týchto buniek. Analýza génovej expresie ukázala rozdiely v expresii viacerých transkripčných faktorov.

Zistili sme, že expresný profil malých RNA sa u parentálnych a rezistentných línií líši. Rozdielna expresia u rezistentných línií bola zistená v 90 miRNA ($p<0,05$), pričom 63 bolo up- a 27 down-regulovaných. Medzi týmito miRNA boli aj viaceré miRNA, ktorých súvis s chemorezistenciou už bol popísaný – miR21, klaster miR-371-373, miR93, miR-187 a iné. Rozdielne exprimované boli taktiež malé jadierkové RNA – „snoRNAs“ (Obr. 2), pričom 23 z nich bolo up- a 22 down-regulovaných ($p<0,05$). U rezistentných buniek bola napríklad up-regulovaná onkogénna snoRNA42 a down-regulovaná tumor supresorová snoRNA U50.



Obr. 1: Morfológia buniek A: JEG-3, B: JEG-3 CisR, C: NTERA-2, D: NTERA-2 CisR, E: NOY-1, F: NOY-1 CisR. Obrázky boli získané pomocou IncuCyte ZOOM™ kinetického prístroja.



Obr. 2: Expresný profil malých jadierkových RNA – snoRNA.

Diskusia

Cisplatina je chemoterapeutikum používané pri liečbe širokého spektra solídnych nádorových ochorení, vrátane TGCTs, ovariálnych karcinómov, nádorov hlavy a krku, kolorektálnych a pľúcnych nádorov, či pokročilých nádorov močového mechúra. Protinádorový účinok spočíva v tvorbe DNA aduktov, ktoré sú zodpovedné za indukciu apoptózy. Napriek tomu však liečba cisplatinou častokrát vedie k rozvoju chemorezistencie a následnému zlyhaniu terapie (4).

K pochopeniu molekulárnej podstaty chemorezistencie TGCTs nám môžu pomôcť aj bunkové línie rezistentné voči cisplatine. V našom laboratóriu sa nám dlhodobou kultiváciou v narastajúcej koncentrácii cisplatiny podarilo z komerčne dostupných bunkových línii pripraviť 3 rezistentné línie – choriokarcinómovú líniu JEG-3 CisR, bunky embryonálneho karcinómu NTERA-2 CisR a bunky ovariálneho Yolc Sac tumoru NOY-1 CisR. Hodnoty IC_{50} sa medzi parentálnymi a rezistentnými líniami líšili 2-4 násobne, pričom podobné rozdiely v hodnotách IC_{50} sme zaznamenali aj pri ovplyvnení buniek karboplatinou. Skrížená rezistencia medzi cisplatinou a ďalšími platinovými derivátmi (karboplatina, oxaliplatina) bola popísaná u viacerých nádorov (5, 6).

Objav malých RNA a najmä ich úlohy v regulácii génovej expresie je prínosom najmä pre možnosť klinickej aplikácie a potenciálu týchto nekódujúcich RNA v liečbe a diagnostike rôznych ochorení (7). miRNA sú krátke nekódujúce jednovláknové RNA molekuly schopné naviazať sa na mRNA a tak kontrolovať ich transláciu (8). Zmenená expresia miRNA bola zaznamenaná pri viacerých typoch nádorových ochorení, vrátane TGCTs (9). miR371-373 klaster je up-regulovaný vo viacerých TGCTs líniách rezistentných voči cisplatine a zohráva úlohu v inhibícii bunkovej smrti (10). miR-21 patrí medzi najznámejšie onkogénne miRNA, pričom jej expresia bola popísaná v súvislosti

s chemorezistenciou u rôznych typov nádorov (11). Rovnaký nárast expresie týchto miRNA sme zaznamenali aj v našich rezistentných líniách.

Malé jadierkové RNA - „snoRNAs“ - majú taktiež určitú úlohu v onkogenéze, pričom môžu pôsobiť ako onkogény, ale aj ako tumor supresory. Zvýšená expresia snoRNA s názvom SNORA42 koreluje s nepriaznivou prognózou, čo je spôsobené supresiou p53-závislej apoptózy. Ďalšou snoRNA, ktorej úloha u nádorov prsníka a prostaty už bola popísaná, je tumor supresorová snoRNA U50 (12). Naše výsledky naznačujú, že snoRNA môžu mať súvis aj s chemorezistenciou nádorových ochorení, čo však doteraz ešte nebolo popísané.

Napriek tomu, že TGCTs sú tumory s vysokou kurabilitou a sú relatívne vzácne v porovnaní s ostatnými solídnymi nádormi, predstavujú kvôli ich genetickým a molekulárnym charakteristikám súvisiacim s ich embryonálnym pôvodom špecifickú skupinu nádorov. Lepšie pochopenie týchto charakteristík by mohlo viesť k vývoju nových terapeutických modalít a nových prognostických markerov. Experimenty na pripravených rezistentných líniách by nám mohli pomôcť pochopiť molekulárnu podstatu chemorezistencie TGCTs voči cisplatine.

Poďakovanie: Táto práca vznikla s podporou projektov Nadácie Tatra banky „Študenti do sveta“, Erasmus+, Nadácie Výskum rakoviny RFL 2009, RFL 2012 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-0230-11, VEGA 2/0087/15.

Zoznam použitej literatúry:

1. Safaei-Diba Ch, Pleško I, Hlava P a spol.: Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2007. NOR, NCZI, Bratislava 2012: 136. ISBN 978-80-89292-27-1.
2. Gonzalez-Exposito R, Merino M, Aguayo C: Molecular biology of testicular germ cell tumors. Clin Transl Oncol 2015; 18: 550-556.
3. Boublikova L, Buchler T, Stary J, Abrahamova J, Trka J: Molecular biology of testicular germ cell tumors: Unique features awaiting clinical application. Crit Rev Oncol Hematol 2014; 89: 366-385.
4. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I a spol.: Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene 2011; 31: 1-15.
5. Shen D, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM: Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. Pharmacol Revs 2012; 64: 706-721.
6. Eckstein N: Platinum resistance in breast and ovarian cancer cell lines. J Exp Clin Canc Re 2011; 30: 91.
7. Xue W, Dahlman JE, Tammela T a spol.: Small RNA combination therapy for lung cancer. P Natl Acad Sci USA 2014; 34: 3553-3561
8. Thomas M, Lieberman J, Lal A: Desperately seeking microRNA targets. Nat Struct Mol Biol 2010; 17: 1169–1174.
9. DeSano JT, Xu L: MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications. Aaps J 2009; 11: 682–692.
10. Port M, Glaesener S, Ruf C a spol.: Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines. Mol Cancer 2011; 10: 52.

11. Komatsu S, Ichikawa D, Kawuguchi T a spol.: Circulating miR-21 as an independent predictive biomarker for chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma. Am J Cancer Res 2016; 6: 1511-1523.
12. Makarova JA, Ivanova SM, Tonevitsky AG, Grigoriev AI: New functions of small nucleolar RNAs. Biochemistry 2013; 78: 638-650.

39. Pohlavné rozdiely v úzkosti podobnom správaní starnúcich potkanov: úloha endogénnych pohlavných hormónov

Mgr. Emese Domonkos[1]
Spoluautori: Veronika Borbélyová [1], Melinda Csongová [1], Martin Bosý [1], Mária Kačmárová[1], Peter Celec [1,2,3]

Školiteľ: Július Hodosy [1,4]
[1] Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava; [2] Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava; [3] Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava; [4] Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava

Úvod

Asociácia medzi cirkulujúcimi pohlavnými hormónmi a prejavmi afektívnych porúch je popísaná ako u žien tak aj u mužov. Vyššia prevalencia úzkostných a depresívnych stavov u žien v porovnaní s mužmi, a na druhej strane zvyšujúca sa prevalencia týchto porúch u mužov s pribudajúcim vekom svedčia o úlohe pohlavných hormónov v etiológii afektívných porúch (1–4). Avšak, kauzálna súvislosť medzi koncentráciou pohlavných hormónov a mierou úzkosti nie je doteraz overená.

Na rozdiel od ľudí, u peripubertálnych (5) a mladých dospelých potkanov (6) sa preukázalo, že samice sú menej úzkostné než samce. Podobne, tieto pohlavné rozdiely v úzkostnom správaní sa dokázali aj u starých potkanov (7). Doteraz však nie je jasné, hlavne u starých jedincov, či tieto pohlavné rozdiely v úzkostnom správaní sú ovplyvnené endogénnou produkciou pohlavných hormónov. Starnutie je spojené progresívnym znížovaním aktivity hyptolamo-hypofýzo-gonadálnej osi a následným poklesom koncentrácie cirkulujúceho testosterónu. U ľudí sa predpokladá, že hypogonadizmus súvisiaci s vekom je zodpovedný za niektoré symptómy starnutia, ako kognitívny pokles či afektívne poruchy (8–10). Podobne ako u ľudí, animálne experimenty tiež potvrdzujú, že staré hypogonadalné samce vykazujú vyššiu mieru depresie (11) a úzkosti (12). U samíc je zrejmé, že ako intra- aj interindividuálna variabilita úzkosti je spojená s variabilitou endogénnej produkcie pohlavných steroidných hormónov (13–16). Či pohlavné rozdiely v úzkosti, popísané u mladých dospelých zvierat, môžu byť ovplyvnené vekom súvisiacim poklesom testosterónu u samcov, nie je známe.

Najbežnejší animálny model na sledovanie príznakov mužského hypogonadizmu u hlodavcoc je chirurgické odstránenie semmenníkov, ktoré sú hlavnými zdrojmi androgénov u samcov. Krátkodobé účinky gonadektómie na správanie samcov sú popísané vo viacerých štúdiách. Zdá sa pritom, že vek kastrácie je dôležitým faktorom účinku, nakoľko kým u dospelých samcov potkana gonadektómia má anxiogénny účinok (17, 18), kastrácia v ranej fáze vývinu spôsobuje anxiolyticky (19). Podľa dostupnej literatúry však vplyv dlhodobého hypogonadizmu na úzkostné správanie starnúcich samcov je nedostatočne preštudovaný.

Primárnym cieľom našej štúdie bolo sledovať prípadne pohlavné rozdiely v úzkosti podobnom správaní starnúcich potkanov a skúmať úlohu endogénnej produkcie androgénov v úzkosti podobnom správaní starých samcov potkana.

Materiál a metodika

V experimente sme použili 20 samíc a 48 samcov potkana laboratórneho (Rattus norvegicus) kmeňa Lewis (Anlab, Praha, Česká republika). Experimentálnym zvieratám bol zabezpečený *ad libitum* prístup k vode a potrave. Zvieratá boli chované v plastových klietkach (n=4/klietka) v kontrolovanom prostredí (teplota 22±2 °C a vlhkosť 50±10 %) a svetelnom režime 12:12h.

V predpubertálnom období (25. PND - deň postnatálneho života) samce (n=18) podstúpili bilaterálnu kastráciu pod vplyvom anestézie (ketamín 100 mg/kg a xylazín 10 mg/kg, v pomere 3:1), aplikovanej intraperitoneálne. Ostatné samce (n=30) slúžili ako kontrolná skupina endogénnej produkcie androgénov.

Zvieratá v staršom veku (15 mesiacov) boli podrobené behaviorálnej štúdii. Na zhodnotenie lokomotorickej aktivity a úzkosti podobného správania zvierat sa uskutočnili test otvoreného poľa (OF; 5 minút), test vyvýšeného bludiska v tvare plus (EPM; 5 minút), test preferencie svetla a tmy (LDB; 5 minút) a pozorovanie vo PhenoTyper klietke (PHT; 30 minút). Behaviorálne parametre sa monitorovali pomocou softvéru Ethovision XT 10.0 (Noldus, Wageningen, Holandsko). Prejdená vzdialenosť, ako ukazovateľ lokomotorickej aktivity a explorácie v novom prostredí, sa zhodnotila v OF i PHT. Úzkosti podobné správanie sa zhodnotilo na základe času strávaného v centrálnej zóne arény (OF a PHT), v osvetlenej čati bludiska (LDB a PHT), v úkryte (PHT), či na otvorených ramenách bludiska (EPM), ako aj na základe počtu vstupov na otvorené ramená (EPM).

Na konci experimentu zvieratám sa odobralo 300µl krvi z chvostovej tepny. Plazmatická koncentrácia testosterónu sa stanovila pomocou enzýmovej imunoanalýzy použitím komerčne dostupného kitu ELISA (DRG Instruments GmbH, Nemecko).

Dáta boli štatisticky vyhodnotené jednofaktorovou analýzou variancie. Rozdiely medzi skupinami boli hodnotené pomocou Bonferroniho post hoc testu. Za štatistickú signifikanciu sme považovali $p<0,05$. Výsledky sú prezentované ako priemer + SEM. Na spracovanie výsledkov sme použili softvér Graphpad Prism 6.

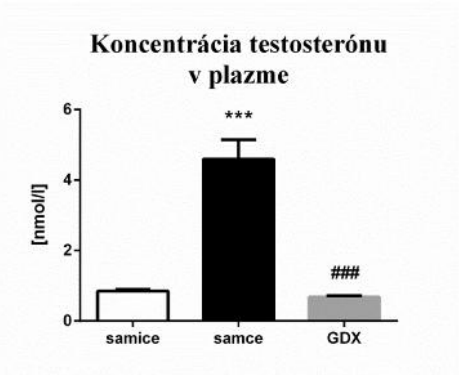
Výsledky

Skupiny sa líšili v plazmatickej koncentrácii testosterónu ($F=30.5$, $p<0.001$, Obr. 1), ktorá bola 5-krát vyššia u samcov než u samíc ($t=6.52$, $p<0.001$). Napriek staršiemu veku zvierat, účinok gonadektómie na koncentráciu testosterónu bol výrazný, t.j. GDX samce vykazovali signifikantne nižšiu koncentráciu testosterónu v plazme v porovnaní s intaktnými starnúcimi samcami (GDX vs samce: $t=6.49$, $p<0.001$).

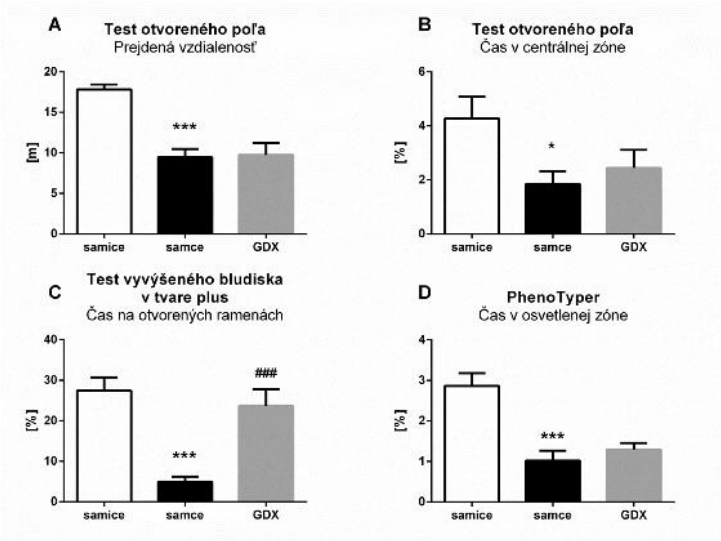
V lokomotorickej aktivite sme pozorovali signifikantné pohlavné rozdiely v oboch testoch (OF: $F=18.2$, $p<0.001$, Obr. 2A a PHT: $F=17.0$, $p<0.001$,), t.j. samce prešli 2-krát kratšiu vzdialenosť než samice (OF: $t=5.63$, $p<0.001$; PHT: $t=5.58$, $p<0.001$). Gonadektómia samcov nemala signifikantný vplyv na pohyb zvierat (OF: $t=0.19$, $p>0.99$; PHT: $t=0.67$, $p>0.99$).

V niektorých ukazovateľoch úzkosti podobného správania, ako v čase strávenom v centre bludika (OF: $F=4.03$, $p<0.05$, Obr. 2B; PHT: $F= 5.07$, $p<0.01$,), čase strávenom na otvorených ramenách ($F=22.6$, $p<0.001$, Obr. 2C), počte vstupov na otvorené remaná ($F=15.1$, $p<0.001$,) a v čase strávenom v ostvetlenej časti PHT ($F=15.0$, $p<0.001$, Obr.2D), sme pozorovali signifikantné pohlavné rozdiely. Podľa uvedených parametrov, samce sa ukázali byť úzkostnejšie než samice: strávili menej času v centre arény v OF (o 56,7%, $t=2.80$, $p<0.05$) i PHT (o 65,6%, $t=5.28$, $p<0.001$), ako aj menej času v osvetlenej časti PHT (o 64.4%, $t=5.28$, $p<0.001$). Okrem toho, samce strávili o 82,1% menej času na otvorených ramenách ($t=6.12$, $p<0.001$ a vstúpili na ne o 60,5% menej často ($t=5.08$, $p<0.001$) než

samice. Gonadektomované samce strávili signifikantne, takmer 5-krát, viac času na otvorených ramenách EPM (t=4.94, p<0.001) a taktiež 2-krát častejšie vtúpili na otvorené ramená (t=3.91, p<0.001) než samice. V čase strávenom vo svetlej šasti LDB (F=0.15, p=0.86,), ako ani v čase strávenom v úkryte v PHT (F=1.65, p=0.20,) sme nepozorovali žiadne rozdiely medzi jednotlivými skupinami.



Obr. 1. Plazmatická koncentrácia testosterónu. Dáta sú prezentované ako priemer + SEM. GDX – gonadektomované samce, *** p<0.001, ### p<0.001.



Obr. 2. Lokomočná aktivita (A) a úzkosti podobné správanie (B-D). A. Prejdená vzdialenosť a B. čas strávený v centrálnej zóne otvoreného poľa. C. Čas strávený na otvorených ramenách a D. frekvencia vstupov na otvorené ramená v teste vyvýšeného bludiska v tvare plus. D. Čas strávený v osvetlenej zóne PhenoTyper klietky. Dáta sú prezentované ako priemer + SEM. GDX – gonadektomované samce, * p<0.05, *** p<0.001, ### p<0.001.

Diskusia

V tejto štúdii sa dokázali pohlavné rozdiely ako v lokomočnej aktivite aj v úzkosti podobnom správaní starnúcich potkanov. Samice sa ukázali byť aktívnejšie a vykazovali menej úzkostné správanie v porovnaní so samcami vo viacerých behaviorálnych testoch, okrem LDB. V úzkosti podobnom správaní skúmanom na EPM, gonadektomované samce sa líšili od intakných samcov, čo naznačuje, že pohlavné hormóny produkované počas puberty a dospievania môžu predurčovať úzkostné správanie samcov potkana v ich staršom veku života.

Pohlavné rozdiely pozorované v úzkostnom správaní potkanov sú konzistentné s výsledkymi predchádzajúcich štúdií, ktoré ukázali, že nie len v dospelom (6), ale aj v staršom veku (7), sú samce úzkostnejšie než samice. V relevantných štúdiách sa u dospelých samocv hlodavcov poukázal anxiogénny účinok gonadektómie (17, 18). Naopak, v našom pokuse GDX samce vykazovali menej úzkostné správanie v EPM než intaktné samce svedčiac o tom, že nedostatok androgénov môže viesť k anxiolýze. Treba tu však pripomenúť, že kastrácia samcov použitých v našom experimente sa uskutočnila pred nástupom puberty zvierat. Vzhľadom na túto skutočnosť, úzkostné správanie samcov pozorované v EPM mohlo byť výsledkom organizačných účinkov androgénov počas dopsievanie (20–22), ktoré sú podobné k ich účinkom v ranom štádiu vývinu (19). Na druhej strane, vo vyššie uvedených štúdiách sa úzkosti podobné správanie skúmalo krátko po gonadektómii, kým v našom pokuse sa to skúmalo po dlhodobom nedostatku androgénov. Odlišný vek hormonálnej deprivácie, ako aj odlišná dĺžka indukovaného hypogonadizmu (19, 23) môžu byť dôvodom nekonzistencie našich výsledkov s pred nami publikovanými zisteniami. Pozorované pohlavné rozdiely v spontánnej lokomočnej aktivite starnúcich zvierat sú v súlade výsledkami nedávnych štúdií (24). Avšak, pravdepodobne tieto nie sú determinované produkciou androgénov. Pohlavné rozdiely pozorované v OF, EPM a čiatočne aj v PHT sa nepreukázali v LDB. Od použitého testu závislé výsledky môžu byť spojené s rôznymi psychologickými/behaviorálnymi mechanizmami podieľajúcich sa na rozlišných úzkostných testoch, ktoré skúmajú rôzny druh averzie (napr. nové prostredie, otvorený priestor, osvetlenie, výška, atď.) (25).

Na záver, podľa našich najlepších vedomostí, náš experiment je prvý, ktorý skúma účinok dlhodobého androgénového deficitu na úzkostné správanie starnúcich potkanov. Naše výsledky potvrdzujú, že samice sú menej úzkostné než samce aj v staršom veku. Okrem toho sme zistili, že tieto pohlavné rozdiely v úzkosti podobnom správaní starnúcich potkanov môžu, aspoň čiastočne, závisieť od endogénnych androgénov produkovaných u samcov, pretože predpubertálna gonadektómia samcov zredukovala rozdiely medzi pohlaviami v úzkostnom správaní. Ohľadom klinickej relevancie našich výsledkov, preskúmanie účinkov suplementačnej liečby, v rozlišných dávkach i po rôzne dlhú dobu, exogénnych pohlavných hormónov na úzkostné správanie dlhodobo hypogonadálnych starnúcich samcov by bolo potrebné.

Podporené čiastočne grantmi Lekárskej fakulty UK č.UK/21/2015, UK/308/2016 a grantom APVV 0539-12.

Zoznam použitej literatúry:

1. Altemus M: Sex differences in depression and anxiety disorders : Potential biological determinants. Horm Behav 2006; 50:534–538.
2. McHenry J, Carrier N, Hull E, Kabbaj M: Sex differences in anxiety and depression: Role of testosterone. Front Neuroendocrinol 2014; 35(1):42–57.

3. Solomon MB, Herman JP: Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. Physiol Behav 2009; 97(2):250–8.
4. Maeng LY, Milad MR: Sex differences in anxiety disorders : Interactions between fear, stress, and gonadal hormones. Horm Behav 2015; 76:106–117.
5. Brand T, Slob AK: Peripubertal castration of male rats, adult open field ambulation and partner preference behavior. Behav Brain Res 1988; 30(2):111–117.
6. Johnston AL, File SE: Sex differences in animal tests of anxiety. Physiol Behav 1991; 49(2):245–250.
7. Bowman RE, Maclusky NJ, Diaz SE, Zrull MC, Luine VN: Aged rats : Sex differences and responses to chronic stress. Brain Res 2006; 6:156–166.
8. Shores MM, Sloan KL, Matsumoto AM, Moceri VM, Felker B, Kivlahan DR: Increased incidence of diagnosed depressive illness in hypogonadal older men. Arch Gen Psychiatry 2004; 61(2):162–7.
9. Wahjoepramono EJ, Asih PR, Aniwiyanti V, Taddei K, Dhaliwal SS, Fuller SJ, Foster J, Carruthers M, Verdile G, Sohrabi HR, Martins RN: The effects of testosterone supplementation on cognitive functioning in older men. CNS Neurol Disord - Drug Targets 2016; 15(3):337–343.
10. Zhang X, Liu Z, Hu X, Yuan Y, Bai W, Wang X, Shen H, Zhao Y: Androgen replacement therapy improves psychological distress and health-related quality of life in late onset hypogonadism patients in Chinese population. Chin Med J (Engl) 2012; 125(21):3806–3810.
11. Frye CA, Walf AA: Depression-like behavior of aged male and female mice is ameliorated with administration of testosterone or its metabolites. Physiol Behav 2009; 97(2):266–269.
12. Frye CA, Edinger K, Sumida K: Androgen administration to aged male mice increases anti-anxiety behavior and enhances cognitive performance. Neuropsychopharmacology 2008; 33(5):1049–1061.
13. Toufexis JD, Myers MK, Davis M: The effect of gonadal hormones and gender on anxiety and emotional learning. Horm Behav 2006; 539–549.
14. Frye CA, Petralia SM, Rhodes ME: Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 a , 5 a -THP. Behav Brain Res 2000; 67.
15. Mercondes KF, Miguel JK, Melo LL, Spadar-Bratfisch CR: Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. Physiol Behav 2001, 74:435–440.
16. Mora S, Dussaubat N, Díaz-Véliz G: Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. 1996; 21(7):609–620.
17. Frye CA, Seliga AM: Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats. Cogn Affect Behav Neurosci 2001; 1(4):371–81.
18. Edinger KL, Frye CA: Intrahippocampal administration of an androgen receptor antagonist, flutamide, can increase anxiety-like behavior in intact and DHT-replaced male rats. Horm Behav 2006; 50(2):216–222.
19. Zuloaga DG, Jordan CL, Breedlove SM: The organizational role of testicular hormones and the androgen receptor in anxiety-related behaviors and sensorimotor gating in rats. Endocrinology 2011; 152(4):1572–81.
20. Brown GR, Kulbarsh KD, Spencer KA, Duval C: Peri-pubertal exposure to testicular hormones organizes response to novel environments and social behaviour in adult male rats. Horm Behav 2015; 73:135–141.

21. Schulz K, Molenda-Figueira H, Sisk C: Back to the future: the organizational–activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. Horm Behav 2009; 55(5):597–604.
22. Morris JS, Weil ZM, Nelson RJ: Sexual experience and testosterone during adolescence alter adult neuronal morphology and behavior. Horm Behav 2013; 64(3):454–460.
23. McDermott CM, Liu D, Schrader LA: Role of gonadal hormones in anxiety and fear memory formation and inhibition in male mice. Physiol Behav 2012; 105(5):1168–74.
24. Burke NN, Coppinger J, Deaver DR, Roche Michelle, Finn DP, Kelly J: Sex differences and similarities in depressive- and anxiety-like behaviour in the Wistar-Kyoto rat. Physiol Behav 2016; 167:28–34.
25. Ramos A, Mormède P: Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. Neurosci Biobehav Rev 1997; 22(1):33–57.

40. Metabolizmus metylglyoxalu u centrálne obéznych adolescentov

Melinda Csongová[1]

(Normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Radana Gurecká[1,2], Ivana Koborová[1], Jean Scheijen[3], Mario van de Waarenburg[3], Casper G. Schalkwijk[3]

Školiteľ: Doc. MUDr. Katarína Šebeková, DrSc.[1]

[1] Ústav Molekulárnej BioMedicíny, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave; [2]Ústav Lekárskej Fyziky, Biofyziky, Informatiky a Telemedicíny, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave; [3]Maastricht University Medical Center, Department of Internal Medicine, Maastricht, The Netherlands

Úvod

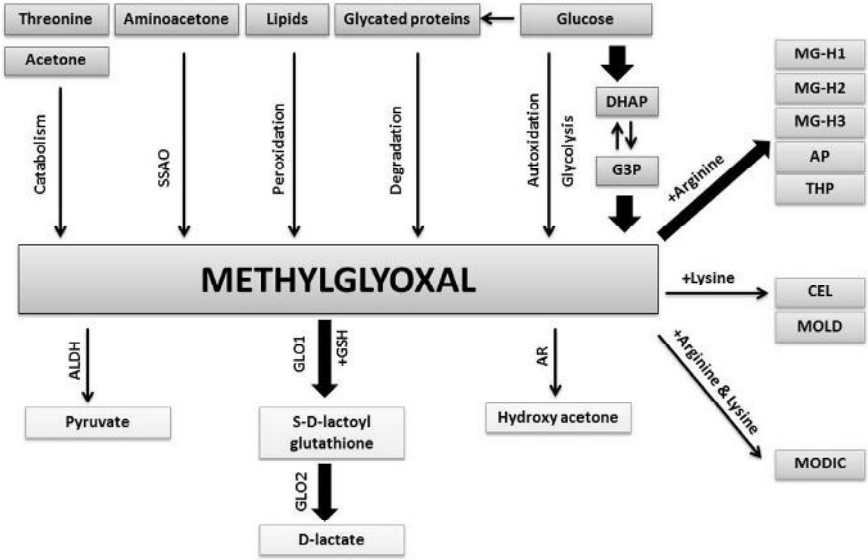
Metylglyoxal (MGO, 2-oxopropanal, $CH_3C(O)CHO$) je vysoko reaktívny α-oxoaldehyd (1). Môže vznikať rôznymi metabolickými cestami, ale hlavným zdrojom jeho vzniku za fyziologických podmienok je glukóza a s ňou spojená glykolýza (Obrázok 1). Keďže ide o toxický oxoaldehyd, *in vivo* sa detoxifikuje glyoxalázovým systémom, kde pomocou kľúčového enzýmu glyoxalázy 1 (Glyo1) sa MGO vylučuje vo forme D-laktátu do moča (2).

Toxicita MGO spočíva najmä v schopnosti modifikovať bielkoviny. Je najpotentnejším glykačným činidlom *in vivo* na bunkových a extracelulárnych bielkovinách, lipidoch a DNA. Aj za fyziologických podmienok malé množstvo MGO uniká detoxifikácii a môže modifikovať proteíny, vďaka čomu vznikajú koncové produkty pokročilej glykácie (advanced glycation end products, AGEs). V tomto prípade vznikajú na bielkoviny viazané AGEs. Tieto modifikované bielkoviny už nie sú schopné plniť fyziologické funkcie. Príkladom je glykovaný inzulín, ktorý je menej účinný a časom môže zapríčiniť inzulínovú rezistenciu (3). V plazme sa okrem MGO-modifikovaných bielkovín nachádzajú voľné MGO-modifikované peptidy, ktoré sa nazývajú aj ako voľné AGEs. Tieto molekuly sú vylučované glomerulárnou filtráciou do moča. Voľné AGEs vznikajú aj proteolytickým štiepením na bielkoviny viazaných AGEs (4). Medzi AGEs vznikajúce sa z MGO patria hydroimidazolóny (MG-Hs) a N^{ε}-carboxyetyllyzín (CEL) (Obrázok1).

Ďalej MGO okrem modifikácie bielkovín a peptidov sa môže naviazať na bunkový receptor pre AGEs, a tým spustiť rôzne signálne dráhy a indukovať napr. oxidačný stres, čo je genotoxický stimulus pre bunku a môže indukovať apoptózu, alebo môže aktivovať zápalovú signálnu dráhu. Diabetogénny a aterogénny účinok MGO bol popísaný vo viacerých štúdiach (5–8). I keď MGO je súčasťou našej každodennej stravy, exogénne zdroje nezohrávajú dôležitú úlohu vo zvyšovaní plazmatickej koncentrácie reaktívneho aduktu (9).

Štúdia Thornalley-ho a kol. popisuje vyššiu koncentráciu MGO a na bielkoviny viazaného CEL u obéznych dospelých v porovnaní s chudými, kým koncentrácia na bielkoviny viazaných MG-Hs je rovnaká (10). Predpokladá sa, že MGO a AGEs prispievajú k dysfunkcii tukového tkaniva a indukujú inzulínovú rezistenciu (11,12).

Cieľom našej práce bolo zistiť, či sú zmeny v koncentráciach MGO a MGO-derivovaných AGEs včasným znakom obezity, a či sú prítomné u centrálne obéznych adolescentov, čiže v rannom veku dospelosti.



Obrázok 1. Vznik a detoxifikácia MGO, a tvorba MGO-derivovaných AGEs. SSAO, semicarbazide-sensitive amine oxidase; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; ALDH, aldehyde dehydrogenase; GLO1, glyoxalase 1; GSH, gluthatione; GLO2, glyoxalase 2; AR, aldose reductase; MG-H1, methylglyoxal-derived hydroimidazolone 1; MG-H2, methylglyoxal-derived hydroimidazolone 2; MGH3, methylglyoxal-derived hydroimidazolone 3; AP, argpyrimidine; THP, tetrahydropyrimidine; CEL, N_{ε}-(1-carboxyethyl)lysine; MOLD, methylglyoxal-lysine dimer; MODIC, 2-ammonio-6-[(2-[(4-ammonio-5-oxido-5-oxopentyl)amino]-4-methyl-4,5-dihydro-1H-imidazol-5-ylidene)amino]hexanoate (Obrázok prerobený podľa Maessen a kol. (13)).

Materiál a metodika

V tejto sekundárnej klinickej štúdie sme si vybrali 342 adolescentov na ďalšie analýzy z nášho veľkého projektu *Rešpekt pre zdravie*, ktorá prebiehala v školskom roku 2011/2012. Hlavným cieľom projektu bola prevencia kardio-metabolických a iných chronických ochorení v prostredí stredných škôl v Bratislave.

Štúdiu schválila Etická komisia Bratislavského samosprávneho kraja. Každý študent podpísal informovaný súhlas, v prípade neplnoletých žiakov musel súhlas podpísať rodič, resp. zákonný zástupca.

Subjekty. Naša kohorta pozostávala z 342 zdravých adolescentov (štíhli n=191; centrálne obézni n=151), z čoho 53% predstavovali dievčatá a 47% chlapci vo veku ±17.

Metódy. Centrálnu obezitu sme stanovovali pomerom obvodu pása a výšky (WHtR; waist-to-height ratio). Za centrálnu obezitu sme považovali WHtR>0.5.

Dáta antropologických meraní (hmotnosť, výška, obvod pása, tlak krvi) a štandardných biochemických analýz (glykémia, inzulín, triacylglyceroly, LDL- a HDL-cholesterol, C-reaktívny proteín s vysokou citlivosťou – hsCRP) sme použili z hlavnej štúdie *Rešpekt pre zdravie*. Zber dát vykonali zaškolení pracovníci z oblasti medicíny, biochemické analýzy vykonali v centrálnom laboratóriu štandardnými laboratórnymi metódami.

Koncentrácie MGO, voľného a na bielkoviny viazaného CEL a MG-Hs v plazme a voľného CEL a MG-Hs v moči sme stanovili metódou UPLC-MSMS (tandem-mass ultra performance liquid chromatography) (14).

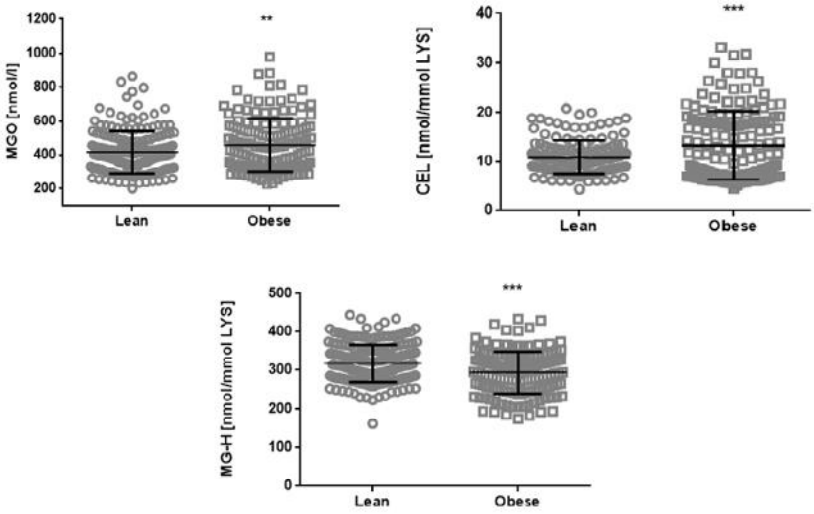
Výsledky

Charakteristika štíhlych a obéznych adolescentov je popísaná v tabuľke 1. Centrálne obézni adolescenti mali vyšší systolický (p=0.001) a diastolický tlak (p=0.001), ako aj horší lipidový profil. Koncentrácie inzulínu, glykémie a inzulínová sensitivita sa medzi skupinami nelíšili.

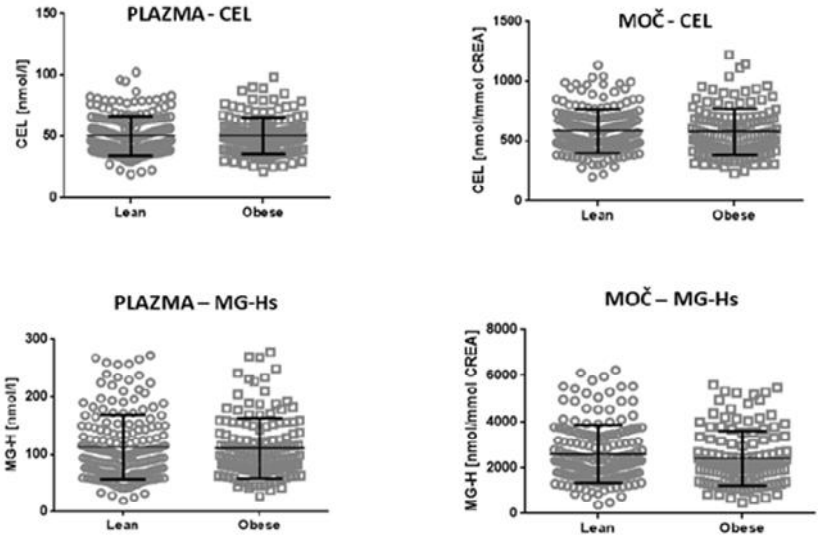
Tabuľka 1. Charakteristika jednotlivých skupín.

	štíhli	***centrálne obézni***	***p***
hmotnosť	67±12	83±18	<0.001
WHtR	0.44±0.03	0.54±0.04	<0.001
systoliký tlak	115±13	119±14	0.001
diastolický tlak	72±8	75±8	0.001
HDL-cholesterol	1.41±0.31	1.27±0.29	<0.001
LDL-cholesterol	2.31±0.62	2.51±0.63	0.004
triacylglycerol	1.02±0.51	1.16±0.73	0.035
inzulín	14.66±8.03	16.92±13.40	0.683
glykémia	5.2±1.8	4.9±0.5	0.190
inzulínová rezistencia(QUICKI)	0.33±0.03	0.33±0.03	0.371
hsCRP	1.29±3.09	2.15±3.93	<0.001

Centrálne obézni mladiství mali významne vyššie koncentrácie MGO (p=0.006) a na bielkoviny viazaného CEL (p=0.001) v plazme (graf 1), avšak koncentrácie na bielkoviny viazaných hydroimidazolónov boli významne nižšie (p<0.001) v porovnaní so štíhlymi adolescentmi (graf 1). Koncentrácie voľného CEL a MG-Hs v plazme a v moči sa nelíšili medzi skupinami (graf 2).



Graf 1: Koncentrácia MGO (**p<0.01 vs. štíhli), na bielkoviny viazaného CEL (***p<0.001 vs. štíhli) a na bielkoviny viazaných MG-Hs (***p<0.001 vs. štíhli) v plazme.



Graf 2: Koncentrácie voľného CEL a MG-Hs v plazme a v moči sa nelíšili medzi skupinami.

Diskusia

Naša štúdia je prvá, ktorá poukázala na zmeny v metabolizme MGO u adolescentov. Tieto zmeny sú teda včasným znakom obezity, a s veľkou pravdepodobnosťou môžu mať patofyziologické následky, nakoľko klinické a experimentálne štúdie dokladajú, že MGO a jeho deriváty majú diabetogénny, prozápalový a aterogénny účinok (1,13,15,16).

Hromadenie plazmatického MGO môže byť zapríčinené zníženou aktivitou deglykačného systému s redukovanou aktivitou kľúčového enzýmu Glo1 (13), na čo poukazujú aj Thornalley a kol. (10) u dospelých obéznych probandov. Objasniť túto otázku plánujeme stanovením aktivity Glo1 v erytrocytoch alebo renálej exkrécie D-laktátu.

Hromadenie na bielkoviny viazaných AGEs je priamym dôsledkom zvýšenej koncentrácie MGO, ktorý je hlavným zdrojom CEL (Obrázok 1) (17).

Paradoxné zníženie koncentrácií MGO hydroimidazolónov môže vyplývať zo skutočnosti, že existujú 3 izoméry MG-Hs (Obrázok 1), z ktorých jeden má výraznú antioxidačnú kapacitu. Tento Mg-Hs izomér podlieha spontánnej deglykačnej reakcii za vzniku pyruvátu (18). Na potvrdenie tohto predpokladu bude nutné stanovenie jednotlivých izomérov MG-Hs.

V ďalších našich štúdiách sa sústredíme na analýzu mechanizmu hromadenia MGO stanovením aktivity Glo1 a renálnej exkrécie D-laktátu, a asociácii koncentrácií MGO a jeho AGE-derivátov s kardiometabolickými rizikovými faktormi manifestovanými v obezite u adolescentov.

Práca bola podporená grantmi VEGA: 0447-12 (KS), APVV: 1/0637/13 (KS) a EASD ARTF: 94766 (MCs)

Zoznam použitej literatúry:

1. Thornalley P: The glyoxalase system in health and disease. Mol Aspects Med 1993; 14: 287–371.
2. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS: Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. Biochem J 1999; 344: 109–16.
3. Schalkwijk CG, Brouwers O, Stehouwer CD: Modulation of insulin action by advanced glycation endproducts: a new player in the field. Horm Metab Res 2008; 40(9): 614–9.
4. Kalapos MP: Where does plasma methylglyoxal originate from? Diabetes Res Clin Pract 2013; 99(3): 260–71.
5. Abordo EA, Westwood ME, Thornalley PJ: Synthesis and secretion of macrophage colony stimulating factor by mature human monocytes and human monocytic THP-1 cells induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts. Immunol Lett 1996; 53: 7–13.
6. Dobler D, Ahmed N, Song L, Eboigbodin KE, Thornalley PJ: Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification. Diabetes 2006; 55(7): 1961–9.
7. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Yan S Du, et al: N ⅊ - (Carboxymethyl) Lysine Adducts of Proteins Are Ligands for Receptor for Advanced Glycation End Products That Activate Cell Signaling Pathways and Modulate Gene Expression. J Biol Chem 1999; 274(44): 31740–9.

8. Okado A, Kawasaki Y, Hasuike Y, Takahashi M, Teshima T, Fujii J, et al: Induction of Apoptotic Cell Death by Methylglyoxal and 3-Deoxyglucosone in Macrophage-Derived Cell Lines. Biochem Biophys Res Commun 1996; 225: 219–24.
9. Degen J, Hellwig M, Henle T: 1,2-Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods. J Agric Food Chem 2012; 60: 7071–9.
10. Masania J, Malczewska-Malec M, Razny U, Goralska J, Zdzienicka A, Kiec-Wilk B, et al: Dicarbonyl stress in clinical obesity. Glycoconjugate Journal 2016; 33(4): 581–9.
11. Dhar A, Dhar I, Jiang B, Desai KM, Wu L: Chronic methylglyoxal infusion by minipump causes pancreatic beta-cell dysfunction and induces type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats. Diabetes 2011; 60(3): 899–908.
12. Jia X, Olson DJH, Ross ARS, Wu L: Structural and functional changes in human insulin induced by methylglyoxal. FASEB J 2006; 20(9): 1555–7.
13. Maessen DEM, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG: The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. Clin Sci 2015; 128(12): 839–61.
14. Scheijen JLJM, Schalkwijk CG: Quantification of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in blood and plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: evaluation of blood specimen. Clin Chem Lab Med 2014; 52(1): 85–91.
15. Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, et al: Advanced Glycation End Products Activate Endothelium Through Signal-Transduction Receptor RAGE: A Mechanism for Amplification of Inflammatory Responses. Circulation 2002; 105(7): 816–22.
16. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A: Advanced Glycosylation Products Quench Nitric Oxide and Mediate Defective Endothelium-dependent Vasodilatation in Experimental Diabetes. J Clin Invest 1991; 87: 432–8.
17. Vistoli G, De Maddis D, Cipak a, Zarkovic N, Carini M, Aldini G: Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. Free Radic Res 2013; 47: 3–27.
18. Wang T, Kartika R, Spiegel DA: Exploring post-translational arginine modification using chemically synthesized methylglyoxal hydroimidazolones (MG-Hs). J Am Chem Soc 2013; 134(21): 8958–67.

41. Expresia molekúl TREM-1 v tkanivách gliómov

MUDr. Lenka Maruščáková[1]
Spoluautor: Mgr. Barbora Filová, PhD.[2]

Školiteľ: doc. MUDr. Mária Bucová, CSc.[1]
[1]Imunologický ústav LFUK, [2]Ústav lekárskej fyziky, biofyziky, informatiky a telemedicíny LFUK

Úvod

Skupina nádorov mozgu gliómy majú pôvod v malígne transformovaných gliových bunkách. Spomedzi nich sa najčastejšie vyskytuje prognosticky najhorší nádorový typ glioblastoma multiforme (mnohotvarý glioblastóm, GBM), ktorý predstavuje glióm s gradingom 4.

Z epidemiologického hľadiska je významná vysoká incidencia gliómov v populácii detí a mladistvých. Pretrváva chýbanie efektívnej liečby nádorov, zlá prognóza je hlavne pri gliómoch s vyšším gradingom. Súčasný medián prežívania pacientov s GBM je medzi 12 a 15 mesiacmi od stanovenia diagnózy (1). Najnovšia WHO (World Health Organization) klasifikácia nádorov centrálnej nervovej sústavy z roku 2016 (2) integruje molekulárne parametre s klasickým histopatologickým prístupom. Kladie dôraz na expresiu molekúl v tkanive. Tento prístup je predpokladom pre lepšiu diagnostiku a následne aj liečbu nádorov.

Na procese rastu a progresii nádoru sa významne podieľajú aj podporné bunky, ktoré samotné nie sú malígne zmenené na genetickej úrovni, ale spolu s nádorovými bunkami vytvárajú nádorové mikroprostredie. V komplexnom procese tumorigenézy sa odhalila úloha produktov buniek imunitného systému ako rastových faktorov pre nádorové bunky a vytváranie promalígneho nádorového mikroprostredia (3,4). Nie všetky majú prebádanú úlohu. Nádorové mikroprostredie má charakter chronického zápalového procesu. Súčasná literatúra poskytuje čoraz viac informácií o význame zápalového procesu, imunitných buniek a molekúl v progresii nádoru. Sledovanie zápalových markerov má tak sľubnú perspektívu v imunoonkologickom výskume ako aj vo vývoji imunoterapeutických postupov. Aj v klinickej neuroonkológii sa popri klasických liečebných modalitách, chemoterapii a rádioterapii stále častejšie spomína imunoterapia s veľmi perspektívnym využitím (5). Takto sa nádorová imunológia dostáva do centra vedeckého záujmu.

Molekuly TREM (triggering receptors expressed on myelocytes) patria medzi PRR (pattern recognition receptors). Nachádzajú sa na povrchu mikroglie a tkanivových makrofágov v mozgovom parenchýme. Expresia TREM-1 molekuly sa dokázala na povrchu makrofágov asociovaých s nádorom (TAM- tumor associated macrophages). Zistilo sa, že podporuje rozvoj a progresiu zápalového mikroprostredia (6). Výskum funkcie molekúl TREM-1môže byť východiskom pre hlbšie pochopenie príčinno – následných vzťahov malígnych a chronických zápalových procesov.

Cieľom predkladanej štúdie je charakterizovanie prítomnosti expresie TREM-1 v gliómových tkanivách a vzťah expresie tejto molekuly s gradingom gliómov.

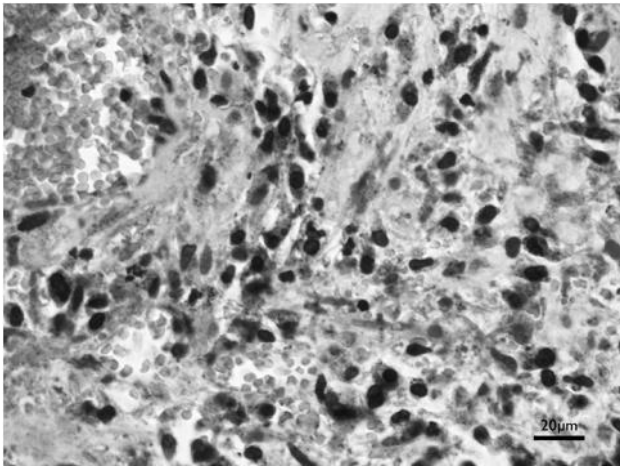
Materiál a metodika

Predkladaná štúdia vznikla na základe spolupráce Imunologického ústavu LFUK s Neurochirurgickou klinikou LF UK a FN v Bratislave. Štúdia bola schválená etickou komisiou a od každého pacienta sa získal informovaný súhlas. Na pracovisku Cytopathos, s r. o. sa najskôr vykonáva po štandardnom

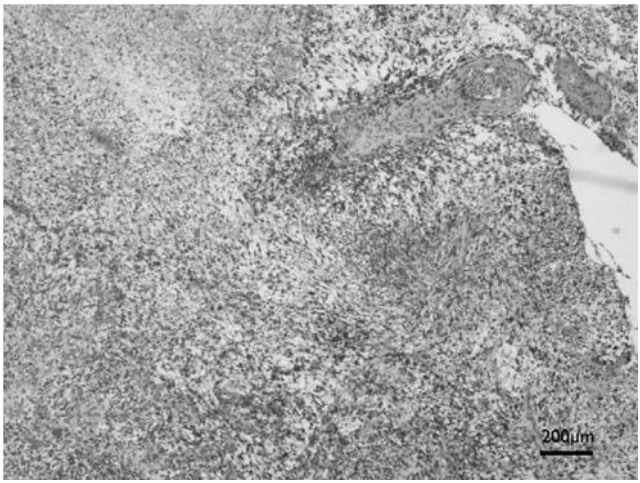
fixačnom spracovaní formalínovo-parafínovou metódou histopatologické vyšetrenie tkanív neurochirurgicky odstránených nádorov. Z parafínových bločkov sú vyhotovené 5µm hrubé rezy, ktoré sú nanesené na podložné sklíčka. Tkanivové rezy deparafinujeme, dehydratujeme a pripravujeme na imunohistochemické farbenie: demaskovaním antigénu- revitalizáciou mikrovlnnou metódou, blokovanie endogénneho enzýmu a nešpecifických väzieb. Imunohistochemicky farbíme tkanivové rezy s použitím primárnej polyklonálnej protilátky anti-TREM-1 (od firmy Sigma Aldrich) a sekundárnej enzýmovo značenej protilátky. Preparáty dofarbujeme hematoxilínom. Po odvodnení a montovaní preparátov ich následne prezeráme mikroskopom Nikon ECLIPSE 80i s pripojenou kamerou značky Nikon. Následne vyhotovujeme farebné mikrografie. Pomocou počítačového programu ImageJ sledujeme a porovnávame expresiu molekúl TREM-1 v tkanivách gliómov s rôznym gradingom.

Výsledky

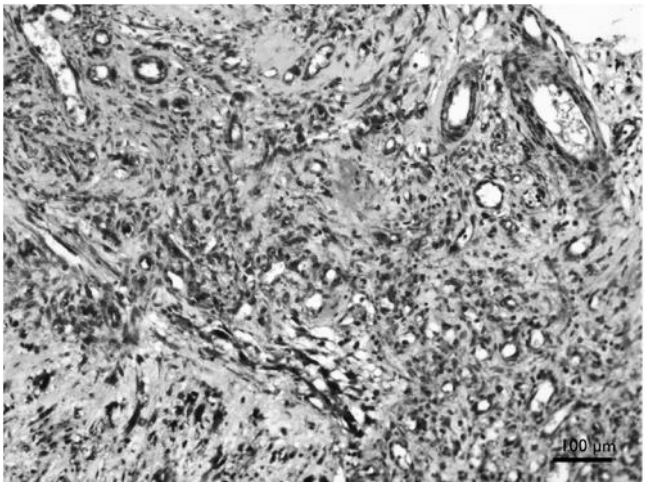
Expresiu molekuly TREM-1 sme zaznamenali v nádorovom tkanive intracelulárne. Imunohistochemická analýza ukázala granulárnu expresiu v cytoplazme buniek (Obr.1). Pri histopatologickom prezeraní preparátov tkanív GBM sme pozorovali expresiu TREM-1 v pseudopalisádovito usporiadaných bunkách ako aj v bunkách roztrúsených v tkanive (Obr. 2). Expresia TREM-1 bola konštantne výrazná aj v perivaskulárnych priestoroch (Obr. 3) a v ložiskách glomeruloidnej mikrovaskulárnej proliferácie. Pri prezeraní a hodnotení expresie TREM-1 v tkanivách s použitím programu ImageJ sme zaznamenali výrazný rozdiel medzi jednotlivými gradingami gliómov, pričom sme pozorovali asociáciu hladiny expresie TREM-1 s rastúcim gradingom nádorov.



Obr. 1 Glioblastoma multiforme. Bunky s cytoplazmatickou granulárnou expresiou TREM-1. Použitie objektívu so zväčšením 40x.



Obr. 2 Glioblastoma multiforme. Heterogenita histologického obrazu v tkanive, pseudopalisádovité ložiská nekrózy. Použitie objektívu so zväčšením 4x.



Obr. 3 Glioblastoma multiforme. Hustá mikrovaskulatúra v tkanive. Použitie objektívu so zväčšením 10x.

Diskusia

Predkladaná štúdia sa zameriava na charakterizovanie expresie molekúl TREM-1 v tkanivách gliómov, s dôrazom na glioblastoma multiforme a vzťah expresie TREM-1 s gradingom gliómov.

Imunohistochémia je v súčasnej dobe praktickým a dostupným nástrojom na identifikáciu patologicky zmeneného molekulárneho profilu v tkanive. Kombinácia fentotypovej a genotypovej diagnostiky má potenciál v prognóze a predikcii nádorovej choroby. Základnými histopatologickými kritériami pre

diagnózu gliómu s gradingom 4 - GBM je proliferácia mikrovaskulatúry (hypertrofia, hyperplázia a glomeruloidná proliferácia endotelu) a ložiská pseudopalisádovej nekrózy. Pri histopatologickom prezeraní tkaniva GBM je známa rôznorodosť histologického obrazu tkanivových rezov a vysoká lokálna heterogenita (2). Táto histologická charakteristika výrazne limituje objektívnosť štatistických analýz expresie molekúl zisťovaných imunohistochemickými metódami na vzorkách nádorových tkanív z operačne riešených gliómov.

Molekula TREM-1 bola objavená v roku 2000 ako ďalší člen imunoglobulínovej superrodiny molekúl (7). Je to pozitívny regulátor zápalovej odpovede, má úlohu v signálnych dráhach spojených so zápalovými reakciami. Jej väzobný partner je stále neznámy, ale medzi pravdepodobné ligandy patria HMGB1 (high mobility group box protein), HSP70 (heat shock proteíny) a molekuly exprimované na krvných doštičkách. V literatúre sa uvádza perspektívne potenciálne využitie molekuly TREM-1 ako nový cieľ pre nádorovú imunomoduláciu (8).

TREM-1 exprimujú vybrané myeloidné bunky, hlavne monocyty/ makrofágy. Expresia molekúl TREM-1 v nádoroch môže predikovať agresivitu nádorového rastu a zlú prognózu. Táto spojitosť sa pozorovala pri karcinóme pečene a pľúc, avšak presný mechanizmus je neznámy (6, 9). My sme pozorovali, že rastúci grading je spojený s úrovňou expresie TREM-1, pričom GBM vykazuje najväčší stupeň expresie TREM-1.

Zápal sa uvádza medzi základnými črtami nádorového procesu (10). Zápalový proces podporuje mnohé zo základných znakov tumorigenézy: pretrvávajúca proliferačná signalizácia, rezistencia voči bunkovej smrti, indukcia angiogenézy (9). Výsledky štúdie s použitím metódy in situ hybridizácie (11) ukázali, že hypoxia môže indukovať expresiu TREM-1 na TAMs. Na transkripčnej úrovni je expresia TREM-1 makrofágmi regulovaná cez signálnu molekulu NFκB (nuclear factor kappa B). Mnoho štúdií ukázalo aktiváciu NFκB hypoxiou (11).Tumorigenéza je komplexný proces, v ktorom je hypoxia funkčne aj signalizačne prepojená s angiogenézou. Tento vzťah sme sledovali aj v našej štúdii experimentálnej tumorigenézy na animálnom modeli (12). Detegovaná molekula TREM-1 môže zohrávať úlohu v signalizácii tohto vzťahu. Glomeruloidná proliferácia kapilár je bežným histopatologickým nálezom v GBM. S proliferáciou endotelu súvisí aj prítomnosť pericytov (13). Tieto sa v literatúre v súvislosti s expresiou TREM-1 molekuly nespomínajú, ale naše nálezy nás vedú k úvahe o tejto expresii, avšak pre potvrdenie tejto našej hypotézy sú potrebné ďalšie detekčné analýzy na prítomnosť pericytov v tkanivách GBM. V prípade pozitivity pericytov na TREM-1 by sme detekovali ďalšiu funkciu tejto molekuly a jej potenciálny vzťah s typickým patologickým nálezom glomeruloidnej kapilárnej proliferácie.

Duan a spol. (14) pozorovali, že samotné nádorové bunky hepatocelulárneho karcinómu exprimujú TREM-1. My ako prvý poukazujeme na expresiu molekuly TREM-1 samotnými nádorovými bunkami v tkanivách GBM. Na definitívne potvrdenie tejto skutočnosti je však potrebné uskutočniť ďalšie analýzy nádorového tkaniva, hlavne imunoflorescenčnou metódou.

V závere sa chceme poďakovať za spoluprácu na vzniku tejto vedeckej štúdie nasledovným pracoviskám: Neurochirurgickej klinike LF UK a FN v Bratislave, Cytopathos, s r. o., Ústavu lekárskej fyziky, biofyziky, informatiky a telemedicíny LFUK a Ústavu histológie a embryológie LFUK.

Zoznam použitej literatúry:

1. Chaddad A, Desrosiers C, Toews M a spol.: Radiomic analysis of multi-contrast brain MRI for the prediction of survival in patients with glioblastoma multiforme. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2016;2016:4035-4038.
2. Louis DN, Perry A, Reifenberger G a spol.: The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. 2016;131(6):803-20.
3. Witz, I P: Yin.Yang activities and vicious cyrcles in the tumor microenvironment. Cancer Research 2008, 68(1),9-13.
4. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL: 2011: the immune hallmarks of cancer. In Cancer Immunol Immunother. 2011;60(3):319-26.
5. Tivnan A, Heilinger T, Lavelle EC, Prehn JH: Advances in immunotherapy for the treatment of glioblastoma. J Neurooncol. 2017 Jan;131(1):1-9.
6. Ho CC, Liao WY, Wang CY a spol.: TREM-1 expression in tumor-associated macrophages and clinical outcome in lung cancer. Am J Respir Crit Care Med. 2008;177(7):763-70.
7. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M: Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, anovel receptor expressed on neutrophils and monocytes. J Immunol. 2000;164(10):4991-5.
8. Yuan Z, Mehta HJ, Mohammed K, Nasreen N, Roman R, Brantly M, Sadikot RT: TREM-1 is induced in tumor associated macrophages by cyclo-oxygenase pathway in human non-small cell lung cancer. PLoS One. 2014;9(5):e94241.
9. Zhou J, Chai F, Lu G a spol.: TREM-1 inhibition attenuates inflammation and tumor within the colon. Int Immunopharmacol. 2013;17(2):155-61.
10. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of Cancer: the next generation. Cell. 2011. 144(5):646-74.
11. Murat A, Migliavacca E, Hussain SF a spol.: Modulation of angiogenic and inflammatory response in glioblastoma by hypoxia. PLoS One. 2009;4(6):e5947.
12. Maruscakova L, Poljak Z, El-Hassoun O, Kopani M, Jakubovsky J, Hulin I: The dynamics of hypoxia-angiogenesis relation as reflection of evolution of tumor microenvironment. Virch Arch 2013, 463, 321.
13. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J: Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. Am J Pathol. 2007;170(1):1-15.
14. Duan M, Wang ZC, Wang XY: TREM-1, an inflammatory modulator, is expressed in hepatocellular carcinoma cells and significantly promotes tumor progression. Ann Surg Oncol. 2015;22(9):3121-9.

42. Hodnotenie rôznych typov operácií rázštepu sekundárneho podnebia

MUDr. Pavol Macho
(chirurgia)
Spoluautori: Fekiačova D, Fedeleš J., jr., Hajek J.

Školiteľ: Doc. MUDr. Jozef Fedeleš, CSc
Klinika plastickej estetickej a rekonštrukčnej chirurgie, Lekárska fakulta UK, UNB Ružinov, Bratislava

Úvod

Rázštepy pery a podnebia patria k najčastejším vývinovým ochoreniam frekvenciou výskytu 1:500-1:2000 v závislosti na predkoch, mieste narodenia, veku matky, prenatálnej expozícii a socioekonomickom postavení (1). Väčšia časť sú tzv. bezsyndrómové, teda bez súčasnej prítomnosti syndrómov alebo iných väčších vrodených defektov. Významná geografická orientácia výskytu rázštepov pery a podnebia sa ukázala aj pri analýze pacientov sledovaných v Ráštepovom centre Kliniky plastickej estetickej a rekonštrukčnej chirurgie LFUK, v ktorej sa zistilo, že je vyššia prevalencia výskytu orofaciálnych rázštepov v regióne Bratislava v porovnaní s ďalšími regiónmi západného Slovenska (2). V Rázštepovom centre kliniky sú pacienti s rázštepmi v dlhodobej dispenzárnej starostlivosti interdisciplinárneho rázštepového týmu. Operácia predstavuje v súčasnosti jedinú metódu , ktorou sa koriguje rázštep a má veľký vplyv aj na kvalitu života pacientov a ich rodiny. Operačné riešenie rázštepu pery je načasované približne na tretí mesiac života pacienta . Operačné uzavretie rázštepu podnebia je naplánované na šiesty mesiac života dieťaťa. Najčastejšie používanou metódou na palatoplastiku je postup podľa Veau-Wardill-Kilnera (3), ďalej sa využíva postup podľa Furlowa (4,5), Zriedkavejšie sú volené prístupy podľa von Langenbecka (6) a Bardacha (7). Zameraním našej práce je vyhodnotenie úspešnosti jednotlivých typov operácií v Rázštepovom centre kliniky so zreteľom na vznik komplikácií a potrebu ich následného chirurgického riešenia.

Materiál a metodika

V retrospektívnej štúdii sa z ambulantných kariet pacientov sledovaných v Rázštepovom centre kliniky vybrali pacienti s rázštepom sekundárneho podnebia operovaní na Klinike plastickej, estetickej a rekonštrukčnej chirurgie LF UK a UNB Ružinov v období od 1.1.2000-31.12.2009 , t.j. za 10 ročné obdobie. Pacienti v celkovom počte 147, boli rozdelení jednak podľa typu rázštepu ako aj podľa typu operácií do jednotlivých skupín, a v rámci nich sa zaznamenávali vznik a výskyt pooperačných komplikácií a potreba ich chirurgického riešenia. Najčastejšie použitým prístupom na palatoplastiku bol postup podľa Veau-Wardill-Kilnera (80,2%, VWK) potom podľa Furlowa (8,1% , FW) a von Langenbecka (7,4%, vonLANG) , najmenej podľa Bardacha (4,5%,BAR), Z komplikácií to boli najmä výskyt oronazálnych komunikácií (ONK), velofaryngeálnych insuficiencií (VFI), dehiscinencia, krvácanie, uvula bifida. Na štatistické vyhodnotenie rozdielov medzi skupinami sa použil chi-kvadratový test (8), nakoľko ide o kvalitatívnych ukazovateľov v jednotlivých súboroch (8,9).

Výsledky

Z celkového počtu 147 pacientov mala väčšina 102 nekompletný rázštep (TAB.1) , u 45 pacientov bol kompletný rázštep podnebia (TAB. 2). Ukázalo sa, že výskyt najzávažnejších pooperačných komplikácií (ONK, VFI) bol u skupiny pacientov s kompletným rázštepom výrazne vyšší (zo 45 až u 21, TAB.2) ako u nekompletného rázštepu (zo 102 iba u 13, TAB.1, p≤0,01). Podľa typu operácií sa zistilo, že podiel pooperačných komplikácií je najnižší u postupu podľa von Langenbecka a Veau-Wardill – Kilnera , kým percentuálne najvyšší podiel pooperačných komplikácií sa pozoroval pri postupe palatoplastiky podľa Bardacha (TAB.2).

Podobne aj zriedkavejšie komplikácie sa vo vyššom percente vyskytli u skupiny s kompletným rázštepom v porovnaní s pacientmi s nekompletným rázštepom. Všetky tieto komplikácie boli zaznamenané u pacientov operovaných postupom podľa Veau-Wardill-Kilnera a to u pacientov s kompletným rázštepom 1 krát hemoragia, 2 krát dehiscinencia a tri krát uvula bifida. U pacientov s nekompletným rázštepom sa vyskytla 2 krát hemoragia a 2 krat uvula bifida.

Tab. 1. Výskyt najzávažnejších komplikácií u pacientov s nekompletným rázštepom

TYP OPERÁCIE	Počet	ONK	%	VFI	%
VWK	**79**	**2**	2,53	**4**	5,06
FW	**10**	**2**	20	-	-
vonLANG	**11**	-	-	-	-
BAR	**2**	-	-	-	-

VWK – VEAU-WARDILL-KILNER
FW – FURLOW
von LANG – von LANGENBECK
BAR – BARDACH
ONK – oronazálna komunikácia
VFI – velofaryngeálna fistula

Tab. 2. Výskyt najzávažnejších pooperačných komplikácií u pacientov s kompletným ráztepom.

TYP OPERÁCIE	Počet	ONK	%	VFI	%
VWK	**39**	**10**	25,6	**8**	20,51
FW	**2**	**1**	50	-	-
BAR	**4**	**2**	50	-	-

VWK – VEAU-WARDILL-KILNER
FW – FURLOW
BAR – BARDACH
ONK – oronazálna komunikácia
VFI – velofaryngeálna fistula

Diskusia

Analýza operačných postupov úpravy orofaciálnych rázštepov ukázala vyšší výskyt pooperačných komplikácií u skupiny pacientov s kompletným rázštepom v porovnaní s nekompletným. Avšak malé počty operovaných pacientov v niektorých typoch operácií (podľa Furlowa alebo Bardacha) v porovnaní s prístupom podľa Veau –Wardill- Kilnera nedovoľujú urobiť definitívne závery o plnej úspešnosti jednotlivých typov operácií. Viaceré predchádzajúce štúdie sa väčšinou zamerali len na porovnávanie dvoch prístupov (najčastejšie podľa Furlowa a Veau-Wardill-Kilnera) a pacienti sa hodnotili po relatívne dlhom čase (3 a viac rokov) po operácii (10, 11,12,13). Nezistili sa rozdiely medzi postupom podľa VWK a FW v pooperačných výsledkoch pri hodnotení kvality reči , vývoja funkcie Eustachovej trubice (10,11). Pri hodnotení vývoja oronasálnej fistuly (12,13, 14) sa ukázalo, že riziko vývoja je menšie po FW ako po VWK). Výsledky našich sledovaní naproti tomu ukazujú vyšší podiel oronazálych fistulí po FW v porovnaní s VWK u pacientov s nekompletným aj kompletným rázštepom. Podobne rozdielne výsledky sa pozorovali aj pri vzniku velofaryngeálnej insuficiencie (14), nakoľko sme u našich pacientov zistili vyšší podiel výskytu velofaryngealnej insuficiencie po VWK v porovnaní s FW . Ukazuje sa potrebné pokračovať v sledovaní ďalších pacientov, aby sa mohli podrobnejšie analyzovať príčiny rozdielov s niektorými doteraz publikovanými prácami.

Zoznam použitej literatúry:

1. Wehby G, Cassell CH : The impact of orofacial clefts on quality of life and health care use and costs. Oral Dis 2001; 16(1): 3-10.
2. Fedeleš J, jr., Ziak P, Krizko M, Payer J,jr, Bohac M, Palencar D, Hulin I,jr., Fedeles J : Prevalence of cleft lip and palate in western Slovakia in the years 2001-2007. Bratisl Lek Listy 2012; 113(2): 117-119.
3. Wardill WEM: The technique of operation for cleft palate. Brit J Surg 1937; 25: 117
4. Demjen Š: Chirurgia rázštepov podnebia. Modifikovaná V/W-Y palatoplastika. 1.vydanie, Martin, Osveta. 1979,
5. Furlow LT jr.: Cleft palate repair by double opposing Z-plasty. Plast Reconstr Surg 1986; 78(6): 724-736.
6. Losee JE, Kirschner RE: Comprehensive cleft care. New York, McGraw-Hill Medical. 2009, 1-1141.
7. Bardach J, Salyer JE : Surgical techniques in cleft lip and palate. Second edition. St.Louis, Mosby Year Book Inc. 1991.
8. Mainland D: Elementary medical statistics. Second edition. Philadephia, W.B. Saunders . 1963, 1-381.
9. Červenka J: Základy štatistiky. 1. vydanie. Martin, Osveta. 1975, 1-161
10. Brothers DB, Dalston RW, Peterson HD, Lawrence WT: Comparison of the Furlow double-opposing Z-palatoplasty with the Wardill-Kilner procedure for isolated clefts of the soft palate. Plast Reconstr Sur 1995; 95(6): 969-977.
11. Guneren E, Ozsoy Z, Ulay M, Eryilmaz E, Ozkul H, Geary PM:A comparison of the effects of Veau-Wardill-Kilner palatoplasty and Furlow double –opposing Z-plasty operations on eustachian tube function. Cleft Palate Craniofac J 2000; 37(3): 266-270.
12. Dong Y, Dong F, Zhang X, Hao F, Shi P, Ren G, Yong P, Guo Y: An effect comparison between Furlow double-oppozing Z- plasty and two flap palatoplasty on velopharyngeal closure. Int J Oral Maxillofac Surg 2012; 41(5): 604-611.

13. Kahraman A, Yuce S, Kocak OF, Canbaz Y, Guner SI, Atik B, Isik D: Comparison of the fistula risk associated with rotation palatoplasty and convetional palatoplasty for cleft palate repair. J Craniofac Surg 2014; 25(5): 1728-1733.
14. deGomes AJ:Comparative study von Langenbeck, Veau-Wardill-Kilner and Furlow palatoplasty technique.(in port) Arquivos de Medicina 2014; 28(2): 36-43.

43. Porovnanie presnosti vzorcov na výpočet dioptrickej sily umelej vnútroočnej šošovky pred operáciou katarakty

MUDr. Ivajlo Popov
(Oftalmológia)
Spoluautori: Veronika Labuzová

Školiteľ: Doc. MUDr. Vladimír Krásnik, PhD.
Klinika oftalmológie LFUK a UNB Ružinov

Úvod

Operácia katarakty je dnes rutinne vykonávanou operáciou. Prvé pokusy o odstránenie šedého zákalu siahajú až do starovekého Egypta. Ako počiatok modernej operácie katarakty možno považovať prvé úspešné odstránenie vlastnej zakalenej šošovky a jej náhradu umelou vnútroočnou šošovkou (UVOŠ) vyrobenej z polymetylmetakrylátu v roku 1949 Sirom Harolodom Ridleyom [1]. Výsledky tejto operácie neboli uspokojivé. S narastajúcim záujmom o operáciu šedého zákalu sa vyvíjali aj nové metódy operácie. Menila sa chirurgická technika aj umiestnenie a ukotvenie umelej vnútroočnej šošovky v ľudskom oku. Od pôvodného princípu, že pre každého pacienta je vhodná jedna štandardná šošovka sa upúšťalo a do popredia sa dostával výber umelej vnútroočnej šošovky na mieru pacientovi. Na zvolenie čo najpresnejšej optickej mohutnosti UVOŠ je nutné vedieť presné biometrické rozmery oka v optickej osi oka. Ich meranie zabezpečoval spočiatku ultrazvuk dnes sú to už modernejšie metódy využívajúce svetelnú interferometriu. Okrem biometrie oka sa postupne vyvíjali vzorce používané na výpočet vhodnej optickej mohutnosti UVOŠ, ktorá sa mala implantovať do pacientovho oka ako náhrada jeho vlastnej šošovky. Spočiatku to boli jednoduché vzorce využívajúce iba dva parametre (dĺžku oka a keratometriu rohovky), akým je napríklad SRK vzorec. Boli založené na Gulldstrandovom modeli oka. Neskôr sa pridali regresné formuly s využitím regresnej analýzy pooperačných výsledkov, akým je napríklad SRK-II, ktorý sa používa v mnohých pracoviskách až dodnes. Postupne boli pokusy o zlepšenie presnosti predpovede výpočtov pooperačnej refrakcie pacienta so zahrnutím viacerých premenných do vzorcov na kalkuláciu akými sú napríklad Hoffer-Q, Holladay-2 a iné [2]. Cieľom našej práce bolo porovnať presnosť predikcie pooperačnej refrakcie oka po implantácii UVOŠ u rôznych vzorcov, eventuálne zistiť , ktorý vzorec je najvhodnejší pre danú kalkuláciu.

Materiál a metodika

Retrospektívne sme porovnávali výsledky predikcie štyroch vzorcov používaných na našej klinike podľa doporučení vychádzajúcich z empírie. Pre každý vzorec sme použili ako vzorku 20 očí (celkovo 80 očí). Oči boli rozdelené do skupín podľa dĺžky očného bulbu (axial lenght, AL) podľa doporučení. Pre AL<22mm bol použitý vzorec Hoffer Q, pre AL 22-24,5mm bol použitý SRK-II, pre 24,5mm<AL<26mm bol použitý Holladay 2 a pre AL≥26mm bol použitý vzorec SRK-T. Všetky oči boli merané pred operáciou katarakty biometrom Lenstar LS900 vyžívajúci princíp OLCR (Optical Low-Coherence Reflectometry). Podobný princíp bol v minulosti použitý u Michelsonovho experimentu [3]. Zisťovali sme priemerný rozdiel so štandardnou odchýlkou (standard deviation, SD) medzi predpokladanou kalkulovanou pooperačnou refrakciou (vyjadrenej v sférickom ekvivalente, SE, v dioptriách [D]) a skutočnou pooperačnou refrakciou (udanou v SE). Pooperačná refrakcia bola

meraná najskôr 10. deň po operácii pomocou automatického keratorefraktometra. Rozdiely sme vyjadrili aj v absolútnych hodnotách rozdielu. Takmer v každej skupine vzorcov sa našiel jeden prípad, kde bol hore spomínaný rozdiel refrakcii nečakane vysoký (stanovili sme hranicu viac ako 4D), tzv. outlier. Spravili sme zvlášť analýzu po vyradení „outliera“ zo skupiny. Tiež sme zisťovali pre jednotlivé oči, ktorý vzorec by bol najvhodnejší pri kalkulácii, teda by dával najmenší rozdiel vypočítanej od výslednej refrakcie.

Výsledky

Rozdiely odhadovanej od reálnej pooperačnej refrakcie sú zobrazené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Rozdiely predpokladanej a reálnej pooperačnej refrakcie oka pre jednotlivé vzorce vyjadrené v sférickom ekvivalente v dioptriách [D] (SD – standard deviation, štandardná odchýlka)

Priemerný rozdiel refrakcií	Hoffer-Q	Hoffer-Q SD	SRK-II	SRK-II SD	Holladay	Holladay SD	SRK-T	SRK-T SD
S oulierom	-0,36	1,76	0,13	1,95	-0,64	1,75	-0,05	1,57
Bez ouliera	-0,63	1,21	0,41	1,46	-0,28	0,65	0,24	0,84
Absolútny s oulierom	1,15	1,36	1,03	1,65	0,54	1,63	0,93	1,24
Absolútny bez ouliera	0,94	0,98	0,81	1,29	0,54	0,44	0,68	0,52

Z Tabuľky 1 vidieť, že všetky vzorce poskytujú absolútnu odchýlku do 0,94D. Najpresnejšie výsledky pre danú dĺžku oka poskytuje vzorec Holladay a najmenej presné Hoffer-Q. U všetkých vzorcov, okrem SRK-II, je priemerná cieľová refrakcia posunutá smerom do záporných hodnôt.

Najvhodnejší vzorec pre jednotlivé oči v danej skupine je zobrazený v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Počty očí, u ktorých daný vzorce poskytoval najlepšie výsledky v jednotlivých skupinách

Skupina	Hoffer-Q	SRK-II	Holladay	SRK-T
SRK II	5	7	8	7
SRK/T	9	4	3	6
HOFFER Q	7	9	4	5
HOLLADAY	1	3	6	3

V skupine Hoffer-Q bol vzorec Hoffer-Q najpresnejší v 7 prípadoch. SRT-T by bol najpresnejší v 9 prípadoch. V skupine SRK-II bol SRK-II najpresnejší v 8 prípadoch a Hoffer Q bol v 9 prípadoch. V skupine Holladay bol vzorec Holladay najlepší v 6 prípadoch a SRK-II v 8 prípadoch. V skupine SRK-T bol vzorec SRK-T najpresnejší v 6 prípadoch a SRK-II v 7 prípadoch.

Diskusia

Neexistujú záväzné pravidlá, ktoré by určovali voľbu vzorca za danej situácie, ale je považované, že vzorec Hoffer-Q má najlepšie výsledky pri očiach s AL menšou 24,5mm, Holladay pri AL od 24,5 do 26mm a SRK-T pri AL viac ako 26mm [4]. Toto tvrdenie je podložené aj väčšou štúdiou realizovanou na 8108 kataraktách [5], avšak použitie určitého vzorca na predikciu správnej dioptrickej sily UVOŠ závisí od operatéra a skúseností na danom pracovisku.

V našom pozorovaní sme zistili, že nami zvolené vzorce pri danej AL dávali veľmi dobrú prediktívnu hodnotu pooperačnej refrakcie. Najslabšie výsledky celkovo poskytoval vzorec Hoffer-Q (avšak v svojej skupine bol druhý najlepší), ktorý sme používali očiach s AL do 22mm. Pre danú AL bol mierne lepší SRK-T, ktorý je odporúčaný pri dlhších očiach. Toto pozorovanie mohlo byť spôsobené

náhodou. Prihliadnuc na fakt, že priemerná AL v populácii je okolo 23,50mm, patria oči pod 22mm ku koncovým hodnotám na gaussovej krivke rozloženia AL v populácii, čo môže spôsobovať určité nepredvídateľné anatomické zmeny, ktoré by mohli hrať rolu v nepresnosti výpočtov, nezávisle od výberu vzorca.

Hoffer-Q bol najlepší v skupine vzorca SRK-II (použitý pre AL od 22 do 24,5mm). Pri dlhších očiach (nad 24,5mm) bol v oboch skupinách najlepší vzorec SRK-II. V Spojených štátoch amerických je odporúčané upúšťať od používania vzorca SRK-II, keďže patrí k starším a jednoduchým vzorcom, napriek tomu je v Európe stále veľmi populárny. Náš súbor ako aj iné štúdie potvrdzujú [6], že SRK-II nie je vhodné úplne ignorovať. Ozcura pozoroval najväčší hyperopický shift u vzorca SRK-II, čo je v súlade s naším zistením, avšak v ich štúdií SRK-II dával najlepšie výsledky u krátkych a stredných očí, pričom u nás boli najlepšie výsledky dosahované u dlhších oči.

Nepresnosti našej práce mohli byť spôsobené pomerne malým počtom pacientov pre jednotlivé podskupiny. Drobné zmeny refrakcie mohli nastať s postupom času pri hojení pooperačných rán v oku, čo tiež mohlo viesť k určitým nepresnostiam. Napriek tomu naša práca poskytuje spätnú kontrolu našich pooperačných výsledkov a určitý návod, ktorý vzorec použiť pri danej AL pri výpočte optickej mohutnosti UVOŠ. Z výsledkov vyplýva, že najvhodnejší vzorec pre oči kratšie ako 24,5mm je Hoffer-Q a pre oči dlhšie ako 24,5mm je SRK-II.

Zoznam použitej literatúry:

1. Apple DJ, Sims J: Harold Ridley and the invention of the intraocular lens. Survey of ophthalmology 1996, 40(4):279-292.
2. Yanoff M, Duker J: Ophthalmology, Fourth Edition: Elsevier Health Sciences; 2014.
3. Fercher AF, Mengedoht K, Werner W: Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. Optics letters 1988, 13(3):186-188.
4. Azar D: Clinical Optics: American Academy of Ophthalmology; 2015.
5. Aristodemou P, Knox Cartwright NE, Sparrow JM, Johnston RL: Formula choice: Hoffer Q, Holladay 1, or SRK/T and refractive outcomes in 8108 eyes after cataract surgery with biometry by partial coherence interferometry. Journal of cataract and refractive surgery 2011, 37(1):63-71.
6. Ozcura F, Aktas S, Sagdik HM, Tetikoglu M: Comparison of the biometric formulas used for applanation A-scan ultrasound biometry. International ophthalmology 2016, 36(5):707-712.

44. Porušená placentácia vo vzťahu k operačným výkonom na maternici

MUDr. Eva Korňanová[1]
(gynekológia a pôrodníctvo)
Spoluautor: MUDr. Jakub Daniš[1]

Školitelia: MUDr. Andrea Maľová, PhD.[1], prof. MUDr. Miroslav Borovský, CSc.[1]
I. gynekologicko-pôrodnícka klinika LFUK a UNB

Úvod

Na Slovensku, ale aj v zahraničí, sa neustále zvyšuje počet pacientok s jazvou na maternici. Medzi najčastejšie operácie na maternici patrí cisársky rez. Kým v osemdesiatych rokoch tvoril podiel cisárskych rezov na celkovom počte pôrodov u nás okolo 4,3 %, v deväťdesiatych rokoch už 10 % (1). V súčasnosti dosahuje frekvencia cisárskych rezov v Slovenskej republike približne 30 % zo všetkých pôrodov (2). Primárne cisárske rezy vedú k opakovaným cisárskym rezom v ďalšom tehotenstve. To spôsobuje zvýšenie rizika porušenej placentácie a tým aj zvýšenie rizika materskej mortality (3).

Porušená placentácia, v literatúre uvádzaná ako abnormálne invazívna placenta (AIP), predstavuje abnormálnu inváziu trofoblastu. Incidencia AIP je na Slovensku 0,37 ochorení na 1000 pôrodov (4). Za normálnych okolností preniká trofoblast iba po úroveň decidui a nepreniká cez pars basalis endometria. Podľa hĺbky invázie delíme AIP na tri podtypy: placenta accreta (75%), increta (17%) a percreta (5-7%). Pri placenta accreta preniká trofoblast cez pars basalis endometria, pri placente increta invaduje do myometria. Pri placente percreta preniká trofoblast cez serózu, pričom môžu choriové klky dosahovať aj na okolité orgány ako črevo či močový mechúr (5). Abnormálna invázia vzniká v dôsledku abnormálnej decidualizácie, pri anatomických zmenách (dolný segment maternice – pri placenta praevia, jazva po operácii na maternici) či zmenách v regulačných mechanizmoch (zvýšené počty T regulačných lymfocytov) (6). Z rizikových faktorov sú dôležité najmä spomínané operačné výkony na maternici (cisársky rez, myomektómia, inštrumentálna revízia dutiny) a placenta praevia. V literatúre je však popisovaná aj multiparita, vyšší vek rodičky, fajčenie, gravidita po in vitro fertilizácii a iné (7).

Po klinickej stránke prebieha gravidita s AIP väčšinou asymptomaticky. Podozrenie na AIP možno vyjadriť ak tehotnú s prítomnými rizikovými faktormi vyšetríme ultrasonograficky. Poväčšine je však AIP diagnostikovaná až pri pôrode pri pokusoch o manuálne vybavenie placenty, či pri život ohrozujúcom krvácaní. V týchto prípadoch po vyčerpaní konzervatívnych alternatív býva definitívnym riešením hysterektómia (5). Ultrazvuková diagnostika (USG) predstavuje v súčastnosti najspoľahlivejšiu dostupnú diagnostickú metódu AIP. Rozsiahla metaanalýza 23 štúdií na vzorke 3707 gravidít s rizikom AIP preukázala senzitivitu USG vyšetrenia 91 % pri 97% špecificite (8). Magnetická rezonancia (MR) je ideálnym diagnostickým riešením na doplnenie ultrasonografie. V metaanalýze 18 štúdií na vzorke 1010 gravidít s rizikom AIP dosiahla magnetická rezonancia senzitivitu 94% pri 84% špecificite. Magnetická rezonancia je výhodná pre svoju vysokú presnosť predikcie v hodnotení hĺbky a topografie placentárnej invázie, najmä ak je placenta lokalizovaná na zadnej stene a v prípade, ak ultrasonografia nie je konkluzívna. Nie je signifikantný rozdiel v senzitivite (p=0,24) a špecificite (p=0,91) USG a MR v diagnostike AIP (9).

Cieľom práce tejto práce je vyhodnotiť rizikovosť operačných výkonov vo vzťahu k porušenej placentácii a poukázať na možnosti včastnej diagnostiky abnormálne invazívnej placenty.

Materiál a metodika

Dáta sme získali štandardizovanými dotazníkmi, ktoré sú súčasťou projektu Slovak Obstetric Survey System (SOSS). Išlo o retrospektívnu analýzu celoštátnych dát z rokov 2012-2014. Dotazníky boli adresované všetkým 55 pôrodniciam na Slovensku v roku 2012 a 2013 a všetkým 54 pôrodniciam v roku 2014. Spätne odoslalo dotaznik 49 slovenských pôrodníc v roku 2012, 53 v roku 2013 a 45 v roku 2014. Celkovo respondovalo priemerne 89,63% pôrodníc.

Za vyhodnotené obdobie z rokov 2012-2014 bolo do súboru zaradených 91,22% slovenských pôrodov (n=149 526). U pacientok zo zistenou diagnózou AIP (n=58) boli sledované nasledovné údaje: vek pacientky, počet tehotností, vedenie pôrodu, čas diagnózy, hĺbka invázie a prítomnosť jednotlivých rizikových faktorov. Dáta boli spracované do tabuliek a grafov pomocou počítačového programu Microsoft Excel 2016. Zo štatistických metód bol použitý chí-kvadrátový test.

Výsledky

Diagnóza abnormálne invazívnej placenty sa vyskytla spolu u 0,04% pôrodov (n=58), z toho u 0,04% prípadov v roku 2012 (n_a = 22), u 0,04% prípadov v roku 2013 (n_b = 22) a u 0,03 prípadov v roku 2014 (n_c = 14).

Medián veku pacientky v čase diagnózy AIP bol 30 rokov, modus 33 rokov. Celkovo bolo 15,52% pacientok (n=9) prvorodičiek a 84,48% pacientok (n=49) viacrodičiek. Medián aj modus počtu tehotností bol 2. Pôrody boli vedené v 67,24 % prípadoch (n=39) cisárskym rezom, v 29,31% prípadoch (n=17) vaginálne a v 3,45% prípadoch (n=2) spôsob vedenia nebol uvedený.

Prenatálne bolo zistených 29,3% (n=17) prípadov AIP, z toho 22,41% (n=13) ultrasonograficky a 6,89% (n=4) pomocou magnetickej rezonancie. Počas pôrodu bolo diagnostikovaných 62,06% (n=36) prípadov AIP. U 6,89% (n=4) pacientok bol čas diagnostiky neuvedený (tabuľka 1).

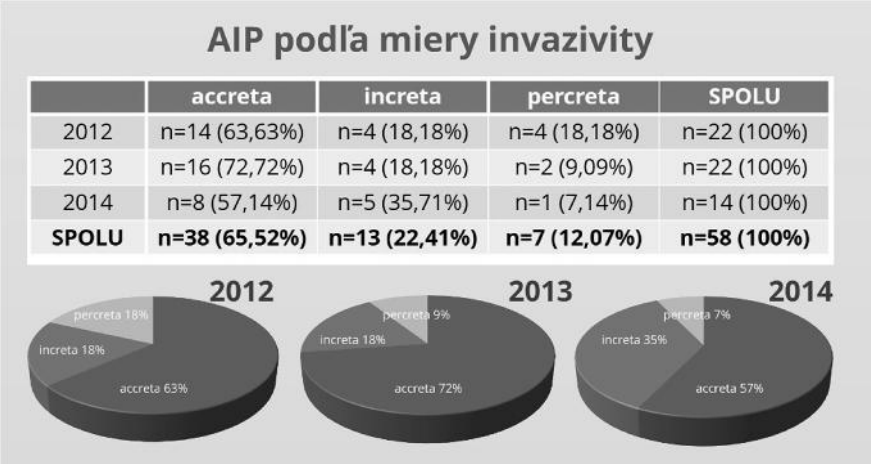
Podľa miery invázie (tabuľka 2) bolo v súbore zachytených 65,52% placenta accreta (n=38). V 22,41% prípadoch (n=13) sa jednalo o placentu incretu a v 12,07% prípadoch (n=7) o placentu percretu.

Tabuľka 1: Záchyt abnormálne invazívnej placenty na Slovensku v rokoch 2012-2014 podľa času diagnostiky (USG – ultrasonografia, MR – magnetická rezonancia)

AIP podľa času diagnostiky

	PRENATÁLNE		PERIPARTÁLNE	NEUVEDENÉ	SPOLU
	USG	MR			
2012	n=4 (18,18%)	n=0 (0%)	n=16 (72,72%)	n=2 (9,09%)	n=22 (100%)
2013	n=6 (27,27%)	n=2 (9,09%)	n=12 (54,54%)	n=2 (9,09%)	n=22 (100%)
2014	n=3 (21,43%)	n=2 (14,29%)	n=8 (57,14%)	n=0 (0%)	n=14 (100%)
SPOLU	**n=13 (22,41%)**	**n=4 (6,89%)**	**n=36 (62,06%)**	**n=4 (6,89%)**	**n=58 (100%)**

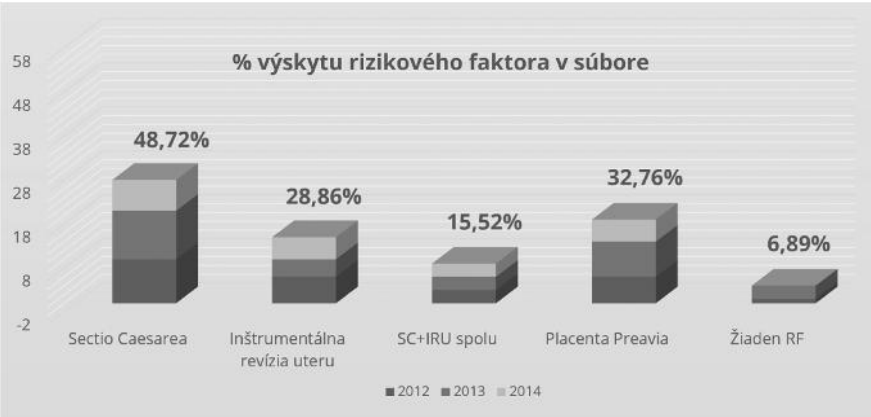
Tabuľka 2: Výskyt abnormálne invazívnej placenty na Slovensku v rokoch 2012-2014 podľa miery invazivity



	accreta	increta	percreta	SPOLU
2012	n=14 (63,63%)	n=4 (18,18%)	n=4 (18,18%)	n=22 (100%)
2013	n=16 (72,72%)	n=4 (18,18%)	n=2 (9,09%)	n=22 (100%)
2014	n=8 (57,14%)	n=5 (35,71%)	n=1 (7,14%)	n=14 (100%)
SPOLU	**n=38 (65,52%)**	**n=13 (22,41%)**	**n=7 (12,07%)**	**n=58 (100%)**

Z jednotlivých rizikových faktorov (tabuľka 3) sa u 63,79% (n=39) pacientok vyskytol cisársky rez v anamnéze, pričom u 48,72% samostatne (n=28) a u 15,52% (n=9) v kombinácii s inštrumentálnou revíziou dutiny maternice. U 28,86% pacientok (n=15) sa vyskytla v anamnéze inštrumentálna revízia maternice. Operačné výkony sa celkovo vyskytli u 89,65% prípadov (n=52). Placenta praevia bola zároveň diagnostikovaná u 32,76% (n=19) pacientok. Operačný výkon na maternici aj placenta praevia sú signifikantným rizikovým faktorom pre AIP ($p<0,00001$) testované na hladine významnosti $\alpha=0,05$. Žiaden rizikový faktor bol uvedený u 6,89% pacientok (n=4).

Tabuľka 3: Výskyt jednotlivých rizikových faktorov abnormálne invazívnej placenty na Slovensku v rokoch 2012-2014. (SC – Sectio Caesarea, IRU – inštrumentálna revízia dutiny uteru, RF – rizikový faktor)



Diskusia

Výskyt abnormálne invazívnej placenty na Slovensku aj vo svete narastá. Vďaka Slovak Obstetric Survey System sme boli schopní spracovať takmer všetky prípady abnormálne invazívnej placenty na Slovensku za obdobie 2012-2014. Výsledky z rokov 2015 a 2016 sú v štádiu spracovávania.

Výsledky nášho súboru sú v porovnaní s literatúrou približne rovnaké, avšak nájdeme aj drobné rozdiely. Abnormálne invazívna placenta postihuje aj v našom súbore aj vo svete celkovo 0,04% tehotenstiev. Z toho sa vyskytuje najčastejšie u druho- a viacrodičiek po 30 roku života. Väčšina týchto tehotenstiev je ukončená cisárskym rezom. Podľa hĺbky invázie sa však v porovnaní s literatúrou menej často vyskytla placenta accreta (65% oproti popisovaným 75%) a častejšie placenta increta (22% v našom súbore a 17% v literatúre) a percreta (12% v našom súbore a 5-7% v literatúre).

V literatúre popisované rizikové faktory sa vo vysokej miere vyskytli aj u pacientok v našom súbore. Operačný výkon na maternici signifikantne prispieva k porušenej placentácii. Riziko sa zvyšuje pri súčastnom výskyte viacerých rizikových faktorov. Našim cieľom by malo byť uvážené indikovanie operačných výkonov na maternici. Niektoré rizikové faktory uvádzané v literatúre (napr. gravidita po in vitro fertilizácii, fajčenie) neboli dotazníkom hodnotené, preto sa k tejto korelácii nemožno vyjadriť. Otáznych je aj 6,89% pacientok (n=4) so žiadnym rizikovým faktorom. Nevieme, či išlo o administratívnu chybu (nezaškrtnutie detailných otázok) alebo tieto pacientky naozaj nemali žiaden rizikový faktor pre AIP.

Oproti zahraničiu zaostávame vo včasnej (prenatálnej) diagnostike AIP. Napriek vysokej senzitivite a špecificite USG a MR je v našich podmienkach nízka záchytnosť AIP prenatálne. Väčšina prípadov AIP je diagnostikovaná peripartálne. Prenatálna diagnostika zachytila len 29% pacientok s abnormálne invazívnou placentou. Neskorá diagnostika vedie k zvýšenému riziku krvácavých komplikácii. Keďže definitívnu diagnózu určí len histologické vyšetrenie, prenatálna diagnostika má postavenie vyslovenia suspície na AIP. V tom nám môže byť nápomocná hodnotiaca tabuľka rizika AIP, ktorú vypracovala Svetová spoločnosť pre ultrazvuk v gynekológii a pôrodníctve (ISUOG) (10). Našim cieľom by malo byť redukovanie komplikácii spôsobených peripartálnou diagnostikou. Skorá diagnostika nám umožňuje naplánovať včastné ukončenie tehotenstva s multidisciplinárnym prístupom (gynekológ, onkogynekológ, anesteziológ, intervenčný radiológ, chirurg, urológ, neonatológ). Tehotné s diagnózou či vysokým rizikom AIP by mali byť sledované pracoviskom, ktoré je schopné zabezpečiť adekvátnu a komplexnú starostlivosť.

Zoznam použitej literatúry:

1. http://www.hpi.sk/2013/04/frekvencia-cisarskych-rezov-na-slovensku/
2. Korbeľ M, Némethová B, Borovský M, et al: Incidencia cisárskeho rezu v Slovenskej republike v rokoch 2007-2015. Gynekol prax 2016; 14(2): 84-90.
3. Solheim KN et al: The effect of caesarean delivery rates on the future incidence of placenta praevia, placenta accreta and maternal mortality. J. Matern Fetal Neonatal Med 2011; 24: 1341-1346.
4. Kristufkova A, Korbeľ M, Borovský M, et al: Severe maternal morbidity in the Slovak republic in the year 2012. Data from the Slovak Obstetrics Survey System. European Journal of Obstetrics & Gynecology & Reproductive Biology 2016; 206: 65.
5. Koucký M, Vráblíková H, Černý A, Calda P. Současný management abnormálně invazivní placenty – placenta accreta/increta/percreta. Actual Gyn 2016; 8: 42-47

6. Schwede S, Alfer J, von Rango U. Differences in regulatory T-cell and dendritic cell pattern in decidual tissue of placenta accreta/increta cases. Placenta 2014; 35(6): 378-85.
7. Belford MA: Placenta Accreta. Am Journ Med 2010; 203: 430–439.
8. Antonio, FD et al.: Prenatal identification of invasive placentation using ultrasound: systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol 2013; 42: 509–517
9. Antonio, FD et al.: Prenatal identification of invasive placentation using magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol 2014; 44: 8–16
10. Alfirevic, Z. et al.: Pro forma for Ultrasound reporting in suspected abnormally invasive placenta (AIP): an international consensus. Ultrasound Obstet Gynecol 2016; 47: 276–278.

45. Rozdiel v expresii cytokínov v zapálenej a nezapálenej sliznici u pacientov s nešpecifickými zápalovými ochoreniami čreva

MUDr. Zuzana Lešková
(Vnútorné lekárstvo, gastroenterológia)
Spoluautori: Anna Krajčovičová, Igor Šturdík, Tomáš Koller, Martin Huorka

Školiteľ: doc. MUDr. Tibor Hlavatý PhD.
V.Interná klinika LFUK a UNB

Úvod

Etiopatogenéza Crohnovej choroby (CD) a ulceróznej kolitídy (UC) napriek intenzívnemu výskumu nie je doposiaľ známa. Nedávne štúdie poukazujú na rozdielny cytokínový profil CD a UC rovnako aj rôzne zastúpenie imunitných buniek.
Cieľom našej štúdie bolo analyzovať expresiu mRNA zápalových, regulačných a protizápalových cytokínov rovnako aj chemokínov a ich receptorov.

Materiál a metodika

Realizovali sme prierezovú štúdiu. Súbor pacientov tvorilo 87 konzekutívnych pacientov (47 CD a 40UC) s nešpecifickými zápalovými ochoreniami čreva, sledovaných v IBD centre V. Internej kliniky LFUK a UNB. U každého pacienta sme realizovali kolonoskopické vyšetrenie, odobrali sme bioptické vzorky zo zápalenej a nezapálenej sliznice časti čreva-sigma, u pacientov s CD aj z oblasti terminalného ilea. Z biotpických vzoriek bola RNA izolovaná pomocou R-Názy Mini KiT(QIAGEN). Reverzná transkripcia bola realizovaná metodóu RT-PCR Kvantita stanovenej mRNA bola vyjadrená rozdielom PCR cyklov v porovnaní s „ house-keepingovým génom“ GADPH. Porovnali sme expresiu mRNA cytokínov v zapálenej a nezapálenej sliznici IBD pacienrov.

Výsledky

U pacientov s Crohnovou chorobou sme zaznamenali zvýšenú expresiu chemokínov CCR1(p=0,005) a IL-8 (p<0,001) v zapálenej sliznici terminálneho ilea a zníženú expresiu ligandu CCL5. Tiež u pacientov s Crohnovou chorobou sme nezaznamenali rozdiel v expresii cytokínov medzi zapálenou a nezapálenou sliznicou sigmy. Vyššiu expresiu IL-8(p=0,04), IL-23 (p= 0,019) TLR2 (p=0,002), CCR1 (p=0,007), CCR2 (0,037) , CCR5 (p□ 0,001), CD206 (p=0,011) TNF□ (p=0,002) a IL-6 (p=0,006) sme zaznamenali v zapálenej sliznici sigmy u pacientov s Ulceróznou kolitídou v porovaní s expresiou v nezapálenej sigme.

Výsledky expresie cytokínov zapálenej a nezapálenej sliznice u pacientov s Crohnovou chorobou sigma, terminálne ileum

Tabuľka č 1: Rozdiel expresie cytokínov u pacientov s CD (sigma)

	rozdiel (Z-NZ)	Štandardná odchýlka	p		rozdiel (Z-NZ)	Štandardná odchýlka	p
IL8	1,049	2,363	0,152	CCR1	0,679	2,546	0,375
IL12	-0,1053	1,417	0,802	CCR2	0,476	2,521	0,527
IL23	0,359	1,962	0,539	CCR5	0,221	1,596	0,64
TLR2	1,039	2,405	0,162	CCR9	-0,1395	1,701	0,782
TLR4	-0,138	1,453	0,747	IL17	-0,476	1,352	0,248
TLR5	0,018	1,227	0,96	IL10	0,072	2,078	0,906
CD207	-0,623	1,477	0,172	CD2	0,005	1,269	0,99
Foxp3	0,3	1,837	0,583	TNF	0,341	1,71	0,504
CCL5	-0,104	1,011	0,727	IL6	0,335	2,723	0,678

rozdiel : výsledna hodnota rozdielu v medzi expresiou mRNA cytokínov v zapálenej a nezapálenej črevnej sliznici IBD pacientov

Tabuľka 2: Rozdiel expresie cytokínov u pacientov s CD (terminálne ileum)

	rozdiel	Štandardná odchýlka	P		rozdiel	Štandardná odchýlka	P
IL8	3,207	2,515	<0.001	CCR1	1,478	1,862	0,005
IL12	-1,046	3,208	0,198	CCR2	0,32	2,59	0,617
IL23A	0,796	2,937	0,28	CCR5	-0,021	1,691	0,96
TLR2	0,636	2,047	0,218	CCR9	0,064	2,674	0,922
TLR4	-0,435	2,373	0,461	IL17A	-0,803	3,658	0,379
TLR5	-0,481	2,089	0,356	IL10	0,688	2,421	0,259
CD207	-1,068	2,236	0,066	CD206	0,303	1,649	0,459
Foxp3	0,692	1,817	0,136	TNF	0,0428	2,258	0,445
CCL5	-1,32	2,095	0,02	IL6	1,427	4,052	0,166

rozdiel : výsledna hodnota rozdielu v medzi expresiou mRNA cytokínov v zapálenej a nezapálenej črevnej sliznici IBD pacientov

Výsledky expresie cytokínov u pacientov s ulceróznou kolitídou v zapálenej a nezapálenej sliznici (sigma)

Tabuľka 3: Rozdiel v exresii cytokínov u pacientov s UC (sigma)

	rozdiel	*Štandardná odchýlka*	*P*		*rozdiel*	*Štandardná odchýlka*	*P*
IL8	4,611	4,471	0,004	CCR1	2,124	2,198	0,007
IL12	0,305	1,464	0,486	CCR2	1,299	1,9	0,037
IL23A	2,124	2,668	0,019	CCR5	1,579	1,006	0,001
TLR2	2,687	2,38	0,002	CCR9	-0,51	1,204	0,17
TLR4	-0,286	1,644	0,558	IL17A	0,31	1,831	0,569
TLR5	0,23	0,691	0,273	IL10	1,864	2,017	0,008
CD207	-0,511	1,589	0,289	CD206	0,833	0,95	0,011
Foxp3	2,373	1,708	0,001	TNFa	1,843	1,529	0,002
CCL5	-0,221	0,862	0,393	IL6	2,688	2,748	0,006

rozdiel : výsledna hodnota rozdielu v medzi expresiou mRNA cytokínov v zapálenej a nezapálenej črevnej sliznici IBD pacientov

Diskusia

IL-8, chemoatraktant pre neutrofily, je dôležitý cytokín v iniciácií zápalu a tvorbe ulcerácií. Jeho zvýšená expresia bola zaznamenaná v zapálenej sliznici IBD pacietov, predovšetkým v bioptických vzorkách ulceróznej sliznice (1, 2, 3).

Expresia chemokínovych receptorov CCR1, -2, -5, -6 súvisi s nahromadením antigén prezentujúcich buniek (makrofágy,dendritické bunky) v zapálenej sliznici IBD pacientov (4, 5).

Nadmerná expresia TLR2 (Toll like receptor, TLR) zrejme súvisí s nadmernou tvorbou TNF□ (6, 7), podobne ako v nami dosiahnutých výsledkach.

U pacientov s CD v bioptických vzorkách v oblasti sigmy sme nezaznamenali rozdiel v expresii cytokínov medzi zapálenou a nezapálenou sliznicou. Podobné výsledky zaznamenali aj v štúdií expresii prozápalových cytokínov v mukóze IBD pacientov, pravdepodobne to súvisi s mikroskopicky prebiehajúcim zápalom v makroskopicky nezapálenej sliznici (8).

Zoznam použitej literatúry:

1. Zhu F, Wang X, Liu S: Expressions and significance of CXC chemokine receptor type 2 and interleukin-8 in patients with inflammatory bowel disease, 2016, DOI: 10.3969/j.issn.1008-7125.2016.06.003
2. Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P: Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. Gut. 1996;38(1):90-98
3. Izutani R, Loh E, Reinecker et al: Increased expression of interleukin-8 mRNA in ulcerative colitis and Crohn's disease mucosa and epithelial cells. TOC. 1995 1,1: 37-47

4. Banks C, Bateman A, Payne R: Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. J Pathol. 2003 Jan;199(1):28-35.
5. Danese S, Gasbarrini A. Chemokines in inflammatory bowel disease. Journal of Clinical Pathology. 2005;58(10):1025-1027
6. Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, et al. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950). 2001;166(1):15-9.
7. Ozinsky A, Smith KD, Hume D, Underhill DM. Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. Journal of endotoxin research. 2000;6(5):393-6
8. Velikova T, Kyurchkiev D, Spassova Z: Alterations in cytokine gene expression profile in colon mucosa of Inflammatory Bowel Disease patients on different therapeutic regimens. Cytokine. 2017 Jan 12; 92:12-19.

46. Skríning sluchu novorodencov, včasná diagnostika a rehabilitácia porúch sluchu

MUDr. Lívia Majerníková[1]
(otorinolaryngológia)
Spoluautor: MUDr. RNDr. Lukáš Varga, PhD.[1]

Školiteľ: doc. MUDr. Zuzana Kabátová, CSc.[1]
[1]Klinika otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LF UK a UNB

Úvod

Univerzálny skríning sluchu novorodencov je prvým krokom k identifikácii porúch sluchu u detí. V Slovenskej republike je povinný od 1. mája 2006. Je riadený Odborným usmernením pre včasnú diagnostiku poruchy sluchu u novorodencov a detí (č. 53) uverejneným vo Vestníku MZ SR v roku 2006 (ročník 54, čiastka 24-27).

Incidencia vrodených porúch sluchu na Slovensku je 3-4/1000 fyziologických novorodencov. U novorodencov s určitými rizikovými faktormi (porucha sluchu v rodine, ochorenia matky v gravidite, užívanie ototoxických liekov, nízky gestačný vek, nízka pôrodná hmotnosť, asfyxia, infekcia novorodenca, pôrodná trauma hlavy, dlhodobá ventilácia, ťažká hyperbilirubinémia, rôzne syndrómy) je výskyt poruchy sluchu až hluchoty v porovnaní s celkovou populáciou novorodencov vyšší.

Včasná diagnostika a rehabilitácia vrodených porúch sluchu je založená na formule 1 – 3 – 6 mesiacov: zistenie poruchy sluchu, stanovenie stupňa poruchy sluchu do tretieho mesiaca, definitívna diagnóza s prvou intervenciou do 6 mesiacov veku. Povinnosťou lekára (neonatológa, otorinolaryngológa), ktorý identifikuje dieťa s poruchou sluchu je oznámiť údaje o dieťati do Centrálneho registra porúch sluchu.

Materiál a metodika

Retrospektívne sme analyzovali súbor 3 096 novorodencov narodených v Nemocnici sv. Cyrila a Metoda UNB v roku 2016, ktorí mali vyšetrený sluch pomocou objektívnej audiologickej vyšetrovacej metódy – meraním otoakustických emisií (OAE) v rámci novorodeneckého skríningu sluchu pred prepustením z novorodeneckého oddelenia.

Sledovali sme detí, ktoré neprešli novorodeneckým skríningom (neprítomné OAE, aj jednostranne) až do stanovenia diagnózy podľa odporúčanej formuly 1 – 3 – 6 (mesiacov). Analyzovali sme výskyt rizikových faktorov ako príčinu poruchy sluchu.

Výsledky

V roku 2016 novorodeneckým skríningom neprešlo 250 detí narodených v Nemocnici sv. Cyrila a Metoda UNB, čo predstavuje 8,0 % zo všetkých narodených detí v tejto nemocnici. Z týchto novorodencov 56,3 % malo rizikové faktory z hľadiska poruchy sluchu. 95,2 % detí, ktoré neprešli novorodeneckým skríningom malo opakovane urobené vyšetrenie OAE do jedného mesiaca. Z opakovane vyšetrených detí sme poruchu sluchu predpokladali u 24,3 % detí. Ďalšími objektívnymi vyšetreniami pre určenie poruchy sluchu BERA (Brainstem Evoked Response Audiometry) alebo ASSR

(Auditory Steady State Response) bola diagnostikovaná trvalá porucha sluchu u 21 detí. Jednostranná porucha sluchu: ľahká – 6 detí, stredne ťažká – 1 dieťa, ťažká – 1 dieťa. Obojstranná porucha sluchu: ľahká – 2 detí, stredne ťažká – 5 detí, ťažká – 6 detí. V diagnostickom procese je ešte 17 detí. U 20 detí ďalšie vyšetrenia preukázali normálny sluch. Analýza výskytu rizikových faktorov nie je ukončená vzhľadom na predbežné výsledky.

Diskusia

Závažné vrodené alebo pre- a perinatálne získané poruchy sluchu vedú k oneskoreniu psychomotorického vývoja postihnutého dieťaťa. Skríning sluchu je pre nepočujúce dieťa šancou na lepšie, rýchlejšie a úplnejšie odstránenie problémov, ktoré mu prináša porucha sluchu.

Na základe literárnych údajov z tisíc narodených detí sa jedno narodí hluché a približne 3 sa narodia s menšou poruchou sluchu (1). V našom súbore skrínovaných detí doposiaľ zaznamenávame horšie výsledky ako udávajú literárne zdroje.

Podstatne závažnejšia situácia nastáva pri falošne negatívnych nálezoch, t.j. u detí s poruchou sluchu, ktoré splnili skríningové kritéria pri prvom vyšetrení a tým sa vylúčili z ďalšieho sledovania. Poruchu sluchu u týchto detí s falošne negatívnymi nálezmi pri skríningu sluchu môžu odhaliť iba poučení a pozorní rodičia, prípadne pediater.

Včasnou diagnostikou a rehabilitáciou poruchy sluchu sme schopní sluchovo postihnutým deťom výrazne zlepšiť rečové schopnosti.

Zoznam použitej literatúry

1. Jakubíková J, eds. Detská audiológia, Bratislava, SAP. 2006, 1-196
2. Kabátová Z, eds. Audiológia, Praha, Grada. 2012, 1-362

47. Detekcia markerov oxidačného stresu v slinách pacientov s autoimunitnými ochoreniami ústnej dutiny a gastrointestinálneho traktu

Katarína Janšáková [1]
Michael Escudier [2], Gordon Proctor [3]

Školiteľ: RNDr. Ľubomíra Tóthová, PhD.
[1] Ústav molekulárnej biomedicíny Lekárska fakulta UK Bratislava SLovesnako; [2] Oddelenie orálnej medicíny a patológie Guy's a St. Thomas' NHS Foundation Trust a King's College Londýn Spojené Kráľovstvo; [3] Mukózne a salivárne oddelenie, Dentálny Inštitút, King's College Londýn Spojené Kráľovstvo

Úvod

Crohnova choroba (CD) ako aj orofaciálna granulomatóza (OFG) predstavujú chronické, zápalové a autoimunitné ochorenia pretrvávajúce celý život. Crohnova choroba môže postihnúť ktorúkoľvek časť gastrointestinálneho traktu, od ústnej dutiny až po konečník, pričom postihuje všetky jeho vrstvy (1). Medzi hlavné symptómy Crohnovej choroby patrí abdominálna bolesť, hnačka, krvácanie či strata hmotnosti (2). Naproti tomu, OFG predstavuje chronický granulomatózny zápal úst a tváre. OFG je charakteristická opuchom pier, úst a ich okolí, ulceráciami a prítomnosťou granulómov v sliznici úst (3, 4). Toto ochorenie je v mnohých prípadoch asociované s rôznymi inými systémovými ochoreniami ako napr. s CD (5), sarkoidózou (6) alebo Melkersson-Rosethalovým syndrómom (7). Zistilo sa, že CD a OFG sú si v mnohom podobné a mnoho pacientov s Crohnovou chorobou máva zápalom postihnuté aj ústa (3). Poškodenie, ktoré je prítomné v ústach pacientov s CD sa nenachádza vždy v rovnakej oblasti ako u pacientov s OFG avšak vyznačuje sa rovnakou histológiou (8). Etiológia oboch ochorení nie je známa, avšak podstatnú úlohu zohráva imunitná odpoveď podnecujúca zápal a s ním asociovaný oxidačný stres (9-11). Oxidačný stres predstavuje nerovnováhu medzi tvorbou voľných radikálov a aktivitou antioxidačných mechanizmov (12). Diagnostika CD ako aj OFG predstavuje dlhotrvajúci proces, ktorému v mnohých prípadoch predchádza zhoršenie stavu pacienta. V prípade CD sa jedná o invazívne kolonoskopické vyšetrenie čreva, prípadne enteroskopia počas ktorej dochádza k odoberaniu vzorky na histologické vyšetrenie (13-15). Určenie diagnózy pre OFG predchádza vylúčenie iných, vyššie spomínaných ochorení asociovaných s OFG. Pacienti štandardne podstupujú ultrasonografické vyšetrenie a biopsiu postihnutej oblasti (16). Nové biomarkery daných ochorení sú nevyhnutné pre včasné určenie diagnózy a pre monitorovanie progresie daného ochorenia. Viacero štúdií sa zaoberalo analýzou zápalových parametrov a markerox oxidačného stresu u pacientov s CD. Said et al. pozoroval zvýšené koncentrácie , IL – 1β, TNF - α a IgA v slinách týchto pacientov v porovnaní s kontrolnými jedincami (17). Iná štúdia pozorovala nárast koncentrácie týchto markerov iba v slinách pacientov počas relapsu, a nie u pacientov v remisii (18). Nielsen et al. pozoroval zvýšenú koncentráciu IL – 6 v sline CD pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou (19). Jediná štúdia, ktorá sa zaoberala markermi v slinách pacientov s OFG a pacientov s OFG spolu s CD bola publikovaná skupinou Savage et al. (20). Táto štúdia poukázala na zvýšenú koncentráciu salivárneho imunoglobulínu A u pacientov s OFG a OFG spolu s CD. Avšak toto zvýšenie nebolo pozorované u CD pacientov. V rámci analýzy markerov oxidačného stresu Rezaie et al. pozorovali

vyššiu koncentráciu oxidu dusičnatého, markerov peroxidácie lipidov a zároveň zníženú hladinu celkovej antioxidačnej kapacity, albumínu a kyseliny močovej v slinách pacientov s CD v porovnaní so zdravými jedincami (21). Doposiaľ neexistujú štúdie, ktoré by sa zaoberali markermi oxidačného stresu v slinách pacientov s OFG, prípadne pacientov s OFG spolu s CD. Preto cieľom tejto štúdie bola analýza markerov oxidačného stresu, antioxidačného statusu a vybraných zápalových markerov oxidačného stresu v slinách pacientov s OFG, CD a OFG spolu s CD a ich porovnanie so zdravými kontrolami.

Materiál a metodika

Pacienti (n=93) boli rozdelení do skupín na základe im prislúchajúcej diagnózy a zdravé kontroly. Nestimulovaná celková slina bola odoberaná počas 10 minút od pacientov s orofaciálnou granulomatózou (OFG), pacientov s Crohnovou chorobou (CD), pacientov s orofaciálnou granulomatózou spolu s Crohnovou chorobou (OFG+CD) a zdravých kontrol (CTRL). Exklúznym kritériom bola prítomnosť iného systémového ochorenia alebo orálneho ochorenia (napr. periodontitída) a akútneho ochorenia (napr. chrípka, nachladnutie, infekcie urogenitálneho traktu a iné). Počas odoberania vzoriek sa všetci pacienti nachádzali v remisii. Všetci participanti boli požiadaní, aby nekonzumovali žiadne jedlo a nápoje minimálne 30 minút pred samotným odberom.

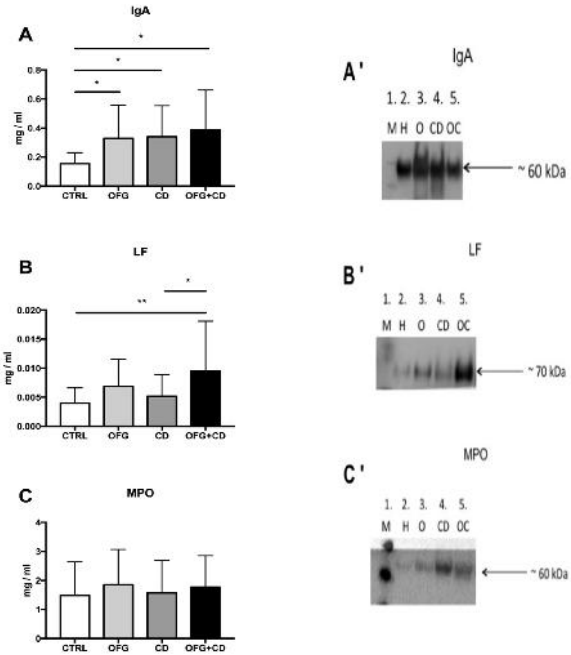
Vo všetkých získaných vzorkách bol zaznamenaný tzv. „salivary flow“ čiže objem salivácie za daný čas. Vo všetkých vzorkách bola stanovená koncentrácia proteínov s použitím komerčne dostupného kitu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Zároveň boli vo všetkých vzorkách analyzované zápalové markery prostredníctvom ELISA metód, a to: imunoglobulín A (IgA; Dako Agilent Pathology Solutions, Sant Clara, CA, USA), laktoferín (LF, Abcam, Cambridge, UK) a myeloperoxidázu (MPO, DuoSet ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, USA). Prítomnosť spomínaných proteínov vo vzorkách bola potvrdená aj western blot analýzou. Následne, boli analyzované markery oxidačného stresu – oxidácia proteínov (AOPP – advanced oxidation protein products), peroxidácia lipidov (TBARS – thiobarbituric acid reactive substances), antioxidačný status – celková antioxidačná kapacita (TAC – total antioxidant capacity), látky redukujúce železitý kation (FRAP – ferric reducing antioxidant power) a karbonylový stres reprezentovaný markerom - koncové produkty pokročilej glykácie (AGEs – advanced glycation end products).

Výsledky boli spracované prostredníctvom štatistického softvéru GraphPad Prism 7.0. Všetky dáta boli porovnávané použitím one – way ANOVA a Tukey post hoc testu. Za štatisticky významný výsledok bola považovaná hodnota P = 0,05. Výsledky sú prezentované ako priemer ± štandardná odchýlka.

Výsledky

Signifikantne najnižší objem salivácie bol pozorovaný u CD skupiny v porovnaní s CTRL skupinou (P = 0,009). Žiadne signifikantné rozdiely neboli pozorované medzi OFG a OFG+CD v porovnaní s CTRL skupinou (P = 0,60 and P = 0,34). Koncentrácia proteínov v sline bola signifikantne nižšia u CTRL v porovnaní s OFG (P = 0,009) a OFG+CD (P = 0,008) skupinou. Detailne sú výsledky prezentované v tabuľke č.1.

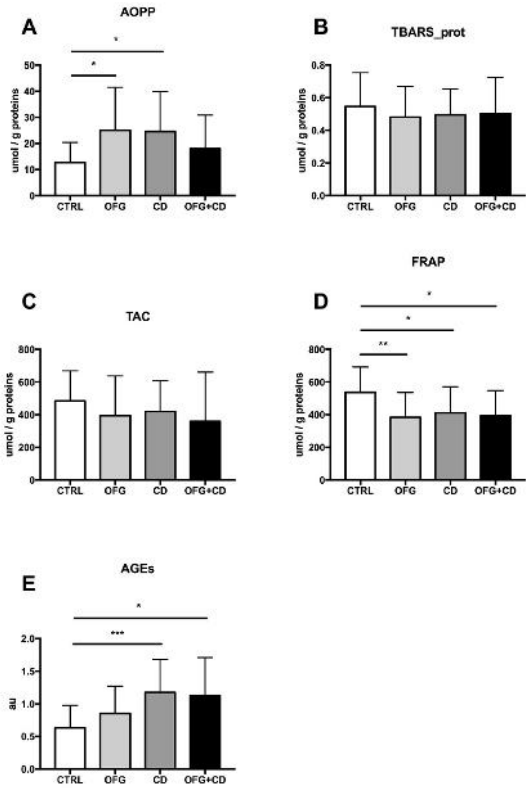
Koncentrácia IgA (Obr. 1 A) bola signifikantne vyššia u všetkých experimentálnych skupín v porovnaní s CTRL skupinou (OFR, P = 0,03; CD, P = 0,01 and OFG+CD, P = 0,01). Meranie koncentrácie LF (Obr. 1 B) v slinách ukázalo signifikantný rozdiel medzi CTRL a OFG+CD skupinou kde vyššie hodnoty boli pozorované u OFG+Cd skupiny (P = 0,009). Signifikantný rozdiel bol pozorovaný aj medzi CD a OFG+CD skupinami (P = 0,05). Analýza MPO (Obr. 1 C) vo vzorkách slín neukázala žiadne rozdiely medzi skupinami (P = 0,68). Prostredníctvom western blot metódy boli úspešne detekované všetky cieľové proteíny vo veľkosti, aká bola uvedená výrobcom protilátok. Molekulová veľkosť pre IgA (Obr 1 A') predstavovala 60 kDa, pre LF (Obr 1 B') 70 kDa a pre MPO (Obr 1 C') 60 kDa ako bolo uvedené podľa výrobcu protilátok.



Obr. 1: Obrázok ukazujúci analýzu zápalových markerov A) IgA, B) LF, C) MPO ELISA metódou a ich detekciu prostredníctvom western blotu A') IgA, B') LF a C') MPO; M – marker molekulovej veľkosti, IgA – imunoglobulín A, LF – laktoferín, MPO – myeloperoxidáza, CTRL – kontrolni jedinci, OFG – orofaciálna granulomatóza, CD – Crohnova choroba, OFG+CD – pacienti s orofaciálnou granulomatózou spolu s Crohnovou chorobou; * predstavuje P < 0,05 a ** predstavuje P < 0,01; výsledky sú uvedené ako priemer ±

Tab. 1: Porovnanie objemu salivácie a proteínovej koncentrácie v slinách pacientov a kontrolných jedincov; CTRL – kontrolni jedinci, OFG – orofaciálna granulomatóza, CD – Crohnova choroba, OFG+CD – pacienti s orofaciálnou granulomatózou spolu s Crohnovou chorobou; výsledky súuvedené ako priemer ±

	CTRL	OFG	CD	OFG+CD
objem salivácie (ml / min)	0,58 ±0,24	0,47±0,29 **P = 0,60**	0,33±0.20 **P = 0,009**	0,41±0,37 **P = 0,34**
koncentrácia proteínov (mg / ml)	1,28±0,27	1,94±0,91 **P = 0,009**	1,74±0,58 **P = 0,11**	2,07±0,96 **P = 0,008**



Obr. 2: Grafy zobrazujúce analýzu markerov oxidačného stresu A) AOPP, B) TBARS, C) TAC, D) FRAP a karbonylového stresu E) AGEs.

AOPP – marker oxidácie proteínov, TBARS – marker peroxidácie lipidov, TAC – celková antioxidačná kapacita, FRAP – marker antioxidačného statusu, CTRL – kontrolni jedinci, OFG – orofaciálna granulomatóza, CD – Crohnova choroba, OFG+CD – pacienti s orofaciálnou granulomatózou spolu s Crohnovou chorobou; * predstavuje P < 0,05; ** predstavuje P < 0,01 a *** predstavuje P < 0,001; výsledky sú uvedené ako priemer ±

Meranie markerov oxidácie proteínov AOPP (Obr. 2 A) ukázalo signifikantne vyššie hodnoty u OFG a CD skupín v porovnaní s CTRL skupinou (P = 0,02 a P = 0,02). Analýza peroxidácie lipidov prostredníctvom TBARS (Obr. 2 B) nepreukázala žiadne signifikantné rozdiely medzi skupinami (P = 0,65). Antioxidačný status reprezentovaný TAC (Obr. 2 C) neodhalil žiadne signifikantné rozdiely medzi pozorovanými skupinami (P = 0,42). Naproti tomu analýza FRAP (Obr. 2 D) ukázala signifikantne zníženú koncentráciu v slinách všetkych experimentálnych skupín v porovnaní s CTRL skupinou (OFG, P = 0,005; CD, P = 0,03 and PFG+CD, P = 0,04). Meranie markeru karbonylového stresu AGEs odhalilo signifikantne vyššie koncentrácie v slinách pacientov s CD a OFG+CD v porovnaní s CTRL skupinou (P < 0,001 a P = 0,01)

Diskusia

Doposiaľ bola publikovaná iba jediná štúdia zaoberajúca sa slinami u pacientov s OFG a OFG+ CD (20). V tejto štúdii sa zaoberali rovnako analýzou IgA pričom bola nájdená zvýšená koncentrácia tohoto markeru v slinách pacientov s OFG ako aj OFG+CD. V našej štúdii sme pozorovali zvýšenú hladinu IgA rovnako aj u pacientov s CD. Pravdepodobne aj slinné žľazy sú zapojené do patogenézy gastrointestinálnych ochorení nakoľko bola nájdená aj vyššia koncentrácia proteínov v sline týchto pacientov čo naznačuje zápal prítomný v samotných žľazách. Napriek tomu, že pacienti s CD nemali signifikantne vyššiu koncentráciu proteínov pozorovali sme trend v porovnaní s kontrolnou skupinou. OFG sa v rámci analýz doposiaľ nevenovala veľká pozornosť a publikované štúdie boli prioritne zamerané na terapiu daných pacientov a v rámci „case report studies“ na ich diagnostiku vo všeobecnosti (7, 16). Výsledky získané z týchto štúdií poukazujú aj na potencionálne rozdiely medzi OFG a CD ochorením. Tento rozdiel môžeme pozorovať napr. v prípade LF, kde vyššie hodnoty pozorujeme u pacientov s OFG a OFG+CD, čo môže jasne naznačovať prítomnosť prakticky permanentného zápalu okrem sliznice úst aj v slinných žľazách u pacientov s OFG patológiou. Naproti tomu analýza markeru karbonylového stresu AGEs poukázala na prioritné zainteresovanie CD. Rezaie et al. pozoroval zvýšenú koncentráciu peroxidácie lipidov a zníženú koncentráciu markeru TAC, albumínu ako aj kyseliny močovej v sline pacientov s CD oproti zdravým kontrolám (21). V našej štúdii marker TBARS ako zástupca perixodácie lipidov a TAC ako marker antioxidačného statusu ostali nezmenené a nebol pozorovaný žiaden rozdiel medzi analyzovanými skupinami.

Štúdie zamerané na analýzu markerov oxidačného stresu a antioxidačného statusu sa v rámci analýzy plazmy navzájom odlišujú. Tüzün et al. nepozoroval žiadne rozdiely v koncentrácii malondialdehydu, markera peroxidácie lipidov medzi CD pacientmi a zdravými kontrolami (22). Naproti tomu Maor et al. pozorovali zvýšene koncentrácie TBARS merané však počas relapsu pacientov ako aj antioxidačného statusu analyzovaného prostredníctvom β - karoténu (23).

Táto štúdia poukazuje na veľký potenciál sliny ako diagnostickej tekutiny. V budúcnosti by bolo vhodné rozšíriť spektrum analyzovaných markerov napr. o zápalové cytokíny. Výsledky našich analýz potvrdili prítomnosť zápalu v slinách spomínaných pacientov no napriek tomu analýzy sprevádzala zvýšená variabilita. V budúcnosti sú potrebné štúdie, ktoré by sa zaoberali zdrojom tejto variability čoho výsledkom by boli presnejšie analýzy.

Zoznam použitej literatúry:

1. Aguirre A, Nugent CA. Images in Clinical Medicine: Oral Manifestation of Crohn's Disease. The New England journal of medicine. 2015;373(13):1250.

2. Griffiths AM. Specificities of inflammatory bowel disease in childhood. Best practice & research Clinical gastroenterology. 2004;18(3):509-23.
3. Sawczenko A, Sandhu BK. Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. Arch Dis Child. 2003;88(11):995-1000.
4. Grave B, McCullough M, Wiesenfeld D. Orofacial granulomatosis--a 20-year review. Oral diseases. 2009;15(1):46-51.
5. Patel P, Brostoff J, Campbell H, Goel RM, Taylor K, Ray S, et al. Clinical evidence for allergy in orofacial granulomatosis and inflammatory bowel disease. Clinical and translational allergy. 2013;3(1):26.
6. Joshipura V, Mahantesha S, Subbaiah SK, Lakkasetty YT. A rare case of primary orofacial granulomatosis of gingiva during pregnancy. Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP. 2015;19(3):408.
7. Elias MK, Mateen FJ, Weiler CR. The Melkersson-Rosenthal syndrome: a retrospective study of biopsied cases. Journal of neurology. 2013;260(1):138-43.
8. Marcoval J, Penin RM. Histopathological Features of Orofacial Granulomatosis. The American Journal of dermatopathology. 2016;38(3):194-200.
9. Niewiadomski O, Studd C, Wilson J, Williams J, Hair C, Knight R, et al. Influence of food and lifestyle on the risk of developing Inflammatory Bowel Disease. Internal medicine journal. 2016.
10. Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. Cell. 2008;134(5):743-56.
11. Catarzi S, Favilli F, Romagnoli C, Marcucci T, Picariello L, Tonelli F, et al. Oxidative state and IL-6 production in intestinal myofibroblasts of Crohn's disease patients. Inflamm Bowel Dis. 2011;17(8):1674-84.
12. Tothova L, Kamodyova N, Cervenka T, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2015;5:73.
13. Kovacs M, Muller KE, Arato A, Lakatos PL, Kovacs JB, Varkonyi A, et al. Diagnostic yield of upper endoscopy in paediatric patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Subanalysis of the HUPIR registry. Journal of Crohn's & colitis. 2012;6(1):86-94.
14. Meuwis MA, Vernier-Massouille G, Grimaud JC, Bouhnik Y, Laharie D, Piver E, et al. Serum calprotectin as a biomarker for Crohn's disease. Journal of Crohn's & colitis. 2013;7(12):e678-83.
15. Kato J, Hiraoka S, Nakarai A, Takashima S, Inokuchi T, Ichinose M. Fecal immunochemical test as a biomarker for inflammatory bowel diseases: can it rival fecal calprotectin? Intestinal research. 2016;14(1):5-14.
16. Rangdhol RV, Madhulika N, Dany A, Jeelani S, Asokan GS. Idiopathic orofacial granulomatosis - a diagnostic and treatment challenge. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR. 2014;8(11):ZD07-10.
17. Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, et al. Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes. 2014;21(1):15-25.

18. Szczeklik K, Owczarek D, Pytko-Polonczyk J, Kesek B, Mach TH. Proinflammatory cytokines in the saliva of patients with active and non-active Crohn's disease. Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej. 2012;122(5):200-8.
19. Aleksandra Nielsen A, Nederby Nielsen J, Schmedes A, Brandslund I, Hey H. Saliva Interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease. Scandinavian journal of gastroenterology. 2005;40(12):1444-8.
20. Savage NW, Barnard K, Shirlaw PJ, Rahman D, Mistry M, Escudier MP, et al. Serum and salivary IgA antibody responses to Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans and Streptococcus mutans in orofacial granulomatosis and Crohn's disease. Clinical and experimental immunology. 2004;135(3):483-9.
21. Rezaie A, Ghorbani F, Eshghtork A, Zamani MJ, Dehghan G, Taghavi B, et al. Alterations in salivary antioxidants, nitric oxide, and transforming growth factor-beta 1 in relation to disease activity in Crohn's disease patients. Annals of the New York Academy of Sciences. 2006;1091:110-22.
22. Tuzun A, Erdil A, Inal V, Aydin A, Bagci S, Yesilova Z, et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. Clinical biochemistry. 2002;35(7):569-72.
23. Maor I, Rainis T, Lanir A, Lavy A. Oxidative stress, inflammation and neutrophil superoxide release in patients with Crohn's disease: distinction between active and non-active disease. Digestive diseases and sciences. 2008;53(8):2208-14.

48. Postural reactions to visual scene movements in senior patients with instability and cognitive impairment (preliminary study)

MUDr. Martin Kucharík[1,2]
Spoluautori: MUDr. Marián Šaling, CSc. [2,3], Ing. Jozef Púčik, PhD. [4], Ing. Tomáš Lukáč[4]

Školiteľ: MUDr. Marián Šaling, CSc.
[1]National Institute of Cardiovascular Diseases, Bratislava, Slovakia; [2]Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia; [3]2nd Department of Neurology, Faculty of Medicine, Comenius University and University Hospital , Bratislava, Slovakia; [4]Institute of Electronics and Photonics, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia

Introduction

Upright posture is complicated task for human body and is defined as assessment of vertical vector of human body in gravitational force. It involves neural (somatosensoric), vestibular and visual input and multiple level integration by central nervous system – which engages cortical structures, basal ganglia, cerebellum and brainstem. During human ageing, most body structures undergo involution, that results in lower effectiveness and dynamics of musculoskeletal system, lower sensitivity of sensory systems with higher thresholds and impaired resolution [1]. Significant age-related changes also occur in central nervous system [2].

There is increasing proportion of elderly people in our population. Dysequilibrium of upright posture is very common in senior patients, even more frequent in patients with cognitive impairment [1-4]. Vertigo is one of the most frequent symptoms among senior patients (>65 year), frequently resulting in instability of posture and gait. The instability of stance may often results in falls and serious injuries [3]. More than 30% of elderly have a history of fall at least one a year. The uncertainty of upright stance has also physical but also psychological consequences – restriction of walks and fear of falls often often results in dependence to other persons and lower quality of life.

Seniors with cognitive impairment form a group with severe posture impairment. Falls occur with double frequency in demented seniors when compared to age matched seniors without cognitive impairment. Study involving 2000 demented seniors reports weekly occuring falls in 10% of studied group [5]. At least one fall a year is reported in 70-80% of demented seniors [6].

The purpose of present experiment was to investigate whether and how the visual scene movements affect undisturbed upright stance control in healthy elderly and demented patients with instability. Visual scene movements induce visual illusion of self-movement (vection) and subjects have to correctly evaluate the contents of visual information [7]. We supposed that elderly patients with cognitive impairment have decreased ability to adapt to illusion movements. There is also high probability, that processes of re-weighing sensory inputs in elderly patients with cognitive impairment are seriously impaired.

Materials and methods

Six healthy elderly subjects (3 males, 3 females; mean age 76 years, SD=10,2) and twelve elderly patients (6 males, 6 females; mean age 78 years, SD=3,8) with Alzheimer or vascular dementia took part in experiments. Centre of pressure (CoP) displacements were recorded using force platform. Participants stood quietly on the platform at a distance of 50 cm from the wide-screen visual scene display. The quite stance in duration of 50 seconds was perturbed by constant linear or rotational visual scene motion (duration 20 seconds). Visual scene motion induced body leaning either forward-backwards or right-left in relation to direction of visual scene motion. Detailed explanation of method and measurement analysis is also available [7].

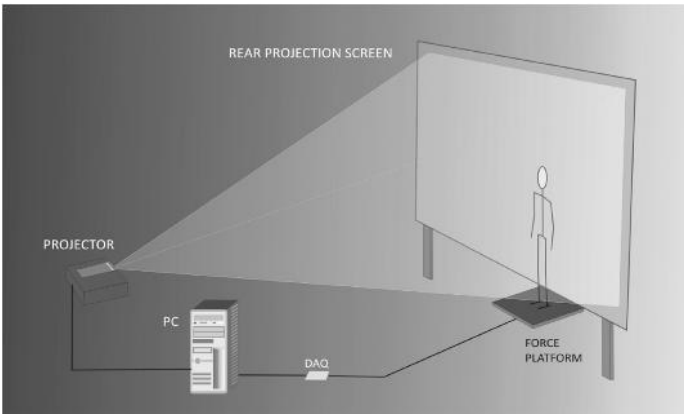


Fig. 1

Evaluated parameters

Postural responses to the designed stimuli were measured in groups of healthy elderly subjects and demented elderly patients. Each participant undergone a measurement protocol, that consists of presentation of four scenes in two perpendicular axes (antero-posterior axis - forward and backward direction, medio-lateral axis - left and right direction).

Each measurement scene was presented five times, with randomly changed direction of movement to suppress subject adaptation to the scene. A single measurement starts with 10 sec prestimulus period (static scene), continued with 20 sec stimulation (moving scene) and 20 sec post-stimulation period (static scene). Samples of presented scenes are shown in Fig. 2 (a – medio-lateral direction, b – antero-posterior direction).

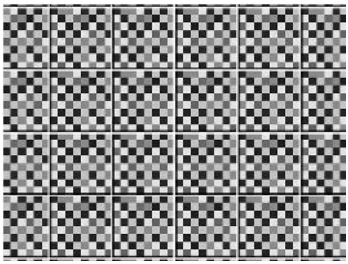


Fig. 2a

Fig. 2b

The stabilographic records were divided in 10 second periods. For every time period, mean position of center of pressure (CoP), mean sway amplitude and sway velocity were calculated. All mentioned parameters were calculated for visual scene rotation in medio-lateral direction (x-axis) and for visual scene motion „from“ or „to“ person (y- axis). Individual responses and parameters extracted from responses were averaged. Baseline of each measured stabilogram was corrected by subtraction the time-averaged value computed from pre-stimulus period [5].

Results

Constant visual scene motion induced so called ON effect - forward body leaning. The opposite OFF effect was observed at the stop of visual scene motion. Rotational visual scene induced similar but less pronounced ON and OFF effect in medio-lateral direction. The maximal CoP displacement in anterio-posterior and medio-lateral direction was computed. The visual scene motion induced larger CoP displacements in patients, however these were not significant. Significant difference was detected for velocity index of body sway, which was increased in demented patients when compared to healthy elderly (see Tab 1a,b,c). Also, the postural responses to visual scene perturbation were less variable in patients with dementia than in control group.

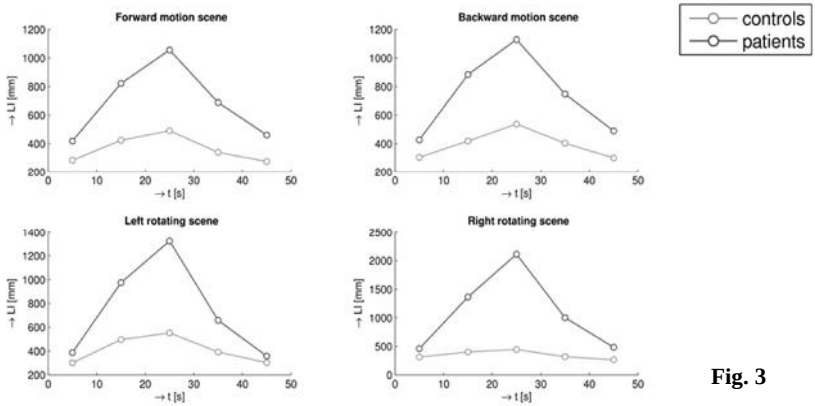


Fig. 3

Line integrals of both groups in each measured direction (LI) are summarized above in Fig. 3. Comparison of line integrals between groups is in tab. 1a. Group-averaged velocities in medio-lateral direction (x axis) and antero-posterior direction (axis y) were significantly different (tab. 1b,c).

Tab. 1a Significance of the difference (P value, t-test) for LI, according to directions and time slots (slot = 10 seconds)

Scene\time	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
forward	0.125	0.163	**0.050**	**0.026**	**0.035**
backward	0.181	0.100	0.192	0.205	**0.015**
right	0.122	0.098	0.136	**0.026**	0.065
left	0.142	0.346	0.173	**0.034**	0.055

Tab. 1b Significance of the difference (P value, t-test) for Ix, according to directions and time slots (slot = 10 seconds)

Scene\time	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
forward	0.119	0.086	**0.050**	**0.028**	**0.034**
backward	0.348	0.142	0.180	0.229	**0.015**
right	0.177	0.077	0.166	0.064	0.082
left	0.398	0.549	0.296	0.073	0.054

Tab. 1c Significance of the difference (P value, t-test) for Iy, according to directions and time slots (slot = 10 seconds)

Scene\time	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
forward	0.133	0.208	0.063	**0.030**	**0.041**
backward	0.147	0.116	0.201	0.196	**0.022**
right	0.124	0.145	0.159	**0.018**	0.065
left	0.102	0.293	0.123	**0.030**	0.071

Discussion

Our findings suggest that elderly patients with cognitive impairment show increased sensitivity to visual scene perturbation. The direction of CoP displacement was the same in both group. Displacement amplitude was non-significant larger in patients. Nevertheless, sway velocity line integral were significantly increased in patients compared to controls. Line integral reflects (represents the whole path of CoP displacement) the effort of subject to keep upright posture. It means that patients needed larger effort to stabilize posture during illusion visual scene movements when compared to control group. This suggest that patients were more affected by movements in visual field. It is possible that the processes of re-weighting sensory inputs in patients with cognitive impairment are altered. In varying environment the meaning of visual information can be ambiguous therefore it requires correct processing of sensory information. Altered sensory processing in patients can lead to the instability in certain situations.

References:

1. Tangen, G.G. et al. 2014. Relationships between balance and cognition in patients with subjective cognitive impairment, mild cognitive impairment, and Alzheimer disease. In Phys Ther. 2014, vol. 94(8), p. 1123-34.

2. Deschamps, T. et al. 2014. Postural control and cognitive decline in older adults: position versus velocity implicit motor strategy. In Gait Posture. 2014, vol. 39(1), p. 628-30.
3. Hay L et al. Availability of visual and proprioceptive afferent messages and postural control in elderly adults. Exp Brain Res. 1996 Feb;108(1):129-39.
4. Manckoundia et al. Impact of cognitive task on the posture of elderly subjects with Alzheimer´s disease compared to healthy elderly subjects. Mov Disord. 2006 Feb;21(2):236-41.
5. Kallin K, Gustafson Y, Sandman PO, Karlsson S. Drugs and falls in older people in geriatric care settings. Aging Clin Exp Res. 2004 Aug;16(4):270-6.
6. Shaw FE, Bond J, Richardson DA, Dawson P, Steen IN et al. Multifactorial intervention after a fall in older people with cognitive impairment and dementia presenting to the accident and emergency department: randomised controlled trial. BMJ. 2003 Jan 11;326(7380):73.
7. Púčik, J. et al. 2013. Experimental system for investigation of visual sensory input in postural feedback control. In AEEE. 2013, vol. 10(3), p. 174-180.

49. Extracelulárna DNA u pacientov s ankylozujúcou spondylitídou a psoriatrickou artritídou sa po aplikácii biologickej liečby nemení

Mgr. Barbora Konečná[1]
(Ústav molekulárnej biomedicíny)
Spoluautori: Emőke Šteňová[2], Peter Celec[1,3,4], Barbora Vlková[1]

Školiteľ: RNDr. Barbora Vlková, PhD.[1]
[1]Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK Bratislava, [2]I. Interná klinika LF a Univerzitná Nemocnica UK Bratislava, [3]Ústav patologickej fyziológie LF UK Bratislava, [4]Katedra molekulárnej biológie PRIF UK Bratislava

Úvod

Uvoľňovanie DNA z buniek do mimobunkového priestoru je fyziologický jav. Táto DNA je buď jadrového (ncDNA) alebo mitochondriálneho (mtDNA) pôvodu a po vstupe do mimobunkového priestoru sa nazýva extracelulárna DNA (ecDNA) [1]. Predošlé štúdie zistili, že koncentrácie ecDNA v cirkulácii sú vyššie počas patofyziologických stavov v porovnaní so zdravými jedincami [2, 3]. Ankylozujúca spondylitída (AS) a psoriatrická artritída (PA) sú autoimunitné choroby, ktoré patria do skupiny artritíd. Sú charakteristické tvorbou antinukleárnych a anti-dsDNA protilátok [4]. Zápal pri týchto chorobách vedie k zvýšenému uvoľňovaniu DNA do mimobunkového priestoru, čo navodzuje tvorbu ďalších protilátok a podporuje tvorbu prozápalových cytokínov. Biologická liečba zameraná na kľúčové prozápalové cytokíny veľmi efektívne zmierňuje príznaky chronických zápalových chorôb, ako už bolo popísané napr. pri reumatoidnej artritíde, ktorá patrí tiež do skupiny artritíd [5]. Cieľom tejto štúdie bolo analyzovať dynamiku extracelulárnej DNA v plazme pri biologickej protizápalovej anti-tumor nekrotizujúci faktor (anti-TNF) liečbe u pacientov s AS a PA.

Materiál a metodika

Pacientom s AS (n=10) a s PA (n=7) bola odobratá krv pred liečbou a následne 3 a 6 mesiacov po nasadení biologickej anti-TNF liečby. Krv bola odobratá do skúmaviek obsahujúcich EDTA. Následne bola centrifugovaná na 2000 x g 10 min pre získanie plazmy a skladovaná na -20°C až kým nebola analyzovaná. Všetky charakteristiky pacientov sú uvedené v Tabuľke 1.

Izolácia DNA

Pred izoláciou bola každá vzorka plazmy centrifugovaná pri 16000 x g 10 min pri teplote 4°C pre získanie plazmy bez apoptotických teliesok [6]. Z 200ul každej vzorky bola izolovaná DNA pomocou QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko) podľa protokolu od výrobcu.

Meranie celkovej ecDNA

Qubit Fluorometer a Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, LA, California, USA) bol použitý na meranie celkovej extracelulárnej DNA izolovanej z plazmy podľa protokolu od výrobcu.

Kvantifikácia extracelulárnej ncDNA a mtDNA
Kvantifikačná PCR bola použitá pre stanovenie množstva ncDNA a mtDNA v plazme. Reakcia prebehla na prístroji Mastercycler realplex 4 (Eppendorf, Hamburg, Nemecko) použijúc QuantiFast SYBRGreen PCR Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko) podľa nasledovného programu: 1 cyklus 5 min 95 °C, 40 cyklov 95 °C 10 s pre denaturáciu, 30 s 60 °C pre aneláciu a 72 °C 30 s pre extenziu [7].

Meranie DNázovej aktivity
DNázová aktivita bola vo vzorkách plazmy meraná jednoduchou radiálnou enzýmovou difúznou (SPRED) metódou použitím 1% agarózového gélu obsahujúceho DNA v koncentrácii 5mg/ml. Gél obsahoval roztoky TRIS-HCl, $CaCl_2$ a $MgCl_2$, aby sa vytvorili vhodné podmienky pre aktivitu enzýmu. Z každej vzorky boli 3µl plazmy napipetované do pripraveného gélu a následne počas noci inkubované na 37˚C v tme. Enzým DNázy I bol riedený pre vytvorenie kalibračnej krivky. Priemery kruhov boli merané ImageJ softvérom a konvertované na jednotky aktivity DNázy.

Štatistická analýza
Všetky dáta boli spracované a vyhodnocované pomocou softvéru GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, California, USA).

Výsledky
Do tejto štúdie bolo zahrnutých 10 pacientov s AS a 7 pacientov s PA. Títo pacienti boli pozorovaní pred liečbou a následne 3 a 6 mesiacov po nasadení biologickej liečby. Charakteristiky pacientov sú uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Charakteristika pacientov

	Ankylozujúca spondylitída	**Psoriatrická artritída**
Pohlavie, žena/muž	5/5	3/4
Vek (roky)	44	58
Roky od prejavenia symptómov	12,75	19,14 (artritída)
Roky od diagnózy	3,5	26,29 (psoriáza), 14 (artritída)
HLA-B 27 pozitívni	10	7
BMI	28,57	29,58
TNF blokátor	7 (adalimumab), 3(golimumab)	7 (adalimumab)
DMARDs	10 (metotrexát), 2 (sulfasalazín)	7 (metotrexát), 2 (sulfasalazín)

HLA-B 27 – ľudský leukocytový antigén B 27, BMI – index telesnej hmotnosti, TNF – tumor nekrotizujúci faktor, DMARDs – chorobu modifikujúce abtireumatické lieky

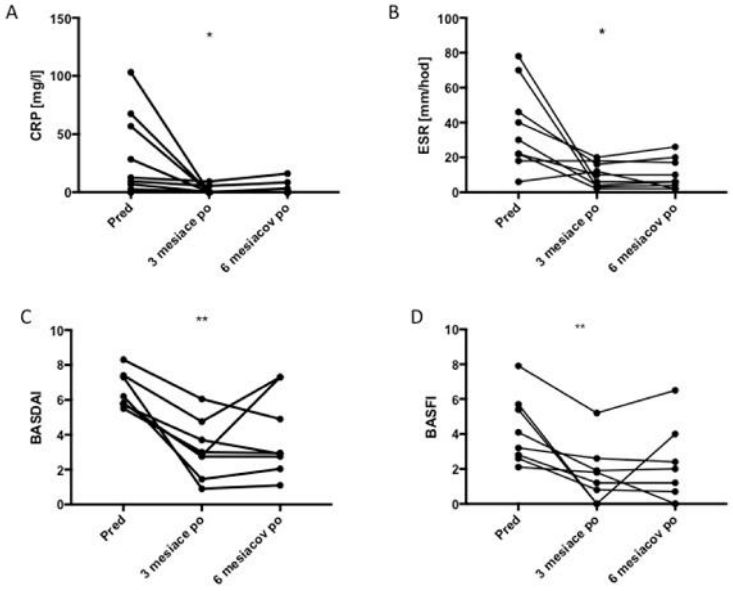
Pri meraní celkovej ecDNA v plazme pacientov neboli pozorované žiadne zmeny pred liečbou ani po nasadení biologickej anti-TNF liečby ani u pacientov s AS ani u pacientov s PA (p=n.s.). Kvantifikácia ncDNA ako aj mtDNA nepotvrdila ani u jednej z chorôb vplyv liečby na množstvá týchto dvoch typov

ecDNA v plazme pacientov (p=n.s. v oboch prípadoch). Taktiež meranie aktivity DNázy neukázalo zmeny aktivity tohto enzýmu vzhľadom na liečbu u pacientov s AS ani u pacientov s PA (p=n.s.).

Naopak klinické dáta C-reaktívny proteín (CRP) a rýchlosť sedimentácie erytrocytov (ESR) ukazujú, že stav pacientov sa zlepšil aj pri AS (p<0,05 v oboch prípadoch) (Obr. 1A, 1B) po nasadení biologickej liečby. Pri PA sa hondoty CRP nezmenili (p=n.s.) (Obr. 2A) nakoľko boli zž na začiatku nízke, no ESR hodnoty signifikantne klesli (p<0,05) (Obr. 2B) po nasadení biologickej liečby.

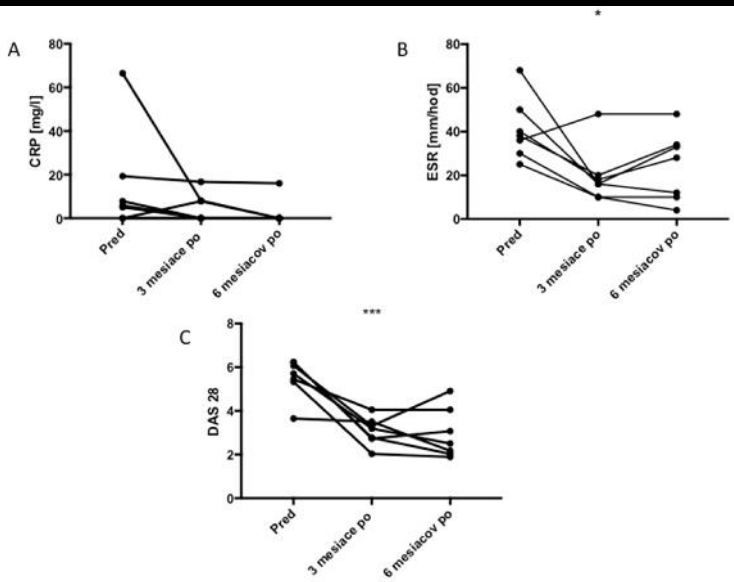
Pacientom s AS bol predložený dotazník BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index), ktorý vypovedá o stave pacienta a efektivite terapie. Skóre BASDAI signifikantne kleslo po nasadení biologickej u všetkých pacientov (Obr. 1C, p<0,01). Pacientom s AS bol taktiež predložený dotazník BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index), ktorý popisuje stupeň funkčnej limitácie pacientov. BASFI index taktiež poklesol u všetkých pacienov po nasdení biologickej liečby (Obr. 1D, p<0,01).

Pacientom s PA bol predložený dotazník DAS 28 (Diseases Activity Score 28), ktorý zodpovedá aktivite artritídy. Číslo 28 zodpovedá 28 kĺbom, na ktoré sa dotazník vzťahuje. U pacientom s PA signifikantne pokleslo toto skóre po nasadení biologickej liečby (Obr. 2C, p<0,001).



Obr. 1: Klinické dáta pacientov s ankylozujúcou spondylitídou. Hodnoty C-reaktívneho proteínu (CRP) (A) a rýchlosť sedimentácie erytrocytov (ESR) (B) klesli po nasadení biologickej liečby (p<0,05 v oboch prípadoch). Podľa dotazníkov BASDAI (C) a BASFI (D) sa stav pacientov výrazne zlepšil (p<0,01 v oboch prípadoch).
(BASDAI – Bath ankolysing spodylitis disesease aktivity index, BASFI - Bath ankolysing spodylitis functional index)

[redacted]



Obr. 2: Klinické dáta pacientov s psoriatrickou artritídou. Hodnoty C-reaktívneho proteínu (CRP) (A) sa nezmenili (p=n.s.). Hodnoty rýchlosti sedimentácie erytrocytov (ESR) klesli po nasadení biologickej liečby (p<0,05) (B). Podľa dotazníku DAS 28 sa stav pacientov výrazne zlepšil (p<0,001) (C).
(DAS 28 – disease aktivity score)

Diskusia

Doposiaľ bolo publikovaných viacero odborných článkov, ktoré popisovali vplyv anti-TNF biologickej liečby na rôzne autoimunitné ochorenia a rozoberali rôzne účinky ako aj efektivitu liečby [8]. Pri AS sa doposiaľ preukázal pozitívny vplyv tejto liečby na črevný zápal [9], u pacientoch s reumatoidnou artritídou liečba zlepšila stav kĺbov natoľko, že mohli znovu pracovať manuálne [10] alebo pri ulceróznej kolitíde anti-TNF liečba zlepšila stav, no nie dlhodobo [11]. Choroby sledované v tejto štúdii, AS a PA, patria do skupiny artritíd. Nedávno sa potvrdili vplyv biologickej liečby na pokles ecDNA v plazme u pacientov s reumatoidnou artritídou, čo súčasne korelovalo so zlepšením stavu pacientov z hľadiska CRP a ESR ako aj s hľadiska aktivity choroby ohodnotenej pomocou DAS 28 dotazníku [5]. Cieľom našej štúdie bolo pozorovať vplyv anti-TNF biologickej protizápalovej na dynamiku celkovej ecDNA ako aj na ncDNA a mtDNA u 10 pacientov s AS a u 7 pacientov s PA. Ani u jednej z daných chorôb sa nepreukázal vplyv biologickej liečby na koncentrácie ecDNA. Koncentrácia celkovej ecDNA ako aj kvantifikácia ncDNA a mtDNA bola konštantná vo všetkých troch odberoch napriek tomu, že CRP, ESR ako aj jednotlivé dotazníky poukazujú na výrazné zlepšenie stavu pacientov. Napriek podrobným dátam o každom pacientovi je nevýhodou našej štúdie malý počet pozorovaných pacientov a ich veľká variabilita. Napriek tomu, že biologická liečba bola rovnaká u všetkých pacientov, nemôžeme vylúčiť vplyv predošlých liekov na pozorované parametre predtým

ako sa pozorovaní jedinci stali pacientmi I. Internej kliniky. Do budúcna plánujeme rozšíriť kohortu a sprísniť exklúzne kritéria za účelom zníženia variability pozorovanej skupiny.

Zoznam použitej literatúry:

1. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. Biochim Biophys Acta. 2007;1775:181-232.
2. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res. 1977;37:646-50.
3. Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. FEBS Lett. 2007;581:795-9.
4. Zeidler H, Amor B. The Assessment in Spondyloarthritis International Society (ASAS) classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general: the spondyloarthritis concept in progress. Ann Rheum Dis. 2011;70:1-3.
5. Hashimoto T, Yoshida K, Hashimoto N, Nakai A, Kaneshiro K, Suzuki K, Kawasaki Y, Shibanuma N, Hashiramoto A. Circulating cell free DNA: a marker to predict the therapeutic response for biological DMARDs in rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis. 2016.
6. Jiang P, Chan CW, Chan KC, Cheng SH, Wong J, Wong VW, Wong GL, Chan SL, Mok TS, Chan HL, Lai PB, Chiu RW, Lo YM. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112:E1317-25.
7. Wai T, Ao A, Zhang X, Cyr D, Dufort D, Shoubridge EA. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. Biol Reprod. 2010;83:52-62.
8. Chatzantoni K, Mouzaki A. Anti-TNF-alpha antibody therapies in autoimmune diseases. Curr Top Med Chem. 2006;6:1707-14.
9. Chitul A, Voiosu AM, Marinescu M, Caraiola S, Nicolau A, Badea GC, Parvu MI, Ionescu RA, Mateescu BR, Voiosu MR, Baicus CR, Rimbas M. Different effects of anti-TNF-alpha biologic drugs on the small bowel macroscopic inflammation in patients with ankylosing spondylitis. Rom J Intern Med. 2017.
10. Olofsson T, Petersson IF, Eriksson JK, Englund M, Nilsson JA, Geborek P, Jacobsson LT, Askling J, Neovius M, Group AS. Predictors of work disability after start of anti-TNF therapy in a national cohort of Swedish patients with rheumatoid arthritis: does early anti-TNF therapy bring patients back to work? Ann Rheum Dis. 2017.
11. Rodriguez-Lago I, Gomez-Irwin L, Fernandez E, Higuera R, Cabriada JL. Granulocyte-Monocyte Apheresis as an Adjuvant Therapy to Anti-Tumor Necrosis Factor Drugs for Ulcerative Colitis. Ther Apher Dial. 2017;21:26-30.

Sponzori konferencie

CENTRUM VEDECKO-TECHNICKÝCH INFORMÁCIÍ SR

NÁRODNÉ CENTRUM PRE POPULARIZÁCIU VEDY A TECHNIKY V SPOLOČNOSTI

MINISTERSTVO ŠKOLSTVA, VEDY, VÝSKUMU A ŠPORTU SLOVENSKEJ REPUBLIKY

MEGABOOKS SK

LISTERINE®

SLOVENSKÉ ELEKTRÁRNE

MEDIREX

orange™

GRADA®

ZÁPADOSLOVENSKÉ TLAČIARNE SKALICA