

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

LEKÁRSKA FAKULTA

ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC

DOKTORANDOV

LEKÁRSKEJ FAKULTY UNIVERZITY KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

BRATISLAVA

2021

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

LEKÁRSKA FAKULTA

ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC

DOKTORANDOV

LEKÁRSKEJ FAKULTY UNIVERZITY KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

2021

BRATISLAVA

30. APRÍLA – 8. MÁJA 2021

Editor: Pavol Janega

Za obsahovú a jazykovú správnosť príspevkov zodpovedajú autori

Výroba

© Univerzita Komenského v Bratislave

**XVI. KONFERENCIA DOKTORANDOV
LF UK**

Zuzana Prídavková, Darina Lysková, Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Alena Furdová: *Determinanty recidivovania bazocelulárneho karcinómu periokulárnej oblasti. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 7-8.*

1. Determinanty recidivovania bazocelulárneho karcinómu periokulárnej oblasti.

MUDr. Zuzana Prídavková^{1,2}
(oftalmológia)

Spoluautori: MUDr. Darina Lysková², MUDr. Denisa Jurenová², MUDr. Paulína Plesníková²

Školiteľ: prof. PhDr. MUDr. Furdová Alena, PhD., MPH, MSc., FEBO²

¹Klinika oftalmológie, Ústredná vojenská nemocnica SNP Ružomberok – FN, Ružomberok, ²Klinika oftalmológie LF UK a UN Bratislava, Nemocnica Ružinov

Úvod

Bazocelulárny karcinóm (BCC) predstavuje 90 % malígnych nádorov mihalníc s prevahou v mužskej populácii. Vyskytuje sa hlavne v siedmej a ôsmej dekáde života. Viac ako 50 % BCC mihalníc sa vyskytuje v oblasti dolnej mihalnice a vnútorného kútika oka (1-3). Orbitálna invázia je popisovaná v 1,6–2,5 % prípadov (4). Primárnou liečbou BCC je radikálna chirurgická resekcia s negatívnymi resekčnými okrajmi (4-6). Pri rozsiahlych, recidivujúcich, či komplikovaných prípadoch je nutné pristúpiť až k mutilujúcim výkonom, akou je exenterácia orbity (4, 7-9).

Materiál a metódy

V roku 2014 boli na pracovisku diagnostikované a histologicky potvrdené 4 prípady BCC mihalníc – v jednom prípade v štádiu T4. Popisujeme závažný priebeh ochorenia pacienta s periokulárnym BCC s opakovanými recidívami, orbitálnou inváziou, exenteráciou orbity.

Kazuistika

84-ročný pacient s recidivujúcim BCC periokulárnej oblasti – v oblasti hornej mihalnice vpravo. Excízia primárneho tumoru v máji r. 2014. Histológia s potvrdzujúcou diagnózou BCC (dg. C44.1 v MKCH 10), s pozitívnymi resekčnými okrajmi. Realizovaná reexcízia danej oblasti, po dvoch rokoch lokálna recidíva s prerastaním do orbity. Indikácia k externej rádioterapii v kuratívnej dávke. Indikovaná exenterácia orbity, realizovaná v januári 2018. Po roku opätovná recidíva nádoru, realizovaná biopsia a histologizácia s dg. C44.1 (TNM 7, pMx, pNx, pTx). Indikovaná externá rádioterapia, bez biologickej liečby. Zachytená po roku opätovná progresia lokálneho nálezu.



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

Obr.1 Perioperačný nálež počas exenterácie orbity vpravo (01/2018).

Obr.2 Priebeh hojenia dutiny očnice – 4 mesiace od exenterácie, bez recidívy (04/2018).

Obr.3 Pacient s nasadenou epitézou v ráme okuliarov (04/2018).

Foto: Alena Furdová, archív Kliniky oftalmológie LF UK a UN Bratislava

Zuzana Prídavková, Darina Lysková, Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Alena Furdová: *Determinanty recidivovania bazocelulárneho karcinómu periokulárnej oblasti. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 7-8.*

Diskusia

Definujeme determinanty recidivovania periokulárneho BCC a závažného priebehu ochorenia. Z neovplyvniteľných faktorov – vek, mužské pohlavie, kaukazská populácia (2-4). Z ovplyvniteľných vplyv ionizujúceho žiarenia, lokalizácia nádoru (10-13). Dlhotrvajúce nádorové ochorenie, histologicky potvrdený agresívny typ BCC, pozitívne resečné okraje po primárnej excízii a non-compliance pacienta determinujú priebeh ochorenia (14-15). Kazuistika poukazuje na dôležitosť včasnej diagnostiky, radikálnu resekciu, multidisciplinárnu spoluprácu, doživotnú dispenzarizáciu pacienta so včasným záchytnom recidív.

Zoznam použitej literatúry

1. Silverman N, Shinder R. What's New in Eyelid Tumors. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2017 Mar-Apr;6(2):143-152.
2. Furdová A, Oláh Z. *Nádory oka a okolitých štruktúr*. Brno: Akademické nakladateľství CERM; 2010. 152 p.
3. Ondrušová M, Pleško I, Safaei-Diba Ch, et al. Komplexná analýza výskytu a úmrtnosti na zhubné nádory v Slovenskej republike [Internet]. Bratislava: Národný onkologický register SR; 2007. Available from: <http://www.nor-sk.org>
4. Furdová A, Horkovičová K, Babál P, et al. Nemelanómové nádory kože mihalníc a vnútorného kútika - bazocelulárny karcinóm [Non-melanotic Tumors of the Eyelids Skin and Inner Corner - Basocellular Carcinoma]. *Cesk Slov Oftalmol*. 2015 Winter;71(6):293-301. Slovak.
5. Furdova A, Lukacko P. Periocular Basal Cell Carcinoma Predictors for Recurrence and Infiltration of the Orbit. *J Craniofac Surg*. 2017 Jan;28(1):e84-e87.
6. Weesie F, Naus NC, Vasilic D, et al. Recurrence of periocular basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma after Mohs micrographic surgery: a retrospective cohort study. *Br J Dermatol*. 2019 May;180(5):1176-1182.
7. Leibovitch I, McNab A, Sullivan T, et al. Orbital invasion by periocular basal cell carcinoma. *Ophthalmology*. 2005 Apr;112(4):717-723.
8. Paavilainen V, Tuominen J, Aho VV, et al. Long-term results after treatment of basal cell carcinoma of the eyelid in South-Western Finland. *Eur J Ophthalmol*. 2007 Jul-Aug;17(4):494-500.
9. Sigurdsson H, Agnarsson BA. Basal cell carcinoma of the eyelid. Risk of recurrence according to adequacy of surgical margins. *Acta Ophthalmol Scand*. 1998 Aug;76(4):477-480.
10. Pogniet B, Gardrat S, Dendale R, et al. Basal cell carcinomas of the eyelid: Results of an initial surgical management. *J Fr Ophtalmol*. 2019 Dec;42(10):1094-1099.
11. Furdova A, Kapitanova K, Kollarova A, et al. Periocular basal cell carcinoma - clinical perspectives. *Oncol Rev*. 2020 Apr 30;14(1):420.
12. Bhatnagar A. Nonmelanoma skin cancer treated with electronic brachytherapy: results at 1 year. *Brachytherapy*. 2013 Mar-Apr;12(2):134-140.
13. Svetlosáková Z, Halás M, Krásnik V, et al. Výskyt recidív po chirurgickej liečbe bazaliómu kože mihalníc [Basalioma of the eyelid: rate and factors of recurrence after surgical therapy]. *Cesk Slov Oftalmol*. 2010 Oct;66(4):171-175. Slovak.
14. Coker DD, Elias EG, Viravathana T, et al. Chemotherapy for Metastatic Basal Cell Carcinoma. *Arch Dermatol*. 1983; 119(1):44-50.
15. Gill HS, Moscato EE, Chang AL, et al. Vismodegib for periocular and orbital basal cell carcinoma. *JAMA Ophthalmol*. 2013 Dec;131(12):1591-1594.

Karolína Kapitánová, Juraj Halička, Alena Furdová: Kombinovaný refrakčný výkon u extrémne vysokej myopie – kazuistika. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 9-12.

2. Kombinovaný refrakčný výkon u extrémne vysokej myopie - kazuistika

MUDr. Karolína Kapitánová^{1,2}
(oftalmológia)

Spoluautori: MUDr. Juraj Halička, PhD.^{1,2}

Školiteľ: prof. MUDr. PhDr. Alena Furdová, PhD., MPH., MSc., FEBO

¹UVEA Klinika s.r.o., Martin - Priekopa, ²Očná klinika JLF UK a UN Martin

Úvod

Laserové refrakčné zákroky umožňujú pri myopii chirurgické odstránenie refrakčnej vady. Podľa hĺbky, v ktorej je zákrok na rohovke realizovaný, rozlišujeme dva typy refrakčných výkonov:

A./ *Povrchové metódy*, metódy bez rezu (PRK, LASEK), ktoré sú vhodné u pacientov s tenšou rohovkou, s neprístupnými hlboko vsadenými očami, vykonávajúcich kontaktné športy, prípadne rizikové povolania.

B./ *Podpovrchové metódy*, metódy s rezom (femtoLASIK), vhodné pri vyšších dioptriách, umožňujúce rýchlejšiu rehabilitáciu videnia, ako aj výhodu v zmysle nižšieho rizika vzniku zákalov rohovky (tzv. haze). Ide však o skupinu viac invazívnych zákrokov. Pri výbere najvhodnejšej metódy rozhoduje najmä hrúbka rohovky a výška refrakčnej vady. Pri vysokej myopii (nad cca -8,0 Dsf) je však bezpečnosť, úspešnosť a efektívnosť týchto zákrokov obmedzená. Stúpa riziko regresie refrakčnej chyby, ako aj vzniku sekundárnych ektatických ochorení rohovky.

V takom prípade je vhodnou voľbou implantácia fakickej vnútroočnej šošovky (VOŠ). V aktuálnej oftalmologickej praxi rozlišujeme:

A./ *Prednokomorové fakické VOŠ* – môžu byť umiestnené v iridokorneálnom uhle (dnes takmer nepoužívané pre riziko dekompenzácie endotelu rohovky, poškodenia iridokorneálneho uhla, ovalizácie zrenice), alebo fixované na dúhovku.

B./ *Zadnokomorové fakické VOŠ* – sú umiestnené v zadnej komore.

Zadnokomorové fakické VOŠ sú používané pri korekcii myopie a myopického astigmatizmu s hodnotami $\leq -15\text{Dsf}$ resp. $\leq 15\text{D SE}$ ($\leq 4\text{Dcyl}$), ďalej pri redukcii myopie a myopického astigmatizmu s hodnotami od -15D do -20D SE.

Podmienkou implantácie zadnokomorovej fakickej VOŠ je hĺbka prednej komory viac ako 3 mm, stabilná refrakcia u pacienta (+/- 0,5 D za uplynulý 1 rok) a hustota endotelových buniek nad 2500 bb/mm².

Individualizovanú korekciu pri atypických alebo veľmi vysokých refrakčných vadách umožňuje tzv. bioptika - kombinácia laserového refrakčného zákroku na rohovke a implantácie fakickej alebo pseudofakickej VOŠ.

Materiál a metódy

Autorka v predkladanej práci prezentuje klinický prípad 21 ročného pacienta – muža s vysokou myopiou a anizometriou. Okuliarovú korekciu používal od 3 rokov veku s úvodným rýchlym rastom refrakčnej vady, predovšetkým na pravom oku. V uplynulých asi 5 rokoch sa narastanie dioptrií zastavilo, pacientovi však nevyhovovala absolútna závislosť od okuliarov, neuspokojivé videnie napriek okuliarom a škúlenie pravého oka. Riešenie jeho extrémnej refrakčnej vady bolo možné pomocou kombinácie dvoch rôznych refrakčných zákrokov – implantácie zadnokomorovej fakickej VOŠ bilaterálne a následnej dokorekcie zbytkovej refrakčnej chyby pravého oka laserovým refrakčným zákrokom na rohovke. Implantovaná bola šošovka Visian EVO ICL Toric 12,1 mm s hodnotou -18,00Dsph/+4,5Dcyl/117° vpravo a -12,5Dsph/+0,5Dcyl/58° vľavo. Ide o šošovky z biokompatibilného materiálu, tzv. kolaméru. Ten pozostáva z kolagénu, poly - HEMA – kopolyméru a zmesi UV

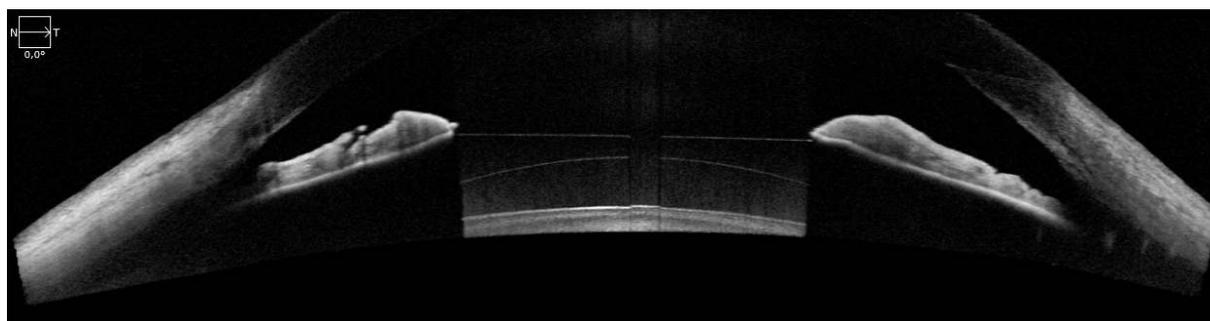
Karolína Kapitánová, Juraj Halička, Alena Furdová: Kombinovaný refrakčný výkon u extrémne vysokej myopie – kazuistika. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 9-12.

chromofórov. Centrálne umiestnený otvor v šošovke s obchodným názvom KS - AquaPORT™ eliminuje potrebu YAG laser iridotómie ako prevencie pooperačného zvýšenia vnútroočného tlaku (VOT) pri možnom pupilárnom bloku spôsobenom prítomnosťou VOŠ (Obr. 1). Šošovka je foldovateľná, teda implantovateľná po vložení do injektora cez 2.75mm rohovkový rez. Vyrába sa ako sférická, ale aj tórická varianta. Po 2 mesiacoch od prvej operácie bol pre anizometriu s hodnotou -4,5D SE doplnený LASEK vpravo. Použitý bol excimer laser Schwind Amaris® (Obr. 2).

Výsledky

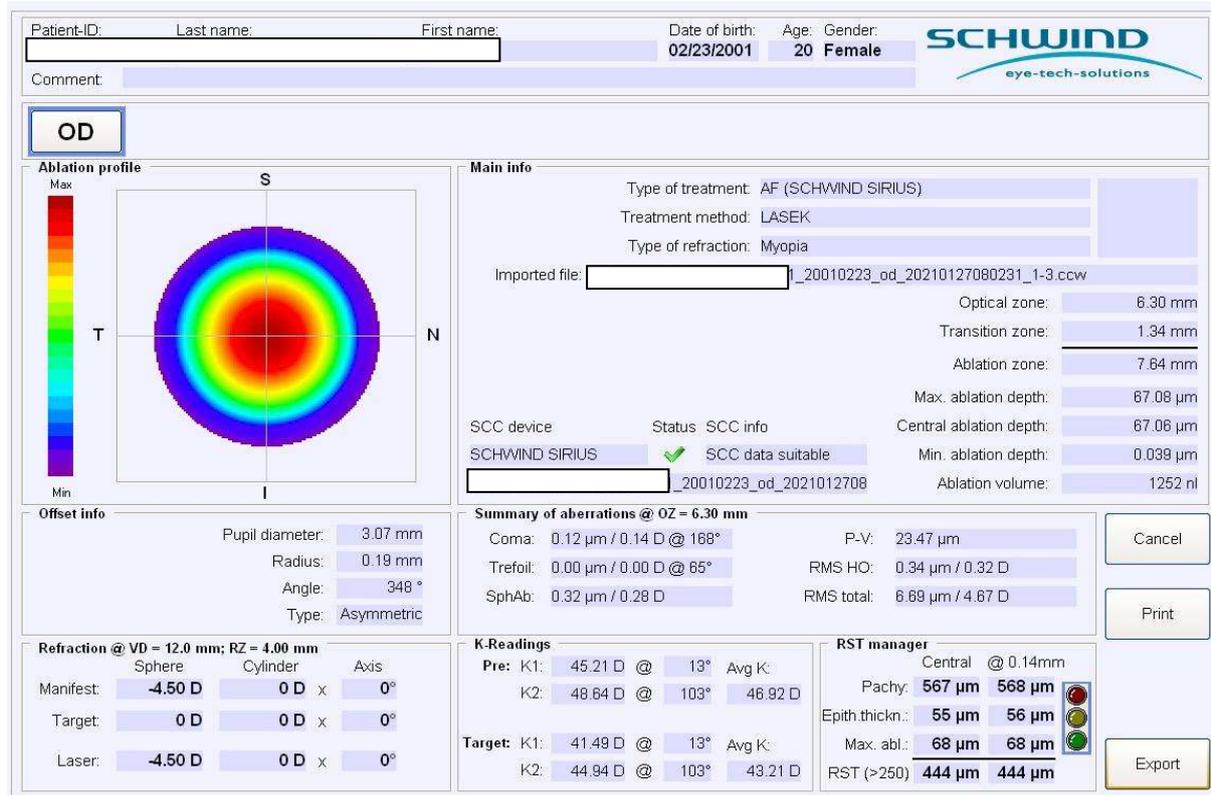
Tab.1: Vyhodnotenie výsledkov kombinovaných refrakčných zákrokov u sledovaného pacienta. Skratky: CZO – centrálna zraková ostrosť, NKCZO – najlepšia korigovaná centrálna zraková ostrosť, VOT – vnútroočný tlak

	Pred operáciou	Po 1. operácii	Po 2. operácii
Objektívna refrakcia	OD:-21.0 Dsf -8.5 Cyl 22 ax OS:-10.25 Dsf -1.5 Cyl 144 ax	OD:-4.25 Dsf -0.75 Cyl 2 ax OS:0 Dsf +1.25 Cyl 64 ax	OD:-0,25 Dsf -1,0 Cyl 10 ax OS:+0,25 Dsf +1,0 Cyl 72 ax
CZO	VOD: 0,01 VOS: 0,03	VOD: 0,3 VOS: 1,0	VOD: 0,9 VOS: 1,0
NKCZO	VOD: 0,3 VOS: 0,8	VOD: 0,8 VOS: 1,0	VOD: 1,0 VOS: 1,0
Endotel rohovky	OD: 2910 bb/mm ² OS: 2810 bb/mm ²	OD: 2670 bb/mm ² OS: 2700 bb/mm ²	--
Stav šošovky	Číra	číra	--
VOT	OD: 17 torr OS: 15 torr	OD: 18 torr OS: 20 torr	OD: 18 torr OS: 19 torr



Obr. 1: Prednosegmentová optická koherentná tomografia (AS OCT) – ľavé oko, stav po implantácii fakickej VOŠ Visian EVO ICL Toric, v centre viditeľný tzv. KS- AquaPort™.

Karolína Kapitánová, Juraj Halička, Alena Furdová: Kombinovaný refrakčný výkon u extrémne vysokej myopie – kazuistika. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 9-12.



Obr. 3: Plánovací systém excimer laseru Schwind Amaris®, plán laserovej ablácie pre pravé oko pacienta za účelom korekcie anizometropie po implantácii fakickéj VOŠ bilaterálne.

Diskusia

Rohovka a šošovka predstavujú dve najvýznamnejšie refrakčné prostredia oka. Kombinácia dvoch refrakčných zákrokov (jedného na rohovke a druhého v zmysle výmeny vlastnej šošovky alebo doplnenia fakickéj VOŠ) je metóda využívaná predovšetkým pri vysokých refrakčných chybách, ale aj významnej anizometrii. Optimálny časový interval medzi prvou a druhou operáciou je spravidla od 1 do 3 mesiacov (1,2). Myopia a myopický astigmatizmus sú najčastejšími indikáciami pre uplatnenie bioptiky v podobe implantácie fakickéj VOŠ a následnej refrakčnej operácie rohovky, pri hypermetrii je tento postup využívaný menej často (3).

Dvali et al. publikoval výsledky implantácie fakických alebo pseudofakických VOŠ u 50 očí s následnou dokorekciou reziduálnej refrakčnej vady s pomocou laser in situ keratomileusis (LASIK). Výsledná objektívna refrakcia v súbore bola v intervale od -0.75 do +0.50 D SE. Nekorigovaná centrálna zraková ostrosť (CZO) dosiahla hodnotu 1,0 u 82% očí (3).

Arne et al. hodnotil skupinu očí s vysokou myopiou a myopickým astigmatizmom. Po úvodnej implantácii fakickéj VOŠ bola prípadná reziduálne refrakčná chyba riešená najskôr 6 týždňov od prvej operácie s pomocou fotorefraktívnej keratektómie (PRK) a u vyšších hodnôt s pomocou LASIK. Pooperačné hodnoty objektívnej refrakcie boli v rozsahu od -0,5 do -2,5D SE. Zlepšenie CZO bolo dokumentované u všetkých očí v sledovanej skupine (4).

Záver

Kombinácia implantácie fakickéj VOŠ a laserového refrakčného zákroku na rohovke môže byť vhodnou alternatívou pre individualizovanú korekciu vysokej myopie.

Karolína Kapitánová, Juraj Halička, Alena Furdová: Kombinovaný refrakčný výkon u extrémne vysokej myopie – kazuistika. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 9-12.

Zoznam použitej literatúry

1. Arne JL, Lesueur LC, Hulin HH. Photorefractive keratectomy or laser in situ keratomileusis for residual refractive error after phakic intraocular lens implantation. *J Cataract Refract Surg* 2003;29(6),1167-1173.
2. Brar S, Batra A, Shah ML, Ganesh S. Outcomes of bi-optics with Small Incision Lenticule Extraction as a sequential treatment following Implantable Collamer Lens for management of extreme myopia. *J Cataract Refract Surg* 2020; 11(23).
3. Dvali ML, Tsinsadze NA, Sirbiladze BV. Bioptics with LASIK flap first for the treatment of high ametropia. *J Refract Surg* 2009;25(1 Suppl),160-162.
4. Velarde JI, Anton PG, de Valentin-Gamazo L. Intraocular lens implantation and laser in situ keratomileusis (bioptics) to correct high myopia and hyperopia with astigmatism. *J Refract Surg* 2001;17(2 Suppl),234-237.

Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Darina Lysková, Zuzana Prídavková, Juraj Sekáč, Pavol Veselý, Pavol Kusenda, Alena Furdová: SARS-CoV-2 v spojovkových sekrétoch a slzách u pacientov s COVID-19 a pozitívnu očnou anamnézou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 13-16.

3. SARS-CoV-2 v spojovkových sekrétoch a slzách u pacientov s COVID-19 a pozitívnu očnou anamnézou

**MUDr. Denisa Jurenová
(oftalmológia)**

Spoluautori: MUDr. Paulína Plesníková¹, MUDr. Darina Lysková¹, MUDr. Zuzana Prídavková¹, MUDr. Juraj Sekáč¹, MUDr. Pavol Veselý¹, MUDr. Pavol Kusenda¹

Školiteľ: prof. PhDr. MUDr. Alena Furdová, PhD., MPH, MSc., FEBO

¹Klinika oftalmológie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice Bratislava

Úvod

Pandémia, ktorú spôsobuje vírus SARS-CoV-2 (koronavírus 2 spôsobujúci ťažký akútny respiračný syndróm), predstavuje výzvu pre zdravotníkov rôznych odborov na celom svete. Oftalmológ Li Wenliang, MD v čínskom meste Wuhan patril k prvým, ktorí upozornili na prítomnosť nového koronavírusu v populácii. Spojovka patrí medzi vstupné brány pre infekciu SARS-CoV-2 a oftalmologické prejavy môžu byť prvou manifestáciou koronavírusového ochorenia COVID-19 (1-3). Viaceré práce potvrdili prítomnosť očnej manifestácie u pacientov s ochorením COVID-19, najčastejšie sa u pacientov vyskytuje konjunktivitída, prípadne keratokonjunktivitída. Vo svete boli zverejnené publikácie, ktoré zaznamenali príznaky u COVID-19 pozitívnych pacientov ako hyperémia, chemóza spojovky, slzenie, sekrécia, pálenie, fotofóbia, bolesť, pocit cudzieho telieska, suché oči (3-6).

Materiál a metódy

V období január–február 2021 sme analyzovali súbor 149 pacientov s laboratórne potvrdeným ochorením COVID-19 hospitalizovaných na COVID-19 oddeleniach v Nemocnici Ružinov, u ktorých sme odobrali vzorky spojovkových sekrétov a slz zo spojovkového vaku na dôkaz prítomnosti SARS-CoV-2 metódou RT-PCR testov (polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkriptázou). Pacienti boli vybraní na základe laboratórne potvrdenej infekcie SARS-CoV-2, a to pozitívnym PCR testom z nazofaryngu (145 pacientov), antigénovým testom z nazofaryngu (1 pacient) a testom protilátok proti SARS-CoV-2 v krvi (3 pacienti). U týchto pacientov sme vykonali odbery spojovkových sekrétov a slz zo spojovkového vaku po everzii dolnej mihalnice pohybom od vonkajšieho kútika po vnútorný tým istým odberným tampónom z oboch očí. Tampón bol následne vložený do označenej skúmavky s transportným médiom a prítomnosť SARS-CoV-2 vo vzorkách bola vyhodnotená metódou RT-PCR. Pacientov sme sa pýtali na očnú anamnézu v podobe očných príznakov počas trvania ochorenia COVID-19 a na očné ochorenia celkovo, ak to ich zdravotný stav dovolil.

Výsledky

V súbore 149 pacientov bol RT-PCR test zo spojovkového vaku pozitívny u 25 pacientov (16,78 %), negatívny u 115 pacientov (77,85 %) a 9 pacientov (6,04 %) malo nejasný výsledok testu.

Z celkového počtu 149 pacientov malo 16 pacientov pozitívnu očnú anamnézu, čo predstavuje 10,74 %, 9 bolo žien a 7 mužov. Medzi 16 pacientami s očnou anamnézou sme detegovali SARS-CoV-2 v spojovkových sekrétoch a slzách u 3 pacientov.

Medzi pacientami s očnou anamnézou sa vyskytli 2 pacienti s očnými príznakmi počas trvania ochorenia COVID-19, jeden muž popisoval začervenanie, rezanie a slzenie očí a jedna žena mala bolesť oka, u oboch vyšiel RT-PCR test zo spojovkového vaku negatívne.

14 pacientov malo anamnézu očných ochorení pred infekciou, a to stav po laserovom zákroku Excimer (1 pacientka), glaukóm (3 pacienti), pseudofakia (3 pacienti), súčasne glaukóm a pseudofakia (2

Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Darina Lysková, Zuzana Prídavková, Juraj Sekáč, Pavol Veselý, Pavol Kusenda, Alena Furdová: SARS-CoV-2 v spojovkových sekrétoch a slzách u pacientov s COVID-19 a pozitívnu očnou anamnézou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 13-16.

pacienti), trachóm v minulosti (1 pacient), strabizmus (1 pacientka), syndróm suchých očí pre Sjögrenov syndróm s aplikáciou umelých slz (1 pacient), diabetická retinopatia s pravidelnou aplikáciou intravitreálnych injekcií a po laserovom zákroku (1 pacient) a stav po enukleácii bulbu pre bolestivý glaukóm (1 pacientka). Z týchto 14 pacientov s anamnézou očných ochorení mali pozitívny RT-PCR test zo spojovkových sekrétov a slz 3 pacienti, z toho 1 s glaukómom a súčasne pseudofakiu, 1 pacient s trachómom v minulosti a 1 pacientka po enukleácii bulbu pre bolestivý glaukóm.

Tabuľka 1: Očná anamnéza v podobe očných príznakov počas trvania ochorenia COVID-19 a očných ochorení pred infekciou u pacientov s laboratórne verifikovanou infekciou SARS-CoV-2 a pozitívne výsledky RT-PCR testu zo spojovkových sekrétov a slz získaných výterom zo spojovkového vaku u týchto pacientov

Očná anamnéza		Počet pacientov	Pozitívny RT-PCR zo spojovkového vaku
Očné príznaky	začervenanie, rezanie, slzenie očí	1	0
	bolesť oka	1	0
	SPOLU	2	0
Očné ochorenia	stav po laserovom zákroku Excimer	1	0
	glaukóm	3	0
	pseudofakia	3	0
	súčasne glaukóm a pseudofakia	2	1
	trachóm v minulosti	1	1
	strabizmus	1	0
	syndróm suchých očí pre Sjögrenov syndróm s aplikáciou umelých slz	1	0
	diabetická retinopatia s pravidelnou aplikáciou intravitreálnych injekcií a po laserovom zákroku	1	0
	stav po enukleácii bulbu pre bolestivý glaukóm	1	1
	SPOLU	14	3
CELKOVO		16	3

Diskusia

V našom súbore 149 pacientov s laboratórne verifikovanou infekciou SARS-CoV-2 malo 25 pacientov (16,78 %) pozitívny RT-PCR test zo spojovkového vaku. V celom súbore sme zaznamenali 16 pacientov s pozitívnu očnou anamnézou, z toho 14 pacientov malo očné ochorenia už pred infekciou a 2 pacienti mali očné príznaky počas ochorenia COVID-19. U 3 pacientov s očnou anamnézou bol výsledok RT-PCR testu zo spojovkových sekrétov a slz pozitívny.

Štúdia uskutočnená v čínskej provincii Hubei na 38 pacientoch s klinickými prejavmi COVID-19 dokázala pozitívny RT-PCR test z nazofaryngu u 28 pacientov a 2 mali pozitívny aj RT-PCR test zo spojovky, 12 z 38 pacientov malo očné príznaky konjunktivitídy, a to hyperémiu, chemózu spojovky, slzenie a zvýšenú sekréciu (7).

Publikácia zaoberajúca sa 27 pediatrickými pacientami hospitalizovanými s potvrdeným COVID-19 pomocou RT-PCR z nazofaryngu dokázala očné príznaky miernej vírusovej konjunktivitídy u 4 pacientov

Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Darina Lysková, Zuzana Prídavková, Juraj Sekáč, Pavol Veselý, Pavol Kusenda, Alena Furdová: SARS-CoV-2 v spojovkových sekrétoch a slzách u pacientov s COVID-19 a pozitívnu očnou anamnézou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 13-16.

(15 %). 3 pacienti zo súboru mali pozitívny RT-PCR test zo spojovky, z toho 1 mal očné príznaky a 2 boli bez očnej manifestácie ochorenia (8).

Zhang et al. skúmali 102 pacientov s klinickými príznakmi COVID-19, z ktorých 72 malo pozitívny RT-PCR test z nazofaryngu. Z týchto 72 pacientov mali 2 prejavy konjunktivitídy, pričom len u 1 z 2 pacientov sa SARS-CoV-2 potvrdil v očných sekrétoch (9).

Zhou et al. publikovali prácu, v ktorej 121 pacientov malo laboratórne potvrdené ochorenie COVID-19, z toho 8 pacientov malo očné príznaky (6,6 %). Celkovo 3 pacienti mali pozitívny RT-PCR test z odberov zo spojovky, z nich 1 mal očné príznaky a 2 boli bez očných symptómov (10).

V egyptskej provincii Sohng malo 28 pacientov pozitívny RT-PCR test z nazofaryngu, z toho 10 z nich (35,71 %) malo príznaky konjunktivitídy. Z 28 pacientov malo 8 (28,57 %) pozitívny test zo slz a spojovky. Z 10 pacientov s príznakmi konjunktivitídy mali 3 pozitívny RT-PCR test zo spojovky (11).

V štúdiu realizovanej v španielskom Madride na 36 laboratórne potvrdených COVID-19 pozitívnych pacientoch preukázali SARS-CoV-2 v spojovkovom vaku 2 pacientov (5,5 %). 18 pacientov malo príznaky konjunktivitídy, ale len u 1 z nich bol RT-PCR test zo spojovkového vaku pozitívny (12).

Karimi et al. testovali 43 pacientov, z toho 30 malo pozitívny RT-PCR test z nazofaryngu a 3 súčasne zo slz. Jeden pacient mal konjunktivitídu a zároveň aj pozitívny RT-PCR test zo slz (13).

Limitáciou našej práce bolo, že všetci pacienti v súbore boli hospitalizovaní, a teda u nich predpokladáme ťažší priebeh ochorenia COVID-19. Odber očnej anamnézy bol limitovaný zdravotným stavom pacientov v čase hospitalizácie.

Zoznam použitej literatúry

1. Ling XC, Kang EY, Lin JY, et al.: Ocular manifestation, comorbidities, and detection of severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2 from conjunctiva in coronavirus disease 2019: A systematic review and meta-analysis. *Taiwan J Ophthalmol* 2020;10(3):153-166.
2. Horkovičová K, Jurenová D, Lysková D, Plesníková P, Furdová A: COVID-19 and EYE. *International Journal of Health, New Technologies and Social Work* 2021;16(1):10-14.
3. Chen L, Deng C, Chen X, et al.: Ocular manifestations and clinical characteristics of 535 cases of COVID-19 in Wuhan, China: a cross-sectional study. *Acta Ophthalmol* 2020;98(8):e951-e959.
4. Chen L, Liu M, Zhang Z, et al.: Ocular manifestations of a hospitalised patient with confirmed 2019 novel coronavirus disease. *British Journal of Ophthalmology* 2020;104(6):748-751.
5. Khavandi S, Tabibzadeh E, Naderan M, Shoar S: Corona virus disease-19 (COVID-19) presenting as conjunctivitis: atypically high-risk during a pandemic. *Contact Lens Anterior Eye* 2020;43(3):211-212.
6. Navel V, Chiambaretta F, Dutheil F: Haemorrhagic conjunctivitis with pseudomembranous related to SARS-CoV-2. *Am J Ophthalmol Case Rep* 2020;19:100735.
7. Wu P, Duan F, Luo C, et al.: Characteristics of Ocular Findings of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Hubei Province, China. *JAMA Ophthalmol* 2020;138(5):575.
8. Valente P, Iarossi G, Federici M, et al.: Ocular manifestations and viral shedding in tears of pediatric patients with coronavirus disease 2019: a preliminary report. *J Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2020;24(4):212-215.
9. Zhang X, Chen X, Chen L, et al.: The evidence of SARS-CoV-2 infection on ocular surface. *Ocul Surf* 2020;18(3):360-362.
10. Zhou Y, Duan C, Zeng Y, et al.: Ocular Findings and Proportion with Conjunctival SARS-CoV-2 in COVID-19 Patients. *Ophthalmology* 2020;127(7):982-983.

Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Darina Lysková, Zuzana Prídavková, Juraj Sekáč, Pavol Veselý, Pavol Kusenda, Alena Furdová: SARS-CoV-2 v spojivkových sekrétoch a slzách u pacientov s COVID-19 a pozitívnou očnou anamnézou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 13-16.

11. Mahmoud H, Ammar H, El Rashidy A, Ali AH, Hefny HM, Mounir A: Assessment of Coronavirus in the Conjunctival Tears and Secretions in Patients with SARS-CoV-2 Infection in Sohag Province, Egypt. Clin Ophthalmol 2020;14:2701-2708.
12. Güemes-Villahoz N, Burgos-Blasco B, Arribi-Vilela A, et al.: Detecting SARS-CoV-2 RNA in conjunctival secretions: Is it a valuable diagnostic method of COVID-19? J Med Virol 2021;93(1):383-388.
13. Karimi S, Arabi A, Shahraki T, Safi S: Detection of severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 in the tears of patients with Coronavirus disease 2019. Eye 2020;34(7):1220-1223.

Juraj Sekáč, Paulína Plesníková, Denisa Jurenová, Darina Lysková, Alena Furdová: Chirurgická liečba sekundárnych glaukómov – naše skúsenosti verzus odporúčania Európskej glaukómovej spoločnosti. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 17-21.

4. Chirurgická liečba sekundárnych glaukómov – naše skúsenosti verzus odporúčania Európskej glaukómovej spoločnosti

MUDr. Juraj Sekáč
(oftalmológia)

Spoluautori: MUDr. Paulína Plesníková¹, MUDr. Denisa Jurenová¹, MUDr. Darina Lysková¹

Školiteľ: prof. PhDr. MUDr. Alena Furdová, PhD., MPH, MSc, FEBO

¹Klinika oftalmológie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice Bratislava

Úvod

Glaukóm je skupina ochorení rôznej etiológie. Spoločnou črtou je progresívna neuropatia zrakového nervu a následné nezvratné poškodenie zrakových funkcií (1). Bez adekvátnej liečby dochádza k postupnému poškodeniu až ireverzibilnej strate zrakových funkcií. Existujú mnohé možnosti a metódy liečby, no ich hlavným cieľom je zachovanie zrakových funkcií pacienta v kontexte s prijateľnou kvalitou života. Prechádzajú neustále vývojom a zlepšovaním (2). Chirurgická liečba sa realizuje zväčša v prípade zlyhania konzervatívneho spôsobu terapie, je zameraná na zníženie vnútroočného tlaku a zastavenie prebiehajúcej glaukómovej progresie, čím sa zlepšuje kvalita života pacienta. Špecifické postavenie majú sekundárne glaukómy, na ktorých vzniku sa podieľajú celkové ochorenia pacienta, úrazy oka, zápalové ochorenia, medikácie i dedičnosť. Ich diagnostika, prevencia a liečba má svoje špecifické postavenie (3,4).

Materiál a metódy

V práci vychádzame z analýzy súboru pacientov, ktorí boli v časovom intervale 5 rokov, od januára 2015 do decembra 2019 operovaní na Klinike oftalmológie LFUK a UNB Ružinov. Súbor pozostáva zo 163 očí, ktorým bola realizovaná chirurgická intervencia pre sekundárny glaukóm rôzneho typu. Všetci pacienti v súbore boli hospitalizovaní v danom časovom okne s hlavnou diagnózou sekundárny glaukóm, podľa medzinárodnej klasifikácie chorôb. Celkový počet pacientov je 152, z toho 64 žien a 88 mužov. Priemerný vek pacientov je 55 rokov s mediánom 66,5 rokov s maximom 89 rokov a minimom 19 rokov. Všetci zaradení pacienti sú naďalej v pravidelnej dispenzarizácii na glaukómovej ambulancii Kliniky oftalmológie LFUK a UNB. U pacientov sme v pooperačnom období v intervale do 2 rokov sledovali ďalší vývoj ochorenia, subjektívne prejavy (bolesť očí a hlavy, periméter) a objektívne prejavy, a to hodnotu vnútroočného tlaku s nutnosťou adjuvantnej terapie a progresiu v objektívnom náleze vyžadujúcu reoperáciu.

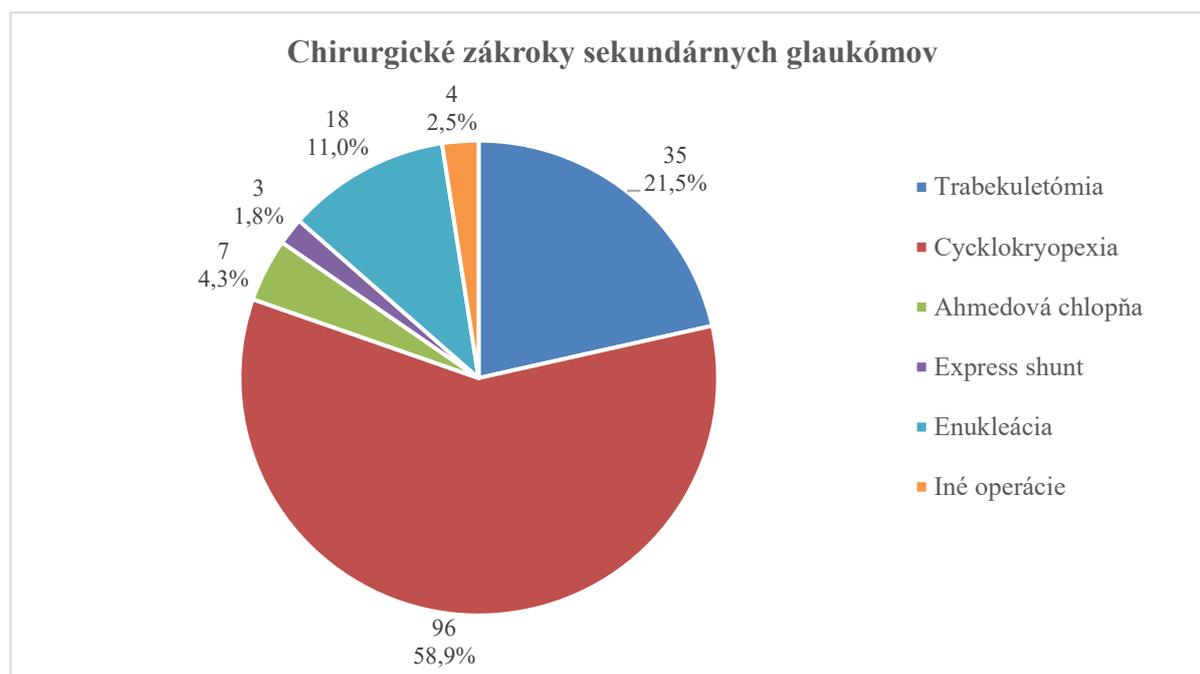
Juraj Sekáč, Paulína Plesníková, Denisa Jurenová, Darina Lysková, Alena Furdová: Chirurgická liečba sekundárnych glaukómov – naše skúsenosti verus odporúčania Európskej glaukómovej spoločnosti. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 17-21.

Výsledky

Skúmaný súbor pozostáva zo 152 pacientov, ktorým bola realizovaných 163 chirurgických zákrokov pre sekundárny glaukóm rôzneho typu.

Tabuľka 1 Počet chirurgických zákrokov jednotlivých typov sekundárnych glaukómov

Sekundárne glaukómy	2015	2016	2017	2018	2019	Spolu
Pseudoexfoliatívny	10	6	5	3	4	28
Pigmentový	1	0	0	0	0	1
Neovaskulárny pri diabetes mellitus	13	11	9	2	4	39
Neovaskulárny inej etiológie	4	11	5	4	3	27
Pourazový	3	2	2	0	2	9
Pozápalový	9	3	3	3	5	23
Pooperačný (PPV)	6	1	3	4	1	15
Šošovkou indukovaný	1	0	0	1	0	2
Iné	2	4	5	5	3	19



Graf 1 Celkový počet chirurgických zákrokov u sekundárnych glaukómoch

Na základe získaných dát zhrnutých v tabuľke 1 a grafe 1 vyplýva, že vo vybranom súbore očí bola trabekulektómia realizovaná u 35 očí (21,5% z celkového počtu operovaných očí), u 7 bola použitá antifibrotická látka. Cyklokryoterapia bola ako chirurgická metóda liečby použitá u 96 očí (58,9%), z toho 61 očí pre neovaskulárny glaukóm, čo predstavuje 63,5% cyklokryopexii a 37,4% všetkých operácií pre sekundárny glaukóm. Použitie metód a techník miniinvazívnej glaukómovej chirurgie v našom súbore pozorujeme u 10 očí (6,1%), implantácia Express shuntu u 3 očí, Ahmedová chlopňa bola implantovaná 7 očiam. Z 22 (13,5%) operačných techník, ktoré nie sú určené priamo na liečbu glaukómu je najpočetnejšia enukleácia. V našom súbore bola enukleácia realizovaná u 18 očí (11,0%). Zvyšné 4 výkony (2,5%) predstavujú operácia katarakty a pars plana vitrektómia.

Juraj Sekáč, Paulína Plesníková, Denisa Jurenová, Darina Lysková, Alena Furdová: Chirurgická liečba sekundárnych glaukómov – naše skúsenosti verus odporúčania Európskej glaukómovej spoločnosti. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 17-21.

Tabuľka 2 Príznaky v pooperačnom období – trabekulektómia, cyklokryopexia

		Trabekulektómia		Cyklokryopexia	
		počet očí	percentuálne zastúpenie	počet očí	percentuálne zastúpenie
Subjektívne príznaky	Bolesť hlavy / očí	8	22,9%	64	66,7%
	Zlepšenie perimetra	11	31,4%	2	2,1%
	Zhoršenie perimetra	6	17,1%	1	1,0%
Objektívne príznaky	Zvýšenie vnútroočného tlaku (adjuvantná terapia)	8	22,9%	38	39,6%
	Reoperácia	6	17,1%	2	2,1%

Tabuľka 2 uvádza subjektívne a objektívne príznaky v pooperačnom období u trabekulektómie a cyklokryopexie. V pooperačnom intervale 2 rokov, v prípade trabekulektómie pozorujeme subjektívne ťažkosti ako bolesť hlavy alebo očí u 8 očí (22,9%), zlepšenie na perimetri u 11 očí (31,4%) a zhoršenie u 6 očí (17,1%). U cyklokryopexie pozorujeme bolesť hlavy alebo očí u 64 očí (66,7%), zlepšenie na perimetri u 2 očí (2,1%) a zhoršenie u 1 oka (1,0%).

Zvýšenie vnútroočného tlaku s nutnosťou adjuvantnej lokálnej antiglaukomatóznej terapie pozorujeme v prípade trabekulektómie u 8 očí (22,9%) a u 38 očí (39,6%) po cyklokryopexii. Nutnosť ďalšej reoperácie do 2 rokov bola po trabekulektómii u 6 očí (17,1%), po cyklokryopexii u 2 očí (2,1%).

Diskusia

Podľa najnovších odporúčaní Európskej glaukómovej spoločnosti, najčastejšie používaný chirurgický zákrok v liečbe primárnych glaukómov je trabekulektómia. V prípade sekundárnych glaukómov jej postavenie nie je také jednoznačné. To dokazuje aj analýza našich pozorovaní. Podľa našich výsledkov bola trabekulektómia realizovaná len u 35 očí, čo predstavuje len 21,5% z celkového počtu operovaných očí pre sekundárny glaukóm.

Cyklokryoterapia podľa odporúčaní EGS z roku 2014 a 2020, predstavuje obsolentnú metódu a vo vyspelých európskych krajinách sa používa len zriedkavo (4,5). Výkon na zníženie tvorby komorového moku, cyklokryoterapiu, realizujeme pomocou transklerálnej kryosondy. Jej teplota je -60°C až -70°C , rozsah aplikácie 180° v 5-6 bodoch nad corpus ciliare, aplikačná dĺžka približne 55 sekúnd až 1 minúta pri každom bode (6). V našom súbore bola cyklokryopexia realizovaná u 96 očí, čo predstavuje 58,9% zo všetkých realizovaných operácií sekundárnych glaukómov. Cyklokryoterapia bola u všetkých neovaskulárnych glaukómov realizovaná u 61 očí, čo predstavuje 63,5% cyklokryopexii a 37,4% všetkých operácií pre sekundárny glaukóm. V najväčšej miere, v 36 prípadoch (37,5% z cyklokryopexii) bola táto metóda použitá na liečbu neovaskulárneho sekundárneho glaukómu spôsobeného progredujúcim diabetes mellitus, kde prispieva nielen k stabilizácii VOT, ale aj k zmierneniu rubeózy dúhovky. V 25 prípadoch (26,0% z cyklokryopexii) je zastúpený neovaskulárny glaukóm s využitím efektu cyklokryopexie na zníženie novotvorby ciev na dúhovke a v dúhovkovo-rohovkovom uhle (6,7). Zo daného vyplýva, že najčastejšie zvolenou metódou u sekundárnych glaukómov bola cyklokryopexia, a to najmä u neovaskulárneho glaukómu pri diabetes mellitus. Podľa našich zistení, použitie cyklokryopexie je vhodné najmä pri dekompenzovaných

Juraj Sekáč, Paulína Plesníková, Denisa Jurenová, Darina Lysková, Alena Furdová: Chirurgická liečba sekundárnych glaukómov – naše skúsenosti verus odporúčania Európskej glaukómovej spoločnosti. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 17-21.

glaukómoch s vysokými hodnotami VOT (nad 40 torr), v prípadoch, keď predchádzajúca antiglaukómová terapia zlyhala, alebo v prípadoch bolestivých bulbov s praktickou až úplnou slepotou. Efekt zníženia VOT je veľmi dobrý. Podľa Mlčáka a kol. (2009) je cyklokryopexia na Slovensku i v Čechách stále dôležitým operačným výkonom, najmä v liečbe refraktérnych glaukómov a priamym účinkom na zníženie produkcie komorového moku a deštrukciu buniek vráskovca priamo vedie k zníženiu VOT (7). Pri porovnaní percentuálneho zastúpenia pre jednotlivé subjektívne a objektívne príznaky ako uvádza tabuľka 2 sme zistili, že v liečbe sekundárnych glaukómov je pooperačnom priebehu lepšie subjektívne tolerovaná trabekulektómia (22,9%) v porovnaní s cyklokryopexiou (66,7%). Bolesť po cyklokryopexii vymizli u všetkých pacientov do 1-2 týždňov od operačného výkonu, po trabekulektómii do týždňa. Nutnosť adjuvantnej lokálnej antiglaukomatóznej terapie je u 8 očí (22,9%) po trabekulektómii a 38 očí (39,6%) po cyklokryopexii. Potreba reoperácie bola po trabekulektómii u 6 očí (17,1%), po cyklokryopexii len u 2 očí (2,1%). Z našich zistení vyplýva, že cyklokryopexia v liečbe sekundárnych glaukómov je v porovnaní s trabekulektómiou subjektívne horšie tolerovaná, a taktiež je častejšie nutná adjuvantná antiglaukomatózna terapia. Avšak z dlhodobého hľadiska stabilizácie glaukómu bez nutnosti ďalšej reoperácie je cyklokryopexia vhodnejšou metódou.

Novou alternatívou ku klasickým chirurgickým technikám je miniinvazívna glaukómová chirurgia. V súčasnosti je najviac rozvíjajúcou sa oblasťou chirurgickej liečby glaukómu (8). V našom súbore sa nachádzalo pomerne málo očí s použitím drenážnych implantátov alebo mikroshuntov, čo značne znižuje výpovednú hodnotu.

V určitých situáciách možno v rámci chirurgickej liečby sekundárneho glaukómu použiť aj operačné techniky, nie priamo na liečbu glaukómu. Sú to pomocné chirurgické techniky, ktoré predstavujú vo väčšine prípadov poslednú možnosť a sú paliatívnymi metódami (9). Enukleácia je radikálnym riešením u vysoko rizikového, výrazne bolestivého glaukómu s atrofiou zrakového nervu (10). V skúmanom súbore bola realizovaná enukleácia u 18 očí, 11,0% zo všetkých chirurgických operácií. Najčastejšie bolo príčinou enukleácie nádorové ochorenie, a to u 11 očí, čo predstavuje 61,1% zo všetkých enukleácií pre sekundárny glaukóm. Malígný melanóm choroidey je zastúpený v 81,8% a malígný melanóm riasnatého telesa v 18,2%. Príčina bolestivého refraktérneho sekundárneho glaukómu v 3 prípadoch enukleácie bola ťažká iridocyklitída, v 2 prípadoch vitreoretinálna operácia, a po 1 prípade pre malígný glaukóm po predchádzajúcom ataku centrálnej arteriálnej oklúzie a glaukóme následkom úrazu a devastáčného poškodenia očného bulbu.

Záver

Glaukóm je závažné ochorenie oka, ktoré bez adekvátnej liečby vedie k postupnému poškodeniu zrakového nervu a zrakových funkcií. To, akú metódu liečby použijeme závisí od viacerých faktorov, ako je stav poškodenia zraku a zrakových funkcií, fáza ochorenia, v ktorej sa ochorenie nachádza, spolupráce a ochoty pacienta liečiť sa a dodržiavať liečebný postup, ale aj možnosti samotného pracoviska, či znalosti a zručnosti ošetrojúceho lekára.

V retrospektívnej analýze údajov sme zistili významné postavenie cyklokryopexie v chirurgickej liečbe sekundárnych glaukómov. Použitie cyklokryopexie napriek klesajúcemu európskemu trendu predstavuje pre nás dôležitú metódu v liečbe refraktérnych sekundárnych glaukómov s vysokými hodnotami VOT, nereagujúcich na konzervatívnu terapiu. Pri sekundárnych glaukómoch netreba zabúdať ani na liečbu základnej diagnózy ako kauzálnej príčiny stavu.

Starostlivosť o pacienta musí byť individuálna a prispôbená všetkým pacientovým potrebám, s ohľadom na jeho aktuálny zdravotný stav, vedomosti a znalosti a s prihliadnutím na jeho socioekonomický status. Pravidelné kontroly a dispenzarizácia pacienta je

Juraj Sekáč, Paulína Plesníková, Denisa Jurenová, Darina Lysková, Alena Furdová: Chirurgická liečba sekundárnych glaukómov – naše skúsenosti verus odporúčania Európskej glaukómovej spoločnosti. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 17-21.

v manažmente glaukómu veľmi dôležitá, najmä pre včasnú reakciu na nastupujúcu progresiu ochorenia a prispôsobenie liečby podloženej najnovšími poznatkami a odporúčaniami.

Zoznam použitej literatúry

1. Rozsival P, Diblík P, Dotřelová D, Hejčmanová D, Hlinomazová Z, Jirásková N, et al. Oční lékařství. 2. Praha: Galén; 2017. 52 p. (Galén).
2. Razeghinejad R, Lin MM, Lee D, Katz LJ, Myers JS. Pathophysiology and management of glaucoma and ocular hypertension related to trauma. *Surv Ophthalmol.* 2020 Oct;65(5):530–47.
3. Ferková S. Glaukómová choroba - rizikové faktory, diagnostika a rozdelenie [Internet]. 2012 [cited 2020 Jan 1]. Available from: <https://portal.fmed.uniba.sk/clanky.php?aid=214>
4. European Glaucoma Society. Terminology and Guidelines for Glaucoma. Savona: PubliComm; 2014. 195 p.
5. European Glaucoma Society. Terminology and Guidelines for Glaucoma. Savona: PubliComm; 2020. 169 p.
6. Kuchynka P, Autrata R, Boguszaková J, Diblík P, Hlinomazová Z, Kocur I, et al. Oční lékařství. Praha: Grada; 2016. 936 p.
7. Mlčák P, Karhanová FEBO M, Marešová K. Chirurgická léčba glaukomu. *Prakt Lékárenství.* 2009 May 1;5(3):118–23.
8. Ansari E. An Update on Implants for Minimally Invasive Glaucoma Surgery (MIGS). *Ophthalmol Ther.* 2017 Dec;6(2):233–41.
9. Gessesse GW, Damji KF. Advanced Glaucoma: Management Pearls. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2013;20(2):131–41.
10. Wanner JB, Pasquale LR. Glaucomas secondary to intraocular melanomas. *Semin Ophthalmol.* 2006 Sep;21(3):181–9.

Paulína Plesníková, Denisa Jurenová, Darina Lysková, Zuzana Prídavková, Juraj Sekáč, Pavol Veselý, Pavol Kusenda, Alena Furdová: Prítomnosť vírusovej RNA SARS-CoV-2 v spojovkovom vaku u pacientov s potvrdeným ochorením COVID-19. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 22-25.

5. Prítomnosť vírusovej RNA SARS-CoV-2 v spojovkovom vaku u pacientov s potvrdeným ochorením COVID-19

MUDr. Paulína Plesníková¹
(Oftalmológia)

Spoluautori: MUDr. Denisa Jurenová¹, MUDr. Darina Lysková¹, MUDr. Zuzana Prídavková¹, MUDr. Juraj Sekáč¹, MUDr. Pavol Veselý¹, MUDr. Pavol Kusenda¹

Školiteľ: prof. PhDr. MUDr. Alena Furdová, PhD., MPH., MSc., FEBO¹

¹Klinika oftalmológie LF UK a UN Bratislava, Nemocnica Ružinov

Úvod

Koncom roka 2019 sa začalo svetom šíriť koronavírusové ochorenie (COVID-19) spôsobené koronavírusom 2 spôsobujúcim ťažký akútny respiračný syndróm (SARS-CoV-2). Pandémia ochorenia COVID-19 sa stala predmetom mnohých štúdií v snahe pochopiť spôsob prenosu vírusu SARS-CoV-2, ako aj správanie sa vírusu v organizme. Koronavírusy (CoVs) sa môžu manifestovať v respiračnom trakte, gastrointestinálnom trakte, oku a iných orgánových systémoch. Patogenéza koronavírusom je známa, ale ich oftalmologická manifestácia nie je dostatočne preskúmaná. Pre ľudí je infekčných 7 typov koronavírusov, všetky spôsobujú ochorenie respiračného traktu, ktoré sa manifestuje v rôznej miere (1,2). Počas epidémie spôsobenej SARS-CoV (koronavírus spôsobujúci ťažký akútny respiračný syndróm) v roku 2003 sa zistil výskyt ribonukleovej kyseliny (RNA) SARS-CoV v slzách nakazených pacientov (3). Povrch oka je vystavený infekčným kvapkám podobne ako sliznica respiračného traktu. Sliznica respiračného traktu a oko zdieľajú receptory pre niekoľko respiračných vírusov (4). Ľudské respiračné vírusy vykazujú určitý očný tropizmus, môžu spôsobiť očnú infekciu alebo infekciu respiračného traktu po kontakte s okom. Z predchádzajúcich štúdií vieme, že oko predstavuje jednu z brán vstupu vírusu do organizmu. V prehľade publikovanom v Taiwan Journal Ophthalmology sa uvádza prevalencia očnej manifestácie SARS-CoV-2 na 7 %, pričom prítomnosť vírusovej RNA bola prítomná len u 1 % vzoriek (5). Podľa neoficiálnych vyjadrení môže byť očnou manifestáciou ochorenia COVID-19 konjunktivitída, v takom prípade je oftalmológ prvým zdravotníckym pracovníkom prichádzajúcim do kontaktu s pacientom. V práci sa venujeme problematike výskytu vírusovej RNA SARS-CoV-2 v spojkových sekrétoch u pacientov s potvrdeným ochorením COVID-19.

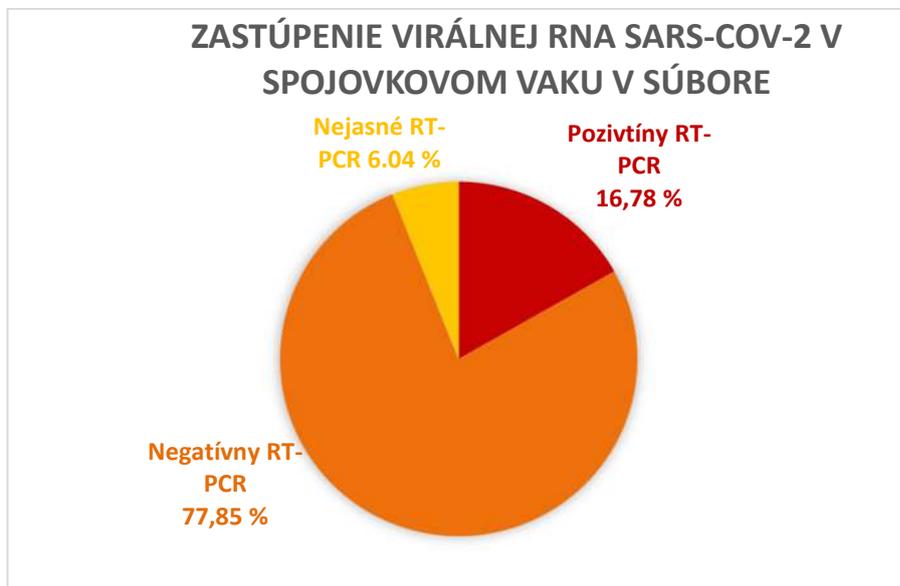
Materiál a metódy

Postupovali sme na základe predpokladu prítomnosti vírusovej RNA SARS-CoV-2 v spojovkovom vaku pacientov s potvrdeným ochorením COVID-19. Podmienkou zaradenia pacienta do štúdie bolo laboratórne potvrdené ochorenie COVID-19. V súbore túto podmienku spĺňalo 149 pacientov, všetci boli hospitalizovaní v Univerzitetnej nemocnici v Bratislave v období január – február 2021. Pozitívny PCR test (polymerázová reťazová reakcia) z nazofaryngeálneho odberu malo 145 pacientov, jeden pacient mal ochorenie potvrdené pomocou antigénového testu a traja pacienti mali ochorenie potvrdené testom protilátok proti SARS-CoV-2 v krvi. Informácie o zdravotnom stave sme čerpali od pacientov a z ich zdravotnej dokumentácie. Samotný odber sme realizovali v ochrannom odevu s ochrannými pracovnými pomôckami sterom zo spojovkového vaku. Ster bol vykonaný po everzii dolnej mihalnice plynulým pohybom od vonkajšieho kútika po spojovke k dolnému slznému bodu bez dezinfekcie a bez znečistenia spojovky. Vzorka zo spojovkového vaku bola odobraná z oboch očí pacienta rovnakou odberovou sondou, ktorá bola následne vložená do odberovej skúmavky s transportným médiom. Všetky vzorky boli vyhodnotené metódou RT-PCR (polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkriptázou).

Výsledky

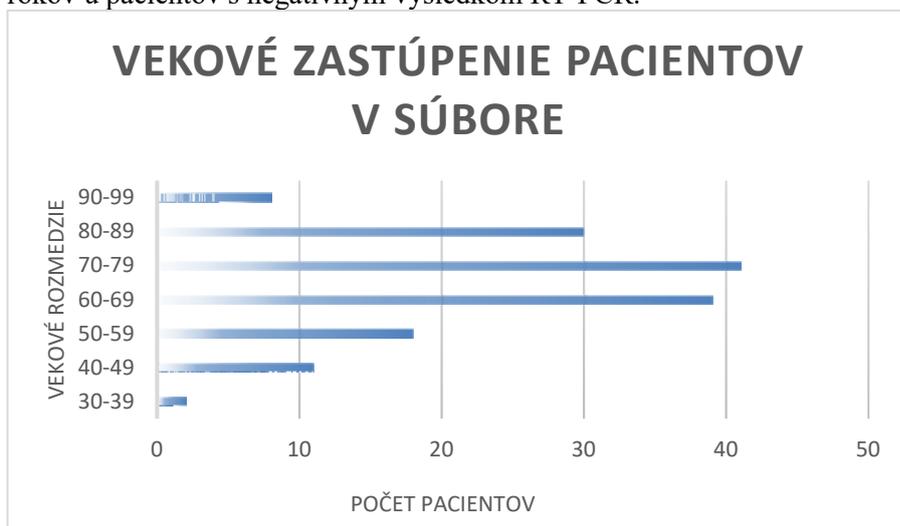
Paulína Plesníková, Denisa Jurenová, Darina Lysková, Zuzana Pridavková, Juraj Sekáč, Pavol Veselý, Pavol Kusenda, Alena Furdová: Prítomnosť vírusovej RNA SARS-CoV-2 v spojovkovom vaku u pacientov s potvrdeným ochorením COVID-19. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 22-25.

V súbore 149 pacientov s potvrdeným ochorením COVID-19 bolo 73 žien a 76 mužov s vekovým priemerom 70 rokov. U 25 pacientov (16,78 %) bol pozitívny RT-PCR zo spojovkového vaku, u 115 (77,85 %) bol výsledok negatívny a u 9 (6,04 %) bol výsledok nejasný.



Graf č.1 Grafické znázornenie výsledkov RT-PCR testov zo spojovkového vaku v súbore

Z 25 pozitívne testovaných pacientov bolo 12 žien a 13 mužov, medzi pohlaviami sme nezaznamenali signifikantný rozdiel. Dĺžku trvania ochorenia sme hodnotili ako interval medzi testom potvrdzujúcim ochorenie a odberom vzorky zo spojovkového vaku. Priemerná hodnota trvania ochorenia v celom súbore bola 6,17 dní, pričom priemerná dĺžka ochorenia u pacientov s pozitívnym RT-PCR testom zo spojovkového vaku bola 5,88 dní. Interval trvania ochorenia bol 0 – 24 dní v celom súbore. Priemerný vek v súbore bol 74 rokov u pacientov s pozitívnym RT-PCR zo vzorky zo spojovkového vaku a 69 rokov u pacientov s negatívnym výsledkom RT-PCR.



Graf č.2 Grafické znázornenie vekového zastúpenia pacientov v testovanom súbore

Najväčšie zastúpenie pacientov v súbore bolo vo vekovom rozložení 70-79 rokov s celkovým počtom 41. Najmenej ich bolo zastúpených vo vekovom rozmedzí 30-39 rokov. Vekový priemer pacientov v súbore bol 70 rokov. Všetci pacienti v súbore boli hospitalizovaní na špeciálne vyhradených covid oddeleniach a liečení pomocou kyslíka, ale neboli napojení na umelú pľúcnu ventiláciu. U 135 z nich bola na základe RTG (skiagrafia) alebo CT (počítačová tomografia) dokázaná covidová pneumónia. Na

Paulína Plesníková, Denisa Jurenová, Darina Lysková, Zuzana Prídavková, Juraj Sekáč, Pavol Veselý, Pavol Kusenda, Alena Furdová: Prítomnosť vírusovej RNA SARS-CoV-2 v spojovkovom vaku u pacientov s potvrdeným ochorením COVID-19. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 22-25.

základe získaných informácií môžeme zhodnotiť náš súbor pacientov ako pacientov so stredne ťažkým priebehom ochorenia COVID-19, čo mohlo byť jednou z limitácií štúdie. Výsledky RT-PCR zo spojovkového vaku mohli byť ovplyvnené citlivosťou testov na SARS-CoV-2, ako aj samotným množstvom vírusu v spojovkovom vaku. U negatívnych výsledkov RT-PCR testu zo spojovkového vaku nevieme s určitosťou vylúčiť prítomnosť vírusu v inom štádiu ochorenia.

Diskusia

Koronavírus SARS-CoV-2 spôsobuje ochorenie, ktoré je stále výzvou pre zdravotníkov rôznych špecializácií. Od začiatku pandémie, ktorú zapríčinil, bolo publikovaných mnoho štúdií zaoberajúcich sa problematikou patogenézy vírusu, jeho prenosu, ale aj jeho očnou manifestáciou. Na základe poznatkov z predošlých epidémií, ktoré spôsobili koronavírusy, predpokladáme prítomnosť vírusovej RNA SARS-CoV-2 v spojovkových sekrétoch. V roku 2004 publikovali štúdiu zameranú na zistenie prítomnosti RNA SARS-CoV v slzách. Od 36 pacientov s podozrením na SARS-CoV odobrali vzorky k následnej analýze pomocou RT-PCR, u troch z nich sa prítomnosť vírusovej RNA SARS-CoV potvrdila (3). Genóm SARS-CoV vykazuje 82 % zhodu s vírusom SARS-CoV-2 (6). Uvádza sa, že SARS-CoV-2 má podobný receptor ako SARS-CoV, ktorý mu umožňuje infikovať hostiteľské bunky prostredníctvom ACE 2 (angiotenzín-konvertujúceho enzýmu 2). Expresia ACE 2 bola okrem pľúcnej alveolárnej sliznice identifikovaná aj v iných tkanivách ľudského tela, ako je rohovka alebo spojovka oka (7,8). Začiatkom roka 2020 sa v univerzitnej nemocnici Wuhan podarilo odobrať vzorky zo spojovkového vaku 121 pacientom s potvrdeným ochorením COVID-19, u troch (2,47 %) z nich sa preukázala RNA SARS-CoV-2 pomocou RT-PCR (9). Ďalšia štúdia bola realizovaná tímom Fang a kol, kde odobrali 32 vzoriek zo spojovkového vaku, 5 (15,6 %) z nich bolo pozitívnych na prítomnosť vírusovej RNA SARS-CoV-2 (10). V Taliansku boli odobraté vzorky zo spojovkového vaku 108 pacientom, z toho 91 malo potvrdené ochorenie COVID-19 a u 52 (57,14 %) z nich sa preukázala prítomnosť RNA SARS-CoV-2 v spojovkovom vaku (11). Percentuálne zastúpenie RNA SARS-CoV-2 v spojovkovom vaku v iných štúdiách vo svete je 5,55 % (12), 6,97 % (13), 3,3 % (14) a 24 % (15). Doteraz realizované štúdie vo svete dokazujú v určitej miere prítomnosť vírusovej RNA SARS-CoV-2 v spojovkových sekrétoch oka počas ochorenia COVID-19. Negatívny výsledok RT-PCR testu zo vzoriek zo spojovkového vaku nevylučuje prítomnosť vírusu v očných sekrétoch v inej fáze ochorenia ako tej, kedy bol realizovaný odber. Samotná citlivosť testov RT-PCR je pre vykonanie štúdie dôležitá. Ďalšou limitáciou štúdie je aj fakt, že vzorky boli odoberané hospitalizovaným pacientom s ťažším priebehom ochorenia.

Zoznam použitej literatúry

1. Corman VM, Muth D., Niemeyer D., Drosten C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2018;100:163-188.
2. Gralinski LE, Baric RS. Molecular pathology of emerging coronavirus infections. *J Pathol.* 2015;235(2):185-195.
3. Loon SC, Teoh SC, Oon LL, et al. The severe acute respiratory syndrome coronavirus in tears. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(7):861-863.
4. Paulsen F: Functional anatomy and immunological interactions of ocular surface and adnexa. *Dev Ophthalmol.* 2008;41:21-35.
5. Ling XC, Kang EY, Lin JY, et al. Ocular manifestation, comorbidities, and detection of severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2 from conjunctiva in coronavirus disease 2019: A systematic review and meta-analysis. *Taiwan J Ophthalmol.* 2020;10(3):153-166.
6. Chan JF, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):221-236.
7. Lange C, Wolf J, Auw-Haedrich C, et al. Expression of the COVID-19 receptor ACE2 in the human conjunctiva. *J Med Virol.* 2020;92(10):2081-2086.
8. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F: Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Journal of Virology.* 2020;94(7):e00127-00120

Paulína Plesníková, Denisa Jurenová, Darina Lysková, Zuzana Prídavková, Juraj Sekáč, Pavol Veselý, Pavol Kusenda, Alena Furdová: Prítomnosť vírusovej RNA SARS-CoV-2 v spojovkovom vaku u pacientov s potvrdeným ochorením COVID-19. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 22-25.

9. Zhou Y, Duan C, Zeng Y, et al. Ocular Findings and Proportion with Conjunctival SARS-CoV-2 in COVID-19 Patients. *Ophthalmology*. 2020;127(7):982-983.
10. Fang Z, Zhang Y, Hang C, et al. Comparisons of viral shedding time of SARS-CoV-2 of different samples in ICU and non-ICU patients. *J Infect*. 2020;81(1):147-178.
11. Azzolini C, Donati S, Premi E, et al. SARS-CoV-2 on Ocular Surfaces in a Cohort of Patients With COVID-19 From the Lombardy Region, Italy. *JAMA Ophthalmol*. 2021.
12. Güemes-Villahoz N, Burgos-Blasco B, Arribi-Vilela A, et al. Detecting SARS-CoV-2 RNA in conjunctival secretions: Is it a valuable diagnostic method of COVID-19? *J Med Virol*. 2021;93(1):383-388.
13. Karimi S, Arabi A, Shahraki T, Safi S: Detection of severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 in the tears of patients with Coronavirus disease 2019. *Eye (Lond)*. 2020;34(7):1220-1223.
14. Xia J, Tong J, Liu M, Shen Y, Guo D: Evaluation of coronavirus in tears and conjunctival secretions of patients with SARS-CoV-2 infection. *J Med Virol*. 2020;92(6):589-594.
15. Arora R, Goel R, Kumar S, et al. Evaluation of SARS-CoV-2 in Tears of Patients with Moderate to Severe COVID-19. *Ophthalmology*. 2020;128(4):494-503.

Ján Urban, Magda Suchánková, Martina Gánovská, Eva Tedlová, František Sándor, Vladimír Leksa, Brian König, Mária Bucová: Úloha CX3CL1 a ADAM17 v patogeneze difúzných parenchýmových pľúcnych chorôb. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 26-31.

6. Úloha CX3CL1 a ADAM17 v patogeneze difúzných parenchýmových pľúcnych chorôb

MUDr. Ján Urban^{1,2}
(Normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: MUDr. Magda Suchánková, PhD.¹, RNDr. Martina Gánovská², MUDr. Eva Tedlová, PhD.³, MUDr. František Sándor, PhD.³, MUDr. Vladimír Leksa, PhD.⁴, Ing. Brian König, PhD.⁵

Školiteľ: doc. MUDr. Mária Bucová, CSc., mim. prof.¹

¹Imunologický ústav LF UK, Bratislava, ²NÚTPCHaHCH Vyšné Hágy, ³Klinika pneumológie a ftizeológie LF UK a UN, Bratislava, ⁴Ústav molekulárnej biológie SAV, Bratislava, ⁵Fakulta hospodárskej informatiky, Ekonomická univerzita, Bratislava

Úvod

Difúzne parenchýmové pľúcne choroby (DPPCH) tvoria rozsiahlu heterogénnu skupinu chorôb s viac ako 200 diagnostickými jednotkami. Charakteristickou črtou DPPCH je postihnutie pľúcneho interstícia rôznym stupňom zápalu a fibrózy s akumuláciou extracelulárnej matrix. DPPCH sa vyskytujú buď ako idiopatické formy, bez neznámeho vyvolávateľa alebo ako následok známeho spúšťača (autoimunitné choroby, rôzne lieky, anorganický a organický prach). Ich prognóza závisí od prebiehajúceho imunologického procesu, ktorý je väčšinou zápalovou odpoveďou na známy alebo neznámy spúšťač. Pretrvávajúci zápalový proces môže viesť k aktivácii fibrotizujúceho procesu, ktorý postupne vedie k deštrukcii architektiky pľúcneho parenchýmu s následným narušením výmeny plynov a respiračným zlyhávaním. Najhoršiu prognózu má progresívny fibrotický fenotyp choroby (1). Hlavným problémom DPPCH s ohľadom na početnosť diagnostických jednotiek je diferenciálna diagnostika a limitované možnosti liečby. Pre rozšírenie liečebných možností je mimoriadne dôležité pochopenie imunopatogenézy týchto chorôb.

Fraktalkín (CX3CL1) je jediným CX3C-chemokínom. CX3CL1 sa vyskytuje v dvoch formách – membránovej a solubilnej, ktorá pôsobí ako silný chemoatraktant podporujúci migráciu NK (natural killers) buniek, cytotoxických T-lymfocytov a makrofágov (2). Membránová forma sa tvorí na endotelových bunkách ako adhezívna molekula a podporuje migráciu leukocytov do miesta zápalu. CX3CL1 produkujú aj epitelové bunky pľúc, obličiek a čreva (3). Solubilná forma CX3CL1 je z membrán buniek uvoľňovaná proteolýzou pôsobením TNF- α -konvertujúceho enzýmu (TACE/ADAM17) (4). CX3CL1 sa viaže na svoj špecifický receptor (CX3CR1) v pomere 1:1 (5). CX3CR1 tvoria hlavne CD16+ NK bunky, CD14+ monocyty a CD3+ lymfocyty (6).

Úloha CX3CL1 v patogeneze DPPCH bola len nedávno potvrdená na animálnom modeli Ishidom a spol. (7) a v niektorých štúdiách v ľudskej populácii (8, 9).

V našej štúdii sme vyhodnocovali potenciálnu úlohu CX3CL1 v patogeneze DPPCH u ľudí. Cieľom našej štúdie bolo zistiť koncentrácie solubilnej formy CX3CL1 v tekutine z bronchoalveolárnej laváže (BALT) pacientov s rôznymi typmi DPPCH – pľúcna sarkoidóza (PS), idiopatická pľúcna fibróza (IPF), hypersenzitívna pneumonitída (HP) a intersticiálne pľúcne postihnutie pri systémových chorobách spojiva (SOS-IPP). Koncentrácie CX3CL1 sme porovnávali medzi jednotlivými skupinami DPPCH a tiež medzi fibrotickými a nefibrotickými štádiami DPPCH. Na základe predchádzajúcich zistení ohľadom ADAM17, pôsobiaceho ako enzým, ktorý uvoľňuje solubilnú formu CX3CL1, sme vyhodnocovali tiež vzťah medzi koncentraciami CX3CL1 k ADAM17 v BALT.

Metódy

Ján Urban, Magda Suchánková, Martina Gánovská, Eva Tedlová, František Sándor, Vladimír Leks, Brian König, Mária Bucová: Úloha CX3CL1 a ADAM17 v patogeneze difúzných parenchýmových pľúcnych chorôb. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 26-31.

Do štúdie sme zaradili 270 pacientov s DPPCH, ktorých sme rozdelili do 4 hlavných skupín: 156 pacientov s PS, 46 pacientov s IPF, 46 pacientov s HP a 22 pacientov so SOS-IPP. Diagnózy PS, IPF, HP a SOS-IPP boli stanovené v súlade s aktuálnymi medzinárodnými diagnostickými odporúčaniami odborníkov ako výsledok konsenzu multidisciplinálneho tímu (pneumológ, rádiológ a patológ) v zariadení špecializovanom na diagnostiku a liečbu pľúcnych chorôb. Následne sme zo skupín PS, HP a SOS-IPP vytvorili dve podskupiny: fibrotickú a nefibrotickú, a to podľa prítomnosti/nepítomnosti charakteristických fibrotických zmien na HRCT (počítačová tomografia s vysokým rozlíšením) skenoch pľúc.

Fibrotická skupina označená OFI (ostatná fibróza) pozostávala zo 46 pacientov - 7 pacientov z PS skupiny (IV. štádium sarkoidózy), 21 pacientov z HP skupiny (chronická/fibrotická HP) a 18 pacientov zo skupiny SOS-IPP (fibrotické štádium SOS-IPP).

Nefibrotická skupina označená NFI (non-fibróza) pozostávala zo 178 pacientov – 149 pacientov z PS skupiny (I.-III. štádium sarkoidózy), 25 pacientov z HP skupiny (zápalová/nefibrotická HP) a 4 pacientov z SOS-IPP skupiny.

Kontrolnú skupinu (KS) tvorilo 16 pacientov bez klinických a rádiologických znakov DPPCH a bez významnej odchýlky v rozpočte buniek BALT.

BALT sme získali od všetkých pacientov počas bronchoskopie v rámci diagnostického procesu DPPCH. Vybraný bronchiálny segment bol lavážovaný instiláciou fyziologického roztoku v objeme 120-160 ml, v troch až štyroch 40 ml alikvotných objemoch s následnou aspiráciou roztoku medzi jednotlivými instilovanými objemami. Následne sme vzorku BALT scentrifigovali a supernatant uchovali pri -80°C až do analýzy. Koncentrácie CX3CL1 a ADAM17 sme stanovili pomocou ELISA testu (Human Fractalkine Elisa test, Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17; FineTest, Wuhan Fine Biotech Co., China) presne podľa návodu výrobcu.

Štatistické spracovanie

Na posúdenie rozloženia dát (parametrické/neparametrické) sme použili Kolmogorov-Smirnov test. Získané údaje sme porovnali pomocou štatistických testov Kruskal-Wallis s Dunn post-testom. Modely logistickej regresie (logit) boli použité na zistenie vplyvu skúmaného markeru na konkrétnu pľúcnu diagnózu. Na vyhodnotenie možného použitia markeru v diferenciálnej diagnostike pri odlíšení fibrotického ochorenia pľúc od ostatných DPPCH sme využili ROC krivku. Štatistickú analýzu sme robili použitím SAS a stata softwaru.

Výsledky

Zvýšená koncentrácia CX3CL1 u pacientov s IPF a HP

V porovnaní s KS mali signifikantne vyššie koncentrácie CX3CL1 v BALT pacienti s IPF ($p < 0,01$) a HP ($p < 0,05$). V skupine pacientov s PS a SOS-IPP sme nezistili signifikantné rozdiely v porovnaní s KS. Pri porovnaní jednotlivých skupín pacientov s DPPCH sme zistili signifikantne nižšie koncentrácie CX3CL1 u pacientov s PS ($p < 0,001$) v porovnaní s ostatnými skupinami pacientov s DPPCH (IPF, HP, SOS-IPP). Medzi IPF, HP a SOS-IPP pacientmi nebol signifikantný rozdiel v koncentrácii CX3CL1 v BALT.

Vysoko signifikantné rozdiely sme zaznamenali v koncentráciách CX3CL1 u oboch fibrotických skupín (skupina s IPF a skupina OFI) v porovnaní s nefibrotickou (NFI) skupinou ($p < 0,001$) pacientov s DPPCH. Medzi skupinou pacientov s IPF (primárna fibróza) a skupinou OFI (sekundárna fibróza) sme nenašli signifikantný rozdiel v hladine CX3CL1.

Na základe zistených údajov sme využitím modelov logistickej regresie zistili, že zvýšené hladiny CX3CL1 v BALT vysoko signifikantne korelujú s rizikom rozvoja fibrózy pľúc, a to aj po odkontrolovaní vplyvu ostatných faktorov, ktoré sú spojené s vyšším rizikom rozvoja fibrózy (vek, pohlavie a fajčenie). Ďalej sme skúmali prediktívnu schopnosť nameraných koncentrácií CX3CL1 na odlíšenie fibrotického a nefibrotického procesu. Využitím ROC krivky sme zistili, že CX3CL1 má ako biomarker vysokú prediktívnu schopnosť odlíšiť fibrotický pľúcny proces od nefibrotických DPPCH, o čom svedčí aj hodnota plochy pod krivkou (AUC) 0,8182. Najvyššia hodnota Youdenovho indexu (0,5586), ktorá

Ján Urban, Magda Suchánková, Martina Gánovská, Eva Tedlová, František Sándor, Vladimír Leksa, Brian König, Mária Bucová: Úloha CX3CL1 a ADAM17 v patogenéze difúzných parenchýmových pľúcnych chorôb. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 26-31.

poskytuje informáciu o kvalite diagnostického testu, bola dosiahnutá pri hodnotách senzitivity 0,7802 a špecificity 0,7784.

Koncentrácia solubilného ADAM-17 v BALT je zvýšená u HP a znížená u IPF

Zistili sme signifikantne vyššie koncentrácie ADAM17 v BALT v skupine pacientov s HP ($p < 0,01$) v porovnaní s KS. Nezistili sme signifikantné rozdiely v koncentráciách ADAM17 v ďalších skupinách DPPCH v porovnaní s KS. Okrem toho sme zistili signifikantne nižšie koncentrácie ADAM17 v skupine pacientov s IPF v porovnaní so skupinou s HP ($p < 0,001$), PS a SOS-IPP ($p < 0,05$). Následne, pri porovnávaní koncentrácií ADAM17 medzi skupinami IPF, OFI a NFI, sme zistili signifikantne nižšie koncentrácie u pacientov s IPF v porovnaní s OFI aj NFI skupinou ($p < 0,01$). Žiadny signifikantný rozdiel v koncentracii ADAM17 nebol zistený pri porovnaní skupín OFI a NFI.

Pacienti s IPF mali najvyšší pomer CX3CL1/ADAM17

Nakoniec sme vyhodnocovali pomer koncentrácií CX3CL1/ADAM17 a zistili sme signifikantne vyššiu hodnotu tohto pomeru u pacientov s IPF v porovnaní s KS ($p < 0,01$). Signifikantný rozdiel sme namerali aj pri porovnaní pacientov s IPF s ostatnými skupinami pacientov s diagnózami DPPCH – PS ($p < 0,001$), HP ($p < 0,01$), SOS-IPP ($p < 0,01$) (Graf 1a). neboli zistené pri porovnaní zvyšných skupín pacientov s DPPCH diagnózami s KS sme nezaznamenali signifikantné rozdiely v tomto pomere. u. Našli sme však signifikantný rozdiel v hodnote pomeru CX3CL1/ADAM17 u skupiny s IPF v porovnaní so skupinami OFI ($p < 0,01$) aj NFI ($p < 0,001$). Signifikantný rozdiel pomeru CX3CL1/ADAM17 sme zistili aj medzi skupinami OFI a NFI ($p < 0,01$) (Graf 1b).

Predpoklad, že vyššia hodnota pomeru CX3CL1/ADAM17 je spojená s vyššou pravdepodobnosťou diagnózy IPF podporili aj výsledky modelov logistickej regresie. Aj po zohľadnení iných faktorov, ktoré môžu mať vplyv na rozvoj IPF (vek, pohlavie a fajčenie), ostal vplyv pomeru CX3CL1/ADAM17 štatisticky signifikantný, čo znamená, že pomer CX3CL1/ADAM17 je spojený s vyššou pravdepodobnosťou diagnózy IPF.

Na základe našich výsledkov demonštrujúcich vysokú hodnotu pomeru CX3CL1/ADAM17 u pacientov s IPF sme využitím analýzy logistickej regresie hodnotili schopnosť využitia pomeru CX3CL1/ADAM17 v diagnostike pri rozlíšení IPF od ostatných DPPCH diagnóz. ROC krivka a hodnota plochy AUC 0,8424 dokazuje vysokú prediktívnu schopnosť pomeru CX3CL1/ADAM17 ako biomarkeru pri odlíšení IPF od ostatných DPPCH diagnóz. Najvyššia hodnota Youdenovho indexu (0,6657) bola dosiahnutá pri hodnotách senzitivity 0,8077 a špecificity 0,8580 (Graf 2).

Diskusia

Účasť osi CX3CL1-CX3CR1 v patogenéze DPPCH nebola popísaná až do nedávna, kedy Ishida a spol. prvýkrát poukázali na jej možnú úlohu v patogenéze fibrózy pľúc (7). V experimentálnom modeli bleomycínom indukovanej pľúcnej fibrózy pri myšiach zistil signifikantne nižší stupeň fibrózy u CX3CR1-deficientných myší v porovnaní s myšami, ktoré CX3CR1 exprimovali. Potvrdil tiež väčšie množstvo M2 (profibrotických) makrofágov v BALT CX3CR1-exprimujúcich myší v porovnaní s M1 makrofágmi, čo bolo v kontraste s opačným pomerom zastúpenia týchto typov makrofágov u CX3CR1-deficientných myší. Navyše, pľúcne tkanivo CX3CR1-deficientných myší obsahovalo menšie množstvo fibrocytov v porovnaní s CX3CR1-exprimujúcimi myšami. Okrem toho zistili, že nižšie hladiny TGF- β (transformujúci rastový faktor),- ktorý je dôležitým profibrogénne pôsobiacim cytokínom, boli namerané v pľúcach CX3CR1-deficientných myší, a to na génovej aj proteínovej úrovni v porovnaní s CX3CR1-exprimujúcimi myšami.

Doteraz bolo publikovaných len pár štúdií, ktoré sa zaoberajú úlohou CX3CL1-CX3CR1 systému v patogenéze DPPCH u ľudí. Hoffman-Vold a spol. (8) vo svojej práci porovnávali koncentrácie CX3CL1 v sére a pľúcnom tkanive pacientov postihnutých intersticiálnym pľúcny procesom asociovaným so systémovou sklerózou a u zdravej populácie. Koncentrácie CX3CL1 boli vyššie v sére a v pľúcnom tkanive týchto pacientov v porovnaní so zdravou populáciou, pričom negatívne korelovali s difúznou

Ján Urban, Magda Suchánková, Martina Gánovská, Eva Tedlová, František Sándor, Vladimír Leksa, Brian König, Mária Bucová: Úloha CX3CL1 a ADAM17 v patogeneze difúzných parenchýmových pľúcnych chorôb. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 26-31.

kapacitou pľúc a pozitívne korelovali s koncentráciou anti-topoizomerázy-I a rozsahom pľúcneho postihnutia. S ohľadom na túto štúdiu sa CX3CL1 zdá byť asociovaný s progresívnym pľúcnym postihnutím u systémovej sklerózy.

Najnovšie sa úlohe CX3CL1 u DPPCH venovali vo svojej práci Greiffo a spol. (9). Autori poukázali na vplyv CX3CL1 pri transmigrácii CX3CR1-exprimujúcich monocytov z krvi do fibrózy postihnutých pľúc ľudí s rôznymi DPPCH.

Je dávnejšie známe, že IPF je primárny fibrotický proces s nízkym stupňom zápalu (10). Chronická HP, SOS-IPP a PS majú tiež potenciál rozvoja sekundárneho fibrotického procesu (11). V súlade s predchádzajúcimi štúdiami dokazujeme aj v našej štúdii zapojenie CX3CL1 do patogenezy fibrotického procesu u IPF aj OFI (IV. štádium sarkoidózy, fibrotická HP a SOS-IPP). Dokázali sme vyššie koncentrácie CX3CL1 v BALT pacientov s IPF aj OFI v porovnaní s KS. Nezistili sme signifikantný rozdiel v koncentráciách CX3CL1 medzi IPF a OFI, avšak tento rozdiel bol signifikantný u oboch týchto skupín v porovnaní s NFI. Tento výsledok podporuje dôkazy o dôležitosti CX3CL1 pri rozvoji fibrotického procesu. Potenciál CX3CL1 v patogeneze fibrotického pľúcneho procesu je zrejmý bez rozdielu, či sa jedná o primárny (IPF) alebo sekundárny fibrotický proces (HP, CTD-SOS, PS). Najnižšie koncentrácie CX3CL1 namerané v skupine pacientov s PS pravdepodobne súvisia s najnižším fibrotickým potenciálom PS, ktorý je asociovaný so špecifickým zápalovým procesom (malý spolupodiel CD8+ T-lymfocytov) v porovnaní s HP a SOS-IPP (12).

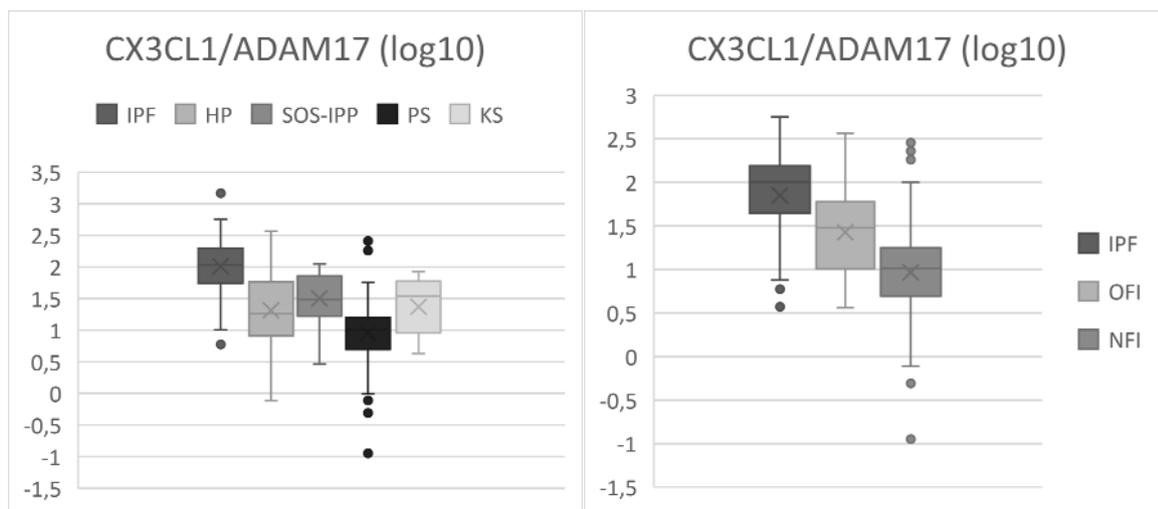
Z predchádzajúcich výskumov je známe, že membránová forma CX3CL1 je štiepená z bunkového povrchu proteolyticky pôsobením ADAM17 (4). Naše výsledky podporujú hypotézu, že ADAM17 zohráva kľúčovú úlohu pri uvoľňovaní solubilného CX3CL1 u HP a SOS-IPP, avšak u IPF pri jeho uvoľňovaní pravdepodobne pôsobí iný mechanizmus. Na základe našej štúdie nie je možné identifikovať mechanizmus vedúci k uvoľňovaniu CX3CL1 u IPF. Niektoré štúdie potvrdzujú úlohu ADAM17 v podporovaní zápalového procesu a nedostatok ADAM17 viedol k poklesu migrácie leukocytov do miesta zápalu (13). Nízka koncentrácia ADAM17 u IPF v našej štúdii koreluje s predchádzajúcimi štúdiami analyzujúcimi úlohu ADAM17 v zápalovom procese a potvrdzuje nízky stupeň zápalu u IPF v porovnaní s ostatnými DPPCH.

Mechanizmus vedúci k nízkej koncentrácii ADAM17 u IPF je nejasný a potrebuje byť skúmaný v ďalšom výskume. Jedným z možných faktorov nízkej hladiny ADAM17 u IPF môže byť tkanivový inhibítor metaloproteinázy-3 (TIMP-3) – prirodzený inhibítor tohto enzýmu (14). Garcia-Alvaréz a spol. demonštrovali vo svojej práci signifikantne vyššiu expresiu TIMP-3 génu a zastúpenie jeho proteínu vo fibroblastických fokusoch a v extracelulárnej matrix v tkanive pacientov s IPF (15).

Vysoká hodnota pomeru CX3CL1/ADAM17 u IPF v našej štúdii v porovnaní s ostatnými DPPCH skupinami je tiež zaujímavá. Vysoká hodnota AUC poukazuje na možnosť vytvorenia zaujímavého testu s vysokou senzitivitou a špecifitou a dobrou schopnosťou odlišiť IPF od ostatných DPPCH.

Nakoniec sme poukázali tiež na vysokú hodnotu CX3CL1/ADAM17 u IPF skupiny so signifikantným rozdielom v porovnaní k podskupine pacientov s ostatnými fibrotickými DPPCH (skupina OFI). S ohľadom na tento signifikantný rozdiel by mohol byť pomer CX3CL1/ADAM17 považovaný za pomocný diagnostický marker odlišujúci IPF a fibrotické štádiá ostatných DPPCH. Potrebný je však ďalší výskum, ktorý by podporil naše výsledky a validoval význam pomeru CX3CL1/ADAM17 ako vhodného biomarkera v diferenciálnej diagnostike IPF a ostatných fibrotizujúcich DPPCH.

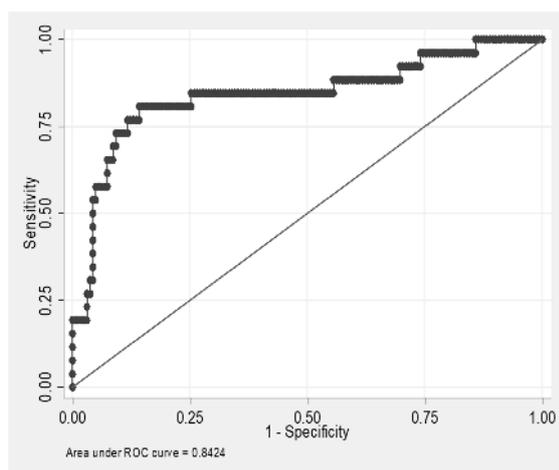
Ján Urban, Magda Suchánková, Martina Gánovská, Eva Tedlová, František Sándor, Vladimír Leksa, Brian König, Mária Bucová: Úloha CX3CL1 a ADAM17 v patogenéze difúzných parenchýmových pľúcnych chorôb. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 26-31.



1a

1b

Graf 1 – Porovnanie (\log_{10}) pomeru CX3CL1/ADAM17 v BALT: 1a) medzi jednotlivými DPPCH skupinami a kontrolnou skupinou, 1b) u idiopatickej pľúcnej fibrózy (IPF), fibrózy inej než IPF (OFI) a nefibrotických štádií DPPCH (NFI).



Graf 2 - ROC krivka prediktívnej schopnosti CX3CL1/ADAM17 rozlišovať IPF od ostatných DPPCH. Youdenov index = 0.6657; Senzitivita = 0.8077; Špecifcita = 0.8580.

Štúdia bola podporená grantom VEGA 1/0758/20

Zoznam použitej literatúry:

1. Wuyts WA, Agostini C, Antoniou KM, a spol. The pathogenesis of pulmonary fibrosis: a moving target. *Eur Respir J* 2013; 41: 1207–1218.
2. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, a spol. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997;385:640–644.
3. Kim K-W, Vallon-Eberhard A, Zigmund E, Farache J, Shezen E, Shakhar G, et al. In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood*. 2011;118:e156–e167.
4. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, a spol. Tumor necrosis factor α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1) *J Biol Chem*. 2001;276:37993–38001.

Ján Urban, Magda Suchánková, Martina Gánovská, Eva Tedlová, František Sándor, Vladimír Leks, Brian König, Mária Bucová: Úloha CX3CL1 a ADAM17 v patogeneze difúzných parenchýmových pľúcnych chorôb. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 26-31.

5. Imai T, Hieshima K, Haskell C, a spol. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*. 1997;91:521–530.
6. Nishimura M, Umehara H, Nakayama T, a spol. Dual functions of fractalkine/ CX3CR1 in trafficking of circulating cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J Immunol*. 2002;168:6173–6180.
7. Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, a spol. Essential involvement of the CX3CL1-CX3CR1 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis via regulation of fibrocyte and M2 macrophage migration. *Sci Rep*. 2017 Dec 4;7(1):16833.
8. Hoffmann-Vold AM, Weig SS, Palchevskiy V, a spol. Augmented concentrations of CX3CL1 are associated with interstitial lung disease in systemic sclerosis. *PLoS One*. 2018;13(11):e0206545.
9. Greiffo FR, Viteri-Alvarez V, Frankenberger M, a spol. CX3CR1–fractalkine axis drives kinetic changes of monocytes in fibrotic interstitial lung diseases. *Eur Respir J* 2020; 55:1900460.
10. Coward WR, Saini G, Jenkins G. The pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Ther Adv Respir Dis*. 2010;4:367–88.
11. Cottin V, Wollin L, Fischer A, a spol. Fibrosing interstitial lung diseases: knowns and unknowns. *Eur Respir Rev* 2019;28(151):180100.
12. Brodeur TY, Robidoux TE, Weinstein JS, a spol. IL-21 Promotes Pulmonary Fibrosis through the Induction of Profibrotic CD8+ T Cells. *J Immunol*. 2015;195(11):5251-60.
13. Arndt PG, Strahan B, Wang Y, Long C, Horiuchi K, Walcheck B. Leukocyte ADAM17 regulates acute pulmonary inflammation. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e19938.
14. Lee MH, Verma V, Maskos K, a spol. Engineering N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-3 to be a better inhibitor against tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme, *Biochem. J*. 2002;364:227-34.
15. García-Alvarez J, Ramirez R, Checa M, a spol.. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is up-regulated by transforming growth factor-beta1 in vitro and expressed in fibroblastic foci in vivo in idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res*. 2006;32(5):201-14.

Darina Lysková, Zuzana Prídavková, Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Juraj Sekáč, Pavol Kusenda, Pavol Veselý, Alena Furdová: Odtlačková cytológia spojovky ako diagnostická metóda v oftalmológii. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 32-35.

7. Odtlačková cytológia spojovky ako diagnostická metóda v oftalmológii.

MUDr. Darina Lysková¹
(oftalmológia)

Spoluautori: MUDr. Zuzana Prídavková¹, MUDr. Denisa Jurenová¹, MUDr. Paulína Plesníková¹, MUDr. Juraj Sekáč¹, MUDr. Pavol Kusenda¹, MUDr. Pavol Veselý¹

Školiteľ: Prof. MUDr. PhDr. Alena Furdová, PhD., MPH., MSc.

¹ Klinika oftalmológie LF UK a UN Bratislava, Nemocnica Ružinov

Úvod

Cieľom našej práce bolo poukázať na možnosť využitia odtlačkovej cytológie spojovky v oftalmológii. Táto metóda slúži k získaniu buniek z povrchovej vrstvy spojovky oka. Získané bunky sú ďalej fixované, zafarbené a hodnotené z morfológického a imunohistochemického hľadiska. Umožňujú nám hodnotiť povrch oka a jeho poškodenie. Napríklad v dôsledku syndrómu suchého oka, malígneho melanómu spojovky, či iných lézií prerastajúcich na spojovku oka, a tým zlepšiť diagnostiku. Skorá diagnostika najmä u malígnych ochorení ovplyvňuje stratégiu terapie. (1)

V našom súbore sme odobrali vzorky pomocou odtlačkovej cytológie spojovky u 20 pacientov vyšetrených na Klinike Oftalmológie Lekárskej Fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a Univerzitnej Nemocnici Bratislava v septembri 2020. Malígne ochorenie v periokulárnej oblasti sme potvrdili u 20% z nich. Najčastejšiou diagnózou bol bazocelulárny karcinóm (BCC) v 15% prípadoch. U všetkých pacientov s BCC bola terapia zásadne chirurgická. Tumor bol odstránený celý s voľnými okrajmi.

Jednou z limitácií chirurgickej terapie malígneho ochorenia v periokulárnej oblasti je veľkosť tumoru. Ak je diagnostikované v pokročilom štádiu, jeho rozsiahla terapeutická chirurgická resekcia môže poškodiť funkciu a vzhľad mihalnice. Včasná diagnostika a chirurgický zákrok sľubujú lepšie estetické výsledky. (2)

Materiál a metódy

Súbor

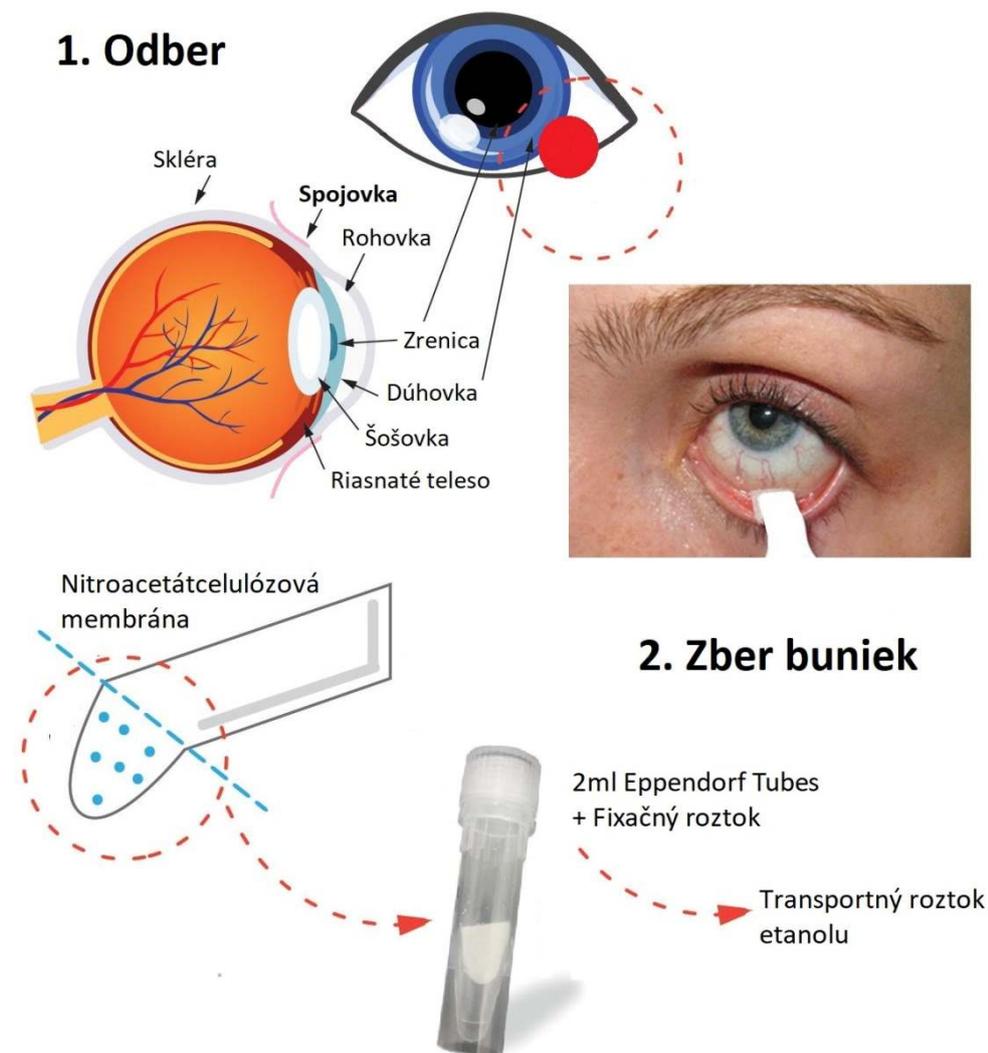
Sledovanú skupinu tvorilo 20 pacientov, ktorým bola poskytnutá zdravotná starostlivosť na Klinike Oftalmológie Lekárskej Fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a Univerzitnej Nemocnici Bratislava v septembri 2020. Pacienti boli zvolení náhodne. Podmienkou pre zaradenie do súboru bola prítomnosť viditeľnej alebo hmatateľnej rezistencie v periokulárnej oblasti. Lézia bola viditeľná a popísaná pri objektívnom fyzikálnom vyšetrení pomocou očného biomikroskopu (štrbinovou lampou). Všetci pacienti pred zákrokom podpísali informovaný súhlas s odberom vzorky na odtlačkovú cytológiu spojovky.

Odtlačková cytológia spojovky

Je neinvazívna, nebolestivá metóda. Pri odbere vzorky sme pacientovi na spojovku priložili sterilný odberový materiál, nitroacetátcelulózyový filtračný papier – membránu. (Obrázok 1.) Pomocou pinzety a sklenenej lopatky sme filtračný papier - membránu zľahka pritlačili po dobu 3-5 sekúnd. Ide o nebolestivý výkon. Aplikácia lokálnych anestetík väčšinou nebola potrebná. Vykonali sme ju len v prípade silného žmurkacieho reflexu. V tomto prípade sme podali lokálne anestetikum Benoxi 0,4%. Podľa protokolu vyhotovenom v Laboratóriu biológie a patológie oka, Prvej Lekárskej Fakulty Univerzity Karlovej a Všeobecnej Fakultnej Nemocnice sme odobrali 2 vzorky z lézie. Ďalšie 4 vzorky sme odobrali zo zvyšných kvadrantov, po jednej z každého kvadrantu spojovky: hore, dole, nazálne,

Darina Lysková, Zuzana Príдавková, Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Juraj Sekáč, Pavol Kusenda, Pavol Veselý, Alena Furdová: Odtlačková cytológia spojovky ako diagnostická metóda v oftalmológii. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 32-35.

temporálne z oboch očí. Vždy sme tiež odobrali vzorku z druhého, kontralaterálneho oka. Miesta odberov sme zaznačili do žiadanky na cytologické vyšetrenie. Vzorky sme vkladali do skúmavky Eppendorf Tubes s fixačným roztokom, v ktorom boli po dobu 10 až 60 minút. Potom sme ich preniesli do skúmavky Eppendorf Tubes s transportným roztokom etanolu a obalili parafilmom. Skladovali sme ich v chladničke pri teplote 4-8°C a urýchlene transportovali do laboratória.



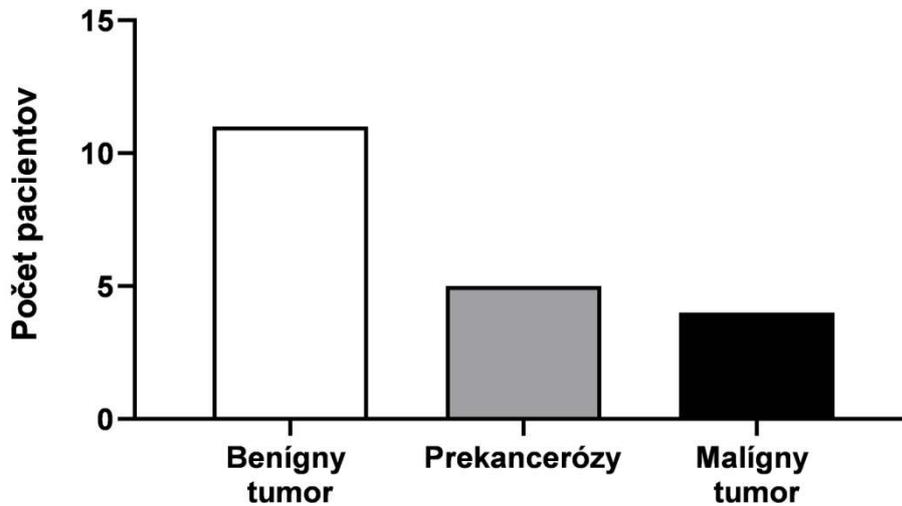
Obrázok 1: Odtlačková cytológia spojovky

Výsledky

V našom súbore 20 pacientov sme malígne ochorenie v periokulárnej oblasti potvrdili u 4 pacientov (20% prípadov). Najčastejšiou diagnózou bol BCC u 3 pacientov (15% prípadov). V literatúre sa uvádza mierna prevaha BCC u mužov. V našom súbore však boli postihnuté výlučne ženy. Terapia bola u všetkých zásadne chirurgická. Tumor bol odstránený celý, histologicky boli popísané voľné okraje a spodina vzoriek.

V hodnotenom súbore pacientov prevažovali benígne lézie, boli prítomné u 11 pacientov (55% prípadov). U 5 pacientov (25% prípadov) sme popísali ľahké atypie buniek, bez alebo s mitotickou aktivitou. Vzorky sme vyhodnotili ako prekancerózný stav.

Darina Lysková, Zuzana Prídavková, Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Juraj Sekáč, Pavol Kusenda, Pavol Veselý, Alena Furdová: Odtlačková cytológia spojovky ako diagnostická metóda v oftalmológii. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 32-35.



Graf 1. Počet pacientov v našom súbore, u ktorých sme tumor hodnotili ako benígný, malígný alebo prekancerózu. Do skupiny pacientov s prekancerózou boli zaradené vzorky pacientov, ktoré vykazovali ľahké atypie buniek, s alebo bez mitotickej aktivity.

Diskusia

Bazocelulárny karcinóm bol najčastejšie diagnostikovaný malígný nádor v našom súbore. Toto zistenie korešponduje s literatúrou, kde je popisovaný ako najčastejší malígný nádor mihalníc. Osemdesiat percent bazocelulárnych karcinómov sa nachádza v oblasti hlavy a krku, z toho dvadsať percent je lokalizovaných v oblasti mihalníc (3,4).

V Slovenskej republike BCC predstavoval 17,2% nádorov z celkového počtu hlásených malígnych nádorov v poslednom štatisticky spracovanom roku 2008. Na Klinike Oftalmológie, Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej Nemocnice v Bratislave sme zaznamenali 219 prípadov BCC v období od 2008 do roku 2013. Vrchol incidencie bol priemerne vo veku 70 rokov u oboch pohlaví (5).

Diagnostika malígnych ochorení v skorých štádiách ovplyvňuje stratégiu terapie. V prípade bazocelulárneho karcinómu je v skorších štádiách zásadne chirurgická. Metódou prvej voľby je široká excízia ložiska s voľnými okrajmi Mohsovou technikou. Odporúčaná je excízia 0,3 až 1cm od klinicky viditeľných okrajov nádoru. V oblasti mihalníc je preto výraznou limitáciou rozsah tumoru. Ak je diagnostikovaný v pokročilom štádiu, jeho rozsiahla terapeutická chirurgická resekcia môže výrazne poškodiť funkciu a vzhľad mihalnice. Prípadne viesť až k exenterácii očnice. Uvedená metóda patrí k najviac mutilujúcim chirurgickým výkonom v oftalmológii. Zvyčajne je potrebné odstrániť celý obsah očnice. Zvažuje sa u tumorov v pokročilých štádiách s rozsiahlou orbitálnou inváziou a u vysoko rizikových, agresívnych tumorov. V súbore 256 pacientov s histologicky potvrdeným bazocelulárnym karcinómom lokalizovaným v periokulárnej oblasti hospitalizovaných na Klinike oftalmológie LFUK a UNB, nemocnice Ružinov v Bratislave, v období od roku 2008 do roku 2014 sa indikovala exenterácia očnice u siedmich pacientov (2,7 %) (6).

Fyzikálne vyšetrenie pomocou očného biomikroskopu (štrbinovej lampy) má v diferenciálnej diagnostike v oftalmológii nezastupiteľnú úlohu. Taktiež, v prípade potreby terapeutickú chirurgickú resekciu lézie predpokladanú diagnózu musíme verifikovať pomocou histológie. Tento postup odtlačková cytológia spojovky nenahradí.

Darina Lysková, Zuzana Prídavková, Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Juraj Sekáč, Pavol Kusenda, Pavol Veselý, Alena Furdová: Odtlačková cytológia spojovky ako diagnostická metóda v oftalmológii. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 32-35.

Avšak interpretáciou výsledkov hodnotiacich povrch oka vieme neinvazívnym spôsobom spresniť diagnostiku. Využitím odtlačkovej cytológie spojovky vieme získať bunky povrchovej vrstvy spojovky oka. Tie následne hodnotí očný patológ z morfológického a imunohistochemického hľadiska. U lézií postihujúcich povrch oka môžeme túto metódu využiť ako pomocnú diagnostickú metódu. Je bezbolestná. K jej výhodám patrí aj možnosť odberu viacerých vzoriek počas jedného vyšetrenia (1). V klinickej praxi je dôležité rozlíšiť zmeny spojovkového epitelu u malígnych a u chronických zápalových ochorení (7).

V budúcnosti by sme radi pokračovali v odberoch u ďalších pacientov, a tým zvýšili počet pacientov v našej štúdií. Naším dlhodobým cieľom je postupne zaviesť túto nie bežne využívanú diagnostickú metódu v oftalmológii do praxe na našej klinike.

Nadalej je potrebné študovať metódy, ktoré urýchľujú a zlepšujú diagnostiku malígnych nádorov s cieľom odhaliť nové možnosti diagnostiky. Ďalšie štúdie na zhodnotenie efektivity, špecificity a senzitivity sú potrebné aj pri bežne používaných diagnostických metódach.

Zoznam použitej literatury

1. Nolan GR, Hirst LW, Wright RG, Bancroft B J: Application of impression cytology to the diagnosis of conjunctival neoplasms. *Diagnostic Cytopathology*, 1994; 11(3), 246–249.
2. Rouic LL, Desjardins L, Cassoux N, Gabriel CL: Basal cell carcinomas of the eyelid : Results of an initial surgical management. *J Gynecol Obstet Biol la Reprod*. 2019;42(10):1094–9.
3. Briggs E, Cook Jr, George B, Bartley M.: Treatment Options and Future Prospects for the Management of Eyelid Malignancies. *Ophthalmology*. 2001;6420(01):2088–98.
4. Deprez M, Uffer S: Clinicopathological Features of Eyelid Skin Tumors . A Retrospective Study of 5504 Cases and Review of Literature. *Am J Dermatopathology*. 2009;31(3):256–62.
5. Furdová A, Horkovičová K, Babál P, Kobzová D: Nemelanómové nádory kože mihalnic a vnútorného kútika - Bazocelulárny karcinóm. *Česká A Slov Oftalmol*. 2015;293–301.
6. Furdova A, Lukacko P: Periocular Basal Cell Carcinoma Predictors for Recurrence and Infiltration of the Orbit. *J Craniofac Surg*. 2016;28(1):84–7.
7. Jirsova K, Juklova K, Alfakih A, Filipec M: Presence of Snake-like Chromatin in Epithelial Cells of Keratoconjunctivitis Sicca Followed by a Large Number of Micronuclei. *Acta Cytologica* 2007;51:541-546.

Pavol Kusenda, Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Darina Lysková, Martin Čaprnda, Alena Furdová: Je možné dosiahnuť dlhodobé zlepšenie zrakovej ostrosti napriek poklesu intenzity liečby pri diabetickom edéme makuly? Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 36-40.

8. Je možné dosiahnuť dlhodobé zlepšenie zrakovej ostrosti napriek poklesu intenzity liečby pri diabetickom edéme makuly?

**MUDr. Pavol Kusenda, FEBO¹
(oftalmológia)**

Spoluautori: MUDr. Denisa Jurenová², MUDr. Paulína Plesníková², MUDr. Darina Lysková², MUDr. Martin Čaprnda, PhD.³

Školiteľ: prof. MUDr. PhDr. Alena Furdová, PhD., MPH, FEBO, MSc.²

¹Očné oddelenie, Univerzitná nemocnica – Nemocnica sv. Michala, Bratislava, ²Klinika oftalmológie LFUK a UNB, Bratislava, ³I. Interná klinika LFUK a UNB, Bratislava

Úvod

Diabetický edém makuly (DEM) je závažnou očnou komplikáciou diabetu. Patofyziologicky vzniká pri zlyhaní hematoretinálnej bariéry. Bez liečby môže opuch v mieste najostrejšieho videnia viesť k zhoršeniu ostrosti zraku až slepote.

Prvou voľbou liečby sú vnútroočne podávané injekcie inhibítorov cievneho endotelového rastového faktora (antiVEGF).

Randomizovaná klinická štúdia (RKŠ) DRRCR.net Protocol I preukázala pri liečbe DEM v priebehu 5 rokov zlepšenie a následnú stabilizáciu najlepšie korigovanej zrakovej ostrosti (NKZO) pri postupnom poklese intenzity terapie (1).

Výsledky z bežnej klinickej praxe pri vlhkej forme vekom podmienenej degenerácie makuly liečenej identickými antiVEGF preparátmi nezvyknú korešpondovať s RKŠ. Pacienti sú v realite často podliečení, zisky ich NKZO sú nižšie a nedarí sa ich dlhodobo udržať (2–4).

Cieľom práce je zistenie, či v reálnej klinickej praxi je pri terapii DEM možné dosiahnuť zisk zrakovej ostrosti a dlhodobo ho udržať pri súčasnej redukcii intenzity liečby podobne ako v RKŠ.

Materiál a metódy

Retrospektívna analýza výsledkov 6-ročnej antiVEGF liečby pacientov so zhoršením NKZO vplyvom DEM postihujúceho centrum.

Pri NKZO 20/25-20/200 liečba ranibizumabom 0,5 mg alebo afliberceptom 2 mg. Rôzne terapeutické režimy v súlade s dávkovaním uvedenom v SPC daného lieku. V druhom a ďalších rokoch liečby uprednostňovaný režim podľa potreby. Pri NKZO 20/250-20/400 liečba začatá off-label bevacizumabom 1,25 mg, pri zlepšení NKZO na $\geq 20/200$ ďalšia terapia ranibizumabom alebo afliberceptom.

Zaradení boli všetci pacienti z jedného pracoviska (aplikačného centra pre antiVEGF liečbu):

- u ktorých bola liečba iniciovaná v rokoch 2012 – 2017,
- bez predchádzajúcej antiVEGF a kortikoidnej liečby,
- s dokumentovanou dĺžkou liečby a sledovaním 1 - 6 rokov,
- ktorých zdravotná dokumentácia nebola presunutá do archívu (z dôvodu úmrtia),
- ktorí zároveň spĺňali nasledujúce inklúzne a exklúzne kritériá.

Vstupná NKZO 20/25 – 20/400, centrálna hrúbka sietnice (CST – central subfield thickness) ≥ 273 μm . Laser makuly mohol byť vykonaný pred začiatkom terapie alebo najskôr po 6 dávkach ranibizumabu/afliberceptu. Možná bola vzájomná zmena (switch) medzi ranibizumabom a afliberceptom v prípade nedostatočnej odpovede na liečbu.

Vylučujúcim kritériom bola prítomnosť iného očného ochorenia ovplyvňujúceho NKZO a vitreomakulárneho rozhrania vyžadujúca chirurgickú intervenciu.

Pavol Kusenda, Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Darina Lysková, Martin Čaprnda, Alena Furdová: Je možné dosiahnuť dlhodobé zlepšenie zrakovaj ostrosti napriek poklesu intenzity liečby pri diabetickom edéme makuly? Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 36-40.

Porovnanie zmien NKZO, CST, liečebnej záťaže (počtu injekcií) v priebehu 6 rokov liečby. Zrková ostrosť vyšetovaná na optotype ETDRS (early treatment diabetic retinopathy study), centrálna hrúbka makuly zistená optickou koherentnou tomografiou prístrojom Heidelberg Spectralis.

Štatistické spracovanie dát prebehlo v programe IBM SPSS Statistics verzia 25. Na overenie normality bol využitý Kolmogorov-Smirnovov test. Bola zistená absencia normálnej distribúcie. Dáta boli porovnávané Wilcoxonovým a Kruskal-Wallisovým testom. Signifikantné výsledky boli uvažované pri $p < 0,05$.

Výsledky

Do súboru bolo zaradených 63 očí (41 pacientov) spĺňajúcich inklúzne a exklúzne kritériá. Z toho 49,2% (n=31) bolo kontinuálne na liečbe ranibizumabom, 19% (n=12) afliberceptom a u 31,7% (n=20) došlo v priebehu sledovania k zmene antiVEGF.

V Tab.1 sú uvedené komplexné údaje o zrakovaj ostrosti, centrálnej hrúbke sietnice a terapeutickj záťaži v priebehu 6 rokov liečby. V celom súbore je pozorovateľné signifikantné zlepšenie zrakovaj ostrosti po 1. a následne aj 3. roku liečby, pričom v ďalšom období je NKZO už stabilizovaná. Edém sa signifikantne redukoval po 1. roku liečby a hrúbka makuly bola následne stabilná. Terapeutická záťaž (počet injekcií) signifikantne klesá každoročne v prvých piatich rokoch liečby. V 6. roku liečby je už počet injekcií proti 5. roku bez zmeny.

Tab.1: Zmena zrakovaj ostrosti, hrúbky sietnice a terapeutickj záťaže v priebehu sledovacieho obdobia – súhrn.

NKZO – najlepšie korigovaná centrálna zraková ostrosť (písmená optotypu ETDRS), CST – centrálna hrúbka sietnice (central subfield thickness) v μm . Hodnoty vyjadrené ako medián s interkvartilovým rozpätím.

	NKZO	CST	Počet injekcií / rok
Začiatok liečby (n=63)	68 [57-73]	419 [354-464]	-
Po 1. roku (n=63)	72 [59-79], P<0,001	297 [273-367], P<0,001	8 [5-9]
Po 2. roku (n=62)	74 [66,25-79], P=0,164	288 [259-348], P=0,052	4 [1,75-6], P<0,001
Po 3. roku (n=59)	75 [69-80], P=0,002	284 [258-328], P=0,414	3 [0-5], P=0,019
Po 4. roku (n=38)	74,4 [68-80,25], P=0,086	287,5 [256-329], P=0,763	1 [0-3], P<0,001
Po 5. roku (n=17)	78 [68-84,5], P=0,85	272 [230-301,5], P=0,868	0 [0-2], P=0,011
Po 6. roku (n=9)	75 [62-81], P=0,36	276 [202-309,5], P=0,361	0 [0-0,5], P=0,102

V Tab.2 sú výsledky analýzy zmeny zrakovaj ostrosti v čase s rozdelením podľa druhu terapie. Zrková ostrosť sa pri dlhodobej liečbe afliberceptom alebo ranibizumabom signifikantne zlepšila už po prvom roku liečby a bola udržaná bez zhoršenia v priebehu celého sledovacieho obdobia. U pacientov s nutnosťou zmeny antiVEGF preparátu sa signifikantné zlepšenie zrakovaj ostrosti s jej následným udržaním prejavilo až po 3. roku terapie.

Pavol Kusenda, Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Darina Lysková, Martin Čaprnda, Alena Furdová: Je možné dosiahnuť dlhodobé zlepšenie zrakovej ostrosti napriek poklesu intenzity liečby pri diabetickom edéme makuly? Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 36-40.

Tab.2: Zmena zrakovej ostrosti podľa typu liečebného preparátu v čase.

NKZO – najlepšie korigovaná centrálna zraková ostrosť, NA – nedostatok údajov pre výpočet. Hodnoty vyjadrené ako medián s interkvartilovým rozpätím.

Typ antiVEGF	NKZO začiatok	NKZO po 1. roku	NKZO po 2. roku	NKZO po 3. roku	NKZO po 4. roku	NKZO po 5. roku	NKZO po 6. roku
Aflibercept	60,5 [49,25-71,25]	69,5 [60,75-75,0], P=0,009	73,5 [58,25-75], P=0,574	71 [62,25-75,5], P=0,207	74 [69,25-81,75], P=0,068	NA	NA
Rôzne preparáty (switch)	68,0 [51,75-71,0]	63,0 [52,5-79], P=0,117	73,5 [59,25-75,75], P=0,236	75 [62-80], P=0,001	73 [56-78], P=0,122	59 [46-75], P=0,461	54 [50-74], P=0,317
Ranibizumab	70 [62-75]	74 [66-83], P=0,006	76,5 [71-82,5], P=0,387	78 [72-84], P=0,285	78 [69-84], P=0,083	81 [73,5-85], P=0,443	77,5 [73,75-85,25], P=0,498

V Tab.3 sú údaje o edéme v čase podľa typu preparátu. U pacientov na liečbe ranibizumabom a v skupine so zmenou antiVEGF bola významná redukcia hrúbky s následnou dlhodobou stabilizáciou po 1. roku liečby. Pacientom na liečbe afliberceptom sa edém významne redukoval po 2. roku liečby s následnou stabilizáciou.

Tab.3: Zmena hrúbky sietnice podľa typu liečebného preparátu v čase.

CST – centrálna hrúbka sietnice v μm , NA – nedostatok údajov pre výpočet. Hodnoty vyjadrené ako medián s interkvartilovým rozpätím.

Typ antiVEGF	CST začiatok	CST po 1. roku	CST po 2. roku	CST po 3. roku	CST po 4. roku	CST po 5. roku	CST po 6. roku
Aflibercept	505,5 [399-593]	369 [297-580,25], P=0,084	322 [267,5-368], P=0,015	334,5 [300,75-414], P=0,508	327,5 [293-467], P=0,465	NA	NA
Rôzne preparáty (switch)	434,5 [395,25-468,5]	294 [268,5-403,5], P=0,002	289,5 [257,25-418], P=0,717	305 [267,25-339,75], P=0,351	298 (272-344), P=0,221	309 [235,5-420], P=0,5	283 [199-309], P=0,317
Ranibizumab	395 [327-446]	280 [260-324], P<0,001	280 [255-307], P=0,537	273 [237-290,5], P=0,466	277 [237-316], P=0,702	268,5 [222-289], P=0,814	270,5 [202,5-312], P=0,753

Vstupná zraková ostrosť ($p=0,048$) a vstupná hrúbka sietnice ($p=0,01$) sa v skupinách s liečbou afliberceptom, rôznymi preparátmi a ranibizumabom významne líšila.

Terapeutická záťaž v skupine afliberceptu významne klesla v 2. roku liečby ($p=0,002$), následne sa stabilizovala. V skupine ranibizumabu významne klesol počet injekcií v 2. roku ($p<0,001$), v treťom sa stabilizoval a významne poklesol ešte vo 4. roku ($p=0,005$) s následnou stabilizáciou. U pacientov so zmenou preparátu bol zistený významný pokles intenzity liečby v 2. ($p=0,002$), 3. ($p=0,033$) a 4. roku ($p=0,001$).

Pavol Kusenda, Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Darina Lysková, Martin Čaprnda, Alena Furdová: Je možné dosiahnuť dlhodobé zlepšenie zrakovej ostrosti napriek poklesu intenzity liečby pri diabetickom edéme makuly? Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 36-40.

Diskusia

Cieľom antiVEGF liečby DEM je dosiahnuť maximálne zlepšenie videnia spolu s redukciou edému a dlhodobé udržanie tohto efektu. Z našich údajov vyplýva, že už v prvých rokoch terapie pacientom signifikantne zlepšime videnie a redukuje opuch. Pacienti nie sú podliečení, darí sa nám pozitívne účinky udržať dlhodo a vďaka tomu postupne výrazne znížiť množstvo injekcií – väčšina pacientov už v piatom a šiestom roku potrebuje len sledovanie.

Prvý rok liečby DEM je podľa multicentrickej štúdie POLARIS (5) v klinickej praxi pri liečbe ranibizumabom podľa potreby spojený s menším ziskom NKZO (+4,4 písmena) a menej intenzívnou terapiou (4,9 injekcií) v porovnaní s RKŠ. V našom súbore je zisk videnia po roku numericky podobný, pričom na liečbu bolo použitých 8 injekcií. Neznamená to, že úvodný rok liečime menej efektívne. Vstupná zraková ostrosť v našom súbore je totiž o 8,6 písmena vyššia ako v publikovanej práci (5). Naši pacienti mali teda menší priestor na zlepšenie videnia vplyvom stropového efektu. Ide teda o klinicky primerané zlepšenie videnia, ktoré sa vplyvom adekvátne intenzívnej terapie podarilo ešte viac zlepšiť po 3. roku liečby.

Pre ilustráciu vplyvu vstupnej zrakovej ostrosti uvádzam podskupinu našich pacientov na liečbe afliberceptom (s obdobnou vstupnou NKZO ako POLARIS), ktorí získali už po prvom roku liečby zisk +9,5 písmena, teda v súlade s RKŠ.

Existujú aj iné faktory, ktoré determinujú potenciál zisku NKZO – väčšie zlepšenie možno očakávať napr. pri absencii epiretinálnej membrány a prítomnosti subretinálnej tekutiny na začiatku terapie. Aj iné štrukturálne zmeny (v elipsoidnej zóne, hyperreflexné body, atrofia, tvrdé exsudáty...) môžu ovplyvniť efekt terapie (6,7).

Päťročné výsledky z nemeckej klinickej praxe ukazujú, že zisk videnia sa podarí dlhodo zlepšiť a udržať u 81% pacientov s DEM (8), náš súbor ilustruje optimistické vyhliadky v dlhšom časovom období.

Hlavným nedostatkom našej práce je postupný pokles počtu hodnotiteľných údajov. Časti pacientov ešte neuplynulo 6-ročné obdobie od začiatku liečby. Mnohí však svojvoľne prestali chodiť, pravdepodobne kvôli spokojnosti s videním a opakovaným kontrolám bez potreby ďalšej liečby pri stabilizovanom náleze, prípadne kvôli iným zdravotným ťažkostiam. Problém s compliance sa popisuje aj v literatúre – približne 1 zo 4 pacientov sa nedostaví na kontrolu do roka od poslednej injekcie (9). Zistené výsledky majú význam nielen pri hodnotení kvality a spôsobu zdravotnej starostlivosti poskytovateľa. Zaujímavé môžu byť aj pre platiteľov a regulátorov zdravotnej starostlivosti pri kreovaní a zmenách štandardných terapeutických postupov, posudzovaní efektivity a určovaní rozsahu preplácania tejto finančne náročnej liečby.

Záver

V reálnej klinickej praxi je pri terapii DEM možné dosiahnuť signifikantné zlepšenie zrakovej ostrosti a jej dlhodobé udržanie pri súčasnej redukcii intenzity terapie.

Zoznam použitej literatúry

1. Bressler SB, Glassman AR, Almkhatar T, et al. Five-Year Outcomes of Ranibizumab With Prompt or Deferred Laser Versus Laser or Triamcinolone Plus Deferred Ranibizumab for Diabetic Macular Edema. *Am J Ophthalmol.* 2016;164(2016):57-68. doi:10.1016/j.ajo.2015.12.025
2. Holz FG, Tadayoni R, Beatty S, et al. Multi-country real-life experience of anti-vascular endothelial growth factor therapy for wet age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2015;99(2):220-226. doi:10.1136/bjophthalmol-2014-305327
3. Souied EH, Oubraham H, Mimoun G, Cohen SY, Quere S, Derveloy A. Changes in visual acuity in patients with wet age-related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab in daily clinical practice. *Retina.* 2015;35(9):1743-1749. doi:10.1097/IAE.0000000000000548

Pavol Kusenda, Denisa Jurenová, Paulína Plesníková, Darina Lysková, Martin Čaprnda, Alena Furdová: Je možné dosiahnuť dlhodobé zlepšenie zrakovej ostrosti napriek poklesu intenzity liečby pri diabetickom edéme makuly? Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 36-40.

4. Finger RP, Wiedemann P, Blumhagen F, Pohl K, Holz FG. Treatment patterns, visual acuity and quality-of-life outcomes of the WAVE study - A noninterventional study of ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration in Germany. *Acta Ophthalmol.* 2013;91(6):540-546. doi:10.1111/j.1755-3768.2012.02493.x
5. Stefanickova J, Cunha-Vaz J, Ulbig M, et al. A noninterventional study to monitor patients with diabetic macular oedema starting treatment with ranibizumab (POLARIS). *Acta Ophthalmol.* 2018;96(8):e942-e949. doi:10.1111/aos.13771
6. Huang CH, Yang CH, Hsieh YT, Yang CM, Ho TC, Lai TT. Hyperreflective foci in predicting the treatment outcomes of diabetic macular oedema after anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Sci Rep.* 2021;11(1). doi:10.1038/s41598-021-84553-7
7. Panozzo G, Cicinelli MV, Augustin AJ, et al. An optical coherence tomography-based grading of diabetic maculopathy proposed by an international expert panel: The European School for Advanced Studies in Ophthalmology classification. *Eur J Ophthalmol.* 2020;30(1):8-18. doi:10.1177/1120672119880394
8. Wecker T, Ehlken C, Bühler A, et al. Five-year visual acuity outcomes and injection patterns in patients with pro-re-nata treatments for AMD, DME, RVO and myopic CNV. *Br J Ophthalmol.* 2017;101(3):353-359. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-308668
9. Gao X, Obeid A, Aderman CM, et al. Loss to Follow-up After Intravitreal Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Injections in Patients with Diabetic Macular Edema. *Ophthalmol Retin.* 2019;3(3):230-236. doi:10.1016/j.oret.2018.11.002

Jakub Styk, Vanda Repiská: Analýza črevnej mikróflóry v bioptických vzorkách nádorov hrubého čreva. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 41-45.

9. Analýza črevnej mikróflóry v bioptických vzorkách nádorov hrubého čreva

Mgr. Jakub Styk
(patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.^{1,2}

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava

²Medirex Group Academy, n.o.

Úvod

Kompozícia ľudského mikrobiálneho ekosystému, mikróflóry, hrá dôležitú úlohu pri regulácii širokého spektra fyziologických procesov. Črevná mikróflóra predstavuje kľúčový faktor ovplyvňujúci metabolizmus hostiteľa, pričom prispieva k zachovaniu správnej funkcie intestinálnej bariéry a účinnej imunitnej odpovedi proti kolonizácii patogénmi. Je známe, že zloženie intestinálnej mikróflóry vykazuje medzi jednotlivcami istú variabilitu, a je podmienené mnohými environmentálnymi faktormi, ku ktorým sa zaraďuje fyzická aktivita, stravovacie návyky, nadmerná konzumácia alkoholu, fajčenie alebo užívanie antibiotík, či iných liečiv (1). Narastajúci počet štúdií naznačuje, že črevná mikróflóra môže byť priamo zapojená do vývoja kolorektálnych adenómov a následnej progresie, vyúsťujúcej do vzniku kolorektálneho karcinómu (CRC; z angl. *colorectal cancer*). Medzi možné mechanizmy progresie CRC patrí poškodenie DNA, podpora chronického zápalu, či uvoľňovanie bioaktívnych metabolitov, ako dôsledok aktivity črevných patogénov (2). Ich kolonizácia intestinálneho epitelu je zapríčinená mikrobiálnou dysbiózou, teda narušením rovnováhy črevnej mikróflóry, ktorú možno charakterizovať zvýšeným počtom so sliznicou asociovaných patogénov a znížením celkovej druhovej variability. Boli identifikované baktérie, ako *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Helicobacter pylori*, respektíve *Escherichia coli*, ktoré predstavujú kľúčové patogény, podieľajúce sa na rozvoji zápalových ochorení čriev (IBD; z angl. *inflammatory bowel disease*) a CRC (3).

Až do roku 1940, kedy sa začali objavovať prvé patogénne varianty, boli kmene *Escherichia coli* známe ako komenzálne mikroorganizmy zdravej črevnej mikróflóry (4). V súčasnosti evidujeme niekoľko dobre definovaných enteropatogénnych kmeňov, spôsobujúcich široké spektrum IBD, vrátane Crohnovej choroby a Ulceróznej kolitídy, ktoré sú predpokladom pre vznik CRC (5). Jedným zo spôsobov, akým môžu enteropatogénne *E. coli* prispievať k rozvoju rakoviny hrubého čreva je prítomnosť toxín produkujúceho génového klastra *pks*. Predpokladá sa, že tento toxín, nazývaný colibaktín, alkyluje DNA na adenínových zvyškoch, čím môže indukovať dvojvláknové zlomy, vedúce k chromozomálnym aberáciám a následnému zvyšovaniu frekvencie génových mutácií v génoch, zapojených do dráh kľúčových pre procesy kolorektálnej tumorigenézy (6). Zároveň, viaceré z črevných patogénov *E. coli* vykazujú okrem schopnosti adharovať k povrchu intestinálnej mukózy a spôsobovať lokálny zápal, aj vysoký invazívny potenciál, čím dochádza k zabezpečeniu ich replikácie a šíreniu sa v hostiteľských bunkách. Tieto patogenetické mechanizmy sú podmienené prítomnosťou ostrovov patogenicity, lokalizovaných ako na plazmidoch, tak bakteriálnych chromozómoch (7,8).

Lepšie porozumenie vzájomným interakciám medzi hostiteľom a črevnou mikróflórou môže prispieť k vývoju presnejšej personalizovanej medicíny pre pacientov s CRC. Hlavným cieľom našej práce bola analýza tkanivových biopsií kolorektálnych adenómov a karcinómov na prítomnosť enteropatogénnych variantov *E. coli*, a to na základe detekcie špecifických génov virulencie. Intracelulárna lokalizácia týchto oportúnnych patogénov by mohla poukázať na čo raz viac zdôrazňovaný prínos črevných baktérií v procese kolorektálnej karcinogenézy.

Jakub Styk, Vanda Repiská: Analýza črevnej mikroflóry v bioptických vzorkách nádorov hrubého čreva. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 41-45.

Materiál a metódy

Molekulárnej analýze sme podrobili 10 nádorových biopsií kolorektálnych adenómov (Tab. 1 vzorky 1-5) a karcinómov (Tab. 1 vzorky 6-10), získaných od pacientov, u ktorých bolo vylúčené predchádzajúce používanie antibiotík a dokončená neoadjuvantná chemorádioterapia. Jednotlivé biopsie sme rozdelili na dve časti, ktoré sme: (i) s cieľom analýzy internalizovaných baktérií podrobili Gentamicín protekčnému testu (GPA; z angl. *gentamicin protection assay*), pričom sme postupovali podľa štúdie Swidsinski et al. (1998) a (ii) čistým fyziologickým roztokom pre analýzu extracelulárnych baktérií. Získané supernatanty sme vysievali na MacConkey agar a individuálne vyrastené kolónie sme po preočkovaní kultivovali v tekutom LB médiu. Získané bakteriálne izoláty sme analyzovali na prítomnosť *E. coli* pomocou testu ENTEROtest 24 (Erba Lachema) a MALDI-TOF hmotnostnej spektrofotometrie. Na izoláciu plazmidovej DNA (pl_DNA) z kultúr identifikovaných ako *E. coli* sme použili JetQuick® Plasmid DNA Purification Kit (Genomed). Chromozomálnu DNA (ch_DNA) sme izolovali pomocou Qiagen Purification Kit (QIAGEN) a celkovú bakteriálnu DNA (var_DNA) sme extrahovali opakovaným varom a zmrazovaním na -70 °C (*boiling procedure*).

PCR prebiehala pri zložení reakčnej zmesi a teplotnom programe, ktoré sú uvedené v Tab. 1. Podmienky PCR pre detekciu génu *aspU* boli odlišné a sú uvedené v spodnej časti tabuľky.

Tab. 1 Parametre PCR.

PCR reakčná zmes	ch_DNA	pl_/var_DNA	Teplotný program			
PCR buffer 10x (Qiagen)	2.5 µL	2.5 µL	Iničiálna denaturácia	95 °C	10 min	
MgCl ₂ 25 mM (Qiagen)	3.0 µL	3.0 µL	Denaturácia	30x	95 °C 60 °C 72 °C	1 min 1 min 1 min
Mix primerov 10.0 pmol/mL (Sigma Aldrich)*	6.99 µL	6.99 µL	Anelácia			
Taq DNA polymeráza (Qiagen)	0.25 µL	0.25 µL	Extenzia			
dNTP (Qiagen)	2.2 µL	2.2 µL	Záverečná extenzia	72 °C	10 min	
Nuclease free water	7.06 µL	6.06 µL	Chladienie	4 °C	∞	
DNA templát	3.0 µL	4.0 µL				
Finálny objem	25 µL					

PCR reakčná zmes pre gén <i>aspU</i>	ch_DNA	pl_/var_DNA	Teplotný program <i>aspU</i>			
PCR buffer 10x (Qiagen)	2.5 µL	2.5 µL	Iničiálna denaturácia	94 °C	7 min	
MgCl ₂ 25 mM (Qiagen)	3.0 µL	3.0 µL	Denaturácia	35x	94 °C 65 °C 72 °C	50 sek 55 sek 1 min
U Primer 10.0 pmol/mL (Sigma Aldrich)	0.25 µL	0.25 µL	Anelácia			
D Primer 10.0 pmol/mL (Sigma Aldrich)	0.25 µL	0.25 µL	Extenzia			
Taq DNA polymeráza (Qiagen)	0.25 µL	0.25 µL	Záverečná extenzia	72 °C	7 min	
dNTP (Qiagen)	2.2 µL	2.2 µL	Chladienie	4 °C	∞	
Nuclease free water	13.55 µL	12.55 µL				
DNA templát	3.0 µL	4.0 µL				
Finálny objem	25 µL					

**eae* 0.31 µL U / 0.31 µL D; *ipaH* 0.31 µL U / 0,31 µL D; *stx* 0.625 µL U / 0.625 µL D; *elt* 0.625 µL D / 0.625 µL D; *aggR* 0.625 µL U / 0.625 µL D; *est* 1 µL U / 1 µL D

Pomocou multiplex PCR a kitu PCR Master Mix (QIAGEN) sme amplifikovali 7 génov virulencie pre 5 enteropatogénnych variantov *E. coli*, ktoré sú uvedené spolu dĺžkami PCR amplikónov (bp – bázové páry) a sekvenciami použitých U (*upstream*) a D (*downstream*) primerov:

eae (881 bp) pre EPEC (enteropatogénne *E. coli*)

U: 5' CCCGAATTCGGCACAAGCATAAG; D: 5' CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATT

ipaH (619 bp) pre EIEC (entero-invazívne *E. coli*)

U: 5' GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC; D: 5' GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC

stx (518 bp) pre STEC (Shiga toxín produkujúce *E. coli*)

Jakub Styk, Vanda Repiská: Analýza črevnej mikroflóry v biotických vzorkách nádorov hrubého čreva. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 41-45.

U: 5'GAGCGAAATAATTTATATGTG; D: 5'TGATGATGGCAATTGAGTAT

elt (322 bp) pre ETEC (entero-toxické *E. coli*)

U: 5'TCTCTATGTGCATACGGAGC; D: 5'CCATACTGATTGCCGCAAT

aggR (254 bp) pre EAEC (entero-agregatívne *E. coli*)

U: 5'GTATACACAAAAGAAGGAAGC; D: 5'ACAGAATCGTCAGCATCAGC

est (147 bp) pre ETEC (entero-toxické *E. coli*)

U: 5'TTAATAGCACCCGGTACAAGCAG; D: 5'CCTGACTCTTCAAAGAGAAAAT

aspU (282 bp) pre EAEC (entero-agregatívne *E. coli*)

U: 5'GCCTTTGCGGGTGGTAGCGG; D: 5'AACCCATTGGTTAGAGCAC

Výsledky

Na základe výsledkov môžeme konštatovať, že spomedzi všetkých detegovaných enteropatogénnych variantov *E. coli* boli EAEC najčastejšie pozorovaným kmeňom. Prítomnosť pre nich charakteristického génu *aggR*, sme zaznamenali v 9/10 analyzovaných biopsií (Tab. 1 a 2). Na druhej strane, prítomnosť pre nich rovnako špecifického génu *aspU* sme zaznamenali len vo vzorke pochádzajúcej od pacienta s karcinómom v oblasti *flexura linealis* (Tab. 1).

Tab.1 Pohlavie, vek, lokalizácia kolorektálneho adenómu (1-5) a karcinómu (6-10), počet analyzovaných vzoriek a sumarizácia detegovaných génov virulencie.

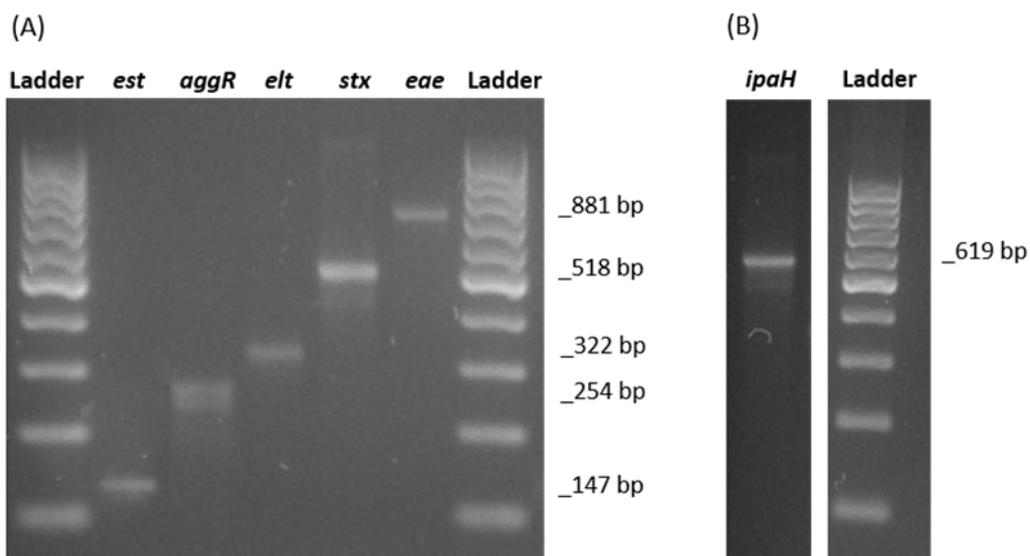
Pacient	Pohlavie	Vek	Lokalizácia	Vzorky	<i>est</i>	<i>aggR</i>	<i>aspU</i>	<i>elt</i>	<i>stx</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
1	Žena	59	<i>sigma</i>	23	3	6	-	-	-	-	-
2	Muž	38	<i>sigma</i>	13	-	13	-	-	-	-	-
3	Žena	41	<i>sigma</i>	20	3	7	-	-	9	1	-
4	Žena	74	<i>sigma</i>	4	-	4	-	-	-	-	-
5*	Muž	73	<i>rectum</i>	10	3	4	-	-	-	-	2
6	Muž	59	<i>flexura linealis</i>	18	-	13	5	-	-	-	-
7	Muž	65	<i>sigma</i>	14	-	9	-	-	-	-	-
8	Muž	71	<i>anastomosis</i>	12	6	5	-	1	-	-	-
9	Muž	61	<i>rectum</i>	5	1	-	-	2	-	-	1
10	Muž	81	<i>sigma</i>	8	-	6	-	-	1	-	1

*analýza extracelulárnych *E. coli*

Tab.2 Sumarizácia detegovaných patogénnych variantov *E. coli* na základe génov virulencie u pacientov s kolorektálnym adenómom (1-5) a karcinómom (6-10).

Pacient	ETEC_ <i>est/elt</i>	EAEC_ <i>aggR</i>	EAEC_ <i>aspU</i>	STEC/EHEC_ <i>stx</i>	EIEC_ <i>ipaH</i>	EPEC_ <i>eae</i>
1	13 %	26 %	-	-	-	-
2	-	100 %	-	-	-	-
3	15 %	35 %	-	45 %	5 %	-
4	-	100 %	-	-	-	-
5	30 %	40 %	-	-	-	20 %
6	-	72 %	28 %	-	-	-
7	-	64 %	-	-	-	-
8	50 %	42 %	-	8 %	-	-
9	20 %	-	-	40 %	-	20 %
10	-	75 %	-	12.5 %	-	12.5 %

Najmenšie zastúpenie fragmentov sme zaznamenali v prípade produktu *ipaH*, ktorého prítomnosť sme detegovali len v jednom izoláte *E. coli*, a to u pacienta s kolorektálnym adenómom. Vizualizáciu daného PCR produktu vo vzorke pacienta 3 zachytáva Obr. 1B. V prípade daného pacienta sme okrem génu typického pre EIEC zaznamenali prítomnosť fragmentov *est*, *aggR* a *stx*, ktoré značia predpokladanú prítomnosť ETEC, EAEC, respektíve STEC/EHEC. V prípade pacienta 5 sme vo vzorke nádorového tkaniva nezaznamenali žiadne intracelulárne lokalizované baktérie. Z toho dôvodu sme ďalšej analýze podrobili také kolónie, ktoré boli identifikované ako extracelulárne *E. coli*. Aj v tomto prípade tvoril najpočetnejšiu skupinu fragmentov PCR produkt *aggR* intestinálnych EAEC (Tab. 1 a 2). Obr. 1A zachytáva elektroforetickú separáciu amplifikovaných fragmentov *est*, *aggR*, *elt*, *stx* a *eae*.



Obr. 1 Separácia amplifikovaných PCR produktov v 2 % agarózovej gélovej elektroforéze. Vizualizácia amplifikovaných fragmentov (A) *est* (147 bp) - ETEC, pacient 8 [var_DNA]; *aggR* (254 bp) - EAEC, pacient 1 [var_DNA]; *elt* (322 bp) - ETEC, pacient 9 [var_DNA]; *stx* (518 bp) - STEC/EHEC, pacient 3 [ch_DNA]; *eae* (881 bp) - EPEC, pacient 9 [pl_DNA]; (B) *ipaH* (619 bp) - EIEC, pacient 3 [ch_DNA]. Ladder_100 bp. V hranatých zátvorkách je uvedený typ analyzovanej DNA.

Diskusia

Identifikácia nádorovo špecifických patogénov prítomných vo vzorkách nádorového tkaniva, v porovnaní s ich absenciou u zdravých kontrol, podnecuje skúmanie ich presnej úlohy v etiológii tak heterogénneho onkologického ochorenia, akým je CRC. Je známe, že intracelulárne *E. coli* sú u pacientov s CRC pomerne často identifikovaným typom patogénu. Raisch et al. (2014) zaznamenali, že početnosť fylogenetickú podskupiny B2, do ktorej patria aj enteropatogénne kmene *E. coli*, bola v bioptických vzorkách pochádzajúcich zo sliznice pacientov s CRC na úrovni takmer 74 %, oproti 42 % kontrol (9). V našom prípade sme prítomnosť intracelulárne lokalizovaných enteropatogénnych *E. coli* zaznamenali v 90 % analyzovaných vzoriek, pričom naše výsledky korelujú s viacerými štúdiami. V tých bolo pozorované dominantné zastúpenie invadujúcich EPEC u väčšiny pacientov s kolorektálnym adenómom a karcinómom, v porovnaní so zdravými kontrolami (10,11). Vysoká prevalencia EAEC v nami analyzovaných biopsiách, a to až v 9 prípadoch (Tab. 2), môže byť vysvetlená pozorovaniami štúdie Ellis et al. (2020), ktorej výsledky naznačujú, že istý typ EAEC má vyšší potenciál ľudskej patogenézy v dôsledku kombinácie takých faktorov virulencie, ktoré podporujú kolonizáciu a zápal hostiteľských buniek (12). Okrem iného, Fang et al. (2018) pozorovali, že *E. coli* zo skupiny B2 disponujú špecializovaným mucín degradujúcim aparátom, ktorý môže prispievať ku kolonizácii črevného epitelu a následnej patogenéze IBD. Na druhej strane, EIEC s génom virulencie *ipaH*, vyznačujúce sa vysokým invazívnym potenciálom, predstavovali najmenšiu frakciu spomedzi všetkých pravdepodobne identifikovaných patotypov *E. coli*. Predpokladá sa, že intestinálne patogény *E. coli* môžu po adhézií a následnej infekcii epitelových buniek čreva spôsobovať také zmeny, ktoré by mohli viesť k ich malígnej transformácii a následnému rozvoju kolorektálnych malignít (13). Na druhej strane, pozorovanú asociáciu enteropatogénnych *E. coli* s rakovinovými léziami je možné brať do úvahy aj ako dôkaz kauzálneho vzťahu, ktorý je opačný, a predpokladá, že nádorové mikroprostredie poskytuje týmto patogénom podmienky vhodné pre kolonizáciu črevného epitelu. Za jednu z výrazných limitácií našej práce považujeme relatívne malý súbor vyšetřovaných vzoriek tkaniva. Predpokladáme, že rozšírenie počtu analyzovaných nádorov a doplnenie analýz o biopsie zdravého tkaniva, by viedlo k relevantnejšiemu výsledkom a záverom. Sekvenačná analýza detegovaných patotypov *E. coli* a následné porovnanie výsledkov s databázami obsahujúcimi referenčné sekvencie s cieľom potvrdiť, či sa jedná o nami hľadané gény, by mohla prispieť k neustálemu objasňovaniu úlohy črevných

Jakub Styk, Vanda Repiská: *Analýza črevnej mikroflóry v biotických vzorkách nádorov hrubého čreva. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 41-45.*

patogénov v procese malígnej transformácie intestinálneho epitelu a rozvoja kolorektálnych adenómov, respektíve ich progresie do CRC.

Podakovanie

Táto ŠVOČ vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: *Dlhodobý strategický výskum a vývoj zameraný na výskyt Lynchovho syndrómu v populácii SR a možnosti prevencie nádorov spojených s týmto syndrómom, kód ITMS: 313011V578, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.*

Zoznam použitej literatúry

1. Sánchez-Alcoholado L, Ramos-Molina B, Otero A, et al. The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer Development and Therapy Response. *Cancers* 2020; 12(6):1406.
2. Vacante M, Ciuni R, Basile F, Biondi A. Gut Microbiota and Colorectal Cancer Development: A Closer Look to the Adenoma-Carcinoma Sequence. *Biomedicines* 2020; 8(11):489.
3. Perna A, Hay E, Contieri M, De Luca A, Guerra G, Lucariello A. Adherent-invasive Escherichia coli (AIEC): Cause or consequence of inflammation, dysbiosis, and rupture of cellular joints in patients with IBD? *J Cell Physiol.* 2020; (6):5041-5049.
4. Tang L, Zhou YJ, Zhu S, et al. E. coli diversity: low in colorectal cancer. *BMC medical genomics* 2020 Dec;13:1-7.
5. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(4):822-80.
6. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Rosendahl Huber A, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks⁺ E. coli. *Nature* 2020; 580(7802):269-273.
7. Nakhjavani FA, Emaneini M, Hosseini H, et al. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) isolated from children with diarrhoea. *J Med Microbiol.* 2013;62(2):191-195.
8. Serapio-Palacios A, Finlay BB. Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic Escherichia coli infection. *Curr Opin Microbiol.* 2020; 54:67-76.
9. Raisch J, Buc E, Bonnet M, et al. Colon cancer-associated B2 Escherichia coli colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(21):6560-6572.
10. Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, Ortner M, Weber J, Lochs H. Association between intraepithelial Escherichia coli and colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998; 115(2):281-286.
11. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, et al. Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004 ; 127(1):80-93.
12. Fang X, Monk JM, Mih N, et al. Escherichia coli B2 strains prevalent in inflammatory bowel disease patients have distinct metabolic capabilities that enable colonization of intestinal mucosa. *BMC Syst Biol.* 2018; 12(1):66.
13. Ellis SJ, Crossman LC, McGrath CJ, et al. Identification and characterisation of enteroaggregative Escherichia coli subtypes associated with human disease. *Sci Rep.* 2020;10(1):7475.

Alžbeta Hlucháňová, Pavel Šiarnik, Ingrid Žitňanová, Žofia Rádiková, Branislav Kollár: Poruchy metabolizmu lipidov a ich oxidačné poškodenie pri syndróme obštrukčného spánkového apnoe. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 46-50.

10. Poruchy metabolizmu lipidov a ich oxidačné poškodenie pri syndróme obštrukčného spánkového apnoe

MUDr. Alžbeta Hlucháňová¹
(neuroológia)

Spoluautori: doc. MUDr. Pavel Šiarnik, PhD., MPH², doc. Ing. Ingrid Žitňanová, PhD.³, MUDr. Žofia Rádiková, PhD.⁴

Školiteľ: prof. MUDr. Branislav Kollár, PhD., MPH²

¹Neurologická klinika SZU a UNB, ²I. neurologická klinika LF UK a UNB, ³Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK, Bratislava, ⁴Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

Úvod a ciele

Obštrukčné spánkové apnoe (OSA) predstavuje najčastejšiu poruchu spánku, ktorá sa spája so zvýšeným rizikom vzniku kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych ochorení, resp. so zvýšenou vaskulárnou morbiditou a mortalitou (1).

Ide o poruchu charakterizovanú opakovaným kolapsom horných dýchacích ciest počas spánku, ktorá vedie k chronickej intermitentnej hypoxii (CIH) a fragmentácii spánku početnými prebúdzacími reakciami. Ochorenie postihuje 2-4% dospeléj populácie, najväčšiu prevalenciu má u mužov v strednom veku (2).

Z doteraz publikovaných prác je známa asociácia intermitentnej hypoxie so širokým spektrom patologických procesov – oxidačný stres, endotelová dysfunkcia, aktivácia sympatikového nervového systému, systémová zápalová reakcia, porucha metabolizmu glukózy a lipidov (3).

Dyslipidémia sa v súčasnosti považuje za jeden z najvýznamnejších mediátorov akcelerovanej aterogenézy u pacientov s OSA. Z najnovších štúdií neustále pribúdajú dôkazy o jej nezávislej asociácii s intermitentnou hypoxiou. Dodnes však nie je známe, akú úlohu OSA pri samotnom vzniku dyslipidémie zohráva (4, 5, 6).

Na zvýšenej vaskulárnej morbidite a mortalite sa u pacientov s OSA spolu s dyslipidémiou môže podieľať aj zmena funkcie jednotlivých lipoproteínov ich oxidačným poškodením. Je známe, že intermitentná hypoxia/reoxygénácia vedie pri OSA ku vzniku oxidačného stresu, ktorý okrem iného spôsobuje aj peroxidáciu lipidov. Lipoperoxydy sa potom následne taktiež môžu podieľať na vzniku cievneho poškodenia (7).

Našu prácu sme rozdelili na dve časti:

- v prvej sme hodnotili lipidogram u pacientov s OSA so zameraním sa na HDL subfrakcie,
- v druhej sme stanovili hladiny lipoperoxidov, a to v dvoch médiách, plazme a sline.

Súbor a metódy

Nábor participantov prebiehal na I. neurologickej klinike LFUK a UNB. Predbežný súbor tvorilo 15 pacientov, mužov, s polysomnograficky potvrdeným OSA. Kontrolný súbor tvorilo 17 zdravých mužov (Tab. 1). Exklúznym kritériom bolo u oboch skupín akékoľvek iné známe chronické ochorenie (kardiovaskulárne, metabolické, onkologické a pod.), užívanie akejkoľvek medikácie a nikotinizmus. Štúdia bola schválená etickou komisiou LFUK. Všetci probandi podpísali informovaný súhlas s účasťou v štúdiu.

Všetkým zúčastneným bola nalačno o 8:00 hod. odobratá a spracovaná vzorka krvi, EDTA plazma bola uskladnená pri -80°C a následne použitá na stanovenie HDL subfrakcií a lipoperoxidov. HDL subfrakcie lipoproteínov v plazme boli analyzované pomocou elektroforézy na polyakrylamidovom géli systémom Lipoprint (Quantimetrix corp., Redondo Beach, CA, USA). Daný systém umožňuje hodnotenie nasledujúcich HDL subfrakcií: veľké HDL subfrakcie 1-3, ktoré sú považované za

Alžbeta Hlucháňová, Pavel Šiarnik, Ingrid Žitňanová, Žofia Rádiková, Branislav Kollár: Poruchy metabolizmu lipidov a ich oxidačné poškodenie pri syndróme obštrukčného spánkového apnoe. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 46-50.

antiaterogénne a malé denzné HDL subfrakcie 8-10 považované za proaterogénne. O vlastnostiach stredne veľkých HDL subfrakcií 4-7 sa stále vedie diskusia (8, 9).

Nestimulované celé sliny (2 ml) boli odobrané účastníkom štúdie do skúmavky. Dve hodiny pred ich odberom účastníci nefajčili, neumývali si zuby, nejedli a nepili. Centrifugáciou získané supernatanty boli uskladnené pri -80°C a použité na stanovenie lipoperoxidov podľa El-Saadani a kol. (1989) (10).

Štatistická analýza získaných dát bola vykonaná pomocou programu SPSS verzia 18 (SPSS Inc., Chicago, USA). Kategorické premenné boli vyjadrené ako priemer \pm smerodajná odchýlka (SD). Na porovnanie premenných medzi skupinami pacientov a kontrol sme použili Studentov t test. Na koreláciu hladín lipoproteínov v plazme a v slinách sme použili Pearsonov korelačný koeficient. Za štatisticky významné boli považované hodnoty $P < 0,05$.

Výsledky

Pacienti s OSA boli signifikantne starší, avšak ich BMI bolo porovnateľné s kontrolami (Tab.1). U pacientov s OSA boli v porovnaní s kontrolami zistené signifikantne vyššie hladiny celkového cholesterolu, lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) a triacylglycerolov. Hladina lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL) bola v oboch skupinách porovnateľná (Tab.1).

Tab. 1. Klinické charakteristiky populácie

	Pacienti s OSA	Kontroly	P
N	15 M	18 M	
Vek (roky)	42,1 \pm 12,2	32,4 \pm 6,0	0,007
BMI (kg/m ²)	29,5 \pm 4,5	27,1 \pm 4,3	ns
T- cholesterol (mmol/l)	5,30 \pm 0,98	4,21 \pm 0,72	0,0011
LDL cholesterol (mmol/l)	4,01 \pm 0,82	2,71 \pm 0,55	<0,0001
HDL cholesterol (mmol/l)	1,21 \pm 0,39	1,18 \pm 0,30	ns
TAG (mmol/l)	1,97 \pm 0,58	1,19 \pm 0,65	0,0013
Hodnoty v tabuľke sú uvedené ako priemer \pm smerodajná odchýlka (SD), P – štatistická hladina významnosti, T- cholesterol – celkový cholesterol, LDL cholesterol – lipoproteíny s nízkou hustotou, HLD cholesterol – lipoproteíny s vysokou hustotou, TAG – triacylglyceroly, OSA – obštrukčné spánkové apnoe.			

Z HDL subfrakcií mali pacienti s OSA signifikantne nižšie hladiny antiaterogénnych, veľkých HDL subfrakcií oproti kontrolám. Naopak, hladina aterogénnych malých denzných subfrakcií bola u pacientov s OSA signifikantne vyššia. Hladina stredných HDL subfrakcií medzi oboma skupinami nebola signifikantne odlišná (Tab. 2).

Tab. 2. HDL subfrakcie a hladiny lipoperoxidov v plazme u pacientov s OSA a kontrol

	Pacienti s OSA (n=15)	Kontroly (n=17)	P
Large HDL1-3 (mg/dl)	9,13 \pm 5,89	17,41 \pm 8,75	0,0043
Medium HDL4-7 (mg/dl)	26,53 \pm 8,31	23,94 \pm 5,23	ns
Small HDL8-10 (mg/dl)	11,20 \pm 4,84	5,35 \pm 4,18	0,0009
Lipoperoxidy (nmol/l)	61,6 \pm 39,7	38,6 \pm 18,7	0,059
Hodnoty v tabuľke sú uvedené ako priemer \pm smerodajná odchýlka (SD), P – štatistická hladina významnosti.			

Hladiny lipoperoxidov v plazme pacientov s OSA boli vyššie ako u zdravých mužov, avšak tento rozdiel nedosiahol štatistickú významnosť (Tab. 2).

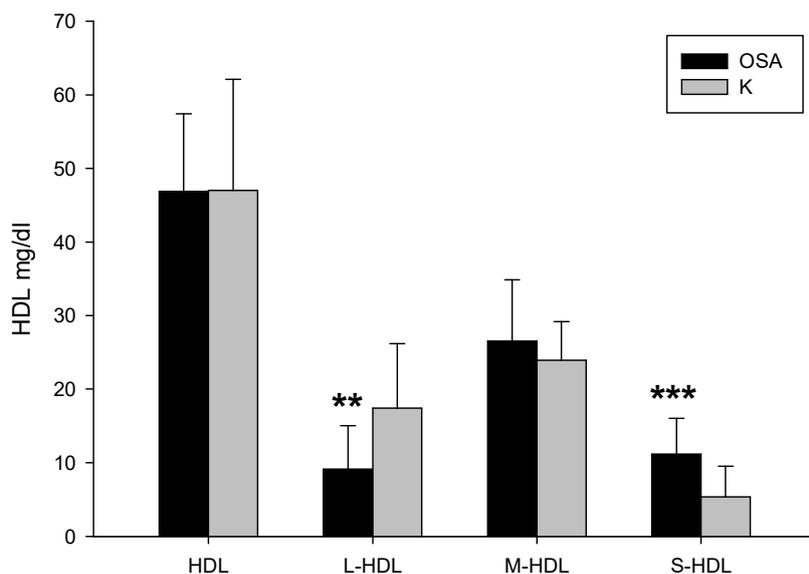
V čiastočne sa prekrývajúcom súbore 25 probandov (pacienti s OSA, zdraví dobrovoľníci, muži aj ženy) sme stanovili hladiny lipoperoxidov v plazme aj v slinách. Hladiny lipoperoxidov v slinách korelovali s ich hladinami v plazme ($r=0,454$; $p=0,023$).

Diskusia

Výsledky viacerých štúdií poukazujú na vyšší výskyt cievnych ochorení u pacientov s OSA (11). Samotné OSA sa na procese aterogenézy zúčastňuje prostredníctvom viacerých patomechanizmov (12). V tejto práci sme sa zamerali na dva z nich, a to dyslipidémiu a oxidačný stres reprezentovaný oxidačným poškodením lipoproteínov. U pacientov s OSA a zdravých dobrovoľníkov sme porovnali lipidogram v plazme a hladiny lipoperoxidov v plazme a slinách. Obe skupiny mali porovnateľné BMI, avšak pacienti s OSA mali signifikantne zvýšené hodnoty celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triacylglycerolov. Hladiny HDL cholesterolu boli v oboch skupinách porovnateľné.

V rámci lipidogramu sme sa špeciálne zamerali na subfrakcie HDL lipoproteínov. HDL cholesterol sa vo všeobecnosti považuje za ateroprotektívny. V literatúre však pribúdajú dôkazy, že malé HDL subfrakcie (HDL8-10) môžu mať narušenú funkčnosť a ich vyššie hladiny sú asociované s proaterogénnym lipidovým profilom (13). Malé HDL môžu byť aterogénne aj kvôli ich slabému rozpoznaniu receptormi, zvýšenej schopnosti oxidácie a acetylácie, ľahšiemu prenikaniu do subendotelového priestoru a tvorbe usadenín cholesterolu v cievach (14).

V našej štúdií sme napriek porovnateľným hladinám HDL cholesterolu zistili u pacientov s OSA signifikantne zvýšenú hladinu subfrakcií malých HDL a okrem toho aj signifikantne nižšie hladiny veľkých, antiaterogénnych HDL subfrakcií (Obr. 1). Tento nález svedčí o proaterogénnom lipidograme u našich pacientov s OSA. Naše výsledky korešponujú s niektorými ďalšími štúdiami, ktoré preukázali zvýšené hladiny triacylglycerolov (15, 16). Znížené hladiny HDL cholesterolu boli popísané u starších pacientov s OSA (17, 18). Naopak, protichodné výsledky boli pozorované v prierezových a intervenčných štúdiách (19), resp. iné štúdie podobné asociácie nenašli (20, 21).



Obrázok 1. Hladiny celkového HDL cholesterolu a jeho veľkých (L-HDL), stredných

(M-HDL) a malých (S-HDL) subfrakcií HDL cholesterolu u pacientov s OSA a zdravých kontrol (K). Hladina štatistickej významnosti: ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

Naša práca ako prvá sledovala hladiny subfrakcií HDL cholesterolu u pacientov s OSA. Už naše predbežné výsledky ukazujú, že u pacientov s OSA dochádza k zmene podielu veľkých a malých subfrakcií HDL cholesterolu smerom k proaterogénnemu HDL profilu, zatiaľ bez zmeny koncentrácie celkového HDL cholesterolu. Naším cieľom v budúcnosti je doplniť obe skupiny probandov, aby boli porovnateľné nielen zastúpením pohlaví, BMI, ale aj vekom.

V druhej časti práce sme zistili trend k zvýšeným hladinám markerov oxidačného poškodenia lipoproteínov (lipoperoxidov) v plazme ($P=0,059$) u jedincov s OSA v porovnaní s kontrolnou

Alžbeta Hlucháňová, Pavel Šiarnik, Ingrid Žitňanová, Žofia Rádiková, Branislav Kollár: Poruchy metabolizmu lipidov a ich oxidačné poškodenie pri syndróme obštrukčného spánkového apnoe. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 46-50.

skupinou. Naše výsledky sú v zhode s inými prácami stanovujúcimi odlišné markery oxidačného stresu. U jedincov s OSA boli opakovane publikované zvýšené hladiny markerov oxidačného poškodenia lipidov, proteínov a nukleových kyselín (13, 22, 10).

Predpokladáme že markery oxidačného stresu môžu byť zvýšené dôsledkom opakujúcich sa krátkych cyklov prerušovanej hypoxie s následnou reoxygénáciou, počas ktorej dochádza k vzniku voľných radikálov spôsobujúcich oxidačné poškodenia biomakromolekúl a narúšajúcich cievnu homeostázu. Dôsledkom týchto procesov môže byť zvýšené kardiovaskulárne a cerebrovaskulárne riziko u jedincov so spánkovými poruchami dýchania (23, 24).

Krv stále zostáva najvhodnejšou telesnou tekutinou na hodnotenie mnohých biomarkerov odrážajúcich systémové procesy. Jej nahradenie slinami je potrebné implementovať s opatrnosťou. Niektoré biomarkery v slinách môžu odrážať ich systémové hladiny, avšak iné biomarkery, ako napr. prozápalový cytokín IL-6 a C-reaktívny proteín, nepreukázali významnú koreláciu so vzorkami plazmy (25, 26). Tieto imunitné biomarkery sú ovplyvňované procesmi lokálnej imunity a odrážajú skôr lokálne ako systémové imunitné odpovede. Nami zistená významná korelácia lipoperoxidov v plazme a slinách ale naznačuje, že na stanovenie niektorých markerov oxidačného stresu by bolo možné použiť aj iné médium ako plazma, a to sliny. Pochopiteľne, na potvrdenie týchto výsledkov, budú potrebné ďalšie štúdie, ktoré by okrem väčšieho počtu pacientov mali zahrnúť aj merania hladín antioxidantov v plazme.

Záver

Naše predbežné výsledky, popisujúce abnormality v hladinách lipoproteínov u pacientov s OSA, sú v súlade s predpokladom častého výskytu poruchy lipidového metabolizmu u týchto jedincov. Dyslipidémia predstavuje jeden z rizikových faktorov, ktorý môže u týchto pacientov viesť k urýchleniu aterosklerotického procesu, a preto jej treba venovať náležitú pozornosť.

Naše výsledky tiež potvrdili existenciu zvýšeného oxidačného stresu u jedincov s OSA. Významná korelácia lipoperoxidov v plazme a slinách navyše naznačuje, že na stanovenie markerov oxidačného stresu by potenciálne bolo možné použiť aj iné médium ako plazmu, a to sliny.

Zoznam použitej literatúry

1. Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, et al. Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med* 2009; 6: e1000132.
2. Goldberger JJ, Cain ME, Hohnloser SH, et al. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation/Heart Rhythm Society Scientific Statement on Noninvasive Risk Stratification Techniques for Identifying Patients at Risk for Sudden Cardiac Death. *Circulation* 2008; 118(14): 1497-1518.
3. Drager LF, Polotsky VY, O'Donnell CP, et al. Translational approaches to understanding metabolic dysfunction and cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 309: H1101-H1111.
4. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-421.
5. Juhasz J. Dyslipidemia: another brick in the wall. A feasible link in the OSA-cardiovascular disease axis. *Sleep Breath* 2014; 18: 5-6.
6. Savransky V, Nanayakkara A, Li J, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 1290-1297.
7. Savransky V, Jun J, Li J, et al. Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of stearoyl coenzyme A desaturase. *Circ Res* 2008; 103: 1173-1180.
8. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, et al. Small dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Québec Cardiovascular Study. *Circulation* 1997; 95(1): 69-75.

Alžbeta Hlucháňová, Pavel Šiarnik, Ingrid Žitňanová, Žofia Rádiková, Branislav Kollár: Poruchy metabolismu lipidov a ich oxidačné poškodenie pri syndróme obštrukčného spánkového apnoe. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 46-50.

9. Kasko M, Gaspar L, DUkat A, Gavornik P, Oravec S. High-density lipoprotein profile in newly-diagnosed lower extremity artery disease in Slovak population without diabetes mellitus. *Neuro Endocrinol Lett* 2014; 35(6): 531-535.
10. El-Saadani M, Esterbauer H, el.Sayed M, GOher M, Nassar AY, Jurgens G. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J Lipid Res* 1989; 30(4): 627-630.
11. Passali D, Corallo G, Yaremchuk S, Longini M, Proietti F, Passali GC, Bellussi L. Oxidative stress in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2015; 35(6): 420-425.
12. Fiedorczyk P, Strozynski A, Olszewska E. Is the Oxidative Stress in Obstructive Sleep Apnea Associated With Cardiovascular Complications? Systematic Review. *J Clin Med* 2020; 9(11): 3734.
13. Alzoghaibi MA, Bahamman AS. Lipid peroxides, superoxide dismutase and circulating IL-8 and GCP-2 in patients with severe obstructive sleep apnea: a pilot study. *Sleep Breath* 2005;9(3): 119-126.
14. Oravec S, Dukat A, Gavornik P, Caprnda M, Kucera M, Ocadlik I. Contribution of the atherogenic lipoprotein profile to the development of arterial hypertension, *Bratisl Lek Listy* 2011; 112(1):4-7.
15. Togeiro SM, Carniero G, Ribeiro Filho FF, et al. Consequences of Obstructive Sleep Apnea on Metaboli Profile: A Population-Based Survey. *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21(4): 847-51.
16. Coughlin SR, Mawdsley L, Mugarza JA, Calverley PM, Wilding JP. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur Heart J* 2004; 25(9): 735-741.
17. Roche F, Sforza E, Pichot V, et al. PROOF Study Group. Obstructive sleep apnoea/hypopnea influences high-density lipoprotein cholesterol in the elderly. *Sleep Med* 2009; 10(8): 882-886.
18. Newman AB, Nieto FJ, Guidry U, et al. Sleep Heart Health Study Research Group. Relation of sleep-disordered breathing to cardiovascular disease risk factors: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol.* 2001; 154(1): 50-59.
19. Drager LF, Jun J, Polotsky VY. Obstructive sleep apnea and dyslipidemia: implications for atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010; 17(2): 161-165.
20. Tan KC, Chow WS, Lam JC, Lam B, Wong WK, Tam S, Ip MS. HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis* 2006; 184(2): 377-382.
21. Tokuda F, Sando Y, Matsui H, Koike H, Yokoyama T. Serum levels of adipocytokines, adiponectin and leptin, in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med* 2008; 47(21): 1843-1849.
22. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 2007; 383(1-2): 30-40.
23. Šiarnik P, Kollár B, Filippi P, Klobočníková K, Hlucháňová A, Žitňanová I, Turčáni P. Association of Lipid Profile with Sleep-Disordered Breathing in Patients with Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Medicine* 2020; 3(1): 28-33.
24. Yardim-Akaidin S, Caliskan-Can E, Gokalp F, Firat H, Ardic S, Simsek B. Lipid peroxidation and DNA damage in apnea patients with or without metabolic syndrome. *Sleep Biological Rhythms* 2013; 11(2): 116–124.
25. Fernandez-Botran R, Miller JJ, Burns VE, Newton TL. Correlations among inflammatory markers in plasma, saliva and oral mucosal transudate in post-menopausal women with past intimate partner violence. *Brain Behav Immun* 2011; 25(2): 314-321.
26. Minetto M, Rainoldi A, Gazzoni M, et al. Differential responses of serum and salivary interleukin-6 to acute strenuous exercise. *Eur J Appl Physiol* 2005; 93(5-6): 679-686.

Laiferová N, Nemeč M, Vernerová L, Kurdiová T, Balážová M, Špiritovič M, Tomčík M, Vencovský J, Ukropec J, Ukropcová B: Svalovo-špecifické mikroRNA sú zvýšené v bunkových kultúrach derivovaných z kostrového svalu pacientov s idiopatickou zápalovou myopatiou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 51-54.

11. Svalovo-špecifické mikroRNA sú zvýšené v bunkových kultúrach derivovaných z kostrového svalu pacientov s idiopatickou zápalovou myopatiou

Mgr. Nikoleta Laiferová^{1,2}
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Nemeč M.², Vernerová L.³, Kurdiová T.², M. Balážová⁴, M. Špiritovič³, M. Tomčík³, J. Vencovský³, J. Ukropec², B. Ukropcová^{1,2}

Školiteľka: doc. MUDr. Barbara Ukropcová, PhD.

¹Ústav patologickej fyziológie, LFUK, Bratislava; ²Biomedicínske Centrum, SAV, Bratislava;

³Revmatologický ústav, 1. lekárska fakulta, Karlova Univerzita, Praha; ⁴Centrum Biovied, SAV, Bratislava

Úvod

Idiopatické zápalové myopatie (IZM) sú systémové zápalové ochorenia charakteristické proximálnym poškodením svalov a svalovou slabosťou (1). V patogenéze idiopatickej zápalovej myopatie je okrem autoimunitnej odpovede popísaná aj metabolická a mitochondriálna dysfunkcia kostrového svalu (2,3). Pravidelná fyzická aktivita zlepšuje funkčnosť a metabolizmus svalu, ako aj systémový metabolizmus a klinický stav pacientov (4, 5). Bunkové kultúry ľudského kostrového svalu predstavujú vhodný model pre štúdium fyziologického fenotypu kostrového svalu, ktorý je zachovaný v podmienkach *in vitro* epi/genetickými mechanizmami (6). MikroRNA (miRNA) sú krátke, 19 – 23 nukleotidové jednovláknové molekuly RNA, ktoré regulujú génovú expresiu na posttranskripčnej úrovni inhibíciou translácie alebo degradáciou transkriptov väzbou na cieľovú mRNA. Svalovo-špecifické miRNA (myomiRs) sú zapojené v regulácii regenerácie a metabolizmu svalu a ich expresia môže byť modifikovaná zápalom, degeneráciou svalov aj odpoveďou na cvičenie (7, 8).

Metodika

Vzorky kostrového svalu *m. vastus lateralis* pacientov s IZM pred a po absolvovaní 6-mesačnej tréningovej intervencie (IZM pacienti n=7/7) a zdravých kontrol porovnateľného veku, pohlavia, BMI a glykémie (n=7) (Tab.1) sme získali biopsiou Bergströmovou ihlou v lokálnej anestéze. Šesťmesačná intenzívna fyzioterapeutická intervencia u pacientov s IZM zahŕňala individuálne prispôbené strečingové a posilňovacie cvičenia dvakrát týždenne pod dohľadom fyzioterapeuta. Zvyšných päť dní v týždni boli pacienti inštruovaní vykonávať individuálne cvičenia doma. U všetkých jedincov bolo stanovené telesné zloženie (DEXA), glukózová tolerancia (oGTT) a funkčné svalové parametre (manuálny test svalovej sily-MMT8 & Funkčný index-FI-2). Index inzulinovej senzitivity (QUICKI) bol vypočítaný ako prevrátena hodnota súčtu logaritmov koncentrácie inzulínu a glukózy nalačno. [QUICKI = 1/log(inzulín nalačno [μU/mL]) + log(glukóza nalačno [mg/dL])]. Trypsínovou digesciou izolované jednojadrové satelitné bunky boli základom primárnej bunkovej kultúry. Po dosiahnutí ~80% konfluencie bola indukovaná diferenciácia buniek. Celková RNA/DNA bola izolovaná z myotúb (diferencovaných buniek kostrového svalu) po 5 dňoch diferenciácie fenol/chloroformovou extrakciou pomocou činidla Qiazol (Qiagen, USA) a purifikovaná DNázou I (New England BioLabs, France). MiRNA bola reverzne prepísaná do cDNA miScript-II-RT-kitom (Qiagen, USA). Hladiny svalovo-špecifických miRNA boli stanovené qPCR (Quant-Studio-5, Applied-Biosystems, USA) s využitím špecifických

Laiferová N, Nemeč M, Vernerová L, Kurdiová T, Balážová M, Špiritovič M, Tomčík M, Vencovský J, Ukropec J, Ukropcová B: Svalovo-špecifické mikroRNA sú zvýšené v bunkových kultúrach derivovaných z kostrového svalu pacientov s idiopatickou zápalovou myopatiou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 51-54.

primerov na detekciu miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206 a normalizované na referenčný gén s konštantnou expresiou (SNORD44) metódou delta CT. Expresia mitochondriálnej DNA (mtDNA) bola tiež stanovená pomocou qPCR. Diferencované bunky boli použité aj na stanovenie množstva proteínov mitochondriálnej oxidatívnej fosforylácie/OXPHOS komplexov (imunoblotting), oxidácie mastných kyselín/FOX (rádiometrické eseje) a syntézy lipidov (tenkovrstvová chromatografia). Štatistické analýzy (párový a nepárový T-test, Pearsonova korelačná analýza) sa uskutočnili v programoch JMP (verzia 4.0.2, SAS Institute, USA) alebo Graph Pad Prism (verzia 6.01, USA). Štatistická významnosť bola stanovená na úrovni $p < 0,05$.

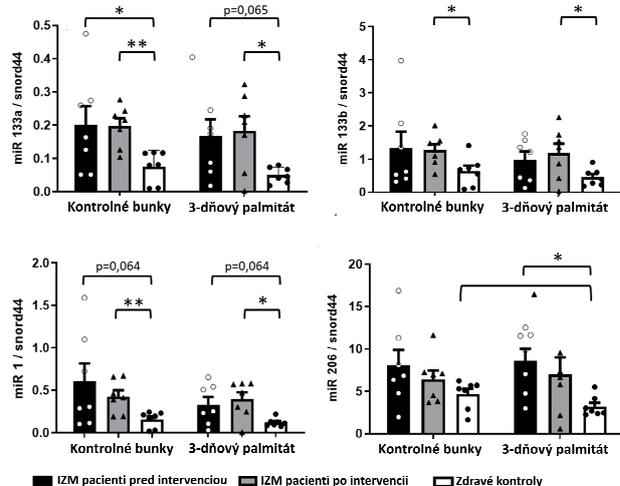
Výsledky

Šesťmesačná intervencia normalizovala glykémiu nalačno u štyroch z piatich pacientov s IZM s poruchou glukózovej tolerancie (oGTT), zlepšila funkčné parametre svalov definujúce svalovú silu (MMT8) a vytrvalosť (FI-2) (Tab. 1) u všetkých pacientov. Tréningová intervencia nezmenila BMI, celkovú netukovú ani tukovú telesnú hmotu (Tab. 1). Expresia svalovo-špecifických miRNA, miR-133a, -133b, -1, -206 bola v bunkových kultúrach myotúb *in vitro*, derivovaných od pacientov s IZM v porovnaní s kontrolami signifikantne zvýšená (2.6-2.1-3.3-0.5-krát, $p < 0,05$). Šesť-mesačný tréning neovplyvnil expresiu myomiRs *in vitro* (Obr.1). Expresia miR-133a a miR-133b v myotubách pacientov s IZM pozitívne korelovala s glykémiou nalačno ($n=21$, $R=0.659$, $p=0.004$; $R=0.551$, $p=0.022$). Pozorovali sme negatívnu koreláciu miR-1, -133a, -133b s akumuláciou medziproduktov oxidácie mastných kyselín (ASPs, acid soluble products; $n=21$, $R=-0.607$, $p=0.004$; $R=-0.577$, $p=0.006$; $R=-0.597$, $p=0.004$). Kompletná oxidácia mastných kyselín (produkcia CO_2) negatívne korelovala/mala tendenciu korelovať s expresiou miR-1, miR-133a, miR-133b ($n=21$, $R=0.458$, $p=0.037$; $R=0.308$, $p=0.089$; $R=0.401$, $p=0.071$). MiR-1, -133a, -133b tiež pozitívne korelovali s množstvom mtDNA ($n=21$, $R=0.446$, $p=0.043$; $R=0.564$, $p=0.008$; $R=0.527$, $p=0.014$) množstvom proteínov OxPHOS komplexu-I ($n=21$, $R=0.479$, $p=0.028$; $R=0.438$, $p=0,047$; $R=0.547$, $p=0.010$) a miR-133a a miR-133b korelovali negatívne s OxPHOS komplexom-V ($R=-0.577$, $p=0.006$; $R=-0.480$, $p=0.028$). MiR-1 a miR-133b boli tiež negatívne asociované s akumuláciou diacylglycerolov ($n=21$, $R=-0.434$, $p=0.049$; $R=-0.501$, $p=0.021$) a miR-133a & miR-133b s triacylglycerolmi ($n=21$, $R=-0.492$, $p=0.023$; $R=-0.526$, $p=0.014$).

Klinický fenotyp	IZM pacienti pred intervenciou	IZM pacienti po intervencii	Zdravé kontroly
Pohlavie [M/Ž]	7 [2/5]	7 [2/5]	7 [2/5]
Vek [roky]	52,7 ± 9,6	53,1 ± 9,7	49,4 ± 9,9
BMI [kg/cm ²]	27,5 ± 10,6	27,4 ± 10,3	27,9 ± 5,3
Telesná hmotnosť [kg]	78,6 ± 28,5	78,3 ± 28	83,3 ± 20,6
Celková chudá hmotnosť DEXA [kg]	41,4 ± 7,2 †	42,0 ± 8,0	49,8 ± 10,4
Celková tuková hmotnosť DEXA [kg]	24,7 ± 11,0	24,1 ± 9,9	31,0 ± 12,9
Lačná glykémia [mmol/l]	6,2 ± 0,8*	5,9 ± 1,1	5,2 ± 0,6
2h glykémia (oGTT) [mmol/L]	6,6 ± 1,2	7,6 ± 3,4	5,7 ± 0,9
QUICKI	0,33 ± 0,04*	0,37 ± 0,10*	0,44 ± 0,15
Manuálny svalový test-8 [skóre]	63,6 ± 8,2	76 ± 4,3 ###	
Funkčný index-2 [%]	53,3 ± 16,5	89,8 ± 11,8 ##	

Tabuľka 1. Charakteristika pacientov s idiopatickou zápalovou myozitídou (IZM), ktorí podstúpili 6-mesačnú intenzívnu tréningovú intervenciu pod dohľadom fyzioterapeuta (priemer ± SD). Zloženie tela bolo stanovené pomocou DEXA. Ž/M - Ženy/Muži; BMI (Body Mass Index) - index telesnej hmotnosti; oGTT - orálny Glukózový Tolerančný Test; QUICKI, index inzulínovej senzitivity. * alebo † pacienti vs. kontroly; # pacienti pred vs. pacienti po tréningu; † $p < 0,06$; * $p < 0,05$; ## $p < 0,01$.

Laiferová N, Nemeč M, Vernerová L, Kurdiová T, Balážová M, Špiritovič M, Tomčík M, Vencovský J, Ukropec J, Ukropcová B: Svalovo-špecifické mikroRNA sú zvýšené v bunkových kultúrach derivovaných z kostrového svalu pacientov s idiopatickou zápalovou myopatiou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 51-54.



Obrázok 1. Expresia miR-133a, -133b, -1, -206 je zvýšená v bunkách kostrového svalu pacientov s idiopatickou zápalovou myozitídou (IZM) v porovnaní so zdravými kontrolami. V myotubách pacientov s IZM sme nepozorovali efekt 6-mesačnej tréningovej intervencie na hladiny špecifických myomiRs. n=7/7/7, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Diskusia

Hlavným klinickým príznakom pacientov s IZM je znížená funkčná kapacita kostrového svalstva. Cvičenie je v súčasnosti odporúčaným a dobre tolerovaným terapeutickým prístupom, ktorý napomáha predchádzaniu straty svalovej hmoty súvisiacej so zápalom, pohybovou inaktivitou aj systémovou liečbou glukokortikoidmi. Fyzická aktivita u pacientov s IZM zlepšuje metabolizmus a funkčnú kapacitu kostrového svalu, samostatnosť a kvalitu života pacientov, a to prakticky bez nežiaducich vedľajších účinkov (9). Šesťmesačný tréning zlepšil metabolizmus, fyzickú zdatnosť a svalovú silu, avšak nie antropometrické parametre pacientov s IZM. Pozorovali sme tiež signifikantné zvýšenie hladín svalovo špecifických miRNA (myomiRs) v diferencovaných svalových bunkách - myotubách pacientov v porovnaní so zdravými kontrolami. V ďalších štúdiách autori popisali zmeny expresie myomiRs u pacientov s IZM v porovnaní so zdravými jedincami. Eisenberg a kol. pozoroval zmeny v regulácii 185 miRNA v kostrovom svale pacientov s muskulárnymi poruchami, vrátane zvýšenia expresie 37 miRNA u pacientov s polymyozitídou a 35 miRNA s dermatomyozitídou (10). Iná štúdia popísala pokles špecifických miRNA, vrátane miR-1, miR-133 a miR-206 zvýšenými hladinami prozápalových cytokínov vo vzorkách kostrového svalu pacientov s IZM. V štúdiu však bola väčšina pacientov neliečených, čo môže spôsobovať rozdiel v našom pozorovaní a ich výsledkami (11). Zvýšenie expresie myomiRs, dôležitých pre reguláciu myogenézy a regeneráciu svalstva, v myotubách derivovaných zo svalu pacientov s IZM môže naznačovať aktiváciu epigenetických mechanizmov, ktoré majú potenciál prispievať ku kompenzácii / spomaleniu progresie ochorenia. Súvislosť medzi expresiou myomiRs v bunkách kostrového svalu *in vitro* a parametrami metabolizmu lipidov a glukózy naznačuje úlohu myomiRs v regulácii systémového a svalového metabolizmu.

Podporené grantom: MZCR 16-33746A, SAS-MOST Joint Research Cooperation grant 2018/10, VEGA 2/0107/18

Zoznam použitej literatúry

1. Hengstman G.J.D., van den Hoogen F.H.J. & van Engelen B.G.M: Treatment of the inflammatory myopathies: Update and practical recommendations. Expert Opinion on Pharmacotherapy. 2009. 10: 1183–1190.

Laiferová N, Nemeč M, Vernerová L, Kurdiová T, Balážová M, Špiritovič M, Tomčík M, Vencovský J, Ukropec J, Ukropcová B: Svalovo-špecifické mikroRNA sú zvýšené v bunkových kultúrach derivovaných z kostrového svalu pacientov s idiopatickou zápalovou myopatiou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 51-54.

2. Coley W., Rayavarapu S. & Nagaraju K: Role of non-immune mechanisms of muscle damage in idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Research and Therapy*. 2012. 14.
3. Liu D., Zuo X., Luo H., Zhu H: The altered metabolism profile in pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2020. 50: 627 – 635.
4. Oddis V., Aggarwal R: Treatment in myositis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018. 14: 279 – 289.
5. Munters L.A., Loell I., Ossipova E., Raouf J., Dastmalchi M., Lindroos E., Chen Y.-W., Esbjörnsson M., Korotkova M., Alexanderson H., Nagaraju K., Crofford L.J., Jakobsson P.-J. & Lundberg I.E: Endurance Exercise Improves Molecular Pathways of Aerobic Metabolism in Patients With Myositis. *Arthritis & Rheumatology*. 2016. 68: 1738–1750.
6. Ukropcova B., McNeil M., Sereda O., de Jonge L., Xie H., Bray G.A. & Smith S.R. 2005. Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor. *Journal of Clinical Investigation*. 115: 1934–1941.
7. Boehler J.F., Hogarth M.W., Barberio M.D., Novak J.S., Ghimbovschi S., Brown K.J., Alemo Munters L., Loell I., Chen Y.W., Gordish-Dressman H., Alexanderson H., Lundberg I.E. & Nagaraju K: Effect of endurance exercise on microRNAs in myositis skeletal muscle — A randomized controlled study. *PLoS ONE*. 2017. 12.
8. Zilahi E., Adamecz Z., Bodoki L., Griger Z., Póliska S., Nagy-Vincze M. & Dankó K: Dysregulated expression profile of myomiRs in the skeletal muscle of patients with polymyositis. *EJIFCC*. 2019. 30: 237–245.
9. Barsotti S. & Lundberg I.E. 2018. Current Treatment for Myositis. *Current Treatment Options in Rheumatology*. 4: 299–315.
10. Eisenberg I., Eran A., Nishino I., Moggio M., Lamperti C., Amato A.A., Lidov H.G., Kang P.B., North K.N., Mitrani-Rosenbaum S., Flanigan K.M., Neely L.A., Whitney D., Beggs A.H., Kohane I.S. & Kunkel L.M. 2007. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 17016–17021.
11. Georgantas R.W., Streicher K., Greenberg S.A., Greenlees L.M., Zhu W., Brohawn P.Z., Higgs B.W., Czapiga M., Morehouse C.A., Amato A., Richman L., Jallal B., Yao Y. & Ranade K. 2014. Inhibition of myogenic microRNAs 1, 133, and 206 by inflammatory cytokines links inflammation and muscle degeneration in adult inflammatory myopathies. *Arthritis and Rheumatology*. 66: 1022–1033.

Daniela Klimová, Uršula Altanerová, Jana Jakubechová, Čestmír Altaner, Vanda Repiská: Inkorporácia chemoterapeutík do extracelulárnych vezikúl odvodených z mezenchymálnych kmeňových/stromálnych buniek. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 55-59.

12. Inkorporácia chemoterapeutík do extracelulárnych vezikúl odvodených z mezenchymálnych kmeňových/stromálnych buniek

Mgr. Daniela Klimová¹
(Patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Spoluautori: Mgr. Uršula Altanerová, PhD², Ing. Jana Jakubechová², doc. Ing. Čestmír Altaner, DrSc.²

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.^{1,3}

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava

²Onkologický ústav sv. Alžbety

³Medirex Group Academy, n.o.

Úvod

Úmrtnosť na rakovinu sa za posledných dvadsať rokov významne nezmenila a v súčasnosti ešte neexistuje efektívny a špecifický spôsob jej liečby, okrem radikálnej chirurgickej resekcie nádoru v počiatočnom štádiu. Génová terapia je v tejto oblasti stále vo fáze klinických štúdií. Hlavným dôvodom „nesmrteľnosti“ nádorov a nádorových buniek je prítomnosť takzvaných samo-regeneračných kmeňových buniek iniciujúcich nádorové bujnenie. Medzi ďalšie dôvody patrí nedostatočná špecificita, závažné vedľajšie účinky chemoterapeutík, a odolnosť buniek voči liekom. Z dôvodu spomínaných významných nedostatkov súčasnej liečby je nevyhnutne potrebná modifikácia a optimalizácia terapie schopnej zamerať sa na agresívne nádorové kmeňové bunky.

Ľudské mezenchymálne/stromálne kmeňové bunky (MSC) sú predmetom výskumu v tejto oblasti najmä vďaka ich schopnosti migrovať k poškodenému tkanivu v tele a regenerovať ho (1). MSC je možné izolovať z rôznych typov tkanív (pupočník, placenta, zubná dreň, tukové tkanivo, kostná dreň alebo menštruačná krv). Terapeutický účinok MSC je do veľkej miery sprostredkovaný extracelulárnymi vezikulami (EVs).

Exozómy sú membránou obalené nanovezikuly s veľkosťou 50-150 nm uvoľňované všetkými typmi buniek. Exozómy boli spočiatku vnímané ako „odpadové“ vezikuly nesúce nežiaduce látky von z bunky. Neskôr sa zistilo, že hrajú významnú rolu v medzibunkovej komunikácii a nesú v svojom kargu rôzne molekuly, ako napríklad cytokíny, rastové faktory, signálne proteíny, mRNA, miRNA a ďalšie zložky (2). Na zlepšenie terapeutického účinku chemoterapeutických liekov boli vyvinuté rôzne nano-systémy. Bohužiaľ, použitie syntetických nanočastíc často vedie k toxicite alebo rýchlej eliminácii fagocytovým systémom mononukleárných buniek. Tento problém by mohli vyriešiť EVs, ktoré majú veľa terapeutických výhod, ako napríklad schopnosť interagovať s recipientnou bunkou pripojením sa na ich povrchu radom proteínov povrchovej adhézie a vektorových ligandov, čím dodávajú svoj náklad do špecifickej cieľovej bunky (3). EVs (exozómy), disponujú špecifickým

Daniela Klimová, Uršula Altanerová, Jana Jakubechová, Čestmír Altaner, Vanda Repiská: Inkorporácia chemoterapeutík do extracelulárnych vezikúl odvodených z mezenchymálnych kmeňových/stromálnych buniek. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 55-59.

bunkovým tropizmom a navádzacou selektivitou podľa ich pôvodu a charakteristík, ktoré je možné použiť na ich zameranie do konkrétneho tkaniva alebo orgánov (4). Alogénne exozómy transplantované z vlastnej krvi alebo tkanív pacientov (kostná dreň, tukové tkanivo, makrofágy atď.) majú navyše „neviditeľný plášť“ pre terapeutické látky imunitného systému. To vedie k zníženiu klirensu liečiva v porovnaní s PEGylovanými nanočasticami. Taktiež môžu byť exozómy lyofilizované a rekonštituované bez zmeny ich morfológie alebo iných vlastností, čo môže byť ďalšia prospešná vlastnosť exozómov ako liekových nosičov (5). Vďaka svojej malej veľkosti sú schopné prenikať cez hematoencefalickú bariéru a dostať sa tak priamo do agresívnych nádorov mozgu a stať sa ich súčasťou (6,7).

Nádorový tropizmus MSC je stredobodom úsilia mnohých vedeckých tímov o zvýšenie špecificity liečby nádorov. Táto myšlienka inšpirovala kolegov k vývoju cielej preliečivovej génovej terapie sprostredkovanej exozómami MSC, dizajnovanými na expresiu samovražedného génu. Fúzny gén cytozín deamináza::uracilfosforibozyltransferáza kvasinkového pôvodu (γ CD::UPRT) je exprimovaný v prítomnosti netoxického preliečiva

5-fluorcytozínu (5-FC). Takýto fúzny gén je schopný konvertovať netoxický 5-FC na toxické cytostatikum 5-fluoruracil (5-FU) a 5-fluoruridínmonofosfát priamo v nádorových bunkách a spôsobiť ich nezvratnú smrť (8-10). Uvedený samovražedný systém ďalej modifikujeme inkorporáciou chemoterapeutík (paclitaxel, 5-FU a gemcitabine) do exozómov z rôznych zdrojov MSC aplikovaných na rôzne typy nádorových buniek.

Materiál a metódy

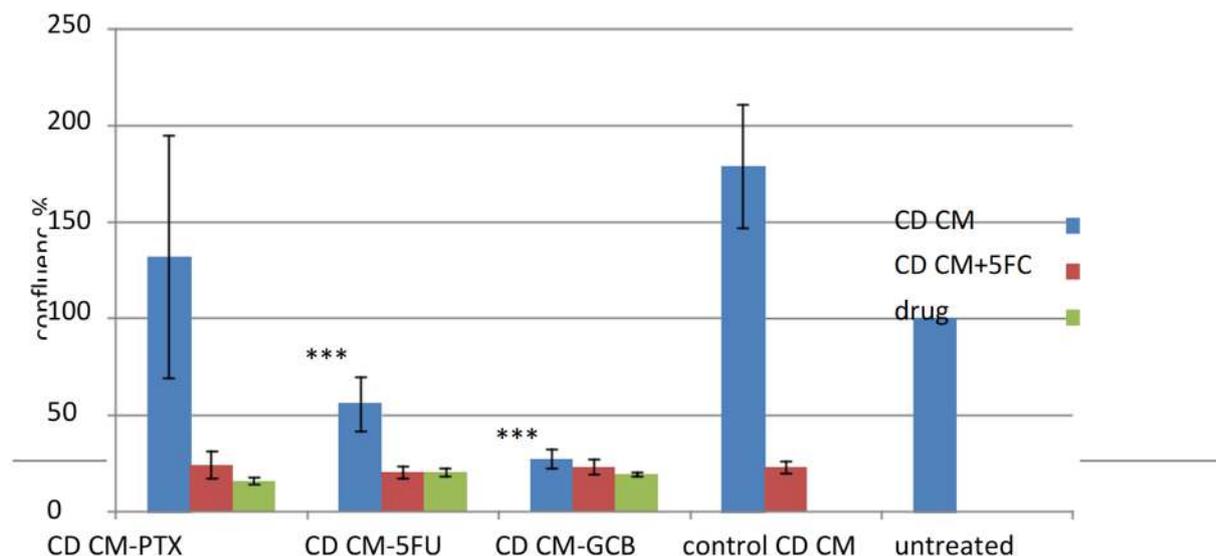
Subkonfluentné ($\sim 5 \times 10^5$) transdukované γ CD::UPRT MSC izolované zo zubnej drene (DP-MS) boli na 24 hodín vystavené nasledovným koncentráciám chemoterapeutík – 8.5 μ g/ml paclitaxel, 1 μ g/ml 5-FU a 2 μ g/ml gemcitabine. Použité koncentrácie boli vybrané na základe titračného profilu a štúdií venujúcich sa podobnej problematike. Po 24 hodinách bolo kultivačné médium s chemoterapeutikom odsaté, a bunky boli 3-krát premyté PBS, aby sme sa zbavili neinkorporovaného liečiva. Následne bolo k bunkám na 24 hodín pridané bezsérové kultivačné médium, ktoré spôsobilo bunkám stresové podmienky, pri ktorých zo seba vylučujú najmenej potrebné zložky do kultivačného média zabalené v EVs (exozómoch). Bezsérové médium obsahujúce exozómy (kondicionované médium - CM) bolo po 24 hodinách harvestované a filtrované cez 22 μ m filter. Harvestované CM obsahujúce chemo-exozómy sa následne pridávalo v objeme 100 μ l do celkového objemu 250 μ l na 96-jamkovú platničku, na ktorú boli deň pred tým nasadené PANC1 bunky 3×10^3 buniek (karcinóm pankreasu). Vzorky boli testované trikrát v kvadruplikátoch, k polovici z nich bolo pridané preliečivo 5-FC. Biologická aktivita vzoriek bola stanovená pomocou MTT testu, štatistická významnosť bola počítaná Studentovým t-testom.

Výsledky

Pri analýze inhibičného účinku chemo-exozómov na rast nádorovej línie PANC1 sme pozorovali, že DP-MS sú schopné do svojich EVs zabaliť 5-FU aj GCB a ich inhibičný efekt bol významne vyšší v porovnaní s kontrolnými neovplyvnenými EVs. Experiment bol prevedený trikrát so vzorkami v kvadruplikátoch. Účinok γ CD::UPRT systému v kombinácii s 5FC mal účinnosť porovnateľnú s čistým chemoterapeutikom. Výsledky MTT testu sú zhrnuté na Obrázku č. 1.

Daniela Klimová, Uršula Altanerová, Jana Jakubechová, Čestmír Altaner, Vanda Repiská: Inkorporácia chemoterapeutík do extracelulárnych vezikúl odvodených z mezenchymálnych kmeňových/stromálnych buniek. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 55-59.

yCD::UPRT CD from HUDPMSC influenced by PTX,5-FU,GCB on PANC1 cells



Obrázok č. 1 Grafické znázornenie inhibičného účinku extracelulárnych vezikúl so zabaleným chemoterapeutikom (chemo EVs) na pankreatickej nádorovej línii PANC1. Modrý stĺpec znázorňuje účinok kondiciovaného média s chemo-EVs, červený stĺpec znázorňuje účinok chemo-EVs s prídavným účinkom yCD::UPRT fúzneho génu s pridaním 5FC, zelený stĺpec znázorňuje inhibičný účinok čistého cytostatika (PTX – 8,5 µg/ml, 5-FU – 1 µg/ml a GCB – 2 µg/ml). Biologická aktivita je prepočítaná vzhľadom k neovplyvnenej kontrole. 5-FU-EVs inhibujú rast PANC1 o 44,2 % ($p=0,0005$) a GCB-EVs o 72,7 % ($p=0,0009$).

Diskusia

Schopnosť chemoterapeutík zbalit' sa cez MSC bunky do extracelulárnych vezikúl, a inhibovať tak rast nádorových buniek, potvrdili spolu s nami aj ostatné vedecké tímy. Naším doplnkom k týmto experimentom bola transdukcia MSC yCD::UPRT systémom, ktorý v prítomnosti 5FC vytvorí cytotoxické 5-FU a cieľovú bunku zničí. Zistili sme, že yCD::UPRT systém nemá v tomto prípade aditívny inhibičný účinok silnejší ako zabalené chemoterapeutikum do extracelulárnych vezikúl, ale má porovnateľný efekt ako voľné chemoterapeutikum s rozdielom, že zabíja bunky špecificky bez negatívneho účinku na iné bunky. Dokázali sme, že 5-FU a GCB sú schopné sa do extracelulárnych vezikúl zbalit' a účinne eliminovať PANC1 bunky *in vitro*. Na vyvrátenie tvrdenia, že je to účinok voľného liečiva v médiu, ktoré sa neinkorporovalo do EVs, sme MSC bunky ovplyvnili chemoterapeutikom aj druhýkrát, pričom druhýkrát kondiciované medium nevykazovalo na PANC1 bunkách žiadny inhibičný efekt.

Mnoho štúdií sa zaujíma o zavedenie PTX do MSC s cieľom nájsť optimálne podmienky pre jeho distribúciu. Pascucci a kol. (2014) ako prví demonštrovali schopnosť MSC prijať a zabalit' protirakovinové liečivá vo forme EVs, na rozdiel od iných vedeckých skupín, kde bolo

Daniela Klimová, Uršula Altanerová, Jana Jakubechová, Čestmír Altaner, Vanda Repiská: Inkorporácia chemoterapeutík do extracelulárnych vezikúl odvodených z mezenchymálnych kmeňových/stromálnych buniek. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 55-59.

chemoterapeutikum inkorporované do vyzolovaných EVs (11). Borghese a kol. (2020) potvrdili, že PTX (2 µg/ml) zabalené v EVs z AT-MSC je účinnejšie

v eliminácii OvCa buniek ako čisté liečivo (12). Salehi a kol. (2018) dokázali, že DP je vhodný zdroj MSC na inkorporáciu a sekréciu PTX pri použití 8.5 µg/ml PTX do EVs pri liečbe rakoviny (13).

V prípade inkorporácie 5-FU do EVs spôsobom ovplyvnenia MSC dosiaľ nie sú dostupné žiadne publikácie na porovnanie s našimi výsledkami.

Štúdia Bonomi a kol. (2015) dokázala, že GCB je možné inkorporovať do MSC derivovaných z kostnej drene a pankreasu (14). Výskumná skupina Li a kol. (2019) sa venovala ovplyvneniu izolovaných purifikovaných autológnych exozómov gemcitabinom pomocou metód sonikácie a inkubácie (15). Demonštrovali, že autológne exozómy sú bezpečné a účinné nosiče na dodávanie GEM na liečbu rakoviny pankreasu.

Extracelulárne vezikuly (exozómy) sú vhodným terapeutickým nástrojom na efektívne dodanie proti-rakovinových liečiv do nádorových buniek. S ich biologickým pôvodom a nano-veľkosťou sú schopné preniknúť do nádorového tkaniva a vylúčiť tak zabalený náklad špecificky do cieľových buniek bez vedľajších účinkov.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy APVV-17-0526.

Zoznam literatúry

1. SPAETH, E., et al. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene therapy*, 2008, 15.10: 730-738
2. CHEN, Tian Sheng, et al. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic acids research*, 2010, 38.1: 215-224
3. THÉRY, Clotilde; OSTROWSKI, Matias; SEGURA, Elodie. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews immunology*, 2009, 9.8: 581-593.
4. WIKLANDER, Oscar PB, et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of extracellular vesicles*, 2015, 4.1: 2
5. HANEY, Matthew J., et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of Controlled Release*, 2015, 207: 18-30.
6. ALVAREZ-ERVITI, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S. and Wood, M.J., 2011. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology*, 29(4), pp.341-345.
7. LIAO, Wen, et al. Exosomes: the next generation of endogenous nanomaterials for advanced drug delivery and therapy. *Acta biomaterialia*, 2019, 86: 1-14.
8. ALTANEROVA U, et al. Human Mesenchymal Stem Cell-derived Iron Oxide Exosomes Allow Targeted Ablation of Tumor Cells via Magnetic Hyperthermia. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 7923-7936

Daniela Klimová, Uršula Altanerová, Jana Jakubecová, Čestmír Altaner, Vanda Repiská: Inkorporácia chemoterapeutík do extracelulárnych vezikúl odvodených z mezenchymálnych kmeňových/stromálnych buniek. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 55-59.

9. ALTANEROVA, U. et al, 2016. Dental pulp mesenchymal stem/stromal cells labeled with iron sucrose release exosomes and cells applied intra-nasally migrate to intracerebral glioblastoma. *Neoplasma*, 63(6), pp.925-933
10. ALTANER, C., 2015. Prodrug gene therapy for cancer mediated by mesenchymal stem/stromal cells engineered to express yeast cytosinedeaminase:: uracilphos phosphoribosyltransferase. *J Stem Cell Res Ther*, 5(264), p.2.
11. PASCUCCI, L., et al. 2014. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 192, pp.262-270.
12. BORGHESE, C. et al, 2020. Adipose-Derived Stem Cells Primed with Paclitaxel Inhibit Ovarian Cancer Spheroid Growth and Overcome Paclitaxel Resistance. *Pharmaceutics*, 12(5), p.401.
13. SALEHI, H., et al. 2018. Dental pulp stem cells used to deliver the anticancer drug paclitaxel. *Stem cell research & therapy*, 9(1), pp.1-10.
14. BONOMI, A. et al, 2015. Gemcitabine-releasing mesenchymal stromal cells inhibit in vitro proliferation of human pancreatic carcinoma cells. *Cytotherapy*, 17(12), pp.1687-1695.
15. LI. et al, 2020. Gemcitabine loaded autologous exosomes for effective and safe chemotherapy of pancreatic cancer. *Acta biomaterialia*, 101, pp.519-530.

Katarína Fabišíková, Simona Humplíková, Vanda Repiská: *Inovatívne monitorovanie pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom.. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 60-64.*

13. Inovatívne monitorovanie pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom

Mgr. Katarína Fabišíková¹
(Patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Spoluautor: MUDr. Simona Humplíková¹

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.^{1,2}

¹ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB

² Medirex Group Academy, n.o.

Úvod

Cirkulujúca nádorová DNA (ctDNA) je časť voľnej cirkulujúcej DNA (cfDNA), ktorá je uvoľňovaná priamo z nádorového tkaniva, v čoho dôsledku je táto ctDNA geneticky identická s korešpondujúcim primárnym tumorom (1). ctDNA má potenciál zmeniť klinickú prax v štyroch kľúčových oblastiach, ktorými sú detekcia minimálneho reziduálneho ochorenia, manažment pacientov s nádormi konečníka, monitorovanie odpovede na liečbu a sledovanie klonálnej dynamiky v reakcii na ciele terapeutie a ďalšie systémové liečby (2).

Analýza ctDNA sa u pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom (mCRC) používa na testovanie mutácií v génoch *KRAS*, *NRAS* a *BRAF*. V prípade génov *KRAS* a *NRAS* môže analýza ctDNA identifikovať pacientov s horšou prognózou, ktorí môžu profitovať z agresívnejšieho režimu chemoterapie, ktorý môže byť v prípade *wild-type* mutačného statusu kombinovaný s biologickou liečbou, nakoľko z liečby monoklonálnymi protilátkami (cetuximab a panitumumab) profitujú len pacienti bez mutácie v génoch *KRAS* a *NRAS*. Mutácie v géne *BRAF* možno použiť ako negatívny prognostický biomarker pre celkové prežívanie a rovnako môžu mať úlohu pri výbere vhodnej liečby (3).

V našej práci sme pomocou plne automatizovaného diagnostického systému Idylla™ analyzovali mutácie v génoch *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* v nádorových tkanivách fixovaných vo formalíne (FFPE) a v cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA) z krvnej plazmy u pacientov so sporadickým mCRC. Analýzou ctDNA v krvi pacientov počas terapie monoklonálnymi protilátkami sme monitorovali potenciálnu zmenu mutačného statusu génov *RAS* a *BRAF* medzi jednotlivými odbermi, čo nám následne umožnilo sledovať pokrok v liečbe monoklonálnymi protilátkami, resp. progresiu ochorenia u jednotlivých pacientov.

Materiál a metódy

Naš súbor pozostával zo 49 pacientov s diagnostikovaným mCRC vo vekovom rozpätí od 39 do 91 rokov. Všetkým pacientom boli odobraté FFPE vzorky a vzorky periférnej krvi. Prvotný DNA test bol u každého pacienta vykonaný z FFPE vzorky získanej z chirurgicky resektovaného nádorového tkaniva. Ďalšie DNA testy boli vykonané z periférnej krvi (resp. ctDNA) odobratej pred, počas a po ukončení terapie monoklonálnymi protilátkami. Pacientov sme rozdelili podľa počtu odberov krvnej plazmy (1-5 odberov), ktorý bol u jednotlivých pacientov stanovený na základe rozhodnutia klinických onkológov.

Pracovný postup izolácie krvnej plazmy z periférnej krvi

Vzorku krvnej plazmy sme pripravovali z 10 mL odobratej periférnej krvi dodanej v EDTA skúmavke (izoláciu bolo nutné urobiť do 4 hodín) alebo v STRECK skúmavke (izoláciu bolo

Katarína Fabišiková, Simona Humplíková, Vanda Repiská: *Inovatívne monitorovanie pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom.. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 60-64.*

nutné urobiť do 72 hodín). Krv v skúmavke sme centrifugovali pri 1500 g po dobu 10 minút pri laboratórnej teplote. Medzitým sme si pripravili 1,5 mL skúmavky. Supernatant (krvnú plazmu) sme rozpipetovali po 1,2 mL do pripravených 1,5 mL skúmaviek, pričom sme dávali pozor, aby sme špičkou nenabrali krvné bunky z peletu. Následne sme skúmavky centrifugovali pri 15000 – 20000 g po dobu 1 minúty pri laboratórnej teplote. Na záver sme supernatant (krvnú plazmu) rozpipetovali po 1,1 mL do nových 1,5 mL skúmaviek.

Analýza vzoriek ctDNA pomocou diagnostického systému Idylla™

Otvorili sme príslušnú Idylla™ kazetu (ctKRAS/ ctNRAS-BRAF) na analýzu ctDNA a napipetovali sme 1 mL izolovanej krvnej plazmy. Na ovládacej konzole Idylla™ sme navolili testovanie, vyplnili sme potrebné identifikačné údaje o analyzovanej vzorke a naskenovali sme identifikačný kód na analyzačnej kazete a spustili sme analýzu. Po ukončení času potrebného na izoláciu a analýzu DNA sme vybrali analyzačnú kazetu a vyexportovali výsledok analýzy ctDNA.

Pracovný postup analýzy FFPE vzoriek pomocou diagnostického systému Idylla™

Na krúžky filtračného papiera sme napipetovali 60 µL *nuclease-free* vody. Na jeden z krúžkov filtračného papiera sme pomocou pinzety naniesli dostatočné množstvo rezov z tkanív. Rezy z tkanív sme prikryli druhým krúžkom filtračného papiera. Pripravené vzorky sme vložili pinzetou do komôrky analyzačnej kazety, ktorú sme následne zatvorili a spustili sme analýzu.

Výsledky

Z celkového počtu pacientov bol vykonaný prvý odber u 49 pacientov, z toho druhý odber u 13 pacientov, tretí odber u 8 pacientov, štvrtý odber u 2 pacientov a piaty odber u 2 pacientov (Tabuľka 1). Spomedzi 49 pacientov malo 22 pacientov *wild-type RAS* a *BRAF* status a 27 pacientov malo mutáciu v niektorom z vyšetrovaných génov, pričom sme identifikovali 12 diskrepancií v mutačnom statuse medzi výsledkom vyšetrenia FFPE vzorky a vzorky krvnej plazmy (Tabuľka 2).

Tabuľka 1. Zhody a diskrepancie mutačného statusu medzi jednotlivými odbermi u pacientov, u ktorých bola vyšetrená vzorka FFPE a zároveň vzorka krvnej plazmy (ctDNA).

POČET PACIENTOV S VYŠETRENOU ctDNA + FFPE: 49			
Poradie odberov	Počet pacientov	Zhoda mutačného statusu v jednotlivých odberoch	Zmena mutačného statusu medzi jednotlivými odbermi
odber	49	–	–
odber	13	9	3
odber	8	4	3
odber	2	0	2
odber	2	1	1

Katarína Fabišíková, Simona Humplíková, Vanda Repiská: *Inovatívne monitorovanie pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom.. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 60-64.*

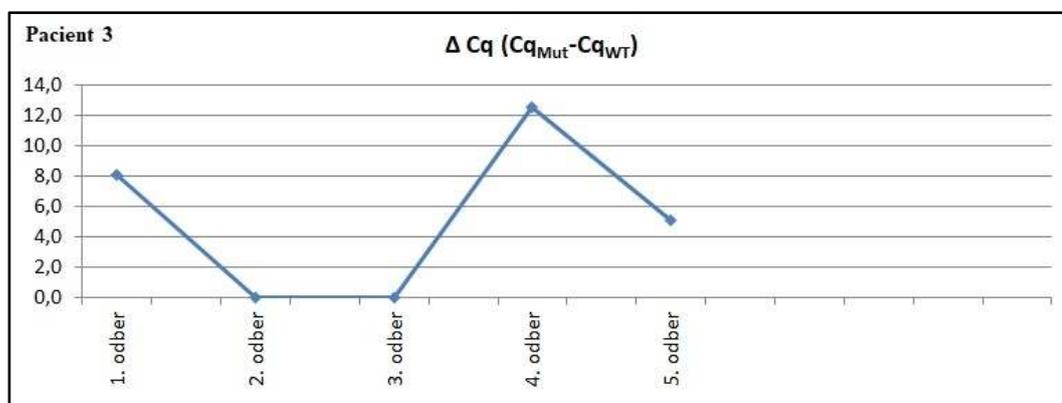
Tabuľka 2. Diskrepancie v génoch *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* medzi vzorkou FFPE a 1. odberom ctDNA.

Diskrepancie medzi FFPE a ctDNA:		
Gén s identifikovaným patogénnym variantom	FFPE wt → 1. odber ctDNA mut	FFPE mut → 1. odber ctDNA wt
	3	9
<i>KRAS</i>	2	4
<i>NRAS</i>	1	2
<i>BRAF</i>	0	3

Okrem kvalitatívneho vyhodnotenia výsledkov analýzy cirkulujúcej nádorovej DNA sme sa zaoberali aj kvantitatívnym monitorovaním jednotlivých odberov. Automatický diagnostický systém Idylla™ je založený na princípe metódy Real-time PCR, a teda umožňuje vizualizáciu a kvantifikáciu amplifikácie DNA v reálnom čase. Kľúčovým údajom bola pre nás hodnota Cq, t.j. tzv. prahový cyklus (threshold cycle), v ktorom začína exponenciálna fáza, kedy sa fluorescencia zvýši na úroveň optickej detekcie. Pre každý z odberov sme vypočítali hodnotu ΔCq , ktorá zodpovedá rozdielu hodnoty Cq mutovanej vzorky a hodnoty Cq s wild-type mutačným statusom ($\Delta Cq = Cq_{Mut} - Cq_{WT}$). V prípade, že výsledok vyšetrenia bol negatívny, t.j. wild-type RAS a BRAF status, hodnota ΔCq bola rovná 0 (4). V Tabuľke 3 sú uvedené výsledky ctRAS testov a hodnoty Cq a ΔCq pacienta, u ktorého sme vyšetrovali krvné plazmy z 5 odberov periférnej krvi. Následne sme zostrojili graf (ΔCq plot), ktorý znázorňuje konkrétne zmeny v mutačnom statuse medzi jednotlivými odbermi (Graf 1).

Tabuľka 3. Hodnoty Cq a ΔCq pacienta, u ktorého boli vyšetrené krvné plazmy z piatich odberov periférnej krvi.

Pacient 3 Poradie odberu	Výsledok Idylla™ ctRAS testu	Cq Mut	Cq WT	ΔCq ($Cq_{Mut} - Cq_{WT}$)*
1. odber	<i>KRAS</i> G12V	33,54	25,39	8,15
2. odber	wt	---	25,3	0
3. odber	wt	---	24,9	0
4. odber	<i>KRAS</i> A146T/V/P	36,06	23,51	12,55
5. odber	<i>KRAS</i> G12V	28,77	23,69	5,08



Graf 1. Delta Cq plot znázorňujúci monitorovanie RAS a BRAF mutačného statusu pacienta, u ktorého boli vyšetrené krvné plazmy z piatich odberov periférnej krvi.

Katarína Fabišíková, Simona Humplíková, Vanda Repiská: *Inovatívne monitorovanie pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom.. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 60-64.*

Diskusia

Výhodou diagnostiky založenej na ctDNA pomocou diagnostického systému Idylla™ je jej neinvazívnosť, rýchlosť získania výsledkov a ich jednoduchá interpretácia bez nutnosti analýzy zložitých grafov. ctDNA poskytuje dostatočné informácie o biologických vlastnostiach nádoru, o jeho heterogenite a výsledky viacerých štúdií preukázali zhodu so vzorkami nádorového tkaniva (5, 6).

V našej práci sme nevenovali pozornosť konkrétnym typom mutácií, ale zaujímal nás najmä pomer diskrepancií k celkovému počtu vyšetrených vzoriek. V rámci inovatívneho monitorovania pacientov s mCRC nás zaujímali najmä zmeny mutačného statusu u pacientov, ktorým sme vyšetřili sériu odberov krvnej plazmy (3 až 5 odberov). Takéto sériové vyšetřenie genetických variantov vo vzorkách krvnej plazmy má potenciál poskytnúť informácie o priestorovej a časovej heterogenite nádoru v rozsahu, aký nie je možné dosiahnuť analýzou samotných vzoriek nádorového tkaniva. FFPE vzorky sú častokrát nevhodné a zamietnuté pre analýzu genetických variantov pomocou Sangerovho sekvenovania alebo metódy NGS z dôvodu nedostatočného množstva materiálu alebo nízkeho percenta nádorových buniek vo vzorke (7).

V rámci 12 prípadov diskrepancie mutačného stavu medzi FFPE vzorkou a prvým odberom krvnej plazmy sme identifikovali 9 prípadov, kde bola FFPE vzorka pozitívna pre mutáciu v niektorom z *RAS* onkogénov, zatiaľ čo prvý odber ctDNA vykazoval *wild-type RAS* status (Tabuľka 2).

Možným vysvetlením týchto diskrepancií je intratumorálna heterogenita. Je známe, že mutácie v génoch *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* v kolorektálnom nádore sú priestorovo heterogénne (8). Vzorka nádorového tkaniva, v ktorej sme testovali *RAS*, resp. *BRAF* mutačný status pravdepodobne pochádzala z nádorového fragmentu, ktorý bol práve náhodou zmutovaný, zatiaľ čo väčšina zostávajúcej nádorovej hmoty bola negatívna. ctDNA, ktorá odráža priemernú hodnotu celého obsahu nádorových buniek bola pre *RAS*, resp. *BRAF* mutácie negatívna v dôsledku zriedenia mutovaných subklonov v nemutovaných klonoch nádorových buniek.

Zmenu mutačného statusu medzi jednotlivými odbermi sme zaznamenali u 9 pacientov (Tabuľka 1). U týchto pacientov sme sledovali aj kvantifikáciu amplifikácie DNA v reálnom čase. Farmakogenomická analýza buniek CRC, ktoré získali rezistenciu na cetuximab ukazuje, že po vysadení protilátok sa klony s *KRAS* mutáciou rozpadajú, zatiaľ čo populácia znovu získava citlivosť na toto liečivo. Profily ctDNA pacientov, ktorí profitujú z viacnásobného podávania anti-EGFR protilátok, vykazujú pulzatívne zmeny mutačného statusu génu *KRAS*. Tieto výsledky ukazujú, že genóm CRC sa dynamicky adaptuje na prerušované dávkovacie schémy a poskytuje molekulárne vysvetlenie účinnosti opakovaných cyklov liečby založenej na EGFR inhibítoroch (9). Uvedená farmakogenomická analýza vysvetľuje zmeny mutačného statusu génu *KRAS* medzi jednotlivými odbermi v prípade pacienta z nášho vyšetřovaného súboru, u ktorého sme vyšetřili 5 odberov krvnej plazmy. U tohto pacienta sme zaznamenali nasledujúce zmeny v mutačnom stave: *KRAS* mut G12V (1. odber ctDNA) → *KRAS* wt (2. odber ctDNA) → *KRAS* wt (3. odber ctDNA) → *KRAS* mut A146T/V/P (4. odber ctDNA) → *KRAS* mut G12V (5. odber ctDNA) (Tabuľka 3, Graf 1). U tohto pacienta sa hodnota ΔCq medzi 4. a 5. odberom výrazne líšila. V 4. odbere bola hodnota ΔCq 12,55, čo poukazuje na nižšie zastúpenie nádorových buniek s mutáciou v porovnaní s 5. odberom, kde hodnota ΔCq bola 5,08.

Naše výsledky ukázali, že sériové monitorovanie ctDNA má potenciál pomôcť klinickým lekárom pri prijímaní rozhodnutí v personalizovanej liečbe a uľahčiť včasné prispôsobenie

Katarína Fabišíková, Simona Humplíková, Vanda Repiská: *Inovatívne monitorovanie pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom.. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 60-64.*

liečby tak, aby sa znížila miera toxicity neúčinných terapií, a taktiež aby sa umožnil rýchlejší prechod na potenciálne účinnejšiu liečbu.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dlhodobý strategický výskum a vývoj zameraný na výskyt Lynchovho syndrómu v populácii SR a možnosti prevencie nádorov spojených s týmto syndrómom , kód ITMS: 313011V578, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

1. Khakoo S, Georgiou A, Gerlinger M, Cunningham D, Starling N. Circulating tumour DNA, a promising biomarker for the management of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018; 122: 72-82.
2. Dasari A, Morris VK, Allegra CJ, Atreya C, Benson AB 3rd, Boland P, Chung K, Copur MS, Corcoran RB, Deming DA, Dwyer A, Diehn M, Eng C, George TJ, Gollub MJ, Goodwin RA, Hamilton SR, Hechtman JF, Hochster H, Hong TS, Innocenti F, Iqbal A, Jacobs SA, Kennecke HF, Lee JJ, Lieu CH, Lenz HJ, Lindwasser OW, Montagut C, Odisio B, Ou FS, Porter L, Raghav K, Schrag D, Scott AJ, Shi Q, Strickler JH, Venook A, Yaeger R, Yothers G, You YN, Zell JA, Kopetz S. ctDNA applications and integration in colorectal cancer: an NCI Colon and Rectal-Anal Task Forces whitepaper. *Nat Rev Clin Oncol* 2020; 17{12}: 757-770.
3. Kolenčík D, Shishido SN, Pitule P, Mason J, Hicks J, Kuhn P. Liquid Biopsy in Colorectal Carcinoma: Clinical Applications and Challenges. *Cancers (Basel)*. 2020 May; 12(6):1376.
4. Melchior L, Grauslund M, Bellosillo B, Montagut C, Torres E, Moragón E, Micalessi I, Frans J, Noten V, Bourgain C, Vriesema R, van der Geize R, Cokelaere K, Vercooren N, Crul K, Rüdiger T, Buchmüller D, Reijans M, Jans C. Multi-center evaluation of the novel fully-automated PCR-based Idylla™ BRAF Mutation Test on formalin-fixed paraffin-embedded tissue of malignant melanoma. *Exp Mol Pathol* 2015; 99{3}: 485-91.
5. Thierry AR, El Messaoudi S, Mollevi C, Raoul JL, Guimbaud R, Pezet D, Artru P, Assenat E, Borg C, Mathonnet M, De La Fouchardiére C, Bouché O, Gavaille C, Fiess C, Auzemery B, Meddeb R, Lopez-Crapez E, Sanchez C, Pastor B, Ychou M. Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Ann Oncol* 2017; 28{9}: 2149-2159.
6. Bachet JB, Bouché O, Taieb J, Dubreuil O, Garcia ML, Meurisse A, Normand C, Gornet JM, Artru P, Louafi S, Bonnetain F, Thiriot-Bidault A, Baumgaertner I, Coriat R, Tougeron D, Lecomte T, Mary F, Aparicio T, Marthey L, Taly V, Blons H, Vernerey D, Laurent-Puig P. RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol* 2018; 29{5}: 1211-1219.
7. Samra H, Springborn S, Alexander Mackinnon A. The Idylla™ Molecular Testing System Is a Useful Option for the Detection of Clinically Actionable Variants in Challenging FFPE Samples Not Suitable for Conventional Sanger and NGS Testing. *Mod Pathol*. 2019; 32:52.
8. Baker AM, Huang W, Wang XM, Jansen M, Ma XJ, Kim J, Anderson CM, Wu X, Pan L, Su N, Luo Y, Domingo E, Heide T, Sottoriva A, Lewis A, Beggs AD, Wright NA, Rodriguez-Justo M, Park E, Tomlinson I, Graham TA. Robust RNA-based in situ mutation detection delineates colorectal cancer subclonal evolution. *Nat Commun* 2017; 8{1}: 1998.
9. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, Ponzetti A, Cremolini C, Amatu A, Lauricella C, Lamba S, Hobor S, Avallone A, Valtorta E, Rospo G, Medico E, Motta V, Antoniotti C, Tatangelo F, Bellosillo B, Veronese S, Budillon A, Montagut C, Racca P, Marsoni S, Falcone A, Corcoran RB, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Siena S, Sartore-Bianchi A, Bardelli A. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med*. 2015 Jul; 21(7):795-801. Erratum in: *Nat Med*. 2015 Jul; 21(7). Erratum in: *Nat Med* 2015; 21{7}: 827.

Marta Kollárová, Mária Chomová, Ľubomíra Tóthová, Jana Radošinská: Aktivita matrixových metaloproteináz v animálnom modeli diabetes mellitus 2. typu. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 65-69.

14. Aktivita matrixových metaloproteináz v animálnom modeli diabetes mellitus 2. typu

Mgr. Marta Kollárová¹
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: doc. Ing. Mária Chomová, PhD.², doc. RNDr. Ľubomíra Tóthová, PhD.³, doc. MUDr. Jana Radošinská, PhD.^{1,4}

Školiteľ: doc. MUDr. Jana Radošinská, PhD

¹ Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, ² Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, ³ Ústav molekularnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, ⁴ Ústav pre výskum srdca, Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Úvod

Diabetes mellitus (DM) predstavuje jeden z najvýznamnejších rizikových faktorov rozvoja kardio-vaskulárnych ochorení. Patrí k najrozšírenejším voľnoradikálovým ochoreniam (1). Vznik DM je podmienený poruchou v tvorbe, sekrécii alebo účinku inzulínu. Jeho patogenéza zahŕňa zvýšenú tvorbu reaktívnych metabolitov, čo znamená zvýšený oxidačný stres. Voľné radikály sa svojim pôsobením podieľajú na vzniku DM pri imunogenetickej deštrukcii beta buniek pankreasu. Okrem zvýšenia oxidačného stresu zohrávajú v patogenéze DM významnú úlohu aj zápalové procesy, ktoré sú dôsledkom hyperglykémie a ktoré sa zúčastňujú vzniku a rozvoja chronických komplikácií tohto ochorenia. Pacienti s DM sú najviac postihnutí práve komplikáciami, ktoré ochorenie sprevádzajú. Chronická hyperglykémia môže viesť k dysfunkcii alebo k celkovému zlyhaniu dôležitých orgánov (2,3). Matrixové metaloproteinázy (MMP) sú proteolytické enzýmy dôležité pri degradácii a remodelácii extracelulárneho matrixu (ECM). Ich úloha by sa dala popísať takmer pri každom fyziologickom aj patologickom procese. V dospelom organizme je aktivita MMP všeobecne veľmi nízka. K zvýšenej aktivácii dochádza väčšinou lokálne a za špecifických okolností, zväčša pri patologických a reparačných procesoch v rôznych orgánoch. U ľudí je známych vyše 20 MMP, rozdelených do šiestich skupín, na základe ich štruktúry a substrátovej špecificity (4). V našej práci sa zameriavame na skupinu želatináz, do ktorej patria MMP-2 a MMP-9.

Hlavným cieľom našej štúdie je popísanie aktivít MMP-2 a MMP-9 v animálnom modeli DM v rôznych štádiách rozvoja tohto ochorenia, ako aj u zdravých kontrol, v plazme a myokarde. Je známe, že pri zvýšenom oxidačnom strese dochádza k priamej aktivácii MMP, preto sme vo všetkých vzorkách súčasne sledovali vybrané parametre oxidačného stresu. Skúmanie MMP je klinicky zaujímavé z pohľadu ich využitia ako potenciálnych biomarkerov rozvoja kardio-vaskulárnych komplikácií DM ako aj možných prediktorov účinnosti liečby tohto ochorenia (5,6).

Materiál a metódy

V experimente sme pracovali so vzorkami plazmy samcov potkanov 4 fenotypov: Wistar (W, absolútna kontrola, n=14), Zucker Lean (chudá kontrola, n=15), Zucker Diabetic Fatty (ZDF) s hyperglykémiou (DIA, n=9) a ZDF bez hyperglykémie (FAT, n=7). Počas celého života boli zvieratá vo všetkých experimentálnych skupinách bez akejkoľvek intervencie. Pravidelne sa im zaznamenávala hmotnosť tela, hladina inzulínu a hladina glukózy v krvi. Usmrtené boli medzi 38.-39. týždňom života. Vzorky krvi boli odobraté do skúmaviek s K₃EDTA, centrifugované (850 g, 10 min, 4 °C) a plazma ako aj ľavá komora srdca boli až po ich analýzu uchované pri -80 °C.

Marta Kollárová, Mária Chomová, Ľubomíra Tóthová, Jana Radošinská: Aktivita matrixových metaloproteináz v animálnom modeli diabetes mellitus 2. typu. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 65-69.

Stanovenie aktivít MMP-2 a MMP-9⁷

Aktivitu MMP-2 a MMP-9 sme stanovili metódou želatínovej zymografie. Táto metóda zahŕňa elektroforetickú separáciu proteínov za denaturujúcich, ale neredukujúcich podmienok v polyakrylamidovom géli, ktorý obsahuje želatínu ako vhodný substrát pre MMP-2 a MMP-9. Proteíny sú po elektroforéze renaturované a gél je inkubovaný cez noc vo vhodnom tlmivom roztoku na skúmanie aktivít konkrétnych proteínáz. Gél je farbený *Coomassie Blue* a proteolytické aktivity MMP-2 a MMP-9 sú detegované ako jasné pásy na modrom pozadí.

Stanovenie parametrov oxidačného stresu⁸

Stanovili sme vybrané parametre oxidačného poškodenia (AOPP – pokročilé produkty oxidácie proteínov, fruktozamín – glykovaný plazmatický proteín a TBARs – marker peroxidácie lipidov) a tiol-disulfidovej redoxnej rovnováhy (GSH/GSSG – pomer oxidovaného a redukovaného glutatiónu).

Spracovanie nameraných dát

Namerané dáta boli analyzované pomocou štatistického softvéru GraphPad Prism 7. Pre zistenie rozdielov v hmotnosti tela, hladine glukózy, inzulínu a parametrov oxidačného stresu sme použili dvojcestnú analýzu variancie, pre zistenie rozdielov v aktivitách MMP t-test (z metodických dôvodov).

Výsledky

Všetky sledované parametre oxidačného stresu – produkty oxidačného poškodenia a prítomnosť antioxidantov, telesnej hmotnosti, hladiny glukózy a inzulínu v krvi uvádzame v Tabuľke 1.

Tabuľka 1 Hmotnosť tela, hladina inzulínu, glukózy, parametre oxidačného stresu

		Wistar	Lean	DIA	FAT
Hmotnosť tela (g)	priemer	498	417	538	630
	SD	87,1	31,5	52,8	25,1
	signif.		**	xxx	xxx *** ●
Glukóza (mmol/L)	priemer	6,21	6,91	24,31	11,13
	SD	0,592	0,675	2,53	3,646
	signif.			xxx ***	xxx *** ●●●
Inzulín (ng/mL)	priemer	3,73	3,24	11,52	26,21
	SD	1,028	0,371	2,311	4,315
	signif.			xxx ***	xxx *** ●●●
AOPP (μ mol/L)	priemer	128	287	3427	2457
	SD	36,9	124,4	1633	1010
	signif.			xxx ***	xxx ***

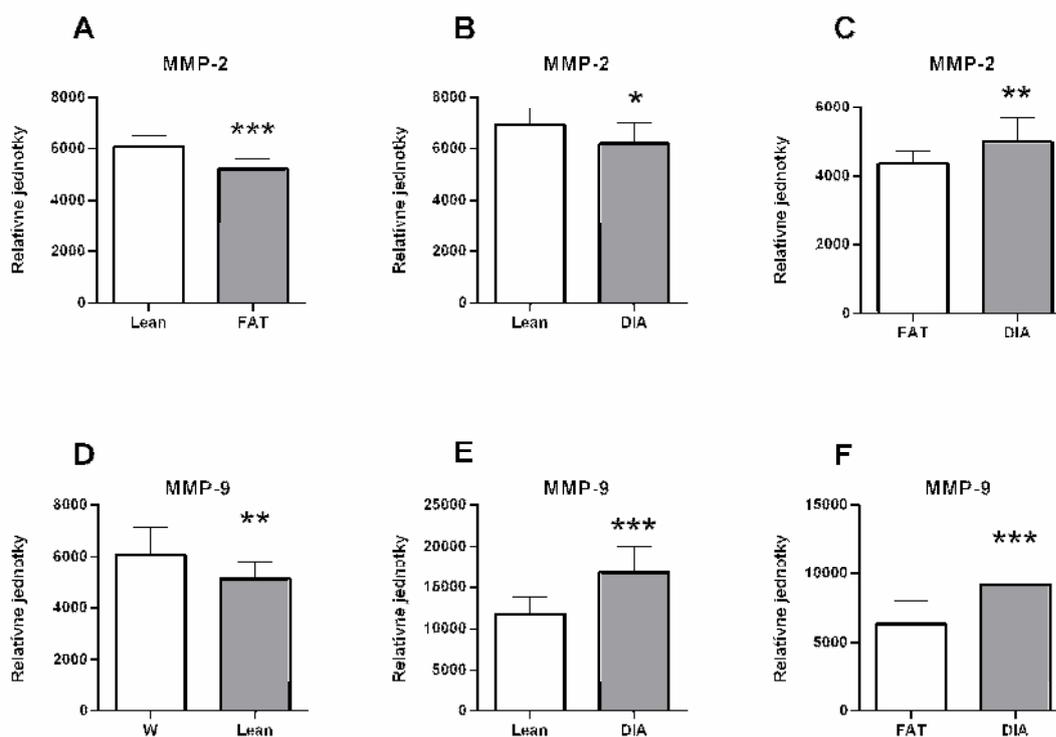
xx reprezentuje $p < 0,01$ a xxx $p < 0,001$ vs. Lean; * reprezentuje $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$ vs. Wistar; ●●● reprezentuje $p < 0,001$ vs. DIA

Marta Kollárová, Mária Chomová, Ľubomíra Tóthová, Jana Radošinská: Aktivita matrixových metaloproteináz v animálnom modeli diabetes mellitus 2. typu. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 65-69.

Tabuľka 2 Hmotnosť tela, hladina inzulínu, glukózy, parametre oxidačného stresu

Fruktozamín (mmol/L)	priemer	1,11	1,42	14,08	8,08
	SD	0,192	0,315	6,884	2,487
	signif.			xxx ***	xxx *** ●●●
GSH/GSSG	priemer	11,25	11,13	9,65	9,32
	SD	2,114	1,709	0,923	0,668
	signif.				*
TBARs (μ mol/L)	priemer	10	10,95	14,45	20,36
	SD	0,728	0,91	3,206	3,085
	signif.			xx ***	xxx *** ●●●

xx reprezentuje $p < 0,01$ a xxx $p < 0,001$ vs. Lean; * reprezentuje $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$ vs. Wistar; ●●● reprezentuje $p < 0,001$ vs. DIA

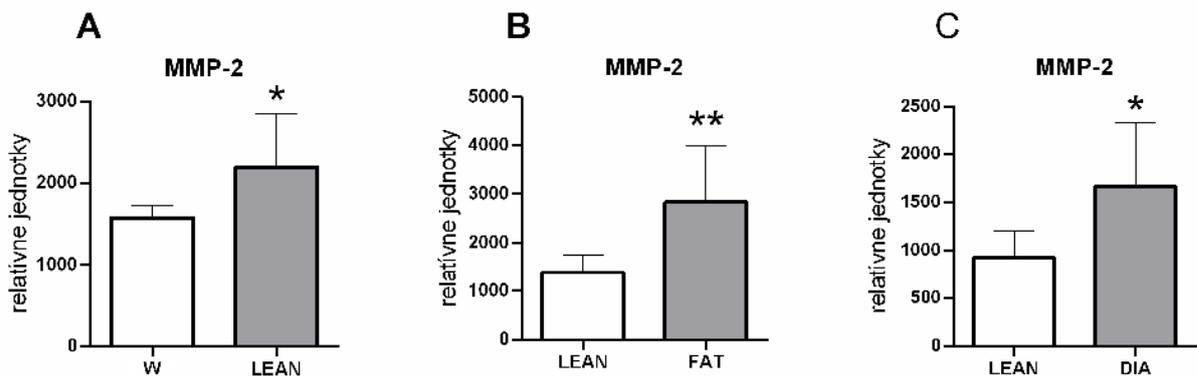


Obrázok 1 Aktivita MMP-2 a MMP-9 v plazme. A: Zucker Lean vs. Zucker Diabetic Fatty bez hyperglykémie, B: Zucker Lean vs. Zucker Diabetic Fatty s hyperglykémiou, C: Zucker Diabetic Fatty bez hyperglykémie vs. Zucker Diabetic Fatty s hyperglykémiou, D: Wistar vs. Zucker Lean, E: Zucker Lean vs. Zucker Diabetic Fatty s hyperglykémiou, F: Zucker Diabetic Fatty bez hyperglykémie vs. Zucker Diabetic Fatty s hyperglykémiou. * reprezentuje $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Marta Kollárová, Mária Chomová, Ľubomíra Tóthová, Jana Radošinská: Aktivita matrixových metaloproteináz v animálnom modeli diabetes mellitus 2. typu. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 65-69.

Aktivita MMP-2 v plazme bola vyššia ($p=0,0193$) v skupine Lean a naopak aktivita MMP-9 bola nižšia ($p<0,0001$) v tejto skupine v porovnaní so skupinou DIA. Lean mali tiež vyššiu aktivitu MMP-2 ($p<0,0001$) v porovnaní s FAT. Porovnaním DIA s FAT sme zistili signifikantne nižšie aktivity MMP-2 (0,0062) aj MMP-9 ($p<0,0001$) v skupine bez hyperglykémie – FAT (Obrázok 1). V aktivitách MMP-2 medzi kontrolnými skupinami W a Lean rozdiely neboli.

V ľavej srdcovej komore bola aktivita MMP-2 vyššia v skupine FAT ($p=0,0080$) aj v skupine DIA ($p=0,0190$), v oboch prípadoch v porovnaní s kontrolnou skupinou Lean. Skupina Lean mala vyššie aktivity MMP-2 v srdci v porovnaní s absolútnou kontrolou W ($p=0,0346$) (Obrázok 2). Aktivita MMP-9 v ľavej komore srdca nebola detegovateľná.



Obrázok 2 Aktivita MMP-2 v ľavej komore srdca. A: Wistar vs. Zucker Lean, B: Zucker Lean vs. Zucker Diabetic Fatty bez hyperglykémie, C: Zucker Lean vs. Zucker Diabetic Fatty s hyperglykémiou. * reprezentuje $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Diskusia

Naša práca monitoruje aktivity MMP-2 a MMP-9 v plazme a aktiváciu MMP-2 v tkanive ľavej komory srdca v animálnom modeli DM typu 2 rôznej klinickej závažnosti. Keďže pri zvýšenom oxidačnom strese sa MMP dokážu aktivovať priamo, sledovali sme aj vybrané parametre oxidačného stresu, antioxidačnej kapacity a prítomnosti antioxidantov.

Doteraz sú známe iba útržkové údaje ohľadom úloh MMP v patogenéze DM a rozvoji komplikácií tohto ochorenia. Bolo popísané, že MMP-2 a MMP-9 sú zapojené v rozvoji a progresii diabetickej nefropatie (9). V štúdií Aghadavod a kol. (2020) použili MMP-2 ako zápalový marker a zistili jej zvýšené hladiny u pacientov s diabeticou nefropatiou v porovnaní s pacientami s DM 2. typu bez poškodenia obličiek (10). Vo viacerých štúdiách sa sledovala aktivita MMP-2 v sline v súvislosti s parodontitídou u diabetickej pacientov. Zistilo sa, že nekontrovaná hladina glukózy môže viesť u pacientov s DM 2. typu k nerovnováhe aktivity salivárnej MMP-2, čo vedie k vývoju parodontitídy (11). V štúdií Arreguin-Cano a kol. (2019) zistili pozitívnu koreláciu aktivít MMP-2 a TIMP-1 (tkanivový inhibítor MMP typu 1) so závažnosťou parodontitídy u pacientov s DM 2. typu (12).

Ako je známe, poškodenie ciev v dôsledku DM vedie k zápalu a spúšťa produkciu reaktívnych foriem kyslíka, čo poškodzuje ECM a zabraňuje hojeniu rán. Analýza expresie MMP-2 a MMP-9 v ľavej komore srdca diabetickej zvierat odhalila zníženú reguláciu MMP-2 a významne zvýšenú reguláciu MMP-9 (6). Podľa Kaminari a kol. (2018) by práve MMP-9 mohla byť terapeutickým cieľom pri liečbe pacientov s DM (13).

Hmotnosť tela aj hladina glukózy našich experimentálnych zvierat zodpovedali animálnemu modelu. AOPP, fruktozamín aj TBARs vykazovali v skupinách FAT a DIA signifikantne vyššie hodnoty v porovnaní s kontrolnými skupinami. TBARs boli signifikantne vyššie v skupine FAT v porovnaní s DIA a fruktozamín

Marta Kollárová, Mária Chomová, Ľubomíra Tóthová, Jana Radošinská: Aktivita matrixových metaloproteináz v animálnom modeli diabetes mellitus 2. typu. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 65-69.

naopak, signifikantne nižší v skupine FAT v porovnaní s DIA. Produkty oxidačného poškodenia vykazovali teda zvýšené koncentrácie ako u diabetických tak aj u obéznych potkanov.

Čo sa týka želatináz, aktivita MMP-2 bola v plazme u DIA aj FAT nižšia v porovnaní s chudou kontrolou. Aktivita MMP-9 bola naopak signifikantne vyššia u DIA v porovnaní s chudou kontrolou. V tkanive ľavej komory srdca bola aktivita MMP-2 signifikantne vyššia ako u DIA tak aj u FAT v porovnaní s chudou kontrolou. Aktivitu MMP-9 sa nám použitím želatínovej zymografie nepodarilo detegovať a to aj napriek rôznym metodickým obmenám.

Obézne potkany s genetickou záťažou DM, u ktorých sa ešte nerozvinula hyperglykémia, majú teda nižšiu plazmatickú aktivitu MMP-2 a MMP-9 v porovnaní s hyperglykemickými. Zvýšená aktivita srdcovej MMP-2 poukazuje na remodeláciu ľavej komory ako obéznych tak aj hyperglykemických zvierat. Získané poznatky by mohli pomôcť k poznaniu úlohy MMP ako v patogenéze, tak aj v rozvoji komplikácií DM typu 2.

Tento výskum bol čiastočne podporený z grantu VEGA 1/0314/19.

Zoznam použitej literatúry

1. Oguntibeju, O. O. Type 2 diabetes mellitus , oxidative stress and inflammation : examining the links. 11, 45–63 (2019).
2. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 36, 67–74 (2013).
3. Kerner, W. Definition , Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. 384–386 (2014).
4. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc. Res. 2006;69, 562–573.
5. Hopps, E. & Caimi, G. Matrix metalloproteinases as a pharmacological target in cardiovascular diseases. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2015;19, 2583–2589.
6. Azevedo, A., Prado, AF., Antonio, RC., Issa, JP., Gerlach, RF. Matrix Metalloproteinases are Involved in Cardiovascular Diseases. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2014;115, 301–314.
7. Kollarova M, Puzserova A, Balis P, Radosinska D, Tothova L, Bartekova M, Barancik M, Radosinska J. Age- and Phenotype-Dependent Changes in Circulating MMP-2 and MMP-9 Activities in Normotensive and Hypertensive Rats. Int J Mol Sci. 2020 Oct 2;21(19):7286. doi: 10.3390/ijms21197286.
8. Gyuraszova, M., Kovalcikova, A., Jansakova, K., Sebekova, K., Celec, P., Tothova, L. Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Status in the Plasma, Urine and Saliva of Healthy Mice. Physiol. Res. 2018;67:921-934.
9. Garcia-Fernandez N, Jacobs-Cachá C, Mora-Gutiérrez JM, Vergara A, Orbe J, Soler MJ. Matrix Metalloproteinases in Diabetic Kidney Disease. J Clin Med. 2020 Feb 8;9(2):472. doi: 10.3390/jcm9020472.
10. Aghadavod, E. et al. Comparison Between Biomarkers of Kidney Injury , Inflammation , and Oxidative Stress in Patients with Diabetic Nephropathy and Type 2 Diabetes Mellitus. 14, 31–35 (2020).
11. Kocher, T. et al. Periodontal complications of hyperglycemia / diabetes mellitus : Epidemiologic complexity and clinical challenge. 59–97 (2018). doi:10.1111/prd.12235.
12. Cano, A. et al. MMP - 2 salivary activity in type 2 diabetes mellitus patients. Diabetol. Metab. Syndr. 1–8 (2019). doi:10.1186/s13098-019-0510-2.
13. Kaminari, A., Tsilibary, E. C. & Tzinia, A. A New Perspective in Utilizing MMP-9 as a Therapeutic Target for Alzheimer’s Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. J. Alzheimer’s Dis. 64, 1–16 (2018).

Martin Marônek, Antonio di Grazia, Eleonora Franzè, Federica Laudisi, Giovanni Monteleone, Roman Gardlík: Úloha neutrofilových extracelulárnych pascí v hojení rán. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 70-74.

15. Úloha neutrofilových extracelulárnych pascí v hojení rán

Mgr. Martin Marônek¹
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Antonio di Grazia², Eleonora Franzè², Federica Laudisi², Giovanni Monteleone²

Školiteľ: doc. RNDr. MUDr. Roman Gardlík, PhD.¹

¹ Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta UK, Bratislava

² Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Roma „Tor Vergata“, Rím, Taliansko

Úvod

Zápalové črevné choroby (z angl. inflammatory bowel disease – IBD) sú skupinou chorôb gastrointestinálneho traktu vyznačujúcich sa chronickým zápalom. Medzi hlavných zástupcov IBD sa radí ulcerózna kolitída a Crohnova choroba. Napriek intenzívnemu výskumu v minulosti aj súčasnosti sa doteraz nepodarilo uspokojivo objasniť patogenézu IBD. Liečba je zameraná na potlačenie zápalu na systémovej úrovni. Vzhľadom na to, že sa terapia zameriava na znaky a príznaky namiesto príčin vzniku zápalu, býva neraz neefektívna či dokonca neúčinná. Z tohto dôvodu je nutné pokračovať v objasňovaní príčin vzniku IBD ako aj hľadať nové potenciálne markery nápomocné pri diagnóze a prognóze tejto skupiny chorôb.

Jedným z takýchto markerov by mohli byť práve neutrofilové extracelulárne pasce (z angl. neutrophil extracellular traps – NETs). Neutrofilý majú okrem fagocytózy a produkcie reaktívnych foriem kyslíka možnosť neutralizácie patogénov aj formou NETs v procese zvanom NETóza [1]. NETs možno chápať ako siete, ktoré slúžia na zachytenie a usmrtenie patogénov a skladajú sa z dekonenzovanej DNA neutrofilu, histónov a antimikrobiálnych proteínov. Počas NETózy dochádza k vypudeniu vlákien DNA z jadra do extracelulárneho priestoru, čím sa vypudená DNA stáva extracelulárnou. Hoci je NETóza považovaná za fyziologický proces, nadmerná tvorba NETs bola dokázaná u mnohých chorôb vrátane IBD [2,3]. V súčasnosti sa NETs považujú za jeden z hlavných prispievateľov chronického zápalu gastrointestinálneho traktu a to hneď dvoma spôsobmi. Extracelulárna DNA, ktorá je hlavnou zložkou NETs, môže v závislosti na forme a podmienkach stimulovať imunitnú odpoveď aktiváciou rôznych bunkových signálnych dráh ako TLR9 či STING [4]. Druhý spôsob sa týka inhibície hojenia rán. Bolo zistené, že NETs spomaľovali hojenie rán v myšacom modeli diabetu [5,6], vďaka čomu je možné sa domnievať, že NETs budú mať podobný účinok aj pri IBD.

Naším cieľom bolo overiť hypotézu, či NETs získané z neutrofilov z krvi IBD pacientov negatívne ovplyvňujú hojenie rán a ak áno, či je možné tento inhibičný účinok zmierniť ich odstránením. Model hojenia rán sme skúmali na bunkách rakoviny hrubého čreva línie DLD-1. NETs sme degradovali pomocou enzýmu deoxyribonukleáza I (DNáza). Je to enzým, ktorý je v organizme fyziologicky prítomný a jeho úloha spočíva v štiepení prebytočnej DNA. Vzhľadom na to, že sa zistilo, že aktivita tohto enzýmu môže byť u IBD pacientov nižšia v porovnaní so zdravými ľuďmi [7], mohlo by terapeutické podanie DNázy viesť k zmierneniu IBD. Okrem DNázy sme NETs inhibovali aj streptonigrínom, čo je inhibítor vzniku NETs.

Martin Marônek, Antonio di Grazia, Eleonora Franzè, Federica Laudisi, Giovanni Monteleone, Roman Gardlík: Úloha neutrofilových extracelulárnych pascí v hojení rán. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 70-74.

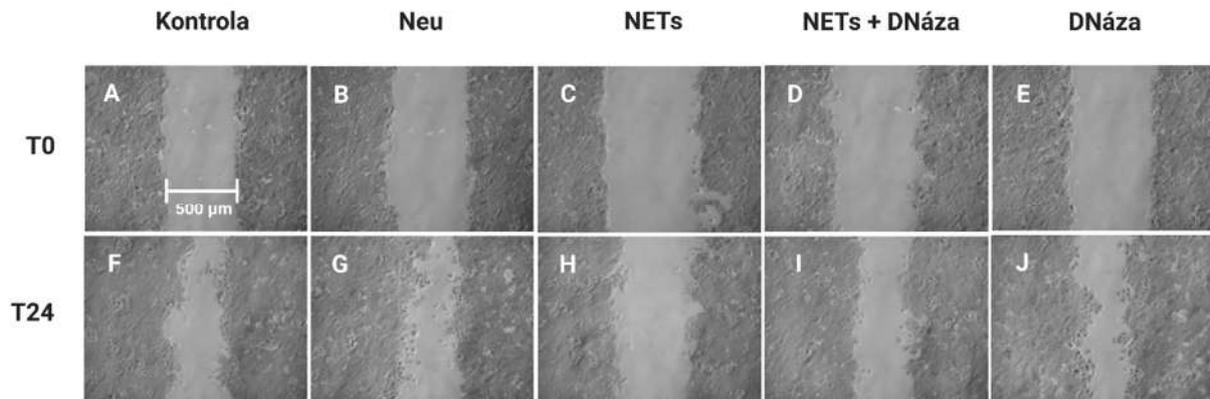
Metódy

Model hojenia rán je založený na poznatku, že dva zhluky buniek migrujú oproti sebe, kým nevyplnia prázdny priestor. Pohyb je kľúčovou vlastnosťou buniek pri hojení rán. Rýchlosť pohybu buniek za určitú jednotku času je možné kvantifikovať a vďaka tomu určiť, či daná látka mala na pohyb buniek vplyv. Bunky línie DLD-1 (ATCC, Manassas, Virginia, USA) sme rozdelili do piatich skupín: kontrolná skupina (Kontrola), bunky kultivované s neutrofilmi (Neu), bunky kultivované s NETs (NETs), bunky kultivované s NETs a DNázou (NETs + DNáza; 5 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) alebo streptonigrínom (NETs + streptonigrín; 1,5 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a bunky kultivované len s DNázou alebo streptonigrínom (DNáza, streptonigrín). Dizajn experimentu bol nasledovný: v prvý deň (deň 0) boli bunky nariadené na 500 000/ml. Z takejto kultúry bol odobratý objem 100 µl a pipetou vnesený do IBIDI kociek (IBIDI GmbH, Mníchov, Nemecko) prichytených v kultivačnej platničke. IBIDI kocky fungujú ako forma, v rámci ktorej bunky prisadnú na podklad (dno kultivačnej platničky) a ktorá zároveň od seba oddeľuje dve strany buniek. Po odobratí IBIDI kociek po 24 hodinách (deň 1, v grafoch T0) preto vzniknú dva zhluky buniek s medzerou v strede medzi nimi. Tieto dva vzniknuté zhluky boli vizualizované pod svetelným mikroskopom a následne inkubované s neutrofilmi, NETs, DNázou alebo streptonigrínom (podľa jednotlivých skupín) po dobu 24 hodín. V deň 1 boli z 10 ml venóznej krvi IBD pacientov izolované neutrofilie a časť z nich bola vystavená účinku 50 nM PMA (forbol-12-myristát-13-acetát; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), čo je látka schopná indukcie NETózy v neutrofiloch. Po prebehnutí NETózy boli bunky inkubované s neutrofilmi a/alebo NETs na 24 hodín. Po tomto čase (deň 2, v grafoch T24) boli bunky vizualizované opäť. Vzďialenosti medzi bunkami na obrázkoch z dňa 1 a dňa 2 boli zmerané programom ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) a vyhodnotené ako tri merania jedného obrázka danej skupiny. Tri merania boli robené z dôvodu nerovnakosti rýchlosti pohybu buniek po celom okraji, čím boli dosiahnuté hodnoty bližšie skutočnému priemeru zostávajúcej (neuzatvorenej) vzdialenosti na deň 2. Číselné hodnoty meraní boli porovnané a štatisticky vyhodnotené použitím jednofaktorovej ANOVA programom GraphPad 6 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

Výsledky

Inkubácia buniek s neutrofilmi (Obr. 1G) nemala výrazný vplyv na vzdialenosť, a teda pohyb buniek v porovnaní s kontrolou (Obr. 1F). Naopak, po pridaní NETs sa pohyb buniek takmer úplne zastavil (Obr. 1H). V skupine, v ktorej sme inkubovali bunky okrem NETs aj s DNázou (Obr. 1I), nastalo zmiernenie negatívneho účinku NETs do takej miery, že výsledná vzdialenosť medzi bunkami v časovom bode T24 bola podobná vzdialenosti s kontrolnou skupinou. Podobný prípad bol pozorovaný aj po inkubácii buniek so samotnou DNázou (Obr. 1J), kde sa miera uzatvorenej vzdialenosti výrazne nelíšila od kontroly.

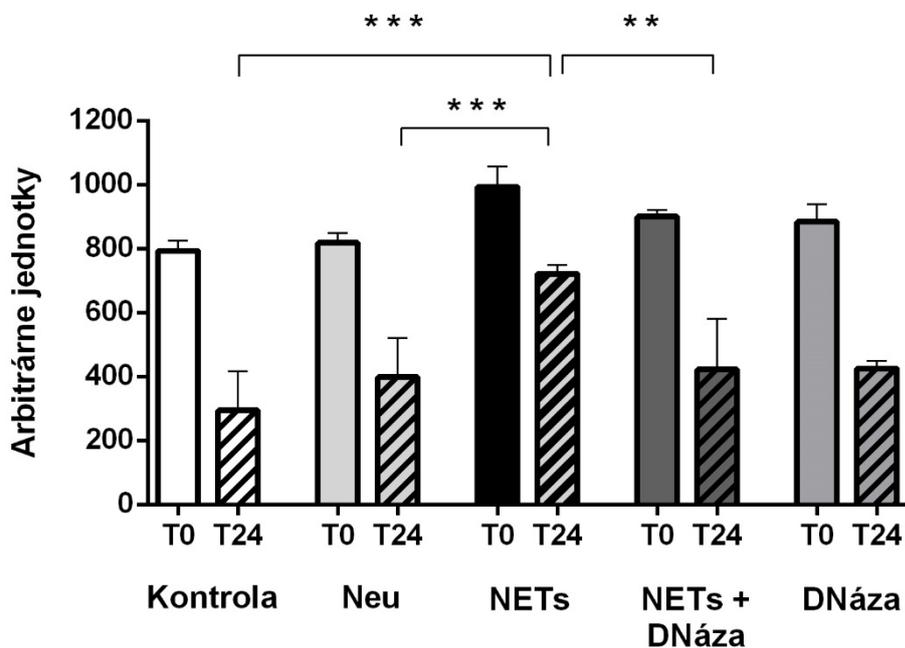
Martin Marônek, Antonio di Grazia, Eleonora Franzè, Federica Laudisi, Giovanni Monteleone, Roman Gardlík: Úloha neutrofilových extracelulárnych pascí v hojení rán. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 70-74.



Obr. 1 Vzďalosti buniek (A, F) v kontrole; (B, G) po kultivácii s neutrofilmi; (C, H) NETs; (D, I) NETs a DNázou a (E, J) samotnou DNázou.

Obr. 2 predstavuje grafické znázornenie kvantifikácie vzdialeností medzi jednotlivými skupinami buniek v časoch T0 (deň 1) a T24 (deň 2). Vzdialenosť medzi skupinou buniek inkubovanou s NETs bola po jednom dni signifikantne väčšia v porovnaní s kontrolou a skupinou buniek inkubovanou s neutrofilmi ($p < 0,001$ pre kontrolu a $p = 0,001$ pre Neu). Navyše, táto vzdialenosť bola signifikantne väčšia aj v porovnaní so skupinou inkubovanou s NETs a DNázou ($p = 0,002$). Vzdialenosť medzi bunkami v skupine inkubovanej so samotnou DNázou sa výrazne nelíšila od všetkých ostatných skupín okrem skupiny inkubovanej s NETs.

Porovnanie vzdialeností (DNáza)

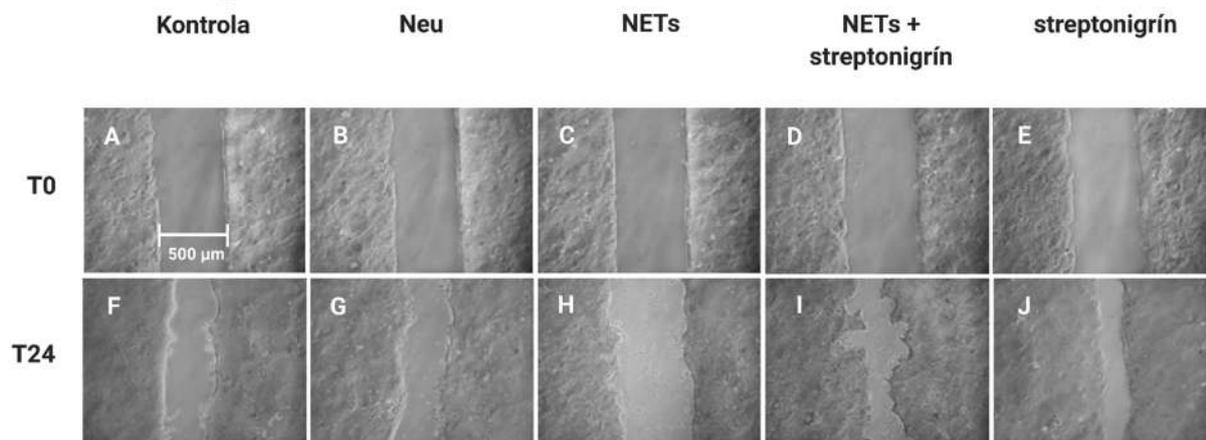


Obr. 2 Porovnanie vzdialeností jednotlivých skupín buniek po pridaní DNázy. ** = $0.05 > p > 0.01$; *** = $p < 0.001$

Z Obr. 3 vyplýva, že streptonigrín mal podobný účinok ako DNáza. Podobne ako na Obr. 1, aj v tomto prípade inkubácia buniek s neutrofilmi spôsobila čiastočné uzatvorenie medzery medzi bunkami po jednom dni (Obr. 3G) a blokovanie migrácie buniek v skupine buniek inkubovanej

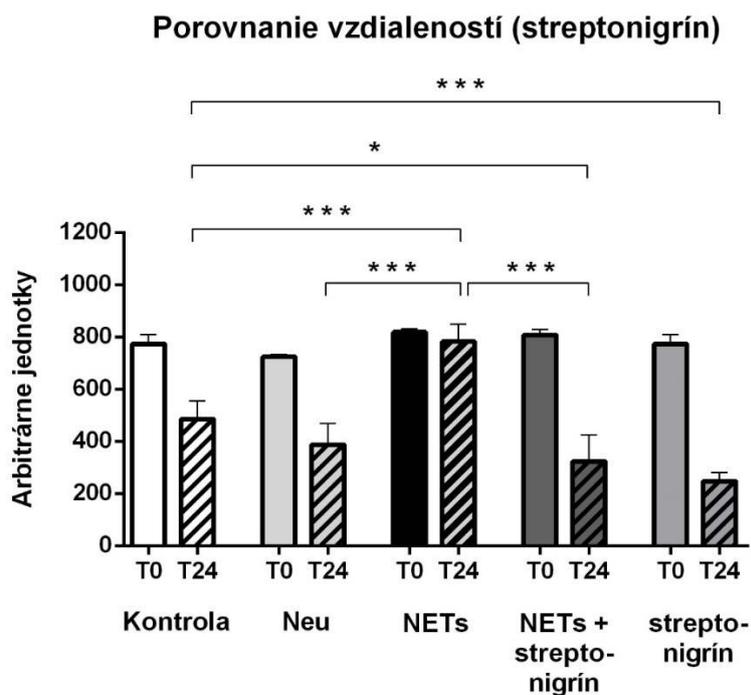
Martin Marônek, Antonio di Grazia, Eleonora Franzè, Federica Laudisi, Giovanni Monteleone, Roman Gardlík: Úloha neutrofilových extracelulárnych pascí v hojení rán. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 70-74.

s NETs (Obr. 3H). Streptonigrín pridaný k bunkám s NETs odstránil ich negatívny účinok (Obr. 3I). Pridanie samotného streptonigrínu k bunkám (Obr. 3J) spôsobilo zdanlivo ešte rýchlejší pohyb buniek, pretože po jednom dni bunky zacelili väčšiu časť medzery v porovnaní s kontrolnou skupinou.



Obr. 3 Vzďalenessi buniek (A, F) v kontrole; (B, G) po kultivácii s neutrofilmi; (C, H) NETs; (D, I) NETs a streptonigrínom a (E, J) samotným streptonigrínom.

Podobne ako v experimente po pridaní DNázy, aj po pridaní streptonigrínu došlo k blokácii inhibičného účinku NETs na pohyb buniek. To sa prejavilo signifikantným rozdielom vo vzdialenessi buniek medzi skupinou inkubovanou s NETs a všetkými ostatnými skupinami (Obr. 4). Navyše je možné si tiež všimnúť, že streptonigrín nielenže zmiernil účinky NETs, ale po jeho podaní bunky uzatvorili väčšiu vzdialenosť v porovnaní s kontrolou ($p = 0,021$). Tento výsledok bol dosiahnutý aj v prípade, ak bol s bunkami inkubovaný samotný streptonigrín ($p < 0,001$).



Obr. 4 Porovnanie vzdialenessi jednotlivých skupín buniek po pridaní streptonigrínu. * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$

Martin Marônek, Antonio di Grazia, Eleonora Franzè, Federica Laudisi, Giovanni Monteleone, Roman Gardlík: Úloha neutrofilových extracelulárnych pascí v hojení rán. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 70-74.

Diskusia

Naše výsledky odhalili niekoľko zaujímavých pozorovaní. Potvrdili sme našu hypotézu, že NETs spomaľujú migráciu buniek a tým aj hojenie rán v *in vitro* modeli. Ukázalo sa, že DNáza má podobný účinok na zvrátenie inhibície pohybu buniek pomocou NETs ako streptonigrín a to napriek odlišnému mechanizmu účinku oboch skúmaných látok. Vzhľadom na podobnosť účinku DNázy a streptonigrínu na základe týchto výsledkov nemožno určiť, ktorý z týchto inhibítorov NETs dosiahol vyššiu účinnosť a rovnako ani to, ktorý z nich by sa javil ako vhodnejší kandidát na ďalšie skúmanie v *in vivo* modeloch. Lokálny účinok oboch inhibítorov NETs je pravdepodobne daný rôznymi faktormi, napríklad vzájomným pomerom množstva NETs a koncentrácie daného inhibítora, pričom prevažujúci stimul sa môže prejavovať na výslednom pohybe buniek. Táto úvaha môže byť ilustrovaná na Obr. 3I, kde sa zdá, že streptonigrín nebol rovnako účinný v inhibícii NETs pozdĺž celých okrajov buniek. Hoci bolo počas manipulácie s bunkami dbané na to, aby bola koncentrácia inkubovaných látok rovnaká v celom médiu s bunkami, určité lokálne výkyvy koncentrácie NETs ako aj ich inhibítorov nemožno vylúčiť. V prípade streptonigrínu sa zdá, že samotné podanie bez NETs určitým spôsobom urýchlilo pohyb buniek v porovnaní s kontrolnou skupinou. Využitie tohto pozorovania (ak sa v nasledujúcich experimentoch potvrdí) je však nateraz otáznе, pretože jednou z charakteristických črt IBD je práve nadmerné množstvo NETs v gastrointestinálnom trakte (zvyčajne hrubom čreve). Napriek tomu je ale možné konštatovať, že potenciálny profylaktický účinok inhibície NETs napríklad na podporu zotrvania pacienta v remisii nie je možné úplne vylúčiť. Na pochopenie funkcie NETs v hojení rán bude v budúcich experimentoch kľúčové odhaliť bunkovú signalizáciu vedúcu k inhibícii bunkového pohybu ako aj podmienky, ktoré tomuto negatívne účinku napomáhajú.

Zoznam použitej literatúry

1. Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* (80-.). 2004, 303, 1532–1535.
2. Gottlieb, Y.; Elhasid, R.; Berger-Achituv, S.; Brazowski, E.; Yerushalmy-Feler, A.; Cohen, S. Neutrophil extracellular traps in pediatric inflammatory bowel disease. *Pathol. Int.* 2018, 68, 517–523.
3. Dinallo, V.; Marafini, I.; Di Fusco, D.; Laudisi, F.; Franzè, E.; Di Grazia, A.; Figliuzzi, M.M.; Caprioli, F.; Stolfi, C.; Monteleone, I.; et al. Neutrophil Extracellular Traps Sustain Inflammatory Signals in Ulcerative Colitis. *J. Crohns. Colitis* 2019, 13, 772–784.
4. Sharma, S.; Fitzgerald, K.A. Innate immune sensing of DNA. *PLoS Pathog.* 2011, 7.
5. Wong, S.L.; Demers, M.; Martinod, K.; Gallant, M.; Wang, Y.; Goldfine, A.B.; Kahn, C.R.; Wagner, D.D. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat. Med.* 2015, 21, 815–9.
6. Yang, S.; Gu, Z.; Lu, C.; Zhang, T.; Guo, X.; Xue, G.; Zhang, L. Neutrophil Extracellular Traps Are Markers of Wound Healing Impairment in Patients with Diabetic Foot Ulcers Treated in a Multidisciplinary Setting. *Adv. Wound Care* 2020, 9, 16–27.
7. Malíčková, K.; Duricová, D.; Bortlík, M.; Hrušková, Z.; Svobodová, B.; Machková, N.; Komárek, V.; Fučíková, T.; Janatková, I.; Zima, T.; et al. Impaired deoxyribonuclease I activity in patients with inflammatory bowel diseases. *Autoimmune Dis.* 2011, 2011, 945861.

Adam Adamec, Mária Vargová, Miroslav Korbel: *Analýza peripartálnych hysterektómii v Slovenskej republike v rokoch 2012-2017. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 75-79.*

16. Analýza peripartálnych hysterektómii v Slovenskej republike v rokoch 2012-2017

MUDr. Adam Adamec
(gynekológia a pôrodnictvo)

Spoluautori: MUDr. PhDr. Mária Vargová
Školiteľ: Doc. MUDr. Miroslav Korbel, CSc.
I. gynekologicko-pôrodnická klinika LF UK a UN Bratislava

Úvod

SOSS (Slovak Obstetric Survey System) - pracovná skupina sekcie perinatálnej medicíny (SPM) Slovenskej gynekologicko-pôrodnickej spoločnosti (SGPS) zhromažďuje od roku 2012 údaje o závažnej akútnej materskej morbidite v Slovenskej republike (SR)⁽¹⁻⁵⁾. Jednou zo sledovaných morbidít sú aj peripartálne hysterektómie. Čiastkové údaje týkajúce sa peripartálnych hysterektómií v SR boli publikované v Gynekológii pre prax⁽¹⁻⁵⁾.

Peripartálna hysterektómia (PPH - peripartum hysterectomy) je rezervovaná pre naliehavé, život ohrozujúce stavy a je spojená s vyššou materskou a novorodeneckou morbiditou a mortalitou⁽⁶⁾. Pripraví ženu o možnosť reprodukcie, negatívne ovplyvní jej psychiku a rodinný život. Má nepriaznivý socioekonomický dopad na spoločnosť^(6,7).

Vo svete, v krajinách Európskej Únie (EU) aj v SR bola donedávna zaužívaná definícia PPH ako odstránenie maternice do 48 hodín po pôrode⁽⁸⁾. The International Network of Obstetric Survey System (INOSS) definuje PPH ako „chirurgické odstránenie maternice v tehotnosti alebo do 42 dní po pôrode“^(9,10). Na základe tejto definície sa spektrum pravdepodobne rozšíri o hysterektómie vykonané z indikácie závažnej genitálnej infekcie⁽¹¹⁾.

Materiál a metódy

Retrospektívne boli analyzované jednotlivé prípady PPH za roky 2012 - 2017. Údaje boli získané z dotazníkov zaslaných gynekologicko-pôrodnickými pracoviskami k už predtým hláseným prípadom SPM SGPS. Vyplnené dotazníky o PPH pokrývali 282 237 (84,61 %) pôrodov v sledovanom období. Podrobnou analýzou prípadov v zaslaných dotazníkoch boli SOSS vyradené duplicitné prípady a prípady s nekompletnými údajmi. Do analýzy bolo zaradených 233 z pôvodných 256 prípadov PPH.

Výsledky

Za obdobie rokov 2012 - 2017 bolo v SR urobených 256 PPH, z toho analyzovaných bolo 233. Incidencia PPH v sledovanom období bola 0,70 na 1000 pôrodov, po prepočítaní na počet pôrodov zúčastnených pôrodníc (84,61 %) - 0,83 na 1000 pôrodov. Priemerný vek rodičiek bol 32,56 rokov, najstaršia mala 45 a najmladšia 16 rokov. Najpočetnejšia skupina bola vo veku 35-39 rokov (tabuľka 1).

Adam Adamec, Mária Vargová, Miroslav Korbel: *Analýza peripartálnych hysterektómií v Slovenskej republike v rokoch 2012-2017. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 75-79.*

Tabuľka 1. Veková distribúcia žien s peripartálnou hysterektómiou (zdroj: SOSS)

Veková kategória	Analyzovaný počet žien s PPH - 232	
	n	%
15-19	3	1,3
20-24	18	7,8
25-29	49	21,1
30-34	65	28,0
35-39	75	31,0
40+	25	10,8

Priemerná hodnota body mass indexu (BMI bola 27,49 kg/m². Ženy s nadhmotnosťou a obezitou mali 64,5 % zastúpenie (tabuľka 2).

Tabuľka 2. Distribúcia žien s peripartálnou hysterektómiou podľa BMI (zdroj: SOSS)

Hmotnostná kategória	BMI (kg/m ²)	Počet (n - 219)	%
Podhmotnosť	< 18,5	1	0,6
Normálna hmotnosť	18,5-24,9	77	35,2
Nadhmotnosť	25,0-29,9	84	38,4
Obezita I	30,0-34,9	42	19,2
Obezita II	35,0-39,9	7	3,2
Obezita III	> 40	8	3,7

PPH bola vykonaná u 19,0 % prvoroďčiek, 30,2 % druhorodičiek, zvyšok tvorili viacrodičky (3- až 16-rodičky).

Predchádzajúci cisársky rez v anamnéze malo 48 % žien a anamnézu predchádzajúcej operácie na maternici malo 63,1 % žien.

Z 233 prípadov PPH bolo 79,4 % pôrodov vedených cisárskym rezom a 20,6 % vaginálne.

Zo 185 pôrodov cisárskym rezom išlo v 56,8 % o akútny cisársky rez, v 27,6 % o elektívny výkon a v 15,6 % prípadoch absentuje údaj.

Najčastejšou príčinou PPH bola patológia placenty - 46,8 % (tabuľka 3). Len v 2,6 % prípadov išlo o elektívnu PPH. Z dostupných údajov bola totálna hysterektómia urobená v 51 % a subtotálna v 49 %.

Pred PPH dostalo oxytocín 80,5 %, methylergometrín 74,3 %, prostaglandíny 35 % a karbetocín 17,2 % pacientok.

V 16,7 % prípadoch PPH predchádzalo neúspešné použitie nejakého výkonu na záchranu maternice.

Priemerná krvná strata počas PPH bola 1417 ml. Až 91,4 % pacientok si vyžadovalo podanie transfúzie erytrocytov - v priemere 5 tranfúzných jednotiek. Trombocytový koncentrát bol podaný v 3,4 % a čerstvá mrazená krvná plazma bola podaná v 70,4 % prípadoch.

Adam Adamec, Mária Vargová, Miroslav Korbel: *Analýza peripartálnych hysterektómií v Slovenskej republike v rokoch 2012-2017. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 75-79.*

Nekomplikovaný priebeh šestonedelia bol v 47,6 % prípadoch. Hospitalizovaných na anesteziologicko resuscitačnom oddelení alebo jednotke intenzívnej starostlivosti bolo 34,3 % pacientok s priemernou dĺžkou hospitalizácie 2,9 dňa. Reoperovaných bolo 8,2 % žien. Zo 233 žien, ktoré podstúpili PPH prežilo 230 a zomreli 3 (letalita 1,3 %). Priemerná dĺžka hospitalizácie bola 7,3 dňa (1 - 29 dní), pričom 12 pacientok (5,2 %) ušlo alebo podpísalo negatívny reverz.

Tabuľka 3. Indikácie peripartálnych hysterektómií v SR v r. 2012 - 2017 (zdroj: SOSS)

Indikácia k PPH	Počet (n233)	%
Patológia placenty:	109	46,8
Abnormálna invázia placenty	81	34,8
Placenta praevia	49	21,0
- kombinovaná patológia	27	11,6
Abrupcia placenty	6	2,6
Atónia maternice	67	28,8
Ruptúra maternice a dehiscencia v jazve	37	15,9
Nešpecifické krvácanie	29	12,4
Hematóm*	6	2,6
Leiomyómy	5	2,1
Diseminovaná intravaskulárna koagulopatia	5	2,1
Inverzia maternice	3	1,3
Cervikálna ruptúra alebo lacerácia	2	0,9
Embólia plodovou vodou	2	0,9
Ostatné**	3	1,3
Neznáma	1	0,4
Infekcia***	0	0

* zahŕňa hematóm v širokom väze, retroperitoneálne a nešpecifikované hematómy

** zahŕňa adenokarcinóm colon sigmoideum, nešpecifikované postpartálne krvácanie a nešpecifikovaný hypokoagulačný

*** zahŕňa endometritídu, pelveoperitonitídu, chorioamnionitídu, gangrénu maternice, puerperálnu sepsu, absces v panve, krvácanie v dôsledku týchto infekcií

Diskusia

Približne 1/3 pacientok s PPH bola rómskeho pôvodu, mala ukončené iba základné vzdelanie a bola nezamestnaná, nespolupracovala, nenavštevovala tehotenskú poradňu a ušli z pôrodnice alebo podpísali negatívny reverz. Rómske etnikum s nízkym vzdelaním, s nízkym sociálnym statusom, multiparita a nenavštevovanie prenatálnej poradne sa javia byť významnými rizikovými faktormi PPH.

Prvorodičky tvorili necelú 1/5 rodičiek s PPH v SR. Vysoké zastúpenie viacrodičiek potvrdzuje, že parita je významným rizikovým faktorom. Treťo- a viacrodičky majú viac ako 2-násobne vyššie riziko peripartálnej hysterektómie⁽¹²⁾.

Prvorodičky sú však najviac dotknuté odstránením maternice. Zo 44 prvorodičiek s PPH štyri porodili mŕtvy plod. Ostali teda bez potomka a bez možnosti sa ďalej reprodukovať.

Adam Adamec, Mária Vargová, Miroslav Korbel: Analýza peripartálnych hysterektómií v Slovenskej republike v rokoch 2012-2017. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 75-79.

Najpočetnejšou skupinou žien, ktoré podstúpili PPH boli rodičky medzi 35-39 rokov -31,0 %, táto skupina je však v celkovom počte pôrodov až na 4. mieste. Druhá najpočetnejšia skupina rodičiek s PPH bola medzi 30-34 rokov - 28,0 %. Táto skupina rodičiek bola v rokoch 2012 a 2013 druhou najpočetnejšou a v rokoch 2014 - 2017 najpočetnejšou skupinou v počte pôrodov. Rodičky medzi 25-29 rokov boli v rokoch 2012 a 2013 najpočetnejšou a v rokoch 2014 - 2017 druhou najpočetnejšou skupinou, pričom žien s PPH z tejto vekovej kategórii bolo len 21,1 %⁽¹³⁾. Rodičky nad 35 rokov majú 4-násobne a rodičky nad 40 rokov takmer 8-násobne vyššie riziko PPH⁽¹²⁾.

Súvislosti medzi BMI a incidenciou PPH nie je možné vypočítať, pretože štátne štatistické inštitúcie v SR doteraz nezberali dáta o BMI rodičiek.

Cisársky rez je známym rizikovým faktorom PPH. Až v 4/5 prípadov v SR bol pôrod vedený cisárskym rezom. Riziko PPH stúpa viac ako 4-x pri prvom a takmer 8-x pri opakovanom cisárskom reze⁽¹²⁾.

Jazva na maternici zvyšuje riziko patologickej placentácie a abnormálnej invázie placenty, dvoch hlavných rizikových faktorov závažného pôrodnického krvácania a PPH^(14,15). Zo súboru bola takmer 1/2 pacientok s anamnézou predchádzajúceho cisárskeho rezu a 2/3 rodičiek s akýmkoľvek predchádzajúcim chirurgickým zákrokom na maternici.

Vo vyspelých krajinách je v súčasnosti globálny nárast PPH v dôsledku zvyšujúcej sa frekvencie cisárskeho rezu, pričom hlavnou indikáciou je patológia placenty^(11,12).

V rozvojových krajinách, kde sú nedostupné uterotonické lieky a nedostatočná zdravotná starostlivosť dominuje atónia a ruptúra maternice^(12,16).

Pre spôsob vedenia PPH neexistujú žiadne odporúčania, je to iba voľbou operátora. V SR bol pomer subtotálnej a totálnej hysterektómie takmer 1:1. Subtotálna hysterektómia je výkon rýchlejší a jednoduchší, sprevádzaný nižšou krvnou stratou a menším množstvom peri- a postoperačných komplikácií. V prípadoch, kde je krvácaním postihnutý dolný segment, krček alebo parakolpium, je potrebná totálna hysterektómia⁽¹¹⁾.

Používanie uterokinetík v SR by sa malo riadiť odporúčaným postupom publikovaným vo vestníku Ministerstva zdravotníctva SR⁽¹⁷⁾. Napriek tomu, že WHO⁽¹⁸⁾ odporúča intravenózne podanie kyseliny trenaxémovej ako štandardný postup na zvládnutie závažného pôrodnického krvácania, v SR bola kyselina trenaxémová (Exacyl) použitá len v 4,7 % prípadoch.

Ďalším krokom pred PPH sú intervencie zachovávajúce uterus. SR pri používaní týchto techník výrazne zaostáva. Pri hodnotení PPH sú zmapované iba tie, ktoré boli použité v snahe zachrániť uterus, ale s neúspešným koncom.

Záver

Z doteraz analyzovaných protokolov PPH sa ukazuje, že rezervy sú v manažmente závažného peripartálneho krvácania v súvislosti s inými patologickými stavmi (predovšetkým abnormálnou inváziou placenty) a správnom použití dostupných medikamentózných a chirurgických metód s cieľom zachovať maternicu. Zdokonalenie sa v manažmente v týchto bodoch by mohlo viesť k zníženiu počtu PPH.

Podporené čiastočne grantom Univerzity Komenského UK/319/2021 s názvom Analýza závažnej materskej morbidity v Slovenskej republike (interdisciplinárna spolupráca pri zefektívnení metodiky spracovania dát)

Zoznam použitej literatúry

1. Krištúfková A, Korbel M, Borovský M, et al.: Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2012. *Gynekol prax* 2015; 13(4): 185-191.

Adam Adamec, Mária Vargová, Miroslav Korbeľ: *Analýza peripartálnych hysterektómií v Slovenskej republike v rokoch 2012-2017. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 75-79.*

2. Krištúfková A, Korbeľ M, Daniš J, et al.: Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2013. *Gynekol prax* 2016; 14(2): 92-98.
3. Krištúfková A, Korbeľ M, Daniš J, et al.: Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2014. *Gynekol prax* 2017; 15(1): 25-32.
4. Krištúfková A, Korbeľ M, Daniš J, et al.: *Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2015. Gynekol prax* 2016; 14(2): 92–98.
5. Krištúfková A, Korbeľ M, Daniš J, et al.: *Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2016 a 2017. Gynekol prax* 2020; 18(2): 85–92.
6. Amarin Z.O. Peripartum Hysterectomy. In: Amarin, Z.O: *Approaches to Hysterectomy*. London: IntechOpen 2015, 139-166.
7. Rossi A.C, Lee R.H, Chmait R.H, et al.: Emergency postpartum hysterectomy for uncontrolled postpartum bleeding: A systematic review. *Obstet Gynecol* 2010; 115(3): 637–644.
8. Euro-Peristat Project with SCPE and EUROCAT. *European Perinatal Health Report. Health and care of pregnant women and babies in Europe in 2010. May 2013.* Dostupné na <http://www.europeristat.com/our-indicators/euro-peristat-perinatal-health-indicators-2010.html>.
9. Krištúfková A, Borovský M, Daniš J, et al.: Medzinárodné sledovanie závažnej materskej morbidity - The International Network of Obstetric Survey System (INOSS). *Gynekol prax* 2019; 17(2): 105–108.
10. Schaap T, Bloemenkamp C, Deneux-Tharaux C, et al.: Defining definitions: a Delphi study to develop a core outcome set for conditions of severe maternal morbidity. *BJOG* 2019; 126(3): 394–401.
11. Adamec A, Vargová M, Nižňanská Z, et al.: Peripartálna hysterektómia. *Slov Gynek Pôrod* 2019; 26(4): 197-202.
12. Knight M, Kurinczuk J.J, Spark P, et al.: Cesarean delivery and peripartum hysterectomy. *Obste Gynecol* 2008; 111(1): 97–105.
13. Podmanická Z, Foltánová N, Galvánková A, et al.: *My v Číslach: Pohyb obyvateľstva 2018.* Bratislava: ŠÚ SR. 2019, 27.
14. Joseph K.S, Rouleau J, Kramer M, et al.: Investigation of an increase in postpartum haemorrhage in Canada. *BJOG* 2007; 114(6): 751–759.
15. Knight M.: Peripartum hysterectomy in the UK: Management and outcomes of the associated haemorrhage. *BJOG* 2007; 114(11): 1380–1387.
16. Van den Akker T, Brobbel C, Dekkers O.M, et al.: Prevalence, Indications, Risk Indicators, and Outcomes of Emergency Peripartum Hysterectomy Worldwide: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2016; 128(6): 1281–1294.
17. Odborné usmernenie Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky pre prevenciu, diagnostiku a liečbu peripartálneho krvácania. *Vestník MZ SR* 2014, čiastka 35-36.
18. WHO. Updated WHO Recommendation on Tranexamic Acid for the Treatment of Postpartum Haemorrhage. Highlights and Key Messages from the World Health Organization’s 2017 Global Recommendation. WHO 2017. Dostupné na <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259379/WHO-RHR-17.21-eng.pdf;sequence=1>. 19.5.2020

Jarásková D, Chandoga J, Bátorová A, Prigancová T, Juhosová M, Ďurina P, Vavrová A, Kyselová A, Jankovičová D., Böhmer D.: *Spektrum patogénnych variantov u pacientov s dysfibrinogenémiou a hypofibrinogenémiou na Slovensku. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 80-84.*

17. Spektrum patogénnych variantov u pacientov s dysfibrinogenémiou a hypofibrinogenémiou na Slovensku

Mgr. Dominika Jarásková¹
(Patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Spoluautori: Chandoga J.¹, Bátorová A.², Prigancová T.², Juhosová M.¹, Ďurina P.¹, Vavrová A.¹, Kyselová A.², Jankovičová D.², Böhmer D.¹

Školiteľ: doc. MUDr. Daniel Böhmer, PhD.¹

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LFUK a UNB, Oddelenie molekulovej a biochemickej genetiky UNB, Bratislava

²Národné hemofilické centrum (NHC), Klinika hematológie a transfúziológie LFUK a UNB, Bratislava

Úvod

Fibrinogén zohráva dôležitú úlohu pri hemokoagulácii a v zachovaní hemostázy, je hlavným substrátom pre tvorbu fibrínového koagula, mediátorom agregácie trombocytov, podporuje fibrinolýzu a má aj antikoagulačné pôsobenie. Vrodené poruchy fibrinogénu sú zriedkavé poruchy zrážania krvi spôsobené kvantitatívnymi (typ I) alebo kvalitatívnymi (typ II) defektmi génu pre fibrinogén (FBG). Kvantitatívne poruchy – afibrinogenémiá a hypofibrinogenémiá, sú definované absenciou cirkulujúceho fibrinogénu alebo jeho zníženou koncentráciou v plazme. Kvalitatívne poruchy – dysfibrinogenémiá a hypodysfibrinogenémiá sú zapríčinené štruktúrnymi a funkčnými abnormalitami molekuly fibrinogénu. Vrodené poruchy fibrinogénu môžu byť spôsobené patogénnymi variantami v ktoromkoľvek z troch génov – *FGA*, *FGB* a *FGG*, ktoré kódujú tri samostatné polypeptidové reťazce FBG (α , β a γ). Gén *FGA* je zložený zo 6 exónov a je lokalizovaný medzi génmi *FGG* (10 exónov) a *FGB* (8 exónov) (1).

Vrodená hypofibrinogenémia (CH) je definovaná ako zníženie hladiny cirkulujúceho fibrinogénu pod 1,5g/l (referenčná hodnota stanovená koagulačnou a imunologickou metódou 1,5 – 3,5g/l). Má autozómovo recesívnu dedičnosť a pacienti sú zväčša heterozygotní prenášači patogénneho variantu pre afibrinogenémiu (2).

Vrodená dysfibrinogenémia (CD) je autozómovo dominantné ochorenie spôsobené patogénnymi variantmi typu „missense“ v heterozygotnom stave. Je charakterizované diskrepanciou medzi nízkou hladinou fibrinogénu (Claussovou koagulačnou metódou; FGB:koag) a jeho normálnou hladinou pri stanovení imunologickou metódou (FBG:Ag; referenčná hodnota 1,8 – 3,5g/l). Väčšina kauzálnych mutácií zapríčiňujúcich dysfibrinogenémiu bola pozorovaná v exóne 2 (p.Arg35) *FGA* génu a v exóne 8 (p.Arg301) *FGG* génu. Tieto dva mutačné „hot-spoty“ zodpovedajú za ~85% prípadov dysfibrinogenémií (3).

Na Slovensku sú pacienti s vrodenými poruchami fibrinogénu registrovaní v Národnom hemofilickom centre (NHC) LFUK a UNB v Bratislave. V spolupráci s NHC pracujeme na tvorbe mutačnej databázy vrodených porúch fibrinogénu na Slovensku. Aplikácia molekulárno-genetických metód nám umožňuje určiť typ mutácie a slúži pre štúdium korelácie genotypu s klinickým priebehom. V súbore 36 pacientov s hypofibrinogenémiou a dysfibrinogenémiou prezentujeme výsledky génovej analýzy, vrátane nových patogénnych variantov, doposiaľ neopísaných v mutačných databázach.

Jarásková D, Chandoga J, Bátorová A, Prigancová T, Juhosová M, Ďurina P, Vavrová A, Kyselová A, Jankovičová D., Böhmer D.: *Spektrum patogénnych variantov u pacientov s dysfibrinogenémiou a hypofibrinogenémiou na Slovensku. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 80-84.*

Materiál a metódy

Pacienti

Do štúdie boli zahrnutí 36 pacienti s vrodenými poruchami fibrinogénu (od roku 2018 do roku 2020). Vzorky krvi boli odobraté do skúmaviek s 0,105M citrátom sodným a s EDTA štandardnou metódou, koagulačné testy a imunologická analýza fibrinogénu sa uskutočnili v koagulačnom laboratóriu NHC. Vzorky krvi s EDTA boli analyzované na Ústave lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LFUK a UNB. Pacienti poskytli informovaný súhlas pred DNA analýzou.

DNA izolácia

Genómová DNA bola izolovaná zo vzoriek periférnej krvi odobratých do štandardizovaných skúmaviek s protizrážanlivým činidlom EDTA. Na izoláciu DNA bola podľa protokolu výrobcu použitá komerčne dostupná súprava QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

Amplifikácia a sekvenovanie cieľových úsekov génov FGA, FGB a FGG

Primery pre amplifikáciu génov *FGA*, *FGB* a *FGG* boli navrhnuté pomocou softvéru Vector NTI Advance® 11.5 a Primer3 v.0.4.0. Špecifita primerov a prítomnosť jednonukleotidových polymorfizmov (SNP) bola skontrolovaná pomocou programov Primer-Blast a SNPCheck v3. Kódujúce exóny a ich príslušné intrónové sekvencie génov *FGA* (6 exónov; 7,5 kb), *FGB* (8 exónov; 8 kb) a *FGG* (10 exónov; 8,5 kb) boli amplifikované pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) a následne sekvenované pomocou Sangerovho sekvenovania na genetickom analyzátoře ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer pomocou súpravy ABI Prism Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA). Získané sekvencie sa analyzovali pomocou softvéru Sequencing Analysis Software verzie 5.4 (Applied Biosystems) a Chromas Lite verzie 2.6.5 a následne sa porovnali s referenčnými sekvenciami Ensembl ENST00000651975.1 (*FGA*-203), ENST00000302068.9 (*FGB*-201) a ENST00000404648.7 (*FGG*-203) s použitím Vector NTI Advance 11.5.4 (Invitrogen).

Interpretácia patogénnych variantov a neopísaných (novel) variantov

Pre interpretáciu nájdených variantov boli použité dostupné databázy – Human Gene Mutation Database (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>), GEHT (<https://site.geht.org/base-fibrinogene/>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Nové neopísané varianty v kódujúcich oblastiach *FGA*, *FGB* a *FGG* boli analyzované a vyhodnotené pomocou predikčných programov MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>), PredictSNP (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/>), Varsome (<https://varsome.com/>), aby sme posúdili ich potenciálnu patogenicitu.

Jarásková D, Chandoga J, Bátorová A, Prigancová T, Juhosová M, Ďurina P, Vavrová A, Kyselová A, Jankovičová D., Böhmer D.: *Spektrum patogénnych variantov u pacientov s dysfibrinogenémiou a hypofibrinogenémiou na Slovensku. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 80-84.*

Výsledky

Spektrum génových variantov u pacientov s dysfibrinogenémiou

V skupine 18 pacientov s vrodenou dysfibrinogenémiou boli v génoch *FGA* a *FGG* identifikované štyri rôzne patogénne varianty v heterozygotnej forme, z toho dva patogénne varianty boli doposiaľ neopísané v mutačných databázach (Tab.1). V géne *FGB* nebola zistená žiadna mutácia. Najčastejšia missense mutácia v exóne 2 v géne *FGA* c.104G>A (p.Arg35His) bola identifikovaná u 12 pacientov. Druhý najčastejší patogénny variant c.901C>T (p.Arg301Cys) v exóne 8 v géne *FGG* bol prítomný u 3 pacientov. Tieto známe hot-spot mutácie predstavovali až 83% variantov identifikovaných u pacientov s dysfibrinogenémiou. Dva neopísané varianty, jeden typu missense v géne *FGG* (p.His369Tyr) a druhý frameshift v géne *FGA* (p.Gly324Lysfs*44), boli predikčnými programami vyhodnotené ako patogénne. Identifikované patogénne varianty u pacientov s dysfibrinogenémiou sú zhrnuté v tabuľke 1.

Gén	Exón	cDNA	Proteín	Počet pacientov	Poznámka
FGA	2	c.104G>A	p.Arg35His	12	hot-spot mutácia
	5	c.923_968dup	p.Gly324Lysfs*44	1	neopísaný variant (dup46nt)
FGG	8	c.901C>T	p.Arg301Cys	3	hot-spot mutácia
		c.1105C>T	p.His369Tyr	2	neopísaný variant

Tab.1: Patogénne varianty identifikované u pacientov s dysfibrinogenémiou (n=18). Boldom sú značené neopísané („novel“) varianty.

Gén	Exón	cDNA	Proteín	Počet pacientov	Poznámka
FGB	4	c.534G>C	p.Lys178Asn	1	VUS
	i6	c.959-13_959-10del	Bβ307*	2	intrón
(FGG)	4	/ c.323C>A*	/p.Ala108Asp		neopísaný variant
FGB	7	c.1102T>C	p.Tyr368His	4	fibrinogén Martin II
	8	c.1427C>T*	p.Ser476Leu	1	neopísaný variant
FGG	1	c.8G>A	p.Trp3*	2	neopísaný variant
	4	c.323C>G	p.Ala108Gly	4	fibrinogén Dunedin
	7	c.999G>T	p.Trp253Cys	1	fibrinogén Bratislava
	7	c.823G>T	p.Glu275*	1	fibrinogén Martin III
variant neidentifikovaný				2	

Tab.2: Patogénne varianty identifikované u pacientov s hypofibrinogenémiou (n=18). Boldom sú označené neopísané („novel“) varianty.

Spektrum génových variantov u pacientov s hypofibrinogenémiou

V skupine 18 pacientov s hypofibrinogenémiou bolo identifikovaných osem rôznych patogénnych variantov, z toho štyri doposiaľ neopísané v mutačných databázach (Tab.2). Všetky mutácie sa vyskytovali v génoch *FGB* a *FGG* v heterozygotnom stave. V géne *FGA* nebol identifikovaný žiadny

Jarásková D, Chandoga J, Bátorová A, Prigancová T, Juhosová M, Ďurina P, Vavrová A, Kyselová A, Jankovičová D., Böhmer D.: *Spektrum patogénnych variantov u pacientov s dysfibrinogenémiou a hypofibrinogenémiou na Slovensku. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 80-84.*

patogénny variant. Najčastejším typom patogénnych variantov boli missense bodové zámény, ktoré sa vyskytli u 12 pacientov. Dvaja z týchto pacientov boli zložením heterozygoti a mali okrem missense mutácie v géne *FGG* (c.323C>A; p.Ala108Asp) aj druhú mutáciu (c.959-13_959-10del; IVS6-10_16delTTTG) v géne *FGB*. Táto mutácia v intróne 6 spôsobuje alternatívny zostrih mRNA. Dva neopísané patogénne varianty typu nonsense (c.8G>A; p.Trp3* a c.823G>T; p.Glu275*) sme identifikovali v géne *FGG*. Identifikované patogénne varianty u pacientov s hypofibrinogenémiou sú zhrnuté v tabuľke 2.

Diskusia

Vrodená dysfibrinogenémia a hypofibrinogenémia sú klasifikované ako zriedkavé poruchy zrážania krvi. Údaje o prevalencii vrodených porúch fibrinogénu nie sú presné, pretože závisia od rozdielnej úrovne registrácie vrodených koagulopatií v rôznych krajinách a ovplyvňuje ich aj vysoký podiel asymptomatických prípadov. Prevalencia registrovaných pacientov s CD a CH na Slovensku predstavuje 43, respektíve 20 osôb na milión obyvateľov. Diagnostika vrodených porúch fibrinogénu je stále väčšinou náhodná, počas rutinného laboratórneho vyšetrenia alebo pred plánovaným chirurgickým zákrokom. V súčasnosti je významná časť pacientov diagnostikovaná prostredníctvom rozšíreného testovania v rodinách postihnutých jednotlivcov, čo vedie k zvyšovaniu počtu pacientov v registri (4). U pacientov s CD sme identifikovali štyri patogénne varianty, dva v géne *FGA* a dva v géne *FGG*. Najčastejší patogénny variant v rámci mutačného hot-spotu *FGA* c.104G>A (Arg35His) bol identifikovaný u 12 pacientov, čo predstavuje 66,7% všetkých mutácií v našej skupiny s CD. Tento variant má za následok oneskorené alebo absentujúce odštiepenie fibrinopeptidu A a následnú predĺženú polymerizáciu fibrínu. Podľa literatúry je 65 – 75% heterozygotných prenášačov tejto mutácie asymptomatických, čo súhlasilo aj s našimi zisteniami (5,6). Patogénny variant v druhom mutačnom hot-spotu *FGG* c.901C>T (Arg301Cys) bol identifikovaný len u 3 pacientov s rôznou klinickou manifestáciou. Tento variant spôsobuje nepresné end-to-end napájanie monomérov fibrínu a zvýšené vetvenie vlákien so spomalenou tvorbou fibrínu (7). Casini a kol. popisujú výskyt týchto dvoch mutačných hot-spotov až u 85% pacientov s dysfibrinogenémiou (3), pričom v našej skupine CD reprezentovali 83% všetkých patogénnych variantov.

U 16 pacientov s CH bolo identifikovaných deväť rôznych heterozygotných mutácií v génoch *FGB* a *FGG*. U jedného probanda bol zistený variant (p.Lys178Asn) v géne *FGB* s neistým významom (VUS) a konfliktnou interpretáciou patogenity. Najviac zastúpeným (n=4) patogénnym variantom v géne *FGB* bola missense zámena v exóne 8 c.1102T>C (p.Tyr368His) známa ako fibrinogén Martin II, opísaná kolektívom Šimurda u dvoch pacientov s trombotickými prejavmi. U štyroch pacientov s touto mutáciou sa vyskytol prípad trombózy len u jednej pacientky v puerpériu. Táto mutácia, ktorá ovplyvňuje vysoko konzervovanú globulárnu C-terminálnu doménu β reťazca fibrinogénu, narúša tvorbu a sekréciu hexaméru fibrinogénu a vedie k jeho zníženej koncentrácii (8). Najviac zastúpeným (n=4) patogénnym variantom v géne *FGG* u pacientov s CH bola missense mutácia c.323C>G (p.Ala108Gly) (fibrinogén Dunedin), ktorý spôsobuje aberantné skladanie triple helixov medzi E a D doménami fibrinogénu, čím znižuje jeho hladiny v cirkulujúcej plazme (9).

Klinická manifestácia hypofibrinogenémie je rôznorodá ako aj v prípade dysfibrinogenémii. V predchádzajúcej štúdií u slovenských pacientov bol asymptomatický priebeh opísaný u 38% pacientov, zatiaľ čo krvácavé prejavy boli prítomné u 44% a trombóza u 18% pacientov (4). Väčšina pacientov s CH v našej štúdií bola asymptomatických alebo iba s miernymi prejavmi krvácania. Nižšia frekvencia krvácania môže byť vysvetlená tým, že väčšina pacientov mala v priemere hodnoty fibrinogénu ~ 1 g/l (Fgb:coag; Fgb:Ag). Mierne znížené hladiny fibrinogénu môžu byť dostačujúce, aby sa predišlo spontánnemu krvácaniu (10). U dvoch pacientov s koagulačne a imunologicky zníženou hladinou

Jarásková D, Chandoga J, Bátorová A, Prigancová T, Juhosová M, Ďurina P, Vavrová A, Kyselová A, Jankovičová D., Böhmer D.: *Spektrum patogénnych variantov u pacientov s dysfibrinogenémiou a hypofibrinogenémiou na Slovensku. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 80-84.*

fibrinogénu nebol identifikovaný žiadny patogénny variant. Príčinou môžu byť aj zmeny mimo kódujúcej oblasti génov *FGA*, *FGB* a *FGG*, zmeny v promótorovej sekvencii alebo v neprekladaných oblastiach, ktoré sme naším prístupom nezachytili.

Prezentované výsledky práce identifikovaných, ako aj neopísaných patogénnych variantov prispievajú k poznaniu a rozširovaniu mutačného spektra génov fibrinogénu v populácii na Slovensku aj v strednej Európe. V súbore pacientov s dysfibrinogenémiou sme takisto potvrdili najčastejšie patogénne varianty nachádzajúce sa v mutačných hot-spotoch. U pacientov s hypofibrinogenémiou sme preukázali širšie spektrum patogénnych variantov, z toho niektoré aj jedinečné pre našu slovenskú populáciu. Avšak pre jednoznačné určenie asociácie medzi genotypom a fenotypom boli naše skupiny pacientov príliš malé. Pokračovanie v spolupráci s NHC poskytuje jedinečnú príležitosť pre ďalšie molekulárno-genetické štúdium, ako aj genotypovo-fenotypové korelácie u rozsiahlejších skupín pacientov s rovnakou mutáciou. Odhalenie genetických, štruktúrnych a funkčných charakteristík fibrinogénu je dôležitým krokom k pochopeniu týchto zriedkavých porúch zrážania krvi.

Zoznam použitej literatúry

1. de Maat MP, Verschuur M. Fibrinogen heterogeneity: inherited and noninherited. *Curr Opin Hematol* 2005; 12(5): 377-383.
2. Dupuy E, Soria C., Molho P, a spol. Embolized ischemic lesions of toes in an afibrinogenemic patient: Possible relevance to in vivo circulating thrombin. *Thromb Res* 2001; 102(3): 211-219.
3. Casini A, Blondon M, Lebreton A, a spol. Natural history of patients with congenital dysfibrinogenemia. *Blood* 2015; 125(3): 553-561.
4. Bátorová A, Jankovičová D, Lazúr J, a spol. Vrodená dysfibrinogenémia a hypofibrinogenémia – molekulová báza a klinický fenotyp. *Interná med* 2016; 16(3): 109-115.
5. Zhou J, Ding Q, Chen Y, a spol. Clinical features and molecular basis of 102 Chinese patients with congenital dysfibrinogenemia. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2015; 55(4): 308-315.
6. Shapiro SE. Diagnosis and management of dysfibrinogenemia. *Clin Adv Hematol Oncol* 2018; 16(9): 602-605.
7. Mosesson MW, Siebenlist KR, DiOrio JP, Matsuda M, Hainfeld JF, Wall JS. The role of fibrinogen D domain intermolecular association sites in the polymerization of fibrin and fibrinogen Tokyo II (gamma 275 Arg→Cys). *J Clin Invest* 1995; 96(2): 1053-1058.
8. Simurda T, Zolkova J, Snahnicanova Z, a spol. Identification of Two Novel Fibrinogen B β Chain Mutations in Two Slovak Families with Quantitative Fibrinogen Disorders. *Int J Mol Sci* 2018; 19(1): 100.
9. Brennan SO, Fellowes AP, Faed JM, George PM. Hypofibrinogenemia in an individual with 2 coding (gamma82 A→G and Bbeta235 P→L) and 2 noncoding mutations. *Blood* 2000; 95(5): 1709-1713.
10. Peyvandi F, Haertel S, Knaub S, Mannucci PM. Incidence of bleeding symptoms in 100 patients with inherited afibrinogenemia or hypofibrinogenemia. *J Thromb Haemost* 2006; 4(7): 1634-1637.

Miriama Juhosová, Petra Jungová, Alica Valachová, Pavol Ďurina, Silvia Dallemule, Dominika Jarásková, Ján Chandoga: CADASIL syndróm –nezriedkavé cerebrovaskulárne ochorenie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 85-89.

18.CADASIL syndróm –nezriedkavé cerebrovaskulárne ochorenie

Mgr. Miriama Juhosová¹
(*Patologická anatómia a súdne lekárstvo*)

Spoluautori: Doc. MUDr. Ján Chandoga CSc.¹ MUDr.Petra Jungová¹
MUDr.Alica Valachová² MUDr.Pavol Ďurina¹ MUDr.Silvia Dallemule¹ Mgr. Dominika
Jarásková¹

Školiteľ: Doc. MUDr. Ján Chandoga CSc.¹

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LFUK a UNB , Oddelenie
molekulovej a biochemickej genetiky, Centrum zriedkavých genetických chorôb,
Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava

²Oddelenie lekárskej genetiky, Fakultná nemocnica Trenčín, Legionárska 28, 911 71 Trenčín

Úvod

CADASIL je akronymom pre Cerebrálnu Autozómovo Dominantnú Arteriopatiu so Subkortikálnymi Infarktmi a Leukoencefalopatiou. Hlavné prejavy ochorenia sú uvedené už v samotnom názve, teda ide o dedičné ochorenie mozgových ciev s následnými podkôrovými infarktmi a s poškodením bielej hmoty mozgu. Syndróm je spôsobený patogénnymi variantmi v gène *NOTCH3* (1,2).

NOTCH3 gén je lokalizovaný na chromozóme 19 a obsahuje 33 exónov, ktoré kódujú proteín zložený z 2321 aminokyselín. Produktom génu je transmembránový receptor zložený z extracelulárnej, transmembránovej a intracelulárnej domény. Je súčasťou signálnej dráhy zapojenej do vaskulogenézy, vaskulárnej remodelácie a diferenciácie buniek. V dospelosti sa exprimuje v bunkách hladkých svalov malých artérií mozgu (3). Z hľadiska molekulárnej podstaty CADASIL syndrómu je zásadná práve extracelulárna doména, ktorá sa zúčastňuje interakcie s ligandmi. Táto doména obsahuje 34 tandemových repetícií podobných epidermálnemu rastovému faktoru (EGF-like repetície), pričom v každej repetícii sa nachádzajú prísne konzervované úseky bohaté na cysteíny, ktoré pomocou disulfidových mostíkov determinujú terciálne štruktúry proteínu *NOTCH3*. Väčšina patogénnych variantov zapríčiňujúcich CADASIL bola pozorovaná v exónoch 2 až 24, ktoré viedli k aminokyselinovej substitúcii v EGF-like štruktúrach (4).

Klinicky sa ochorenie prejavuje migrénou s aurou, tranzitórnymi ischemickými atakmi, psychiatrickými poruchami a iktami, ktoré vedú k subkortikálnej demencii. Na MR je typický nález mnohopočetných, bilaterálne uložených lakunárnych infarktov (bazálne gangliá, capsula interna, thalamus a pons) a difúzne T2 hyperintenzity v hlbokoj periventrikulárnej bielej hmote. Typický je prítomný T2 hypersignál v temporálnom laloku, v oblasti capsula externa a početné ložiská mikrohemoragie (5). Pri tej istej mutácii je nástup a priebeh ochorenia variabilný, tak v rámci jednej rodiny ako aj medzi rodinami. Komplexná diagnostika zahŕňa anamnestické údaje, MR vyšetrenie a molekulárno-genetické vyšetrenie, ktoré definitívne diagnózu potvrdí. Najdôležitejšou determinantou závažnosti CADASIL syndrómu je pozícia identifikovaného patogénneho variantu, pričom patogénne varianty v EGF-like repetíciách 1–6 predisponujú k skoršiemu nástupu cievnej mozgovej príhody a kratšiemu prežitiu a

Miriama Juhosová, Petra Jungová, Alica Valachová, Pavol Ďurina, Silvia Dallemule, Dominika Jarásková, Ján Chandoga: CADASIL syndróm – nezriedkavé cerebrovaskulárne ochorenie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 85-89.

k výraznejšej hyperintenzite v bielej hmote v porovnaní s variantmi v pozícií EGF-like repetícií 7–34. Celosvetovo sa prevalencia CADASIL syndrómu v populácii podľa najnovších literárnych údajov odhaduje na 1:300 (6). Špecifická a efektívna liečba doteraz známa nie je.

V práci prezentujeme súbor 20 pacientov s diagnózou CADASIL syndrómu s potvrdenými molekulárno-genetickými nálezmi v Ústave lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LFUK a UNB.

Materiál a metódy

Pacienti

Pacienti boli indikovaní na molekulárno-genetické vyšetrenie neurológom a lekárske genetikom na základe klinického nálezu a MR vyšetrenia a po zohľadnení kritérií podľa CADASIL skóre od 0-25 (7) (Tabuľka č.1).

Pacienti poskytli informovaný súhlas s plánovanou DNA analýzou. Uvedené údaje z osobnej a rodinnej anamnézy boli zaznamenané pri vyšetrení lekárske genetikom.

Celkové skóre > 15 je prediktívne pre CADASIL diagnózu

* Aspoň jeden z typických príznakov

(bolesti hlavy, TIA/NCMP, kognitívne zmeny, psychiatrická symptomatika)

Migrény	1
Migrény s aurou	3
TIA alebo náhla cievna mozgová príhoda	1
TIA alebo náhla cievna mozgová príhoda pred 50 rokom	2
Psychiatrická symptomatika	1
Kognitívne zmeny/demencia	3
Leukoencefalopatia	3
Leukoencefalopatia zasahujúca temporálny lalok	1
Leukoencefalopatia zasahujúca capsula externa	5
Subkortikálne infarkty	2
Rodinná anamnéza * v aspoň jednej generácii	1
Rodinná anamnéza * v aspoň dvoch generáciách	2

Tabuľka č.1: CADASIL skóre

Pescini a kol. (2012) . *Stroke*. 43(11):2871-6.

DNA izolácia

Genómová DNA bola izolovaná kolónkovou metódou pomocou QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) z periférnej krvi odobratej do štandardných odberových skúmaviek s protizrážacím činidlom EDTA. Kit je určený na rýchlu izoláciu a purifikáciu genómovej DNA.

Priame sekvenovanie DNA a interpretácia patogénnych variantov NOTCH3 génu

Na amplifikáciu kódujúcich exónov 1-33 NOTCH3 génu sme použili nami navrhnuté primery pomocou programu Vector NTI Advance® 11.5 a softvéru Primer 3 v.0.4.0 spolu s primermi uvedenými v literatúre pre NOTCH3 gén (8). Vhodnosť navrhnutých sekvencií všetkých primerov bola testovaná pomocou dvoch softvérov: SNPcheckv3 a Primer-BLAST.

Miriama Juhosová, Petra Jungová, Alica Valachová, Pavol Ďurina, Silvia Dallemule, Dominika Jarásková, Ján Chandoga: CADASIL syndróm – nezriedkavé cerebrovaskulárne ochorenie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 85-89.

Molekulárno-genetická analýza pozostávala z amplifikácie jednotlivých exónov pomocou polymerázovej reťazovej reakcie. Následne sa amplifikáty sekvenovali pomocou metódy Sangerovho enzýmového sekvenovania a automatického sekvenátora (3130ABI PRISM Genetic Analyzer, AppliedBiosystem). Sekvenčné chromatogramy sme analyzovali využitím programov Chromas 2.2, Vector NTI Advance® 11.5 a softvéru SeqScape.

U identifikovaných variantov génov bol ich efekt zhodnotený pomocou dostupných databáz zameraných na zber genomických dát a umožňujúcich vyhľadávanie relevantných literárnych údajov: (PubMed; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>); Human Gene Mutation Database- (HGMD) http://hgddatabase.cvtisr.sk/home.php?select_db=H.

	Exón	EGF-like repetícia	Proteínová úroveň patogénneho variantu	Vek v čase potvrdenia patogénneho variantu	Pescini skóre	Pohlavie	Predikcia fenotypu
Rodina 1	4	3	p.Arg133Cys	35	17	muž	CADASIL
Rodina 2	4	3	p.Arg141Cys	58	20	žena	CADASIL
Rodina 3	4	3	p.Arg153Cys	39	6	žena	CADASIL
Rodina 4	4	4	p.Cys162Arg	35	7	muž	CADASIL
Rodina 5	4	4	p.Cys162Arg	38	9	muž	CADASIL
Rodina 6	4	5	p.Arg207Cys	56	6	muž	CADASIL
Rodina 7	6	8	p.Arg332Cys	56	8	žena	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 8	6	8	p.Arg332Cys	37	9	žena	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 9*	8	10	p.(Cys408Arg)	68	10	muž	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 10	8	10	p.Gly420Cys	46	8	žena	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 11*	8	10	p.(Tyr423Cys)	60	14	muž	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 12	8	11	p.Arg449Cys	45	11	žena	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 13	9	11	p.Cys466Tyr	46	16	muž	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 14	11	14	p.Cys549Tyr	67	12	žena	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 15	11	14	p.Cys549Tyr	30	12	žena	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 16	20	27	p.Arg1076Cys	43	10	muž	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 17	20	27	p.Arg1076Cys	51	14	muž	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 18	20	27	p.Arg1076Cys	57	7	muž	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 19	20	27	p.Arg1076Cys	77	7	žena	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom
Rodina 20	20	27	p.Arg1076Cys	47	9	muž	klinický fenotyp CADASIL s miernejším resp. oneskoreným priebehom

Tabuľka č. 2: Súbor pacientov s potvrdenou diagnózou CADASIL syndrómu
*doposiaľ nepublikované patogénne varianty

Genotypizácia

Stratégia rozsahu analýz génu bola navrhnutá individuálne a závisela od klinických príznakov, nálezov MRI typických pre CADASIL syndróm, rodinnej anamnézy a zohľadňovala CADASIL skóre. U všetkých pacientov s podozrením na CADASIL syndróm sa realizovala sekvenčná analýza exónov 1–12 génu *NOTCH3* vrátane príľahlých intrónových sekvencií. Pokiaľ neboli zistené žiadne patogénne varianty, tak u pacientov s významnou rodinnou anamnézou skorých mozgových príhod, demenciou a s vysokým CADASIL skóre sa pokračovalo v sekvenčnej analýze exónov 13–24. V prípade pretrvávajúceho podozrenia na diagnózu požiadal lekárske genetické o rozšírenie sekvenčnej analýzy o zvyšné exóny 25–33.

Miriama Juhosová, Petra Jungová, Alica Valachová, Pavol Ďurina, Silvia Dallemule, Dominika Jarásková, Ján Chandoga: CADASIL syndróm – nezriedkavé cerebrovaskulárne ochorenie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 85-89.

Výsledky

Za obdobie od roku 2014 po rok 2020 bol zistený patogénny variant v *NOTCH3* géne na našom pracovisku v 20 rodinách. Identifikovaných bolo 13 rôznych typov *missense* patogénnych variantov v heterozygotnom stave s charakteristickou zmenou počtu cysteínových zvyškov. V 6 rodinách boli identifikované varianty v prvých šiestich EGF-like repetíciách a v 14 rodinách EGF-like repetíciách 7-34. Lokalizáciu typov patogénnych variantov a počet pacientov s patogénnym variantom v príslušnej lokalite génu demonštruje Tabuľka č.2. Identifikovali sme aj doposiaľ nepopísané patogénne varianty v ligand väzobnej doméne EGF-like repetícii 10 p.(Cys408Arg) a p.(Tyr423Cys). Mutačné predikčné programy (Mutation Taster, Varsome, PredictSNP, PolyPhen-2 a Provean) ich vyhodnotili ako patogénne (class 5 - Pathogenic).

Diskusia

CADASIL syndróm je najčastejšou hereditárnou príčinou ischemických mozgových príhod, ktorého rozpoznanie nemusí byť vzhľadom na vysoko variabilný priebeh a neúplný klinický obraz jednoduché, a to najmä v jeho skorších štádiách. Diagnózu potvrdzuje až molekulárno - genetické testovanie, ktorému musí predchádzať dôsledné prehodnotenie klinických symptómov, MRI nálezov a rodinnej anamnézy. Genetické testovanie musí vzhľadom na charakter progresívneho ochorenia dospelého veku prebiehať v rámci špecializovanej pred a po testovacej konzultácie.

V priebehu našej štúdie sme u pacientov indikovaných na molekulárno-genetické vyšetrenie *NOTCH3* génu zistili 13 rozličných patogénnych variantov v 20 rodinách s ich rozložením v rozsahu od štvrtého až po dvadsiaty exón génu *NOTCH3*. Nálezy dvoch nových patogénnych variantov p.(Cys408Arg) a p.(Tyr423Cys) potvrdili, že genetické vyšetrenie CADASIL syndrómu vedie neustále k objavovaniu nových patogénnych variantov. Sangerova sekvenčná analýza *NOTCH3* zostáva diagnostickým zlatým štandardom na potvrdenie CADASIL syndrómu. Využitím sekvenovania novej generácie boli detegované patogénne varianty zistené častejšie a rovnomerne rozložené v exónoch 4, 6, 9, 11, 16, 18 a 20 (9). Predošlé štúdie uvádzali ako „*hot spot*“ miesta patogénnych variantov exóny 3 a 4, po ktorých nasledovali exóny 8, 5, 6 a 11, kým u pacientov z Kašmíru a Talianska v exóne 22 (10).

V porovnaní s publikovanými prácami distribúcia patogénnych variantov v našom súbore bola odlišná v exóne 4 (n=6), exóne 6 (n=2), exóne 8 (n=4), exóne 9 (n=1), exóne 11 (n=2), exóne 20 (n=5), pričom najčastejšie zastúpeným patogénnym variantom bol p.Arg1076Cys v exóne 20.

Podľa databázy HGMD je v súčasnosti s CADASIL syndrómom asociovaných 275 unikátnych patogénnych jednonukleotidových zmien meniacich počet cysteínových zvyškov EGF-like repetíciách. Keďže molekulárno-genetické vyšetrenie je časovo aj finančne náročné, bol navrhnutý zoznam typických príznakov s priradenými hodnotami podľa ich spojitosti s CADASIL syndrómom (7). Čím bola táto hodnota vyššia, tým bol syndróm viac pravdepodobný. Maximálne bolo možné pacientovi prideliť 25 bodov. Pokiaľ bolo pridelených menej ako 15, pacient nespĺňal indikačné kritériá pre molekulárno-genetickú analýzu. Podľa našich výsledkov daný klinický protokol spĺňalo málo pacientov a pri ich striktnom dodržaní by bola väčšina pacientov vylúčená z molekulárno-genetickej diagnostiky.

Vzhľadom k vysokej variabilite prejavov neexistuje striktná fenotypovo genotypová korelácia. Podľa najnovších literárnych údajov pacienti s patogénnymi variantmi v EGF-like repetíciách 1-6 majú signifikantne vyšší počet lézií a lakunárnych infarktov v bielej hmote mozgu ako

Miriama Juhosová, Petra Jungová, Alica Valachová, Pavol Ďurina, Silvia Dallemule, Dominika Jarásková, Ján Chandoga: CADASIL syndróm – nezriedkavé cerebrovaskulárne ochorenie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 85-89.

pacienti s patogénnymi variantmi v EGF-like repetíciách 7-34 a predisponujú takmer o 10 rokov skoršiemu nástupu (6).

V práci sme prezentovali prvé výsledky širokého spektra patogénnych variantov v slovenskej populácii pacientov s CADASIL ochorením, ktoré umožňujú skúmať vzťahy medzi genotypom a fenotypom pacientov s týmto závažným ochorením. V súbore vyšetrených pacientov sme potvrdili veľkú heterogenitu patogénnych variantov génu *NOTCH3* a odhalili sme nové patogénne varianty, zatiaľ neuvedené v mutačných databázach. Limitáciou práce je počet členov súboru, v genetickom programe diagnostiky aktívne pokračujeme a cieľom je vytvoriť komplexnú mutačnú databázu pacientov s CADASIL syndrómom. V SR sme preukázali odlišnú lokalizáciu kauzálnych patogénnych variantov, okrem najčastejšie popisovaného exónu 4 sa v našom súbore najčastejšie vyskytoval patogénny variant v exóne 20. Patogénne varianty v EGF-like repetíciách 1-6 predikovali o 10 rokov skorší nástup ochorenia.

Záverom konštatujeme, že aktuálny klinický protokol (Pesciniho skóre) je nevhodný pre indikáciu a na molekulárno-genetické vyšetrenie pacientov zo SR bude potrebné starostlivo prehodnotiť klinické údaje a MRI nálezy s cieľom vytvoriť spoľahlivý indikačný dotazník.

Zoznam použitej literatúry

1. Baudrimont M, Dubas F, Joutel A, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. Autosomal dominant leukoencephalopathy and subcortical ischemic stroke. A clinicopathological study. *Stroke*. 1993; 24(1):122-125. doi:10.1161/01.str.24.1.122
2. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, a spol. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*. 1996; 383(6602):707-710. doi:10.1038/383707a0
3. Hosseini-Alghaderi S, Baron M. Notch3 in Development, Health and Disease. *Biomolecules*. 2020; 10(3):485. doi:10.3390/biom10030485
4. Chabriat H, Joutel A, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. CADASIL: yesterday, today, tomorrow. *Eur J Neurol*. 2020; 27(8):1588-1595. doi: 10.1111/ene.14293
5. Chabriat H, Joutel A, Dichgans M, Tournier-Lasserre E, Bousser MG. Cadasil. *Lancet Neurol*. 2009; 8(7):643-653. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70127-9.
6. Rutten JW, Van Eijnsden BJ, Duering M, a spol. The effect of NOTCH3 pathogenic variant position on CADASIL disease severity: NOTCH3 EGFr 1-6 pathogenic variant are associated with a more severe phenotype and lower survival compared with EGFr 7-34 pathogenic variant. *Genet Med*. 2019; 21(3):676-682. doi:10.1038/s41436-018-0088-3
7. Pescini F, Nannucci S, Bertaccini B, a spol. The Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) Scale: a screening tool to select patients for NOTCH3 gene analysis. *Stroke*. 2012; 43(11):2871-2876. doi:10.1161/STROKEAHA.112.665927.
8. Tan ZX, Li FF, Qu YY a spol. Identification of a known mutation in Notch 3 in familial CADASIL in China. *PLoS One*. 2012; 7(5):e36590. doi: 10.1371/journal.pone.0036590.
9. Maksemous N, Smith RA, Haupt LM, Griffiths LR. Targeted next generation sequencing identifies novel NOTCH3 gene mutations in CADASIL diagnostics patients. *Hum Genomics*. 2016; 10(1):38. doi: 10.1186/s40246-016-0093-z.
10. Chavoshi Tarzjani, SP, Shahzadeh Fazeli, SA, Sanati, M H, Mirzayee, Z. Genetic study of the NOTCH3 gene in CADASIL patients. *EJMHG*. 2018; 19:425-427 doi:10.1016/j.ejmhg.2018.05.001

Peter Stanko, Tomáš Baka, Kristína Krajčírovičová, Kristína Repová, Silvia Aziriová, Fedor Šimko: Protekcia kardiovaskulárneho systému pri L-NAME-indukovanej hypertenzii duálnou inhibíciou neprilyzínu a AT1 receptora pre angiotenzín II. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 90-95.

19. Protekcia kardiovaskulárneho systému pri L-NAME-indukovanej hypertenzii duálnou inhibíciou neprilyzínu a AT1 receptora pre angiotenzín II

MUDr. Peter Stanko¹
(Normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: : MUDr. Tomáš Baka, PhD.¹; Mgr. Kristína Krajčírovičová¹; MUDr. Kristína Repová, PhD.¹; Mgr. Silvia Aziriová, PhD.¹

Školiteľ: prof. MUDr. Fedor Šimko, CSc.^{1,2,3}

¹Ústav patologickej fyziológie LF UK; ²III. Interná klinika LF UK a UN Bratislava, ³Ústav experimentálnej endokrinológie SAV

Úvod

Zlyhanie srdca (ZS) je závažným medicínskym a spoločenským problémom, s vysokou prevalenciou a veľmi zlou prognózou. Jednou z najčastejších príčin chronického ZS je dlhodobé hemodynamické preťaženie pri neliečenej alebo nesprávne liečenej hypertenzii rezultujúcej do vzniku hypertenzného srdca (1).

Napriek značnému rozšíreniu terapeutických možností v priebehu posledných desaťročí, reziduálna mortalita ZS je stále vysoká, čo determinuje hľadanie nových ciest terapeutickej intervencie (2). Súčasťou patofyziologického podkladu zhoršovania ZS je neadekvátna neurohumorálna aktivácia. V ostatných desaťročiach preto v terapii ZS dominuje inhibícia vazokonstrikčnej a proliferatívnej odpovede vedúcej k patologickej remodelácii myokardu a ciev prostredníctvom inhibície renín-angiotenzín-aldosterónového systému (RAAS) a sympatikového nervového systému (3).

Pri ZS dochádza okrem stimulácie látok s vazokonstrikčným, proagregačným, rastovým, proproliferáčnym a prozápalovým účinkom aj k aktivácii hormónov s antagonistickým - potenciálne protektívnym účinkom. Jednými z dominantných látok s dilatáčnym, antiproliferáčnym a protizápalovým efektom sú zložky systému natriuretických peptidov (NP). NP sa uvoľňujú pri dilatácii predsiení a komôr srdca následkom hemodynamického preťaženia (4). Zvýšením plazmatických hladín NP pomocou inhibície neprilyzínu (enzýmu degradujúceho NP) sakubitrilom v kombinácii s blokádou AT1 receptora pre angiotenzín II valsartanom, sa v štúdií PARADIGM-HF dosiahla výrazná redukcia kardiovaskulárnych udalostí a mortality u pacientov so systolickým ZS. Spomínaná kombinácia terapeutík známa ako ARNI (angiotenzín receptor – neprilyzín inhibítory), ktorej predstaviteľom je sakubitril/valsartan, sa stala novou skupinou terapeutík v manažmente ZS (5).

Predpokladá sa, že benefit ARNI je z patofyziologického hľadiska kombináciou výraznej redukcie hemodynamickej záťaže a jeho antiremodelačného účinku v zmysle redukcie patologickej hypertrofiie a fibrotizácie zlyhávajúcej ľavej komory (ĽK) srdca.

Cieľom práce bolo detekovať potenciálne kardioprotektívne účinky ARNI na modeli L-NAME indukovanej hypertenzie a porovnať tieto efekty s účinkami klasického ACE inhibítora kaptoprilu.

Materiál a metódy

Skupiny zvierat, aplikácia farmakologicky aktívnych látok

Peter Stanko, Tomáš Baka, Kristína Krajčírovičová, Kristína Repová, Silvia Aziriová, Fedor Šimko: Protekcia kardiovaskulárneho systému pri L-NAME-indukovanej hypertenzii duálnou inhibíciou neprilyzínu a AT1 receptora pre angiotenzín II. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 90-95.

12 týždňové potkany, samce kmeňa Wistar, sa rozdelili do 5 skupín (n=10):

1. skupina: kontrola (K),
2. skupina: ARNI [sakubitril/valsartan, 68 mg/kg/deň] (ARNI),
3. skupina: L-NAME [40 mg/kg/deň] (L),
4. skupina: L-NAME a ARNI [40 mg/kg/deň a 68 mg/kg/deň] (L+ARNI),
5. skupina: L-NAME a kaptopril [40 mg/kg/deň a 100 mg/kg/deň] (L+CAP).

Všetky látky sa podávali 4 týždne v pitnej vode, pričom pre zachovanie správneho dávkovania bola koncentrácia upravovaná podľa aktuálnej spotreby vody.

Priebežné meranie systolického tlaku krvi počas experimentu

Počas 4 týždňov trvania experimentu sa potkanom v pravidelných intervaloch (1x za týždeň) neinvasívnou pletyzmografickou metódou (metóda tail-cuff) meral systolický tlak krvi (STK) (6).

Echokardiografia

Na konci pokusu sa funkcia srdca vyšetrila echokardiograficky (GE Vivid 7 Dimension, 12 MHz lineárna sonda). Na kvantifikáciu systolickej funkcie ĽK sa stanovila ejekčná frakcia (EF) a frakčné skrátenie (FS). Diastolickú funkciu ĽK odráža pomer rýchlosti plnenia ĽK cez mitrálnu chlopňu v skorej a neskorej fáze diastoly (pomer E/A), čas izovolumickej relaxácie (IVRT) a deceleračný čas (DecT) (7).

Odber tkanivových vzoriek

Po 4 týždňoch trvania experimentu sa potkany usmrtili a odobrali sa srdcia pre ďalšie spracovanie. Relatívna hmotnosť ľavej komory sa stanovila ako pomer hmotnosti ĽK k hmotnosti tela potkana.

Štatistická analýza

Výsledky sa vyjadrili ako priemer \pm štandardná chyba priemeru. Rozdiely sa považovali za významné, ak $p < 0,05$. Na štatistické hodnotenie sa použili ANOVA a Holm-Sidakov post-hoc test.

Výsledky

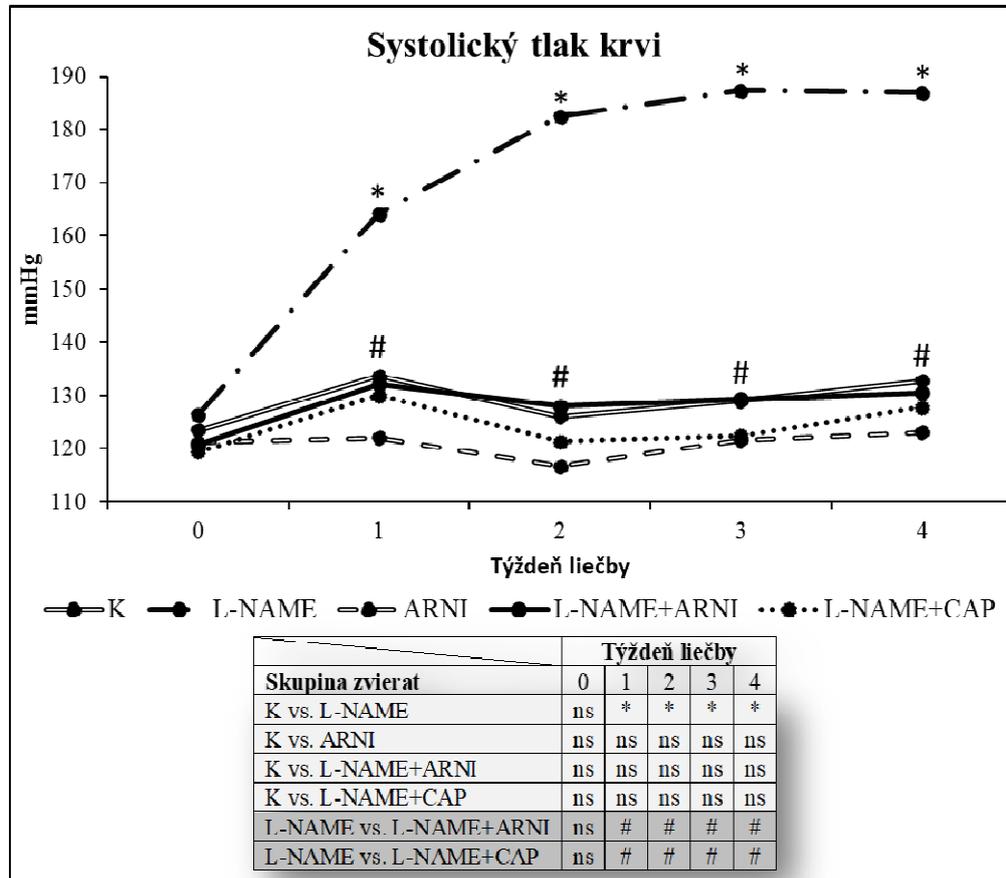
Po 4 týždňoch trvania pokusu bol STK u kontrol 132,7 \pm 3,9 mmHg. STK po podaní ARNI mierne klesol (o 7%), pričom pri podaní L-NAME významne ($p < 0,05$) stúpol o 40%. ARNI a kaptopril pridané k L-NAME znížili STK o 30%, resp. o 31% (Obr. 1).

Relatívna hmotnosť ĽK bola u kontrol 1,21 \pm 0,05 mg/g, pričom L-NAME ju zvýšilo o 24%. V skupine L+ARNI došlo k redukcii relatívnej hmotnosti ĽK o 21%, kým v skupine L+CAP až k 32% redukcii, v porovnaní so skupinou L-NAME (Obr. 2).

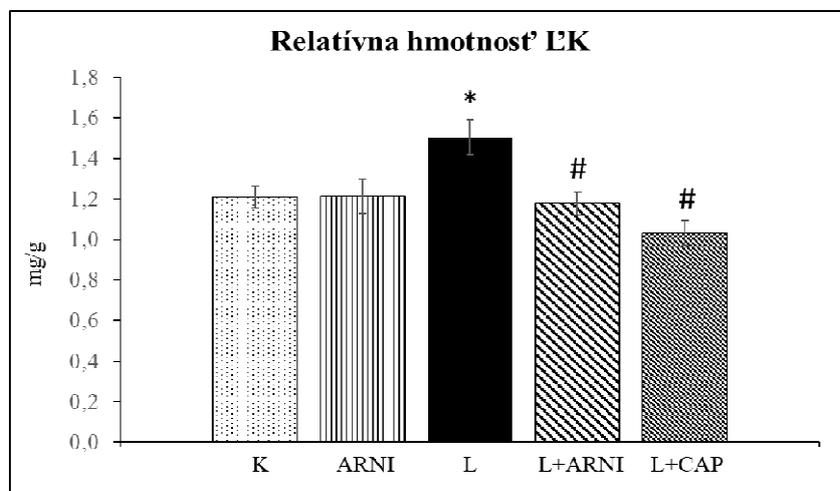
Echokardiografickým vyšetrením bola u kontrol nameraná EF 78 \pm 0,8% a FS 42 \pm 0,8%. L-NAME znížilo EF o 17% a FS o 26% oproti skupine K. Pridanie ARNI resp. kaptoprilu k L-NAME zhodne zvýšilo EF o 16% a FS o 24%. Hodnota pomeru E/A bola v kontrolnej skupine 1,25 \pm 0,03, v skupine L-NAME bol tento pomer o 50% vyšší. V skupinách L+ARNI a L+CAP klesol pomer E/A o 41%, resp. 30%, oproti skupine L-NAME. V kontrolnej skupine bola nameraná hodnota DecT 25,7 \pm 1,05 ms, L-NAME ju zvýšilo o 45%. ARNI aj kaptopril znížil v skupine s L-NAME DecT o 36%, resp. 33%. Hodnota IVRT u kontrol bola 27,8 ms, pričom

Peter Stanko, Tomáš Baka, Kristína Krajčírovičová, Kristína Repová, Silvia Aziriová, Fedor Šimko: Protekcia kardiovaskulárneho systému pri L-NAME-indukovanej hypertenzii duálnou inhibíciou neprilyzínu a AT1 receptora pre angiotenzín II. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 90-95.

v skupine L-NAME stúpla o 52%. ARNI aj kaptopril v hypertenznej skupine s L-NAME znížil IVRT o 44%, resp. 49% (Obr. 3).

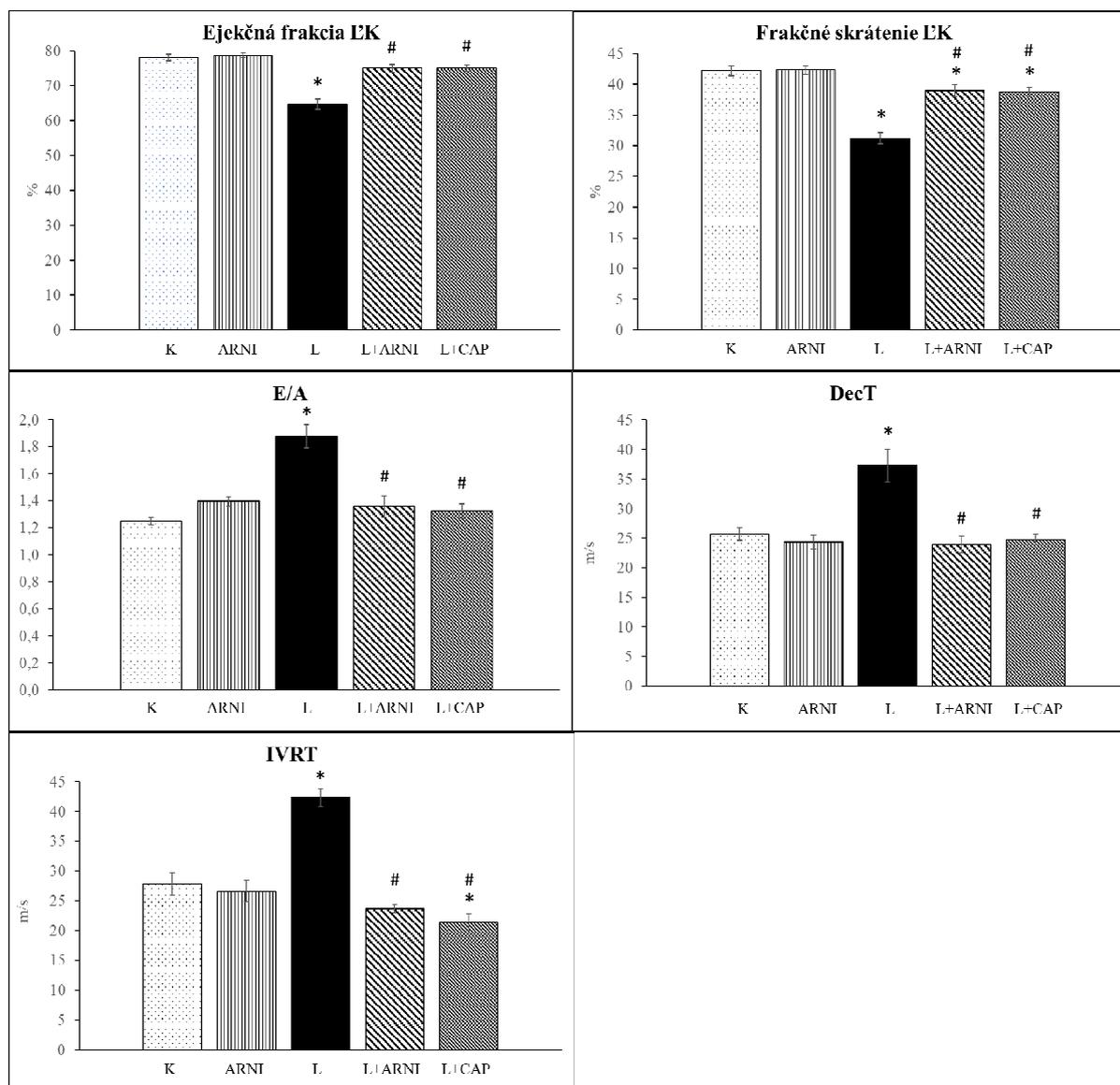


Obr. 1 Systolický tlak krvi v priebehu experimentu. K – kontrola, ARNI – sakubitril/valsartan, CAP – kaptopril; tabuľka znázorňuje signifikanciu v priebehu pokusu, ns – nesignifikantné, * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. L-NAME



Obr. 2 Relatívna hmotnosť ľavej komory. K – kontrola, ARNI – sakubitril/valsartan, L – L-NAME, CAP – kaptopril; * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. L-NAME

Peter Stanko, Tomáš Baka, Kristína Krajčírovičová, Kristína Repová, Silvia Aziriová, Fedor Šimko: Protekcia kardiovaskulárneho systému pri L-NAME-indukovanej hypertenzii duálnou inhibíciou neprilyzínu a AT1 receptora pre angiotenzín II. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 90-95.



Obr. 3 Echokardiografické vyšetrenie systolickej a diastolickej funkcie ľavej komory. K – kontrola, ARNI – sakubitril/valsartan, L – L-NAME, CAP – kaptopril; ĽK – ľavá komora, E/A – pomer rýchlosti plnenia ľavej komory cez mitrálnu chlopňu v skorej a neskej fáze diastoly, DecT – deceleračný čas, IVRT – čas izovolumickej relaxácie; * $p < 0,05$ vs. K, # $p < 0,05$ vs. L-NAME

Diskusia

Chronická aplikácia L-NAME v našom experimente viedla ku vzniku systolickej hypertenzie, hypertrofie ĽK a k poruche systolickej aj diastolickej funkcie ĽK. Podávanie kaptoprilu alebo ARNI zabránilo vzniku hypertenzie, hypertrofie ĽK a kompletne zabránilo vzniku poruchy funkcie ĽK.

Hypertenzia a ischemická choroba srdca sú príčinou až 70% prípadov vzniku ZS. Hypertenzné srdce následkom chronického tlakového preťaženia je charakterizované hypertrofiou, fibrotickou prestavbou a postupným zhoršovaním diastolických a systolických vlastností ĽK s výrazným zhoršením prognózy (8). Pri správne aplikovanej terapii je však možné dosiahnuť

Peter Stanko, Tomáš Baka, Kristína Krajčírovičová, Kristína Repová, Silvia Aziriová, Fedor Šimko: Protekcia kardiovaskulárneho systému pri L-NAME-indukovanej hypertenzii duálnou inhibíciou neprilyzínu a AT1 receptora pre angiotenzín II. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 90-95.

čiastočnú alebo úplnú reverziu tkanivových alterácií hypertrofovanej komory alebo zabrániť vzniku hypertenzného srdca. Preto je pozornosť pri hypertenzii upriamená nielen na redukcii hemodynamického preťaženia, ale aj prevenciu, resp. reverziu hypertenzného srdca (9).

L-NAME-indukovaná hypertenzia je jedným z najčastejšie využívaných modelov pri štúdiu hypertenzného srdca. L-NAME (N^o-nitro-L-arginín metyl ester) je falošným substrátom pre endotelovú syntázu oxidu dusnatého (eNOS), čím sa redukuje tvorba dilatačného faktora oxidu dusnatého (NO) s následným vznikom tzv. NO-deficitnej hypertenzie (6, 9).

Neprilyzín je endopeptidáza hydrolyzujúca atriálny (ANP) a mozgový (BNP) natriuretický peptid s vazodilatačným a natriuretickým účinkom. Pri inhibícii neprilyzínu sa však zvyšuje nielen biologická dostupnosť ANP, resp. BNP, ale aj hladina angiotenzínu II (Ang II), ktorý je ďalším substrátom tejto endopeptidázy. Preto vazokonstrikčný a proproliferatívny účinok Ang II môže čiastočne eliminovať protektívne efekty NP (4). Kombinácia inhibítora neprilyzínu (sakubitrilu) s blokátorom AT1 receptora pre Ang II (valsartanom) neželateľný účinok zvýšenia Ang II eliminuje, s následnou dominanciou vazodilatačných, diuretických a antiproliferatívnych účinkov sprostredkovaných zvýšením hladiny NP (5).

ARNI aj kaptopril redukovali hypertrofiu LK, a to prostredníctvom redukcii hemodynamickej tlakovej záťaže. Z predchádzajúcich experimentov na našom pracovisku je zrejmé, že hypertrofia LK pri L-NAME indukovanej hypertenzii sa spája so zmožením fibrotického tkaniva. Za zhoršenie pasívnych diastolických vlastností je zodpovedné predovšetkým zvýšenie koncentrácie nesolubilného kolagénu s vysokou tuhosťou (7,10). Porušenie systolických vlastností (EF, FS) ako aj aktívnej relaxácie (IVRT) je determinované zhoršením Ca²⁺ handlingu s oneskoreným uvoľňovaním a vychytávaním Ca²⁺ do zásobných štruktúr bunky (11) alebo zvýšením senzitivity myofilament na Ca²⁺ (12), ako aj redukciou biodostupnosťou NO (13). ACE-inhibítora kaptopril, obsahujúci SH skupiny s antioxidačnými vlastnosťami, nielen zvyšuje dostupnosť NO, ale redukuje aj koncentráciu väziva (9, 10) čo v konečnom dôsledku zlepšuje systolické aj diastolické vlastnosti srdca (14). Podobne blokátory AT1 receptora viedli v minulých experimentoch k úprave srdcovej funkcie (15).

Atriálne peptidy sú taktiež známe redukciiu fibrotickej prestavby, zlepšením dostupnosti ATP a kalciovej homeostázy (5). Je teda racionálne predpokladať, že kombinácia AT1 blokády a zvýšenia hladiny ANP (pomocou ARNI) pôsobí protektívne na hypertrofiu LK z hľadiska prevencie jej vzniku a narušenia systolickej a diastolickej funkcie, čo sa jednoznačne dokázalo v našom experimente.

Na základe našich experimentálnych údajov je možné predpokladať, že ARNI je účinné protektívum nielen pri zlyhávajúcom, ale už pri hypertenznom srdci. Ak sa výsledky potvrdia v humánnej medicíne, mohlo by sa ARNI využívať pri terapii hypertenzného srdca u pacientov, u ktorých je použitie ACE inhibície kontraindikované alebo zle tolerované.

Záver

Chronické podávanie L-NAME indukovalo hypertenziu, hypertrofiu LK srdca a systolickú aj diastolickú dysfunkciu.

ARNI aj kaptopril zabránili vzniku hypertenzie a hypertrofie myokardu.

ARNI aj kaptopril zlepšili systolickú aj diastolickú funkciu ľavej komory.

Peter Stanko, Tomáš Baka, Kristína Krajčírovičová, Kristína Repová, Silvia Aziriová, Fedor Šimko: Protekcia kardiovaskulárneho systému pri L-NAME-indukovanej hypertenzii duálnou inhibíciou neprilyzínu a AT1 receptora pre angiotenzín II. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 90-95.

ARNI sa javí ako alternatívna možnosť vysoko-účinnnej protekcie hypertenzného srdca v prípade nemožnosti použitia ACE-inhibítorov.

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0035/19 a UK/45/2020.

Zoznam použitej literatúry

1. Simko F, Pechanova O. Remodelling of the heart and vessels in experimental hypertension: advances in protection. *J Hypertens.* 2010; 28(1): 1-6.
2. Simko F, Adamcova A: What prevents cardioprotective drugs from reaching the market? *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2018; 11(5): 463-465.
3. Adamcova M, Simko F: Multiplex biomarker approach to cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2018, 39(7): 1068-1072.
4. McMurray JJ: Neprilysin inhibition to treat heart failure: a tale of science, serendipity, and second chances. *Eur J Heart Fail.* 2015; 17:242-7.
5. Baka T, Stanko P, Hrenak J a spol.: Dual inhibition of neprilysin and angiotensin II type 1 receptor in light of clinical studies. *Cardiology Lett.* 2021; 30(1): 23-30.
6. Stanko P, Baka T, Repova K a spol.: Ivabradine Ameliorates Kidney Fibrosis in L-NAME-Induced Hypertension. *Front Med.* 2020; 7:325.
7. Simko F, Baka T, Poglitsch M a spol.: Effect of Ivabradine on a Hypertensive Heart and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in L-NAME-Induced Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(10): 3017.
8. Simko F, Baka T, Krajcirovicova K a spol.: Effect of Melatonin on the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in L-NAME-Induced Hypertension. *Molecules.* 2018; 23(2): 265.
9. Pechanova O, Bernatova I, Pelouch V a spol.: Protein remodelling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29(12): 3365-74.
10. Simko F, Pechanova O, Repova K a spol.: Lactacystin-Induced Model of Hypertension in Rats: Effects of Melatonin and Captopril. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(8): 1612.
11. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: Causal mechanisms and treatment. *Circulation* 2002; 105: 1503-1508.
12. Jeong EM, Monasky MM, Gu L a spol.: Tetrahydrobiopterin improves diastolic dysfunction by reversing changes in myofilament properties. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 56: 44-54.
13. Silberman GA, Fan TH, Liu H a spol.: Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. *Circulation* 2010; 121: 519-528.
14. Litwin SE, Katz SE, Morgan JP a spol.: Long-term captopril treatment improves diastolic filling more than systolic performance in rats with large myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 28(3): 773-81.
15. Monteiro P, Duarte AI, Gonçalves LM a spol.: Valsartan improves mitochondrial function in hearts submitted to acute ischemia. *Eur J Pharmacol.* 2005; 518(2-3): 158-64.

Petra Vrbová, Simona Valášková, Andrea Gažová, Juraj Smaha, Martin Kužma, Juraj Payer, Ján Kyselovič: MikroRNA ako potenciálne biomarkery zníženého funkčného stavu a mobility u hospitalizovaných pacientov na internej klinike. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 96-99.

20. MikroRNA ako potenciálne biomarkery zníženého funkčného stavu a mobility u hospitalizovaných pacientov na internej klinike

MUDr. Petra Vrbová¹
(vnútorné choroby)

Spoluautori: PharmDr. Simona Valášková², PharmDr. Andrea Gažová, PhD³, MUDr. Juraj Smaha¹, doc. MUDr. Martin Kužma, PhD.¹, prof. MUDr. Juraj Payer, PhD., MPH, FRCP¹, prof. PharmDr. Ján Kyselovič, CSc.²

Školiteľ: doc. MUDr. Tomáš Koller, PhD.¹

¹V. interná klinika LF UK a UN Bratislava, ²Katedra farmakológie a toxikológie Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, ³Ústav farmakológie a klinickej farmakológie LF UK

Úvod

Hospitalizovaní pacienti na internom oddelení majú zvýšené riziko nízkej fyzickej rezervy, ktorá sa počas pobytu v nemocnici ďalej znižuje (1, 2). V dôsledku akútneho ochorenia, imobility a anorexie je miera prevalencie sarkopenických a krehkých pacientov v nemocniciach vysoká, dosahuje až do 50% hospitalizovaných v závislosti od použitých diagnostických kritérií (3). Starostlivosť o týchto pacientov predstavuje významnú záťaž spoločnosti po stránke zdravotnej, sociálnej a ekonomickej (4, 5). Ako doterajšie výskumy ukazujú, existuje veľký potenciál pre zvrátenie krehkosti, najmä v jej počiatočných fázach. Z tohto dôvodu je včasná identifikácia, skrining a zvládanie krehkosti dôležitou prioritou oblasti medicíny (6). Diagnostika vyžaduje bed-side testovanie funkčných domén alebo ďalšie zložitejšie hodnotenia svalovej hmoty (7, 8). Do praxe je potrebné zavedenie klinicky jednoduchých užitočných biomarkerov funkčného stavu.

MikroRNA (miRNA), ako novo objavené regulátory génovej expresie, môžu modulovať mnoho procesov v kostrovom svale, vrátane myogenézy, regenerácie tkanív a bunkového programovania (9). Zistilo, že miRNA sú identifikované tak v obehú zdravých jedincov, aj osôb so svalovým ochorením, s rôznou expresiou počas starnutia (10). Preto sme sa rozhodli zamerať na preskúmanie potenciálu miRNA s cieľom nájsť spoľahlivý biomarker fyzickej krehkosti u hospitalizovaných pacientov.

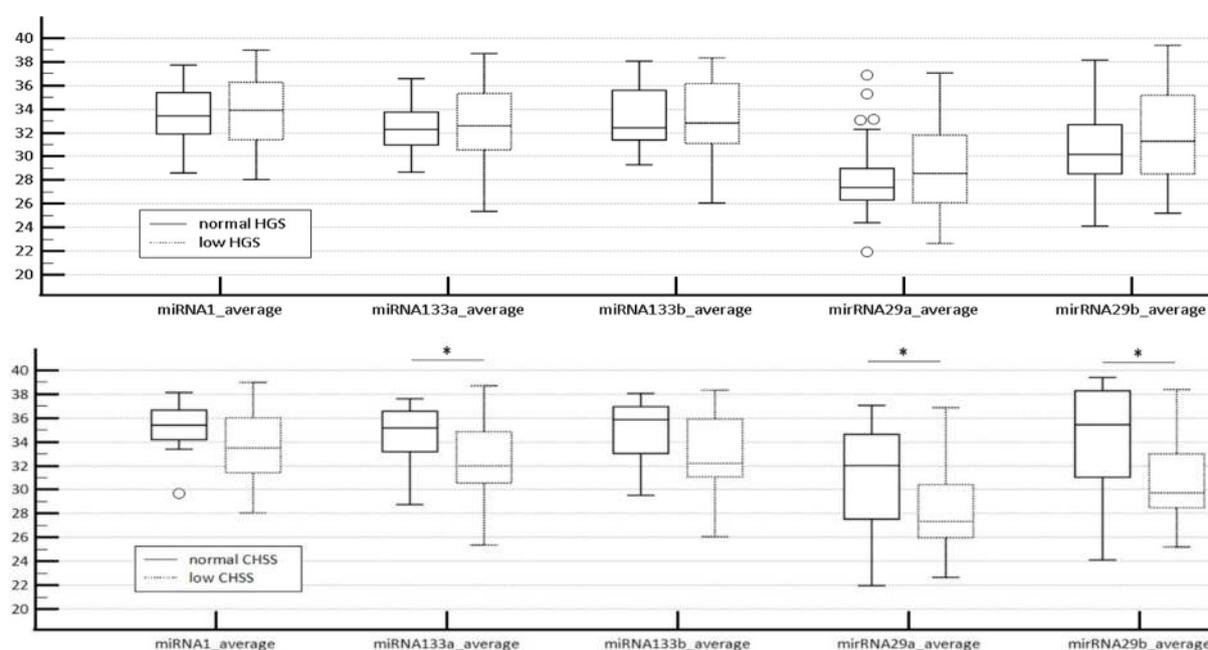
Materiál a metódy

Vykonalí sme prierezovú štúdiu u hospitalizovaných pacientov na internej klinike. Vstupné kritériá: vek 55-75 rokov, schopnosť vstať zo stoličky. Vylučujúce kritéria: imobilita, terminálne štádiá choroby, pobyt na JIS. Vyšetřili sme: základné demografické a antropometrické parametre, laboratórne parametre (hemoglobín, kreatinín, vitamín D), nutričné parametre (body mass index - BMI, kožné riasy tricepsu a pod lopatkou), funkčné parametre (meranie sily stisku ruky - HGS (handgrip strength), chôdza bežnou rýchlosťou na 5 metrov, 10 sekundové státie v troch pozíciách so zachovaním rovnováhy, čas potrebný na päť postavení sa zo stoličky - CHSS (chairs stand speed)) a bio-impedančné parametre (fat free mass, fat mass). Vyšetřili sme 5 miRNA z plazmy: miRNA1, miRNA133a+b, miRNA29a+b.

Petra Vrbová, Simona Valášková, Andrea Gažová, Juraj Smaha, Martin Kužma, Juraj Payer, Ján Kyselovič: MikroRNA ako potenciálne biomarkery zníženého funkčného stavu a mobility u hospitalizovaných pacientov na internej klinike. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 96-99.

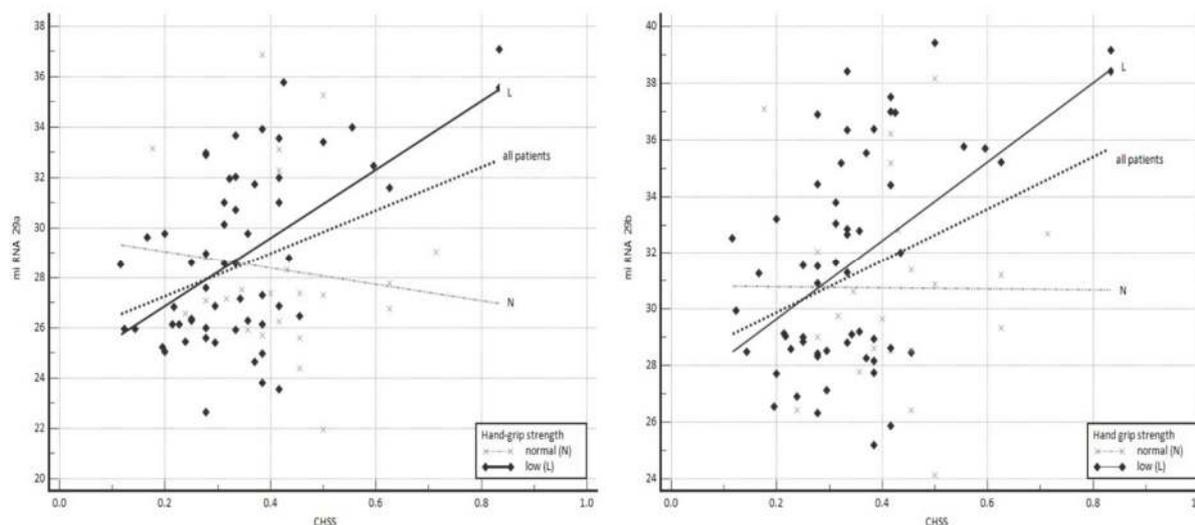
Výsledky

Zaradili sme 80 pacientov (40 mužov, 40 žien) s priemerným vekom $68,8 \pm 8,4$ rokov. Obezita bola pozorovaná u 27,5% a 30%, nízka HGS a nízke CHSS u 65,0, 77,5% a 80, 90% mužov a žien. Medián pobytu v nemocnici bol 6,5 dňa. MiRNA29 mala najsilnejšiu koreláciu s kožnou riasou tricepsu (miRNA29b, $r = 0,377$, $p = 0,0006$) a CHSS (miRNA 29a, $r = 0,262$, $p = 0,02$). Hladiny MiRNA29 a 133a boli signifikantne nižšie u pacientov s CHSS $<0,5/s$. Ostatné antropometrické parametre, domény mobility alebo vitamín D nekorelovali. Všetky miRNA okrem miRNA1 mohli predpovedať nízku hladinu CHSS (miRNA29b, AUROC = 0,736 CI 0,56-0,91, $p = 0,01$), najmä v podskupine pacientov s nízkym HGS (miRNA 29b, AUROC = 0,928 CI 0,83-0,98).



Graf 1: Porovnanie hladín miRNA 1, 133a, 133b, 29a a 29b podľa kategorických domén funkčnej mobility. Horný graf: normálna (plný štvorec) vs. nízka sila stisku ruky (bodkovaný štvorec, muži <30 kg, ženy <20 kg). Spodný graf: normálna (plný štvorec) vs. nízka rýchlosť vstávania zo stoličky (bodkovaný štvorec, $<0,5/s$), Box-whiskerov graf zobrazujúci 25-75 percentil a rozsah, * $p < 0,05$.

Petra Vrbová, Simona Valášková, Andrea Gažová, Juraj Smaha, Martin Kužma, Juraj Payer, Ján Kyselovič: *MikroRNA ako potenciálne biomarkery zníženého funkčného stavu a mobility u hospitalizovaných pacientov na internej klinike. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 96-99.*



Graf 2: Korelácie medzi miRNA29 a rýchlosťou vstávania zo stoličky (počet postavení /s). Ľavý graf: miRNA29a, všetci pacienti: $r = 0,262$, $p = 0,019$, pacienti s nízkou silou stisku ruky (L): $r = 0,437$, $p = 0,0007$, normálna sila stisku ruky (N): $r = 0,061$, $p = 0,784$. Pravý graf: miRNA29b, všetci pacienti: $r = 0,257$, $p = 0,021$, pacienti s nízkou silou stisku ruky (L): $r = 0,392$, $p = 0,0026$, normálna sila stisku ruky (N): $r = 0,0669$, $p = 0,767$.

Diskusia

Zo všetkých funkčných domén len rýchlosť vstávania zo stoličky korelovala s vybranými miRNA. MiRNA29 a 133a mohli s priemernou presnosťou predpovedať nízku rýchlosť vstávania zo stoličky. MiRNA29 a 133 by teda mohli mať potenciál ako biomarkery na identifikáciu pacientov s niektorými aspektmi zhoršeného funkčného stavu, v tomto prípade narušenej antigravitačnej domény. Vzhľadom na doterajšiu dostupnú literatúru nenájdeme podobné informácie o vzťahu medzi miRNA a CHSS, ktorá robí naše zistenie jedinečným. Zaujímavým poznatkom je tiež korelácia medzi miRNA 29b a kožnou riasou tricepsu. Doposiaľ bolo vykonaných niekoľko štúdií u ľudí s cieľom preskúmať zmeny v sérových hladinách miRNA pri skúmaní vzťahu s doménami funkčnej mobility (11). Štúdia Iannone et al. zistila nižšie plazmatické hladiny miRNA133b u jednotlivcov so sarkopéniou, nižšie hladiny miRNA133b a miRNA206 významne korelovali so zlým stavom výživy (12). Prierezová štúdia Murabito et al. zistila spojitosť medzi miRNA a zvýšenou silou stisku ruky (13). Ďalšia štúdia He et al. zistila u sarkopenických jedincov nižšie hladiny miRNA208b a miRNA155, ktoré významne korelovali so silou stisku ruky u žien a miRNA208b, miRNA499, miRNA222 s hmotou kostrového svalstva. Avšak pre miRNA1, miRNA133a, miRNA133b neboli pozorované významné rozdiely (14). Štúdia Liu et al. takisto neodhalila významné rozdiely v miRNA133a (15).

Záverom konštatujeme, že u hospitalizovaných pacientov na internej klinike je nízky funkčný stav veľmi častý. MiRNA má potenciál byť biomarkerom antigravitačnej domény, avšak nie iných funkčných domén. Na ich praktické použitie sú však potrebné väčšie štúdie s konkrétnymi miRNA a klinicky definovanými cieľmi.

Petra Vrbová, Simona Valášková, Andrea Gažová, Juraj Smaha, Martin Kužma, Juraj Payer, Ján Kyselovič: MikroRNA ako potenciálne biomarkery zníženého funkčného stavu a mobility u hospitalizovaných pacientov na internej klinike. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 96-99.

Zoznam použitej literatúry

1. Thompson CH, Dodds RM: The Ageing Syndromes of Sarcopenia and Frailty. *Medicine in Older Adults* 2021; 49 (1): 6-9.
2. Oliveira JS, Pinheiro MB, Fairhall M et al.: Evidence on Physical Activity and the Prevention of Frailty and Sarcopenia Among Older People: A Systematic Review to Inform the World Health Organization Physical Activity Guidelines. *Journal of Physical Activity and Health* 2020; 17 (12): 1247-1258.
3. Gingrich A, Volkert D, Kiesswetter E et al.: Prevalence and overlap of sarcopenia, frailty, cachexia and malnutrition in older medical inpatients. *BMC Geriatrics* 2019; 19: 120.
4. Papadopoulou SK: Sarcopenia: A Contemporary Health Problem among Older Adult Populations. *Nutrients* 2020; 12 (5): 1293.
5. World Health Organization. WHO Clinical Consortium on Healthy Ageing. In: Topic focus: frailty and intrinsic capacity 2017. p. 36
6. Dent, E., Morley, J.E., Cruz-Jentoft, A.J. et al.: Physical Frailty: ICFSR International Clinical Practice Guidelines for Identification and Management. *J Nutr Health Aging* 2019; 23 (9): 771–787.
7. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J et al.: Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing* 2019; 48(4): 601.
8. Chen X, Mao G, Leng SX: Frailty syndrome: An overview. *Clinical Interventions in Aging* 2014; 19 (9): 433-441.
9. Brown DM, Goljanek-Whysall K: microRNAs: Modulators of the underlying pathophysiology of sarcopenia? *Ageing Research Review* 2015; 24 (Pt B): 263–73.
10. Nie M, Deng ZL, Liu J et al.: Noncoding RNAs, emerging regulators of skeletal muscle development and diseases. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 676575.
11. Yanai K, Kaneko S, Ishii H et al.: MicroRNAs in Sarcopenia: A Systematic Review. *Front Med (Lausanne)* 2020; 7: 180.
12. Iannone F, Montesanto A, Cione E et al.: Expression Patterns of Muscle-Specific miR-133b and miR-206 Correlate with Nutritional Status and Sarcopenia. *Nutrients* 2020; 12 (2): 297.
13. Murabito JM, Rong J, Lunetta KL et al.: Cross-sectional relations of whole-blood miRNA expression levels and hand grip strength in a community sample. *Aging Cell* 2017; 16 (4): 888-894.
14. He N, Zhang YL, Zhang Y et al.: Circulating MicroRNAs in Plasma Decrease in Response to Sarcopenia in the Elderly. *Front Genet.* 2020; 11: 167.
15. Liu HC, Han DS, Hsu CC et al.: Circulating MicroRNA-486 and MicroRNA-146a serve as potential biomarkers of sarcopenia in the older adults. *BMC Geriatrics* 2021; 21 (1): 86.

Mária Vargová, Adam Adamec, Miroslav Korbeľ: Analýza prípadov transportu rodičiek na jednotky intenzívnej starostlivosti v Slovenskej republike v rokoch 2014 – 2017. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 100-104.

21. Analýza prípadov transportu rodičiek na jednotky intenzívnej starostlivosti v Slovenskej republike v rokoch 2014 – 2017

MUDr. PhDr. Mária Vargová
(gynekológia a pôrodnictvo)

Spoluautori: MUDr. Adam Adamec
Školiteľ: Doc. MUDr. Miroslav Korbeľ, CSc.
I. gynekologicko-pôrodnická klinika LF UK a UN Bratislava

Úvod

The Slovak Obstetric Survey System (SOSS) - pracovná skupina sekcie perinatálnej medicíny (SPM) Slovenskej gynekologicko-pôrodnickej spoločnosti (SGPS) zhromažďuje údaje o závažných akútnych materských morbiditách v SR a analyzuje ich od roku 2012⁽¹⁻⁶⁾. Predmetom analýzy sú aj údaje o rodičkách, ktoré boli v gravidite alebo po pôrode z dôvodu závažného klinického stavu transportované na jednotky intenzívnej starostlivosti. SOSS definuje transport na jednotky intenzívnej starostlivosti (JIS) ako stav tehotnej alebo rodičky, ktorý si vyžadoval preklad na oddelenie/kliniku anestéziológie a intenzívnej (resuscitačnej) medicíny alebo na akúkoľvek jednotku intenzívnej starostlivosti. Práca analyzuje transporty na JIS v rokoch 2014 – 2017.

Súbor a metódy

Retrospektívne boli analyzované prípady transportu rodičiek na JIS v rokoch 2014 - 2017. Údaje boli získané z perinatologických hlásení zasielaných SPM SGPS. Následne sa pôrodnickým pracoviskám zaslali štandardizované dotazníky k hláseným prípadom. Vrátené dotazníky boli analyzované komisiou SOSS na základe definovaných kritérií.

Výsledky

Na pracoviskách, ktoré dodali údaje, bolo v sledovanom období 181 573 pôrodov a hlásených 308 prípadov transportu na JIS. Po analýze expertnou skupinou SOSS bolo hodnotiteľných 297 dotazníkov (k 11 prípadom boli informácie nedostatočné).

Incidencia transportov na JIS v r. 2014 – 2017 bola 1,63 na 1 000 pôrodov, najvyššia v roku 2016 – 2,13 a najnižšia v roku 2015 - 1,24.

Na všetkých transportoch na JIS v Slovenskej republike (SR) sa podieľal Nitriansky kraj 18,9 %, Košický 12,5 %, Žilinský a Prešovský kraj zhodne po 10,4 %, Banskobystrický 10,1 %, Bratislavský a Trnavský zhodne 7,4 % a Trenčiansky 5,7 %.

Najviac transportov na JIS bolo u rodičiek vo veku 25-29 rokov (tabuľka 1). Najmladšia rodička v súbore mala 15 a najstaršia 43 rokov.

Mária Vargová, Adam Adamec, Miroslav Korbel: *Analýza prípadov transportu rodičiek na jednotky intenzívnej starostlivosti v Slovenskej republike v rokoch 2014 – 2017. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 100-104.*

Tabuľka 1. Veková distribúcia 297 rodičiek transportovaných na JIS (zdroj: SOSS)

Veková kategória	Počty rodičiek	
	n	%
15 - 19	17	5,7
20 - 24	32	10,8
25 - 29	84	28,3
30 – 34	77	25,9
35 - 39	71	23,9
40 +	16	5,4
Celkovo	297	100

Hodnotu body mass indexu (BMI) bolo možné vypočítať u 280 žien transportovaných na JIS. Ženy s nadhmotnosťou a obezitou mali 71 % zastúpenie na transportoch (tabuľka 2).

Tabuľka 2. BMI žien transportovaných na JIS podľa (zdroj: SOSS)

Hmotnostná kategória	BMI	Počet	
	(kg/m ²)	(n = 280)	%
Podhmotnosť	< 18,5	5	1,8
Normálna hmotnosť	18,5 - 24,9	76	27,1
Nadhmotnosť	25,0 - 29,9	107	38,2
Obezita I	30,0 - 34,9	60	21,4
Obezita II	35,0 - 39,9	21	7,5
Obezita III	≥ 40	11	3,9

BMI – body mass index

Slovenskú národnosť malo 81,4 % žien transportovaných na JIS, rómskeho pôvodu bolo 14,8 % žien, maďarskej národnosti 1,3 % a 2,3 % nemalo uvedenú národnosť.

Zo všetkých transportov na JIS bolo 86,2 % po cisárskom reze, 12,5 % po spontánnom a 1,3 % po vaginálnom operačnom pôrode.

Priemerná dĺžka hospitalizácie pacientok transportovaných na JIS bola 2 dni. Minimálna dĺžka hospitalizácie bola 1 deň a maximálna 46 dní.

Letalita žien transportovaných na JIS bola 3,8 % (zomrelo 11 pacientok). Príčinou úmrtia bolo intrakraniálne krvácanie a komplikácie preeklampsie zhodne po 3 prípady, hemoragický šok - 2 prípady, a po 1 prípade na embóliu plodovou vodou, HELLP syndróm a ischemickú cievnu príhodu pri anomálii mozgových ciev.

Diskusia

Východoslovenský región (Košický a Prešovský kraj) mal najvyšší počet pôrodov, ale aj vysoký počet cisárskych rezov a pôrodov žien rómskeho etnika⁽⁶⁾. Transporty žien rómskeho

Mária Vargová, Adam Adamec, Miroslav Korbel: *Analýza prípadov transportu rodičiek na jednotky intenzívnej starostlivosti v Slovenskej republike v rokoch 2014 – 2017. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 100-104.*

etnika na JIS súvisia s ich nedisciplinovanosťou a nenavštevovaním prenatálnych poradní. Z oficiálnych štatistík nie je možné zistiť pôrodnosť tohto etnika, ani vypočítať incidenciu či relatívne riziko závažných komplikácií a úmrtia.

Tabuľka 3. Rozdelenie príčin transportu rodičiek na JIS podľa konkrétnych prípadov (zdroj: SOSS)

Príčina prekladu		Roky				2014 - 2017	
		2014	2015	2016	2017		
Závažné peripartálne krvácanie	Ruptúry uteru	3	3	1	4	11	
	Abrupcia placenty	4	5	5	8	22	
	Abnormálne invazívna placenta	accreta	1	4	4	2	11
		incretata	1	0	3	0	4
		percreta	1	1	1	0	3
	Hypotónia/Atónia uteru	7	2	7	11	27	
	Placenta praevia	4	2	6	3	15	
	Pôrodné poranenia*	1	5	4	3	13	
Perioperačné komplikácie**	5	1	4	9	19		
Diseminovaná intravaskulárna koagulopatia		0	2	5	3	10	
Hypertenzné ochorenia v gravidite	Preeklampsia	2	3	9	10	24	
	Eklampsia	5	2	6	2	15	
	HELLP	5	1	8	6	20	
	Arteriálna hypertenzia	3	4	9	3	19	
Tromboembolické		3	2	4	4	13	
Kardiovaskulárne		2	0	4	2	8	
Sepsa + infekcie		6	2	5	3	16	
Metabolické		0	2	3	1	6	
Anesteziologické komplikácie pri SC		2	2	7	3	14	
Gastroenterologické komplikácie	Ileózny stav	1	1	0	0	2	
	Colitisulcerosa	1	1	0	0	2	
	Resekcia rekta	0	1	0	0	1	
	Dyspeptický sy	0	0	1	0	1	
	Hematóm heparu	0	0	1	0	1	
	Pankreatitída				1	1	
Iné	Paranoidná schizofrénia	1	0	0	0	1	
	Hypokoagulačný stav	0	2	0	1	3	
	Epileptický záchvat	0	1	2	2	5	
	Porucha vedomia	0	0	1	0	1	
	Inverzia uteru	0	0	1	0	1	
	Polytrauma - autonehoda	0	0	1	1	2	
	Rpt moč.mech. pri SC				1	1	
	Anafylaktický šok				1	1	
	Perforácia uteru kyretáž				1	1	
	Ischemická cievna mozgová príhoda				1	1	
	Nefrotický syndróm				1	1	
Spolu		59	49	102	87	297	

* po vaginálnom pôrode, ** počas a po cisárskom reze

Mária Vargová, Adam Adamec, Miroslav Korbel: Analýza prípadov transportu rodičiek na jednotky intenzívnej starostlivosti v Slovenskej republike v rokoch 2014 – 2017. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 100-104.

Existuje málo štúdií, ktoré by porovnávali materskú mortalitu a morbiditu medzi rôznymi štátmi. Aj v rámci jedného štátu existujú aj etnické/rasové rozdiely v materskej mortalite v rámci jedného štátu⁽⁷⁾.

Stúpajúci vek prvorodičiek (nad 30 rokov) je významný rizikový faktor následných komplikácií v tehotenstve a počas pôrodu⁽⁸⁾. V SR bolo na JIS transportovaných vo veku 30 a viac rokov 55,2 % rodičiek.

Závažné popôrodné krvácanie je hlavnou príčinou závažnej akútnej materskej morbidity a materskej mortality vo svete⁽⁹⁻¹⁰⁾. Zvýšenie incidencie popôrodného krvácania možno pripísať zvyšujúcemu sa veku rodičiek a zvyšujúcemu sa počtu cisárskych rezov⁽¹¹⁾. V SR, podobne ako vo svete, bolo najčastejšou príčinou transportu rodičky na JIS (42,1 %) závažné popôrodné krvácanie (tabuľka 3).

Celonárodná štúdia v Kanade v rokoch 2004-2015 analyzovala 10 204 prípadov transportov na jednotky intenzívnej starostlivosti z celkového počtu 3 162 303 tehotností u 2 035 453 žien z dôvodu vážneho klinického stavu počas tehotenstva alebo pôrodu⁽¹²⁾. Incidencia prijatia rodičiek na JIS v kanadskej štúdii bola 3,2 na 1000 tehotností (v SR 1,6 na 1 000 pôrodov). Najčastejšie závažné materské morbidity, ktoré sa v štúdii vyskytli bolo popôrodné krvácanie a sepsa (v SR krvácanie a hypertenzné ochorenia). Počet úmrtí matiek v sledovanej štúdii bol 6,2 na 100 000 tehotností (v SR 5,2) s mierou materskej úmrtnosti 0,01% (v SR 3,8 %). Najvyšší počet prípadov (30 %) sa vyskytol vo veku 30-34 rokov (v SR najvyšší počet u 25-29 ročných 28,3 %) a u nullipár - 64,7 % (v SR 45,5 %).

V Turecku sledovali transporty na JIS v rokoch 2014 a 2015⁽¹³⁾. Zo 16 728 pôrodov 68 prípadov bolo sprevádzaných závažnou morbiditou (incidencia 4,1/1 000 pôrodov) a 2 prípady skončili úmrtím matky (materská mortalita 11,96/100 000 pôrodov). Dôvodom transportu na JIS bolo v 58,8 % závažné hypertenzné ochorenie (v SR 26 %) a 35,3 % pôrodnické krvácanie (v SR 42 %).

V štúdii z Izraela analyzovali 111 prípadov transportu na JIS zo 120 279 rodičiek s mediánom veku 30 rokov (16 - 44 rokov)⁽¹⁴⁾. Izraelská incidencia transportov na JIS (0,9 na 1 000 pôrodov) bola významne nižšia ako v SR (1,6). Rovnako významne nižší bol aj podiel transportov na JIS po cisárskom reze 63,9 % oproti 87 % v SR. Najčastejším dôvodom transportu na JIS v izraelskej štúdii bolo krvácanie – 35,57 % (v SR 42 %). Hypertenzné ochorenia sa v tejto štúdii podieľali na transportoch na JIS v 9,15 %, kým v SR v 26 %.

V niektorých závažných morbiditách končiacich na JIS sme v porovnaní s inými krajinami horší, ale v niektorých aj lepší. A to je dosť dobrý dôvod na hľadanie ciest na zlepšenie v tých prípadoch, kde nás iné krajiny predstihujú.

Filozofia transportov na JIS v SR sa odvíja jednak od závažnosti komplikácií a jednak od možností (vybavenia a personálneho zabezpečenia) pôrodníc. Niektoré pôrodnice riešia závažné stavy na svojich oddeleniach, iné ich transportujú na jednotky intenzívnej starostlivosti rôzneho typu alebo anesteziologicko-resuscitačné zložky nemocníc. Aj z tohto dôvodu môžu byť rozdiely medzi regiónmi a pôrodnicami⁽¹⁵⁾. Je jedno, kde sa poskytne intenzívna starostlivosť pacientkam so závažnými komplikáciami, dôležité však je, aby bola na adekvátnej úrovni a aby pacientky prežili bez ujmy na zdraví.

Záver

Analýza údajov transportu rodičiek na JIS v SR poukazuje na dôležitosť ďalšieho podrobného sledovania závažných akútnych stavov v súvislosti s tehotnosťou a pôrodom. Významnými rizikovými faktormi závažnej morbidity vyžadujúcej transport na JIS v SR sa javia: vek rodičky, BMI, cisársky rez, etnická príslušnosť, kvalita perinatálnej starostlivosti a spolupráca

Mária Vargová, Adam Adamec, Miroslav Korbeľ: Analýza prípadov transportu rodičiek na jednotky intenzívnej starostlivosti v Slovenskej republike v rokoch 2014 – 2017. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 100-104.

tehotných. Bude treba hľadať spôsoby, ako túto (nie práve najpriaznivejšiu situáciu) v budúcnosti riešiť, aby sa znížila materská mortalita a závažná morbidita.

Podporené čiastočne grantom Univerzity Komenského UK/223/2020 Závažná akútna materská morbidita v Slovenskej republike vyžadujúca intenzívnu multidisciplinárnu starostlivosť.

Literatúra

1. Krištúfková A, Borovský M, Daniš J, et al. Medzinárodné sledovanie závažnej materskej morbidity - The International Network of Obstetric Survey system (INOSS). *Gynekol prax* 2019; 17(2): 105-108.
2. Krištúfková A, Korbeľ M, Borovský M, et al. Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2012. *Gynekol prax* 2015; 13(4): 185-191.
3. Krištúfková A, Korbeľ M, Daniš J, et al. Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2013. *Gynekol prax* 2016; 14(2): 92-98.
4. Krištúfková A, Korbeľ M, Daniš J, et al. Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2014. *Gynekol prax* 2017; 15(1): 25-32.
5. Krištúfková A, Korbeľ M, Daniš J, et al. Analýza závažnej akútnej materskej morbidity v Slovenskej republike v roku 2015. *Gynekol prax* 2019; 17(2): 96-99.
6. Korbeľ M, Krištúfková A, Daniš J, a spol. Materská morbidita a mortalita v Slovenskej republike v rokoch 2007–2015. *Česka Gynekol* 2019; 84(2): 129-139.
7. Holdt Somer SJ, Sinkey RG, Bryant AS. Epidemiology of racial/ethnic disparities in severe maternal morbidity and mortality. *Semin Perinatol* 2017; 41(5): 258-265.
8. Aoyama K, Pinto R, Ray JG, et al. Association of Maternal Age With Severe Maternal Morbidity and Mortality in Canada. *JAMA Network Open* 2019; 2(8): e199875. Available at: <https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2748660>
9. Feduniw S, Warzecha D, Szymusik I, et al. Epidemiology, prevention and management of early postpartum hemorrhage – a systematic review. *Ginekol Pol* 2020; 91(1): 38-44.
10. Hirshberg A, Srinivas SK. Epidemiology of maternal morbidity and mortality. *Semin Perinatol* 2017; 41(6): 332-337.
11. Fan D, Xia Q, Liu L, et al. The incidence of post partum hemorrhage in pregnant women with placenta previa: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2017; 12(1): e0170194. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170194>
12. Aoyama K, Pinto R, Ray JG, et al. Variability in intensive care unit admission among pregnant and post partum women in Canada: a nationwide population-based observational study. *Critical Care* 2019; 23, 381. Available: <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2660-x>
13. UsluYuvacı H, Düzcan T, Akdemir N, et al. Treatment Results of Patients Followed in Intensive Care Unit in Severe Maternal Morbidity Cases. *Gynecol Obstet Reprod Med* 2018; 24(3): 129 - 133. doi: 10.21613/GORM.2018.749-2018
14. Rottenstreich M, Reznick O, Sela HY, et al. Severe Maternal Morbidity Cases in Israel in a High-Volume High-Resource Referral Center: A Retrospective Cohort Study. *Isr Med Assoc J* 2020; 22: 142-147.
15. Vargová M., Korbeľ M., Krištúfková A. et al.: Analýza prípadov transportu rodičiek na jednotky intenzívnej starostlivosti v Slovenskej republike v rokoch 2014 – 2016. *Gynekol prax* 2020; 18(2): 104-108.

Matúš Jurík, Pavel Šiarnik, Katarína Valovičová, Patrik Karapin, Katarína Klobučniková, Peter Turčáni, Branislav Kollár: Vplyv pretlakovej ventilácie na prietok krvi mozgom u pacientov s cerebrálnou ischémiou a spánkovým apnoe. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 105-109.

22.Vplyv pretlakovej ventilácie na prietok krvi mozgom u pacientov s cerebrálnou ischémiou a spánkovým apnoe

MUDr. Matúš Jurík¹
(Neurológia)

Spoluautori: doc. MUDr. Pavel Šiarnik, PhD., MPH¹, MUC. Katarína Valovičová², MUDr. Patrik Karapin¹, MUDr. Katarína Klobučniková, PhD.¹, prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.

Školiteľ: prof. MUDr. Branislav Kollár, PhD., MPH¹

¹ I. neurologická klinika LFUK a UNB, ² Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

Úvod

Prevalencia spánkových porúch dýchania (SPD) je v súčasnosti na vzostupe, čo je do veľkej miery ovplyvnené celosvetovým nárastom výskytu obezity. Najčastejšou formou SPD je obštrukčné spánkové apnoe (OSA). Je definované ako výskyt ≥ 5 apnoických alebo hypopnoických prestávok za hodinu spánku (tzv. apnoe/hypopnoe index [AHI]). OSA je prítomné u 24% mužov a 9% žien (1). V populácii pacientov s ischemickou cievnu mozgovou príhodou (iCMP) sa prevalencia SPD pohybuje na úrovni 72% (2,3), pričom 93% z nich predstavuje OSA (4). Najúčinnjšou liečbou OSA je pretlaková ventilácia (continuous positive airway pressure – CPAP).

OSA je známy nezávislý rizikový faktor cievnych ochorení. Chronicky OSA prispieva k zvyšovaniu krvného tlaku, autonómnej dysregulácii so sympatikovou hyperaktivitou, endoteliálnej dysfunkcii a prozápalovému stavu (5). Bolo preukázané, že dlhé apnoické epizódy (s trvaním > 20 sekúnd) v kombinácii s foramen ovale patens sú spojené s takmer dvojnásobným rizikom iCMP počas spánku (6). Vzťah medzi iCMP a SPD je obojsmerný. SPD predstavujú jednak rizikový faktor pre vznik iCMP, no štrukturálne poškodenia mozgu v dôsledku iCPM môže taktiež viesť ku vzniku spánkového apnoe (2). Existuje niekoľko metód, ako stanoviť prietok krvi mozgom („cerebral blood flow“ [CBF]). „Blízka“ infračervená spektroskopia (near-infrared spectroscopy [NIRS]) má v porovnaní s inými metódami stanovenia CBF veľa výhod. Kľúčovou výhodou je jej neinvazívnosť a umožnenie kontinuálneho záznamu sledovanej veličiny v adekvátnych časových úsekoch. Štúdie používajúce NIRS preukázali pokles CBF počas epizód OSA (ale nie hypopnoe) a tieto zmeny boli výraznejšie pri ťažších stupňoch OSA (7,8). Nevýhodou NIRS je, že hodnotí skôr oxygenáciu mozgového tkaniva ako mozgovú perfúziu. Nová technológia, ultrazvukom „značená“ NIRS (UT-NIRS) analyzuje Dopplerov posun ultrazvukom „označeného“ svetelného signálu a určí tak prúdenie krvi pod sensorom. Analyzované sú fotóny, ktoré vychádzajú z vopred stanoveného objemu tkaniva (9,10). Hodnoty CBF získané pomocou UT-NIRS signifikantne korelujú s hodnotami získanými pri meraní Xe-SPECT, ktorý predstavuje „zlatý štandard“ na stanovenie CBF (11).

Naša štúdia mala za cieľ posúdiť vplyv CPAP terapie na CBF a základné polysomnografické ukazovatele SPD.

Metódy

Do štúdie bolo zaradených 11 pacientov s iCMP a 6 kontrolných pacientov (pacienti s OSA bez inej významnejšej komorbidity a bez anamnézy CMP). Diagnóza CMP bola stanovená na základe

Matúš Jurík, Pavel Šiarnik, Katarína Valovičová, Patrik Karapin, Katarína Klobučniková, Peter Turčáni, Branislav Kollár: Vplyv pretlakovej ventilácie na prietok krvi mozgom u pacientov s cerebrálnou ischémiou a spánkovým apnoe. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 111-115.

štandardného neurologického vyšetrenia, lokalizácia ischemickej lézie bola potvrdená počítačovou tomografiou alebo magnetickou rezonanciou. U pacientov s iCMP bol realizovaný vstupný skríning. V priebehu 7 dní od vzniku príznakov CMP bola u nich realizovaná celonočná pulzná oximetria (zariadenie WristOx2, model 3150, Nonin Medical, USA). Za pozitívny výsledok sme považovali desaturačný index ≥ 15 (počet desaturácií $\geq 3\%$ trvajúcich ≥ 10 sekúnd za hodinu záznamu). Daní pacienti boli znovu hospitalizovaní po 6 týždňoch od vzniku CMP za účelom realizácie celonočnej polysomnografie (zariadenie Alice 6, Philips-Respironics, Holandsko). Každý participant podstúpil 2 celonočné polysomnografie. Diagnostickú noc a následne druhú noc s pretlakovou ventiláciou (terapeutická noc). Obidve noci bol zároveň monitorovaný CBF pomocou UT-NIRS technológie (C-Flow, Ornim medical, Izrael). Tento prístroj zobrazuje CBF za pomoci indexu cerebrálneho prietoku („cerebral flow index“ [CFI]) – bezrozmerného čísla, ktoré je v rozpätí 0-100, pričom je odporúčané vyhodnocovať skôr relatívne zmeny ako absolútne hodnoty.

Príprava pacienta pozostávala z identifikácie a odmastenia plochej nevlasatej časti čela, kam boli následne prilepené dve samolepiace podložky (Smart Pads, dodané od Ornim medical). Na UT-NIRS sondy bolo nanesené malé množstvo gélu a následne boli sondy vložené do nalepených podložiek bilaterálne na čelo pacienta (12). Dáta sa zaznamenávali celonočne. Vyhodnocovali sme priemernú hodnotu CFI získanú z oboch sond.

Polysomnografia bola hodnotená a skóvaná erudovaným personálom na základe štandardizovaných kritérií (13). Na vyhodnotenie signálu CBF a synchronizáciu dát z C-Flow a z polysomnografie bol použitý software Biograph (Beset, Slovensko). Štatistická analýza bola realizovaná za pomoci programu SPSS, verzia 18 (SPSS Inc, Chicago, USA). Kategorická premenné sú vyjadrené ako počet a percentuálne zastúpenie (%), kontinuálne premenné ako priemer \pm smerodajná odchýlka. Pre porovnanie skupín bol použitý pre konkrétne premenné Studentov t-test. Za štatisticky významnú sme považovali hodnotu $P < 0,05$.

Výsledky

Tabuľka 1: Charakteristiky pacientov s iCMP a kontrol porovnávajúce diagnostickú a terapeutickú noc.

	Diagnostická noc	Terapeutická noc	p
iCMP (n=11; vek 67,7 \pm 9,6 rokov; 4 ženy/ 7 mužov)			
CFI	50,3 \pm 6,4	49,0 \pm 4,5	0,602
AHI (n/h)	22,6 \pm 9,0	9,9 \pm 9,9	0,004**
Priemerná sat (%)	94,5 \pm 2,1	94,9 \pm 2,1	0,659
Minimálna sat (%)	86,3 \pm 11,7	91,6 \pm 3,2	0,157
Pulz (n/h)	68,9 \pm 17,3	69,1 \pm 15,3	0,97
Kontroly (n=6, vek 43,7 \pm 14,6; 6 mužov)			
CFI	45,9 \pm 7,3	49,7 \pm 11,7	0,521
AHI (n/h)	58,1 \pm 14,9	7,0 \pm 9,7	<0,001***
Priemerná sat (%)	94,6 \pm 2,0	94,7 \pm 1,9	0,943
Minimálna sat (%)	79,0 \pm 10,7	91,7 \pm 2,7	0,019*
Pulz (n/h)	63,3 \pm 6,5	66,3 \pm 6,0	0,413
CFI: index cerebrálneho prietoku, AHI: apnoe/hypopnoe index, sat: nočná saturácia krvi kyslíkom, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001			

Matúš Jurík, Pavel Šiarnik, Katarína Valovičová, Patrik Karapin, Katarína Klobučniková, Peter Turčáni, Branislav Kollár: Vplyv pretlakovej ventilácie na prietok krvi mozgom u pacientov s cerebrálnou ischémiou a spánkovým apnoe. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 105-109.

Priemerný vek pacientov s iCMP bol $67,7 \pm 9,6$ rokov, priemerný vek kontrol bol $43,7 \pm 14,6$ rokov. V skupine s iCMP traja pacienti užívali chronickú medikáciu, ktorá bola potenciálne vazoaktívna (dvaja pacienti doxazosín, jeden urapidil). Výsledky pre obe skupiny sú sumarizované v tabuľke 1. Nezaznamenali sme významnú zmenu CFI pri porovnaní diagnostickej a terapeutickej noci. Počet respiračných udalostí významne poklesol počas terapeutickej noci v porovnaní s diagnostickou v oboch skupinách (iCMP: AHI z $22,6 \pm 9,0$ na $9,9 \pm 9,9$ a kontroly: z $58,1 \pm 14,9$ na $7,0 \pm 9,7$).

Diskusia

U pacientov s iCMP ani u kontrol so spánkovým apnoe sa nám nepodarilo nájsť žiadne významné zmeny v CBF pri hodnotení efektu CPAP terapie. Existuje niekoľko vysvetlení.

Po prvé, v súbore s iCMP sme nemali dostatočne veľké zastúpenie pacientov s iCMP vzniknutou počas spánku (jediný pacient). V tejto subpopulácii iCMP je totiž možné očakávať najväčší vplyv SPD na zmeny CBF. Pacienti s OSA majú viac ako 3-násobne vyššie riziko vzniku iCMP počas spánku v porovnaní s pacientmi bez OSA (14). Šiarnik a kol. popísali vyššiu prevalenciu stredne závažných a závažných foriem SPD u pacientov s iCMP vzniknutou počas spánku v porovnaní s pacientmi s iCMP vzniknutou v bdelom stave (15). U pacientov s rekurentnou hypoxiou (napríklad pri chronickej obštrukčnej chorobe pľúc alebo OSA) je autoregulácia CBF narušená a mozgová cirkulácia horšie reaguje na nedostatok kyslíka (16). Zdá sa, že CPAP liečba z krátkodobého hľadiska zlepšuje neurologický status pacientov (17). Preto predpokladáme, že porovnanie CBF vo väčšej skupine pacientov s iCMP vzniknutou počas spánku s iCMP vzniknutou počas bdlosti by prinieslo významné rozdiely.

Po druhé, v našej štúdii sme sa zamerali na priemerné hodnoty CFI a ich porovnanie medzi diagnostickou a terapeutickou nocou. Vhodnejšia by však mohla byť analýza časového vzťahu výchyľiek CFI ku špecifickým respiračným udalostiam. Viaceré štúdie preukázali, že pacienti s OSA majú neadekvátnu odpoveď na cerebrálnu hypoxiu a ich autoregulácia nie je schopná sa adaptovať vazodiláciou na nedostatok kyslíka. Táto neschopnosť adaptácie je ešte výraznejšia pri závažnejších formách OSA (16). Clara a kol. zistili výskyt fluktuácií CBF v blízkej časovej nadväznosti na apnoické/hypopnoické epizódy (časové okno medzi -5 a +35 sekúnd od začiatku udalosti) (18). Budúce štúdie by sa teda mali detailnejšie zamerať práve na časovú nadväznosť medzi respiračnými udalosťami a výkyvmi v CBF.

Na záver by sme uviedli, že pacienti v našej štúdii podstúpili iba jednu terapeutickú noc s použitím CPAP terapie. Výskumy však nasvedčujú tomu, že na zmenu cerebrovaskulárnej reaktivity je nutná dlhodobá terapia. V štúdiách hodnotiacich cerebrovaskulárnu reaktivitu u pacientov po iCMP mali pacienti s OSA horšiu vazodilatačnú odpoveď na hypoxiu. Tá sa však upravila po 4-12 týždňoch CPAP terapie (19,20). Vazodilatačná odpoveď tu bola definovaná pomocou strednej prietokovej rýchlosti v arteria cerebri media, nešlo teda o CBF *per se*. Už v minulosti však bolo dokázané, že zmeny v mikrocirkulácii (18,21) odzrkadľujú relatívne presne aj zmeny v makrocirkulácii (22).

Pokiaľ je autorom známe, predkladaná práca je prvá, ktorá používa zariadenie C-Flow počas spánku u pacientov po CMP. O samotnom parametre CFI je preto známe pomerne málo. Neexistujú normatívne hodnoty u zdravých jedincov, nie je jasné aké zmeny nastávajú počas fyziologického spánku, alebo aké zmeny CFI je možné očakávať počas rekonvalescencie z iCMP. Všetky tieto otázky by mali byť zvážené pri budúcich štúdiách.

PodĎakovanie

Práca bola podporená projektom „Dobudovanie centra excelentnosti pre náhle cievne mozgové príhody na Lekárskej fakulte UK v Bratislave“ spolufinancovaného zo zdrojov ES z Európskeho fondu regionálneho rozvoja – Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku (ITMS 26240120023).

Matúš Jurík, Pavel Šiarnik, Katarína Valovičová, Patrik Karapin, Katarína Klobučniková, Peter Turčáni, Branislav Kollár: Vplyv pretlakovej ventilácie na prietok krvi mozgom u pacientov s cerebrálnou ischémiou a spánkovým apnoe. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 111-115.

Zoznam použitej literatúry

1. Klobučniková, K., Šiarnik, P., Čarnická, Z., & Kollár, B. (2018). *Poruchy spánku vo vybranej skupine neurologických ochorení* (1st ed., p. 36). Bratislava: Berlina.
2. Parra, O., Arboix, A., Bechich, S. et al. (2000). Time Course of Sleep-related Breathing Disorders in First-Ever Stroke or Transient Ischemic Attack. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 161(2), 375-380. doi: 10.1164/ajrccm.161.2.9903139
3. Bassetti, C., & Aldrich, M. (1999). Sleep Apnea in Acute Cerebrovascular Diseases: Final Report on 128 Patients. *Sleep*, 22(2), 217-223. doi: 10.1093/sleep/22.2.217
4. Johnson, K., & Johnson, D. (2010). Frequency of Sleep Apnea in Stroke and TIA Patients: A Meta-analysis. *Journal Of Clinical Sleep Medicine*, 06(02), 131-137. doi: 10.5664/jcsm.27760
5. Culebras, A. (2014). Sleep Apnea and Stroke. *Current Neurology And Neuroscience Reports*, 15(1). doi: 10.1007/s11910-014-0503-3
6. Ciccone, A., Proserpio, P., Roccatagliata, D. et al. (2012). Wake-up stroke and TIA due to paradoxical embolism during long obstructive sleep apnoeas: a cross-sectional study. *Thorax*, 68(1), 97-104. doi: 10.1136/thoraxjnl-2012-201643
7. Pizza, F., Biallas, M., Wolf, M., Werth, E., & Bassetti, C. (2010). Nocturnal Cerebral Hemodynamics in Snorers and in Patients with Obstructive Sleep Apnea: A Near-Infrared Spectroscopy Study. *Sleep*, 33(2), 205-210. doi: 10.1093/sleep/33.2.205
8. Aries, M., Coumou, A., Elting, J. et al. (2012). Near Infrared Spectroscopy for the Detection of Desaturations in Vulnerable Ischemic Brain Tissue. *Stroke*, 43(4), 1134-1136. doi: 10.1161/strokeaha.111.636894
9. C-FLOW Specifications. [online]. Available from URL: http://www.ornim.com/wp-content/uploads/2016/03/ornim_medical-c_flow-cflow-MGG_1087A_specs.pdf.
10. UTLight Technology. [online]. Available from URL: http://www.ornim.com/wp-content/uploads/2015/11/UTL_MGG_1020C_1cm.pdf.
11. Schytz, H., Guo, S., Jensen, L. et al. (2012). A New Technology for Detecting Cerebral Blood Flow: A Comparative Study of Ultrasound Tagged NIRS and 133Xe-SPECT. *Neurocritical Care*, 17(1), 139-145. doi: 10.1007/s12028-012-9720-2
12. Caccioppola, A., Carbonara, M., Macrì, M. et al. (2018). Ultrasound-tagged near-infrared spectroscopy does not disclose absent cerebral circulation in brain-dead adults. *British Journal Of Anaesthesia*, 121(3), 588-594. doi: 10.1016/j.bja.2018.04.038
13. Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan SF. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specification. Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine, 2007
14. Mohammad, Y., Almutlaq, A., Al-Ruwaita, A. et al. (2019). Stroke during sleep and obstructive sleep apnea: there is a link. *Neurological Sciences*, 40(5), 1001-1005. doi: 10.1007/s10072-019-03753-2
15. Šiarnik, P., Kollár, B., Čarnická, Z., Šurda, P. et al. (2016). Association of Sleep Disordered Breathing with Wake-Up Acute Ischemic Stroke: A Full Polysomnographic Study. *Journal Of Clinical Sleep Medicine*, 12(04), 549-554. doi: 10.5664/jcsm.5688
16. Beaudin, A., Hartmann, S., Pun, M., & Poulin, M. (2017). Human cerebral blood flow control during hypoxia: focus on chronic pulmonary obstructive disease and obstructive sleep apnea. *Journal Of Applied Physiology*, 123(5), 1350-1361. doi: 10.1152/jappphysiol.00352.2017

Matúš Jurík, Pavel Šiarnik, Katarína Valovičová, Patrik Karapin, Katarína Klobučniková, Peter Turčáni, Branislav Kollár: Vplyv pretlakovej ventilácie na prietok krvi mozgom u pacientov s cerebrálnou ischémiou a spánkovým apnoe. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 105-109.

17. Tsivgoulis, G., Alexandrov, A., Katsanos, A. et al. (2017). Noninvasive Ventilatory Correction in Patients With Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 48(8), 2285-2288. doi: 10.1161/strokeaha.117.017661
18. Gregori-Pla, C. (2019). Microvascular cerebral blood flow fluctuations in association with apneas and hypopneas in acute ischemic stroke. *Neurophotonics*, 6(02), 1. doi: 10.1117/1.nph.6.2.025004
19. Foster, G., Hanly, P., Ostrowski, M., & Poulin, M. (2007). Effects of Continuous Positive Airway Pressure on Cerebral Vascular Response to Hypoxia in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 175(7), 720-725. doi: 10.1164/rccm.200609-1271oc
20. Reichmuth, K., Dopp, J., Barczi, S. et al. (2009). Impaired Vascular Regulation in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 180(11), 1143-1150. doi: 10.1164/rccm.200903-0393oc
21. Zirak, P., Gregori-Pla, C., Blanco, I. et al. (2018). Characterization of the microvascular cerebral blood flow response to obstructive apneic events during night sleep. *Neurophotonics*, 5(04), 1. doi: 10.1117/1.nph.5.4.045003
22. Alex, R., Manchikatla, S., Machiraju, K., Altuwaijri, E., Watenpaugh, D., Rong Zhang, & Behbehani, K. et al. (2014). Effect of apnea duration on apnea induced variations in cerebral blood flow velocity and arterial blood pressure. *2014 36Th Annual International Conference Of The IEEE Engineering In Medicine And Biology Society*. doi: 10.1109/embc.2014.6943581

Veronika Hanzelová, Mária Kubalová, Tomáš Debnár, Miloš Mlynček: Včasná diagnostika poranení črevnej steny v gynekologickej operatíve, prevencia forenzných následkov. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 110-113.

23.Včasná diagnostika poranení črevnej steny v gynekologickej operatíve, prevencia forenzných následkov

MUDr. Veronika Hanzelová¹
(gynekológia a pôrodnictvo)

Spoluautori: MUDr. Mária Kubalová¹, MUDr. Tomáš Debnár¹

Školiteľ: prof. MUDr. Miloš Mlynček, CSc.¹

¹Gynekologicko-pôrodnická klinika Fakultnej nemocnice Nitra a Univerzity Konštantína Filozofa v Nitre

Úvod

Iatrogénne poranenie čreva je závažná komplikácia abdominálnych operácií, ktorá môže spôsobiť úmrtie pacientky a forenzné dôsledky. Lézie čreva sú diagnostikované peroperačne len v polovici prípadov. Oneskorená diagnostika v pooperačnom období vedie ku vzniku sterkorálnej peritonitídy, sepsy, multiorgánového zlyhania, a nakoniec k exitu pacientky.

Incidencia iatrogénnych poranení črevnej steny sa udáva v literatúre od 0,2% do 1,6%. V gynekológii k tomu môže dôjsť pri abdominálnom, vaginálnom aj laparoskopickom operačnom prístupe. Lézia čreva vzniká v dôsledku neúmyselného pôsobenia mechanickej sily, tepelnej energie alebo ich kombinácie na stenu čreva. Viaceré štúdie potvrdili, že najčastejšie k poškodeniu čreva dochádza pri adhesiolýze a vstupe inštrumentária do dutiny brušnej pri laparoskopickom výkone (1).

Pri gynekologických výkonoch sa najčastejšie stretávame s čiastočným poškodením integrity viscerálneho peritonea. Takéto lacerácie serózovej vrstvy črevnej steny majú potenciál buď progredovať a penetrovať celú hrúbku steny čreva, alebo spontánne sa vyhojiť počas rôzne dlhého pooperačného obdobia. Termín „*enterotómia*“ alebo „*colotómia*“ sa používa v literatúre ako synonymum úplnej penetrácie črevnej steny.

Laparotómia je považovaná za zlatý štandard v prípade revízie dutiny brušnej pre podozrenie na léziu čreva pre možnosť exaktnej explorácie dutiny brušnej. Pri laparoskopických operáciách býva poranenie čreva peroperačne prehliadnuté až v 44-77% prípadov (2).

Imunitný systém citlivo reaguje na zmeny vnútorného prostredia a okamžite spúšťa kaskádu imunitných reakcií s cieľom udržať homeostázu vnútorného prostredia a reparáciu tkanív. Monitorovanie týchto biomarkerov nám môže pomôcť zachytiť perforáciu čreva vo včasnom štádiu a vyhnúť sa tak možným forenzným dôsledkom.

Materiál a metódy

Uvádzame vlastnú observačnú štúdiu zameranú na včasnú diagnostiku iatrogénnych poranení črevnej steny počas gynekologických operácií. Na Vedeckej konferencii doktorandov v roku 2020 sme prezentovali súbor pacientok z našej kliniky, ktoré podstúpili abdominálnu hysterektómiu, vaginálnu hysterektómiu a laparoskopickú vaginálnu hysterektómiu. Analyzovali sme spojitosť medzi jednotlivými rizikovými faktormi a výskytom infekčnej pooperačnej komplikácie. Snažili sme sa stanoviť najspoľahlivejší biomarker ako prediktor sekundárneho hojenia rán vplyvom infekčného agensu. Najcitlivejší zápalový marker so

Veronika Hanzelová, Mária Kubalová, Tomáš Debnár, Miloš Mlynček: Včasná diagnostika poranení črevnej steny v gynekologickej operatíve, prevencia forenzných následkov. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 110-113.

senzitivitou >61,8% a špecificitou 83,3% sa ukázal C-reaktívny proteín, ktorého elevácia bola priamo úmerná závažnosti pooperačnej komplikácii (tabuľka 1).

Nami zistené hodnoty CRP porovnávame s údajmi inými autormi. Zdôrazňujeme význam pooperačného sledovania zápalových markerov a tým včas diagnostikovať iatrogénne poškodenie črevnej steny. Výsledky využívame v klinickej praxi na našej klinike.

Tabuľka 1: Hodnoty CRP u pacientok po vaginálnej a abdominálnej hysterektómii s a bez infekčnej komplikácie

CRP						
typ	Komplikácie	Mean	N	SD	Minimum	Maximum
<u>Vag. Hyst.</u>	bez komplikácie	49,5	32	29,1	4,3	120,0
	s komplikáciou	106,3	4	32,7	70,8	137,0
	Total	55,8	36	34,2	4,3	137,0
<u>Abd. Hyst.</u>	bez komplikácie	87,9	167	42,9	9,8	224,0
	s komplikáciou	118,7	32	49,4	22,5	227,0
	Total	92,9	199	45,3	9,8	227,0

p < 0,001

p < 0,05

Diskusia

Lézia črevnej steny počas abdominálnych operácií je mimoriadne závažná komplikácia, ktorá siaha od lacerácie serózy až po kompletnú perforáciu čreva s následnou kolostómiou, čo vo veľkej miere ovplyvňuje kvalitu života pacientky. Operatér by mal detailne poznať pacientku, jej predchorobie, predchádzajúce operačné výkony v brušnej dutine, rizikové faktory, ktoré predisponujú ku vzniku lézie črevnej steny. Poškodenie môže nastať viacerými mechanizmami: neúmyselným priamym tepelným poškodením čreva chybou operátora, termickým vedením cez iný vodivý inštrument, elektrickým výbojom spôsobeným chybne naloženou izoláciou alebo mechanicky, najmä pri lýze adhézii (3).

Čím dlhší čas ubehne od operácie po diagnostikovanie problému, tým horší je dopad na zdravie pacientky.

Elbiss a Abu-Zidan zdôrazňujú, že miera úmrtnosti sa významne zvyšuje, ak je diagnostika poranenia čreva oneskorená o viac ako tri dni (4).

Symptómy poškodenia čriev sa manifestujú obvykle do 12-36 hodín od operácie, ale môžu sa vyskytnúť až o päť alebo sedem dní neskôr. Môže sa tak stať v prípade oneskorenej nekrózy pri termickom poškodení čreva, alebo vzniku perikolického abscesu, ktorý po čase spontánne perforuje. U pacientov sa môžu rozvinúť nešpecifické ťažkosti, ako sú bolesti brucha, neznášanlivosť orálneho príjmu, nadúvanie, nevoľnosť, febrilita alebo hnačka, čo môže diagnostiku oddialiť. Neskorá prezentácia symptómov má za následok sterkorálnu peritonitídu,

Veronika Hanzelová, Mária Kubalová, Tomáš Debnár, Miloš Mlynček: *Včasná diagnostika poranení črevnej steny v gynekologickej operatívnej, prevencia forenzných následkov. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 110-113.*

tvorbu abscesov, septický šok. Opakované vyšetrenie abdomenu realizované každých 4-6 hodín sú rozhodujúce pre správnu diagnostiku a následnú chirurgickú intervenciu (5,6).

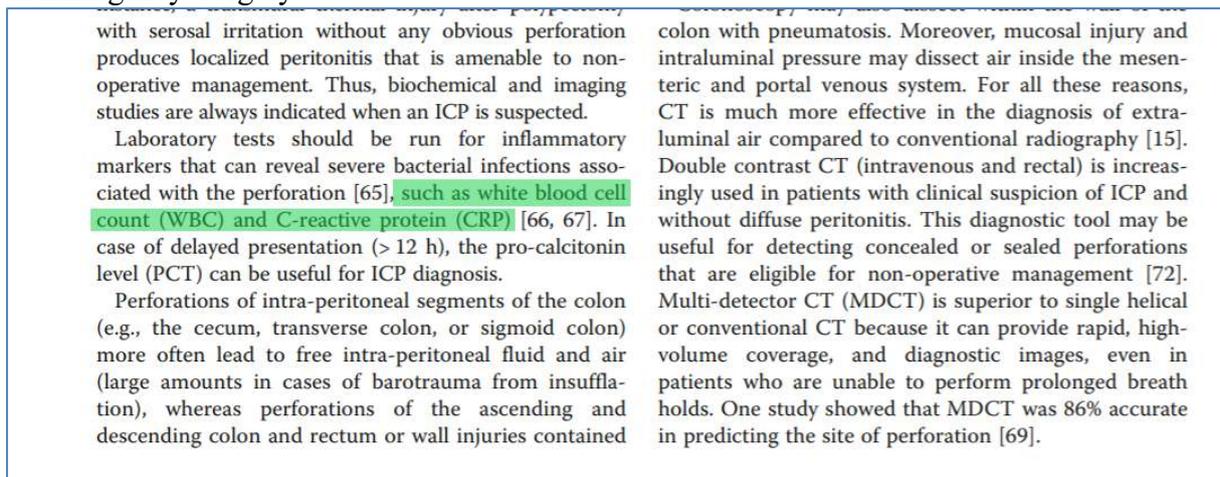
Na našej klinike monitorujeme zápalové markery u každej pacientky na 3. deň od operácie s cieľom vytipovať prípady s možnou infekčnou komplikáciou. U pacientok, ktorých CRP je vyššie ako 100, pátrame po infekčnej komplikácii sledovaním zdravotného stavu pomocou sonografických kontrol, eventuálne doplníme CT vyšetrenie. Dôležité je sledovanie dynamiky a kontrola CRP v priebehu 2-3 dní, pretože jeho hodnoty po odoznení zápalu rýchlo klesajú.

Hrozbou v prípade kompletnej perforácie hrubého čreva je rozsiahle rozliatie fekálií do dutiny brušnej, čo vedie ku sterkorálnej peritonitíde. Bakteriálny zápal je sprevádzaný eleváciou zápalových parametrov, najmä leukocytov, C-reaktívneho proteínu a prokalcitonínu.

C-reaktívny proteín je kľúčovým markerom reaktantov akútnej fázy zápalu. Hodnoty CRP medzi 100 až 500 mg/l sa považujú za významné pre dôkaz zápalu vyvolaného bakteriálnou infekciou (7).

V prezentácii poukazujeme na dve kazuistiky z našej kliniky, u ktorých bola stanovená diagnóza perforácie čreva aj na základe elevácie zápalových parametrov.

Obrázok č.1: Úryvok z medzinárodných guidelines uverejnených v roku 2017 vo World Journal of Emergency Surgery

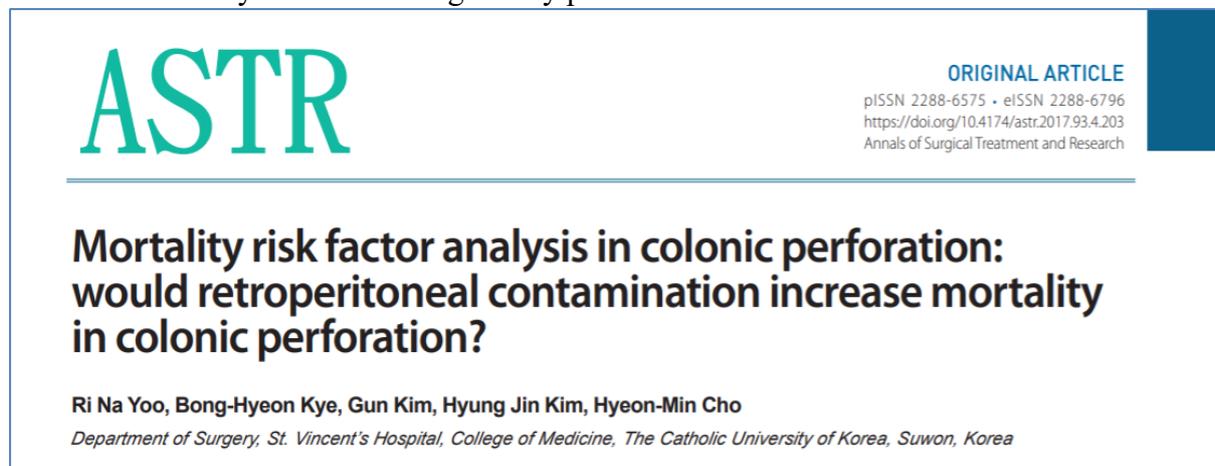


Podľa medzinárodných guidelines uverejnených vo World Journal of Emergency Surgery, naposledy aktualizovaných v roku 2017 (obrázok č.1), doporučujú monitorovanie leukocytov a C-reaktívneho proteínu pri podozrení na perforáciu čreva (8).

Ak je diagnostika perforácie oneskorená, dochádza aj k elevácii prokalcitonínu. Je považovaný za indikátor sepsy vyvolanej bakteriálnou infekciou.

Veronika Hanzelová, Mária Kubalová, Tomáš Debnár, Miloš Mlynček: Včasná diagnostika poranení črevnej steny v gynekologickej operatíve, prevencia forenzných následkov. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 110-113.

Obrázok č 2: Publikácia uverejnená z Annals of Surgical Treatment and research, vyzdvihujúca sledovanie leukocytov v rámci diagnostiky perforácie čreva



Záverom zdôrazňujeme monitorovanie jednoduchých a dostupných zápalových markerov, akými sú C-reaktívny proteín a leukocyty na 3. deň po operácii. Dokážu citlivo reagovať na bakteriálny zápal, napomôcť skorej diagnostike črevnej perforácie, znížiť tým morbiditu a mortalitu pacientky a tiež odvieť hrozbu forenzných dôsledkov.

Referencie

1. Meng-Tzung W, Lim-Woh K, Sond-Nan CH, et al.: Can bowel injury be prevented during laparoscopic surgery? A case report and literature review. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2004, 43 (4), p. 219-221.
2. Hedge CV: Management of large bowel injury during laparoscopic surgery. *J Obst Gynecol India*, 2012, 62 (5), p. 501-503.
3. Walden P, Zeybek B, Phelps JY, et al.: Understanding the legal essentials of a bowel injury lawsuit in minimally invasive gynecologic surgery. *J Min Inv Gynec*, 2017, p. 30-37.
4. Elbiss HM, Abu-Zidan F: Bowel injury following gynecological laparoscopic surgery. *African Hlth Sciences*, 2017, 17 (4), p. 1237-1245.
5. Kirby R, Arnold F, Challacombe B, et al.: Diagnosis and management of bowel injury during laparoscopic surgery. *Trends Urol Men's Hlth*, 2011, p. 18-21.
6. Mesdaghinia E, Hedayati M, Moussavi-Bioki N, et al.: Iatrogenic gastrointestinal injuries during obstetrical and gynecological operation. *Arch Trauma Res.*, 2013, 2 (2), p. 81-84.
7. Hanzelová V, Mlynček M: Iatrogenic bowel injuries during gynaecological surgery: A case report and literature review. *Surg Case Rep*, 2020, 3 (8), p. 1-4.
8. Yoo RN, Kye BH, et al.: Mortality risk factor analysis in colonic perforation: would retroperitoneal contamination increase mortality in colonic perforation? *Ann of Surgical Treatment Res.*, 2017, 93 (4), p.203-208.

24. Uterine natural killer cells in context of implantation

MUDr. Lenka Lapidés¹
(Anatomy, histology and embryology)

Tutor: prof. RNDr. Ivan Varga, PhD.¹
¹Institute of Histology and Embryology LFUK

Introduction

Infertility remains a worldwide problem with an increasing incidence. Approximately 48 million couples and 186 million individuals are effected with infertility globally (1). Recently there has been a slight stagnation in particular treatment modalities like recurrent implantation failure or recurrent abortion. More research in these fields especially in the spotlight of reproductive immunology is needed. Our research group focus on issues of uterine NK cells. The fact that approximately 20-30% of women with recurrent implantation failure, habitual abortions and preeclampsia show elevated uterine NK cells count suggest the importance of this issue (2). We would like to present in this article their significance in the embryonic implantation, uncover our preliminary results as well as discuss importance of uterine NK cell testing.

Uterine natural killer cells

Natural killer cells are one of the most important cells in human immune system. From the morphological point of view they belong to lymphocytes. We recognize two different subgroups of natural killer cells: natural killer cells in the peripheral blood and natural killer cells in the uterus so called uterine natural killer cells. Many years there was a false hypothesis, that elevated natural killer cells in the peripheral blood with its cytotoxic function have negative influence on implantation process by rejecting hemiallogenic embryo. Only recently turned this hypothesis to be false. Uterine natural killer cells (uNK cells) may have completely opposite effect on ongoing pregnancy.

uNK cells are quantitatively the most common immunologically active cells in pregnant uterus during first trimester (3). It is necessary to emphasize that the presence of uNK cells change dramatically over menstrual cycle. uNK cells are very important for regulation of the implantation and placentation by surrounding spiral arteries. They are important cytokine producers.

In our prospective study we are detecting uNK cells count, trying to identify patients where testing is profitable as well as trying to collect indispensable information, which many years have been collected not correctly. Since May 2020 until February 2021 we already tested in our ongoing research 139 patients.

Material and Methods

Endometrial samples

Endometrial samples were collected from patients with recurrent implantation failure, habitual abortions and idiopathic sterility. Patients with recurrent implantation failure (RIF) were according to ESHRE definition defined as followed - failure to implant 3 good quality embryos by patients younger than 37-years-old and failure to implant 2 embryos of good quality by patients older than 37-years-old (4). Patients with habitual abortion (HA) were defined according to ESHRE definition as patients who had 3 and more abortions during first 19 weeks

Lenka Lapedes, Ivan Varga: Uterine natural killer cells in context of implantation. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 114-118.

of pregnancy (5). Samples were collected between 19. and 21. day of the menstrual cycle with pipelle or with endometrial curettage, followed by fixation with formalin for at least 24 hours. The mean age of our study patients were 36,8 years. All patients gave written informed consent to be included in our research and our research was approved by ethical committee.

Immunohistochemical staining.

Tissue sections were examined after immunohistochemical staining. After antigen retrieval through boiling with citrate buffer were these sections stained with hematoxylin and eosin. Afterwards we used antibodies CD56 (for NK cells) visualised with immunoperoxidase staining technique using dark-brown product and granzyme B antibodies (serine protease expressing activation state of NK cells) visualised with alkaline phosphatase using red product. We used Plasma cells CD 138 staining to rule out chronic endometritis. All chemicals were from the Agilent company, USA.

Uterine cell counting and interpretation

Cells were counted manually by experienced pathologist. Results were expressed as a number of uNK cells / mm².

in Table

NK cell count reference range	
Low u NK cells	≤ 40 CD56 cells / 1 mm ² 200x
Normal	41-299 CD56 cells / 1 mm ² 200x
Elevated u NK cells	≥ 300 CD56 cells / 1 mm ² 200x

cells /
We used
references
expressed
1 (6).

Table 1: Reference range of uterine NK cells

Results

There are many studies comparing the success of histopathological diagnosis with dilatation-curettage and pipelle endometrial sampling. Many studies have proven that endometrial pipelle sampling offers high agreement of the results compared with dilatation-curettage (7,8,9,10). Many studies examined if the less invasive method through pipelle was sufficient for pathologies like abnormal uterine bleeding, sonographically abnormal endometrium or general histopathological diagnosis, though we haven't found any study comparing sampling in regard to uterine NK cells quantification evaluated through immunohistochemical staining. Therefore, we tested during the first phase of our study, if we are able to provide as well to our patients a noninvasive endometrial sampling using pipelle sampling.

From 9 patients with history of RIF or HA we obtained a histological sample (figure 1) from endometrium through curettage as well as through aspiration with pipelle. Histologically cells had late proliferative and early secretory phase changes. The average size of tissue sample obtained with pipelle was 10,27 mm² compared to sample obtained with curettage, which was in average 18,74 mm². We proved satisfactory that endometrium sample taken with pipelle provide enough sufficient representative material – 55% of curettage sample (Table 2). Average total count of CD56 / mm² were for pipelle 90,13 and 84,04 for curettage. We identified one patient with low uterine NK cells using both methods. In this cohort of patients there were no patients with higher uterine NK cells count. 8 patients showed normal uterine NK cells count using both methods. CD56 count was in 5 cases nearly identical (86-109%), other 4 cases

showed some differences, although the results belonged to the same group (normal or low) which mean the same diagnostic or therapeutic consequences. Furthermore we proved correlation of granzyme B positivity & identification of NK cells clusters.

No	Pipelle				Curettage				% Pipelle/Curettage	
	size (mm2)	CD56 / mm2	% granzyme B	clusters	size (mm2)	CD56 / mm2	% granzyme B	clusters	CD56	size
1	4.1	57.3	60	(+)	14.1	81.0	70	+	66.3	33.3
2	3	91.3	60	+	6.1	82.0	60	+	111.3	49.2
3	2.1	58.6	30	-	27.0	53.7	20	-	109.1	8.5
4	15.1	105.0	30	+	20.1	121.7	30	+	86.3	76.6
5	13.1	59.3	30	-	12.2	42.0	40	-	141.2	112.7
6	26.1	95.7	50	(+)	32.1	116.0	20	+	82.5	83.8
7	12.1	292.0	20	-	26.7	195.3	30	+	149.5	46.4
8	11.1	10.0	20	-	22.8	24.0	20	(+)	41.7	50.4
9	2.1	42.0	50	-	7.6	40.7	50	-	103.2	31.6

Table 2. Histological samples from 9 patients with history of RIF or HA obtained through curettage as well as through aspiration with pipelle. Table shows size correlation of samples and compares CD56 count between both methodes.

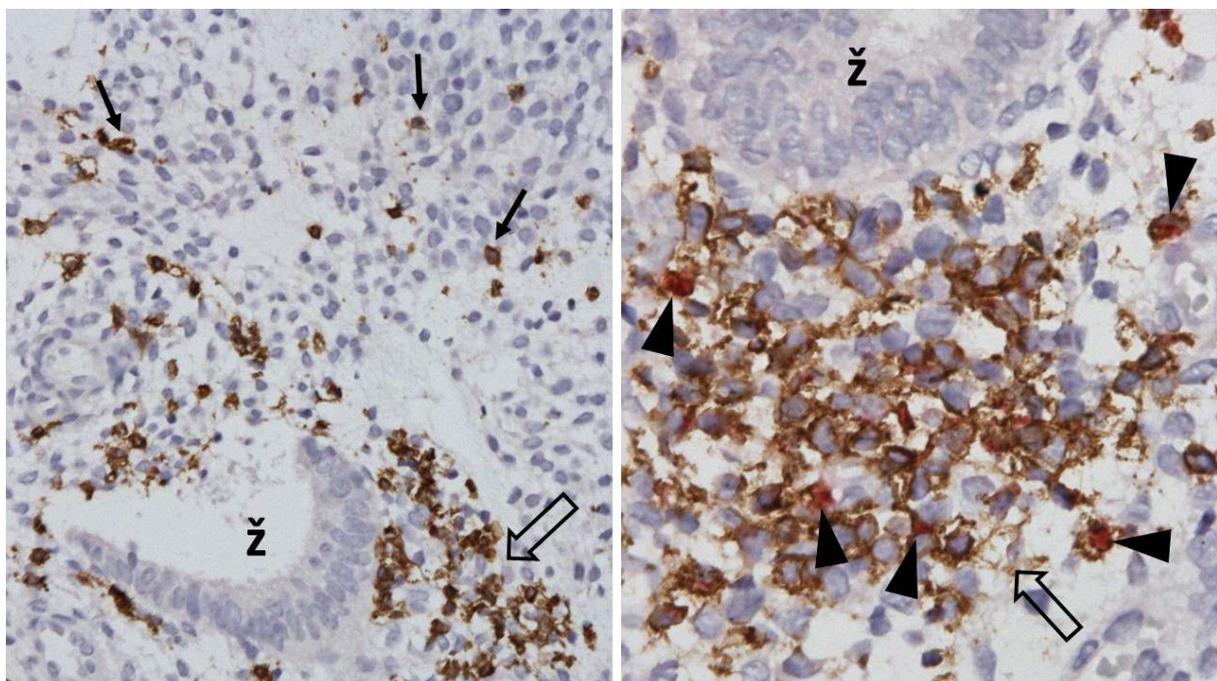


Figure 1: Endometrium collected using aspiration with pipelle. Thin arrows (→) point to sparse infiltration of uterine NK cells and big arrows (⇒) show dense accumulation of uterine NK cells. Black filled arrows (▶) on the right side points to red coloured cells stained with granzyme B. “Ž” represents endometrial glands. 200 objective on the left, 400 objective on the right.

In the second phase we continued to collect samples from altogether 112 patients with RIF, habitual abortion and 27 patients with idiopathic sterility either with curettage or with pipelle. The most of patients decided to undergo testing with less invasive method – pipelle, which was proved to be easy and useful method for obtaining adequate tissue samples evaluated with immunohistochemical staining. None of our patients was tested with the result of unsatisfactory sample. Patients with pathological (decreased or elevated) uterine NK cells are consequently followed up for further assessment of the treatment effectiveness. The most effective therapy for elevated uNK cells seems to be combination of methylprednisolon 16 mg p.o. with intralipid

Lenka Lapedes, Ivan Varga: Uterine natural killer cells in context of implantation. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 114-118.

infusions (every 2 weeks) for at least 6 weeks before planned conception. Decreased uNK cells were optimised after endometrial scratching. Other provided treatment modalities were not effective. Chronical endometritis is well treatable with Doxycyclin monotherapy. The first as well as second phase of our research is still ongoing and we will be hopefully able to publish these results soon.

Discussion

At this moment testing of NK cells is not recommended in ESHRE Guidelines (11), though it needs to be mentioned, that the latest study regarding uterine NK cells mentioned in the Guideline is from 2013. During the last 7 years from this study is still the discussion ongoing (12) and we need to await more research to reconsider future recommendations about uNK cell testing.

Meanwhile is the research focused more on NK cell testing in uterine microenvironment. The comparison of our results with diverse accessible studies regarding our topic is difficult due to diverse inclusion criterias of patients. There is need to standardize uterine NK cell testing, define divergent test approaches, such as flow cytometry and immunohistochemical evaluation, diverse biopsy methods (e.g. pipelle, lavage, curettage) need to be evaluated. Moreover it is desirable to establish exact days of the menstrual cycle, where samples will be taken. uNK cells are not the only immune cells present during implantation. We need to define exact interactions between endometrial immune cells. Following tasks still remain to be answered during ongoing research:

- How can we improve and standardise uNK cell testing.
- How to approach patients with low uNK cells and elevated uNK cells.
- Which patients tend to be therapy resistant.
- Personalise treatment, length of the treatment, dosage for patients with elevated uNK cells, finding alternatives to corticosteroids and intralipid infusions.

Treatment of patients with RIF, habitual abortion and idiopathic infertility remains challenge in the reproductive medicine. Propably the best answer is personalised medicine with standardized testing and targeted therapy recommendations. Narrow cooperation between histology, immunology, reproductive medicine and many other fields is needed to understand uterine NK cells and to develop recommendations for treatment of infertile couples. Our next steps will try to standardise uNK cell testing and to focus on different therapeutical modalities.

Supported from "Agentúra pre podporu výskumu a vývoja" APVV-18-0499

Author doesn't have any conflict of interest.

References:

1. WHO, Infertility, 14 September 2020, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
2. Kuon RJ, Weber M, Heger J, et al: Uterine natural killer cells in patients with idiopathic recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 2017 Oct;78(4).
3. Kitazawa J, Kimura F, Nakamura A, et al: Endometrial Immunity for Embryo Implantation and Pregnancy Establishment. *Tohoku J Exp Med.* 2020 Jan;250(1):49-60.
4. Bashiri A, Halper KI, Orvieto R.: Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Dec 5;16(1):121.

Lenka Lapidés, Ivan Varga: Uterine natural killer cells in context of implantation. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 114-118.

5. ESHRE Guideline Group on RPL, Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, et al: ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open*. 2018 Apr 6;2018(2).
6. Chiokadze M, Bär C, Pastuschek J, et al: Beyond Uterine Natural Killer Cell Numbers in Unexplained Recurrent Pregnancy Loss: Combined Analysis of CD45, CD56, CD16, CD57, and CD138. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Aug 29;10(9):650.
7. Piriye E, Mellin W, Römer T.: Comparison of aspirating pipettes and hysteroscopy with curettage. *Arch Gynecol Obstet*. 2020 Jun;301(6):1485-1492.
8. Abdelazim IA, Aboelezz A, Abdulkareem AF: Pipelle endometrial sampling versus conventional dilatation & curettage in patients with abnormal uterine bleeding. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2013 Mar 1;14(1):1-5.
9. Sanam M, Majid MM: Comparison the Diagnostic Value of Dilatation and Curettage Versus Endometrial Biopsy by Pipelle-a Clinical Trial. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(12):4971-5.
10. Gungorduk K, Ascioglu O, Ertas IE, et al: Comparison of the histopathological diagnoses of preoperative dilatation and curettage and Pipelle biopsy. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2014;35(5):539-43.
11. The ESHRE Guideline Group on RPL, Ruth Bender Atik, Ole Bjarne Christiansen, Janine Elson, et al: ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss, *Human Reproduction Open*, Volume 2018, Issue 2, 2018.
12. Sacks G.: Enough! Stop the arguments and get on with the science of natural killer cell testing. *Hum Reprod*. 2015 Jul;30(7):1526-31.

Alžbeta Čagalová, Ľubica Tichá, Alexandra Gaál Kovalčíková, Katarína Šebeková, Ľudmila Podracká: Kostný metabolizmus a oxidačný stres u dievčat s mentálnou anorexiou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 119-123.

25. Kostný metabolizmus a oxidačný stres u dievčat s mentálnou anorexiou

MUDr. Alžbeta Čagalová¹
(pediatria)

Spoluautori: Ľubica Tichá¹, Alexandra Gaál Kovalčíková¹, Katarína Šebeková², Ľudmila Podracká¹
Školiteľ: prof. MUDr. Ľudmila Podracká, CSc.¹

¹Detská klinika LF UK a NÚDCH Bratislava, ²Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK Bratislava

Úvod

Znížená denzita kostného minerálu je častou komplikáciou mentálnej anorexie (MA) a môže pretrvávať aj po zlepšení stravovacích návykov pacientok a dosiahnutí primeranej hmotnosti (1). Nutričná karencia, nedostatočný prísun dôležitých mikro- a makronutrientov a dlhodobé hladovanie, ktoré je jedným zo základných znakov MA, môže prispievať k tvorbe voľných kyslíkových radikálov (reactive oxygen species – ROS) (2). ROS sú nestabilné molekuly vznikajúce počas biochemických a metabolických procesov v organizme (3), ktoré sú za fyziologických podmienok odstránené antioxidantnými mechanizmami. Ak vznikne nerovnováha medzi tvorbou ROS a ich odstraňovaním antioxidantami, hovoríme o oxidačnom strese, ktorý poškodzuje všetky typy makromolekúl – lipidy, proteíny a nukleové kyseliny (4). Poškodenie makromolekúl je často prvým krokom v patofyziológii rôznych ochorení. Nedávne práce opisujú úlohu oxidačného stresu v patogeneze úbytku kostnej hmoty. Štúdie naznačujú, že ROS môže znižovať aktivitu a diferenciaciu osteoblastov a indukovať apoptózu osteocytov, čo zhoršuje mineralizáciu kostí a osteogenézu (5).

Cieľom tejto práce bolo prispieť k objasneniu vzťahu medzi oxidačným stresom a denzitou kostného minerálu (bone mineral density – BMD) u dievčat s mentálnou anorexiou analýzou základných a špecifických markerov kostného metabolizmu, oxidačného stresu a antioxidantného statusu.

Materiál a metódy

Do súboru sme zahrnuli 43 dievčat s MA s priemerným vekom 15.3 ± 1.4 hospitalizovaných na Detskej klinike LF UK a NÚDCH Bratislava v rokoch 2016 - 2020.

Pacientky sme vyšetrili v čase diagnostikovania ochorenia pred začatím realimentácie a liečby. Všetky pacientky spĺňali diagnostické kritériá reštriktívneho typu MA podľa Diagnostického a štatistického manuálu duševných porúch, 5.vydanie (6). Kontrolnú skupinu tvorilo 20 zdravých dievčat s normálnou hmotnosťou a priemerným vekom 15.7 ± 1.7 .

Exkluzívne kritéria pre obe skupiny bol iný podtyp poruchy príjmu potravy a akútne alebo chronické ochorenie, ktoré by mohlo mať vplyv na kostný metabolizmus.

U dievčat sme hodnotili vek, antropometrické údaje, index telesnej hmotnosti (BMI - body mass index), Z-skóre BMI, laboratórne parametre kostného metabolizmu v sére (kalcium, fosfor, alkalická fosfatáza - ALP, 25-OH vitamín D, parathormón, osteokalcín, C-terminálny telopeptidový fragment kolagénu typu I - CTx, aminoterminálny propeptid prokolagénu - PINP) a markery oxidačného a karbonylového stresu (produkt pokročilej oxidácie proteínov/ advanced oxidation protein products - AOPP, fluorescencia spojená s produktami pokročilej glykácie/advanced glycation end-products associated fluorescence - AGE-FI) a antioxidantného statusu (totálna antioxidantná kapacita/total antioxidant capacity - TAC, schopnosť plazmy redukovať železité ióny/Ferric reducing antioxidant power - FRAP). Duálnou röntgenovou absorpciometriou (Dual-energy X-ray absorptiometry - DXA) sme vyšetrili BMD a obsah kostného minerálu (bone mineral content - BMC) v oblasti lumbálnej chrbtice, proximálnej časti ľavého femuru ako aj celotelové meranie bez zachytenia hlavy (total body less head – TBLH).

Na štatistické vyhodnotenie sme použili štatistický softvér IBM SPSS v 23.0. Jednotlivé parametre v skupine pacientok s mentálnou anorexiou sme porovnali s kontrolnou skupinou zdravých dievčat.

Alžbeta Čagalová, Ľubica Tichá, Alexandra Gaál Kovalčíková, Katarína Šebeková, Ľudmila Podracká: Kostný metabolizmus a oxidačný stres u dievčat s mentálnou anorexiou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 119-123.

Korelačnou analýzou sme hodnotili vzťah medzi denzitou kostného minerálu a markermi oxidačného stresu.

Výsledky

Priemerný vek dievčat a výška sa medzi skupinami nelíšili (Tab. 1). Pacientky s MA mali signifikantne nižšiu telesnú hmotnosť a BMI pri diagnostikovaní ochorenia.

	Mentálna anorexia	Kontroly	<i>p</i> hodnota
Vek (rok)	15.3 ± 1.4	15.7 ± 1.7	0.34
BMI (kg/m ²)	14.5 ± 1.8	20.2 ± 1.7	< 0.001
BMI SDS	-2.3 ± 0.8	-0.2 ± 0.7	< 0.001
Výška (cm)	165.3 ± 7.2	166.6 ± 7.2	0.51
Výška SDS	0.3 ± 1.0	0.4 ± 1.0	0.91
Telesná hmotnosť (kg)	39.7 ± 6.7	56.2 ± 7.0	< 0.001
Telesná hmotnosť SDS	-1.6 ± 0.8	0.3 ± 0.7	< 0.001

Tab. 1: Klinická charakteristika pacientok s mentálnou anorexiou a zdravých kontrol

Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka

BMI: index telesnej hmotnosti, SDS: skóre štandardnej odchýlky

Hustota kostného minerálu

Pri porovnaní BMC a Z-skóre BMD v oblasti lumbálnej chrbtice sme nepozorovali rozdiel v skupine pacientok s MA a zdravých kontrol (Tab. 2). Avšak 15 probandiek v kohorte anorektičiek (34%) malo Z-skóre BMD v oblasti lumbálnej chrbtice menej ako -1 SD (skóre kompatibilné s osteopéniou dospelých), pričom štyri z nich (9%) mali nízku BMD (Z-skóre BMD ≤ -2 SD). Zaznamenali sme signifikantne nižšie hodnoty BMC ($p < 0.01$) a Z-skóre BMD ($p < 0.001$) v oblasti proximálneho femuru u pacientok s MA ako v kontrolnej skupine. Rovnako TBLH meranie preukázalo nižší BMC u anorektičiek ako u zdravých dievčat ($p < 0.01$).

	Mentálna anorexia	Kontroly	<i>p</i> hodnota
BMD Z-skóre lumbálnej chrbtice	-0.4 ± 1.2	-0.1 ± 0.7	0.17
BMC lumbálnej chrbtice (g)	50.4 (40.8–55.5)	55.8 (45.4–58.4)	0.15
BMD Z-skóre proximálneho femuru	-0.6 ± 1.1	0.4 ± 0.8	< 0.001
BMC proximálneho femuru (g)	27.6 ± 6.9	32.2 ± 4.3	< 0.01
BMD Z-skóre TBLH	-0.4 ± 1.4	0.1 ± 0.7	0.08
BMC TBLH (g)	1388 (1184–1582)	1613 (1468–1789)	< 0.01

Tab. 2: Denzita kostného minerálu u pacientok s mentálnou anorexiou a zdravých kontrol

Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka alebo ako medián a medzikvartilové rozpätie, 25. – 75. percentil (zošikmené dáta)

BMD: denzita kostného minerálu, BMC: obsah kostného minerálu

Alžbeta Čagalová, Ľubica Tichá, Alexandra Gaál Kovalčíková, Katarína Šebeková, Ľudmila Podracká: *Kostný metabolizmus a oxidačný stres u dievčat s mentálnou anorexiou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 119-123.*

	Mentálna anorexia	Kontroly	p hodnota
Kalcium (mmol/l)	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.11
Fosfor (mmol/l)	1.2 (1.1–1.3)	1.3 (1.3–1.4)	0.01
Alkalická fosfatáza (μkat/l)	0.9 (0.8–1.2)	1.3 (1.1–2.5)	< 0.001
25-OH vitamín D (ng/ml)	34.0 ± 9.1	26.9 ± 6.0	< 0.05
Osteokalcín (ng/ml)	15.8 (11.2–25.3)	48.4 (41.4–77.5)	< 0.001
CTX (ng/ml)	1.3 (0.9–1.8)	1.2 (0.8–1.6)	0.24
PINP (ng/ml)	46.4 (34.9–72.0)	140.0 (106.9–357)	< 0.001
Parahormón (ng/l)	29.5 ± 9.8	40.0 ± 12.1	< 0.05
AOPP (μmol/l)	56.6 (42.4–79.0)	24.1 (19.9–31.4)	< 0.001
AGE-FI (g/l)	2.79 (1.95–3.87)	0.76 (0.56–0.96)	< 0.001
FRAP (μmol/l)	605 ± 128	1347 ± 174	< 0.001
Celková antioxidantná kapacita (μmol/l)	341 ± 178	595 ± 25	< 0.001

Tab. 3: Markery kostného metabolizmu a oxidačného stresu u pacientok s mentálnou anorexiou a zdravých kontrol

Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka alebo ako medián a medzikvartilové rozpätie, 25. – 75. percentil (zošikmené dáta).

CTX: C-terminálny telopeptidový fragment kolagénu typu I, PINP: aminoterminálny propeptid prokolagénu, AOPP: produkt pokročilej oxidácie proteínov, AGE-FI: fluorescencia spojená s produktami pokročilej glykácie, FRAP: schopnosť plazmy redukovať železité ióny

Markery kostného metabolizmu a oxidačného stresu

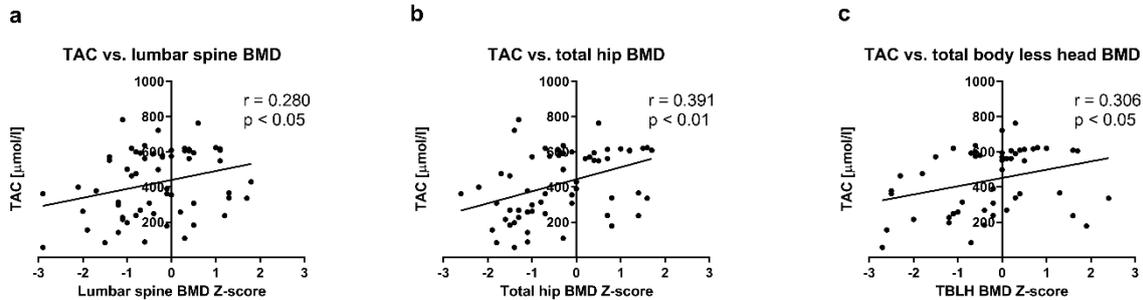
Základné parametre kostného metabolizmu, ako je vápnik, fosfor a parathormón boli v rámci referenčného rozmedzia v oboch skupinách (Tab. 3). U pacientok s MA sme zistili signifikantne nižšiu aktivitu ALP ($p < 0.001$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Zaznamenali sme však vyššiu koncentráciu vitamínu D u anorektičiek ako u zdravých dievčat. Koncentrácia markera kostnej formácie (PINP) a kostného obratu (osteokalcín) bola výrazne nižšia v skupine anorektičiek ($p < 0.001$), zatiaľ čo koncentrácia markera kostnej resorpcie (CTX) sa v sledovaných skupinách nelíšila.

Hodnoty markerov antioxidantného statusu – FRAP a TAC boli nižšie u pacientok s MA v porovnaní so zdravými dievčatami (znížené o 55% a 43%, $p < 0.001$), kým anorektičky mali plazmatickú koncentráciu AOPP a AGE-FI vyššiu (zvýšená o 57% a 73%, $p < 0.001$).

Korelačnou analýzou dát v celom súbore sme zistili pozitívnu koreláciu medzi TAC a BMD Z-skóre v oblasti lumbálnej chrbtice ($r = 0.280$, $p < 0.05$), proximálnej časti femuru ($r = 0.391$, $p < 0.01$) a TBLH ($r = 0.306$, $p < 0.05$) (obr. 1). Potvrdili sme pozitívnu závislosť medzi FRAP a BMC ($r = 0.369$, $p < 0.01$) a BMD Z-skóre v oblasti proximálnej časti femuru ($r = 0.358$, $p < 0.01$). Spearmanova analýza odhalila negatívny vzťah medzi AOPP a BMC ($\rho = -0.411$, $p < 0.01$) a BMD Z-skóre v oblasti proximálnej časti femuru ($\rho = -0.453$, $p < 0.001$) a markermi kostného obratu – s osteokalcínom ($\rho = -0.640$, $p < 0.001$) a PINP ($\rho = -0.658$, $p < 0.001$). AGEs-FI tiež negatívne korelovalo s BMD Z-skóre v

Alžbeta Čagalová, Ľubica Tichá, Alexandra Gaál Kovalčíková, Katarína Šebeková, Ľudmila Podracká: *Kostný metabolizmus a oxidačný stres u dievčat s mentálnou anorexiou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 119-123.*

oblasti proximálnej časti femuru ($\rho = -0.350$, $p < 0.01$) a osteokalcínom ($\rho = -0.702$, $p < 0.001$) či PINP ($\rho = -0.664$, $p < 0.001$). Pozorovali sme pozitívny vzťah medzi markermi antioxidačného statusu (TAC a FRAP) a osteokalcínom ($\rho = 0.693$, $p < 0.001$, $\rho = 0.542$, $p < 0.001$) a PINP ($\rho = 0.657$, $p < 0.001$, $\rho = 0.637$, $p < 0.001$).



Obr.1: Závislosť medzi celkovou antioxidačnou kapacitou a denzitou kostného minerálu
a: TAC vs BMD Z-skóre v oblasti lumbálnej chrbtice, b: TAC vs BMD Z-skóre v oblasti proximálneho femuru, c: TAC vs BMD Z-skóre TBLH

TAC: celková antioxidačná kapacita, BMD: denzita kostného minerálu, TBLH: celotelová denzita bez zachytenia hlavy

Diskusia

V prezentovanej štúdií sme preukázali, že plazmatické koncentrácie markerov antioxidačného statusu – TAC a FRAP boli signifikantne nižšie, zatiaľ čo koncentrácie AOPP a markera karbonylového stresu – AGEs boli vyššie u dievčat s MA ako u zdravých kontrol. Dokázali sme, že pacientky s MA majú zvýšené poškodenie biomolekúl oxidačným stresom a narušenú antioxidačnú obranu. Tieto výsledky sú v súlade s metaanalýzou Solmi a kol. (7) Korelačnou analýzou sme potvrdili pozitívny vzťah medzi markermi kostného obratu – osteokalcínom a PINP s markermi antioxidačného statusu a ich inverznú asociáciu s AOPP a AGEs. Naše výsledky podporujú hypotézu negatívneho vplyvu oxidačného stresu na kostný metabolizmus.

Kosť je dynamické tkanivo, v ktorom neustále dochádza k remodelácii. Táto prestavba vyžaduje koordináciu osteoklastov, ktoré sa podieľajú na resorpcii kosti a osteoblastov zabezpečujúcich osteoformáciu.

Oxidačný stres spôsobuje vznik nerovnováhy medzi osteoblastami a osteoklastami, indukuje apoptózu osteoblastov a aktiváciu osteoklastov, čím sa narušuje proces remodelácie kosti a môže dochádzať k úbytku kostnej hmoty (8). Viaceré štúdie naznačujú, že ROS zohrávajú dôležitú úlohu v procese resorpcie kosti prostredníctvom aktivácie transkripčného nukleárneho faktora κ B (NF- κ B), ktorý reguluje produkciu osteoklastogenetických cytokínov (9). V našej prierezovej štúdií, rovnako ako v práci Soyka a kol., dievčatá s mentálnou anorexiou mali znížené markery osteoformácie a kostného obratu v porovnaní so zdravými kontrolami (1).

TAC a FRAP odrážajú celkovú endogénnu a exogénnu antioxidačnú schopnosť bez potreby vyšetrovania jednotlivých antioxidantov (10, 11). V nedávno publikovanej štúdií autori uvádzajú zvýšenie TAC po zlepšení stravovacích návykov a prírastku hmotnosti u žien s MA (12). Podľa Altintag a kol. nižší antioxidačný status a zvýšený oxidačný stres môže súvisieť so znížením BMD v oblasti lumbálnej chrbtice a krčku femuru u pacientok s postmenopauzálnou osteoporózou (13). V našej kohorte anorektičky mali sérové koncentrácie TAC a FRAP signifikantne nižšie ako kontroly. Okrem toho sme preukázali pozitívnu koreláciu medzi antioxidantami a BMD ako aj markermi kostného obratu. In vitro štúdia demonštrovala, že AOPP, marker oxidácie proteínov, inhibuje proliferáciu a diferenciaciu osteoblastov prostredníctvom ROS – dependentného NF- κ B (14). U postmenopauzálnych osteoporotických žien bol AOPP zvýšený v porovnaní so zdravými ženami. Zároveň sa zistil inverzný

Alžbeta Čagalová, Ľubica Tichá, Alexandra Gaál Kovalčíková, Katarína Šebeková, Ľudmila Podracká: Kostný metabolizmus a oxidačný stres u dievčat s mentálnou anorexiou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 119-123.

vzťah medzi AOPP a BMD v oblasti lumbálnej chrbtice (15). Naše originálne výsledky potvrdili nielen vyššie plazmatické koncentrácie AOPP, ale aj negatívnu koreláciu s BMD a markermi osteoformácie. AGEs sú markerom karbonylového stresu. Ide o neenzymaticky glykované alebo glykoxidované proteíny, ktoré sa tvoria najmä na proteínoch ako napríklad kolagén. AGEs sa hromadia v matrix kostného kolagénu a narušujú štruktúru a funkciu kosti znížením jej pevnosti (16). Okrem účinkov na kolagén, môžu AGEs ovplyvňovať tiež aktivitu kostných buniek. Anorektické dievčatá z našej kohorty mali vyššie hodnoty AGE-FI v porovnaní so zdravými kontrolami, pričom AGE-FI negatívne korelovali s osteokalcínom a PINP. Tieto výsledky naznačujú, že zvýšený karbonylový stres môže prispievať k zníženiu formácie kosti.

Prezentovaná práca je prvou štúdiou, ktorá dokazuje, že adolescentné dievčatá s MA majú už v čase diagnostikovania ochorenia zníženú BMD a zmeny v kostnom metabolizme sú spojené so zvýšeným oxidačným stresom a porušenou antioxidačnou kapacitou. Znížená denzita kostného minerálu už v adolescencii je závažný nález, ktorý môže viesť k rozvoju osteoporózy a zvyšuje riziko vzniku patologických fraktúr. Naše výsledky podporujú hypotézu o patogenetickej úlohe oxidačného a karbonylového stresu v procesoch kostnej remodelácie. Na detailne objasnenie vplyvu oxidačného stresu na BMD u pacientov s MA sú potrebné ďalšie dlhodobé štúdie.

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0613/17 a MZ SR 2018/36-LFUK-10.

Zoznam použitej literatúry

1. Soyka LA, Misra M, Frenchman A, et al: Abnormal Bone Mineral Accrual in Adolescent Girls with Anorexia Nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(9): 4177–4185.
2. Moyano D, Sierra C, Brandi N, et al: Antioxidant status in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 1999; 25(1): 99–103.
3. Galli F, Piroddi M, Annetti C, et al: Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contrib Nephrol* 2005; 149: 240–260.
4. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44–84.
5. Romagnoli C, Marcucci G, Favilli F, et al: Role of GSH/GSSG redox couple in osteogenic activity and osteoclastogenic markers of human osteoblast-like SaOS-2 cells. *FEBS J* 2012; 280(3): 867–879.
6. American Psychiatry Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th edn. Arlington, American Psychiatry Association. 2013, 1-947.
7. Solmi M, Veronese N, Manzato E, et al: Oxidative stress and antioxidant levels in patients with anorexia nervosa: A systematic review and exploratory meta-analysis. *Int J Eat Disord* 2015; 48(7): 826–841.
8. Lean JM, Jagger CJ, Kirstein B, et al: Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology* 2005; 146(2): 728–735.
9. Melhus H, Michaëlsson K, Holmberg L, et al: Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture. *J Bone Miner Res* 1999; 14(1): 129–135.
10. Benzie IFF, Strain JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70–76.
11. Erel O: A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37(4): 277–285.
12. Oliveras-López MJ, Ruiz-Prieto I, Bolaños-Ríos P, et al: Antioxidant activity and nutritional status in anorexia nervosa: Effects of weight recovery. *Nutrients* 2015; 7(4): 2193–2208.
13. Altindag O, Erel O, Soran N, et al: Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int* 2008; 28: 317–321.
14. Zhong ZM, Bai L, Chen JT: Advanced oxidation protein products inhibit proliferation and differentiation of rat osteoblast-like cells via NF-κB pathway. *Cell Physiol Biochem* 2009; 24(1-2): 105–114.
15. Wu Q, Zhong ZM, Pan Y, et al: Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in postmenopausal osteoporosis. *Med Sci Monit* 2015; 21: 2428–2432.
16. Wang X, Shen X, Li X, Mauli Agrawal C: Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone* 2002; 31(1): 1–7.

Michaela Blažíčková, Katarína Kozics: Stanovenie cytotoxicity a genotoxicity nového derivátu tymolu na bunky kolorektálneho karcinómu. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 124-128.

26. Stanovenie cytotoxicity a genotoxicity nového derivátu tymolu na bunky kolorektálneho karcinómu

**Mgr. Michaela Blažíčková
(onkológia)**

Spoluautori: chemický ústav PriFUK

Školiteľ: RNDr. Katarína Kozics, PhD.
Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

Úvod

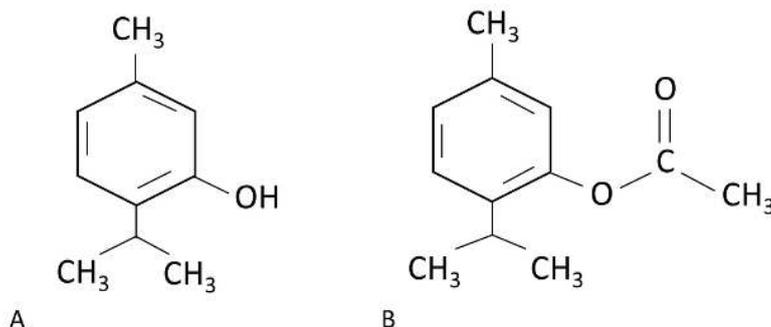
Stanovenie cytotoxicity a genotoxicity je dôležitou súčasťou hodnotenia prírodných ale i syntetických látok s potenciálnym využitím v medicíne či potravinárstve. Látka s cytotoxickým účinkom má schopnosť poškodzovať bunky, zatiaľ čo pri genotoxicite dochádza k poškodeniu samotnej DNA, čo môže viesť k rozvoju nádorových ochorení. Štandardne používanou analýzou na stanovenie cytotoxicity je metóda MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5 difenyltetrazólium bromid). Princípom metódy je zmena zlúčeniny MTT na formazán v dôsledku mitochondriálnej aktivity v životaschopných bunkách, sprevádzaná zmenou zafarbenia roztoku [1]. Metóda aplikovaná pre posúdenie genotoxicity látky bola jednobunková gélová elektroforéza (SCGE), nazývaná aj kometová analýza. Taktiež sa jedná o štandardnú metódu. Na základe migrácie nukleovej kyseliny v elektrickom poli umožňuje detekciu zlomov DNA v jednotlivých bunkách a vizualizáciu poškodenia po fluorescenčnom farbení [2].

V medicíne sú bežne využívané liečivá extrahované z prírodných látok alebo založené na prírodnej báze. Medzi takúto látku patrí aj tymol (z chemického hľadiska ide o 2-izopropyl-5-metylphenol), primárne izolovaný z rastlín čelade hluchavkovité (*Lamiaceae*), napr. z Dúšky tymianovej (*Thymus vulgaris*). Tymol sa vyznačuje mnohými terapeutickými vlastnosťami: antibakteriálnymi, antioxidantnými, antimikrobiálnymi, ale aj protinádorovými, protizápalovými a mnohými inými [3,8,10]. Jeho využitie je ale limitované jeho hydrofóbnymi vlastnosťami [3,8]. Preto bol syntetizovaný nový derivát tymolu - tymol ester kyseliny octovej s lepšou rozpustnosťou vo vode. Predpokladá sa zvýšená účinnosť prieniku látky do bunky a zvýšenie efektivity. Tento predpoklad bol overovaný na nádorovej bunkovej línii kolorektálneho karcinómu HT-29. Celosvetovo má kolorektálny karcinóm najvyššiu mieru incidencie v strednej Európe a na Slovensku, pričom je spojený aj s komplikovanou liečbou a pomerne vysokou úmrtnosťou [4].

Materiál a metódy

Tymol (obr. 1A) vo forme bielej kryštalickej látky bol komerčne zakúpený od firmy Sigma Aldrich a v našej štúdiu bol využitý ako štandard. Na chemickom ústave PriFUK bol syntetizovaný nový derivát tymolu - tymol ester kyseliny octovej (obr. 1B) procesom esterifikácie a bol čistený preparatívnu kvapalinovou chromatografiou. U oboch látok bola stanovená cytotoxicita a genotoxicita na nádorovej bunkovej línii kolorektálneho karcinómu HT-29. Táto bunková línia bola izolovaná zo 44 ročnej pacientky a zakúpená od firmy ATCC [5]. Kultivácia prebiehala v nízko glukózovom DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) médiu v termostate pri 37 °C a 5 % CO₂.

Michaela Blažíčková, Katarína Kozics: Stanovenie cytotoxicity a genotoxicity nového derivátu tymolu na bunky kolorektálneho karcinómu. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 124-128.



Obr. 1: Porovnanie chemických štruktúr použitých látok
tymol – štandard (A) a novosyntetizovaný derivát tymol ester kyseliny octovej (B)

Stanovenie cytotoxicity:

Cytotoxicita tymolu a nového derivátu sa stanovila metódou MTT. Na 96 jamkovú platničku sme nasadili $1,3 \times 10^6$ buniek a po pokryve 70-80 % povrchu jamky sme bunky ovplyvňovali po dobu 24 hodín koncentračnou škálou skúmanej látky (pre štandard v rozsahu: 15 – 150 $\mu\text{g/ml}$, derivát: 0,01-0,11 $\mu\text{g/ml}$). MTT farbička sa v koncentrácii 1 mg/ml aplikuje na bunky po dobu 3 hodín pri 37 °C. Životaschopnosť buniek závisí od mitochondriálnej aktivity a produkcie enzýmov. V aktívnych bunkách dochádza k redukcii MTT a vzniku nerozpustného formazánu. Súčasne nastáva zmena zafarbenia roztoku zo žltej na fialovú. Pridaním DMSO (dimetylsulfoxid) a umiestnením platničky na 30 minút na trepačku sa kryštály formazánu rozpustia. Potom je možné spektrofotometricky (Bio-Rad Laboratories) stanoviť hodnoty absorbancie použitím programu xMark, merané pri vlnových dĺžkach 540 a 690 nm. Následne sme pre skúmanú látku stanovili hodnotu IC_{50} , teda inhibičnú koncentráciu rastu 50 % v porovnaní s kontrolou [1].

Stanovenie genotoxicity:

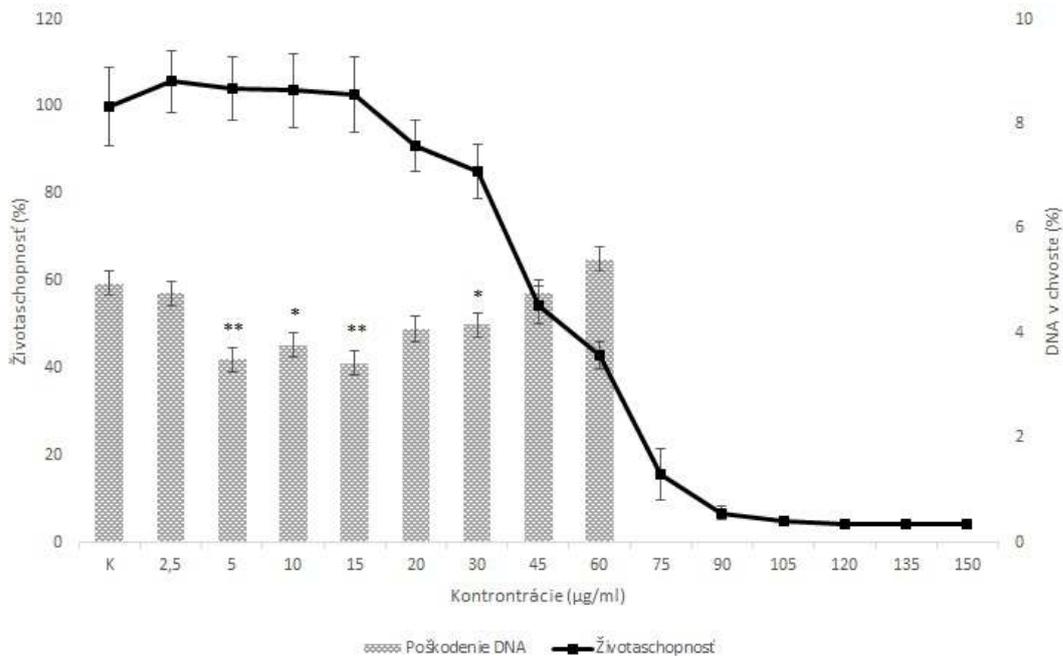
Bola použitá SCGE metóda, prostredníctvom ktorej, je možné stanoviť zlomy v DNA pre jednotlivé bunky. Na 6 jamkovú platničku sme nasadili 3×10^5 buniek a po náraste ovplyvňovali danými koncentráciami (pre štandard v rozsahu: 2,5 - 60 $\mu\text{g/ml}$, derivát: 0,02-0,09 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 24 hodín. Postup SCGE metódy bol navrhnutý Singhom a spol. [6] a upravený Gábelovou a Dušinskou [7]. Bunky sme premyli 0,25 % trypsín-PBS (pufrovaný fosfátový roztok) a centrifugovali po dobu 5 minút pri 2 500 rpm. Po fixácii buniek v 0,75 % LMP agaróze (low melting point) prebehla lýza buniek v lyzujúcom roztoku (2,5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10mM Tri-HCl pH 10, 1 % Triton X-100) 1 hodinu pri 4 °C. Sklíčka sme umiestnili do elektroforetickej aparatúry, zaliali elektroforetickým roztokom (300 mM NaOH, 1mM Na_2EDTA , pH>13) a nechali odvíjať DNA po dobu 30 minút v tme pri 4 °C. Nasledovala elektroforéza (19V, 300mA) po dobu 20 minút pri 4 °C. Sklíčka boli neutralizované roztokom 0,4 M Tris-HCl (pH =7,4) 2x10 minút a fixované v etanole 5 minút. Po vyschnutí sa aplikoval etídium brodimu (5 $\mu\text{g/ml}$). Preparáty sme hodnotili pod fluorescenčným mikroskopom Axio Imager a použitím softvéru Metafer 3.6. Ako parameter poškodenia DNA (jednovláknové zlomy DNA) sme zvolili percento DNA v chvoste kométy. V každej vzorke sa vyhodnotilo 100 buniek v troch paralelkách z troch nezávislých experimentov.

Michaela Blažíčková, Katarína Kozics: Stanovenie cytotoxicity a genotoxicity nového derivátu tymolu na bunky kolorektálneho karcinómu. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 124-128.

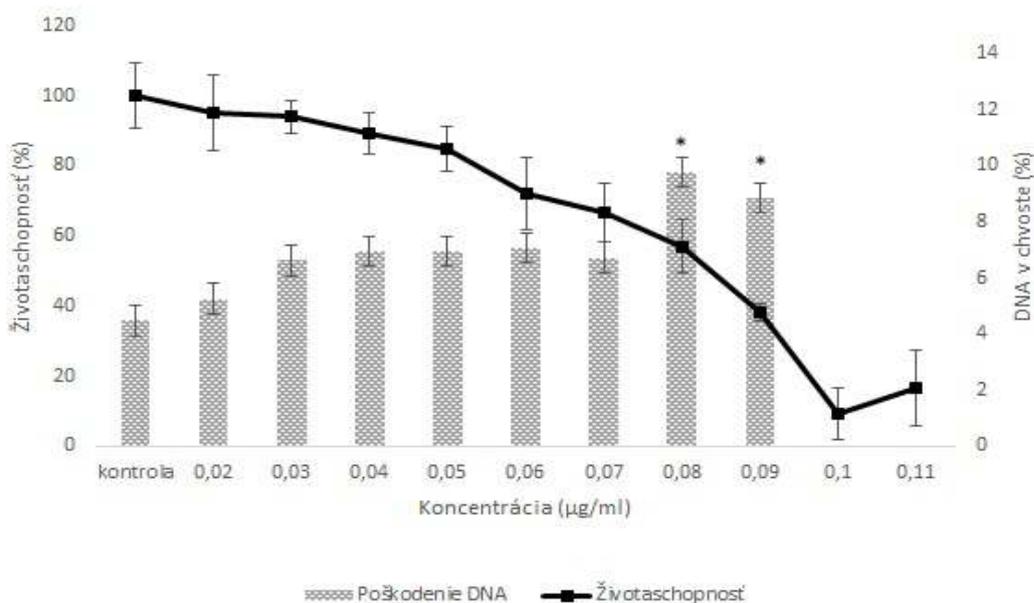
Štatistické spracovanie:

Nami získané údaje z troch nezávislých experimentov sú uvedené ako priemerné hodnoty \pm smerodajná odchýlka (sd). Signifikantné rozdiely medzi neovplyvnenými a ovplyvnenými vzorkami sme stanovili pomocou Studentovho t-testu. Štatisticky preukázané rozdiely v porovnaní s kontrolou: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Výsledky



Graf 1: Stanovenie cytotoxického a genotoxického účinku štandardu tymolu na nádorové bunky HT-29 po 24 hodinovom vplyve pre jednotlivé koncentrácie v µg/ml



Michaela Blažíčková, Katarína Kozics: Stanovenie cytotoxicity a genotoxicity nového derivátu tymolu na bunky kolorektálneho karcinómu. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 124-128.

Graf 2: Stanovenie cytotoxického a genotoxického účinku novosyntetizovaného derivátu tymolu na nádorové bunky HT-29 po 24 hodinovom vplyve pre jednotlivé koncentrácie v $\mu\text{g/ml}$

Pre stanovenie cytotoxického účinku tymolu sme zvolili koncentračnú škálu od 15 – 150 $\mu\text{g/ml}$ na základe študovanej literatúry pre bunky kolorektálneho karcinómu [8,9,10]. Pri koncentrácii 90 $\mu\text{g/ml}$ a vyššie bola mitochondriálna aktivita buniek takmer nulová. IC_{50} sme na základe výsledkov určili na 50,76 $\mu\text{g/ml}$ (graf 1). Koncentračnú škálu pre stanovenie genotoxicity sme upravili a zvolili hodnoty, ktoré neboli cytotoxické, v rozsahu 2,5-60 $\mu\text{g/ml}$. Na základe výsledkov pre genotoxicitu sme zistili, že tymol v študovaných koncentráciách nevykazuje štatisticky významné poškodenie DNA v porovnaní s kontrolou. Pri koncentráciách 5-20 $\mu\text{g/ml}$ ale dokázal štatisticky znížiť poškodenie DNA pod bazálnu hodnotu kontroly (graf 1).

V prípade novosyntetizovaného derivátu sme sa pri výbere koncentračnej škály nemohli využiť literárne zdroje. Vychádzali sme z predpokladu, že účinnosť tohoto derivátu je vyššia pri nižších koncentráciách v porovnaní so štandardom. Po predbežných testoch bola koncentračná škála stanovená na rozsah 0,01 až 0,11 $\mu\text{g/ml}$ v prípade cytotoxického hodnotenia. Najnižšie percento životaschopnosti buniek bolo pri hodnote 0,11 $\mu\text{g/ml}$ a to iba 16 %. Hodnota IC_{50} bola 0,08 $\mu\text{g/ml}$ (graf 2). Rovnako ako v prípade štandardu, aj pri stanovení genotoxicity derivátu sme na základe predchádzajúcich výsledkov upravili koncentračnú škálu. Použili sme rozsah 0,02 až 0,09 $\mu\text{g/ml}$. V kontrolnej skupine bolo priemerné poškodenie DNA 4,5 %, najvyššie sme zaznamenali pri najvyšších koncentráciách, skoro 10 %, ktoré ale vykazovali aj cytotoxicitu. Štatisticky významné merania boli pri hodnotách 0,08 a 0,09 $\mu\text{g/ml}$ s priemerným poškodením približne 9 % (graf 2).

Diskusia

Tymol napriek významným biologickým vlastnostiam má aj toxické účinky popísané v rôznych štúdiách [8,10]. Naše výsledky potvrdili cytotoxický účinok tymolu na bunkovej línii HT-29 ($\text{IC}_{50} \sim 50 \mu\text{g/ml}$). V práci od autorov Ran a Zhenzhou Chen [8] bola zistená hodnota IC_{50} pre tymol na bunky HT-29 po 24 hodinovej expozícii na približne 300 $\mu\text{g/ml}$. Podľa práce Thapa a spol. [9] bola táto hodnota približne 152 $\mu\text{g/ml}$. Rozdielne výsledky boli pravdepodobne spôsobené modifikáciou postupu, príp. použitím iných kultivačných médií a podmienok pri kultivácii nádorových buniek. Zistili sme, že pri nízkych koncentráciách tymol nevykazoval zvýšený genotoxický účinok v porovnaní s negatívnou kontrolou, čo zodpovedá výsledkom publikovaným v práci Thapa a spol. [9]. Po 24 hodinovom ovplyvnení buniek koncentráciou 62,5 $\mu\text{g/ml}$ zaznamenali 5 % poškodenie DNA, teda rovnaké ako v prípade negatívnej kontroly. Nízka rozpustnosť tymolu vo vodných roztokoch je limitujúcim faktorom jeho širšieho využitia, preto sme sa zamerali na novosyntetizovaný derivát tymolu (tymol ester kyseliny octovej), ktorý pri zachovaní biologických vlastností efektívnejšie preniká do buniek.

Výsledky analýz MTT a SCGE nám potvrdili primárny predpoklad vyššej účinnosti nového derivátu v porovnaní so štandardom, kedy na prienik do buniek a ich ovplyvnenie bola dostačujúca o tri rády nižšia koncentrácia. Nový derivát dokázal aj indukovať jednoreťazcové zlomy v DNA pri veľmi nízkej koncentrácii 0,08 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}), v porovnaní so štandardom, ktorý ani pri cytotoxickej koncentrácii 60 $\mu\text{g/ml}$ nebol genotoxický. Nový derivát teda na základe zmeny chemickej štruktúry dokáže efektívnejšie ovplyvniť nádorové bunky a preto je pre rovnaký účinok potrebná nižšia koncentrácia látky.

Michaela Blažíčková, Katarína Kozics: Stanovenie cytotoxicity a genotoxicity nového derivátu tymolu na bunky kolorektálneho karcinómu. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 124-128.

Cieľom práce bolo stanoviť cytotoxický a genotoxický účinok novosyntetizovaného derivátu tymolu na nádorové bunky kolorektálneho karcinómu a porovnať účinok so štandardnou látkou – tymolom, čo sme splnili. Výsledky našej práce dokazujú, že aplikácia nových derivátov tymolu má svoje opodstatnenie pri ovplyvňovaní nádorových buniek kolorektálneho karcinómu. Ďalšie výsledky by mohli priniesť nové možnosti pri prevencii a liečbe tohto ochorenia.

Táto práca vznikla za podpory grantu z Vedeckej grantovej agentúry SAV VEGA 2-0055-20.

Zoznam použitej literatúry

1. Van Meerloo, J, Kaspers GJ, Cloos J: Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cancer cell culture. Humana Press 2011; 237-245.
2. Fairbairn DW, Peggy LO, O'Neill KL: The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology 1995; 339.1: 37-59.
3. Meeran NMF, Javed H, Al Tae H, Azimullah S, Ojha SK: Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. Frontiers in pharmacology 2017; 8: 380.
4. Safiri S, Sepanlou SG, Ikuta KS a spol.: The global, regional, and national burden of colorectal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. The lancet Gastroenterology & hepatology 2019; 4.12: 913-933.
5. Inernetový zdroj: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx?geo_country=sk [12.4.2021]
6. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental cell research 1988; 175.1: 184-191.
7. Gabelova A, Dusinska M: Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica. Státní ústav v Praze 2003; 3: 43-59.
8. Ran LV, Zhenzhou Chen: Thymol inhibits cell migration and invasion by downregulating the activation of PI3K/AKT and ERK pathways in human colon cancer cells. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2017; 16.12 : 2895-2901.
9. Thapa D, Richardson AJ, Zweifel B, Wallace RJ, Gratz SW: Genoprotective effects of essential oil compounds against oxidative and methylated DNA damage in human colon cancer cells. Journal of food science 2019; 84.7: 1979-1985.
10. Spisni E, Petrocelli G, Imbesi V, a spol. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Microbial-Modulating Activities of Essential Oils: Implications in Colonic Pathophysiology. International Journal of Molecular Sciences 2020; 21.11: 4152.

Žofia Szapuová, Katarína Janšáková, Ivan Belica, Hana Celušáková: *Objektívne a subjektívne hodnotenie pasívneho fajčenia detí s poruchami autistického spektra. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 129-133.*

27. Objektívne a subjektívne hodnotenie pasívneho fajčenia detí s poruchami autistického spektra

Mgr. Žofia Szapuová
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Mgr. Katarína Janšáková, PhD; Mgr. Ivan Belica; Mgr. Hana Celušáková, PhD.

Školiteľka: Prof. MUDr. Daniela Ostatníková, PhD.
Fyziologický ústav LF UK, Bratislava

Úvod

Porucha autistického spektra (PAS) je neurovývinová porucha vyznačujúca sa pervazívnymi ťažkosťami prítomnými od raného detstva. Autizmus je charakteristický deficitmi v sociálnej interakcii a komunikácii a prítomnosťou úzko vymedzených, repetitívnych a stereotypných vzorcov správania (1). Prevalencia PAS v súčasnosti vykazuje stúpajúcu tendenciu, posledná štúdia z USA udáva pomer 1:54 (2)

Priamy tabakový dym aj pasívny dym (tzv. environmentálny tabakový dym – environmental tobacco smoke, ETS) sú komplexné zmesi zahrňajúce tisíce chemikálií, ktoré predstavujú toxické zaťaženie s podozrením na rôzne dopady na neurovývin (3). V posledných rokoch intenzívne vzrástol záujem o výskum vplyvu pasívneho fajčenia na mentálne zdravie jedincov. Výsledky viacerých štúdií naznačujú asociáciu medzi pasívnym fajčením a psychickými poruchami (4–7). Metaanalýza z roku 2013 (8) ukazuje, že postnatálne vystavenie pasívnemu fajčeniu je asociované s horšími školskými výsledkami a slabším kognitívnym výkonom starších detí a adolescentov, taktiež sa zistilo spojenie medzi pasívnym fajčením a neurovývinovým oneskorením.

Jedným z možných dôvodov vyššie spomínaných javov je účinok nikotínu na nikotínové acetylcholínové receptory. Expozícia nikotínom indukuje štrukturálne a synaptické zmeny vo vyvíjajúcom sa mozgu a tieto zmeny môžu pretrvať aj v neskoršom živote.(9). Ďalším možným mechanizmom účinku nikotínu je zmena v dopaminergickom systéme. Bandiera a kol. (4) predpokladajú, že tak ako pri dlhodobom aktívnom fajčení, aj pasívne fajčenie môže viesť k zníženiu dostupnosti dopamínových receptorov. Napriek viacerým výskumom o vystavení environmentálnemu tabakovému dymu (ETS) v ranom veku a jeho neurovývinovými dopadmi u zdravej detskej populácie (9–13), relatívne málo štúdií sa venuje tomuto vzťahu v populácií s PAS, navyše aj závery niekoľkých existujúcich štúdií sú nejednoznačné (14–17). Jedným dôvodom nekonzistentnosti záverov môže byť aj použitie rozličných metód hodnotenia expozície ETS.

Expozíciu tabakovému dymu možno merať subjektívnymi a objektívnymi metódami. Vzhľadom na to, že subjektívne hodnotenie, teda výpovede rodičov o svojich fajčiarskych návykoch, nemusia byť vždy spoľahlivé (18), je potrebné použiť aj objektívne meranie na určenie miery vystavenia. Kotinín je hlavným metabolitom nikotínu a je najvhodnejším objektívnym markerom na meranie pasívnej expozície tabakovému dymu (19–21). Zároveň je najpoužívanejším biomarkerom pri rozlíšení aktívnych a pasívnych fajčiarov (22). Približne 80 - 85% nikotínu sa metabolizuje v pečeni a pomocou enzýmov sa konvertuje na kotinín (20).

V našej štúdií, na zistenie rozsahu pasívneho fajčenia detí s autizmom, sme použili oba prístupy. Cieľom našej štúdie bolo skúmanie zhody medzi subjektívnym a objektívnym hodnotením ETS u detí s PAS.

Metódy

Žofia Szapuová, Katarína Janšáková, Ivan Belica, Hana Celušáková: Objektívne a subjektívne hodnotenie pasívneho fajčenia detí s poruchami autistického spektra. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 129-133.

Výskumný súbor tvorilo 33 detí s PAS. Priemerný vek participantov bol 4,95 roka ($\pm 1,73$ SD). Prítomnosť poruchy autistického spektra dieťaťa sme hodnotili pomocou diagnostického interview na autizmus (ADI-R), diagnostickej škály pre autizmus (ADOS-2). Objektívnym ukazovateľom vystavenia ETS bol kotinín. Kotinín v moči sme merali použitím súpravy ELISA (Enzyme Linked Immunesorbant Assay) podľa inštrukcii výrobcu. Subjektívnym ukazovateľom vystavenia boli odpovede rodičov na nami vytvorený dotazník (Dotazník miery vystavenia dieťaťa environmentálnemu tabakovému dymu), ktorý je zameraný na detekciu fajčiarskych návykov rodičov, na výskyt fajčenia v domácnosti a na možný výskyt vystavenia dieťaťa pasívnemu fajčeniu. Získané dáta boli spracované a analyzované pomocou štatistického programu SPSS Statistical Package for Social Science (SPSS) version 25 (International Business Machines Corp., New Orchard Road, Armonk, New York, USA). Zhodu medzi dvoma metódami sme hodnotili pomocou kappa štatistiky, senzitivity, špecificity, pozitívnej a negatívnej predpovednej hodnoty. Na zistenie závislosti medzi premennými sme použili Spearmanov korelačný koeficient.

Výsledky

Tabuľka č. 1 Zhoda medzi subjektívnym hodnotením expozície detí pasívnemu fajčeniu na základe výpovedí rodičov a objektivizáciou presným stanovením hladiny kotinínu v moči

Kotinín vs. ETS	
Miera zhody	Spolu
Kappa	0,613
Spearmanove korelácie	0,616
Senzitivita	70,59
Špecificita	89,29
Predpovedná hodnota pozitívna	87,05
Predpovedná hodnota negatívna	74,85
Diagnostická presnosť	82,22

Na základe kappa štatistiky sme zistili významnú zhodu medzi dvoma ukazovateľmi pasívneho fajčenia. Identifikovali sme vysokú mieru senzitivity a špecificity a diagnostickej presnosti.

Tabuľka č. 2 Korelácie medzi hladinou kotinínu a parametrami dotazníka expozície ETS

		Kotinín ng/ml
Vystavenie ETS	r	,684**
	p	0,000
Fajčenie matky v súčasnosti	r	,397*
	p	0,022
Fajčenie otca v súčasnosti	r	,644**
	p	0,000
Koľko cigariet sa v domácnosti vyfajčí	r	,638**
	p	0,000
Ako často je dieťa vystavené ETS	r	0,228
	p	0,202
Fajčenie v domácnosti	r	,648**
	p	0,000

r – korelačný koeficient; p – p-hodnota (sig.(2-tailed)); * <0,05; ** <0,01

Žofia Szapuová, Katarína Janšáková, Ivan Belica, Hana Celušáková: Objektívne a subjektívne hodnotenie pasívneho fajčenia detí s poruchami autistického spektra. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 129-133.

Korelačné analýzy poukázali na štatisticky signifikantné pozitívne korelácie medzi hladinou kotinínu a výpoveďami rodičov o miere vystavenia pasívnemu fajčeniu dieťaťa. Nepozorovali sme významný vzťah medzi častotou vystavenia ETS a hladinou kotinínu.

Diskusia a záver

Validitu subjektívneho hodnotenia vystavenia detí pasívnemu fajčeniu sme určili pomocou kappa štatistiky, senzitivity, špecificity, predpovednej hodnoty pozitívnej a negatívnej. Koeficient kappa predstavuje percentuálnu zhodu medzi subjektívnym hodnotením rodičov vystavenia pasívnemu fajčeniu ich detí a presným laboratórnym stanovením hladiny kotinínu v moči u exponovaných, pričom sa berie do úvahy zhoda náhodou. Predpovedná hodnota pozitívna (PV+) je pravdepodobnosť, že testovaná osoba má naozaj ochorenie v prípade pozitívneho testu. V našom prípade ide o percento tých detí, ktorých rodičia udávajú expozíciu pasívnemu fajčeniu a majú to objektivizované hladinou kotinínu v moči. Predpovedná hodnota negatívna (PV-) je pravdepodobnosť, že testovaná osoba naozaj nemá ochorenie v prípade pozitívneho testu. V našom prípade ide o percento tých detí, ktorých rodičia neudávajú expozíciu pasívnemu fajčeniu a majú to objektivizované nízkou hladinou kotinínu v moči. Senzitivita predstavuje pravdepodobnosť pozitívneho testovania, ak je choroba naozaj prítomná. Špecificita je pravdepodobnosť negatívneho testovania, ak choroba naozaj nie je prítomná. Tieto ukazovatele vzájomne spolu súvisia a ukazujú úroveň validity skrínového testu. Koeficient kappa predstavuje percentuálnu zhodu medzi subjektívnym hodnotením rodičov vystavenia pasívnemu fajčeniu ich detí a presným laboratórnym stanovením hladiny kotinínu v moči u exponovaných ak sa berie do úvahy zhoda náhodou. Koeficient kappa (0,613) v našom prípade prekračuje požadovanú hranicu, môžeme preto povedať, že medzi dvoma použitými metódami je významná zhoda (23).

Zistili sme štatisticky významné pozitívne korelácie medzi objektívnym a subjektívnymi ukazovateľmi vystavením ETS. Hladina kotinínu v moči signifikantne korelovala s vystavením ETS podľa výpovede rodičov, taktiež s fajčením otca alebo matky, tiež s fajčením v domácnosti. Metaanalýza z roku 2020 (17), zameraná na vzťah medzi pasívnym fajčením detí a PAS, zistila, že doposiaľ jediná štúdia (14) stanovovala vystavenie pasívnemu fajčeniu aj objektívnou aj subjektívnou metódou, všetky ďalšie štúdie použili len subjektívnu, teda dotazníkovú metódu. Kim a kol. (14) sa venovali vzťahu medzi hladinou kotinínu a prejavmi ADHD a PAS. Ich výsledky naznačujú, že vyššia hladina kotinínu v moči je spojená s horšou schopnosťou adaptácie a so slabším výsledkom v teste kognitívnych funkcií. Na základe svojich výsledkov autori tvrdia, že pasívne fajčenie má negatívny efekt na manifestáciu symptomatiky PAS aj ADHD.

Naše výsledky poukazujú na významnú zhodu medzi subjektívnymi a objektívnymi ukazovateľmi vystavenia pasívnemu fajčeniu detí s PAS. Naše zistenia tiež poukazujú na dôležitosť merania expozície ETS prostredníctvom merania hladiny kotinínu. V ďalších štúdiách by bolo potrebné hlbšie skúmať vzťah medzi pasívnym fajčením a behaviorálnymi prejavmi detí s PAS.

Podporené grantom APVV-15- 0045 a APVV-15- 85.

Zoznam použitej literatúry

1. Lord C, Brugha TS, Charman T, Cusack J, Dumas G, Frazier T, et al. Autism spectrum disorder. *Nature Reviews Disease Primers*. 16. január 2020;6(1):1–23.
2. Centers for Diseases Control. Autism Prevalence Rises in Communities Monitored by CDC | CDC Online Newsroom | CDC [Internet]. 2020 [cit 04. apríl 2021]. Available at: <https://www.cdc.gov/media/releases/2020/p0326-autism-prevalence-rises.html>
3. Kalkbrenner AE, Schmidt RJ, Penlesky AC. Environmental Chemical Exposures and Autism Spectrum Disorders: A Review of the Epidemiological Evidence. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. 01. november 2014;44(10):277–318.

Žofia Szapuová, Katarína Janšáková, Ivan Belica, Hana Celušáková: *Objektívne a subjektívne hodnotenie pasívneho fajčenia detí s poruchami autistického spektra. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 129-133.*

4. Bandiera FC. What are candidate biobehavioral mechanisms underlying the association between secondhand smoke exposure and mental health? *Med Hypotheses*. december 2011;77(6):1009–10.
5. Tiesler CMT, Chen C-M, Sausenthaler S, Herbarth O, Lehmann I, Schaaf B, et al. Passive smoking and behavioural problems in children: Results from the LISApplus prospective birth cohort study. *Environmental Research*. 01. november 2011;111(8):1173–9.
6. Padrón A, Galán I, García-Esquinas E, Fernández E, Ballbè M, Rodríguez-Artalejo F. Exposure to secondhand smoke in the home and mental health in children: a population-based study. *Tobacco Control*. 01. máj 2016;25(3):307–12.
7. Padrón A, Galán I, Rodríguez-Artalejo F. Second-hand smoke exposure and psychological distress in adolescents. A population-based study. *Tobacco Control*. 01. júl 2014;23(4):302–7.
8. Chen R, Clifford A, Lang L, Anstey KJ. Is exposure to secondhand smoke associated with cognitive parameters of children and adolescents?-a systematic literature review. *Annals of Epidemiology*. 01. október 2013;23(10):652–61.
9. Jung Y, Hsieh LS, Lee AM, Zhou Z, Coman D, Heath CJ, et al. An epigenetic mechanism mediates developmental nicotine effects on neuronal structure and behavior. *Nature Neuroscience*. júl 2016;19(7):905–14.
10. Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacology & Therapeutics*. 01. máj 2009;122(2):125–39.
11. Yolton K, Dietrich K, Auinger P, Lanphear BP, Hornung R. Exposure to Environmental Tobacco Smoke and Cognitive Abilities among U.S. Children and Adolescents. *Environ Health Perspect*. január 2005;113(1):98–103.
12. Mohamed NN, Loy SL, Lim PY, Al Mamun A, Jan Mohamed HJ. Early life secondhand smoke exposure assessed by hair nicotine biomarker may reduce children's neurodevelopment at 2years of age. *Science of The Total Environment*. 01. január 2018;610–611:147–53.
13. Chastang J, Baiz N, Cadwallader JS, Robert S, Dwyer J, Charpin DA, et al. Postnatal Environmental Tobacco Smoke Exposure Related to Behavioral Problems in Children. *PLOS ONE*. 05. august 2015;10(8):e0133604.
14. Kim KM, Lim MH, Kwon H-J, Yoo S-J, Kim E, Kim JW, et al. Associations between urinary cotinine and symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *Environmental Research*. 01. október 2018;166:481–6.
15. Khalil et al. Secondhand smoke exposure is associated with autism spectrum disorder in US males but not in females: Results from the National Survey on Children's Health [Internet]. 2018 [cit 30. marec 2021]. Available at: <https://www.environmentmed.org/article.asp?issn=2468-5690;year=2018;volume=3;issue=1;spage=8;epage=17;aulast=Khalil>
16. Larsson M, Weiss B, Janson S, Sundell J, Bornehag C-G. Associations between indoor environmental factors and parental-reported autistic spectrum disorders in children 6-8 years of age. *Neurotoxicology*. september 2009;30(5):822–31.
17. Abd Majid MS, Johani F, Mohamed NE, Diyana S, isa Z. Secondhand Smoke Exposure and Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *Sains Malaysiana*. 01. júl 2020;49:1615–25.
18. Al-Sayed EM, Ibrahim KS. Second-hand tobacco smoke and children. *Toxicol Ind Health*. august 2014;30(7):635–44.
19. Roberts C, Wagler G, Carr MM. Environmental Tobacco Smoke: Public Perception of Risks of Exposing Children to Second- and Third-Hand Tobacco Smoke. *Journal of Pediatric Health Care*. 01. január 2017;31(1):e7–13.

Žofia Szapuová, Katarína Janšáková, Ivan Belica, Hana Celušáková: Objektívne a subjektívne hodnotenie pasívneho fajčenia detí s poruchami autistického spektra. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 129-133.

20. Moran VE. Cotinine: Beyond that Expected, More than a Biomarker of Tobacco Consumption. *Front Pharmacol* [Internet]. 10. október 2012 [cit 05. jún 2019];3. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3467453/>
21. Kim S. Overview of Cotinine Cutoff Values for Smoking Status Classification. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. december 2016 [cit 02. november 2018];13(12). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5201377/>
22. Raja M, Garg A, Yadav P, Jha K, Handa S. Diagnostic Methods for Detection of Cotinine Level in Tobacco Users: A Review. *J Clin Diagn Res.* marec 2016;10(3):ZE04–6.
23. Rosner BA. *Fundamentals of Biostatistics*. Duxbury; 2000. 824 s.

Tomáš Jasenovec, Dominika Radošinská, Peter Bališ, Angelika Puzserová, Martin Škrátek, Ján Manka, Iveta Bernátová, Jana Radošinská: Účinok ultra malých superparamagnetických nanočastíc oxidu železitého na erythrocyty normotenzných a hypertenzných potkanov. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 134-138.

28. Účinok ultra malých superparamagnetických nanočastíc oxidu železitého na erythrocyty normotenzných a hypertenzných potkanov

MUDr. Tomáš Jasenovec¹

Spoluautori: Jana Radošinská^{1,2}, Dominika Radošinská³, Peter Bališ⁴, Angelika Puzserová⁴, Martin Škrátek⁵, Ján Manka⁵, Iveta Bernátová⁴
Školiteľ: Jana Radošinská^{1,2}

Úvod

Hlavnou úlohou erythrocytov je zabezpečiť transport dýchacích plynov z pľúc do tkanív a naopak. Erythrocyty musia preto opakovane prechádzať cievnym systémom vrátane kapilár s priemerom menším ako je priemer erythrocytov, preto musia byť schopné opakovane meniť svoj tvar. Túto schopnosť nazývame deformabilita erythrocytov. Je ovplyvnená mnohými faktormi, ako napríklad homeostázou iónov, či produkciou oxidu dusnatého (NO) erythrocytmi (1). Erythrocyty obsahujú vlastnú syntázu NO, čím môžu významne prispievať k celkovému množstvu NO v krvi a podieľať sa na regulácii perfúzie tkanív (2).

Spontánne hypertenzné potkany (SHR) sa používajú ako model ľudskej esenciálnej hypertenzie a v experimentoch najčastejšie porovnávajú s kontrolnými Wistar-Kyoto potkanmi (WKY). Mechanizmy zapojené do vývoja hypertenzie ovplyvňujú rôzne tkanivá, ako aj erythrocyty. SHR majú oproti WKY vyšší počet erythrocytov, hematokrit, agregabilitu erythrocytov, viskozitu plazmy a zníženú deformabilitu erythrocytov (3-5).

Superparamagnetické nanočastice oxidu železitého (SPION) sú považované za biokompatibilné a netoxické nanočastice. Používajú pri zobrazovaní magnetickou rezonanciou, magnetickej hypertermii, fototermálnej terapii alebo transporte liekov (6). Existujú však obavy, že ich podávanie by za určitých okolností mohlo viesť k poškodeniu buniek. Toxicita nanočastíc závisí od ich dávky a typu, a je možné ju znížiť použitím vhodného biokompatibilného obalu. SPION sa zvyknú obalovať silikónom, dextránom, citrátom alebo polyetylén glykolom (PEG). PEG je stabilný hydrofilný polymér používaný v klinickej praxi (6).

Po podaní sú nanočastice transportované krvným obehom, takže je možná ich interakcia s erythrocytmi. V štúdií sme študovali funkčné vlastnosti erythrocytov - deformabilitu, produkciu NO a osmotickú rezistenciu po podaní PEGylovaných ultra-malých SPION (USPION) v dvoch experimentoch: 1. účinok jednorazového akútneho, a 2. opakovaného podávania USPION, ako aj na potenciálne odlišný účinok USPION na erythrocyty normotenzných a hypertenzných potkanov.

Metódy

Dizajn experimentu

V experimente sme použili 12-16 týždňové WKY a SHR, ktorým sme podávali komerčne dostupné PEGylované USPION (Sigma-Aldrich). USPION/ fyziologický roztok sme podávali infúznou pumpou cez jugulárny katéter. Uskutočnili sme dve série experimentov. V prvej sérii mali potkany zavedený aj katéter na a. carotis pre odber krvi, vzorky boli odobrané pred podaním USPION a 100 minút po podaní (1mg Fe/kg).

V druhej sérii sme USPION podávali v dvoch po sebe nasledujúcich dňoch (2mg Fe/kg/deň). Trunkálnu krv sme odoberali 24 hodín po druhej dávke USPION do heparinizovaných skúmaviek.

Deformabilita erythrocytov

Tomáš Jasenovec, Dominika Radošinská, Peter Bališ, Angelika Puzserová, Martin Škrátek, Ján Manka, Iveta Bernátová, Jana Radošinská: Účinok ultra malých superparamagnetických nanočastíc oxidu železitého na erythrocyty normotenzných a hypertenzných potkanov. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 134-138.

Premyté erythrocyty sme nariadili roztokom Cellpack a následne centrifugovali cez filter s pórmí s veľkosťou 5 μm . Deformabilita predstavuje podiel erythrocytov, ktoré počas 5 minút prešli centrifugačným filtrom.

Produkcia NO erythrocytmi

NO sme vizualizovali pomocou fluorescenčnej sondy 4,5-diaminofluoresceín diacetát (DAF-2DA. Po 10-minútovej inkubácii v tme (koncentrácia DAF-2DA 25 $\mu\text{mol/l}$) sme pomocou fluorescenčného mikroskopu a fluorescenčného filtra FITC vyhotovili snímky a fluorescenciu kvantifikovali programom Image J.

Osmotická rezistencia erythrocytov

Premyté erythrocyty sme napipetovali do roztokov s rôznymi koncentraciami NaCl (0,9 - 0,1 %). Po 30 minútach inkubácie sme suspenzie centrifugovali, a v supernatante sme spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 540 nm odmerali koncentráciu hemoglobínu uvoľneného z hemolyzovaných erythrocytov. Interpoláciou získaných údajov sme stanovili IC50 - koncentráciu NaCl, pri ktorej nastala 50% hemolýza.

Stanovenie plazmatickej koncentrácie železa a množstva železa v erythrocytoch pochádzajúceho z USPION

Koncentrácia železa v plazme experimentálnych zvierat bola stanovená v akreditovanom laboratóriu Laboklin s.r.o. Množstvo železa v erythrocytoch, ktoré pochádzalo z USPION bolo stanovené metódou SQUID biomagnetometrie v spolupráci s Ústavom merania SAV (7).

Štatistické spracovanie

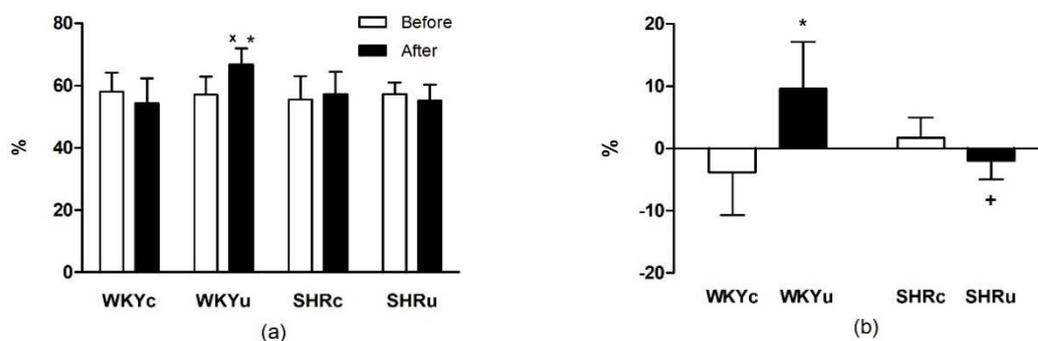
Dáta sú prezentované ako priemer \pm smerodajná odchýlka (SD). Na štatistickú analýzu sme použili dvojcestnú ANOVU pre opakované merania v Experimente 1 a dvojcestnú ANOVU (pre nezávislé faktory kmeň potkanov a intervencia USPION) v Experimente 2, s následných Bonferroniho post-hoc testom, respektíve Tukeyho testom mnohonásobného porovnávania. Výsledky boli považované za signifikantne rozdielne pri $p < 0,05$. Použili sme programy Statistica v13.5 a GraphPad Prism v7.02.

Výsledky

Experiment 1 – Efekt akútneho podania USPION

Deformabilita erythrocytov

Pozorovali sme významné zvýšenie deformability erythrocytov u WKY po podaní USPION oproti deformabilite stanovenej pred intervenciou v tejto skupine ($p < 0,01$), ako aj v porovnaní s kontrolnými WKY, ktoré dostali len infúziu fyziologického roztoku ($p < 0,05$). Takéto zmeny sme nepozorovali u SHR (Obrázok 1a). Rozdiely v deformabilite erythrocytov pred a po podaní USPION sú výsledky prezentované na Obrázku 1b.



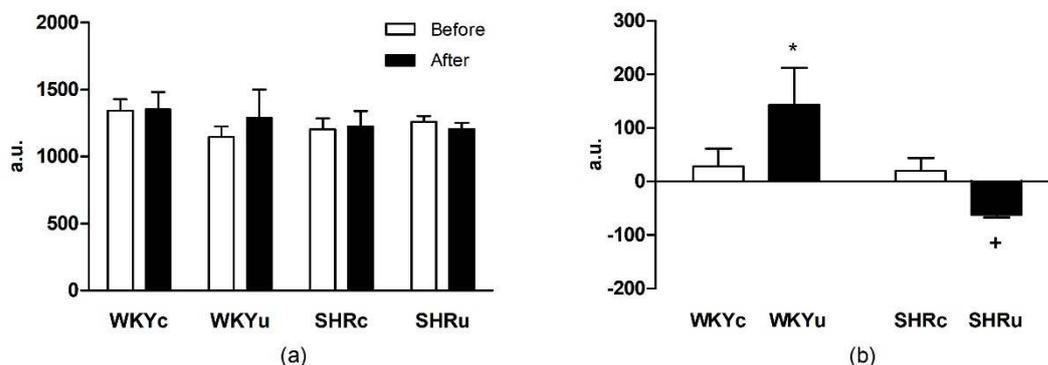
Obrázok 1. Deformabilita erythrocytov pred a po jednorazovom podaní USPION v dávke 1 mg Fe/ kg telesnej

Tomáš Jasenovec, Dominika Radošinská, Peter Bališ, Angelika Puzserová, Martin Škrátek, Ján Manka, Iveta Bernátová, Jana Radošinská: Účinok ultra malých superparamagnetických nanočastíc oxidu železitého na erytrocyty normotenzných a hypertenzných potkanov. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 134-138.

hmotnosti (1a) a rozdiel v deformabilite erytrocytov pred a po podaní USPIONs (1b). * $p < 0,05$ vs. WKYc, * $p < 0,05$ vs. WKYu pred podaním USPION, + $p < 0,05$ vs. WKYu

Produkcia NO erytrocytmi

Vyhodnotením produkcie NO erytrocytmi pomocou dvojcestnej ANOVA pre opakované merania sme nepreukázali signifikantný rozdiel medzi skupinami pred a po liečbe (Obrázok 2a). Avšak odhalili sme signifikantné zvýšenie produkcie NO u USPION-liečených WKY v porovnaní s USPION-liečenými SHR potkanmi (obrázok 2b, $p < 0,05$).



Obrázok 2. Produkcia oxidu dusnatého erytrocytmi pred a po jednorazovom podaní USPION v dávke 1 mg Fe/kg telesnej hmotnosti (2a) a rozdiel v produkcii oxidu dusnatého erytrocytmi po podaní USPION a pred (2b). * $p < 0,05$ oproti WKYc, + $p < 0,05$ oproti WKYu.

Celkový obsah železa v plazme a obsah železa pochádzajúci z USPION v erytrocytoch

Podávanie USPION sa ukázal ako významný faktor na celkový obsah železa v plazme ($p < 0,05$), s vyššími hodnotami u potkanov ktorým boli USPION aplikované. Obsah železa pochádzajúci z USPION vo frakcii erytrocytov bol signifikantne nižší pri SHR v porovnaní s WKY ($p < 0,05$).

Experiment 2

Deformabilita erytrocytov

V druhom experimente - pri opakovanom podaní USPION, sa ako významný faktor ukázal kmeň ($p < 0,05$). WKY mali vyššiu deformabilitu erytrocytov ako SHR (obrázok 4a). Významná bola aj interakcia kmeňa s intervenciou ($p < 0,05$). Deformabilita erytrocytov bola po opakovanom podaní USPION vyššia u USPION-liečených WKY ako u USPION-liečených SHR ($p < 0,05$, obrázok 4a).

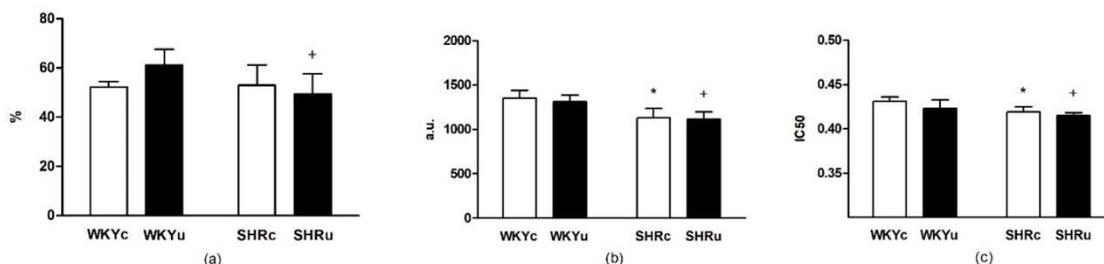
Produkcia NO erytrocytmi

Pri opakovanom podávaní USPION zohráva kmeň úlohu významného faktora pre tvorbu NO ($p < 0,0001$). WKY mali významne vyššie hladiny NO v erytrocytoch ako SHR ($p < 0,0001$, Obrázok 4b).

Osmotická rezistencia erytrocytov

Pri osmotickej rezistencii sa ako významný faktor ukázal kmeň ($p < 0,001$) pričom erytrocyty SHR boli viac rezistentné voči hypotonickému prostrediu ako erytrocyty WKY ($p < 0,005$). Intervencia je taktiež významným faktorom ($p < 0,05$), podávanie USPIONs viedlo k zvýšeniu osmotickej rezistencie ($p < 0,05$, obrázok 4c).

Tomáš Jaseňovec, Dominika Radošinská, Peter Bališ, Angelika Puzserová, Martin Škrátek, Ján Manka, Iveta Bernátová, Jana Radošinská: Účinok ultra malých superparamagnetických nanočastíc oxidu železitého na erytrocyty normotenzných a hypertenzných potkanov. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 134-138.



Obrázok 4. Účinok opakovaného podávania USPIONs v dávke 2 mg Fe/kg telesnej hmotnosti za deň na vlastnosti erytrocytov: deformabilita (4a), produkcia oxidu dusnatého (4b) a osmotická rezistencia (4c). Potkany boli usmrtené približne 24 hodín po druhom podaní USPIONs. * $p < 0,05$ oproti WKYc, + $p < 0,05$ oproti WKYu.

Celkový obsah železa v plazme a obsah železa pochádzajúci z USPION v erytrocytoch

Medzi skupinami sme nepozorovali zmeny v plazmatickej koncentrácii železa. Hladina železa pochádzajúceho z USPION bola u WKY vyššia ako u SHR ($p < 0,01$)

Diskusia

V našej štúdii sme sa zamerali na vplyv jednorazového a opakovaného podania USPION na funkčné vlastnosti erytrocytov u WKY ako aj u ich spontánne hypertenzného ekvivalentu (SHR). Naše výsledky ukázali, že PEGylované Fe_3O_4 nanočastice nezhoršili deformabilitu erytrocytov po jednorazovom ani opakovanom podaní USPION. Po jednorazovom podaní USPION nastalo u WKY dokonca zvýšenie deformability erytrocytov. Tento efekt sme však nepozorovali u SHR. Rozdiel v deformabilite erytrocytov bol u SHR po podaní USPION v oboch experimentoch významne nižší ako u WKY liečených USPION. Predpokladáme, že zvýšenie deformability erytrocytov je u WKY po podaní USPION len prechodné a reaktívne. V prípade SHR nie je takáto reakcia pozorovateľná pre možné vyčerpanie rezerv erytrocytov. Spolu so zlepšenou deformabilitou erytrocytov sa po jednorazovom podaní USPION u WKY zvýšila aj produkcia NO. Predpokladáme teda, že zmeny v deformabilite erytrocytov môžu byť prinajmenšom čiastočne dôsledkom zvýšenej produkcie NO. Produkcia NO sa v erytrocytoch nezmenila po opakovanom podaní USPION, čo by mohlo byť výsledkom toho, že množstvo USPION v erytrocytoch bolo 24 hodín po ich podaní významne nižšie. Celkový obsah železa v plazme bol totiž zvýšený len u potkanov v 1. experimente, čo naznačuje elimináciu USPION z plazmy v 2. experimente.

Pomocou SQUID biomagnetometrie na stanovenie železa pochádzajúceho z USPION sme v erytrocytoch detegovali významne nižšie množstvo železa u SHR v porovnaní s WKY v oboch experimentálnych prístupoch. Tieto zistenia môžu poukazovať na vyššiu elimináciu nanočastíc z erytrocytov u SHR, alebo na zníženie interakcie PEGylovaných USPION s erytrocytovými membránami u SHR.

V našej štúdii opakované podanie USPION zlepšilo osmotickú rezistenciu erytrocytov nezávisle od kmeňa potkanov. Erytrocyty u SHR vykazovali vyššiu rezistenciu na hypoosmotický stres ako erytrocyty WKY. U ľudí bol pritom pozorovaný opak - osmotická rezistencia erytrocytov bola u pacientov s esenciálnou hypertenziou horšia ako u normotenzných jedincov, čo ale nebolo pozorované u pacientov so sekundárnou hypertenziou (8,9).

Záver

Naša štúdia priniesla originálne výsledky týkajúce sa účinku jednorazového a opakovaného podávania USPION na vlastnosti erytrocytov za podmienok normálneho a vysokého krvného tlaku u potkanov. U WKY sa po podaní USPION deformabilita erytrocytov zvýšila, a ani v jednom z experimentálnych prístupov sme nepozorovali nežiaduce účinky po podaní týchto nanočastíc. Tiež sme zistili zvýšenú

Tomáš Jasenovec, Dominika Radošinská, Peter Bališ, Angelika Puzserová, Martin Škrátek, Ján Manka, Iveta Bernátová, Jana Radošinská: Účinok ultra malých superparamagnetických nanočastíc oxidu železitého na erythrocyty normotenzných a hypertenzných potkanov. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 134-138.

produkcii NO erythrocytmi po jednorazovej infúzii USPIO u WKY. Nižšia akumulácia USPIO v erythrocytoch hypertenzných potkanov môže byť relevantná pre klinickú prax v prípade hypertonikov podrobujúcich sa klinickému vyšetreniu s použitím nanočastíc oxidu železitého.

Podporené grantmi APVV-16-0263, VEGA 2/0160/17, 2/0157/21, a 1/0193/21.

Zoznam 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; S43–S54.
2. Cortese-Krott MM, Kelm M: Endothelial Nitric Oxide Synthase in Red Blood Cells: Key to a New Erythrocrine Function? *Redox Biol.* 2014; 2: 251–258.
3. Fukuda S, Tsuchikura S, Iida H: Age-Related Changes in Blood Pressure, Hematological Values, Concentrations of Serum Biochemical Constituents and Weights of Organs in the SHR/Izm, SHRSP/Izm and WKY/Izm. *Exp. Anim.* 2004; 53: 67–72.
4. Lominadze D, Joshua IG, Schuschke DA: Increased Erythrocyte Aggregation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am. J. Hypertens.* 1998; 11: 784–789.
5. Ariyoshi K, Maruyama T, Odashiro K, Akashi K, Fujino T, Uyesaka N: Impaired Erythrocyte Filterability of Spontaneously Hypertensive Rats: Investigation by Nickel Filtration Technique. *Circ. J.* 2010; 74: 129–136. [CrossRef]
6. Yu M, Huang S, Yu KJ, Clyne AM: Dextran and Polymer Polyethylene Glycol (PEG) Coating Reduce Both 5 and 30 Nm Iron Oxide Nanoparticle Cytotoxicity in 2D and 3D Cell Culture. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 5554–5570.
7. Škrátek M, Dvurečenskij A, Kluknavský M, Barta A, Bališ P, Mičurová A, Cigáň A, Eckstein-Andicsová A, Maňka J, Bernátová I: Sensitive SQUID Bio-Magnetometry for Determination and Differentiation of Biogenic Iron and Iron Oxide Nanoparticles in the Biological Samples. *Nanomaterials* 2020; 10: 1993.
8. Tsuda K, Minatogawa Y, Nishio I, Masuyama Y: Increased Osmotic Fragility of Erythrocytes in Essential Hypertension. *Clin. Exp. Hypertens. A* 1984; 6: 2235–2247.
9. Fasanmade AA: Erythrocyte Osmotic Fragility in Hypertension and during Diuretic Therapy. *West. Afr. J. Med.* 1999; 18: 183–186

Verona Buociková, Svetlana Miklíková, Miroslava Matúšková, Marína Cihová, Alena Gábelová, Martina Labudová, Lucia Csáderová, Aiva Plotniece, Karlis Pajuste, Martins Rucins, Arkadij Sobolev, Božena Smolková: Účinok lipozomálneho doxorubicínu zacieleného prostredníctvom folátového receptora na triple-negatívne nádorové bunky karcinómu prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 139-144.

29. Účinok lipozomálneho doxorubicínu zacieleného prostredníctvom folátového receptora na triple-negatívne nádorové bunky karcinómu prsníka

Mgr. Verona Buociková¹
(onkológia)

Spoluautori: Svetlana Miklíková¹, Miroslava Matúšková¹, Marína Cihová¹, Alena Gábelová¹, Martina Labudová², Lucia Csáderová², Aiva Plotniece³, Karlis Pajuste³, Martins Rucins³, Arkadij Sobolev³

Školiteľ: Mgr. Božena Smolková, PhD. ¹

¹ Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, Bratislava, ² Virologický ústav BMC SAV, Bratislava
³ Latvian Institute of Organic Synthesis, Riga, Lotyšsko

Úvod

Pokrok v oblasti nanotechnológií umožnil vývoj širokej škály biokompatibilných a nízko-imunogénnych organických a anorganických nanomateriálov, určených na transport protinádorových liečiv priamo do nádorového tkaniva (napr. lipozómy, dendriméry, micely, nanogély, nanomateriály na báze kovov). V rámci liečby nádorových ochorení bolo doteraz úspešne študovaných a následne zavedených do klinickej praxe niekoľko nanoformulácií, pričom mnohé ďalšie prechádzajú klinickými skúškami. Zabalenie terapeutických agensov do nanonosičov zabraňuje ich rýchlemu klírensu a degradácii, čím sa zároveň predlžuje ich polčas v cirkulácii, zvyšuje rozpustnosť, či stabilita a znižuje toxicita (1). Jedinečné fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. veľkosť, tvar, náboj) umožňujú akumuláciu nanonosičov v nádorovom tkanive v dôsledku efektu zvýšenej permeability a retencie (EPR efekt), ktorý je základom pasívneho zacielenia. Funkčné povrchové modifikácie nanonosičov pomocou špecifických ligandov (protilátky, aptaméry, proteíny atď.) s vysokou afinitou ku konkrétnym receptorom nadmerne exprimovaným na nádorových bunkách, umožňujú cieleň transport liečiv, čím môžu zvýšiť účinnosť liečby a znížiť vedľajšie účinky (2).

Karcinóm prsníka je najčastejším nádorovým ochorením u žien na svete a predstavuje jednu z hlavných príčin úmrtnosti žien na onkologické ochorenie. Inovatívne liečebné postupy a multidisciplinárny prístup významne prispeli k zlepšeniu účinnosti moderných terapeutických režimov (3). Vážne vedľajšie účinky, získaná rezistencia na liečbu, či heterogenita nádorov sú stále pretrvávajúcimi výzvami, ktoré je potrebné prekonať zavedením nových liečebných stratégií.

Cieľom našej práce bolo stanovenie terapeutической účinnosti lipozomálneho prototypu nanonosiča na myšacích xenograftoch karcinómu prsníka *in vivo*. Na aktívne cieleň sme využili molekulu folátu, pričom sme vychádzali z poznatku, že zvýšená expresia folátového receptora bola preukázaná na viacerých typoch nádorových buniek. Efekt enkapsulácie chemoterapeutického agensu doxorubicínu (DOX) do lipozomálneho nanonosiča sme chceli porovnať s jeho komerčne dostupnou lipozomálnou formuláciou Caelyx® (CX), ktorá sa v klinickej praxi využíva na liečbu metastatického karcinómu prsníka. Nanoformulácie bežných, ale aj experimentálnych liečiv by mohli prispieť k zvýšeniu účinnosti a zlepšeniu zacielenia terapie u pacientov s karcinómom prsníka.

Verona Buociková, Svetlana Miklíková, Miroslava Matúšková, Marína Cihová, Alena Gábelová, Martina Labudová, Lucia Csáderová, Aiva Plotniece, Karlis Pajuste, Martins Rucins, Arkadij Sobolev, Božena Smolková: Účinok lipozomálneho doxorubicínu zacieleného prostredníctvom folátového receptora na triple-negatívne nádorové bunky karcinómu prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 139-144.

Materiál a metódy

Kultivácia buniek: Bunková línia MDA-MB-231 (ATCC®: HTB-26™), izolovaná z pleurálneho výpotku pacientov s adenokarcinómom prsníka, a nenádorová epiteliálna prsníková bunková línia MCF 10A (ATCC®: CRL-10317™) boli zakúpené z uvedených zdrojov. MDA-MB-231 bunková línia predstavuje ťažko liečiteľný, triple-negatívny, molekulárny subtyp karcinómu prsníka. Nádorové bunky boli udržiavané v médiu DMEM (PAN Biotech, Nemecko) s vysokým obsahom glukózy (4,5 g/l), doplnenom 10% fetálnym hovädzím sérom (FBS, Biochrom AG, Nemecko), 2 mM glutamínom (PAA Laboratories GmbH, Rakúsko) a 10 µg/ml gentamicínom (Sandoz, Nemecko). Nenádorová línia MCF 10A bola kultivovaná vo vysokoglukózovom médiu DMEM:Ham's F12 1:1 (PAN Biotech), s pridaním 5% FBS (Biochrom AG), 20 ng/ml EGF (Miltenyi Biotec, Nemecko), 0.5 µg/ml hydrokortizónu (Sigma-Aldrich, Nemecko), 100 ng/ml cholera toxínu (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml inzulínu (Sigma-Aldrich) a 10 µg/ml gentamicínu (Sandoz).

Expresia folátového receptora: RNA bola izolovaná z 1×10^6 buniek pomocou NucleoSpin™ RNA kitu (Macherey-Nagel GmbH, Nemecko). Na prepis do cDNA bol použitý RT² First Strand Kit (Qiagen, Nemecko). Na normalizáciu bol použitý gén *HPRT1*. Kvantitatívna PCR (qPCR) reakcia prebiehala v Bio-Rad CFX96 Real-Time prístroji. Hodnoty Ct boli následne použité na relatívnu kvantifikáciu expresie génu pomocou softvéru REST, pričom expresia *FOLR1* v nádorových bunkách MDA-MB-231 bola normalizovaná k expresii *FOLR1* v nenádorovej línii MCF 10A.

Lipozomálny prototyp nanonosiča (Lipo) bol syntetizovaný z nasledovných komponentov:
 DOPC – 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholín (stabilita častíc)
 DOPE – 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamín (zvýšenie účinnosti transfekcie)
 Brij58 – polyetylén glykol hexadecyl éter (PEGylácia častíc)
 CHEMS – cholesteryl hemisukcinát (pH-senzitívny komponent)
 SiR – fluorescenčný SiR-značený 1,4-DHP derivát (vizualizácia častíc)
 DSPE-PEG-folát – 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamín-N-[folát(polyetylén glykol)-2000] amónna soľ (cielený transport).

Tab. 1: Základné charakteristiky lipozomálnych prototypov

Nanočastica	Koncentrácia lipidu	Koncentrácia DOX	Z-average (nm)	Index polydisperzity (PDI)
Lipo	2.5 mM	---	74.3±0.4	0.220
Lipo-DOX	1.37 mM	0.152 mg/ml	339.6±4.0	0.127

Nanočastice Lipo a Lipo-DOX boli rozpustené v 10 mM HEPES-0.9% NaCl pufri, pH=7.4. Komerčne dostupný lipozomálny pegylovaný DOX, Caelyx® (Janssen-Cilag NV, Belgicko), obsahoval účinnú látku DOX v koncentrácii 2 mg/ml.

Prietoková cytometria: Pri určovaní schopnosti vychytávať lipozomálne častice v *in vitro* podmienkach sme bunky ovplyvňovali 2 hod jednotlivými lipozomálnymi formuláciami (Lipo, Lipo-DOX, CX). Vzorky boli následne analyzované pomocou BD Canto II Cytometer (Becton Dickinson, USA) a FCS Express softvéru. SiR-pozitívne bunky sme detegovali v APC spektre a DOX-pozitívne bunky v PE spektre.

Verona Buociková, Svetlana Miklíková, Miroslava Matúšková, Marína Cihová, Alena Gábelová, Martina Labudová, Lucia Csáderová, Aiva Plotniece, Karlis Pajuste, Martins Rucins, Arkadij Sobolev, Božena Smolková: Účinok lipozomálneho doxorubicínu zacieleného prostredníctvom folátového receptora na triple-negatívne nádorové bunky karcinómu prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 139-144.

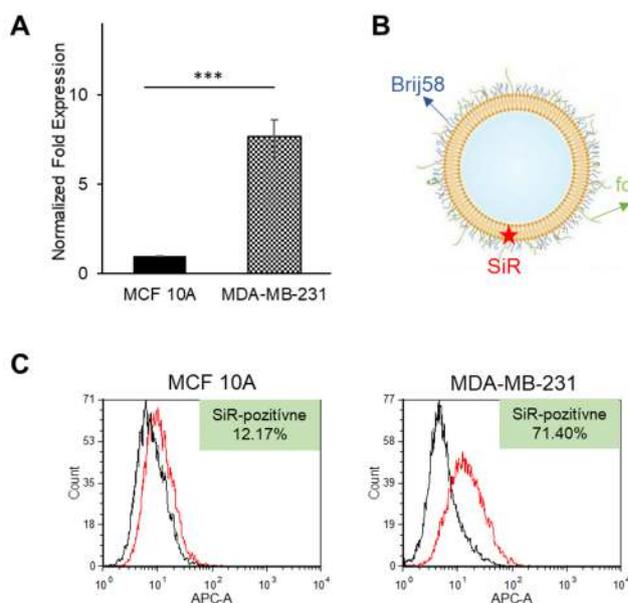
In vivo štúdia: Šesť až osem-týždňovým SCID/beige myšiam (SCID/bg, Charles River, Nemecko) sme ortotopicky do prsnej žľazy injikovali 1.5×10^6 MDA-MB-231 buniek v 100 μ l bezsérového média DMEM, zriedeného 1:1 ECM gélom. Na 15. deň sme myši rozdelili do 3 skupín podľa aplikovanej lipozomálnej formulácie (Lipo, Lipo-DOX, CX). Terapia komerčným CX bola pritom považovaná za pozitívnu kontrolu k liečbe Lipo-DOX. Lipo častice boli zriedené v pomere 1:0.8 v 10 mM HEPES-0.9% NaCl pufrí, CX do finálnej koncentrácie 1.27 mg/kg telesnej váhy vo fyziologickom roztoku. Častice Lipo-DOX sa podávali nezriedené v koncentrácii 1.27 mg/kg telesnej váhy. Všetky lipozomálne formulácie boli podávané intravenózne do očného sínusu v objeme 150 μ l každý druhý deň, spolu 6 dávok. Počas celého experimentu boli nádory premeriavané a ich objem sme vypočítali na základe nasledujúceho vzorca: objem nádoru (mm^3) = $0,52 \times ((\text{šírka} + \text{dĺžka}) / 2)^3$. Na 36. deň boli všetky myši utratené a nádory vizualizované pomocou systému IVIS Spectrum CT® (In Vivo Imaging System, PerkinElmer). V SiR spektre sme mohli pozorovať akumuláciu Lipo a Lipo-DOX nanočastíc v nádoroch a v DOX spektre Lipo-DOX a CX nanočastíc.

Štatistická analýza:

Rozdiely medzi dvoma skupinami boli hodnotené Student t-testom. Pre porovnanie rozdielov rastových kriviek sme použili analýzu rozptylu (ANOVA) pre opakované merania. Za štatisticky významné boli považované výsledky s $p < 0.05$. Hodnoty expresie *FOLR1* boli analyzované metódou relatívnej kvantifikácie. Na vyhodnotenie štatistickej významnosti rozdielov bol použitý program REST (Qiagen).

Výsledky

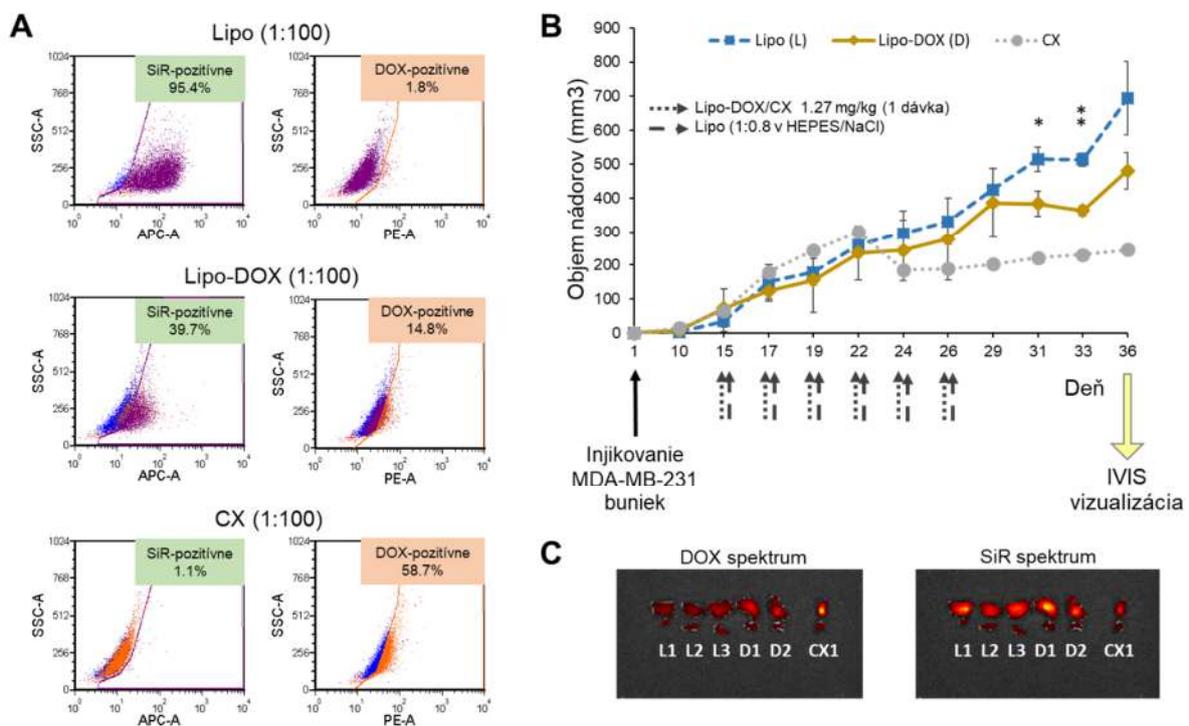
Použitím qPCR sme dokázali, že expresia génu *FOLR1* bola u bunkovej línie MDA-MB-231 7,7 krát vyššia v porovnaní s nenádorovou bunkovou líniou MCF 10A ($p < 0.001$) (Obr. 1A). Preto bol lipozomálny nosič dekorovaný folátom na zacielenie prostredníctvom folátového receptora (Obr. 1B). Takto upravený nosič bol vychytávaný vo väčšej miere nádorovou bunkovou líniou MDA-MB-231 (Obr. 1C). V prípade MCF 10A obsahovalo Lipo časticu (SiR-pozitívne bunky) po 2-hodinovej expozícii 12.17% buniek, pričom u nádorovej bunkovej línie to bolo až 71.40% buniek.



Obr. 1: Cieleny transport prostredníctvom folátového receptora. A - Relatívna génová expresia folátového receptora v MDA-MB-231 bunkovej líni karcinómu prsníka voči nenádorovej líni buniek epitelu prsníka MCF 10A; B - Grafické zobrazenie fluorescenčne značeného (SiR) lipozomálneho prototypu nanonosiča s cieľiacou molekulou folátu a Brij58 ako PEGylačného agensu na povrchu; C - Detekcia vychytávania lipozomálneho nanonosiča (SiR-pozitívne bunky) nenádorovou líniou MCF 10A a nádorovou bunkovou líniou MDA-MB-231 po 2-hodinovej expozícii, použitím prietokovej cytometrie.

Verona Buociková, Svetlana Miklíková, Miroslava Matúšková, Marína Cihová, Alena Gábelová, Martina Labudová, Lucia Csáderová, Aiva Plotniece, Karlis Pajuste, Martins Rucins, Arkadij Sobolev, Božena Smolková: Účinok lipozomálneho doxorubicínu zacieleného prostredníctvom folátového receptora na triple-negatívne nádorové bunky karcinómu prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 139-144.

Pomocou prietokovej cytometrie sme zistili aj rozdiely vo vychytávaní nanočastíc Lipo a Lipo-DOX bunkami MDA-MB-231. Prázdny nanonosič Lipo bol vychytávaný bunkami efektívnejšie (95.4% SiR-pozitívnych buniek) v porovnaní s lipozómom po enkapsulovaní DOX (39.7% SiR-pozitívnych buniek) (Obr. 2A). Svoju úlohu pritom mohla zohrávať veľkosť častíc, ktorá bola pre časticu Lipo 74.3 ± 0.4 nm a pre Lipo-DOX až 339.6 ± 4.0 nm. Takisto sme porovnali prítomnosť DOX v bunkách MDA-MB-231 po ovplyvnení Lipo-DOX a CX (Obr. 2A). Tento terapeutický agens vykazuje prirodzenú fluorescenciu s emisným signálom pri 595 nm a excitáciou pri 480 nm. Iba 14.8% buniek preukázalo DOX-pozitivitu po ovplyvnení Lipo-DOX, oproti 58.7% buniek po ovplyvnení komerčným CX pri rovnakom zriedení nanočastíc 1:100.



Obr. 2: Cieľový transport doxorubicínu (DOX) prostredníctvom nanonosiča *in vitro* a *in vivo*. A – Účinnosť vychytávania prázdneho nanonosiča (Lipo), enkapsulovaného doxorubicínu (Lipo-DOX) a komerčne dostupného lipozomálneho doxorubicínu (CX) nádorovými bunkami MDA-MB-231 po 2-hodinovej expozícii. Lipozomálne prototypy Lipo a Lipo-DOX obsahujú vizualizačné fluorescenčné farbivo SiR. Vzorky všetkých lipozómov boli zriedené 1:100. SiR-pozitívne bunky boli detegované prietokovou cytometriou v APC spektre, DOX-pozitívne bunky v PE spektre. B - Zhodnotenie účinnosti lipozomálnych prototypov (Lipo, Lipo-DOX) a lipozomálneho doxorubicínu CX v podmienkach *in vivo*, na základe merania objemu nádorov. Xenografty boli vytvorené jednostranným injikovaním MDA-MB-231 nádorových buniek ortotopicky do prsnej žľazy. Terapeutický režim je zobrazený šípkami. Hviezdičky znázorňujú rozdiel medzi Lipo a Lipo-DOX, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. C – Detekcia výskytu jednotlivých nanoformulácií v nádorových xenograftoch na konci experimentu pomocou IVIS Spectrum CT® zobrazovacieho systému (L1/L2/L3 - Lipo, D1/D2 - Lipo-DOX, CX1 - CX).

Terapeutický efekt Lipo-DOX sme následne pozorovali *in vivo* na imunodeficientnom modeli SCID/bg myši, ktorým sme jednostranne ortotopicky injikovali MDA-MB-231 bunky. Aplikácia prázdneho nanonosiča Lipo nevykazovala v kontrolnej skupine myši toxicitu.

Verona Buociková, Svetlana Miklíková, Miroslava Matúšková, Marína Cihová, Alena Gábelová, Martina Labudová, Lucia Csáderová, Aiva Plotniece, Karlis Pajuste, Martins Rucins, Arkadij Sobolev, Božena Smolková: Účinok lipozomálneho doxorubicínu zacieleného prostredníctvom folátového receptora na triple-negatívne nádorové bunky karcinómu prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 139-144.

Kumulatívna dávka Lipo-DOX a CX bola po 11-tich dňoch liečby 7.62 mg/kg telesnej váhy. Pozorovali sme zmenšenie objemu nádorov v skupine liečenej Lipo-DOX oproti skupine, ktorej sme podávali Lipo nosič, ale rozdiel medzi priebehom rastových kriviek nedosiahol štatistickú významnosť (Obr. 2B). V prípade pozitívnej kontroly liečenej CX sme pozorovali najintenzívnejšie zmenšenie objemu nádoru, napriek absencii cieľiaceho ligandu na povrchu nanočastíc. 10 dní po podaní poslednej dávky lipozómov sme jednotlivé tumory analyzovali pomocou IVIS Spectrum CT® systému na prítomnosť Lipo a Lipo-DOX nanočastíc, využitím SiR fluorescencie. Hodnotili sme tiež prítomnosť fluorescenčného signálu zo samotného DOX v Lipo-DOX a CX nanočasticiach. V DOX spektre sme pozorovali jasný signál v tumore CX, čo zodpovedá aj výraznej inhibícii rastu daného tumoru v priebehu experimentu, a slabší signál aj v tumoroch D1 a D2, ktoré boli liečené Lipo-DOX (Obr. 2C). V SiR spektre sme pozorovali signál vo všetkých tumoroch liečených nosičmi označených fluorescenčnou farbičkou SiR.

Diskusia

Štúdium nanočastíc pre aplikácie v medicíne zaznamenalo za posledné desaťročie obrovský rozmach. Významná výhoda nanoliečiv spočíva v ich multimodalite. Enkapsulácia protinádorových agensov v kombinácii s cieľiacimi ligandmi predstavuje sľubný posun v liečbe onkologických ochorení. Pri liečbe primárneho karcinómu prsníka sa v bežnej klinickej praxi využívajú multidisciplinárne stratégie, pričom konvenčná cytostatická liečba je často spojená s nízkou terapeutickou účinnosťou a zvýšenou systémovou toxicitou (4).

DOX je antracyklínové chemoterapeutikum, bežne používané v liečbe rôznych druhov onkologických ochorení, vrátane karcinómu prsníka. Klinické využitie DOX je obmedzené najmä kvôli kumulatívne, dávkovo-závislému, progresívnemu poškodeniu myokardu (5). Lipozomálne nanoformulácie DOX vykazujú viaceré výhody oproti bežnej forme DOX, vrátane zníženia kardiotoxicity, zvýšenia času cirkulácie v krvnom obeh, bezpečnosti a celkovej účinnosti (6).

Pasívny transport lipozomálneho DOX do nádorového tkaniva je pripisovaný EPR efektu. Využitím cieľiacej molekuly folátu, ktorého receptor je nadexprimovaný v nádorových bunkách karcinómu prsníka, sa predpokladá zvýšenie selektívneho vychytávania lipozómov práve nádorovými bunkami. Bolo preukázané, že aktívnym transportom folátových lipozómov s enkapsulovaným liečivom paklitaxel dochádzalo k zvýšenej akumulácii liečiva v myšacích tumoroch, odvodených z MDA-MB-231 buniek (7). Podobný výsledok bol nedávno zistený aj na 4T1 myšacom modeli karcinómu prsníka s folátovými lipozómami a enkapsulovaným DOX (8).

Výsledky našej štúdie naznačujú, že CX, komerčný pegylovaný lipozomálny DOX, je vychytávaný v MDA-MB-231 myšacích tumoroch rovnako efektívne ako prototyp Lipo-DOX, napriek absencii cieľiacej molekuly na povrchu CX lipozómov. Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že napriek sľubným *in vitro* výsledkom dochádza v nádoroch predovšetkým k pasívnemu transportu liečiva prostredníctvom EPR efektu. V rámci analýzy objemu tumorov sme pozorovali výraznejší inhibičný efekt CX, v porovnaní s Lipo-DOX. Rozdiely môžu súvisieť s veľkosťou porovnávaných nanočastíc, keďže výrobca CX uvádza veľkosť do 100 nm, avšak veľkosť Lipo-DOX častíc bola približne trikrát väčšia (339.6 ± 4.0 nm). Podľa viacerých štúdií by mali mať systémovo podávané nanočastice veľkosť do 200 nm, aby sa zabránilo skorej eliminácii obličkami alebo následnému zachyteniu slezinou a pečťou (9). Navyše, Cui a spol. vo svojej štúdií uvádza, že aj minimálne zmeny v lipoformuláciách DOX

Verona Buociková, Svetlana Miklíková, Miroslava Matúšková, Marína Cihová, Alena Gábelová, Martina Labudová, Lucia Csáderová, Aiva Plotniece, Karlis Pajuste, Martins Rucins, Arkadij Sobolev, Božena Smolková: Účinok lipozomálneho doxorubicínu zacieleného prostredníctvom folátového receptora na triple-negatívne nádorové bunky karcinómu prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 139-144.

môžu významne zmeniť charakteristiky a účinok daných liečiv (10). Iným dôvodom, ktorý si vyžaduje overenie, môže byť odlišná pH senzitivita a tým rozdielna schopnosť uvoľniť liečivo v nádore, resp. uvoľnenie liečiva alebo jeho časti z experimentálneho LipoDOX nanonosiča ešte pred jeho vstupom do nádoru. Napriek sľubným predbežným výsledkom je pre zlepšenie terapeutických vlastností vyvíjaného nanonosiča potrebná jeho ďalšia optimalizácia.

Táto práca vznikla s podporou 7RP platformy ERA-NET, program EuroNanoMed II, projekt INNOCENT.

Zoznam použitej literatúry

1. Magro M, Venerando A, Macone A, Canettieri G, Agostinelli E, Vianello F: Nanotechnology-Based Strategies to Develop New Anticancer Therapies. *Biomolecules* 2020, 10(5):735.
2. Navya PN, Kaphle A, Srinivas SP, Bhargava SK, Rotello VM, Daima HK: Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials. *Nano Conver* 2019, 6(1):23.
3. Tong CWS, Wu M, Cho WCS, To KKW: Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. *Frontiers in oncology* 2018, 8:227-227.
4. Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Li Y, Wu XY: Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2007, 59(6):491-504.
5. Mamidi RN, Weng S, Stellar S a spol.: Pharmacokinetics, efficacy and toxicity of different pegylated liposomal doxorubicin formulations in preclinical models: is a conventional bioequivalence approach sufficient to ensure therapeutic equivalence of pegylated liposomal doxorubicin products? *Cancer Chemother Pharmacol* 2010, 66(6):1173-1184.
6. Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB: A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles. *Drug Saf* 2001, 24(12):903-920.
7. Monteiro LOF, Fernandes RS, Oda CMR a spol.: Paclitaxel-loaded folate-coated long circulating and pH-sensitive liposomes as a potential drug delivery system: A biodistribution study. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018, 97:489-495.
8. de Oliveira Silva J, Fernandes RS, Ramos Oda CM a spol.: Folate-coated, long-circulating and pH-sensitive liposomes enhance doxorubicin antitumor effect in a breast cancer animal model. *Biomed Pharmacother* 2019, 118:109323.
9. Davis ME, Chen Z, Shin DM: Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. In: *Nanoscience and technology: A collection of reviews from nature journals*. edn.: World Scientific; 2010: 239-250.
10. Cui J, Li C, Guo W a spol.: Direct comparison of two pegylated liposomal doxorubicin formulations: is AUC predictive for toxicity and efficacy? *J Control Release* 2007, 118(2):204-215.

Ľubomír Gazdík, Juraj Lysý, Viera Lehotská: Vplyv fixných čelústno-ortopedických retainerov na vznik artefaktov pri zobrazovaní magnetickou rezonanciou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 145-149.

30.Vplyv fixných čelústno-ortopedických retainerov na vznik artefaktov pri zobrazovaní magnetickou rezonanciou

MDDr. Ľubomír Gazdík
(Röntgenológia a rádiológia)

Spoluautori: MUDr. Juraj Lysý, PhD. ¹

Školiteľ: doc. et doc. MUDr. Viera Lehotská, PhD. ²

¹Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LF UK a OÚSA, ²II. rádiologická klinika LF UK a OÚSA, Bratislava

Úvod

Stabilizačná fáza čelústno-ortopedickej liečby je veľmi často spojená s permanentne noseným drôtom nalepeným na vnútorné plochy predných zubov, tzv. fixným retainerom (1). Často sa stáva, že čelústni ortopédi sú vyzvaní sňať fixný retainer pred vyšetrením magnetickou rezonanciou u ich pacientov. Je to z dôvodu, že najpoužívanejšie materiály v čelústnej ortopédii sú rôzne kovy a ich zliatiny. Tie môžu vytvárať artefakty na snímkach magnetickej rezonancie (2,3). Snímky tak môžu zostať nehodnotiteľné. Existujú štúdie, ktoré skúmajú tento neželaný vplyv čelústno-ortopedických zámkov a drôtov, ale len málo sa ich venuje oblasti fixných retainerov. Tie pritom zostávajú v ústach pacientov dlhé roky po skončení aktívnej liečby a môžu tak predstavovať komplikáciu pri diagnostike ochorení hlavy. Predpokladáme, že výber vhodného typu fixného retainera by mohol zredukovať rozsah artefaktov. Cieľom práce je sledovať a popísať vplyv čelústno-ortopedických retainerov vyrobených z rôznych materiálov a vinutiach na tvorbu artefaktov na MR obraze in vitro.

Materiál a metódy

Predmetom štúdie bolo 9 rôznych čelústno-ortopedických drôtov, vyrobených zo zliatiny zlata, titánu a nerezovej ocele. Ich rozmery a spôsob vinutia sú uvedené v Tab. 01.

Tab.01 Charakteristiky vzoriek drôtov použitých v štúdiu

Vzorka	Materiál	Rozmery (inch)	Spôsob vinutia	Počet prameňov
1	Au-zliatina	0.0383x0.0158	Retiazka	0 - očká retiazky
2	Ti-zliatina	0.017	Koaxiálne	3
3	Ti-zliatina	0.020	Koaxiálne	3
4	nerez. oceľ	0.015	Twistové	3
5	nerez. oceľ	0.018	Twistové	3
6	nerez. oceľ	0.020	Twistové	3
7	nerez. oceľ	0.015	Koaxiálne	5
8	nerez. oceľ	0.018	Koaxiálne	5
9	nerez. oceľ	0.011x0.027	splietaný drôt	8

Ľubomír Gazdík, Juraj Lysý, Viera Lehotská: Vplyv fixných čelustno-ortopedických retainerov na vznik artefaktov pri zobrazovaní magnetickou rezonanciou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 145-149.

Ako referenčná veľkosť drôtu bol zvolený fixný retainer pre dolné zuboradie (zuby 33-43). Dĺžka drôtu bola stanovená na základe údajov o rozmeroch zubov 105 pacientov z Kliniky stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LF UK a OÚSA. Pre všetky vzorky použité v štúdiu bol zvolený rozmer 29,2 mm. Drôty boli jemne upravené tak, aby ich tvar simuloval zakrivenie zubného oblúka. Fantóm, ktorý bol použitý na snímanie retainerov sa skladal z umelohmotnej nádoby valcového tvaru o objeme 0,6l (priemer 10 cm, výška 9 cm). Do výšky 35 mm sme naliali agarózový roztok. Použitá bola čistená laboratórna PCR agaróza (Top-Bio). Po stuhnutí gélu bol na povrch položený drôt a následne sme ho zaliali agarózovým roztokom do výšky 70 mm. Pre zaslepenie štúdie boli vzorky označené číslicami od 1-10 (9 fantómov s drôtmi, 1 referenčný prázdny fantóm).

Fantómy boli snímané MR tomografom so statickým magnetickým poľom 1,5T (Philips Ingenia). Pri všetkých fantómoch bola použitá štandardná sekvencia turbo spin-echo, T2-vážené meranie. Hodnotenie rezov realizovali traja rádiológovia. Použitý bol software TomoCon Lite. Aby bola zaručená zaslepenosť štúdie, hodnotitelia nevedeli aký drôt sa nachádza vo fantóme. Z hodnotených rezov mali zvoliť ten, na ktorom je najväčší artefakt. Za artefakt sa považovalo zvýraznenie, strata, alebo deformácia MR signálu (v porovnaní s referenčným fantómom bez retainera). Na artefakte potom odmerali dva na seba kolmé rozmery: rozmer P - najväčšia veľkosť v smere paralelnom so stredovou líniou fantómu („ventro-dorzálny“ rozmer) a rozmer K – najväčšia veľkosť v smere kolmom na stredovú líniu („kranio-kaudálny“ rozmer).

Namerané rozmery boli presné na jedno desatinné číslo. Ak snímaný fantóm vyhodnotili ako kontrolný, teda bez drôtu a artefaktu, označili veľkosť v oboch rozmeroch ako 0 mm. Ak niektorý fantóm vyhodnotili tak, že sa v ňom nachádza len drôt bez artefaktu, stanovili oba rozmery ako 0,5 mm (to je najväčšia hrúbka drôtu použitého v štúdiu). Poradie hodnotených fantómov bolo náhodné, ale každý z nich bol meraný 4krát každým z hodnotiteľov.

Na posúdenie výskytu artefaktov a ich porovnanie bol pri štatistickom spracovaní použitý jednak rozmer K, ale aj orientačná plocha artefaktu – hodnota A. Pri jej výpočte sme zvolili zjednodušený model: tvar artefaktov bol symetrický, preto bol na zmeranie ich plochy použitý vzorec na výpočet obsahu elipsy: $A = \pi \times K/2 \times P/2$.

Výsledky boli spracované pomocou štatistických testov T-test a ANOVA v programe SPSS 20. Všetky testy boli realizované na hladine významnosti $\alpha=0.05$.

Cieľom práce bolo posúdiť nasledovné hypotézy:

H1: Predpokladáme, že typ kovu, z ktorého sú zhotovené drôty fixných retainerov, ovplyvňuje veľkosť artefaktu na MR obraze.

H2: Predpokladáme, že spôsob vinutia ocelového drôtu fixného retainera bude ovplyvňovať veľkosť artefaktu na MR obraze.

Pre posúdenie druhej hypotézy bol porovnaný referenčný drôt zo skupiny guľatých ocelových s hranatým spletaným ocelovým drôtom. Snažili sme sa, aby bol čo najmenší rozdiel v ploche prierezu drôtov. Na základe tohto kritéria bol vybraný twistový drôt hrúbky 0.020i (inch). Rozmery hranatého spletaného drôtu boli 0.011x0.027i.

Ľubomír Gazdík, Juraj Lysý, Viera Lehotská: Vplyv fixných čelustno-ortopedických retainerov na vznik artefaktov pri zobrazovaní magnetickou rezonanciou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 145-149.

Výsledky

U kontrolného fantómu, v ktorom sa nenachádzal drôt, bola 100% zhoda hodnotiacich. Pri všetkých meraniach nezaznamenali ani drôt, ani artefakt. Podobne všetci hodnotiaci určili u zlatého drôtu K rozmer 0,5 mm, čo bola dohodnutá hodnota pre prítomnosť drôtu bez artefaktu. Pri meraní artefaktov u ostatných fantómov boli zaznamenané hodnoty uvedené v tabuľke 02.

Tab.02 Veľkosti artefaktov u hodnotených fantómov (v mm)

	Kontrola	Au-zliatina	Ti-zliatina	Nerez. oceľ
	Priemer \pm SD	Priemer \pm SD	Priemer \pm SD	Priemer \pm SD
Hodnota K	0 \pm 0	0,5 \pm 0	4,43 \pm 0,68	31,81 \pm 9,47
Hodnota A	0 \pm 0	0,2 \pm 0	20,38 \pm 10,26	1276,38 \pm 580,24

Prítomnosť artefaktov u zliatiny titanu a nerezovej ocele oproti kontrolnému fantómu sa ukázala ako štatisticky významná. Na jej overenie bol použitý T-test, osobitne pre každý materiál.

Následne sme porovnali veľkosti artefaktov podľa kovu, ktorý sa nachádzal vo fantómoch pri zobrazovaní. Použili sme štatistický test jednofaktorovej analýzy rozptylu – ANOVA.

Titánová zliatina tvorí len o málo väčší artefakt ako je rozmer drôtu zlatej zliatiny. Nerezová oceľ stojí od nich osobitne, pretože tvorí výrazne väčšie artefakty ako zliatina zlata alebo titánu. Z dostupných dát vyplýva, že rozdiely medzi veľkosťami artefaktov v rozmere K aj hodnote A sú štatisticky významné ($p = 0,001$). Hypotéza H1 bola podporená, typ kovu drôtu retainera ovplyvňuje veľkosť artefaktov.

Pri posudzovaní druhej hypotézy sme zistili, že artefakty, ktoré vytvoril hranatý drôt mali priemerný rozmer K = 12,19 mm a hodnotu A = 147,45 mm². V porovnaní s guľatým drôtom sú artefakty priemerne viac ako 3krát menšie v rozmere K. Podobne plocha artefaktu je menšia viac ako 12krát. Rozdiely v hodnotených parametroch sa pomocou T-testu potvrdili ako štatisticky významné (Tab.03).

Tab.03 Rozmery artefaktov na snímkach fantómov s oceľovými drôtmí 0.020i twist a 0.011x0.027i splietaný

	SS 0.020i (twist)	SS 0.011x0.027i (splietaný)	Rozdiel medzi priemerami	Štandardná chyba rozdielu	p hodnota
	Priemer \pm SD	Priemer \pm SD			
Hodnota K	38,28 \pm 3,55	12,19 \pm 1,17	26,08	1,08	0,001
Hodnota A	1785,84 \pm 206,81	147,45 \pm 20,59	1638,39	60	0,001

Ľubomír Gazdík, Juraj Lysý, Viera Lehotská: Vplyv fixných čelustno-ortopedických retainerov na vznik artefaktov pri zobrazovaní magnetickou rezonanciou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 145-149.

Môžeme konštatovať, že v skupine ocelových drôtov tvorí hranatý spletaný drôt výrazne menšie artefakty ako referenčný twistový retainer. Hypotéza H2 bola podporená. Pri použití rovnakom materiáli a porovnateľnej ploche prierezu fixného retainera vinutie drôtu významne ovplyvnilo veľkosť artefaktu.

Diskusia

V odbornej literatúre nie je veľa štúdií o problematike materiálov používaných v čelustnej ortopédii a MRI zobrazovania. Ak si aj autori túto oblasť vybrali, skúmali hlavne zámky. Elison et al rovnako ako Beau et al. zistili, že ocelové zámky spôsobujú významné artefakty (3,4). Materiály fixných retainerov boli v štúdiách hodnotené len výnimočne. Realizovaným výskumom sme sa teda pokúsili prispieť v skúmanej oblasti vlastným prínosom.

Drôt zhotovený zo zlatej zliatiny hodnotila len Shalish et al., ktorá súhlasne s našimi výsledkami zistila, že tento materiál nespôsobuje artefakty (2).

Veľká časť štúdií, zhodne s väčšinovým názorom odborníkov ukazuje, že titánové zliatiny vo všeobecnosti nevytvárajú artefakty (4, 5). Na druhej strane iní autori zistili, že zliatiny tohto kovu sú schopné vytvárať určité skreslenia MR obrazu (6,7). Rozdiel v záveroch štúdií je vysvetľovaný použitím rozdielnych typov a množstiev zliatiny pri jednotlivých experimentoch (6). Samotný titan má nízku magnetickú vnímavosť, ale stopy iných kovov v zliatine môžu ovplyvniť MR obraz (5). Preto závisí na individuálnom zložení súčiastky, ako sa to prejaví v MR obraze. Treba podotknúť, že titán sa v čelustnej ortopédii používa vo forme zliatiny, nikdy nie ako čistý kov. Pri retainerových drôtoch vyrobených z titánovej zliatiny sa v hodnotení artefaktov zhodujeme s autormi, ktorí tvrdia, že titánová zliatina tvorí určité artefakty. Sú však pomerne malé a nachádzajú sa v tesnej blízkosti súčiastky.

Naše výsledky meraní fantómov s ocelovými drôtmí sú v zhode s ďalšími štúdiami, ktoré potvrdili, že nerezová oceľ vytvára na MRI významné artefakty (2,4).

Spôsob vinutia a jej vplyv na vyšetrenie magnetickou rezonanciou nebol doteraz špecificky skúmaný. Napriek rovnakému materiálu sa veľkosť artefaktov u skúmaných vzoriek výrazne líšila. Artefakt spôsobený hranatým drôtom bol 3krát menší a zaberá 12krát menšiu plochu. Ako možné vysvetlenie udávame skutočnosť, že twistový drôt je vinutý ako cievka. V silnom magnetickom poli môže spôsobovať väčšie narušenie jeho homogenity ako spletaný drôt.

Uvedomujeme si, že magnetické vlastnosti tkanív v dutine ústnej sa odlišujú od homogénneho prostredia agaru vo fantóme. Pre interpretáciu našich výsledkov z hľadiska klinickej praxe je preto najskôr nutné realizovať analogický experiment in vivo.

Záver

Naše výsledky korešpondujú so štúdiami ďalších autorov v sledovanej oblasti. Na základe našich zistení boli potvrdené rozdiely v tvorbe artefaktov u rozdielnych kovov použitých pri fixných retaineroch in vitro. Takisto bola v našej štúdií skúmaná ďalšia premenná – zaznamenali sme významný rozdiel vo veľkosti artefaktov u ocelového drôta upraveného rozdielnym vinutím.

Lubomír Gazdík, Juraj Lysý, Viera Lehotská: Vplyv fixných čelústno-ortopedických retainerov na vznik artefaktov pri zobrazovaní magnetickou rezonanciou. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 145-149.

Zoznam použitej literatúry

1. Graber L, Vanarsdall R, Vig Katherine, eds. Orthodontics: current principles and techniques, fifth edition. Elsevier Health Sciences. 2011,1-944
2. Shalish M, Dykstein N, Frielander-Barenboim S, Ben-David E, Gomori J, Chaushu S: Influence of common fixed retainers on the diagnostic quality of cranial magnetic resonance images. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 2015; 147(5): 604-609.
3. Elison JM, Leggitt VL, Thomson M, Oyoyo U, Wycliffe ND: Influence of common orthodontic appliances on the diagnostic quality of cranial magnetic resonance images. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 2008; 134(6): 563-572.
4. Beau A, Bossard D, Gebeile-Chauty S: Magnetic resonance imaging artefacts and fixed orthodontic attachments. The European Journal of Orthodontics 2015; 37(1): 105-110.
5. Blankenstein F, Truong B, Thomas A et al.: Predictability of magnetic susceptibility artifacts from metallic orthodontic appliances in magnetic resonance imaging. Journal of OrofacialOrthopedics/Fortschritte der Kieferorthopädie 2015; 76(1): 14-29.
6. Costa AL, Appenzeller S, Yasuda C, Pereira FR, Zanardi VA, Cendes F: Artifacts in brain magnetic resonance imaging due to metallic dental objects. Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugia Bucal 2009; 14(6): 278-282.
7. Shafiei F, Honda E, Takahashi H, Sasaki T: Artifacts from dental casting alloys in magnetic resonance imaging. Journal of dental research 2003; 82(8): 602-606.

Lucia Krasničanová, Vanda Repiská: *Analýza špecifických genetických variantov u pacientov s nádorovým ochorením prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 150-157.*

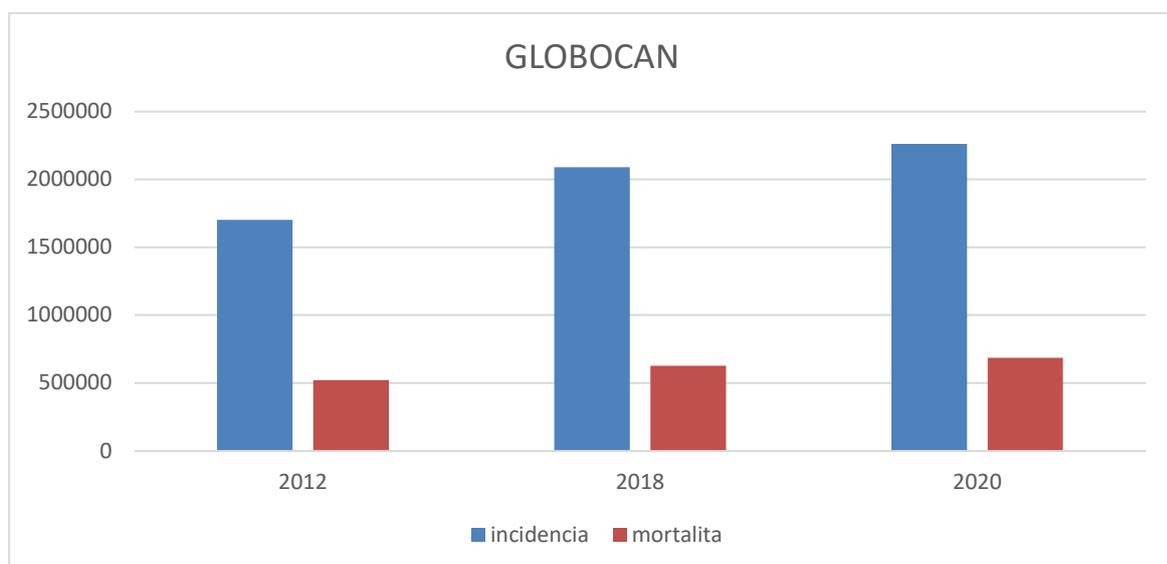
31. Analýza špecifických genetických variantov u pacientov s nádorovým ochorením prsníka

Mgr. Lucia Krasničanová
(patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.
Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava
Medirex Group Academy, n.o.

Úvod

Podľa najaktuálnejšej celosvetovej štatistiky GLOBOCAN 2020 uverejnenej medzinárodnou agentúrou pre výskum rakoviny, ktorá sa zaoberá odhadmi incidencie a mortality nádorových ochorení, je nádorové ochorenia prsníka z hľadiska incidencie najčastejšie diagnostikovaným typom nádorového ochorenia. Incidencia vyše 2 a štvrt' milióna novodiagnostikovaných prípadov predstavuje až 11,7% všetkých prípadov rakoviny. Ak berieme do úvahy obe pohlavia, mortalita na nádorové ochorenie prsníka sa nachádza celosvetovo na piatej priečke a tvorí pri celkovom počte necelých 685 tisíc, takmer 7% prípadov úmrtí na nádorové ochorenie. Ak zväžíme mortalitu len u ženskej formy tohto ochorenia, zistíme že mortalita na rakovinu prsníka je na prvom mieste (1), pričom je značný rozdiel medzi prežívaním vo vyspelých (80% prežívanie) a rozvojových krajinách (40% prežívanie) (4). Ak porovnáme výsledky štatistiky s výsledkami GLOBOCAN 2018 a GLOBOCAN 2012 zistíme, že došlo k výraznému nárastu incidencie ako aj mortality (Graf 1) (2,3). Nárast incidencie je okrem zlepšených skriningových metód zapríčinený najmä nárastom obezity, znížením fyzickej aktivity a tiež zmenou reprodukčného správania, ktoré značnou mierou prispievajú ku vzniku nádorových ochorení (3).



Graf 1. Incidencia a mortalita nádorového ochorenia prsníka pre roky 2012,2018,2020 podľa celosvetovej štatistiky GLOBOCAN (1,2,3)

Lucia Krasničanová, Vanda Repiská: Analýza špecifických genetických variantov u pacientov s nádorovým ochorením prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 150-157.

Najúčinnejším krokom pre skorý záchyt a znižovanie mortality je účinný skrining, ktorý sa najčastejšie vykonáva palpačným samovyšetrením a mamografiou (5). Samotná diagnostika rakoviny prsníka je založená na palpačnom vyšetrení a tradičných zobrazovacích metódach ako sú ultrasonografia a bilaterálna mamografia. Na základe výsledkov zobrazovacích metód, nasleduje patologické vyšetrenie, ktorého princíp spočíva na vyšetrení tkaniva odobratého biopsiou (6). Primárne je pri nádorovom ochorení prsníka vykonané histologické vyšetrenie tkaniva. Pre lepšie stanovenie prognózy ochorenia a charakterizáciu subtypov nádoru ako aj predikciu odpovede na terapiu je vykonávaná imunohistochemia, ktorá umožňuje analýzu prítomnosti vybraných vnútrobunkových proteínov ako aj štruktúr na povrchu bunky. Esenciálne sú vyšetované pri imunohistochemii estrogénový a progesterónový receptor a biomarkery HER2, Ki67 a p53 (7). Bioamarkery, ktoré sú rutinne využívané v klinickej praxi však neumožňujú vystihnúť komplexnosť rakoviny prsníka, pričom podrobnejšie rozdeľovanie nádorov do subtypov je významné pre stanovenie prognózy a tiež pre predikciu úspešnosti prípadnej cielenej terapie. Analýza génovej expresie nádorového tkaniva môže značne ovplyvniť správne zaradenie subtypu a tým ovplyvniť terapiu pacienta (8). Molekulárna analýza genómu tumoru zaznamenala v 21. storočí značný progres, takže pacientom s rakovinou prsníka je ponúkaná efektívnejšia individualizovaná terapia na základe analýzy sofistikovanejších molekulárnych markerov (9). Práve preto je dôležité sa v súčasnosti zamerať na detailnejšie poznanie podstaty nádorového ochorenia u každého pacienta, s cieľom optimalizovať terapiu pre čo najlepší výsledok. Preto sme sa rozhodli analyzovať vzorky slovenských pacientov s nádorovým ochorením prsníka s cieľom poukázať na spektrum mutácií prítomných v nádorovom tkanive a tiež možné využitie týchto poznatkov v reálnej klinickej praxi. Analýza mutačného spektra má tiež význam pri objavovaní nových mutácií v génoch asociovaných so vznikom rakovina prsníka pre účely ich anotácie čo sa týka ich patogénnosti (10).

Materiál a metódy

Pre účely tejto práce sme použili vzorky nádorového tkaniva prsníka, odobraté počas operácie a následne uskladnené v tekutom dusíku.

Pri práci sme použili tieto chemikálie:

Agilent High Sensitivity DNA Kit, (Agilent Technologies)

DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)

EtOH

Kit SureSelect^{QXT} (Agilent Technologies)

MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina)

NaOH

Qubit^R dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)

Nádorové tkanivo sme na začiatok homogenizovali pomocou mažiara v tekutom dusíku v trecích miskách. DNA sme potom izolovali z nádorového tkaniva pomocou kitu DNeasy Blood & Tissue Kit. Kvalitu izolácie a prípadné znečistenie organickými látkami a proteínmi sme si overili zmeraním koncentrácie nukleových kyselín pomocou spektrofotometra NanoDrop 1000. DNA knižnicu pre účely sekvenovania sme si pripravili použitím kitu na prípravu knižnic SureSelect^{QXT}, ktorý umožňuje vychytenie a obohatenie úsekov analyzovaných génov, ktoré sme si zvolili na základe publikácie Lawrence et al. (2014). Následne sme si kvalitu vytvorenej DNA knižnice stanovili prístrojom Agilent 2100 Bioanalyzer pričom sme použili kit Agilent High Sensitivity DNA Kit. Kvantitu dvojjáčkovej

Lucia Krasničanová, Vanda Repiská: Analýza špecifických genetických variantov u pacientov s nádorovým ochorením prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 150-157.

DNA vo vytvorenej DNA knižnici sme overili fluorimetrom Qubit 2.0 pomocou kitu Qubit® dsDNA HS Assay Kit. Analyzované vzorky sme podrobili sekvenovaniu pomocou sekvenátora Illumina MiSeq s využitím kitu MiSeq Reagent Kit v3. Po bioinformatickom spracovaní sme identifikované patogénne varianty vo vzorkách následne analyzovali.

Výsledky

Na základe analýzy výsledkov sme po osekvenovaní DNA vybraných génov detegovali množstvo mutácií v génoch, ktoré sú asociované so vznikom nádorového ochorenia prsníka. Z hľadiska patogénnosti sme identifikovali rôzne druhy variantov avšak našim hlavným cieľom bolo analyzovať patogénne (P) a pravdepodobne patogénne (LP) varianty v nami vybraných génoch. Kvôli prehľadnosti neuvádzame identifikované benígne, pravdepodobne benígne a tiež varianty s neznámou funkciou. Okrem toho bolo našim cieľom porovnať výsledky nami realizovanej analýzy s výsledkami väčších štúdií. Spolu sme identifikovali 55 P a LP variantov (Tabuľka 1, Graf2). Najviac takýchto variantov sme detegovali v géne *TP53* a to až 17. Nasledoval gén *PIK3CA*, v ktorom sme objavili spolu 14 variantov. V géne *BRCA2* a v géne *GATA3* sme identifikovali po 4 varianty. Okrem toho sme v génoch *CDH1 3*, *BRIP1* a *PTEN* identifikovali po 2 varianty. V génoch *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *CDKN1B*, *GNPTAB*, *KRAS*, *NF1*, *PIK3R1* a *RUNX1* sme detegovali len po jednom P resp. LP variante. V 7 vzorkách sa nám nepodarilo identifikovať patogénne alebo pravdepodobne patogénne varianty v nami analyzovaných génoch.

Tabuľka č. 1 Detegované patogénne (P) a pravdepodobne patogénne (LP) varianty vo vzorkách nádorového tkania prsníka (KV – klasifikácia variantu)

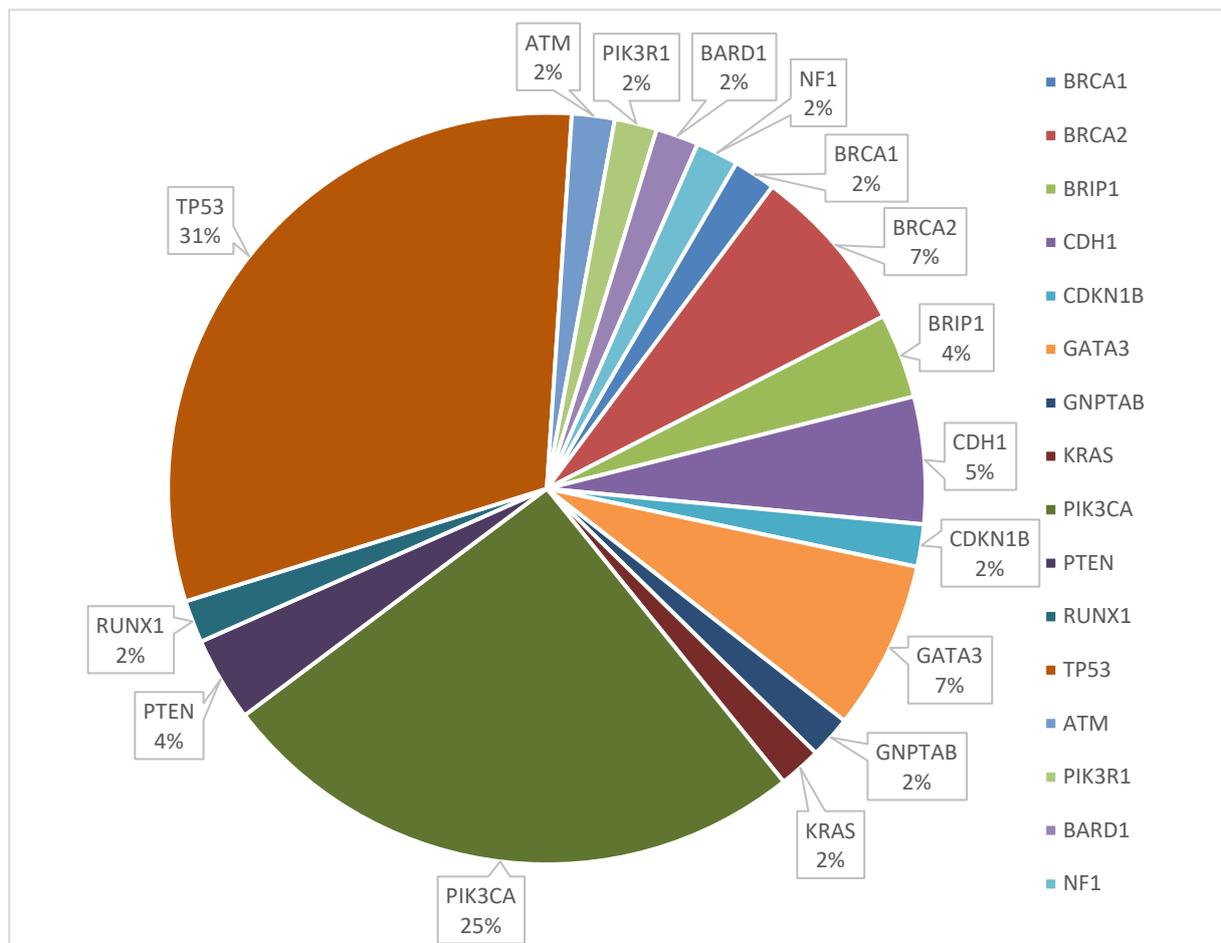
č. vz.	chr.	pozícia	typ variantu	oblasť génu	názov génu	transkripčný variant	proteínový variant	KV
1	3	178921549	SNV	exón	PIK3CA	c.1031T>G	p.V344G	LP
2	16	68849628	SNV	5'UTR; exón	CDH1	c.1348C>T	p.Q450*	P
3	17	7579374	delécia	promótor; exón	TP53	c.307_313del TACCAGG	p.Y103fs*18	LP
3	2	215595203	delécia	exón; ncRNA	BARD1	c.1932_1933 delAT	p.C645*	LP
4	10	8115749	delécia	exón	GATA3	c.1099delC	p.R367fs*38	LP
5	21	36206812	inzercia	exón	RUNX1	c.612_618dup GCGGCGC	p.T207fs*29	LP
6	5	67590369	delécia	exón	PIK3R1	c.343delC	p.Q115fs*2	LP
7	17	7578533	delécia	exón; 5'UTR	TP53	c.396_397delGA	p.K132fs*16	LP
8	3	178927980	SNV	exón	PIK3CA	c.1258T>C	p.C420R	P

Lucia Krasničánová, Vanda Repiská: Analýza špecifických genetických variantov u pacientov s nádorovým ochorením prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 150-157.

9	17	7577137	delécia	exón	TP53	c.801delG	p.N268fs*77	LP
10	17	7577548	SNV	exón	TP53	c.733G>A	p.G245S	P
10	16	68842333	delécia	5'UTR; exón	CDH1	c.394delG	p.V132fs*83	LP
11	17	7577094	SNV	exón	TP53	c.844C>G	p.R282G	P
12	11	108106446	delécia	exón	ATM	c.381delA	p.V128*	P
13	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
14	17	7577582	inzercia	exón	TP53	c.695_698dup TCCA	p.Y234fs*7	LP
14	17	59886004	SNV	exón	BRIP1	c.742T>C	p.F248L	LP
15	17	7577538	SNV	exón	TP53	c.743G>A	p.R248Q	P
16	10	8111435	SNV	zostrih. miesto	GATA3	c.922-1G>T	x	P
17	3	178921553	SNV	exón	PIK3CA	c.1035T>A	p.N345K	P
18	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
19	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>T	p.H1047L	P
20	17	7577526	SNV	exón	TP53	c.755T>C	p.L252P	P
20	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
21	16	68772218	SNV	5'UTR; exón	CDH1	c.67C>T	p.Q23*	P
22	10	8115874	inzercia	exón	GATA3	c.1223_1224 insA	p.P409fs	LP
23	17	7578291	SNV	zostrih. miesto	TP53	c.560-2A>C	x	P
24	17	7577106	SNV	exón	TP53	c.832C>T	p.P278S	P
25	17	7578176	SNV	zostrih. miesto	TP53	c.672+1G>T	x	P
26	17	7577099	SNV	exón	TP53	c.839G>A	p.R280K	P
27	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
28	3	178921553	SNV	exón	PIK3CA	c.1035T>A	p.N345K	P
29	17	7578414	delécia	exón	TP53	c.516delT	p.V173*	LP
30	13	32911298	delécia	exón	BRCA2	c.2808_2811 delACAA	p.A938fs*21	P
30	13	32913778	SNV	exón	BRCA2	c.5286T>Ar	p.Y1762*	P
31	17	7577559	SNV	exón	TP53	c.722C>T	p.S241F	P
32	17	7578406	SNV	exón	TP53	c.524G>A	p.R175H	P
33	10	8115874	inzercia	exón	GATA3	c.1224dupG	p.P409fs	LP
34	13	32930673	SNV	exón	BRCA2	c.7544C>T	p.T2515I	LP
35	17	7577069	delécia	exón	TP53	c.863_869del ATCTCCG	p.N288fs*55	LP
35	17	29657479	inzercia	exón	NF1	c.5717dupT	p.L1906fs*9	LP
36	17	7578402	SNV	exón	TP53	c.528C>G	p.C176W	LP
37	13	32907420	inzercia	exón	BRCA2	c.1813dupA	p.I605fs*11	P
37	12	102147248	delécia	exón	GNPTAB	c.3503_3504 delTC	p.L1168fs*5	P
38	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>T	p.H1047L	P

Lucia Krasničanová, Vanda Repiská: Analýza špecifických genetických variantov u pacientov s nádorovým ochorením prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 150-157.

39	17	59853848	inzercia	exón	BRIP1	c.2010dupT	p.E671*	P
40	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
41	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
42	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
43	12	25398284	SNV	exón	KRAS	c.35G>C	p.G12A	P
44	3	178952085	SNV	exón	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	P
45	12	12870861	delécia	exón	CDKN1B	c.88delA	p.R30fs*12	LP
46	10	89653783	SNV	5'UTR; exón	PTEN	c.81T>A	p.Y27*	P
47	10	89720799	delécia	exón	PTEN	c.955_958del ACTT	p.T319*	P
48	17	41243844	delécia	Exón; intrón; ncRNA	BRCA1	c.3700_3704 delGTAAA	p.V1234fs*8	P



Graf 2. Percentuálne zastúpenie variantov detegovaných v jednotlivých génoch pri našej analýze.

Diskusia

Vzhľadom na fakt, že rakovina prsníka je v súčasnosti najčastejšie diagnostikovanou rakovinou, je potrebné neustále rozvíjať nové prístupy v skríningu a tiež diagnostike. Analýza

Lucia Krasničanová, Vanda Repiská: Analýza špecifických genetických variantov u pacientov s nádorovým ochorením prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 150-157.

mutačného profilu pacienta pomocou NGS môže pomôcť v prípade stanovenia prognózy ochorenia a tiež pri nastavení efektívnejšej liečby v rámci personalizovanej medicíny a to s ohľadom na konkrétny subtyp nádoru prípadne až na úrovni konkrétneho patogénneho variantu. Hoci sme v našom výskume analyzovali len 55 vzoriek nádorového tkaniva prsníka, porovnali sme nami získané výsledky s inými štúdiami z hľadiska frekvencie výskytu patogénnych a pravdepodobne patogénnych variantov v jednotlivých génoch.

V rámci tumor supresorového génu *TP53* sme identifikovali 17 P a LP variantov (ďalej už len ako varianty), čo je 30,3% všetkých identifikovaných variantov. Ak to porovnáme s frekvenciou v rámci štúdie od Silwal-Pandit a kol. (11), kde v rámci analýzy identifikovali 28,3%, je možné povedať že frekvencia v rámci našej analýzy je podobná. Mierna odchýlka môže byť zapríčinená veľkosťou súboru pacientov v našej analýze.

Mutácia génu *PIK3CA*, ktorého produktom je proteín PI3K, je druhá najčastejšie sa vyskytujúca v prípade vzniku rakoviny prsníka. V našej analýze sme v rámci daného génu identifikovali 14 variantov, čo predstavovalo 25% všetkých identifikovaných variantov. Naše výsledky korelujú s výsledkami štúdie Saal a kol. (12), kde identifikovali dané varianty v 26% analyzovaných vzoriek.

Zastúpenie variantov v géne *BRCA2*, ktorý je spolu s génom *BRCA1*, často spájaný najmä s dedičnou formou rakoviny prsníka a zlou prognózou, bolo 7,2% v rámci všetkých variantov, zatiaľ čo v štúdiu od Winter a kol. (13) identifikovali varianty v 5,8% vzoriek.

Rovnaký počet variantov a teda aj percentuálne zastúpenie (7,2%) sme identifikovali aj v géne *GATA3*, ktorý je spájaný najmä s luminálnym subtypom rakoviny prsníka. V tomto prípade pozorujeme miernu odchýlku od analýzy The Cancer Genome Atlas Network (14), kde identifikovali varianty v 10,7% analyzovaných vzoriek. Príčinou miernej odchýlky môže byť samotné zastúpenie luminálnych podtypov rakoviny prsníka v nami analyzovaných vzorkách.

V géne *CDH1* sme identifikovali v rámci našich vzoriek 5,4% variantov. Odchýlka 1% oproti práci Lawrence a kol. (15), kde identifikovali varianty v danom géne v 6,4% vzoriek, môže byť, ako už bolo spomenuté, zapríčinená malou skupinou pacientov v našej analýze. Všeobecne výskyt variantov v tomto tumor supresorovom géne je spájaný so zlou prognózou a tvorbou metastáz.

Varianty v géne *PTEN* boli v analýze Lawrence a kol. (15) identifikované v 3,5% vzoriek, čo koreluje s percentuálnym zastúpením v našej analýze, kde frekvencia predstavovala 3,6%. Zaujímavosťou je, že patogénne varianty tohto génu sú spájané so vznikom Cowdenovho syndrómu, u ktorého je riziko vzniku nádorového ochorenia prsníka veľmi vysoké.

Varianty v géne *BRIP1* sme detegovali v 2 vzorkách, čo predstavuje 3,6%. Nami identifikované varianty sú však len zriedkavo v publikáciách vyskytujú v súvislosti s rakovinou prsníka. Percentuálne zastúpenie variantov v géne *BRCA1* bolo 1,8%, čo je v porovnaní so štúdiou Winter a kol. (13), kde identifikovali varianty v 5,5% vzoriek len približne tretina. Príčinou môže byť nižší podiel pacientov s dedičnou formou rakoviny prsníka v našej analýze a tiež malá skupina analyzovaných pacientov.

V géne *RUNX1*, ktorý je spájaný so vznikom luminálneho subtypu rakoviny prsníka, sme identifikovali varianty v 1,8% vzoriek, čo je o niečo menej ako v štúdiu Lawrence a kol. (15), kde detegovali varianty daného génu v 2,8% vzoriek tkaniva rakoviny prsníka.

V génoch *ATM*, *BARD1*, *CDKN1B*, *GNPTAB*, *KRAS*, *NF1*, *PIK3R1* sme v rámci našich vzoriek detegovali po 1 variante v každom géne. Výskyt konkrétne identifikovaných variantov v rámci našej analýzy je však popísaný v súvislosti s mnohými nádorovými ochoreniami a ich výskyt pri rakovine prsníka nie je typický.

Lucia Krasničanová, Vanda Repiská: Analýza špecifických genetických variantov u pacientov s nádorovým ochorením prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 150-157.

V rámci práce sme sa snažili poukázať na to, že metóda NGS je vhodnou alternatívou ku diagnostickým metódam analýzy nádorového tkaniva využívaným v súčasnosti. Výhodou tejto metódy je úspora nákladov s prihliadnutím na veľké množstvo informácií o mutačnom profile pacienta, ktoré takouto analýzou získame a tiež časová úspora, ktorá je v prípade onkologických ochorení z hľadiska nasadenia liečby dôležitá. Keďže je rakovina prsníka značne heterogénne ochorenie, s inter- ako aj intratumorovou heterogenitou, ktorá môže do značnej miery ovplyvniť úspešnosť terapie, a konvenčná biopsia nemusí zachytiť všetky typy buniek s rozdielnymi mutáciami, je dôležité aby sa využívali najmä prístupy, ktoré umožnia zachytiť celé spektrum genetických mutácií nádoru. Preto je potenciál využitia metódy NGS do budúcnosti aj pri metóde tzv. tekutej biopsie, ktorá využíva analýzu buniek, prípadne fragmentov DNA z krvi uvoľňovaných z nádoru. Táto neinvazívna metóda umožňuje analyzovať komplexný mutačný profil nádoru, sledovať progres ochorenia v čase a tiež úspešnosť terapie ochorenia (10).

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dlhodobý strategický výskum a vývoj zameraný na výskyt Lynchovho syndrómu v populácii SR a možnosti prevencie nádorov spojených s týmto syndrómom, kód ITMS: 313011V578, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

4. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU: reness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research* 2017; 50(1):33
10. Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR: Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clinical genetics* 2019; 95(6):643-660
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018; 68(6): 394-424.
9. Mukohara T: PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer* 2015; 7: 111-123
8. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, Díez M, Viladot M, Arance A, Munoz M: Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast*. 2015; 24: S26-S35
6. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, Zackrisson S, Cardoso F: Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2015; 26 Suppl 5:v8-30
1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F: Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians/Early View* 2021; doi: 10.3322/caac.21660.
3. Torre L, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A: Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2015; 65 (2): 87-108
7. Zaha DC: Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology* 2014; 5(3):382-392
5. Zhi H, Ou B, Luo BM, Feng X, Wen YL, Yang HY: Comparison of ultrasound elastography, mammography, and sonography in the diagnosis of solid breast lesions. *Journal of Ultrasound in Medicine* 2007; 26(6):807-815

Lucia Krasničanová, Vanda Repiská: Analýza špecifických genetických variantov u pacientov s nádorovým ochorením prsníka. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 150-157.

11. Silwal-Pandit L, Moen Vollan HK, Chin SF, et al.: TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. *Clinical Cancer Research* 2014; 20(13):3569-3580
12. Saal LH, Holm K, Maurer M, et al.: PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Research* 2005; 65(7):2554-2559
13. Winter C, Nilsson MP, Olsson E, et al.: Targeted sequencing of BRCA1 and BRCA2 across a large unselected breast cancer cohort suggests that one-third of mutations are somatic. *Annals of Oncology* 2016; 27(8):1532-1538
14. The Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490: 61–70
15. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G: Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 2014; 505(7484):495-501

Marianna Otrošinová, Zuzana Šulavíková, Vladimír Krásnik: Neskorý pooperačný syndróm distenzie puzdra – 2 ročné sledovanie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 158-162.

32. Neskorý pooperačný syndróm distenzie puzdra – 2 ročné sledovanie

MUDr. Marianna Otrošinová¹
(oftalmológia)

Spoluautori: Zuzana Šulavíková²

Školiteľ: doc. MUDr. Vladimír Krásnik, PhD³

¹Očné oddelenie, NPK a.s., Pardubice, ²Očná klinika, FN Trenčín

³Klinika oftalmológie LF UK, Bratislava

Úvod

Syndróm distenzie zadného puzdra (SDP), tiež známy aj ako syndróm kapsulárneho bloku, je v literatúre pomerne vzácne popisovaná a v minulosti zriedkakedy poznaná komplikácia chirurgie katarakty, spojená s použitím techniky prednej kontinuálnej cirkulárnej kapsulorexie s fakoemulzifikáciou a implantáciou umelej vnútroočnej zadnej komorovej šošovky. Dôjde k cirkulárnej adhézii medzi okrajom cirkulárnej kapsulorexie a prednou plochou umelej vnútroočnej šošovky, alebo jadra šošovky.

Materiál a metódy

Popisujeme naše skúsenosti s neskorým pooperačným typom syndrómu distenzie puzdra. V retrospektívnej štúdií hodnotíme 9 pacientov s touto diagnózou v priebehu dvoch rokov, ktorí boli indikovaní k Nd:YAG kapsulotómii pre zhoršenie zrakových funkcií v domnení, že sa jedná o sekundárnu kataraktu. Pacienti javili známky neskorého pooperačného typu SDP v rozmedzí 4-9 rokov po nekomplikovanej operácii katarakty fakoemulzifikáciou s implantáciou umelej vnútroočnej šošovky do šošovkového puzdra. Každý pacient podstúpil vyšetrenie pomocou štrbinovej lampy, vrátane vyšetrenia v arteficiálnej mydriáze, fotografiu predného segmentu a vyšetrenie pomocou prednej segmentovej optickej koherentnej tomografie (PS-OCT) a pomocou Scheimpflugovej kamery Pentacam.

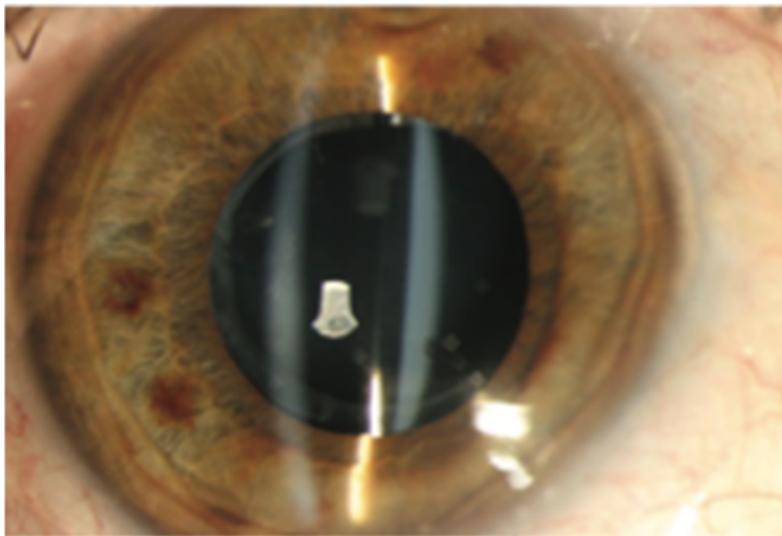
Výsledky

U všetkých pacientov sme pri vyšetrení štrbinovou lampou pozorovali fibroticky zmenený okraj prednej cirkulárnej kapsulorexie cirkulárne adherujúci k prednej ploche umelej vnútroočnej šošovky. Šošovka bola v puzdre centrovaná bez posunu v predozadnej osi. Za umelou šošovkou bolo možné vidieť rozťahnuté zadné puzdro a priestor medzi zadnou plochou umelej šošovky a zadným puzdrom bol homogénne vyplnený mliečne bielou skalenou tekutinou (Obrázok 1). Žiadne abnormality rohovky, dúhovko-rohovkového uhlu, hĺbky prednej komory, ani jej obsahu sme nepozorovali. Kvalita vyšetrenia sklovca a sietnice bola limitovaná nálezom na prednom segmente. Avšak/Napriek tomu neboli nájdené žiadne známky zápalu a vitreoretinálnej patológie.

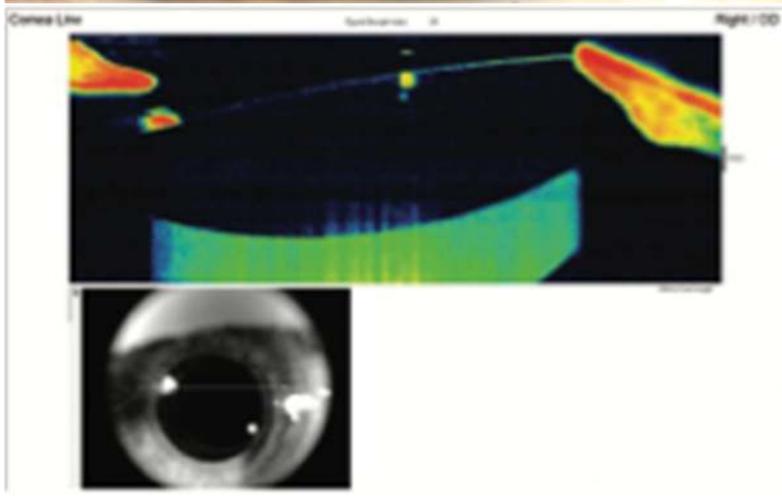
Na základe tohoto nálezu bola stanovená suspektná diagnóza neskorého pooperačného typu syndrómu distenzie zadného puzdra. K potvrdeniu stanovenej diagnózy sme zvolili ďalšie vyšetrovacie metódy – prednej segmentovej OCT (Optovue, Avanti RTVue XR) (Obrázok 2) a Scheimpflugovu kameru (OCULUS Pentacam HR) v maximálnej mydriáze. So zreteľom na možnú infekciu a v snahe zabrániť prípadnému prieniku mikroflóry do sklovcového priestoru sme namiesto laserovej kapsulotómie zvolili chirurgický postup. Pod mikroskopom boli z troch paracentéz vytvorené nástrihy predného fibrotického puzdra. Nasledovala diagnostická aspirácia mliečne bielej skalenej tekutiny 26 gauge kanylou zavedenou paracentézou do puzdra za umelou šošovkou, laváž irigáciou a aspiráciou a aplikáciu roztoku cefuroximu do puzdra. Žiadne peroperačné komplikácie sme nepozorovali.

Marianna Otrošinová, Zuzana Šulavíková, Vladimír Krásnik: Neskorý pooperačný syndróm distenzie puzdra – 2 ročné sledovanie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 158-162.

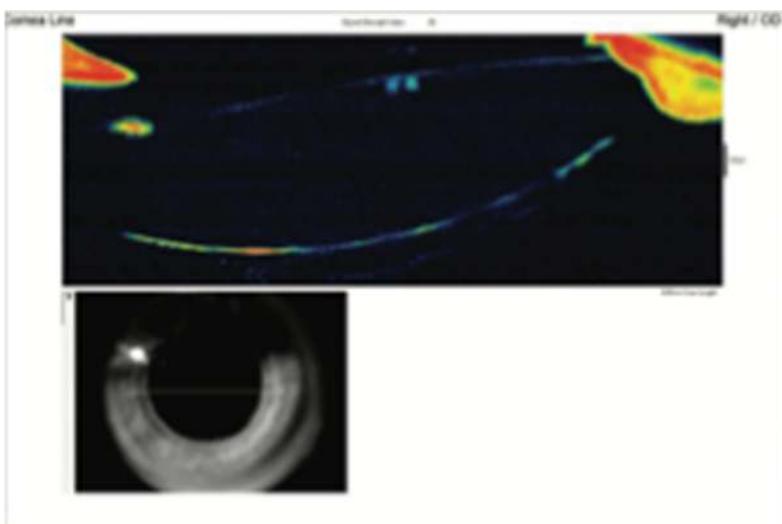
Aspirovaná tekutina bola odoslaná ku kultivačnému a mikroskopickému vyšetreniu. Mikroskopia potvrdila prítomnosť G+ tyčínok koryneformného tvaru svedčiaceho pre rod *Propionibacterium* vo dvoch prípadoch. Kultivácia bola pozitívna iba v jednom prípade.



Obr.1 Predný segment bez známok zápalu, fibroticky zmenené predné puzdro tesne adherujúce k prednej ploche umelej šošovky. Rozšírený priestor medzi zadnou plochou umelej vnútroočnej šošovky a zadným puzdrom vyplnený mliečne bielu skalenou tekutinou.



Obr.2 Predne segmentové OCT demonštruje distenziu puzdra. Pred lavážou je zadné puzdro dozadu roztiahnuté a vyplnené mliečne bielu skalenou tekutinou (hyperreflektívna masa za umelou šošovkou). Dobre centrovaná šošovka bez predozadného posunu.



Obr.3 Predne segmentové OCT po laváži zobrazuje priestor za umelou šošovkou skolabovaný a ohraničený zvrášteným zadným puzdrom

Marianna Otrošinová, Zuzana Šulavíková, Vladimír Krásnik: Neskorý pooperačný syndróm distenzie puzdra – 2 ročné sledovanie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 158-162.

Diskusia

Ako prvý popísal syndróm distenzie puzdra Davison v roku 1990 [1] a Holtz v roku 1992 [3], ale bol to až Masket [6], ktorý ako prvý v roku 1993 použil termín „syndróm kapsulárneho bloku“ k pomenovaniu tejto komplikácie.

Miyake a kol. zostavili v roku 1998 prvú klasifikáciu, ktorá rozdeľuje syndróm distenzie zadného puzdra do troch skupín na základe časového vzniku v súvislosti s operáciou: peroperačný, včasný pooperačný a pozdný pooperačný typ [7]. Druhú klasifikáciu zostavil Kim a Shin v roku 2008 [5] s ohľadom na patogenézu vzniku, ktorá rozdeľuje pooperačný syndróm distenzie puzdra do troch skupín: nebunkový, zápalový a fibrotický typ.

1. Peroperačný typ vzniká behom rapidnej hydrodisekcie, pri použití vysokého irigačného tlaku, alebo pri použití veľkého množstva irigačnej tekutiny. To vedie k dislokácii jadra šošovky dopredu a blokáde otvoru prednej cirkulárnej kapsulorexie. Môže dôjsť až k ruptúre zadného puzdra s luxáciou jadra do sklovcového priestoru [7]. Častejšie vzniká u zadnej polárnej katarakty a hypermetúrnej katarakty a u jedincov s axiálnou dĺžkou bulbu väčšou ako 25 mm [9].

2. Včasný pooperačný typ vzniká najčastejšie v prvý pooperačný deň, ale môže sa rozvinúť v priebehu prvých dvoch pooperačných týždňov [6,9,10,11]. Miyake a kol. [7] sa domnievali, že akumulovaná tekutina za umelou šošovkou je viskoelastický materiál, čo potvrdil Sugiura a kol. [10]. Analýzou aspirovanej tekutiny pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie dokázal, že transparentná tekutina vo vaku šošovky bol zriedený hyaluronát sodný. Hyaluronát je viskoelastický materiál s vysokou molekulárnou hmotnosťou, takže ponechaný v puzdre zvyšuje osmotický gradient a nasáva tekutinu dovnútra cez puzdro, ktoré sa v tejto situácii chová ako semipermeabilná membrána [3]. Tento typ distenzie zadného puzdra bol klasifikovaný ako nebunkový typ klasifikácie podľa Kima a Shina [5].

Kumulovaná tekutina posúva umelú šošovku dopredu k okraju prednej cirkulárnej kapsulorexie, čím spôsobuje jej blokádu a dochádza k splytčeniu prednej komory a zmene duhovko-rohovkového uhlu. Pokiaľ tento proces pokračuje, môže viesť k elevácii vnútroočného tlaku a k akútnemu glaukómu s uzavretým uhlom [11]. Dopredu posunutá šošovka spôsobuje zmenu polohy ohniska, a tým je indukovaná myópia [5,11].

3. Neskorý pooperačný syndróm distenzie puzdra je tiež známy ako pooperačná likvifikácia. Ide o chronický proces vznikajúci sekundárne pri fibrotických zmenách a vzniku adhézie medzi prednou kapsulou a prednou plochou optiky umelej vnútroočnej šošovky. Objavuje sa v priemere 3,8 roka po operácii a je charakterizovaný akumuláciou bieleho materiálu za šošovkou vo vnútri puzdra [8].

Eifrig študoval akumulovanú tekutinu v puzdre a potvrdil vysokú koncentráciu alfa-krystalinu a relatívne nízku koncentráciu albumínov, čo naznačuje, že akumulovaná tekutina môže pochádzať z reziduálnych epiteliálnych buniek šošovky (LECs – lens epithelial cells) [5]. Bunky pod vplyvom rôznych mediátorov proliferujú, podliehajú metaplázii a produkujú rôzne typy extracelulárnej matrix a kolagénov, ktoré sa akumulujú v puzdre [12]. To vytvára osmotický gradient cez semipermeabilnú membránu puzdra. Dochádza k prestupu komorovej tekutiny do puzdra [5,7,8]. Podľa klasifikácie zostavenej Kimom a Shinom [5] je tento typ známy ako fibrotický pooperačný typ SDP.

K vážnym komplikáciám, ako je protrúzia umelej šošovky, splytčenie prednej komory a elevácia vnútroočnej tenzie, u tohto typu SDP nedochádza [2]. Zníženie zrakovej ostrosti je spôsobené rozptylom svetla v opalizujúcej tekutine za šošovkou, napodobujúcej piggy-bag efekt.

V niektorých prípadoch odhalila mikrobiálna analýza v skalenej tekutine akumulovanej za umelou šošovkou prítomnosť baktérie *Propionibacterium acnes* [4]. Anaeróbne baktérie môžu dlhú dobu prežívať a pomnožiť sa až za vhodných podmienok hypoxie, tj. pri hromadení tekutiny v puzdre. Preto je v etiológii vzniku tohoto typu zvažovaná aj možnosť infekčnej komponenty. Vzhľadom k tomu, nesie voľba Nd:YAG laserovej zadnej kapsulotomie v riešení neskorej pooperačnej distenzie zadného puzdra riziko rozšírenia potenciálnej infekcie do sklovcového priestoru a môže viesť k vzniku endoftalmitídy.

Marianna Otrošinová, Zuzana Šulavíková, Vladimír Krásnik: Neskorý pooperačný syndróm distenzie puzdra – 2 ročné sledovanie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 158-162.

Priemerná doba manifestácie pozadného pooperačného typu je 3,8 roku [7,8], boli publikované aj prípady, kedy pacienti začali mať symptómy až 10 rokov po operácii sivého zákalu. V našom súbore to bolo 4-9 rokov po operácii.

Neskorý SDP môže byť vo včasných štádiách subklinický a je detekovaný až neskôr, keď dôjde k zhoršeniu zrakovej ostrosti [11], v prípade akumulácie dostatočne veľkého množstva tekutiny, ktorá musí byť skalená [8]. Prítomnosť mliečne bielej tekutiny v puzdre je typická pre neskorý typ pooperačného SDP.

Existuje množstvo symptómov, ktoré môžu viesť k správnej diagnostike. Syndróm distenzie puzdra by mal byť zahrnutý v diferenciálnej diagnostike u každého pacienta so zmenami videnia po operácii sivého zákalu, a to nezávisle od dĺžky doby od operácie [4]. Samotné fyzikálne vyšetrenie na štrbinovej lampe je často dostačujúce pre stanovenie diagnózy. Definitívnu diagnózu a lepšie zobrazenie anatomických štruktúr je možné dosiahnuť pomocou diagnostických vyšetrovacích metód, ako sú Scheimpflugova fotografia, predne segmentové UBM a predne segmentové OCT. V prípadoch, kedy je zadné puzdro extrémne rozťahnuté, PS-OCT alebo ultrazvuková biomikroskopia je lepšou zobrazovacou metódou ako Scheimpflugova fotografia, ktorá navyše vyžaduje extrémnu mydriázu. Lekár musí nakoniec zohľadniť svoje diagnostické možnosti a vybrať optimálne zobrazenie a následnú liečbu.

Naše pozorovanie ukázalo, že PS-OCT je rýchlou a veľmi užitočnou metódou zobrazenia predného segmentu a pomôže jednoznačne odlíšiť túto diagnózu od opacifikácie zadného puzdra či opacifikácie umelej vnútroočnej šošovky. Povedomie o tejto diagnóze a jej prejavoch, rovnako ako výber vhodnej zobrazovacej metódy môžu viesť k správnej diagnostike, a tým k úspešnej liečbe a zabráneniu neprijateľných výsledkov súvisiacich s nevhodne zvoleným postupom liečby. Liečba aspiráciou mliečnej tekutiny a výplachom kapsulárneho vaku je technicky bezpečný a efektívny postup. Výhodou je tiež možnosť mikroskopického a mikrobiologického vyšetrenia aspirovanej tekutiny. Vzhľadom k možnosti infekčnej etiologie, predstavuje voľba Nd-YAG laserovej zadnej kapsulotómie v liečbe neskorej formy SDP riziko šírenia potenciálnej infekcie do sklovca a vzniku endoftalmitídy.

SDP a hlavne neskorý pooperačný typ sa označuje ako zriedkavá komplikácia, ale naše pozorovanie ukazuje, že je bežnejšia, ako sa uvádza, a zvýšené povedomie o tejto diagnóze môže odhaliť ďalšie prípady.

Zoznam literatúry

1. Davison JA: Capsular bag distension after endophacoemulsification and posterior chamber intraocular lens implantation. *J Cataract Refract Surg* 1990; 16: 99–108.
2. Eifrig DE: Capsulorhexis-related lacteocruemiasia. *J Cataract Refract Surg* 1997; 23: 450–454.
3. Holtz SJ: Postoperative capsular bag distension. *J Cataract Refract Surg* 1992; 18: 310–317.
4. Killoran E, Haugsdal J, Oetting TA: Capsular block syndrome: An unusual presentation. *EyeRounds.org* [online]. 2016 [cit. 2018-11-03]. Dostupné na WWW: <<https://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/cases/238-capsular-block-syndrome.htm>>.
5. Kim HK, Shin JP: Capsular block syndrome after cataract surgery: clinical analysis and classification. *J Cataract Refract Surg*, 2008; 34: 357–363.
6. Masket S: Postoperative complications of capsulorhexis. *J Cataract Refract Surg* 1993; 19: 721–724.
7. Miyake K, Otta I, Ichihashi S et al.: New classification of capsular block syndrome. *J Cataract Refract Surg* 1998; 24: 1230–1234.
8. Miyake K, Ota I, Miyake S et al.: Liquefied after cataract: a complication of continuous curvilinear capsulorhexis and intraocular lens implantation in the lens capsule. *Am J Ophthalmol* 1998; 125: 429–435.

Marianna Otrošinová, Zuzana Šulavíková, Vladimír Krásnik: Neskorý pooperačný syndróm distenzie puzdra – 2 ročné sledovanie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 158-162.

9. Ota I, Miyake S, Miyake K: Dislocation of the lens nucleus into the vitreous cavity after standard hydrodissection. *Am J Ophthalmol* 1996; 121: 706–708.
10. Sugiura T, Miyauchi S, Eguchi S et al.: Analysis of liquid accumulated in the distended capsular bag in early postoperative capsular block syndrome. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26: 420–425.
11. Theng JT, Jap A, Chee SP: Capsular block syndrome: a case series. *J Cataract Refract Surg*, 2000; 26: 462–467.
12. Wendrix G, Zeyen T: Late-onset capsular bag distension syndrome after cataract surgery: 2 case-reports. *Bull Soc Belge Ophtholmol* 2006; 301: 67–69.

33. Statíny a COVID-19

MUDr. Jihad Bou Ezzeddine
(vnútorné lekárstvo)

Školiteľ: prof. MUDr. Róbert Hatala, CSc., FESC, FACC

Interná klinika UNsP Milosrdní bratia, Bratislava; Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, a.s., Bratislava

Úvod

Infekcia koronavírusom (SARS-CoV-2; severe acute respiratory syndrome- Coronavirus-2) spôsobuje ťažký akútny respiračný syndróm. Prvýkrát bola táto infekcia zaznamenaná v Číne (provincia Wu-chan) koncom roku 2019, preto ochorenie nesie názov (COVID-19; Coronavirus disease-19). Svetovou zdravotníckou organizáciou bola infekcia SARS-COV-2 od marca roku 2020 označená za pandémiu.

Pri závažnom priebehu infekcie SARS-COV-2 sa môže rozvinúť ťažká zápalová reakcia vo forme bilaterálnej pneumónie. Lipidový metabolizmus hrá pri tomto zápale rozhodujúcu úlohu. Zápalovú reakciu môže ovplyvniť dvoma spôsobmi. Prvým je pôsobenie na štruktúru bunkovej membrány – BM. Lipidy sú základnými prvkami BM, ktoré pomáhajú internalizovať vírus a uľahčujú jeho ďalšiu replikáciu a transkripciu. Ukázalo sa, že vysoké hladiny cholesterolu v tkanivách podporujú SARS-CoV-2 endocytózu v hostiteľskej bunke a umožňujú vznik infekcie. Druhým je pôsobenie na signálnu dráhu bunky cez cytokíny. Cytokíny sú lipidové deriváty. Telo reaguje na vírusovú infekciu vytváraním veľkého množstva prozápalových cytokínov, ako je tumor nekrotizujúci faktor (TNF), interleukíny- najmä 6 a 1 β (IL-6, IL-1 β). Myeloidný diferenciačný faktor 88 je kľúčový adaptorový proteín v signálnej dráhe interleukínu 1 β - prozápalového cytokínu (1). Ako infekcia koronavírusom v ľudskom tele postupuje, systémové účinky týchto cytokínov vedú k zvýšenej vaskulárnej permeabilite a môžu viesť až k multiorgánovému zlyhaniu a smrti.

Statíny pôsobia tak, že vo vnútri buniek inhibujú enzým 3-hydroxy-3-metyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reduktázu. Toto pôsobenie zabraňuje zvýšenej regulácii primárnej odpovede myeloidného diferenciačného faktoru 88 (MYD88) na prítomnosť vírusu vo forme zníženia tvorby prozápalového cytokínu- interleukínu IL-1 β . Boli publikované aj rôzne mechanizmy statínom sprostredkovaného zlepšenia endoteliálnych funkcií, ktoré zahŕňajú napríklad redukciu zvyškových lipoproteínov (2), inhibíciu mikroRNA-133a expresie (3), indukciu uvoľňovania oxidu dusnatého (4), zníženie hladiny proteínov akútnej fázy (ako C-reaktívny proteín) (5). Tento posledný mechanizmus sa tiež podieľa na protizápalových účinkoch statínov (5,6). Niekoľko štúdií identifikovalo aktiváciu autofágie ako jeden z primárnych molekulárnych mechanizmov podporujúcich protizápalové účinky statínov (7,8).

Lipofilné statíny majú veľký distribučný rozsah, ktorý zasahuje všetky tkanivá tela, čo môže zohrať podstatnú úlohu pri ochrannej činnosti tkanív a organizmu pred vírusom indukovanou zápalovou reakciou. Naopak, hydrofilné statíny majú určité ťažkosti s prienikom do orgánov, vrátane tukového tkaniva a tkanív chránených funkčnými bariérami (t. j. hematoencefalickou bariérou). Preto majú hydrofilné statíny aj pri rovnakej účinnosti znižovania lipidov menšie protizápalové vlastnosti.

Okrem respiračných príznakov má väčšina pacientov infikovaných SARS-CoV-2 zvýšené riziko kardiovaskulárnych komplikácií a tromboembolizmu. Tieto komplikujú priebeh po infekcii cerebrálnymi príhodami, hlbokou žilovou trombózou alebo pľúcnou embóliou. Pacienti s ochorením COVID-19 majú často multimorbiditu (t.j. koexistenciu viacerých komorbidít), vrátane hypertenzie, kardiovaskulárnych chorôb a diabetes mellitus. Retrospektívna analýza 72 314 prípadov s pozitívou infekcie SARS-CoV-2 z Číny ukázala, že pacienti s kardiovaskulárnymi ochoreniami vykazovali významne vyššiu úmrtnosť (10,5% oproti 2,3%) (9). Keďže používanie statínov je spojené s

Jihad Bou Ezzeddine, Róbert Hatala: Statíny a COVID-19. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 163-167.

výrazným znížením rizika úmrtia na kardiovaskulárne ochorenia v bežnej populácii, začalo sa uvažovať, či by statíny prostredníctvom svojich pleiotropných mechanizmov účinku, ktoré zahŕňajú zlepšenie endotelových funkcií, protizápalové a antitrombotické účinky (10,11,12), mohli terapeuticky prospievať pacientom s ochorením COVID-19. Retrospektívna analýza realizovaná na 13 981 pacientoch s ochorením COVID-19 (v provincii Hubei, Čína), z ktorých 1219 pacientov dostávalo statíny, odhalila, že užívanie statínov bolo spojené so zníženou úmrtnosťou (13).

Materiál a metódy

V našej retrospektívnej štúdii sme vychádzali z predpokladu, že pacienti užívajúci statíny majú lepšiu prognózu prežívania pri závažnejšom priebehu SARS-COV-2 infekcie ako pacienti, ktorí statíny neužívali vôbec. Štúdia bola realizovaná na COVID oddelení Univerzitnej nemocnice s poliklinikou Milosrdní bratia v termíne od 1.11.2020 do 31.3.2021 na vzorke 40 pacientov. Pacienti boli rozdelení na dve rovnaké skupiny : 1. skupina pacientov, ktorá mala v liekovej anamnéze pri prijíme na oddelenie uvedený statín aj deklarovala jeho pravidelné užívanie po dobu aspoň jedného roka, 2. skupina pacientov, ktorá nemala v liekovej anamnéze pri prijíme na oddelenie ani v inej dostupnej dokumentácii uvedený statín. Všetci pacienti v našej štúdii dostávali plnú podpornú liečbu COVID-19. Žiadnemu z pacientov v našej štúdii nebol podávaný ivermektín.

Hlavnými cieľmi štúdie bolo zhodnotenie úmrtnosti zo všetkých príčin a zhodnotenie klinického vývoja stavu pacientov – od vyliečenia až po nutnosť umelej pľúcnej ventilácie pri užívaní a bez užívania statínov.

Do štúdie boli zaradení pacienti, ktorí splnili kritériá pre diagnózu pneumónie spôsobenej SARS-COV-2 infekciou podľa Svetovej zdravotníckej organizácie. Medzi tieto kritériá patrí: 1.pozitívny test na COVID-19 realizovaný polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) štandardizovaným spôsobom výteru z nazofarynxu a orofarynxu.

2. prítomnosť infiltrátov v pľúcnom parenchýme charakteru opacity mliečneho skla (GGO infiltrátov), zápalovej konsolidácie, lymfadenopatie na snímkach hrudníka realizovaných pomocou počítačovej tomografie (CT).

3. vyšetrenie acidobázickej rovnováhy z arteriálnej krvi s hodnotami saturácie krvi kyslíkom $\leq 93\%$.

Zo štúdie boli vyradení pacienti, ktorí mali autoimunitné ochorenie, onkologické ochorenie s nutnosťou hormonálnej, biologickej liečby či prebiehajúcim cyklom chemoterapie, dialyzovaní pacienti, pacienti s akútnym hepatálnym a obličkovým zlyhávaním, pacienti s akútnym či subakútnym infarktom myokardu. V prípade smrti pacienta boli zo štúdie vyradení takí pacienti, u ktorých v pitevnej správe nebolo stanovené ochorenie COVID-19 ako hlavná príčina úmrtia. Minimálna dĺžka hospitalizácie našich pacientov bola 15 dní a maximálna 61 dní.

Kontinuálne premenné boli vyjadrené ako priemer a kategorické dáta ako percentá. Všetky dichotomické premenné boli porovnané pomocou testu χ^2 . Na hladine významnosti 5 % ($p=0.05$), nulovú hypotézu (H_0) o nezávislosti jednotlivých znakov zamietame a prijímame hypotézu H_1 , ktorá nám potvrdzuje, že existuje štatisticky významná závislosť medzi pozorovanými znakmi.

Výsledky

Pacientov sme podľa vyššie uvedených kritérií rozdelili na 2 skupiny, v každej skupine bolo 20 pacientov. U jednotlivých pacientov sme analyzovali prítomnosť: 1. arteriálnej hypertenzie (AH), 2. diabetes mellitus 2. typu (DM 2.typu) alebo poruchy glukózovej tolerancie, 3. ischemickej choroby srdca (ICHS) alebo prítomnosti tranzitórneho ischemického ataku (TIA) či cievnej mozgovej príhody (CMP), 4. hyperlipidémie alebo hypercholesterolémie, 5. obezity (BMI nad 30kg/m²), 6. embolizácie do artérie pulmonalis (AP), 7. chronickej obštrukčnej choroby pľúc (CHOCHP) (tabuľka číslo 1).

Jihad Bou Ezzeddine, Róbert Hatala: Statíny a COVID-19. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 163-167.

Tab.1: Porovnanie parametrov u pacientov s a bez užívania statínov

Parameter	Statíny áno	Statíny nie	Hodnota pravdepodobnosti
n	20	20	
Vek (priemer)	73,5	67,5	
Mužské pohlavie	40%	45%	0,749
AH	75%	65%	0,490
Porucha glukózovej tolerancie	20%	5%	0,151
DM 2. typu	40%	30%	0,507
ICHS	45%	15%	0,038
TIA/CMP	15%	10%	0,632
Hypercholesterolémia	10%	35%	<u>0,058</u>
Zvýšená hodnota LDL	5%	20%	0,091
Zvýšená hodnota TAG	5%	10%	0,548
Obezita (BMI > 30 kg/ m ²)	40%	30%	0,507
Embolizácia do AP	5%	10%	0,548
CHOCHP	20%	10%	0,375
Nutnosť HFOT	10%	20%	0,375
Nutnosť UPV	0%	20%	0,035
Počet úmrtí	0%	20%	0,035

AH – arteriálna hypertenzia, DM 2. typu – Diabetes mellitus 2. typu, ICHS – ischemická choroba srdca, TIA – tranzitórny ischemický atak, CMP – cievna mozgová príhoda, LDL - low density lipoprotein (lipoproteín s nízkou hustotou), TAG – triacylglyceroly, BMI – body mass index (index telesnej hmotnosti), AP – artéria pulmonalis, CHOCHP – chronická obštrukčná choroba pľúc, HFOT – high- flow oxygen therapy (vysokoprietoková kyslíková liečba), UPV – umelá pľúcna ventilácia

Tab.2.: Lieková anamnéza pacientov v našej štúdii

Parameter	Statíny áno	Statíny nie	Hodnota pravdepodobnosti
n	20	20	
Kyselina acetylsalicylová	50%	35%	0,337
P2Y12 inhibítory	10%	0%	0,146
Nové orálne antikoagulanty	5%	15%	0,291
ACEI	60%	55%	0,749
Sartany	15%	10%	0,632
Beta- blokátory	25%	30%	0,723
Blokátory kalciových kanálov	15%	10%	0,632
Warfarin	5%	15%	0,291

P2Y12 inhibítory – inhibítory chemoreceptora pre adenosín difosfát, patria sem: klopidogrel, prasugrel, tikagrelor, kangrelor, ACEI- inhibítory enzýmu konvertujúceho angiotenzín

Diskusia

V našej štúdii sme vyhodnotili zo sledovaných parametrov v tabuľke č.1 potrebu umelej pľúcnej ventilácie, ICHS, počet úmrtí u pacientov, ktorí neužívali statíny, za štatisticky významné. Diagnóza hypercholesterolémie sa blížila k hladine štatistickej významnosti. Tento parameter je preto vhodné pri zväčšení súboru opäť analyzovať. Hoci skupina pacientov užívajúcich statíny bola polymorbídnejšia, v tejto skupine bola nižšia úmrtnosť a menej pacientov vyžadovalo umelú pľúcnu ventiláciu. Ostatné parametre vrátane užívania antiagregancií, antikoagulancií a antihypertenzív spomenutých v tabuľke č.2, nedosahovali štatistickú významnosť.

Americká kardiologická spoločnosť rozdeľuje užívanie statínov podľa výšky dennej dávky na nízku, stredne vysokú a vysokú dávku statínov. Všetci pacienti v našej štúdii užívali lipofilné statíny, z toho 80% pacientov atorvastatín a 20% pacientov simvastatín. Podľa rozdelenia Americkej kardiologickej spoločnosti, všetci pacienti ktorí užívali simvastatín (4 z 20 pacientov), mali stredne vysokú dávku. U pacientov s atorvastatínom v terapii bolo dávkovanie nasledovné: 6 z 20 pacientov užívalo stredne vysokú dávku, 10 z 20 pacientov užívalo vysokú dávku.

V štúdii realizovanej v nemocnici Modena v Taliansku doktorom Rossariom Rossi a kol., na vzorke 71 pacientov s ochorením COVID-19, bola miera úmrtnosti u pacientov, ktorí užívali statíny 21.4%, zatiaľ čo v skupine pacientov, ktorí statíny neužívali bola miera úmrtnosti 34,5%. Hoci tieto údaje nedosahovali štatistickú významnosť, poukázali na trend v redukcii rizika mortality v skupine pacientov užívajúcich statíny. V štúdii z Modeny užívalo vysokú dávku statínov 42,86% pacientov, nízku a stredne vysokú dávku 57,14% pacientov. V skupine pacientov s vysokou dávkou statínov zaznamenali 22,2% úmrtnosť, zatiaľ čo v druhej skupine, s nízkou až stredne vysokou dávkou statínov bola úmrtnosť 25%. Atorvastatín užívalo 52,38% pacientov, simvastatín 9,52% pacientov. Zvyšok pacientov užíval hydrofilný rosuvastatín (14).

V retrospektívnej kohortovej štúdii, realizovanej v provincii Shiraz v Iráne medzinárodným tímom pod vedením Peymanioho s kolektívom, sledovali 150 pacientov s COVID-19 infekciou, ktorých si rozdelili na dve rovnaké skupiny. V jednej skupine pacienti užívali statíny a v druhej skupine boli pacienti bez statínov v terapii. Zistili, že v skupine pacientov užívajúcich statíny, bolo o 15% menej pacientov napojených na umelú pľúcnu ventiláciu, alebo vysokoprietokovú kyslíkovú liečbu, v porovnaní s pacientmi ktorí statíny neužívali. Taktiež zaznamenali redukciiu mortality o 24% v skupine pacientov so statínmi v liečbe. Ich výsledky však nedosahovali štatistickú významnosť, ale poukázali na asociáciu medzi užívaním statínov a klinickým priebehom ochorenia u pacientov s COVID-19 (15).

Kvôli prísnyim inklúznym aj exklúznym kritériám sme mohli do našej štúdie zahrnúť celkovo iba 40 pacientov. Ďalšou limitáciou oproti predchádzajúcim štúdiám bolo, že sme nemohli porovnať rozdiely v sledovaných parametroch medzi pacientmi s hydrofilnými a lipofilnými statínmi v liečbe, keďže všetci naši sledovaní pacienti užívali lipofilné statíny. Naše zistenia vyžadujú ďalšie skúmanie na väčšej vzorke pacientov a potvrdenie našich výsledkov v prospektívnej štúdii.

Naša a aj vyššie spomenuté zahraničné štúdie preukázali výrazné zníženie úmrtnosti a potreby umelej pľúcnej ventilácie u pacientov s infekciou COVID-19 užívajúcich statíny. Užívanie statínov u pacientov s COVID-19 a ICHS bolo štatisticky významné. Keď zoberieme do úvahy dobrú dostupnosť, bezpečnosť a pomerne nízku cenu statínov, stálo by za zváženie ich používanie ako súčasť liečby pacientov s infekciou COVID-19.

Zoznam použitej literatúry

1. Chow R, Im J, Chiu N a spol.: The protective association between statins use and adverse outcomes among COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. Medrxiv preprint [Internet]. 12. február 2021 [cit 14. apríl 2021]; Available at: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.02.08.21251070v1>

Jihad Bou Ezzeddine, Róbert Hatala: Statíny a COVID-19. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 163-167.

2. Nakamura T, Uematsu M., Yoshizaki T, Kobayashi T, Watanabe Y, Kugiyama K: Improvement of endothelial dysfunction is mediated through reduction of remnant lipoprotein after statin therapy in patients with coronary artery disease. *J Cardiol* 2020; 75 (3): 270–274.
3. Li P, Yin YL, Guo T a spol.: Inhibition of aberrant MicroRNA-133a expression in endothelial cells by statin prevents endothelial dysfunction by targeting GTP Cyclohydrolase 1 in vivo. *Circulation* 2016; 134 (22): 1752–1765.
4. Cerda A, Fajardo CM, Basso RG, Hirata MH, Hirata RDC: Role of microRNAs 221/222 on statin induced nitric oxide release in human endothelial cells. *Arq Bras Cardiol* 2015; 104 (3): 195–201.
5. Momin A, Melikian N, Wheatcroft SB a spol.: The association between saphenous vein endothelial function, systemic inflammation, and statin therapy in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 134 (2): 335–341.
6. Ahmadi M, Amiri S, Pecic S a spol.: Pleiotropic effects of statins: a focus on cancer. *Biochim Biophys Acta Mol basis Dis* 2020; 1866 (12): 165968.
7. Han F, Xiao QQ, Peng S, Che XY, Jiang LS, Shao Q, He B: Atorvastatin ameliorates LPS-induced inflammatory response by autophagy via AKT/mTOR signaling pathway. *J Cell Biochem* 2018; 119 (2): 1604–1615.
8. Peng S, Xu LW, Che XY, Xiao QQ, Pu J, Shao Q, He B: Atorvastatin inhibits inflammatory response, attenuates lipid deposition, and improves the stability of vulnerable atherosclerotic plaques by modulating autophagy. *Front Pharmacol* 2018; 9: 438.
9. Wu Z, McGoogan JM: Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 2020; 323 (13): 1239–1242.
10. Lee KCH, Sewa DW, Phua GC: Potential role of statins in COVID-19. *International Journal of Infectious Diseases* 2020; 96: 615–617.
11. Subir R, Jagat JM, Kalyan KG: Pros and cons for use of statins in people with coronavirus disease-19 (COVID-19). *Diabetes Metab Syndr* 2020; 14 (5): 1225–1229.
12. Rizk JG, Kalantar-Zadeh K, Mehra MR, Lavie CJ, Rizk Y, Forthal DN: Pharmaco-Immunomodulatory therapy in COVID-19. *Drugs* 2020; 80 (13): 1267–1292.
13. Zhang XJ, Qin JJ, Cheng X a spol.: In-hospital use of statins is associated with a reduced risk of mortality among individuals with COVID-19. *Cell Metab* 2020; 32 (2): 176–187 e4.
14. Rossi R, Talarico M, Coppi F, Boriani G: Protective role of statins in COVID 19 patients: importance of pharmacokinetic characteristics rather than intensity of action. *Intern Emerg Med* 2020; 15 (8): 1573-1576.
15. Peymani P, Dehesh T, Aligolighasemabadi F a spol.: Statins in patients with COVID-19: a retrospective cohort study in Iranian COVID-19 patients. *Translational medicine communications* [Internet]. 25. január 2021 [cit 14. apríl 2021]; 6 (3). Available at: <https://transmedcomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41231-021-00082-5#citeas>

Diana Víglaská, Samuel Kunzo, Zuzana Kabátová, Lukáš Varga: Vzťah rozšíreného vestibulárneho akveduktu ku kochleárnym a audiometrickým parametrom. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 168-171.

34.Vzťah rozšíreného vestibulárneho akveduktu ku kochleárnym a audiometrickým parametrom

**MUDr. Diana Víglaská¹
(otorinolaryngológia)**

Spoluautori: MUDr. Samuel Kunzo², doc. MUDr. Zuzana Kabátová, PhD.¹

Školiteľ: MUDr. RNDr. Lukáš Varga, PhD.¹

¹Klinika otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LF UK a UNB, Bratislava, ²Detická otorinolaryngologická klinika LF UK a NÚDCH, Bratislava

Úvod

Senzorineurálna porucha sluchu (SNHL) patrí k najčastejším chronickým zdravotným problémom v populácii, detský vek nevynímajúc. Rozšírený vestibulárny akvedukt (EVA) je jednou z najčastejších vrodených anomálií vnútorného ucha u detí so SNHL (1). Vo vestibulárnom akvedukte (VA) sa nachádza endolymfatický kanálik, ktorý zabezpečuje prúdenie endolymfy. Jeho rozšírenie sa pripisuje kongenitálnej malformácii spánkovej kosti, ktorá zvyšuje u pacienta pravdepodobnosť poruchy sluchu a vestibulárneho systému (2). SNHL pri EVA sa nemusí prejaviť hneď po narodení a u niektorých pacientov sa rozvíja až v postlingválnom období (3). Identifikácia EVA je dôležitá súčasť diagnostického procesu aj u kandidátov na kochleárnu implantáciu, ktorú zohľadňujeme pri predoperačnom plánovaní a hodnotení rizík vzniku komplikácií (únik perilymfatickej tekutiny, strata reziduálneho sluchu) pri tomto výkone (4). U časti pacientov môže byť navyše EVA jedným z prvých klinických indikátorov, ktoré môžu upozorniť na riziko neskoršieho rozvoja Pendredovho syndrómu (SNHL a struma na podklade poruchy organifikácie jódu), s potrebou cielej analýzy génu *SLC26A4* (5).

Cieľom našej práce bolo zistenie prevalencie EVA v súbore vybraných pacientov so SNHL na základe presných rádiologických meraní a posúdenie vzťahu medzi veľkosťou EVA, kochley a závažnosťou poruchy sluchu.

Materiál a metódy

Retrospektívne sme analyzovali súbor 178 pacientov po kochleárnej implantácii a kandidátov na kochleárnu implantáciu, ako aj pacientov s diagnózou náhle SNHL, ktorých CT a/alebo MRI zobrazenia spánkových kostí boli dostupné a spĺňali požadované kritériá kvality snímok (6). Na týchto snímkach vo formáte DICOM sme pomocou softvéru TomoCon Viewer (TatraMed Software, Bratislava, SR) hodnotili prítomnosť rozšíreného vestibulárneho akveduktu podľa Cincinnati kritérií (šírka VA v oblasti operkula $\geq 2,0$ mm alebo v oblasti stredovej šírky - „midpoint“ ≥ 1 mm) (7-8), obr. 1. Pomocou špeciálneho softvéru na rádiologickú analýzu rozmerov kochley a predoperačné plánovanie pri kochleárnej implantácii, Otoplan (CAScination, Bern, Švajčiarsko & MED-EL, Innsbruck, Rakúsko), sme vykonali merania priemeru (D), výšky (H) a šírky (W) kochley a na základe nich získali prepočítaný odhad celkovej dĺžky kochleárneho duktu (CDL). Následne sme hodnotili vzťah medzi rozmermi VA, kochley a priemerným prahom sluchu na 4 rečových frekvenciách 0,5-4 kHz (PTA4) s použitím Pearsonovho korelačného koeficientu.

Výsledky

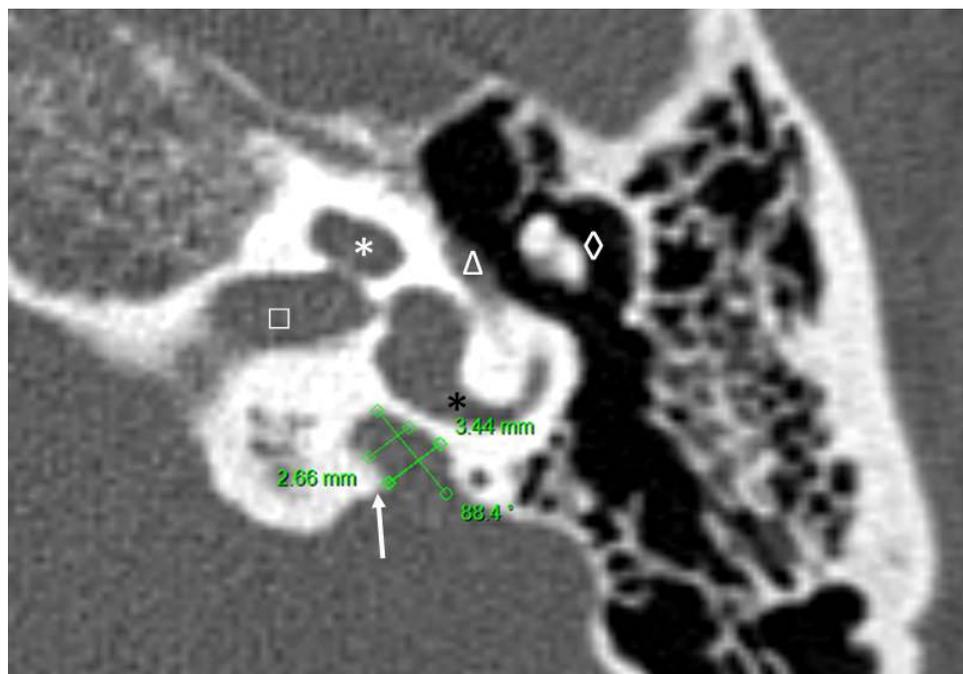
Zo 178 pacientov (356 uší) sme v 29 prípadoch (50 uší, 14 %) identifikovali EVA, ktorý až v 72 % nebol predtým popisovaný rádiológom. Pri 8 pacientoch bol nález unilaterálny, 4 (13 %) mali súčasne

Diana Víglaská, Samuel Kunzo, Zuzana Kabátová, Lukáš Varga: Vzťah rozšíreného vestibulárneho akveduktu ku kochleárnym a audiometrickým parametrom. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 168-171.

Mondiniho dyspláziu kochley (2 bilaterálne, 2 unilaterálne), 4 mali bilaterálnu dyspláziu laterálnych semicirkulárnych kanálikov (LSCC) a 1 mal bilaterálnu dyspláziu všetkých troch semicirkulárnych kanálikov v kombinácii s EVA.

Tab.1: Hodnoty Pearsonovho korelačného koeficientu (r) vyjadrujúceho vzťah vybraných morfológických a audiologických parametrov. D – priemer. H – výška. W – šírka. CDL – dĺžka kochleárneho duktu. PTA4 – priemer sluchu na 4 rečových frekvenciách (0,5-4 kHz).

	operkulum (mm)	midpoint (mm)	PTA4 (dB)
D (mm)	-0,02	0,07	0,26
H (mm)	0,07	0,11	0,17
W (mm)	-0,26	0	0,04
CDL (mm)	-0,17	0,08	0,19
PTA4 (dB)	- 0,23	- 0,03	



Obr.1 CT spánkových kostí vľavo, axiálna rovina - rozšírený vestibulárny akvedukt podľa Cincinnati kritérií (zelené úsečky). Ľavý vestibulárny akvedukt meria 3,44 mm v oblasti operkula a 2,66 mm v stredovej šírke. Použité symboly: * : kochlea, Δ : tvárový nerv, *: laterálny semicirkulárny kanálik, \square : vnútorný zvukovod, \diamond : bubienková dutina, \uparrow : operkulum

Z audiologického hľadiska malo 17 pacientov prelingválnu a 12 postlingválnu poruchu sluchu. Priemerný vek nástupu poruchy sluchu bol 7 rokov. Osem pacientov údajalo epizódu náhleho zhoršenia sluchu a 5 postupne progredujúcu poruchu sluchu. Iba 6 pacientov uvádzalo tinitus (3 bilaterálny, 3 unilaterálny) a žiadny z pacientov nemal klinicky manifestnú vestibulárnu poruchu (pred kochleárnou implantáciou). Priemerná šírka EVA so smerodajnou odchýlkou v oblasti operkula bola 2,14 mm ($\pm 1,14$ mm) a priemerná stredová šírka VA bola 1,91 mm ($\pm 1,18$ mm). Priemerné hodnoty veľkostných parametrov kochley u týchto pacientov boli nasledovné: D 8,7 mm ($\pm 0,66$ mm), H 3,8 mm

Diana Víglaská, Samuel Kunzo, Zuzana Kabátová, Lukáš Varga: Vzťah rozšíreného vestibulárneho akveduktu ku kochleárnym a audiometrickým parametrom. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 168-171.

($\pm 0,68$ mm), W 6,4 mm ($\pm 0,98$ mm), CDL 33,2 mm ($\pm 3,66$ mm). Priemerná hodnota PTA4 (0.5-4 kHz) v našom súbore pacientov s EVA bola 89 dB, t.j. na úrovni ťažkej poruchy sluchu. Hodnoty Pearsonovho korelačného koeficientu pre rozmery VA vo vzťahu k stupňu poruchy sluchu a veľkostným parametrom kochley uvádzame v tab.1. Na základe našich výpočtov sme zistili, že lineárna korelácia medzi spomínanými premennými nie je významná.

Diskusia

Etiológia senzorineurálnej poruchy sluchu je až v 50 % prípadov neznáma. Vo väčšine prípadov SNHL ide o izolovanú kongenitálnu abnormalitu spájanú s genetickými alebo environmentálnymi faktormi (7). Súčasný nález SNHL a EVA bol doteraz zistený v asociácii s mutáciami v génoch *SLC26A4*, *KCNJ10* a *FOX11* (9), čo potvrdzuje etiologicky heterogénny pôvod tejto kongenitálnej malformácie. V kontexte SNHL je zobrazovacia diagnostika spánkovej kosti potrebná pri pátraní po príčine poruchy sluchu a pri diagnostike anatomických malformácií pred kochleárnou implantáciou (10). Rozšírenie vestibulárneho akveduktu na CT a/alebo MRI môže byť posudzované podľa Valvassoriho kritérií (veľkosť VA $>1,5$ mm v oblasti stredovej šírky) alebo Cincinnati kritérií (veľkosť VA ≥ 2 mm v oblasti operkula a/alebo ≥ 1 mm v oblasti stredovej šírky). Napriek tomu, že dnes je už CT a MRI zobrazenie štandardom, veľa pacientov nemá diagnostikovanú EVA. Dôvodom môže byť nedostatočná kvalita snímok, posudzovanie podľa starších Valvassori kritérií, ktoré sú menej senzitívne, ale aj skutočnosť, že v mnohých prípadoch sa v dôsledku malých rozmerov a zložitých morfológických detailov vnútorné ucho hodnotí len orientačne vizuálne, bez uplatnenia presných morfológických meraní. V našom súbore sme EVA na základe týchto meraní *de novo* identifikovali u 72 % celkového počtu pacientov s EVA, čo je porovnateľné s údajmi z literatúry, uvádzajúcej až 84 % podiel pacientov zachytených pomocou exaktných rádiologických meraní oproti malému počtu pacientov detegovaných len na základe vizuálneho hodnotenia snímok (7). Väčšina nálezov EVA (84 %) bola bilaterálna, čo je v zhode s doteraz publikovanými údajmi (11) a podporuje hypotézu dominujúceho vplyvu dedičných faktorov na vznik tejto malformácie.

Koreláciu medzi stupňom rozšírenia vestibulárneho akveduktu a závažnosťou poruchy sluchu sme nepotvrdili. Vzťah medzi týmito premennými nepotvrdili ani ďalší autori (12). Príčinou však môže byť aj limitovaná metóda selekcie pacientov, pretože zobrazovacie vyšetrenia sa prevažne indikujú len pri ťažkom stupni poruchy sluchu a hluchote. O variabilite rádiologických nálezov pri ľahších poruchách sluchu tak nemáme dostatok údajov. Pri porovnávaní výsledkov meraní kochley sa zistila slabá pozitívna korelácia medzi priemerom kochley (D) a stupňom poruchy sluchu a slabá negatívna korelácia medzi šírkou kochley (W) a šírkou VA v oblasti operkula. Okrem možnej štatistickej chyby v dôsledku veľkosti súboru, možno minimálne v druhom prípade uvažovať aj o potenciálnej závislosti vysvetliteľnej simultánnym výskytom ďalších anomálií vnútorného ucha u pacientov s EVA.

V našom súbore mala väčšina pacientov prelingválnu poruchu sluchu (do veku 2 rokov), hoci priemerný vek nástupu SNHL bol až 7 rokov. V tomto veku je pre vývin reči dôležitá včasná identifikácia príčiny a následná rehabilitácia poruchy sluchu, či už načúvacími prístrojmi alebo kochleárnou implantáciou (13). Noguchi a spol. uvádzajú nástup poruchy sluchu vo veku menej ako 10 rokov (14). Oba údaje svedčia o značnej variabilite veku nástupu a rýchlosti progresie poruchy sluchu asociovanej s EVA. Náhla porucha sluchu pri EVA sa objavuje hlavne po úraze hlavy, preto je dôležité v rámci poradenstva upozorniť na tento rizikový faktor, vyhýbať sa kontaktným športom a používať ochranné pomôcky hlavy aj pri relatívne bežných pohybových aktivitách, napr. pri bicyklovaní, korčuľovaní a pod. (13). Vertigo sa popisovalo iba u niekoľkých pacientov po implantácii kochleárneho implantátu, čo dávame do súvislosti s peroperačným dráždením vestibulárneho aparátu. Aj v zahraničných štúdiách sa uvádza vertigo iba v malom percente prípadov (<9 %) pri nástupe SNHL asociovanej s EVA (13-14).

Naše výsledky podporujú potrebu implementácie presných meraní detailných rozmerov vnútorného ucha v rádiologickej diagnostike príčin SNHL a súčasne demonštrujú, že aj diskrétné patologické zmeny môžu stáť v pozadí ťažkých porúch sluchu. EVA má dnes už pomerne jasne definované diagnostické

Diana Víglaská, Samuel Kunzo, Zuzana Kabátová, Lukáš Varga: Vzťah rozšíreného vestibulárneho akveduktu ku kochleárnym a audiometrickým parametrom. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 168-171.

kritériá, ktoré spolu so zlepšujúcou sa kvalitou a dostupnosťou zobrazovacích vyšetrení zvyšujú pravdepodobnosť záchytu tejto malformácie, no patomechanizmus jej vzniku zostáva stále z väčšej časti neobjasnený. Preto možno sledovaný súbor považovať aj za vhodný východiskový materiál pre ďalšie analýzy, napr. pomocou exómového sekvenovania.

Zoznam použitej literatúry

1. Antonelli PJ, Varela AE, Mancuso AA: Diagnostic yield of high-resolution computed tomography for pediatric sensorineural hearing loss. *Laryngoscope*, 1999; 109(10): 1642-1647.
2. Welling D, Slater P, Martyn M a spol.: Sensorineural hearing loss after occlusion of the enlarged vestibular aqueduct. *Am J Otol*. 1999; 20(3): 338-343.
3. Au G, Gibson W: Cochlear implantation in children with large vestibular aqueduct syndrome. *Am J Otol*. 1999; 20(2): 183-186.
4. Deep NL, Hoxworth JM, Barrs DM: What is the best imaging modality for diagnosing a large vestibular aqueduct? *Laryngoscope*. 2016; 126(2): 302-303.
5. Masindova I, Varga L, Stanik J, Valentinova L, Profant M, Klimes I, Gasperikova D: Molecular and hereditary mechanisms of sensorineural hearing loss with focus on selected endocrinopathies. *Endocr Regul*. 2012; 46(3): 167-186.
6. Connor SEJ, Dudau C, Pai I, Gaganasiou M: Is CT or MRI the optimal imaging investigation for the diagnosis of large vestibular aqueduct syndrome and large endolymphatic sac anomaly? *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2019; 276(3): 693-702.
7. Dewan K, Wippold FJ, Lieu JEC: Enlarged vestibular aqueduct in pediatric SNHL. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009; 140(4): 552-558.
8. Boston M, Halsted M, Meizen DJ a spol.: The large vestibular aqueduct: a new definition based on audiologic and computed tomography correlation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007; 136(6): 972-977.
9. Liu Y, Wen J, Sang S a spol.: Next-generation sequencing-based mutation analysis of genes associated with enlarged vestibular aqueduct in Chinese families. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020; 277(12): 3331-3339.
10. Trimble K, Blaser S, James AL, Papsin BC: Computed tomography and/or magnetic resonance imaging before pediatric cochlear implantation? Developing an investigative strategy. *Otology & Neurotology*. 2007; 28(3): 317-324.
11. Campbell AP, Adunka OF, Zhou B, Qaqish BF, Buchman CA: Large vestibular aqueduct syndrome. *The laryngoscope*. 2011; 121(2): 352-357.
12. Hwang M, Marovich R, Shin SS, Chi D, Branstetter BF: Optimizing CT for the evaluation of vestibular aqueduct enlargement: Inter-rater reproducibility and predictive value of reformatted CT measurements. *J Otol*. 2015; 10(1): 13-17.
13. Madden C, Halsted M, Benton C, Greinwald J, Choo D: Enlarged vestibular aqueduct syndrome in pediatric population. *Otology & Neurotology*. 2003; 24(4): 625-632.
14. Noguchi Y, Fukuda S, Fukushima K a spol.: A nationwide study on enlargement of the vestibular aqueduct in Japan. *Auris Nasus Larynx*. 2017; 44(1): 33-39.

Jakub Szabó, Emese Renczés, Matúš Mlynár, Peter Celec: Intranasal oxytocin in a genetic animal model of autism. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 172-176.

35. Intranasal oxytocin in a genetic animal model of autism

Mgr. Jakub Szabó
(Lekárske neurovedy)

Spoluautori: Mgr. Emese Renczés, PhD., Matúš Mlynár
Školiteľ: doc. MUDr. Ing. RNDr. Peter Celec, DrSc., MPH

Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava

Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a group of neurodevelopmental disorders characterized by deficits in social interaction, communication, and repetitive behavior (1). As the etiopathogenesis is unknown, the treatment is symptomatic and inefficient. Only a limited number of symptoms in autism is treatable to this day. The most prevalent treatment used so far has been antipsychotic medication to treat irritability and hyperactivity (2). Intense research is studying potential novel treatment approaches targeting the core symptoms (3).

Oxytocin (OXT) is a neuropeptide best known for its crucial role in social bonding, social behavior, social recognition, and social care (4), which has led to the suggestion of using it as a therapeutic treatment in psychiatric disorders defined by deficits in sociability, such as autism. Indeed, a number of clinical studies have found the OXT administration to improve social functioning and decrease repetitive behavior in autism (5, 6), some reported no significant effects of intranasal OXT (7) and many more are still ongoing. However, OXT is still not being utilized due to limited effectiveness, that depends on the dose, form of application and mainly on the patients. This is accenting the need for further investigation of OXT as a possible therapeutic agent.

With the unclear etiopathogenesis and high heritability of ASD, genetic factors stand out as a main component involved. Thus, the genetic models of autism pose an ideal choice for the research into the disorder. One of the most prominent genetic animal models used in ASD research is the *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3 (Shank3)* gene haploinsufficiency model which exhibits a variety of autism-like phenotype, such as extensive grooming indicating repetitive behavior, or abnormal social behavior (8). OXT has been proven to rescue morphological and structural neuronal deficits in autistic mice (9). However, the research on behavioral effects of OXT in the *Shank3* animal model so far has been almost exclusively limited to rats, where the role of OXT attenuated ASD phenotype (10). To elucidate the behavioral effects of non-invasive OXT treatment, we employed the *Shank3* mutant mouse model of ASD.

Material and methods

Male wild-type (WT; n = 9) and *Shank3B^{-/-}* knock-out (KO; n = 10) adult (3-month old) mice with C57BL/6 background were used. Animals were group-housed (4-6 per cage) with their littermates and kept in a controlled environment of 24 ± 2 degrees Celsius and $55 \pm 10\%$ humidity with *ad libitum* access to food and water on a 12-hour light/dark cycle.

Animals were intranasally administered 0.8 IU/kg OXT (Ferring Pharmaceuticals, Switzerland) with the concentration of 1 IU/ml or saline vehicle treatment once daily between 12:00 and 15:00 according to previously used protocol (11) for the period of 14 consecutive days. For the

Jakub Szabó, Emese Renczés, Matúš Mlynár, Peter Celec: Intranasal oxytocin in a genetic animal model of autism. *Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 172-176.*

intranasal administration, a single channel 0.5 – 10 μ l Pipette was used (Eppendorf, Germany). Drops of solution were gently placed equally on both nostrils of the mouse, which were inhaled by reflex. Administration and handling were consistent across groups and days of administration. No anesthesia was required, as the administration is non-invasive.

Behavioral testing was conducted 12 hour after the last daily substance administration throughout 3 consecutive days. Mice were tested in the PhenoTyper 4500 cage (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) including an open field arena (45 cm x 45 cm x 45 cm) for 2 behavioral assays. Each test was carried out in a dimly lit room, with room temperature of 24 ± 1 degree Celsius. All animals were habituated to the room at least 30 minutes prior to each testing. Mouse handling and experiments were carried out by the same experimenters throughout the study.

In the *Reciprocal interaction test*, subject animals were socially isolated for 24 hours prior to the testing and then randomly paired with a socially novel WT animal of the same sex used as a social partner. Both animals were placed in the cage filled with sawdust bedding and left to freely interact for 10 minutes while being recorded. Recording was manually scored by an observer for cumulative time spent nose-to-nose, nose-anogenital and side-sniffing as a measure of social interaction, and self-grooming, digging, lying flat, freezing in contact, or avoiding the social partner as a measure of social disinterest.

In the *Open field test*, animals were individually placed into the cage and left to freely explore for 10 minutes while recorded. Recordings were manually scored by an observer for cumulative time of grooming and rearing behavior as a measure of repetitive and explorative behavior, respectively.

Statistical analyses were conducted using IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM Corp.). To compare the groups, One-way ANOVA followed by the post-hoc analysis using Bonferroni correction was used. Data are presented as mean and SEM. *P*-values of less than 0.05 were considered significant.

Results

Significant differences were recorded between groups [$F(2, 16) = 8.485, p = 0.003$] in social interaction (Fig. 1A). OXT-treated KO mice spent twice the time ($t = -6.131, p < 0.001$) interacting with the social partner than the vehicle-treated KO group, while vehicle-treated WT group interacted more than the vehicle-treated KO group as well ($t = 3.647, p = 0.004$). No differences were observed between OXT-treated KO group and vehicle-treated WT group ($t = 0.221, p = 0.828$).

Furthermore, differences were also noted between the groups in social disinterest [$F(2, 16) = 13.926, p < 0.001$, Fig. 1B]. Vehicle-treated KO group exhibited higher social disinterest than the OXT-treated KO mice ($t = 3.69, p = 0.006$). No differences were recorded between both the KO and WT vehicle-treated mice ($t = -4.029, p = 0.073$), as well as between the WT vehicle-treated group and OXT-treated KO group ($t = 1.618, p = 0.13$).

No differences between the groups were observed in grooming [$F(2, 16) = 2.835, p = 0.088$, Fig. 1C], and rearing [$F(2, 16) = 0.884, p = 0.432$, Fig. 1D] behavior.

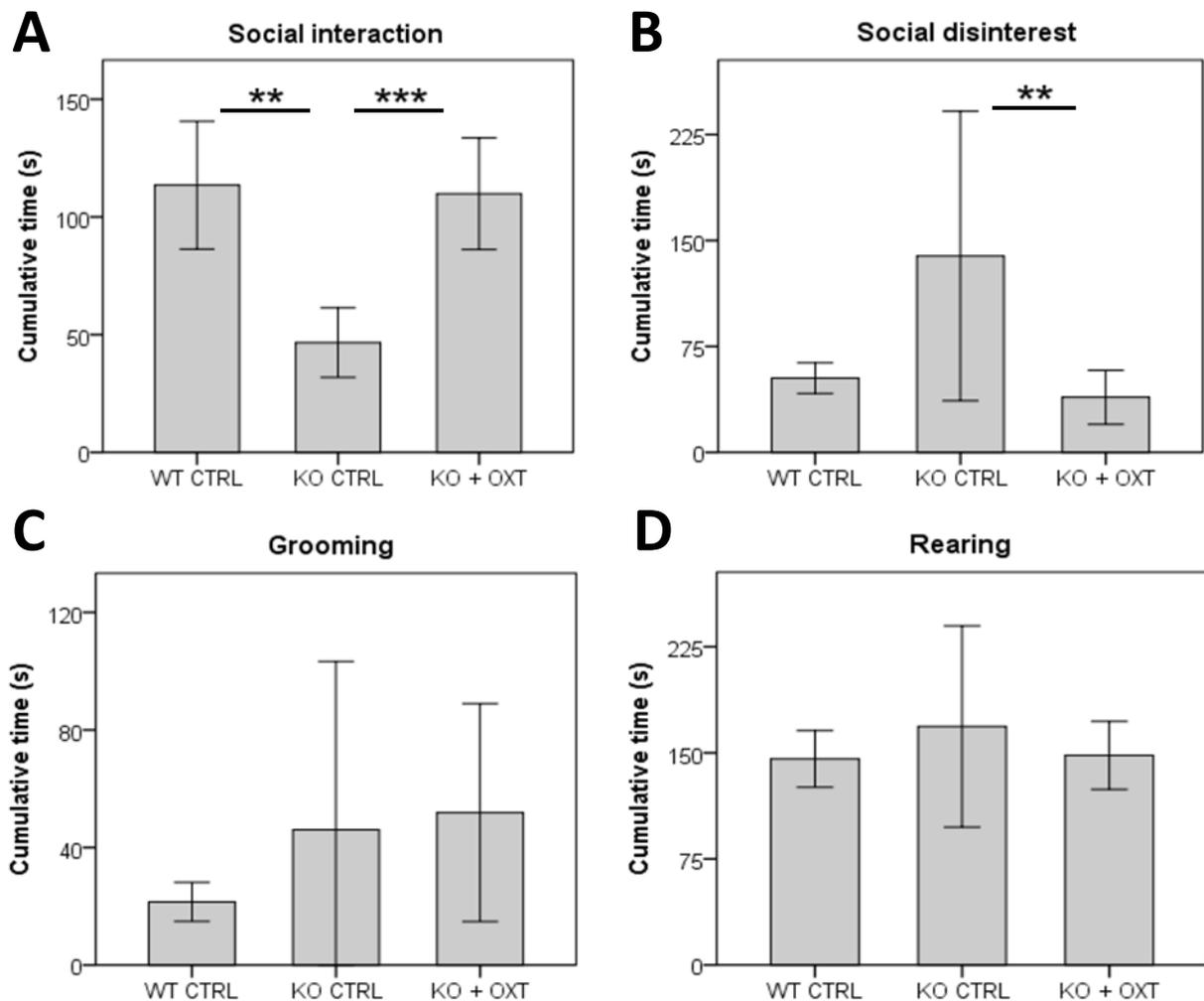


Fig. 1. Comparisons between the groups of WT control mice, KO control mice and KO mice treated with OXT in (A) social interaction, (B) social disinterest, (C) grooming as a measure of repetitive behavior and (D) rearing as a measure of explorative behavior. The values presented as means and SEM. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

Discussion

Present study was, to our knowledge, the first to examine the effect of subchronic intranasal OXT treatment on autistic phenotype in *Shank3* mutant mouse model of ASD. Daily intranasal administration of OXT for 2 weeks attenuated social deficits exhibited in saline-treated KO mice, but had no effect on the observed repetitive and explorative behavior.

Amelioration of social behavior due to OXT in the current paper is a finding consistent across several previous studies with CD1, BALB/cByJ and C58/J mice (12, 13) despite the designs varying greatly in volumes, lengths, and routes of administration, which might produce different prosocial effects (14). However, in the BTBR mouse model (11), with which our study shared a substantial portion of methodology, such as strain, administration protocol, dose, and behavioral assays, no effect of OXT treatment on the sociability was recorded. The differences in results could be partly explained by the disparity of age in which the animals were tested in

Jakub Szabó, Emese Renczés, Matúš Mlynár, Peter Celec: Intranasal oxytocin in a genetic animal model of autism. *Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 172-176.*

both studies; our study was done on adult mice, whereas Bales et al. (11) used mice in adolescence. Furthermore, authors claim to observe no effects of long-term exposure to OXT on social interaction but assessed the reciprocal social interaction only 3 days into the daily OXT administration, started at weaning. It is, thus, plausible that the substance in the presented dose did not take a sufficient effect at the time of assessment. Recent study investigating the effects of OXT administered by intracranial injections in *Shank3* rats has noted an impairing effect in social memory, but not in social interaction (10). Presumably, the differences in administration route as well as in genetic background of subjects might be causing the disparities in the results. Our results support the role of subchronic intranasal OXT in rescuing the social deficits in ASD. Repetitive behavior indicated by self-grooming was not affected by the OXT administration in our study. These findings contradict the significant effect of the subchronic OXT treatment in young adult C58/J mice that decreased the repetitive grooming (13). Besides the differences in age of subjects, mentioned study used an intraperitoneal route of administration, which is reported to provide a more systemic substance effect (15), possibly targeting the relevant underlying mechanisms not yet well-elucidated. Similarly, other studies with intranasal OXT administration did not support its effect on repetitive behavior as well (11). Previously reported effects of chronic OXT on exploration (14) were not supported by our results. As the mentioned effect was dose-dependent, i.e. only observed in the group with OXT dose of 5 IU/kg, which is over 5-fold higher dose than the one used in our study, we expect the lower dose to be the key factor behind the noted discrepancies.

Our findings, however, should be understood with several limitations in mind. The concentrations of the absorbed OXT, as well as its kinetics were not recorded, therefore we lack information on effect duration. Furthermore, as ASD is primarily prevalent at an early age, adulthood might not be the most optimal age for modelling of the disorder. Although we set out to investigate the OXT effect on the core ASD symptomatology, we lacked any measure for the deficits in communication, which are highly prevalent in autism. On the other hand, as the impaired sociability is arguably the most debilitating condition of ASD, we illustrated a substantial attenuative effect of the substance, rendering the social deficiency to none.

In conclusion, we demonstrated that subchronic intranasal OXT exposure can reliably ameliorate social deficits in the *Shank3* mouse model of autism. This effect is already observable after 2 weeks of administration. As the prosocial OXT effects tend to vary across different models of autism, these preclinical findings provide yet another argument for the number of ongoing clinical trials that the effects might depend on the specific sample, and further underline the need to conduct pre-clinical trials with different autism models.

Bibliography

1. American Psychiatric Association: Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5, 5th edition. Arlington. 2013. 1-947.
2. Tural Hesapcioglu S, Ceylan MF, Kasak M, Sen CP: Olanzapine, risperidone, and aripiprazole use in children and adolescents with Autism Spectrum Disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders* 2020; 72(101520).
3. Frye RE: Social Skills Deficits in Autism Spectrum Disorder: Potential Biological Origins and Progress in Developing Therapeutic Agents. *CNS Drugs* 2018; 32(8); 713–734.
4. Lim MM, Bielsky IF, Young LJ: Neuropeptides and the social brain: Potential rodent models of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2005; 23(2–3): 235–243.

Jakub Szabó, Emese Renczés, Matúš Mlynár, Peter Celec: *Intranasal oxytocin in a genetic animal model of autism. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 172-176.*

5. Andari E, Duhamel JR, Zalla T, Herbrecht E, Leboyer M, Sirigu A: Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(9): 4389–4394.
6. Hollander E, Novotny S, Hanratty M, Yaffe R, DeCaria CM, Aronowitz BR, Mosovich S: Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic and Asperger's disorders. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28(1): 193–198.
7. Cacciotti-Saija C, Langdon R., Ward, PB, a spol.: A double-blind randomized controlled trial of oxytocin nasal spray and social cognition training for young people with early psychosis. *Schizophrenia Bulletin* 2015; 41(2): 483–493.
8. Peça J, Feliciano C, Ting JT, a spol.: Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 2011; 472(7344): 437–442.
9. Reichova A, Bacova Z, Bukatova S, a spol.: Abnormal neuronal morphology and altered synaptic proteins are restored by oxytocin in autism-related SHANK3 deficient model. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2020; 518 (110924).
10. Harony-Nicolas H, Kay M, du Hoffmann J, a spol.: Oxytocin improves behavioral and electrophysiological deficits in a novel Shank3-deficient rat. *ELife* 2017; (6).
11. Bales KL, Solomon M, Jacob S, a spol.: Long-term exposure to intranasal oxytocin in a mouse autism model. *Translational Psychiatry* 2014; 4(11) 480–480.
12. Hara Y, Ago Y, Higuchi M, a spol.: Oxytocin attenuates deficits in social interaction but not recognition memory in a prenatal valproic acid-induced mouse model of autism. *Hormones and Behavior* 2017; 96: 130–136.
13. Teng BL, Nonneman RJ, Agster KL, a spol.: Prosocial effects of oxytocin in two mouse models of autism spectrum disorders. *Neuropharmacology* 2013; 72: 187–196
14. Huang H, Michetti C, Busnelli M, a spol.: Chronic and Acute Intranasal Oxytocin Produce Divergent Social Effects in Mice. *Neuropsychopharmacology* 2014; 39(5): 1102–1114
15. Smith AS, Korgan AC, Young WS: Oxytocin delivered nasally or intraperitoneally reaches the brain and plasma of normal and oxytocin knockout mice. *Pharmacological Research* 2019; 146(104324).

Michal Svoboda, Petra Prišćáková, Vanda Repiská: Úloha *ERVW-1* a syncytínu-1 v rozvoji gestačných hypertenzných ochorení. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 177-182

36. Úloha *ERVW-1* a syncytínu-1 v rozvoji gestačných hypertenzných ochorení

Mgr. Michal Svoboda¹
(Patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Spoluautor: Mgr. Petra Prišćáková, PhD.¹

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.¹

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK

Úvod

Gestačné hypertenzné ochorenia (GHO) predstavujú jednu z najčastejšie sa vyskytujúcich komplikácií gravidity a tvoria podstatnú príčinu materskej, fetálnej a neonatálnej morbidity a mortality. Hypertenzia počas gravidity môže mať negatívny dopad na vývoj placenty, a tak aj na transport živín medzi matkou a plodom (1,2). Jednou z najvážnejších foriem GHO je preeklampsia (PE). PE je závažné multifaktoriálne ochorenie objavujúce sa počas tehotenstva a je druhou najčastejšou príčinou úmrtia gravidných žien. Medzi jej hlavné symptómy patrí novonadobudnuté zvýšenie krvného tlaku (systolický > 140 mmHg; diastolický > 90 mmHg) a proteínúria (>0,3 g za 24h) po 20. gestačnom týždni. Napriek vysokej incidencii (5 – 8 % tehotenstiev), nemá ani v dnešnej dobe efektívnu liečbu, či markery pre včasnú diagnostiku (3). Vznik PE je spojený s nesprávnym formovaním trofoblastu a placenty počas tehotenstva.

Jedným z faktorov zodpovedných za správny priebeh placentácie je proteín syncytín-1 kódovaný génom *ERVW-1*. Gén *ERVW-1* patrí do skupiny endogénnych retrovirálnych elementov (ERV), ktoré v súčasnosti tvoria až 8 % našej DNA a zohrávajú dôležitú úlohu pri formovaní placenty. Medzi úlohy syncytínu-1 patria pre placentu esenciálne procesy, akými sú tvorba mnohjadrového syncytia, regulácia bunkového cyklu alebo supresia imunitnej odpovede. Najvyššia úroveň expresie génu *ERVW-1* je v placente a jej narušenie môže vyústiť k patofyziologickým prejavom PE.

Znížená expresia génu *ERVW-1* sa dáva do súvislosti s rozvojom PE (4,5). Táto hypotéza avšak nemusí byť konečná. Často sú vykonávané jednorázové biopsie v blízkosti pupočníka a tie následne analyzované. Je možné že v rámci placenty, ktorá je veľmi heterogénne tkanivo, sa expresia syncytínu-1 v určitých miestach zvyšuje a v iných znižuje, a tento trend by biopsiou na jednom mieste nebolo možné zachytiť. V našej práci sme navrhli odber 10 rôznych biopsií od stredu až po okraj placenty, ktorý by lepšie odrážal možnú variabilitu expresie sledovaného génu. V našom projekte sme sa taktiež zamerali na regulačnú oblasť génu *ERVW-1* so snahou o identifikáciu prítomných variantov, ktoré by mohli mať vplyv na jeho expresiu. Ak by sa nám podarilo identifikovať variant, ktorý by súvisel so znížením expresie génu *ERVW-1*, mohol by byť použitý ako skríningový marker žien, ktoré majú vyššie riziko abnormálnej placentácie, ktorá vedie k PE.

Materiál a metódy

Vzorky: Do našej štúdie bolo zaradených celkovo 16 vzoriek (9 PE a 7 bez PE). K dispozícii boli aj archívne vzorky (12 PE a 26 bez PE). Z 16 placent bolo odobraných 10 biopsií podľa protokolu odporúčaného Prišćákovou a kol. (6). Placenty pochádzali z I. gynekologicko-

Michal Svoboda, Petra Priščáková, Vanda Repiská: Úloha ERVW-1 a syncytínu-1 v rozvoji gestačných hypertenzných ochorení. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 177-182.

pôrodnickej kliniky LF UK a UNB s Centrom reprodukčnej medicíny v Bratislave a z II. gynekologicko-pôrodnickej kliniky LF UK a UNB v Bratislave. Darkyne placent boli oboznámené s ich použitím pri vedeckom výskume a podpísali informovaný súhlas.

Spracovanie RNA: Na izoláciu RNA bola použitá komerčná súprava *GeneJET RNA purification Kit (Thermo Scientific)*. Izolovaná RNA bola prečistená od novej kontaminácie DNA pomocou *DNase I (RNase-free) 2 U/μl* a *10X DNase I Buffer*, obe od firmy *Ambion™*. Takto prečistená RNA bola následne reverznou transkripciou prepísaná do cDNA použitím komerčnej súpravy *First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)*. Relatívna expresia génu *ERVW-1* bola stanovená metódou real-time (kvantitatívnou) PCR s použitím TaqMan prôb pre gén nášho záujmu – *ERVW-1* a referenčný gén, ktorým bola RnÁza P. Výsledky boli vyhodnotené v programe *QuantStudio™ 3*. Expresiu každej vzorky bola číselne vyjadrená pomocou hodnoty Ct (*cycle threshold*). Z hodnôt Ct tak bolo možné vypočítať ΔCt , ktorá už reprezentuje hodnotu relatívnej kvantifikácie: $\Delta Ct = Ct (E1) - Ct (RP)$.

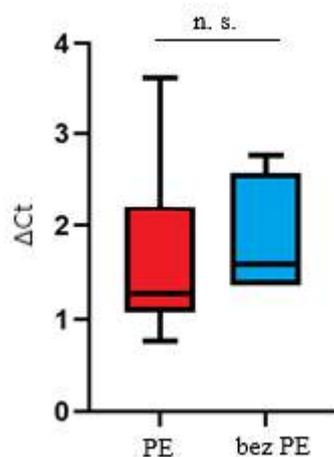
Spracovanie DNA: Na izoláciu DNA z tkanív placent bola použitá komerčná súprava *QIAGEN, DNeasy Blood & Tissue Kit (250)*. Regulačná časť génu *ERVW-1* bola amplifikovaná PCR (*Thermo Scientific, PCR Master Mix (2x)*, 7 primerových párov pokrývajúcich celú dĺžku tejto oblasti). PCR produkty boli purifikované pomocou *EXO/SAP* (alkalická fosfatáza a exonukleáza). Prečistené fragmenty boli amplifikované Sangerovou sekvenačnou reakciou (*BigDye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing RR-100* a *BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer*, obe od firmy *Applied Biosystems™*). Získané fragmenty boli analyzované genetickým analyzátorom *ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)*, a výsledné dáta spracované v programoch *VectorNTI* a *Chromas*.

Výsledky

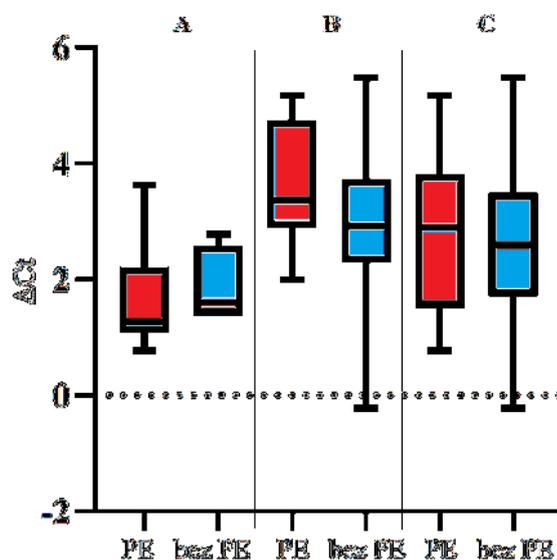
Celkovo bolo analyzovaných 9 PE a 7 fyziologických tkanív bez PE odberom 10 biopsií. V skupine PE vzoriek bola zaznamenaná nižšia priemerná hodnota ΔCt ($\Delta Ct = 1,638$), teda zvýšená expresia *ERVW-1*, ako v prípade fyziologických vzoriek ($\Delta Ct = 1,922$) (Obr. 1). Rozdiel medzi vzorkami s PE a bez PE sa nepreukázal ako štatisticky signifikantný (t-test, $p = 0,578$).

Tieto výsledky boli porovnané s archívnymi vzorkami (12 PE a 26 bez PE), pri ktorých sa odoberali len tri biopsie z každej placenty. Takto bolo analyzovaných štatisticky vyhodnotených celkovo 21 PE tkanív a 33 tkanív bez PE (Obr. 2)

Michal Svoboda, Petra Priščáková, Vanda Repiská: Úloha *ERVW-1* a syncytínu-1 v rozvoji gestačných hypertenzných ochorení. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 177-182



Obrázok 1 Relatívna expresia *ERVW-1* vyjadrená ΔCt (cycle threshold). Celkovo bolo analyzovaných 9 PE (preeklampsia) tkanív a 7 tkanív bez PE. Priemerná relatívna expresia bola v prípade vzoriek bez diagnostikovanej PE nižšia ($\Delta Ct = 1,922$) ako pri vzorkách s diagnostikovanou PE ($\Delta Ct = 1,638$); t-test, $p = 0,578$.



Obrázok 2 Relatívna expresia *ERVW-1* vyjadrená ΔCt (cycle threshold). Sekcia A znázorňuje náš súbor 16 placent a naznačuje zvýšenú expresiu v PE skupine. Sekcia B reprezentuje výsledky archívneho súboru vzoriek a naznačuje zníženú expresiu v PE skupine. Sekcia C zahŕňa spojenie nášho a archívneho súboru a naznačuje taktiež zníženú expresiu v PE (preeklampsia) skupine.

Po spojení oboch súborov bola v skupine PE vzoriek zaznamenaná vyššia priemerná hodnota ΔCt ($\Delta Ct = 2,817$) ako v prípade fyziologických vzoriek ($\Delta Ct = 2,717$). Tieto výsledky naznačujú zníženú expresiu génu *ERVW-1* v PE skupine. Rozdiel medzi PE a bez PE skupinami

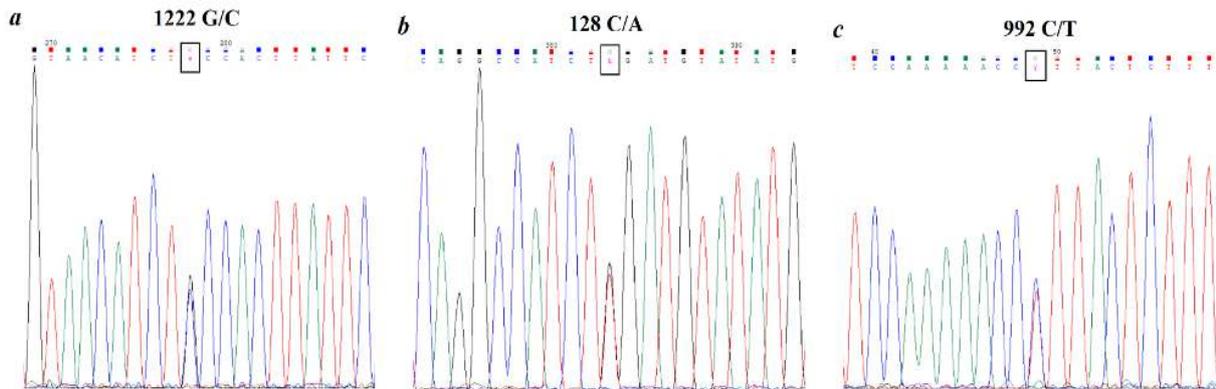
Michal Svoboda, Petra Priščáková, Vanda Repiská: Úloha *ERVW-1* a syncytínu-1 v rozvoji gestačných hypertenzných ochorení. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 177-182.

Súbor vzoriek	PE	Bez PE	SD	SD	t-test
Nové vzorky (10 biopsii)	1,638	1,922	0,856	0,571	p = 0,578
Archívne vzorky (3 biopsie)	3,660	2,980	0,959	1,533	p = 0,108
Všetky vzorky	2,817	2,717	1,337	1,259	p = 0,785

Tabuľka 1 Zhrnutie výsledkov kvantitatívnej PCR rôznych súborov vzoriek (ΔCt).
SD – štandardná odchýlka

však nebol štatisticky signifikantný (t-test, $p = 0,785$). Zhrnutie výsledkov kvantitatívnej PCR jednotlivých súborov vzoriek je uvedené v Tab.1.

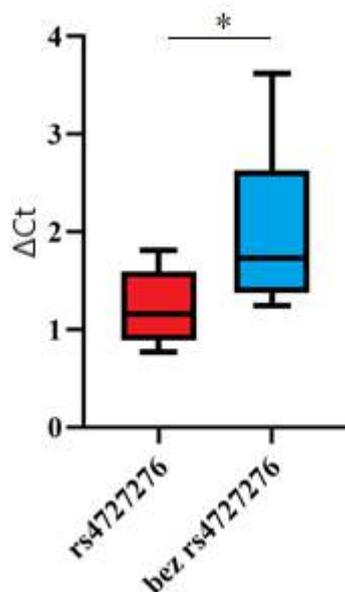
V regulačnej oblasti génu *ERVW-1* bolo identifikovaných viacero variantov (Obr. 3). Najčastejšie vyskytujúci sa variant bol v polohe 1222 bp (rs4727276) referenčnej sekvencie a bol identifikovaný pri štyroch PE vzorkách a jednej vzorke bez PE. Tento variant sa nachádza v oblasti URE (*upstream regulatory element*) a mohol by mať vplyv na expresiu *ERVW-1*. Zvyšné dva varianty sa vyskytli iba po jednom (128 C/A (rs112171707) v PE vzorke; 992 C/T (rs192755521) vo vzorke bez PE a nenachádzajú sa v žiadnej špecifickej oblasti regulačnej oblasti *ERVW-1*.



Obrázok 3 Typy identifikovaných variantov v regulačnej oblasti *ERVW-1*. Sekcia a. znázorňuje variant v pozícii 1222 bp referenčnej sekvencie zasahujúci do URE; sekcia b. a c. znázorňuje varianty nachádzajúce sa mimo špecifickej oblasti regulačnej oblasti *ERVW-1*.

Po identifikácii variantu rs4727276 bol štatisticky vyhodnotený rozdiel relatívnej expresie medzi vzorkami, v ktorých bol tento variant prítomný a vzorkami bez neho (Obr. 4). Skupina s variantom rs4727276 vykazovala vyššiu expresiu *ERVW-1* ($\Delta Ct = 1,222$), ako v prípade skupiny bez variantu ($\Delta Ct = 2,054$). Tento rozdiel bol štatisticky signifikantný (t-test, $p = 0,0426$).

Michal Svoboda, Petra Prišćáková, Vanda Repiská: Úloha *ERVW-1* a syncytínu-1 v rozvoji gestačných hypertenzných ochorení. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 177-182



Obrázok 4 Porovnanie ΔCt (*cycle threshold*) medzi vzorkami s variantom rs4727276 a bez neho. Celkovo bolo analyzovaných 5 vzoriek obsahujúcich variant rs4727276 a 11 vzoriek bez neho. Priemerná relatívna expresia bola v prípade vzoriek s identifikovaným variantom rs4727276 vyššia ($\Delta Ct = 1,222$) ako pri vzorkách bez identifikovaného variantu rs4727276 ($\Delta Ct = 2,054$); t-test, $p=0,0426$.

Diskusia

Celkové výsledky kvantitatívnej PCR neboli jednoznačné. Naše dáta naznačovali zníženú expresiu génu *ERVW-1* vo fyziologicky normálnej skupine vzoriek. Tieto dáta tak oponujú predošlým publikáciám, ktoré tvrdia, že v prípade preeklampsie je expresia génu *ERVW-1* niekoľko krát nižšia (4,5). Po spojení našich výsledkov s archívnymi vzorkami sme dostali výsledky naznačujúce opačný trend.

Jedným z vysvetlení nekonzistentnosti týchto výsledkov by mohla byť nejednotnosť odberu vzoriek z tkaniva placenty. Uvedené publikácie vykonávali biopsie iba v blízkosti pupočníka, čo pravdepodobne nereprezentuje presnú expresiu vysoko heterogénneho tkaniva akým je placenta. Expresia génu *ERVW-1* sa takisto môže v určitej časti placenty zvyšovať a v inej zase znižovať, pričom tento trend by nebolo možné zachytiť biopsiou jediného miesta.

V prípade archívnych vzoriek bol pri biopsii využitý iný odberový protokol, pri ktorom sa z každej placenty odoberali iba tri vzorky, čo takisto pravdepodobne nevedlo k spoľahlivej reprezentácii expresie *ERVW-1* v jednotlivých placentách. V našom prípade sme mali k dispozícii až 10 vzoriek z každej placenty, čím sme sa snažili o čo najpresnejšiu charakterizáciu jej relatívnej expresie. Budúce experimenty by sa mohli pridržať návrhu viacerých, presne charakterizovaných biopsií a následne tieto špecifické miesta porovnať medzi jednotlivými placentami navzájom.

Ďalším z potenciálnych problémov odporujúcich si výsledkov je samotná diagnostika PE. Diagnostika PE je primárne symptomologická. Symptómy PE však nie sú také vzácne a zachytená hypertenzia alebo proteinúria môžu mať aj rozdielnu príčinu. Tento fakt znamená, že by do našej skupiny PE vzoriek mohla byť zaradená aj vzorka bez PE, vykazujúce podobné

Michal Svoboda, Petra Priščáková, Vanda Repiská: Úloha ERVW-1 a syncytínu-1 v rozvoji gestačných hypertenzných ochorení. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 177-182.

symptómy. Špecifickým problémom by v klinickej praxi mohli byť aj prípady, kedy symptómy PE nemusia byť takmer vôbec manifestované a PE sa neskôr predsa len rozvinie.

V regulačnej oblasti génu *ERVW-1* sa nám podarilo identifikovať viacero variantov. Najčastejšie vyskytujúcim sa variantom bol variant v pozícii 1222 bp referenčnej sekvencie (rs4727276) a bol prítomný aj v PE vzorkách aj vo vzorkách bez PE. Tento variant sa nachádza v regulačnej oblasti URE (*upstream* regulačný element), čo by mohlo mať vplyv na expresiu génu *ERVW-1*. Taktiež už bol v minulosti identifikovaný v publikácii venujúcej sa variantom v regulačnej oblasti *ERVW-1* a PE (7). Vzhľadom na zvýšenú frekvenciu výskytu rs4727276 v našich vzorkách a jeho lokalizáciu v URE sme sa rozhodli porovnať expresiu vzoriek obsahujúcich tento variant a tých, v ktorých sa nenachádzal. Zaujímavé je, že vzorky s identifikovaným rs4727276 vykazovali výrazne zvýšenú expresiu *ERVW-1* ($\Delta Ct = 1,222$) ako vzorky v ktorých identifikovaný nebol ($\Delta Ct = 2,054$) (t-test. $p = 0,0426$). Po vyhľadani príslušného variantu v databázach sa nám nepodarilo overiť jeho klinický význam. Pre potvrdenie vplyvu rs4727276 bude potrebná analýza väčšieho súboru vzoriek.

Dovoľujeme si poďakovať Ministerstvu zdravotníctva Slovenskej republiky za finančnú podporu na riešenie projektu MZSR 2018/40-LFUK-14 s názvom SYNCYTÍN-1 ako nový marker preeklampsie, druhej najčastejšej príčiny úmrtia gravidných žien, ako aj Ministerstvu školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky za finančnú podporu na riešenie projektu VEGA 1/0168/18 s názvom Štúdium etiológie preeklampsie – druhej najčastejšej príčiny úmrtia gravidných žien.

Zoznam použitej literatúry

1. Beňová, K., Novotný, R. (2011) Hypertenzia v gravidite. *Via Practica*. 8(1): 17–22)
2. Braunthal, S., Brateanu, A. (2019) Hypertension in pregnancy: Pathophysiology and treatment. *SAGE Open Med*. 7:2050312119843700.
3. Carty, D.M., Delles, C., Dominiczak, A.F. (2010). Preeclampsia and future maternal health. *J. Hypertens.*, 28(7):1349-1355.
4. Lee, X., Keith, J.C. Jr., Stumm, N. a spol. (2001) Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia. *Placenta*. 22(10):808-812.
5. Ruebner, M., Strissel, P.L., Ekici, A.B. a spol. (2013) Reduced syncytin-1 expression levels in placental syndromes correlates with epigenetic hypermethylation of the ERVW-1 promoter region. *PLoS One*. 8(2):e56145.
6. Priščáková, P., Korbeľ, M., Nižňanská, Z. a spol. (2020). A proper placental sampling for syncytin-1 analysis. *BioTechniques*, 69(6), 427–435.
7. Priščáková, P., Konkolová, J., Petrovič, R., Lipov, J., Bhmer, D., Repiská, V., Gbelcová, H. (2016) ERVW-1 gene polymorphisms related to preeclampsia. *Bratisl. Lek. Listy*. 117(6):340-344.

Ľubica Janovičová, Ana Ivanová, Lenka Reismüllerová, Peter Celec: Extracellular DNA and DNase activity in seminal plasma. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 183-186.

37. Extracellular DNA and DNase activity in seminal plasma

MSc. Ľubica Janovičová¹
(normal and pathologic physiology)

Co-authors: MSc. Ana Ivanová², Lenka Reismüllerová MD PhD MPH²

Supervisor: assoc. prof. Peter Celec MD, Dipl Ing., Dr. Rer. Nat., DSc., MPH¹

¹Institute of molecular biomedicine, Comenius university, Medical faculty, Bratislava, Slovakia,

²Reproduction Clinic Iscare, Bratislava, Slovakia

Introduction

Male infertility affects as many as 2% of men and may be due to decreased motility, abnormal morphology, or decreased concentration of sperm [1]. Male infertility is associated with the increased sperm DNA fragmentation [2]. Release of DNA into seminal plasma may signify decreased fertility and increased DNA fragmentation. DNA that is released into the body fluids due to cell death is termed extracellular DNA (ecDNA). High concentration of ecDNA in seminal plasma was found to be associated with decreased viability, abnormal morphology and decreased motility [3]. Mitochondrial ecDNA (mtDNA) is in the same way associated with the sperm quality and viability [4]. High ecDNA concentration may not only suggest decreased fertility but may indicate disease state. Patients with prostate cancer have high ecDNA concentration in seminal plasma [5]. EcDNA is proposed marker but it is a molecule which when recognized by immune system may lead to inflammation. Its role in seminal plasma remains yet unknown. There are enzymes, deoxyribonucleases (DNases) that cleave DNA intracellularly and extracellularly. If present in seminal plasma, they could facilitate ecDNA cleavage. The aim of this study was to describe total ecDNA, ncDNA and mtDNA concentration in seminal plasma and measure DNase activity in seminal plasma.

Materials and methods

Study included seminal plasma (n=254) from patients visiting the Iscare clinic. The determination of viability, motility, morphology and concentration were a part of the standard automated semen analysis. Seminal plasma was filtered and additionally centrifuged at 16 000 x g for 10 min at 4°C. EcDNA was isolated from 200 µl of seminal plasma using the QIAamp 96 DNA Blood kit. Concentration of total ecDNA was measured using a fluorometric method, the AccuBlue dsDNA High Sensitivity kit. The subcellular origin of ecDNA was determined using the real-time PCR for nuclear ecDNA (ncDNA) and mtDNA. Shortly, real-time PCR started with the initial denaturation at 98°C for 3 min. This was followed by 40 cycles of denaturation at 98°C for 15 sec, annealing at 51/47°C (ncDNA/mtDNA) for 30 sec and extension at 60°C for 30 sec.

DNase activity was measured using the single-radial enzyme-diffusion assay. Shortly, 100 ml agarose gels containing 1% agarose, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 0.5 M Tri HCl (pH=7.5), 0.5 mg/ml DNA from chicken livers and fluorescent dye Goodview were prepared. Small holes were punched into the gels. Samples (1 µl) were pipetted into the wells. Gels were incubated at 37°C for 16 hours in dark. Then, pictures were made using the UVP iBOX fluorescence imaging system. The diameter of circles that were on gels were measured using the ImageJ software and DNase activity was recalculated based on the DNase activity of standards that was Qiagen RNase-free DNase set.

Statistical analysis was done using the GraphPad Prism 9 software. Data are presented as mean with standard deviation. $\alpha < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Total ecDNA concentration was measured in seminal plasma samples. The concentration of total ecDNA positively correlated with the age of patients. Older men had more total ecDNA in seminal plasma (Figure 1A; $p < 0.01$; $r = 0.20$). Sperm concentration had a positive correlation with total ecDNA in seminal plasma. The more cells were in seminal plasma the more total ecDNA was found there (Figure 1B; $p < 0.01$; $r = 0.22$). Similarly, progressive motility had positive correlation with total ecDNA in seminal plasma (Figure 1C; $p < 0.05$; $r = 0.14$). The percentage of cells with normal morphology did not correlate with total ecDNA in seminal plasma (Figure 1D; $p = 0.64$; $r = 0.03$). DNase activity in seminal plasma did not correlate with total ecDNA (Figure 1E; $p = 0.35$; $r = -0.07$).

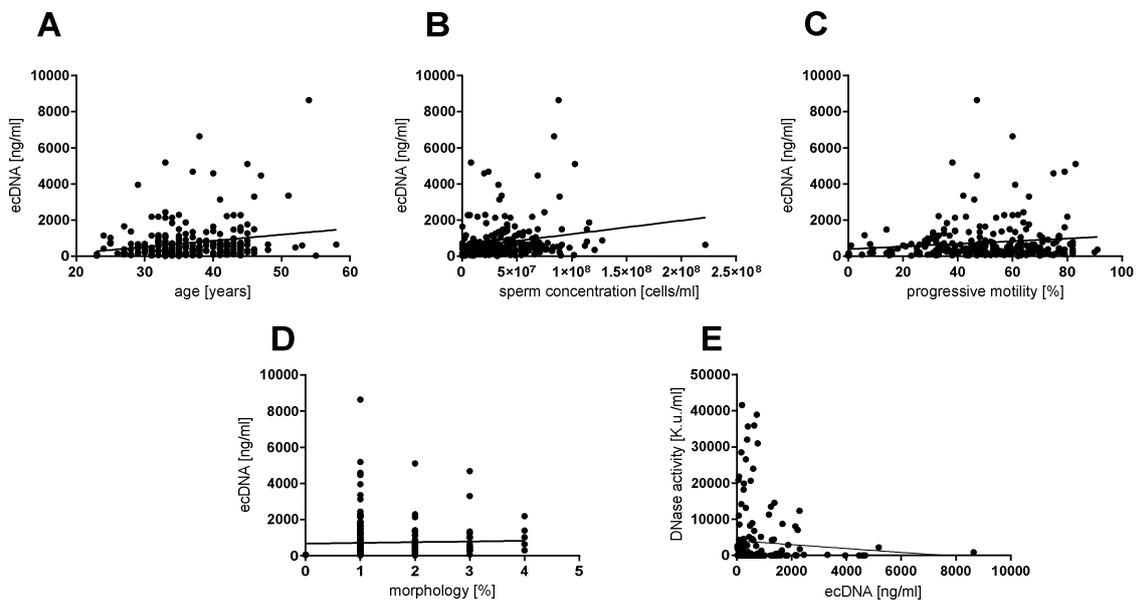


Figure 1. Correlation of ecDNA and DNase activity with fertility parameters in seminal plasma. A) ecDNA concentration increases with age. B) ecDNA has positive correlation with sperm concentration. C) ecDNA has positive correlation with progressive sperm motility D) Correlation of ecDNA and % of cells with normal morphology. E) DNase activity did not correlate with total ecDNA concentration in seminal plasma.

Total ecDNA in seminal plasma was analyzed based on the diagnosis. Generally, high variability was observed in total ecDNA, ncDNA and mtDNA. Lower concentration of total ecDNA was observed in seminal plasma of men with oligo-astheno-teratospermia (Figure 2A). No differences were observed between patients based on their diagnosis (Figure 2B, C). Coefficient of variation of total ecDNA concentration was 118% in normozoospermia, 64% in astheno-teratozoospermia, 147% in oligo-teratozoospermia, 102 % in oligo-astheno-teratospermia and 64% in azoospermia. Coefficient of variation of ncDNA concentration was 319% in normozoospermia, 89% in astheno-teratozoospermia, 222% in oligo-teratozoospermia, 152 % in oligo-astheno-teratospermia and 115% in azoospermia. High variability was observed in mtDNA concentration too with coefficient of variation 163% in normozoospermia, 99% in astheno-teratozoospermia, 106% in oligo-teratozoospermia, 107 % in oligo-astheno-teratospermia and 89% in azoospermia.

Lúbicová Janovičová, Ana Ivanová, Lenka Reismüllerová, Peter Celec: Extracellular DNA and DNase activity in seminal plasma. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 183-186.

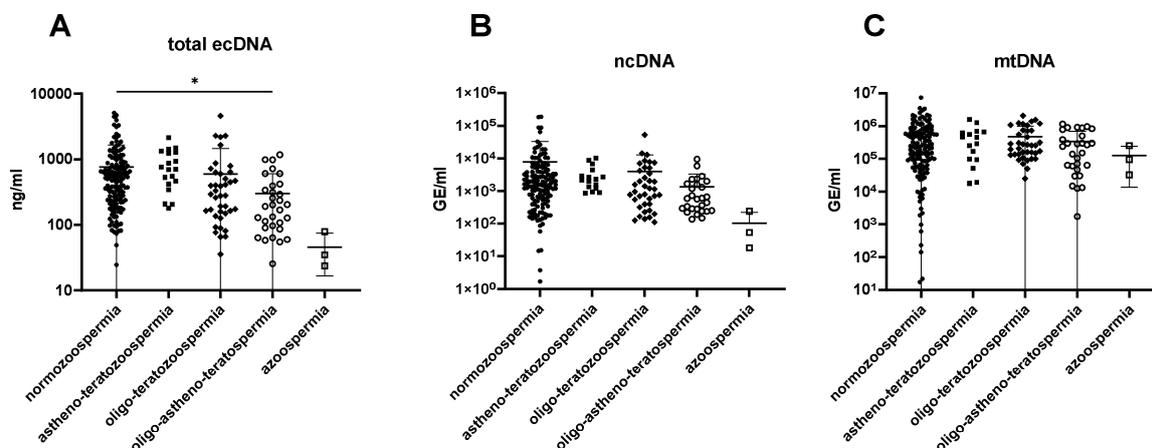


Figure 2. Total ecDNA, ncDNA and mtDNA concentration in seminal plasma. A) Total ecDNA concentration was lower in patients with oligo-astheno-teratospermia in comparison to normozoospermia. B) No differences were observed between diagnoses in neither ncDNA nor C) mtDNA concentration in seminal plasma.

Discussion

There are few studies documenting ecDNA concentration in seminal plasma. Two studies describe the association of decreased fertility the higher is the ecDNA concentration [3, 6]. One study focuses on mtDNA and documents similar association with decreased fertility [4]. Here, we described the correlation between sperm concentration, sperm motility and ecDNA. These parameters were found to be associated with decreased fertility. Our results support these findings. Aforementioned study with mtDNA has shown that mtDNA copy number is lower in asthenozoospermia and oligoasthenozoospermia [4]. However, our results show that mtDNA concentration has high variability and no differences were observed. EcDNA is one of targets for the treatment of some diseases where high concentration of ecDNA is released. The inflammatory properties were not examined and the role of ecDNA as damage-associated molecular pattern was not investigated. EcDNA concentration in seminal plasma was found to be a good predictor of prostate cancer and benign prostate hyperplasia [7, 8]. DNase activity was high in seminal plasma in comparison to what was observed in human plasma. There are so far, no studies describing DNase activity of seminal plasma. It could be potentially an important mechanism of removal of ecDNA from seminal plasma. More studies are needed to understand the consequences of high ecDNA concentration in seminal plasma.

References

1. Kumar, N. and A.K. Singh, *Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature*. J Hum Reprod Sci, 2015. 8(4): p. 191-6.
2. Zeqiraj, A., et al., *Male Infertility and Sperm DNA Fragmentation*. Open Access Maced J Med Sci, 2018. 6(8): p. 1342-1345.
3. Costa, F., et al., *Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria*. Zygote, 2017. 25(2): p. 111-119.
4. Chen, Y., et al., *Seminal plasma cell-free mitochondrial DNA copy number is associated with human semen quality*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2018. 231: p. 164-168.
5. Ponti, G., et al., *Seminal Cell-Free DNA Assessment as a Novel Prostate Cancer Biomarker*. Pathol Oncol Res, 2018. 24(4): p. 941-945.

Ľubica Janovičová, Ana Ivanová, Lenka Reismüllerová, Peter Celec: Extracellular DNA and DNase activity in seminal plasma. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 183-186.

6. Di Pizio, P., et al., *Seminal cell-free DNA and sperm characteristic's: An added biomarker for male infertility investigation*. *Andrologia*, 2021. 53(1): p. e13822.
7. Ponti, G., et al., *Seminal Cell Free DNA Concentration Levels Discriminate Between Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia*. *Anticancer Res*, 2018. 38(9): p. 5121-5125.
8. Ponti, G., et al., *Quick assessment of cell-free DNA in seminal fluid and fragment size for early non-invasive prostate cancer diagnosis*. *Clin Chim Acta*, 2019. 497: p. 76-80.

Lívia Gajdošová, Martina Horváthová, Cynthia Sárkányová, Jana Muchová: Vplyv kombinovanej intervencie (výživová intervencia proteínmi a fyzická aktivita) na molekulárne mechanizmy sarkopénie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 187-191.

38.Vplyv kombinovanej intervencie (výživová intervencia proteínmi a fyzická aktivita) na molekulárne mechanizmy sarkopénie

Mgr. Lívia Gajdošová¹
(biochémia)

Spoluautori: Mgr. Martina Horváthová, PhD.¹, Bc. Cynthia Sárkányová¹

Školiteľ: doc. RNDr. Jana Muchová, PhD.¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK

Úvod

Starnutie je spojené so zníženou schopnosťou organizmu vytvárať adaptačné stresové reakcie na vonkajšie podnety, akými je napríklad reakcia na náhle zmeny zdravotného stavu. So zvyšujúcim sa vekom dochádza k funkčnému poklesu fyziologických rezerv organizmu, čo prispieva k homeostatickej nerovnováhe (1). V dôsledku toho je telo náchylnejšie na stres, choroby a rôzne zranenia, čo vedie k patológiám súvisiacim s vekom (2-4). K častým ochoreniam, ktoré sa vyskytujú počas starnutia, patrí sarkopénia. Sarkopénia je stav, pri ktorom dochádza k progresívnej strate hmoty kostrových svalov, poklesu svalovej sily a poruchám ich funkčnosti (5). Poznatky o molekulových mechanizmoch, ktoré sa uplatňujú v patofyziológii sarkopénie a tiež poznatky o vplyve kombinovanej intervencie (výživová intervencia stravou obohatenou o proteíny a fyzická aktivita) môžu priniesť zlepšenie kvality života v starobe a predĺženie obdobia zdravého starnutia. Najmä nízky príjem proteínov môže závažne ovplyvniť celkový stav organizmu, preto je potrebné venovať pozornosť výskumu v oblasti vplyvu nutričov na vývoj sarkopénie. Cieľom tejto štúdie bolo sledovať vplyv výživovej intervencie (proteíny) a kombinovanej intervencie (výživová intervencia proteínmi a cvičenie na bežiacom páse) na hladiny myostatínu, aktívínu A, folistatínu vo svale *m. extensor digitorum longus* (EDL) a pro-kolagénového peptidu N-koncovej oblasti typu III (P3NP) v plazme mladých a starých potkanov a preskúmať tak možné priaznivé účinky proteínov a cvičenia na proces sarkopénie.

Materiál a metódy

Do štúdie bolo zaradených 33 samcov laboratórnych potkanov (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar v dvoch vekových kategóriách: mladé potkany (MP) vo veku 3 – 4 mesiacov (n = 15) a staré potkany (SP) vo veku 24 – 25 mesiacov (n = 18). Pred začiatkom experimentu boli zvieratá každej vekovej skupiny randomizovane rozdelené do troch skupín:

skupina (M/SPC) – zvieratá kŕmené štandardnou stravou po dobu 5 týždňov,

skupina (M/SP1) – zvieratá kŕmené štandardnou stravou + suplementácia proteínmi (1g/kg hmotnosti) denne po dobu 2 týždňov,

skupina (M/SP1EX) – zvieratá kŕmené štandardnou stravou + suplementácia proteínmi (1g/kg hmotnosti) denne po dobu 2 týždňov + 3 týždne kombinovaná intervencia (suplementácia proteínmi + cvičenie s frekvenciou 5x/týždeň)

Projekt bol schválený Etickou komisiou a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky. Experimentálne zvieratá boli chované v klietkach v skupinách po troch a mali zabezpečený stály prístup k pitnej vode a potrave *ad libitum*. V miestnosti bola udržiavaná stála teplota vzduchu 22±2 °C, vlhkosť 50±5 % a svetelný režim (12 hodín svetla/12 hodín tmy). Potkany v cvičiacich skupinách boli nútené behať na motorizovanom bežiacom páse pre hlodavce (Rodent Treadmill, Ugo Basile, Taliansko). Počas aklimatizácie (týždeň pred začiatkom intervencie) potkany behali na páse

Lívia Gajdošová, Martina Horváthová, Cynthia Sárkányová, Jana Muchová: Vplyv kombinovanej intervencie (výživová intervencia proteínmi a fyzická aktivita) na molekulárne mechanizmy sarkopénie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 187-191.

v rovine pri konštantnej rýchlosti 12 m/min po dobu 5 minút. Následne prvý týždeň behali na naklonenej rovine so sklonom 5° a ďalší týždeň sa záťaž zvýšila naklonením roviny na 10°, pričom behali denne po dobu 10 minút, 5x týždenne s rýchlosťou 12 m/min. Po skončení experimentu boli zvieratá usmrtené dekapitáciou a následne im boli odobraté vzorky krvi a svalu EDL, ktoré sme zmrazili v tekutom dusíku a uskladnili v mraziacom boxe pri teplote -80°C až do analýzy. Z odobratých tkanív EDL sme pred samotnou analýzou pripravili homogenáty na stanovenie jednotlivých parametrov podľa odporúčaní výrobcov použitých diagnostických setov. Koncentráciu proteínov sme stanovili pomocou setu na stanovenie proteínov (BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific, USA). Koncentráciu myostatínu, aktivínu A a folistatínu sme stanovili vo svale *m. extensor digitorum longus* (EDL), ktorý obsahuje vlákna typu II (rýchle vlákna) metódou ELISA pomocou komerčných setov (Quantikine® ELISA GDF-8/Myostatin Immunoassay, R&D Systems, Inc., USA; Rat Activin A (ACV-A) ELISA Kit, Cusabio, Čína; Rat Follistatin (FS) ELISA Kit, Cusabio, Čína) presne podľa inštrukcií výrobcu. Výsledky sme následne prepočítali na g proteínov a vyjadrili v ng/g proteínu. Na stanovenie P3NP sme použili komerčný set Procollagen III N-Terminal Propeptide (PIIINP) DIY ELISA Kit (MyBioSource, USA). Pre štatistickú analýzu sme použili štatistický softvér Statistica® (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) a StatsDirect® (StatsDirect Ltd., UK). Údaje sa uvádzajú ako priemer ± SD. Štatistickú významnosť sme posudzovali T-testom. Za štatisticky významné považujeme hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky

Koncentrácie myostatínu, aktivínu A, folistatínu vo svale EDL a koncentrácia P3NP v plazme sú uvedené v Tab. 1. Signifikantne nižšie hladiny myostatínu v plazme v porovnaní s MP1 pozorujeme u MP1EX ($p = 0,021$), pričom u SP nedošlo k žiadnym signifikantným zmenám.

Tab. 1: Priemerné hodnoty vybraných markerov sarkopénie u jednotlivých intervenčných skupín mladých a starých potkanov

Parameter	C	P1	P1EX
Myostatín(ng/g proteínu)			
MP	596,38±155,75	735,16±54,88	503,57±139,37 ^a
SP	607,67±147,39	621,41±207,43	537,48±31,67
Aktivín A (ng/g proteínu)			
MP	2196,63±638,29	1371,99±683,58	4328,96±1338,75 ^{a,b}
SP	3922,46±2446,53	2068,29±1105,38	2927,25±853,66
Folistatín (ng/g proteínu)			
MP	127,09±24,11	138,30±44,59	243,21±84,13 ^b
SP	93,65±13,48 ^b	127,72±43,96	170,01±13,06 ^c
P3NP (ng/ml)			
MP	13,31±2,61	16,03±3,97	14,46±3,45
SP	4,11±1,38 ^b	6,16±1,83 ^a	2,91±0,81 ^{d,e}

P3NP – pro-kolagénový peptid N-koncovej oblasti typu III; MP – mladý potkan; SP – starý potkan; C – kontrola; P1 – suplementácia proteínmi; P1EX – kombinovaná intervencia (proteíny+fyzická aktivita). Hodnoty sú uvedené ako priemer ± SD (smerodajná odchýlka); Označenie štatisticky významných rozdielov: ^a $p < 0,05$ vs. MP1; ^b $p < 0,05$ vs. MPC; ^c $p < 0,05$ vs. SPC; ^d $p < 0,05$ vs. MP1EX; ^e $p < 0,05$ vs. SP1.

Lívia Gajdošová, Martina Horváthová, Cynthia Sárkányová, Jana Muchová: Vplyv kombinovanej intervencie (výživová intervencia proteínmi a fyzická aktivita) na molekulárne mechanizmy sarkopénie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 187-191.

Pri koncentrácii aktívínu A sme signifikantne vyššie hladiny pozorovali u MP1EX v porovnaní s MP1 ($p = 0,047$) a MPC ($p = 0,028$). U SP nedošlo k žiadnym významným zmenám. Štatisticky významné zvýšenie bolo pozorované pri folistatíne u skupiny MP1EX v porovnaní s MPC ($p = 0,018$). Signifikantné zvýšenie bolo pozorované u SPC v porovnaní s MPC ($p = 0,043$), ako aj u SP1EX v porovnaní s SPC ($p = 0,001$). Hladina P3NP bola u každej skupiny SP signifikantne nižšia ($p < 0,05$) ako u MP rovnakých skupín. Ku signifikantnému zníženiu hladín došlo u SP1EX v porovnaní s SP1 ($p = 0,003$).

Diskusia

Táto štúdia skúmala vplyv výživovej intervencie a kombinovanej intervencie na vybrané parametre súvisiace so sarkopéniou. Suplementácia proteínmi, prípadne kombinovaná intervencia spojená s cvičením môžu posilniť aspekty svalovej funkcie, ktoré vykazujú poklesy súvisiace s vekom (6). Účinky mnohých doplnkov výživy, vrátane proteínov, sú posilnené cvičením/fyzickou aktivitou (7-9). Cirkulujúca hladina myostatínu súvisí s expresiou myostatínu v kostrových svaloch. Dostupné údaje, ktoré hodnotili vplyv cvičenia na hladiny myostatínu sú protichodné; niektorí autori zistili pokles cirkulujúcich hladín myostatínu (10-12), pričom iní pozorovali nárast týchto hladín (13). Podľa Paoli a kol. 2015 (14) môže cvičenie indukovať akútne zvýšenie myostatínu, avšak toto je nasledované dlhodobým znížením hladín. Dostupné údaje zo štúdie podľa Ko a kol. 2014 (15), ktoré hodnotili vplyv cvičenia na hladiny myostatínu v kostrových svaloch naznačujú, že expresia myostatínu je významne zvýšená u starých potkanov v porovnaní s mladými potkanmi, čo sme však nepozorovali. Bowser a kol. 2013 (16) pozorovali zvýšenie hladiny myostatínu vo svaloch s vláknami typu I (*soleus*), avšak vo svaloch s vláknami typu II (ako je EDL) dochádzalo spolu s vekom ku poklesu hladiny myostatínu. Naše výsledky ukázali, že v skupine mladých potkanov, ktorí podstupovali kombinovanú intervenciu (proteíny + fyzická aktivita) boli hladiny myostatínu signifikantne nižšie ako u mladých potkanov suplementovaných proteínmi bez fyzickej aktivity a nevýznamne nižšie ako u kontrolnej skupiny. Kombinovaná intervencia (proteíny + fyzická aktivita) u starých potkanov spôsobila iba nevýznamné zníženie hladín myostatínu voči skupine starých potkanov suplementovaných proteínmi bez fyzickej aktivity a kontrolnej skupine.

Aktívín A je považovaný za dôležitý kooperujúci ligand, ktorý spolu s myostatínom pôsobí pri supresii svalového rastu (17-18). Vyššie cirkulujúce hladiny aktívínu A spôsobujú závažný úbytok svalovej hmoty a svalovú atrofiu (18-22). V skupine mladých potkanov s kombinovanou intervenciou (proteíny + fyzická aktivita) sa preukázali signifikantne vyššie hladiny aktívínu A oproti skupine mladých potkanov suplementovaných proteínmi bez fyzickej aktivity a kontrolnej skupine. Podľa viacerých štúdií (23-25) sa hladiny aktívínu A spolu s vekom zvyšujú, čo sme zistili aj v našej štúdii, avšak bez potvrdenej významnosti (kontrolná skupina starých potkanov vs. kontrolná skupina mladých potkanov). U skupiny starých potkanov suplementovaných proteínmi bez fyzickej aktivity, ako aj u skupiny s kombinovanou intervenciou (proteíny + fyzická aktivita) boli v porovnaní s kontrolou SPC pozorované nevýznamne nižšie hladiny aktívínu A.

Folistatín pôsobí ako inhibítor myostatínu a aktívínu A (26-27) a jeho zvýšené hladiny súvisia s rastom svalovej hmoty (28). Hladina folistatínu u kontrolnej skupiny starých potkanov vykazovala signifikantne nižšiu hladinu v porovnaní s kontrolnou skupinou mladých potkanov, čo potvrdzuje s vekom súvisiace zníženie hladín folistatínu. Po suplementácii proteínmi sa tieto hladiny zvýšili u oboch vekových skupín, avšak tieto výsledky nie sú štatisticky významné. Hansen a kol., 2015 (29) zistili, že vplyvom cvičenia dochádza ku zvýšeniu hladiny folistatínu, čo korešponduje aj s našimi zisteniami, kedy hladiny folistatínu u mladých aj starých potkanov vykazovali signifikantne vyššie hladiny pri kombinovanej intervencii (proteíny + fyzická aktivita) v porovnaní s kontrolou, čo predpovedá pozitívny vplyv cvičenia na rast svalov. Napriek tomu zvýšené koncentrácie folistatínu u starých potkanov nedosahujú pri kombinovanej intervencii koncentráciu folistatínu u mladých.

Livia Gajdošová, Martina Horváthová, Cynthia Sárkányová, Jana Muchová: Vplyv kombinovanej intervencie (výživová intervencia proteínmi a fyzická aktivita) na molekulárne mechanizmy sarkopéniie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 187-191.

Cirkulujúce hladiny P3NP môžu odrážať zvýšenú fibrózu kostrového svalstva spojenú so starnutím, ako aj rast svalov (30,31). Hladiny P3NP u starých potkanov boli v porovnaní s mladými potkanmi signifikantne nižšie (SPC vs. MPC; SP1 vs. MP1; SP1EX vs. MP1EX: $p < 0,05$). V skupine kombinovanej intervencie (proteíny + fyzická aktivita) bola u starých potkanov pozorovaná signifikantne nižšia hladina P3NP ako u suplementovanej skupiny bez fyzickej aktivity. Fragala a kol. 2014 (32) prišli k zisteniu, že cvičebná intervencia zvyšuje hladinu cirkulujúceho P3NP, čo je však protichodné s našimi výsledkami. Vplyvom kombinovanej intervencie sme pozorovali u starých potkanov v porovnaní so suplementovanou skupinou bez fyzickej aktivity významne nižšie hladiny P3NP. Vplyvom stravy obohatenej o proteíny boli pozorované nevýznamne vyššie hladiny P3NP ako u kontrolnej skupiny, a to v oboch vekových kategóriách.

U starých potkanov sme v porovnaní s mladými v kontrolných skupinách pozorovali približne rovnaké hladiny myostatínu, vyššie hladiny aktivínu, nižšie hladiny folistatínu a nižšie hladiny P3NP. Na základe porovnania jednotlivých typov intervencií (výživová intervencia stravou obohatenou o proteíny, alebo kombinovaná intervencia stravou obohatenou o proteíny spolu s fyzickou aktivitou) môžeme povedať, že kým myostatín a aktivín A boli ovplyvnené najmä u mladých potkanov, koncentrácia folistatínu sa zvýšila aj u starých potkanov, a to významne pri kombinovanej intervencii. Koncentrácia P3NP sa u starých potkanov pri kombinovanej intervencii významne znížila. Na základe získaných výsledkov môžeme povedať, že kombinovaná intervencia (výživová intervencia stravou obohatenou o proteíny a cvičenie) má predpoklady modulovať molekulové mechanizmy, ktoré súvisia so sarkopéniou. Na upresnenie vplyvu kombinovanej intervencie je však potrebné uskutočniť ďalšie štúdie.

Podporené čiastočne projektom EÚ z programu Cezhraničnej spolupráce SR-AT – Interreg, Nutriaging V-014.

Zoznam použitej literatúry

1. Clegg A, Young J, Iliffe S, Rikkert MO, Rockwood K. Frailty in elderly people. *Lancet*. 2013;381(9868):752-762.
2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-1217.
3. Flatt T, Partridge L. Horizons in the evolution of aging. *BMC Biol*. 2018;16(1):93.
4. Mantovani E, Zucchella C, Schena F, Romanelli MG, Venturelli M, Tamburin S. Towards a Redefinition of Cognitive Frailty. *J Alzheimers Dis*. 2020;76(3):831-843.
5. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinková E, Vandewoude M, Zamboni M. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing*. 2010; 39:412-423.
6. Russ DW, Acksel C, McCorkle KW, Edens NK, Garvey SM. Effects of Running Wheel Activity and Dietary HMB and β -alanine Co-Supplementation on Muscle Quality in Aged Male Rats. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*. 2017 ;21(5):554-561.
7. Esmarck B, Andersen JL, Olsen S, Richter EA, Mizuno M, Kjaer M. Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans. *J Physiol*. 2001;535(Pt 1):301-11.
8. Wall BT, Cermak NM, van Loon LJ. Dietary protein considerations to support active aging. *Sports Med*. 2014;44 Suppl 2:S185-94.
9. Breen L, Phillips SM. Interactions between exercise and nutrition to prevent muscle waste during ageing. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;75(3):708-715.
10. Hulmi JJ, Ahtiainen JP, Kaasalainen T, et al. Postexercise myostatin and activin IIb mRNA levels: effects of strength training. *Med Sci Sports Exerc* 2007;39:289–297
11. Walker KS, Kambadur R, Sharma M, Smith HK. Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in healthy men. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:787–793

Lívia Gajdošová, Martina Horváthová, Cynthia Sárkányová, Jana Muchová: Vplyv kombinovanej intervencie (výživová intervencia proteínmi a fyzická aktivita) na molekulárne mechanizmy sarkopénie. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 187-191.

- ~~12.~~ Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J* 2004;18:1025–1027
13. Willoughby DS. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:574–582.
14. Paoli A, Pacelli QF, Neri M, et al. Protein supplementation increases postexercise plasma myostatin concentration after 8 weeks of resistance training in young physically active subjects. *J Med Food*. 2015;18(1):137-143.
15. Ko IG, Jeong JW, Kim YH, et al. Aerobic exercise affects myostatin expression in aged rat skeletal muscles: a possibility of antiaging effects of aerobic exercise related with pelvic floor muscle and urethral rhabdosphincter. *Int Neurourol J*. 2014;18(2):77-85.
16. Bowser M, Herberg S, Arounleut P, et al. Effects of the activin A-myostatin-follistatin system on aging bone and muscle progenitor cells. *Exp Gerontol*. 2013;48(2):290-297.
17. Lee SJ, Lee YS, Zimmers TA, et al. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol Endocrinol*. 2010;24(10):1998-2008
18. Latres E, Mastaitis J, Fury W, et al. Activin A more prominently regulates muscle mass in primates than does GDF8. *Nat Commun*. 2017;8:15153.
19. Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H, Bradley A. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(19):8817-8821.
20. Chen JL, Walton KL, Winbanks CE, et al. Elevated expression of activins promotes muscle wasting and cachexia. *FASEB J*. 2014;28(4):1711-1723.
21. Trendelenburg AU, Meyer A, Jacobi C, et al. TAK-1/p38/nNFκB signaling inhibits myoblast differentiation by increasing levels of Activin A. *Skeletal Muscle* 2. 2012;3.
22. Zhou X, Wang JL, Lu J, et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell*. 2010;142(4):531-543.
23. Loria P, Petraglia F, Concari M, et al. Influence of age and sex on serum concentrations of total dimeric activin A. *Eur J Endocrinol*. 1998;139(5):487-492.
24. Baccarelli A, Morpurgo P, Corsi A, Vaghi I, Fanelli M, Cremonesi G, Vaninetti S, Beck-Peccoz P, Spada A. Activin A serum levels and aging of the pituitary-gonadal axis: a cross-sectional study in middle-aged and elderly healthy subjects. *Exp Gerontol*. 2001;36:1403–12.
25. Hurwitz JM, Santoro N. Inhibins, activins and follistatin in the aging female and male. *Semin Reprod Med*. 2004;22:209–17.
26. Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*. 1990;247(4944):836-838.
27. Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):9306-9311.
- ~~28.~~ Lee SJ. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PLoS One*. 2007;2(8):e789.
- ~~29.~~ Hansen J, Brandt C, Nielsen AR, et al. Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine [published correction appears in *Endocrinology*. 2015 Mar;156(3):1200]. *Endocrinology*. 2011;152(1):164-171.
30. Santanasto AJ, Cvejkus RK, Wojczynski MK, Marron MM, Schupf N, Christensen K, Thyagarajan B, Zmuda JM. Circulating Procollagen type III N-terminal peptide (P3NP) and Physical Function in Adults from The Long Life Family Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020 Aug 14:glaa197.
31. Berry SD, Ramachandran VS, Cawthon PM, et al. Procollagen type III N-terminal peptide (P3NP) and lean mass: a cross-sectional study. *J Frailty Aging*. 2013;2(3):129-134.
32. Fragala MS, Jajtner AR, Beyer KS, et al. Biomarkers of muscle quality: N-terminal propeptide of type III procollagen and C-terminal agrin fragment responses to resistance exercise training in older adults. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2014;5(2):139-148.

Kristína Macáková, Nadja Ivašková, Barbora Konečná, Michal Pastorek, Barbora Vlková, Peter Celec: Neutrofilý v patogenéze reumatoidnej artritídy. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 192-195.

39. Neutrofilý v patogenéze reumatoidnej artritídy

**Mgr. Kristína Macáková
(normálna a patologická fyziológia)**

Spoluautori: Nadja Ivašková, Barbora Konečná, Michal Pastorek, Barbora Vlková, Peter Celec
Školiteľ: RNDr. Barbora Vlková, PhD.
Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Bratislava.

Úvod

Reumatoidná artritída (RA) je zápalová, chronická autoimunitná choroba. Aj keď sa jedná o pomerne častú chorobu, etiopatogenéza tejto choroby nie je úplne známa. Charakteristickými znakmi pre RA je prítomnosť protilátok voči imunoglobulínu G a voči citrulinovaným proteínom [1]. Prítomnosť citrulinovaných proteínov zvyšuje imunogenicitu a ich prítomnosť v kĺboch koreluje so závažnosťou choroby [2]. Z tohto dôvodu sa v posledných rokoch výskum upriamuje na štúdium neutrofilov, najpočetnejších, efektorových buniek vrodenej imunity, nakoľko ich funkcie môžu viesť k zvýšenému výskytu citrulinovaných proteínov [3].

Neutrofilý vo svojej imunitnej reakcii môžu využívať tri typy ciest a to fagocytózu, degranuláciu a uvoľňovanie neutrofilových, extracelulárnych sietí (NETov) v procese nazývanom som sa NETóza [3]. NETy sú štruktúry pripomínajúce siete, ktoré sú pri imunitnej odpovedi vylúčené do extracelulárneho priestoru s cieľom zneškodniť pôvodcu zápalu. NETy tvoria viacero zložiek a pre väčšinu z nich sú charakteristické antimikrobiálne vlastnosti. K zložkám NETov patrí DNA a proteíny ako napríklad históny, neutrofilová elastáza, myeloperoxidáza, kalprotektín, katelicidín, aktín a defenzíny [4]. Jedným z kľúčových komponentov NETov sú práve históny a proces ich citrulinácie. Citrulinované históny tak vytvárajú ďalší podnet pre produkciu nových protilátok, čo vedie k zhoršeniu stavu. Okrem toho samotná prítomnosť protilátok podmieňuje tvorbu nových NETov [5]. Takáto imunitná odpoveď vytvára začarovaný kruh, kde prítomnosť komponentov v samotných NEToch podmieňuje tvorbu protilátok, ktoré sú sami o sebe príčinou/spúšťačom NETózy. Práve takáto reakcia môže teda viesť k zhoršeniu zápalu a stavu [6].

Z tohto dôvodu sa náš experiment zameria na funkčnú analýzu neutrofilov, fokusovanú na tvorbu NETov. Naším cieľom bolo zistiť či tvorba NETov je zvýšená v prípade RA a taktiež objasniť či hyperreaktivita neutrofilov, ktorá vedie k zvýšenej tvorbe NETov pri RA, je spôsobená endogénne, čo znamená, že za zvýšenou tvorbou NETov stoja samotné neutrofilý, alebo činnosť neutrofilov ovplyvňujú exogénne faktory ako imunogénne častice, ktorých príkladom sú mitochondrie alebo baktérie. Z tohto dôvodu boli do tejto štúdie zaradené tri skupiny pacientov. Pacienti s RA, ktorí boli rozdelení do dvoch podskupín a to pacienti s nasadenou biologickou, imunosupresívnou liečbou a RA pacienti bez liečby. Kontrolnou skupinou boli pacienti s artrózou.

Materiál a metódy

Pacienti:

V tejto štúdií boli použité krvné vzorky od 37 pacientov. Pacienti na základe diagnózy a liečby boli zaradení do troch skupín. Pacienti s reumatoidnou artritídou liečení imunosupresívnou, biologickou liečbou (22), pacienti s diagnostikovanou RA bez imunosupresívnej liečby (5), kontrolnou skupinou boli pacienti s artrózou (10). Krvné vzorky, ktoré boli pacientom odobraté, boli využité na izoláciu neutrofilov.

Izolácia neutrofilov:

Krvné vzorky boli získané od všetkých skupín zahrnutých v tomto projekte. Pacientská krv sa navrstvila v pomere 1:1 na polymorf (AN221725, Accurate Chemical & Scientific Corp). Ďalším krokom bola centrifugácia (30 min., 550g pri 24 °C). Po gradientovej centrifugácii sa odobrala len vrstva, ktorá

Kristína Macáková, Nadja Ivašková, Barbora Konečná, Michal Pastorek, Barbora Vlková, Peter Celec: Neutrofilý v patogenéze reumatoidnej artritídy. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 192-195.

obsahovala neutrofilý. Odobraté neutrofilý sa inkubovali počas 5 min s 0,45 % NaCl. Po 5 min sa objem doplnil s RPMI-1640. Nasledovala ďalšia centrifugácia (10 min., 220g pri izbovej teplote). Po centrifugácii sa odstránil supernatant a pelet sa rozsuspendoval v 20 ml 0,2 % NaCl a po 20 s sa pridal rovnaký objem 1,6 % NaCl z dôvodu potrebnej lýzy erytrocytov. Po lýze nasledovala posledná centrifugácia (10 min., 220g pri izbovej teplote). Po centrifugácii sa supernatant odstránil a pelet obsahujúci neutrofilý sa rozsuspendoval v 1 ml RPMI-1640 s 10% FBS.

Netóza:

Na detekciu tvorby NETov v rôznych podmienkach sme využili DNA viažúce sa farbivo Sytox Green dye pri vlnovej dĺžke: excitácia 488 nm a emisia 525 nm (Life Technologies). Tvorba NETov bola pozorovaná v rôznych podmienkach/stimuloch, ktoré mali za úlohu mimikovať sterilný alebo bakteriálny zápal. Za týmto účelom boli využité ľudské mitochondrie, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* s MOI 80 a MOI 8 (MOI = multiplicity of infection). Neutrofilý boli k reagentom pridávané v počte 100 000 neutrofilov na jamku. Neutrofilý boli spoločne s reagentmi inkubované 3 hod. pri 5 % CO₂ a 37 °C. Výsledná/celková DNA prítomná v neutrofiloch sa určila na základe fluorescenčných hodnôt z jamiek, kde boli neutrofilý lyzované 0,1 % Tritonom-X-100. Na výpočet percenta tvorby NETov sa od každých podmienok odčítala fluorescencia negatívnej kontroly čiže jamky kde boli iba neutrofilý s médiom. Na pozitívnu kontrolu sme využili forbol-12-myristát-13-acetát (PMA) s výslednou koncentráciou 100 nM.

Štatistická analýza:

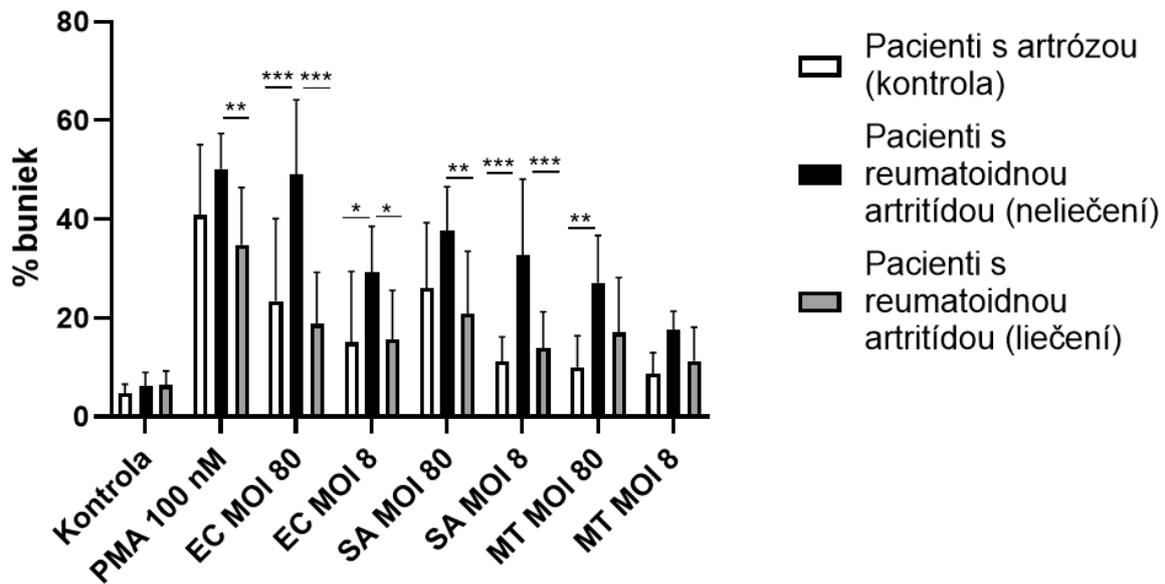
Získané výsledky boli spracované v programe GraphPad Prism (verzia 8.0.1). Tento program sme využili aj na vytvorenie grafov. Na vyhodnotenie výsledkov sme použili Two-way ANOVA test s Dunn-Šidákovou korekciou. Výsledné dáta sú prezentované ako priemer ± štandardná odchýlka. Za signifikantné rozdiely boli považované tie, u ktorých bolo dosiahnuté $p < 0,05$.

Výsledky

Signifikantné rozdiely v prípade pozitívnej kontroly a induktora PMA boli dosiahnuté medzi pacientmi s artrózou a RA pacientmi s biologickou imunosupresívnou liečbou ($p=0,0079$). Pri *E. coli* s MOI 80 boli signifikantné rozdiely medzi skupinami artrotických pacientov a neliečených RA pacientov ($p=0,0001$) a taktiež medzi liečenými a neliečenými RA pacientmi ($p=0,0001$). V prípade *E. coli* s MOI 8 boli signifikantné rozdiely dosiahnuté opäť medzi rovnakými skupinami ($p=0,0324$ a $p=0,0222$). Pri *S. aureus* a MOI 80 boli štatisticky významné rozdiely medzi RA pacientmi s a bez imunosupresívnej liečby ($p=0,0027$). Pri MOI 8 u *S. aureus* bol signifikantný rozdiel medzi rovnakými skupinami ako pri *E. coli* s MOI 8 ($p=0,0004$ a $p=0,0007$). Pri využití mitochondrií ako stimulu bol vyhodnotený iba jeden signifikantný rozdiel a to pri MOI 80 medzi pacientmi s artrózou a neliečenými pacientmi s RA ($p=0,0067$).

Grafické znázornenie štatistických výsledkov je v grafe 1.

Kristína Macáková, Nadja Ivašková, Barbora Konečná, Michal Pastorek, Barbora Vlková, Peter Celec: Neutrofilny v patogenéze reumatoidnej artritídy. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 192-195.



Graf 1 Percento neutrofilov tvoriacich NETy v jednotlivých skupinách v závislosti od rôznych stimulov a ich koncentrácií. PMA- forbol-12-myristát-13-acetát, EC- *E. coli*, SA- *S. aureus*, MT- mitochondrie.

Diskusia

Tvorba NETov vykazuje signifikantné rozdiely naprieč skupinami a stimulmi. Z uvedených výsledkov (Graf 1) vyplýva, že najväčšia tvorba NETov bola zaznamenaná v prípade pacientov s reumatoidnou artritídou, ktorí ešte nedostali imunosupresívnu liečbu. V štúdiu boli zahrnutí aj pacienti s RA, ktorým už bola podaná biologická imunosupresívna liečba. Z ich krvných vzoriek bolo zistené, že tvorba NETov je znížená v porovnaní so skupinou bez liečby. Kontrolná skupina pacientov s artrózou taktiež vykazovala nižšie percento tvorby NETov ako neliečení RA pacienti. Tieto výsledky potvrdzujú našu hypotézu, ktorá hovorí, že u pacientov s RA dochádza k zvýšenej tvorbe NETov. Takéto výsledky boli potvrdené/popísané už viacerými štúdiami [2,5,7]. Znížená tvorba NETov, ktorá nastala u liečených RA pacientov môže byť výsledkom biologickej, imunosupresívnej liečby, nakoľko biologická liečba znižuje koncentráciu zápalových cytokínov [8], čiže znižuje výskyt jedných z viacerých spúšťačov tvorby NETov [7]. Podobné účinky tohto typu liečby, ktoré viedli k zníženej koncentrácii NETov, boli preukázané aj v prípade inej autoimunitnej choroby, systémového lupusu [9]. Pri porovnaní tvorby NETov z neutrofilov vzhľadom na rôzne stimuly ich najväčšia produkcia bola zaznamenaná v prípade bakteriálnych stimulov. Na základe týchto výsledkov môžeme uvažovať, že jeden z ďalších, možných rizikových faktorov pre vznik RA môžu byť bakteriálne infekcie, nakoľko bakteriálna infekcia okrem samotnej tvorby NETov, môže podmieňovať ďalšiu citrulináciu [10]. Z doteraz dosiahnutých výsledkov sme nezistili či príčina zvýšenej tvorby NETov u RA pacientov je sprostredkovaná samotnými neutrofilmi alebo prostredím, ktorému sú neutrofilny vystavené. Z tohto dôvodu ďalším prístupom k objasneniu zvýšenej tvorby NETov u RA bude štúdium plazmy od rovnakej skupiny pacientov. Cieľom ďalších krokov bude preskúmať či možné iniciačné faktory sa nachádzajú v plazme a či varujú naprieč zvolenými skupinami. Taktiež ďalším cieľom bude, zvýšiť počet pacientov zaradených do kontrolnej skupiny, nakoľko získanie odpovedí na tieto otázky tak vytvára priestor pre nový prístup liečby pri RA.

Podporené grantom APVV-18-0366

Zoznam použitej literatúry

- Smolen, J. S., Aletaha, D., Bijlsma, J. W., Breedveld, F. C., Boumpas, D., Burmester, G., Combe, B., Cutolo M., de Wit. M., Dougados, M., Emery, P., Gibofsky, A., Gomer-Reino, J. J., Haraoui, B., Kalden, J., Keystone, E. C., Kvien, T. K., McInnes, I., Martin-Mola, E., Montecucco,

Kristína Macáková, Nadja Ivašková, Barbora Konečná, Michal Pastorek, Barbora Vlková, Peter Celec: Neutrofily v patogenéze reumatoidnej artritídy. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 192-195.

- C., Schoels, M., & Van Der Heijde, D. (2010). Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Annals of the rheumatic diseases*, 69(4), 631-637.
2. Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J. S., Friday, S., Li, S., Patel, R. M., Subramanian, V., Thompson, P., Chen, P., Fox, D. A., Subramanian, P., & Kaplan, M. J. (2013). NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science translational medicine*, 5(178), 178ra40-178ra40
3. Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 134-147
4. Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R., & Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5(10), e1000639.
5. Corsiero, E., Pratesi, F., Prediletto, E., Bombardieri, M., & Migliorini, P. (2016). NETosis as source of autoantigens in rheumatoid arthritis. *Frontiers in immunology*, 7, 485, 1-9.
6. Granger, V.; Peyneau, M.; Chollet-Martin, S.; de Chaisemartin, L. Neutrophil Extracellular Traps in Autoimmunity and Allergy: Immune Complexes at Work. *Front. Immunol.* 2019, 10, 2524
7. Klopff, J., Brostjan, C., Eilenberg, W., & Neumayer, C. (2021). Neutrophil Extracellular Traps and Their Implications in Cardiovascular and Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 559.
8. Radner, H., & Aletaha, D. (2015). Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 165(1), 3-9.
9. Kraaij, T., Kamerling, S. W., de Rooij, E. N., van Daele, P. L., Bredewold, O. W., Bakker, J. A., Bajema, I. M., Scherer, H. U., Toes, R. E. M., Huizinga, T. J. W., Rabelink, T. J., van Kooten, C., & Teng, Y. O. (2018). The NET-effect of combining rituximab with belimumab in severe systemic lupus erythematosus. *Journal of autoimmunity*, 91, 45-54.
10. Perricone, C., Ceccarelli, F., Matteo, S., Di Carlo, G., Bogdanos, D. P., Lucchetti, R., Pilloni, A., Guido, V., Polimeni, A., & Conti, F. (2019). *Porphyromonas gingivalis* and rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*, 31(5), 517-524.

Katarína Krivošíková, Zora Krivošíková, Tomáš Seeman, Ľudmila Podracká: Význam deficitu vitamínu D v patogenéze hypertenzie u obéznych detí. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 196-202.

40. Význam deficitu vitamínu D v patogenéze hypertenzie u obéznych detí

MUDr. Katarína Krivošíková¹
(pediatria)

Spoluautori: Zora Krivošíková², Tomáš Seeman^{1,3}

Školiteľ: prof. MUDr. Ľudmila Podracká, CSc.¹

¹Detská klinika, LF UK a NÚDCH, Bratislava

²Oddelenie klinickej a experimentálnej farmakoterapie, LF SZU, Bratislava

³Pediatrická klinika, Detská fakultná nemocnica Dr. von Haunera, LMU univerzita v Mníchove, Nemecko

Úvod

Za posledné desaťročie sa incidencia hypertenzie v detskej populácii zvyšovala súbežne s nárastom obezity a jej metabolickými rizikami. Tento trend je zjavný aj v slovenskej populácii detí (1). Hypertenzia u detí, ale najmä v spojení s obezitou, predstavuje hlavný prediktor hypertenzie v dospelosti a vedie k zvýšeniu rizika kardiovaskulárnej úmrtnosti (2). Analýza údajov od viac ako 57 915 detí a dospelujúcich s nadhmotnosťou a obezitou odhaduje prevalenciu hypertenzie 20%-40% (3).

Patofyziológia hypertenzie u obéznych detí zahŕňa množstvo mechanizmov. Podieľa sa na nej aktivácia sympatického nervového systému, účinok hyperleptinémie a hyperinzulinémie, endotelová dysfunkcia a oxidačný stres, vaskulárne poškodenie v dôsledku zápalu alebo vazokonstrikcie, ako aj retencia sodíka a tekutín aktiváciou renín-angiotenzínového systému (RAS) (4). Obezita tiež zvyšuje celkové kardiovaskulárne riziko s jeho ďalšími komplikáciami, ako je diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémia či hypertrofia ľavej komory (5).

Obezita u detí sa tiež spája s nízkymi koncentraciami vitamínu D, pričom prevalencia deficitu vitamínu D sa udáva v rozmedzí od 31,7% (Kanada), 83% (USA) do 96,4% (Nemecko) (6, 7, 8). Na Slovensku nie sú údaje o prevalencii nedostatku vitamínu D u obéznych detí dostatočne zdokumentované. Podľa recentných výskumov sa ukazuje, že nedostatok vitamínu D je spojený s arteriálnou hypertenziou (9, 10, 11). Porušením signalizácie sa prostredníctvom receptora vitamínu D zvyšuje vaskulárna stuhnutosť, čo vedie k aktivácii RAS a tým k zhoršeniu systolickej a diastolickej funkcie srdca (12). Nedostatok vitamínu D ako negatívny endokrinný regulátor biosyntézy renínu zvyšuje sekréciu renínu a angiotenzínu II, čo vedie k hypertenzii, hypertrofii srdca a zvýšenej retencii sodíka (9). Pri nedostatočných koncentráciách vitamínu D je neefektívne regulovaná transkripcia endoteovej NO-syntázy, vplyvom čoho nižšia dostupnosť NO môže narušiť vaskulárnu relaxáciu závislú od endotelu, čím stúpa vaskulárna kontraktilita (10).

Klinické štúdie skúmajúce vzťah medzi vitamínom D a krvným tlakom u obéznych detí naznačujú, že nedostatok vitamínu D môže byť asociovaný s hypertenziou (13). V populácii slovenských detí nie sú dostupné štúdie o vzťahu medzi hypovitaminózou D, hypertenziou a obezitou. Cieľom tejto práce bolo overiť hypotézu, či obézne slovenské deti trpia nedostatkom vitamínu D a hypertenziou; a bližšie skúmať vzťah medzi vitamínom D a krvným tlakom pri obezite.

Katarína Krivošíková, Zora Krivošíková, Tomáš Seeman, Ľudmila Podracká: Význam deficitu vitamínu D v patogeneze hypertenzie u obéznych detí. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 196-202.

Materiál a metódy

Do prospektívnej observačnej štúdie sme zaradili 171 hospitalizovaných a/alebo ambulantne vyšetrených detí z Detskej kliniky LF UK a NÚDCH v rokoch 2018 - 2020. V súbore bolo rovnomerné zastúpenie chlapcov a dievčat (78 v.s. 89) s priemerným vekom $12,9 \pm 3,0$ roka. Deti boli rozdelené podľa indexu telesnej hmotnosti (BMI) do dvoch skupín; na skupinu detí s obezitou ($n = 120$) a kontrolnú skupinu s normálnym BMI ($n = 51$). Obezita bola definovaná ako BMI ≥ 95 . percentil pre daný vek a pohlavie podľa referenčných hodnôt v slovenskej populácii detí (zodpovedajúce $\geq 1,65$ SDS). Obézne deti museli spĺňať nasledovné inklúzne kritériá: dieťa vo veku 5 až 18 rokov s obezitou trvajúcou viac ako 48 mesiacov, neprítomnosť iného základného ochorenia, vylúčenie monogénovej, syndromologickej alebo sekundárnej príčiny obezity a vylúčenie sekundárnej hypertenzie. Všetky deti neboli suplementované vitamínom D najmenej dva mesiace pred začatím štúdie. Krvné testy sa robili rovnomerne počas celého roka, nezávisle od ročného obdobia. Do kontrolného súboru sme zaradili 51 zdravých detí vo veku od 5 do 18 rokov s normálnou hmotnosťou, bez hypertenzie. U všetkých detí sme vyhodnotili základné auxologické údaje o veku, krvnom tlaku, telesnej výške, telesnej hmotnosti, BMI a SDS BMI a vyšetrili sérové koncentrácie 25(OH)D. U obéznych detí sa analyzovalo aj lipidové spektrum, glukóza v krvi nalačno a inzulín, bol vypočítaný index HOMA. Biochemické parametre sa vyšetrovali na analyzátore Cobas E401 (Roche, CA, USA) a vitamín D na analyzátore Vitros 5600 (Vitros, Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). Krvný tlak sa hodnotil 24-hodinovým monitorovaním tlakovým holterom alebo troma od seba nezávislými meraniami tlaku krvi počas dňa.

Projekt bol schválený Etickou komisiou NÚDCH (č. schválenia: EK:05/2018 NÚDCH). Všetci zákonní zástupcovia pacientov boli poučení o štúdií a podpísali informovaný súhlas.

Na štatistické vyhodnotenie sme použili štatistický softvér IBM SPSS verziu 23.0. Údaje sme udávali ako priemer \pm SD alebo počty (%). Kategorické premenné sme hodnotili s použitím χ^2 testu. Spojité premenné u ktorých bola potvrdená normalita sme využili na porovnanie dvoch skupín Studentovým t-testom, v opačnom prípade Mann-Whitneyovým testom. Na predikciu rizikových faktorov hypertenzie sme využili logistickú regresiu a všeobecný lineárny model. Rozhodovací strom sme použili na zistenie najvýznamnejších faktorov ovplyvňujúcich prítomnosť hypertenzie a zvýšený systolický krvný tlak. Za štatisticky významnú sme považovali hladinu významnosti $p < 0,05$.

Výsledky

Priemerný vek všetkých sledovaných detí bol $12,9 \pm 3,0$ roka (deti s obezitou $13,0 \pm 2,9$ roka resp. kontrolná skupina $12,6 \pm 3,1$ roka). Zo 120 detí s obezitou bolo 57 chlapcov a 63 dievčat, v kontrolnej skupine 51 detí s normálnou hmotnosťou bolo 25 chlapcov a 26 dievčat. Pomer chlapcov a dievčat sa v jednotlivých skupinách štatisticky nelíšil. Kontrolná skupina mala významne nižšie BMI-SDS ($p < 0,001$), denný STK-SDS ($p < 0,001$) a koncentrácie 25(OH)D ($p < 0,001$) (údaje nie sú prezentované). Zdravé kontroly nemali prehypertenziu ani hypertenziu. Porovnanie vybraných demografických, laboratórnych údajov, ako aj klasifikácia tlaku krvi u detí s obezitou rozdelených podľa pohlavia uvádza tabuľka 1. Chlapci mali štatisticky významne vyššiu prevalenciu prehypertenzie alebo hypertenzie oproti dievčatám ($p < 0,040$). U chlapcov sa častejšie vyskytovala prehypertenzia a diastolická hypertenzia, u dievčat systolická hypertenzia.

Katarína Krivošíková, Zora Krivošíková, Tomáš Seeman, Ludmila Podracká: Význam deficitu vitamínu D v patogeneze hypertenzie u obéznych detí. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 196-202.

Tabuľka 1 Demografické, laboratórne údaje a klasifikácia tlaku krvi u obéznych detí podľa pohlavia

	Obézni chlapci	Obézne dievčatá	<i>p</i>
Počet (ch/d)	57	63	
Vek (roky)	12,9±3,1	13,1±2,9	0,790
Gestačný týždeň (týždeň)	39,6±1,6	39,5±1,3	0,191
Pôrodná dĺžka (cm)	50,5±2,4	49,8±2,4	0,297
Pôrodná hmotnosť (g)	3401,5±625,8	3246,7±588,7	0,150
Výška-SDS	0,63±1,09	0,60±0,97	0,888
BMI-SDS	5,63±2,75	5,59±2,15	0,590
Denný STK-SDS	0,445±1,159	0,328±1,612	0,654
Denný DTK-SDS	0,020±1,644	-0,298±1,315	0,250
25(OH)D (ng/ml)	28,1±8,2	27,4±8,9	0,337
T-Chol (mmol/l)	4,27±1,0	4,05±0,93	0,287
TAG (mmol/l)	1,29±0,54	1,28±0,52	0,959
LDL-C (mmol/l)	1,08±0,20	1,15±0,25	0,149
HDL-C (mmol/l)	2,82±0,88	2,51±0,78	0,086
Glu (mmol/l)	4,42±0,95	4,39±0,78	0,823
Inzulín (mU/l)	25,9±14,0	30,9±18,7	0,093
HOMA index	5,005±2,873	5,991±4,589	0,144
Klasifikácia hypertenzie			
Normálny tlak krvi	40 (70,2%)	46 (73,0%)	
Prehypertenzia/Hypertenzia	17 (29,8%)	17(27,0%)	0,040
Prehypertenzia	5 (8,8%)	1 (1,6%)	
Systolická hypertenzia	3 (5,3%)	10 (15,9%)	
Diastolická hypertenzia	7 (12,3%)	2 (3,2%)	
Systolicko-diastolická hypertenzia	2 (3,5%)	4 (6,3%)	

Tabuľka 2 Status vitamínu D u detí s/bez obezity

	Obézne deti (n=116; 100%)	Kontroly (n=47; 100%)	<i>p</i> OR
25(OH)D (ng/ml)			
25(OH)D (ng/ml) celoročne	27,75±8,58 (116)	34,24±9,31 (47)	0,001
≥ 30 (optimálny)	43 (37,1%)	30 (63,8 %)	0,002
< 30 (deficit)	73 (62,9%)	17 (36,2%)	2,996
≥ 20 < 30 ng/ml (mierny)	54 (46,6%)	16 (22,9%)	
≥ 10 < 20 ng/ml (stredný)	19 (16,4%)	1 (2,1%)	
< 10 ng/ml (závažný)	0 (0%)	0 (0%)	
25(OH)D (ng/ml) zima-jar	27,17±7,56 (42)	34,15±6,66 (8)	0,019
25(OH)D (ng/ml) leto-jeseň	28,08±9,14 (74)	34,26±9,84 (39)	0,001

Status vitamínu D u obéznych detí uvádza tabuľka 2.

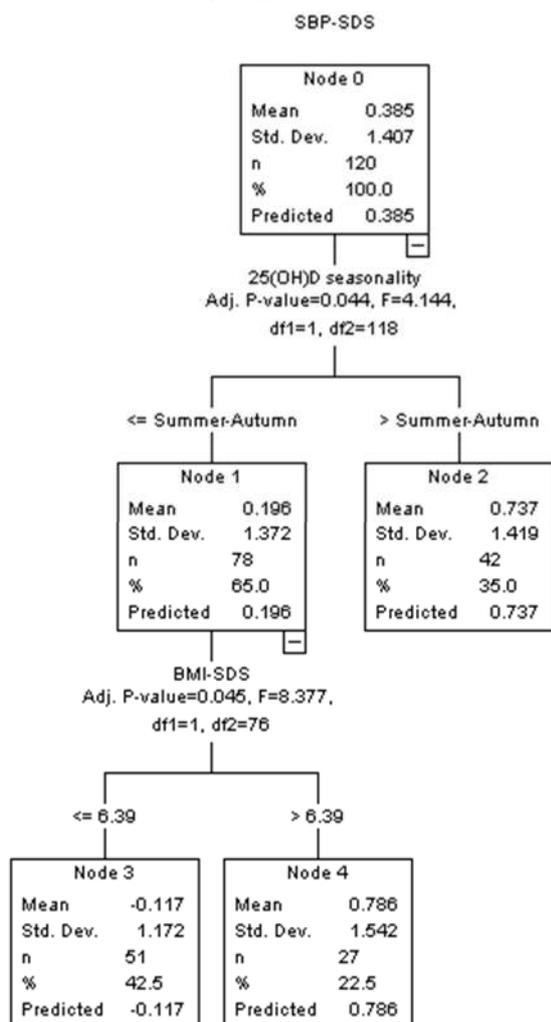
Katarína Krivošíková, Zora Krivošíková, Tomáš Seeman, Ľudmila Podracká: Význam deficitu vitamínu D v patogenéze hypertenzie u obéznych detí. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 196-202.

Obézne deti mali štatisticky významne vyšší vitamín D v porovnaní so štíhlymi deťmi ($p < 0.001$). Iba 37,1% obéznych detí malo optimálne hodnoty 25(OH)D, 46,6% mierny deficit a 16,4% stredný deficit. Naopak, 63,8% štíhlych detí dosiahlo optimálnu koncentráciu 25(OH)D, 22,9% mierny deficit a 2,1% stredný deficit. V žiadnej skupine sa nezistil závažný deficit vitamínu D. Riziko deficitu vitamínu D bolo trikrát vyššie u obéznych detí v porovnaní s neobéznymi deťmi ($p < 0,002$; OR: 2,996).

Koncentrácie 25(OH)D boli u detí s normálnou hmotnosťou významne vyššie ako u obéznych detí počas celého roka ($p < 0,000$), ako aj v období leto-jeseň ($p < 0,001$) a v období zima-jar ($p < 0,019$).

Regresná analýza preukázala, že najviac prediktívnymi rizikovými faktormi pre prehypertenziu/hypertenziu sú BMI-SDS (OR = 1,480, 95% CI: 1,152-1,900), T-Chol (OR = 2,285, 95% CI: 1,309-3,991) a sezonalita vitamínu D (OR = 3,975, 95% CI: 1,246-12,686).

Na štúdium vplyvu vybraných rizikových faktorov na hodnoty STK-SDS a DTK-SDS sa aplikoval všeobecný lineárny model. Pre STK-SDS sa zistili ako významné faktory- zvýšené BMI-SDS ($p < 0,000$), T-Chol ($p < 0,002$) a obdobie zima-jar ($p < 0,006$). Pre DTK-SDS boli významné faktory zvýšené BMI-SDS ($p < 0,000$) a obdobie zima-jar ($p < 0,019$).

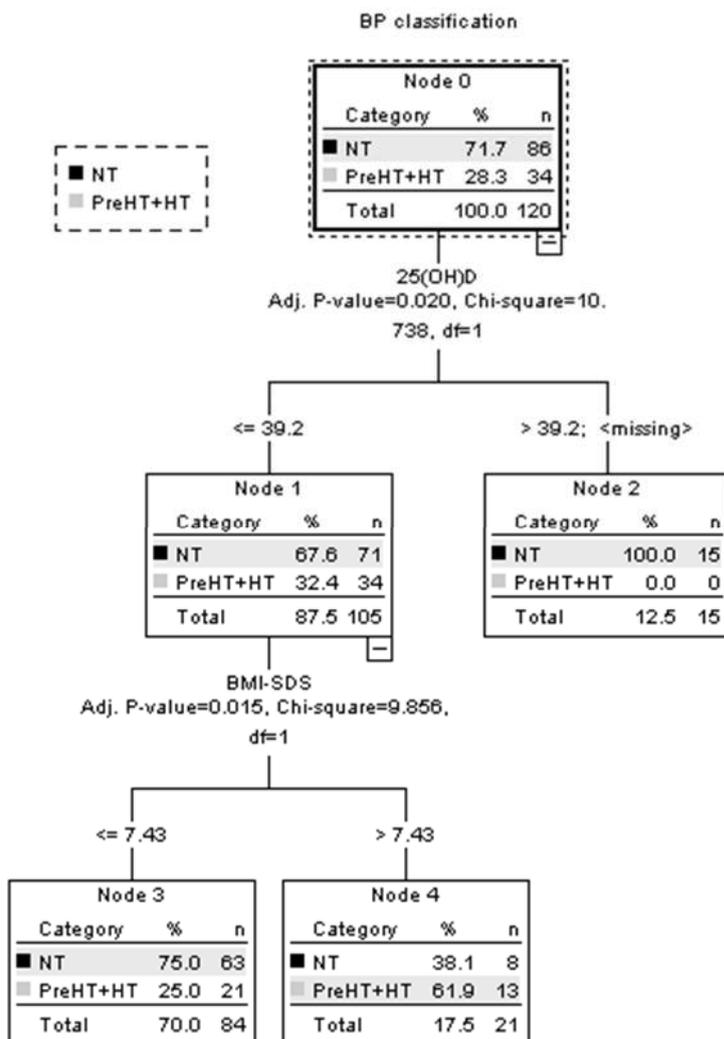


Obrázok 1a Rozhodovací strom - vzťah medzi systolickým krvným tlakom a sledovanými parametrami

Katarína Krivošíková, Zora Krivošíková, Tomáš Seeman, Ľudmila Podracká: Význam deficitu vitamínu D v patogeneze hypertenzie u obeznych detí. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 196-202.

Na zistenie, ktorý zo sledovaných parametrov má najväčší vplyv na STK-SDS, DTK-SDS a klasifikáciu krvného tlaku sme použili rozhodovacie strom. Obrázok 1a zobrazuje sezonalitu vitamínu D a BMI-SDS ako najsilnejšie prediktory pre STK-SDS. V období leto-jeseň boli STK-SDS významne nižšie ako v období zima-jar (0,196 oproti 0,737; $p < 0,044$). Rozhodovací strom ďalej pokračoval v delení detí meraných v období leto-jeseň podľa BMI-SDS. Deti s BMI-SDS $\leq 6,39$ mali signifikantne nižšie STK-SDS ($p < 0,045$) v porovnaní s deťmi s BMI-SDS $> 6,39$.

Rozhodovací strom (obrázok 1b) identifikoval 25(OH)D ako hlavný determinant prevalence hypertenzie v sledovanom súbore detí s obezitou (obrázok 1b). Deti s koncentraciami 25(OH)D $> 39,2$ nemali prehypertenziu/hypertenziu v porovnaní s deťmi s koncentraciami 25(OH)D $\leq 39,2$ ng/ml, kedy prehypertenziu/hypertenziu trpelo 32% detí v porovnaní s 68% detí s normálnym tlakom ($p < 0,02$). V skupine s nižšími koncentraciami 25(OH)D mali deti s BMI-SDS $\geq 7,43$ signifikantne vyššiu prevalenciu normálneho tlaku v porovnaní s deťmi s BMI-SDS $> 7,43$ ($p < 0,015$).



Obrázok 1b Rozhodovací strom - vzťah medzi prevalenciou hypertenzie a sledovanými parametrami

Diskusia

Katarína Krivošíková, Zora Krivošíková, Tomáš Seeman, Ľudmila Podracká: Význam deficitu vitamínu D v patogeneze hypertenzie u obeznych detí. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 196-202.

Deficit vitamínu D v detskej populácii predstavuje globálny problém a vykazuje narastajúci trend. V súčasnosti je dostatok klinických dôkazov o vzťahu medzi deficitom vitamínu D a obezitou u detí. Osman a kol. (14) zistil významne vyššie koncentrácie vitamínu D u detí s normálnou hmotnosťou v porovnaní s obeznými deťmi. Fiamenghi a kol. (15) v metaanalýze zahrňujúcej 24 600 detí z 20 prierezových štúdií potvrdili vzťah medzi detskou obezitou a hypovitaminózou D. V našom súbore sme zistili deficit vitamínu D až u 63% detí s obezitou v porovnaní s 36% detí s normálnou hmotnosťou, pričom riziko deficitu vitamínu D u obeznych detí bolo až 2,996 násobne vyššie. V súčasnosti sa intenzívne skúma vzťah medzi deficitom vitamínu D a hypertenziou, najmä u obeznych detí. Závety rôznych štúdií sú však variabilné. Abboud a kol. (11) v metaanalýze do ktorej zahrnul 85 publikovaných prác zistil iba slabý vzťah medzi hypovitaminózou D a zvýšeným krvným tlakom, resp. hypertenziou. Naopak, Kao a kol. (10) v štúdií s 229 chlapcami s obezitou vo veku 2 až 18 rokov zistil významné inverzné korelácie medzi vitamínom D a systolickým/diastolickým tlakom. Aj Wang a kol. (16) u 775 detí vo veku 3 až 18 rokov pozoroval inverzný vzťah medzi vitamínom D a systolickým tlakom, ktorý sa však po adjustácii na hmotnosť nepotvrdil. V našej skupine obeznych detí sme zistili, že sezonalita vitamínu D je spolu s BMI-SDS a T-Chol najvýznamnejším rizikovým faktorom pre zvýšený krvný tlak a hypertenziu u obeznych detí. Toto riziko bolo v zimnej sezóne až 3,975 krát vyššie ako v lete, pričom zvýšené BMI-SDS predstavovalo 1,48 násobne vyššie riziko a zvýšený T-Chol 2,285 násobne vyššie riziko. Všeobecný lineárny model potvrdil tieto rizikové faktory aj pre STK a BMI-SDS ako aj sezonalitu vitamínu D pre DTK. Súhrnná analýza sledovaných údajov pomocou rozhodovacích stromov identifikovala deficit vitamínu D ako najvýznamnejší faktor ovplyvňujúci výskyt prehypertenzie a hypertenzie. Je zaujímavé, že deti s deficitom mali aj nižšie BMI-SDS a normálny tlak krvi. Výsledky našej prierezovej klinickej štúdie potvrdzujú hypotézu, že vplyv deficitu vitamínu D na vznik zvýšeného krvného tlaku alebo hypertenzie u detí sa s obezitou zvyšuje.

Záver

Obezita a hypertenzia je závažný celospoločenský problém. Úlohou pediatrov a zdravotníckej osvedy je šíriť povedomie o význame racionálnej výživy na rastúci organizmus, apelovať na výchovu k správnym stravovacím návykom už od útleho veku a intenzívne podporovať pravidelnú fyzickú aktivitu. K jednoduchým a finančne nenáročným preventabilným opatreniam vzniku a rozvoja hypertenzie patrí účinná suplementácia vitamínom D.

Práca bola podporená grantom VEGA No.1/0202/17 a realizáciou projektu "Centrum excelentnosti environmentálneho zdravia", ITMS č. 26240120033, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj, financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Použitá literatúra

1. Babinska K, Kovacs L, Janko V, Dallos T, Feber J. Association between obesity and the severity of ambulatory hypertension in children and adolescents. *Journal of the American Society of Hypertension: JASH.* 2012 Sep-Oct;6(5):356-363.
2. Seeman T, Dostálek L, Gilík J. Control of hypertension in treated children and its association with target organ damage. *Am J Hypertens.* 2012 Mar;25(3):389-95.
3. Flechtner-Mors M, Neuhauser H, Reinehr T, Roost HP, Wiegand S, Siegfried W, Zwiauer K, Molz E, Holl RW; APV initiative and the BMBF Competence Network

Katarína Krivošíková, Zora Krivošíková, Tomáš Seeman, Ludmila Podracká: Význam deficitu vitamínu D v patogeneze hypertenzie u obéznych detí. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 196-202.

- Obesity. Blood pressure in 57,915 pediatric patients who are overweight or obese based on five reference systems. *Am J Cardiol.* 2015 Jun 1;115(11):1587-94.
4. Shariq OA, McKenzie TJ. Obesity-related hypertension: a review of pathophysiology, management, and the role of metabolic surgery. *Gland Surg.* 2020;9(1):80-93.
 5. Orlando A, Cazzaniga E, Giussani M, Palestini P, Genovesi S. Hypertension in Children: Role of Obesity, Simple Carbohydrates, and Uric Acid. *Front Public Health.* 2018;6:129.
 6. Munasinghe LL, Willows ND, Yuan Y, Ekwaru JP, Veugelers PJ. Vitamin D Sufficiency of Canadian Children Did Not Improve Following the 2010 Revision of the Dietary Guidelines That Recommend Higher Intake of Vitamin D: An Analysis of the Canadian Health Measures Survey. *Nutrients.* 2017;9(9):945.
 7. Turer CB, Lin H, Flores G. Prevalence of vitamin D deficiency among overweight and obese US children. *Pediatrics.* 2013 Jan;131(1):e152-61.
 8. Hall JE, Mouton A, da Silva AA, Omoto ACM, Wang Z, Li X, do Carmo JM. Obesity, kidney dysfunction and inflammation: interactions in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2020 Dec 1:cvaa336.
 9. Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 May;89-90(1-5):387-92.
 10. Kao KT, Abidi N, Ranasinha S, Brown J, Rodda C, McCallum Z, Zacharin M, Simm PJ, Magnussen CG, Sabin MA. Low vitamin D is associated with hypertension in paediatric obesity. *J Paediatr Child Health.* 2015 Dec;51(12):1207-13.
 11. Abboud, M., Al Anouti, F., Papandreou, D. *et al.* Vitamin D status and blood pressure in children and adolescents: a systematic review of observational studies. *Syst Rev* 2021; 10, 60.
 12. Jia, G.; Aroor, A.R.; Hill, M.A.; Sowers, J.R. Role of renin-angiotensin-aldosterone system activation in promoting cardiovascular fibrosis and stiffness. *Hypertension* 2018, 72, 537–548.
 13. Kim DH, Meza CA, Clarke H, Kim JS, Hickner RC. Vitamin D and Endothelial Function. *Nutrients.* 2020;12(2):575.
 14. Osman A, Osman NR, Fouad DA, Toaima NN. Vitamin D deficiency in obese children and adolescents and relation to glucose homeostasis. *QJM: An Int J of Med,* 2018, Vol. 111, Suppl. 1
 15. Fiamenghi VI, Mello ED. Vitamin D deficiency in children and adolescents with obesity: a meta-analysis. *J Pediatr (Rio J).* 2020 Oct 3:S0021-7557(20)30207-2.
 16. Wang G, Liu X, Bartell TR, Pearson C, Cheng TL, Wang X. Vitamin D trajectories from birth to early childhood and elevated systolic blood pressure during childhood and adolescence. *Hypertension.* 2019;74:421–30.

Balázs Gálffy, Martin Mistrík: Analýza súboru alogénnych príbuzenských transplantácií krvotvorných buniek pre akútnu myeloblastovú leukémiu na Klinike hematológie a transfúziológie LFUK, SZU a UNB. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 203-206.

41. Analýza súboru alogénnych príbuzenských transplantácií krvotvorných buniek pre akútnu myeloblastovú leukémiu na Klinike hematológie a transfúziológie LFUK, SZU a UNB

**MUDr. Balázs Gálffy
(hematológia a transfúziológia)**

Školiteľ: doc. MUDr. Martin Mistrík PhD.
Klinika hematológie a transfúziológie LFUK, SZU a UNB, Bratislava

Úvod

U pacientov s akútnou myeloblastovou leukémiou (AML) naďalej ostáva prioritnou liečebnou modalitou alogénna transplantácia krvotvorných buniek (TKB) ako najúčinnějšía prevencia relapsu leukémie. Pri dostupnosti HLA-zhodného súrodenca sú preferované predovšetkým súrodenecké transplantácie (1).

V poslednom desaťročí zaznamenávame významný pokrok vo výskume molekulárnych a cytogenetických zmien u pacientov s AML. Poznatky z genetickej analýzy sa stali súčasťou dôležitých rozhodovacích procesov. Tie nám pomáhajú v rámci merania minimálnej reziduálnej choroby (MRD) aj optimálneho zvolenia liečebnej stratégie. V prípade vysokého a stredného rizika preferujeme ochorenie zakonsolidovať alogénnou TKB, naopak u pacientov v nízkom riziku s MRD negativitou je prípustné zvoliť netransplantačnú cestu - opakované cykly chemoterapie, resp. autológnu TKB. Ďalšie faktory vysokej rizikovosti zahŕňajú vysoký iniciálny počet leukocytov, sekundárny pôvod (napr. terapiou asociované AML, AML po transformácii z myelodysplastického syndrómu), extramedulárne postihnutie, pridružené ochorenia, aj vysoký vek a horší výkonnostný stav (2,3).

Materiál a metodika

Retrospektívna analýza súboru pacientov s dg. AML, ktorí podstúpili príbuzenskú TKB na Klinike hematológie a transfúziológie LFUK, SZU a UNB v intervale 1.1.2010 – 31.12.2017. Súbor tvorí 77 pacientov. Okrem základných štatistických hodnotení sme pacientov stratifikovali podľa rizikovosti a vzniknuté podsúbory sme zanalyzovali pomocou Kaplan-Mayerových kriviek celkového prežívania. Pri stratifikácii pacientov do jednotlivých rizikových skupín podľa vstupnej genetickej analýzy sme sa riadili najnovšími European LeukemiaNet (ELN) odporúčaniami z roku 2017 (4).

Balázs Gálffy, Martin Mistrík: Analýza súboru alogénnych príbuzenských transplantácií krvotvorných buniek pre akútnu myeloblastovú leukémiu na Klinike hematológie a transfúziológie LFUK, SZU a UNB. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 203-206.

Tab.1: ELN stratifikácia rizika podľa genetiky

ELN stratifikácia	rizika	podľa genetiky
Favourable	<ul style="list-style-type: none"> t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i>^{low} Biallelic mutated <i>CEBPA</i> 	
Intermediate	<ul style="list-style-type: none"> Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i>^{high} Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i>^{low} (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> Cytogenetic abnormalities not classified as favourable or adverse 	
Adverse	<ul style="list-style-type: none"> t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype, monosomal karyotype Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i>^{high} Mutated <i>RUNX1</i> Mutated <i>ASXL1</i> Mutated <i>TP53</i> 	

Výsledky

Zo 77 pacientov 65 malo TKB 1x a 6 pacienti 2x. Medián veku v čase transplantácie (Tx) bol 44 rokov, vo vekovom rozsahu 19-65 rokov, s ľahkou prevahou mužov (43 pacientov, t.j. 55,8%). V čase Tx 66 pacientov (85,7%) bolo v kompletnej hematologickej remisii. Pri 67 Tx pozostával prípravny režim zo štandardnej myeloablatívnej chemoterapie, avšak deviatich pacientov sme pre vek a komorbidity pripravili redukovaným režimom, resp. v prípade florídneho ochorenia sekvenčnou chemoterapiou známou ako protokol FLAMSA-RIC.

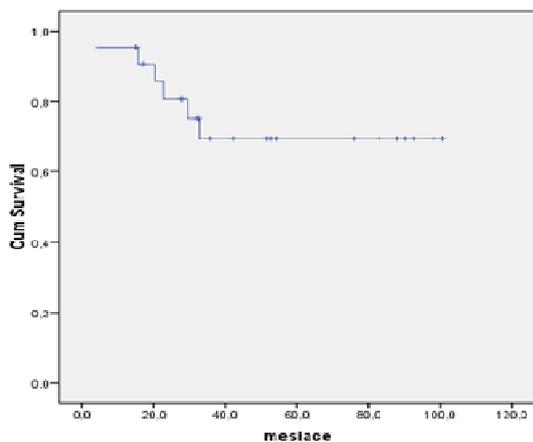
Štep od darcu predstavovali 74-krát periférne krvotvorné bunky, čo tvorí 96,1 %, dvakrát kostnú dreň a u 1 pacienta vzhľadom na to, že subkutánnou stimuláciou granulopoézy G-CSF nebol umožnený dostatočný zber periférnych krvotvorných buniek, bunky pochádzali z oboch zdrojov. Ako prevenciu choroby štepu proti hostiteľovi (GvHD) sme kombinovali inhibítor kalcineurínu cyklosporín A a metotrexát, resp. mykofenolát mofetyl. Dominoval AB0-kompatibilný štep v pomere 62,3%, u 11 pacientov sme transplantovali bunky od súrodenca s malou inkompatibilitou v AB0 systéme, u 11 s veľkou inkompatibilitou a 7 dostali štep od darcu, u ktorej sme zaznamenali malú a veľkú (tzv. obojsmernú) inkompatibilitu. Počas chemoterapiou indukovaného cytopénie pacienti dostali v mediáne 4 transfúzne jednotky erytrocytov aj trombocytov, avšak vidíme aj enormne vysoké transfúzne nároky u niektorých pacientov (Ery 0-34x, Tr 1-56x).

Medián dosiahnutia absolútneho počtu neutrofilov nad 0,5 G/l bol 16.deň po Tx (10-41 dní). Počet trombocytov nad 20 G/l a tým nezávislosť od transfúzií dosiahli pacienti po 7-56 dňoch, v mediáne po 13 dňoch od Tx. 3 pacienti v čase úmrtia boli závislí na substitúciách krvných doštičiek.

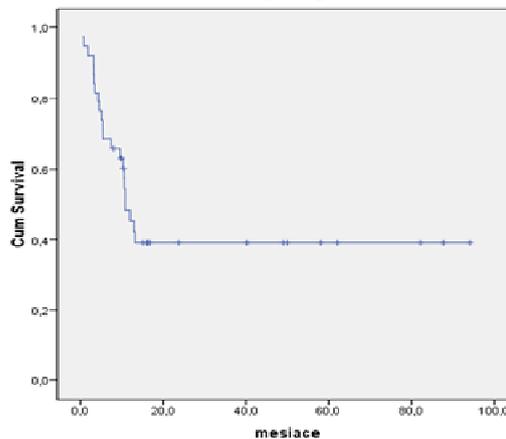
Trojročné celkové prežívanie bez ohľadu na rizikovosť predstavuje 55,8% (43/77 pacientov). Ako príčina smrti dominuje GvHD (7 pacientov) a infekčné komplikácie (7 pacientov). U 4 pacientov bola kombinovaná príčina smrti, jeden pacient zomrel na capillary leak syndróm, jeden na zlyhanie štepu, jeden na intrakraniálnu hemorágiu po úraze a jeden na ruptúru čreva. 9 pacientov exitovalo na relaps leukémie (12,7 %). 100-dňovú mortalitu pozorujeme u 6 pacientov (7,8 %).

Balázs Gálffy, Martin Mistrík: Analýza súboru alogénnych príbuzenských transplantácií krvotvorných buniek pre akútnu myeloblastovú leukémiu na Klinike hematológie a transfúziológie LFUK, SZU a UNB. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 203-206.

Prevažnú väčšinu pacientov sme transplantovali so stredným (Obr.1) alebo vysokým (Obr.2) rizikom. Do vysokorizikovej skupiny sme zaradili aj pacientov s vysokým iniciálnym počtom leukocytov nad 50 G/l, sekundárne leukémie a pacientov s extramedulárnym postihnutím.



Obr.1: Pacienti so stredným rizikom – intermediate risk (n=22)

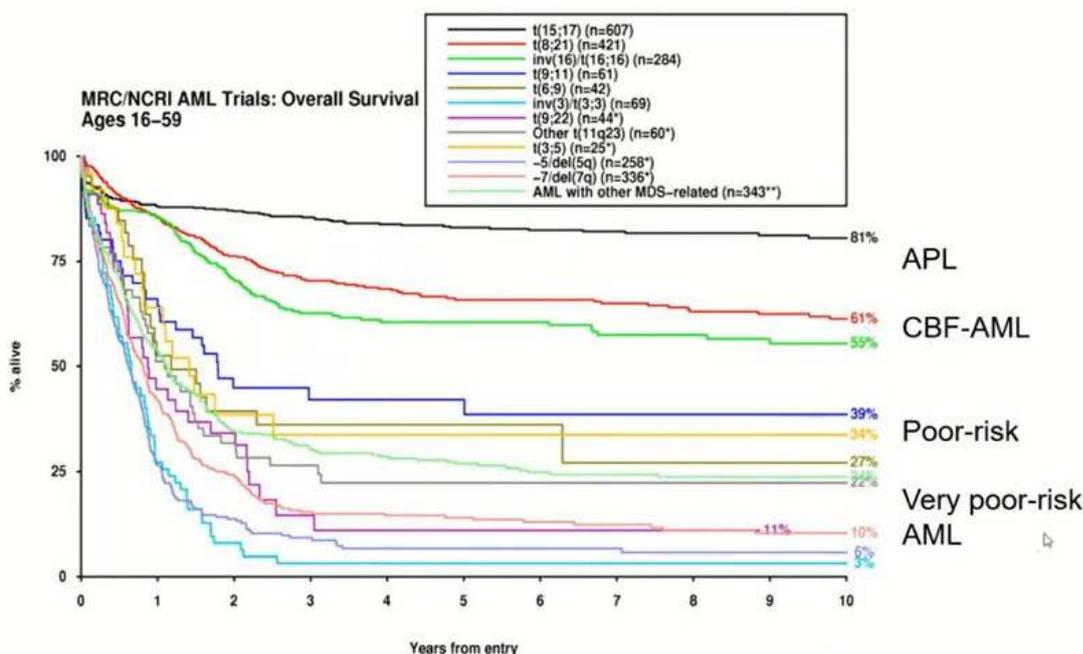


Obr.2: Pacienti s vysokým rizikom – adverse risk (n=38)

Medián celkového prežívania celého súboru nebol dosiahnutý. Zaznamenali sme významný rozdiel medzi celkovým prežívaním pacientov so stredným a vysokým rizikom, 70 a 40%. Z pacientov s nízkym rizikom exitovali len dvaja z jedenástich.

Diskusia a záver

Na základe Kaplan-Mayerových kriviek celkového prežívania vidíme veľký rozdiel medzi jednotlivými podtypmi AML (Obr.3). U pacientov s translokáciou chr.8,21 a inverziou chr.16 je dlhodobé prežívanie viac ako 50% aj bez Tx, na druhej strane z pacientov s inverziou chr.3 alebo deléciou chr.5 žije bez Tx dlhodobo len 3-6% (5).



Balázs Gálffy, Martin Mistrík: Analýza súboru alogénnych príbuzenských transplantácií krvotvorných buniek pre akútnu myeloblastovú leukémiu na Klinike hematológie a transfúziológie LFUK, SZU a UNB. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 203-206.

Obr.3 Dopad cytogenetických entít na prežitie podľa klasifikácie WHO

Na správne zostavenie liečebného plánu je nevyhnutné poznať genetický status pacienta a taktiež ho dôkladne sledovať v priebehu liečby. V prípade vysokého a stredného rizika alogénna TKB pri AML súvisí s významným znížením rizika relapsu a zvýšením celkového prežívania v porovnaní s netransplantačnou terapiou. Vzhľadom na možné fatálne komplikácie samotnej transplantácie (infekcia počas agranulocytózy a imunosupresie, GvHD, atď.) u pacientov s nízkym rizikom je potrebné zvážiť benefity a riziká výkonu. Transplantačná aktivita postupne stúpa aj na Slovensku. Klinika hematológie a transfúziológie LFUK, SZU a UNB za posledné 3 roky opakovane prekročila 100 transplantácií ročne, spolu s autológnyimi transplantáciami. Je to umožnené okrem iného používaním prípravných režimov s redukovanou intenzitou u alogénne transplantovaných starších pacientov. Výsledky sú porovnateľné s údajmi z EBMT (European Society for Blood and Marrow Transplantation) (6).

Zoznam literatúry

1. Raida L: Indikace alogenních transplantací krvetvorných buněk. In Transplantace krvetvorných buněk – základní principy. Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci. 2013, 32-35.
2. Soukup P: HCT v léčbě akutní myeloidní leukémie. In Cetkovský P., Mayer J., Starý J. a spol. Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk. Praha, Galén. 2016, 353-357.
3. Majhail N S, Farnia S H, Carpenter P A a spol: Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation In Biology of Blood and Marrow Transplantation Volume 21, Issue 11, 2015, 1863-1869
4. Döhner H, Estey E, Grimwade D a spol: Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood 2017; 129: 424-447
5. Grimwade D, Hills R K, Moorman A V a spol: Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. Blood 2010. 116: 354-365
6. Carreras E., Dufour C., Mohty M. a spol.: The EBMT Handbook – Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. 7th edition. 2019, 257-427, 507-521.

Patrik Karapin, Katarína Klobučníková, Branislav Kollár, Pavel Šiarnik, Peter Turčáni, Stanislav Šutovský: Poruchy kognitívnych funkcií u pacientov so spánkovými poruchami dýchania. Má vplyv zlá architektonika spánku na kogníciu? Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 207-212.

42. Poruchy kognitívnych funkcií u pacientov so spánkovými poruchami dýchania. Má vplyv zlá architektonika spánku na kogníciu?

MUDr. Patrik Karapin¹
(Neurológia)

Spoluautori: MUDr. Katarína Klobučníková, PhD.¹, prof. MUDr. Branislav Kollár, PhD., MPH¹; doc. MUDr. Pavel Šiarnik, PhD., MPH¹; prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.

Školiteľ: doc. MUDr. Stanislav Šutovský, PhD.¹

¹ I. neurologická klinika LFUK a UN Bratislava

Úvod

Spánkové poruchy dýchania (SPD) sú častým, ale liečiteľným ochorením dospelaj populácie. V posledných desaťročiach je možné pozorovať stúpajúcu prevalenciu tejto choroby, podmienenú zvyšujúcim sa výskytom obezity, starnúcou populáciou ako aj lepšou diagnostikou (1). Najčastejšou formou SPD je obštrukčné spánkové apnoe (OSA), ktoré je charakterizované opakovanými apnoickými alebo hypopnoickými epizódami počas spánku, zvýšenou dennou spavosťou, fragmentáciou spánku a intermitentnou hypoxiou (2).

Vo vedeckej obci sa objavuje zvýšený záujem v skúmaní dopadu SPD na celkový zdravotný stav, asociáciu s civilizačnými ochoreniami, zahŕňajúcimi arteriálnu hypertenziu, diabetes a kardiovaskulárne ochorenia (3, 4). Pozornosť sa venuje asociácii medzi OSA, neuropsychologickými funkciami a kognitívnym deficitom. Výsledky takéhoto bádania sú doposiaľ nejednoznačné. Niektoré práce poukazujú na asociáciu medzi kognitívnym deficitom a OSA u starších ľudí (5), z iných štúdií zas vyplýva, že SPD nie je rizikovým faktorom pre vznik kognitívneho deficitu (6). Recentná meta-analýza (7) zahŕňajúca 6 prospektívnych štúdií poukázala, že jedinci s SPD majú o 26% zvýšené riziko vzniku kognitívneho deficitu (risk ratio, 1,26; 95% CI; 1,05-1,50).

Rozporuplné sú aj závery prác, ktoré skúmali aké kognitívne domény sú najviac zhoršené u pacientov s OSA (8). Typicky sa u týchto jedincov pozoruje deficit pozornosti a exekutívnych funkcií, menej sú zastúpené ťažkosti s pamäťou (9). Prevalencia kognitívneho deficitu medzi pacientami s OSA nie je presne známa, taktiež nie je presne známa úloha SPD na deteriorácii celkovej kognície u dospelých ľudí. Predpokladá sa najmä význam fragmentácie spánku a intermitentnej nočnej hypoxie (10).

Alela $\epsilon 4$ apolipoproteínu E (APOE4) je dobre známym rizikovým faktorom pre Alzheimerovu chorobu (11). Štúdie, ktoré hodnotili vzťah medzi polymorfizmom APOE a SPD sú nejednoznačné, väčšina prác poukazuje na zvýšené riziko SPD u jedincov s alelou APOE $\epsilon 4$, niekoľko štúdií poukazuje opačne na pozitívnu asociáciu medzi SPD a alelou APOE $\epsilon 2$. Recentné meta-analýzy skôr poukazujú, na fakt že polymorfizmus APOE neovplyvňuje riziko vzniku SPD (12).

Cieľom tejto štúdie bola snaha o objasnenie vzťahu medzi SPD, polymorfizmom APOE a kognitívnym profilom.

Materiál a metódy

Do štúdie boli zaradení pacienti, ktorí boli v spánkovom laboratóriu hospitalizovaní na I. neurologickej kliniky LF UK a UN Bratislava, s podozrením na SPD. U všetkých participantov bola realizovaná

Patrik Karapin, Katarína Klobučníková, Branislav Kollár, Pavel Šiarnik, Peter Turčáni, Stanislav Šutovský: Poruchy kognitívnych funkcií u pacientov so spánkovými poruchami dýchania. Má vplyv zlá architektonika spánku na kogníciu? Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 207-212.

celonočná polysomnografia (zariadenie Alice 6, Philips-Respironics, Holandsko). Polysomnografia bola hodnotená a skórovaná erudovaným personálom na základe štandardizovaných kritérií (13).

Sledovanými parametrami bolo AHI (apnoe/hypopnoe index), ktorý je definovaný ako počet apnoických alebo hypopnoických prestávok počas hodiny spánku; apnoická pauza je definovaná ako epizóda s poklesom amplitúdy prietoku vzduchu hornými dýchacími cestami o minimálne 90% s trvaním minimálne 10s; hypopnoe je definované ako epizóda poklesu amplitúdy prietoku vzduchu hornými dýchacími cestami minimálne o 50% s trvaním minimálne 10 sekúnd so súčasným poklesom saturácie krvi kyslíkom minimálne o 3% (13).

Ďalšími skúmanými veličinami bol arousal index - AI (počet prebudení za hodinu spánku) a desaturačný index (počet všetkých desaturácií krvi kyslíkom za hodinu spánku). Bol zaznamenaný hypnogram pacienta s vyhodnotením percentuálneho zastúpenia jednotlivých štádií spánku (REM, NREM fázy N1, N2, N3). Diagnóza SPD bola definovaná ako AHI \geq 5. Na hodnotenie dennej spavosti bol použitý dotazník - Epworthská škála spavosti (ESS).

Pacientom boli ďalej realizované štandardné odbery krvi, doplnené vyšetrením genetického polymorfizmu ApoE. DNA bola odobratá z periférnej krvi, polymorfizmus APOE bol vyhodnotený metódou PCR-RFLP (polymorfizmus dĺžky restriktčných fragmentov), kde na podklade restriktčnej analýzy PCR produktu sa zistila prítomnosť fragmentov s typickou dĺžkou, na podklade ktorých sa následne definovala prítomnosť alel APOE. Ďalej sme sledovali kognitívny status, u niektorých pacientov sme doplnili skrínigové vyšetrenie kognitívnych funkcií – revidovaná verzia Addenbrookského kognitívneho testu ACE-R (14). Hodnotili sme skóre celkovej kognície a jednotlivých podskupín testu– orientácia, pozornosť, pamäť, verbálna fluencia, rečové funkcie a vizuo-konštrukčné schopnosti. Vzhľadom na fakt, že ACE-R obsahuje rovnaké psychometrické úlohy ako MMSE (Mini Mental State Examination), zaznamenali sme aj skóre tohto testu.

Štatistická analýza bola realizovaná za pomoci programu SPSS, verzia 21 (SPSS Inc, Chicago, USA). Kategorické premenné sú vyjadrené ako počet a percentuálne zastúpenie (%), kontinuálne premenné ako priemer \pm smerodajná odchýlka alebo medián, IQR (interquartile range). Na porovnanie hodnôt viacerých veličín sme použili Kruskal-Wallisov test. Pre porovnanie hodnôt veličiny medzi dvoma skupinami sme pre veličiny s parametrickými premennými použili Studentov t-test ak boli premenné normálne distribuované, v opačnom prípade bol použitý Mann-Whitney test. Za štatisticky významnú sme považovali hodnotu $P < 0,05$.

Výsledky

Do štúdie bolo nakoniec zaradených 396 participantov, ktorí mali validný výsledok polymorfizmu APOE. Frekvencie pre jednotlivé genotypy boli 11,6% pre $\epsilon 2\epsilon 3$ (N= 46); 69,9% pre $\epsilon 3\epsilon 3$ (N= 277); 15,2% pre $\epsilon 3\epsilon 4$ (N= 60); 1,5% pre $\epsilon 4\epsilon 4$ (N= 6); 1,8% pre $\epsilon 4\epsilon 2$ (N= 7). Nebol prítomný jediniec s genotypom $\epsilon 2\epsilon 2$. Vzhľadom na nejednoznačný efekt alely $\epsilon 2$ a $\epsilon 4$ sme vyradili participantov s genotypom $\epsilon 2\epsilon 4$, zo štúdie sme ďalej vylúčili pacientov, u ktorých sa nepotvrdila SPD. Výsledný súbor pozostával z 359 pacientov, z ktorých bolo 70,2 % mužov (252/359), priemerný vek bol $55,8 \pm 12,21$ rokov. Ďalšie informácie ohľadom pohlavia, veku, body mass indexu (BMI) a parametrov spánkového apnoe môžeme vidieť v tabuľke č.1.

Zamerali sme sa na možnú asociáciu medzi genotypom APOE a objektívnymi známami SPD. Vzhľadom na malý počet jedincov s polymorfizmom $\epsilon 4\epsilon 4$ (6), sme týchto participantov zaradili do skupiny s prítomnosťou aspoň jednej alely $\epsilon 4$. Ako môžeme vidieť v tabuľke č.1, nie je prítomný významnejší rozdiel v charakteristikách ako vek, pohlavie, BMI a ESS medzi jednotlivými sledovanými skupinami. Taktiež sa títo zaradení participantí nelíšili v percentuálnom zastúpení najčastejších komorbidných ochorení. Pri porovnávaní dát so zreteľom na spánkové parametre môžeme pozorovať, že jediniec s genotypom $\epsilon 3/\epsilon 2$ majú významne väčšie percentuálne zastúpenie N1 NREM fázy počas spánku.

Patrik Karapin, Katarína Klobučníková, Branislav Kollár, Pavel Šiarnik, Peter Turčáni, Stanislav Šutovský: Poruchy kognitívnych funkcií u pacientov so spánkovými poruchami dýchania. Má vplyv zlá architektúra spánku na kogníciu? Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 207-212.

Pri porovnaní spánkových parametrov medzi jedincami s prítomnou jednou alelou $\epsilon 2$ a ostatnými participantami (nie je uvedené v tabuľke č. 1) je možné pozorovať signifikantný rozdiel aj v percentuálnom zastúpení REM fázy počas spánku. Pacienti s alelou $\epsilon 2$ majú nižšie percentuálne zastúpenie REM spánku v porovnaní s ostatnými participantami, ktorí sú nosičmi alely $\epsilon 3$ alebo $\epsilon 4$ ($p=0,034$; realizovaný Mann-Whitney test pre porovnanie %REM medzi jedincami s alelou $\epsilon 2$ a ostatnými participantami; nie je uvedené v tabuľke č.1). Jedinci s alelou $\epsilon 2$ majú taktiež signifikantne nižšie percentuálne zastúpenie N1 fázy NREM spánku pri porovnaní s ostatnými jedincami ($p=0,004$; realizovaný Mann-Whitney test pre porovnanie %REM medzi jedincami s alelou $\epsilon 2$ a ostatnými participantami; nie je uvedené v tabuľke č.1).

Tabuľka č.1 Základné parametre, výsledky a štatistická analýza celej sledovanej skupiny

Premenné	APOE genotyp				p
	Všetci participantí	$\epsilon 3/\epsilon 2$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 3/\epsilon 4$	
Počet participantov	359 (100%)	42 (11,7%)	257 (71,6%)	60 (16,7%)	
Zastúpenie mužov	252 (70,2%)	34 (81%)	182 (70,8%)	36 (60,0%)	0,069*
Vek	55,80± 12,21	58,26± 12,31	55,62± 12,15	54,85± 12,41	0,356**
BMI	34,51± 7,22	35,60± 7,83	34,51± 7,01	33,72± 7,71	0,45**
ESS	7,29± 4,72	8,14± 5,37	6,92± 4,49	8,25± 5,06	0,106**
Arteriálna hypertenzia	255 (71,0%)	32 (76,2%)	184 (71,6%)	39 (65%)	0,44*
Diabetes II. typu	81 (22,6%)	11 (26,2%)	58 (22,6%)	12 (20%)	0,763*
Fibrilácia predsiení	35 (9,7%)	6 (14,3%)	20 (7,8%)	9 (15%)	0,136*
CMP	32 (8,9%)	3 (7,1%)	23 (8,9%)	6 (10%)	0,883*
Dyslipidémia	116 (32,3%)	11 (26,2%)	83 (32,3%)	22 (36,7%)	0,538*
Tyreopatia	41 (11,4%)	3 (7,1%)	31 (12,1%)	7 (11,7%)	0,648*
Apnoe/hypopnoe index (AHI)	43,69± 28,65	49,90± 29,95	43,80± 29,16	38,91± 24,79	0,132**
Arousal index (AI)	24,94± 17,82	28,23± 18,54	25,12± 18,17	21,89± 15,39	0,298**
Desaturačný index	41,17± 28,38	47,07± 29,62	41,32± 28,88	36,4± 24,76	0,166**
% REM	8,41± 7,45	5,96± 5,58	8,60± 7,71	9,28± 7,22	0,071**
% N1	35,50± 18,31	43,25± 21,70	35,10± 17,71	31,81± 16,98	0,006**
% N2	31,16± 16,76	26,45± 18,89	31,56± 16,26	32,72± 17,07	0,041**
% N3	24,93± 14,48	24,33± 15,67	24,74± 14,58	26,20± 13,27	0,583**

BMI – body mass index, ESS – Epworthská škála spavosti, CMP – cieвне mozgové príhody, % REM – percentuálne zastúpenie REM fázy počas celého spánku, %N1 - percentuálne zastúpenie N1 NREM fázy počas celého spánku, %N2 - percentuálne zastúpenie N2 NREM fázy počas celého spánku, %N3 - percentuálne zastúpenie N3 NREM fázy počas celého spánku

* - chi-kvadrát test nezávislosti, ** - Kruskal-Wallisov test

Ďalej sme posudzovali asociáciu APOE a SPD a s kognitívnym profilom. U 95 participantov z celkovej sledovanej skupiny sme realizovali rozšírený skriningový kognitívny test ACE-R, aj s vyhodnotením jeho jednotlivých podskupín (výsledky sú v tab. č.2). Následne sme túto podskupinu opätovne rozdelili na 3 skupiny podľa genotypu APOE. Ako môžeme vidieť v tabuľke č. 2, participantí v tejto podskupine sa výraznejšie nelíšia vo veku, pohlaví, BMI a ESS. Pri porovnávaní dát so zreteľom na spánkové parametre môžeme pozorovať, že jedinci s genotypom $\epsilon 3/\epsilon 2$ majú signifikantne vyššie percentuálne zastúpenie N1 fázy NREM počas celého spánku aj v podskupine participantov, u ktorých sme realizovali skriningový kognitívny test. Nelíšia sa však významnejšie v dĺžke REM fázy počas spánku, nie je

Patrik Karapin, Katarína Klobučníková, Branislav Kollár, Pavel Šiarnik, Peter Turčáni, Stanislav Šutovský: Poruchy kognitívnych funkcií u pacientov so spánkovými poruchami dýchania. Má vplyv zlá architektúra spánku na kogníciu? Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 207-212.

pozorovať ani signifikantný rozdiel v celkovej kognícii (MMSE, ACE-R), ako aj v jednotlivých kognitívnych doménach.

V podskupine, u ktorej bol realizovaný kognitívny test sme ďalej sledovali koreláciu medzi pozorovanými objektívnymi parametrami spánkového apnoe, hypnogramom (percentuálnym zastúpením jednotlivých spánkových fáz) a kognitívnym profilom (tab. č.3) Podarilo sa nám preukázať signifikantnú koreláciu medzi jednotlivými fázami spánku a kognitívnymi doménami (viď tab. č. 3). Zaznamenali sme signifikantné pozitívne korelácie medzi percentuálnym zastúpením REM fázy počas spánku a celkovou kogníciou (hodnota ACE-R) a verbálnou fluenciou. Naopak sme zaznamenali signifikantnú inverznú koreláciu medzi percentuálnym zastúpením N1 NREM fázy spánku a celkovou kogníciou, verbálnou fluenciou a taktiež aj s pamäťou. Na druhej strane sa nám nepodarilo preukázať signifikantné korelácie medzi AHI (apnoe/hypopnoe index), arousal indexom, desaturačným indexom a ESS (nie je uvedené v tabuľke č.3).

Tabuľka č.2 Základné parametre, výsledky a štatistická analýza podskupiny participantov, ktorí mali realizovaný kognitívny test

Premenné	APOE genotyp				
	Všetci participantí	ε3/ε2	ε3/ε3	ε3/ε4 + ε3/ε4	p
Počet participantov	95(100%)	11 (11,6%)	67 (70,5%)	17 (17,9%)	
Zastúpenie mužov	63 (66,3%)	10 (90,9%)	44 (65,7%)	9 (52,9%)	0,113*
Vek	54,27± 11,86	53,36± 8,96	55,28± 11,53	50,88± 14,53	0,339**
BMI	33,88± 6,80	37,15± 8,38	33,45± 6,30	32,50± 7,49	0,072**
ESS	6,96± 4,72	8,46± 6,80	6,19± 4,14	9,00± 4,78	0,379**
Apnoe/hypopnoe index (AHI)	40,18± 30,96	51,84± 33,43	38,44± 31,14	39,53± 28,77	0,196**
Arousal index (AI)	25,49± 21,79	27,48± 14,39	25,27± 23,72	25,06± 18,37	0,498**
Desaturačný index	37,66± 30,32	47,00± 30,61	36,19± 30,82	37,39± 24,76	0,276**
% REM	8,40± 6,85	7,66± 5,10	8,25± 7,23	9,47± 6,47	0,732**
% N1	34,97± 16,53	45,17± 13,58	34,63± 17,45	29,68± 11,49	0,027**
% N2	30,14± 15,06	20,40± 9,61	32,00± 15,75	29,12± 13,06	0,037**
% N3	26,49± 13,80	26,76± 13,22	25,11± 14,21	31,72± 11,77	0,168**
MMSE	28,06± 1,16	28,09± 1,14	27,99± 1,14	28,35± 1,27	0,666**
ACE-R	93,09± 4,52	92,64± 4,43	93,37± 4,31	92,29± 5,45	0,765**
Orientácia	10,00± 0,00	10,00± 0,00	10,00± 0,00	10,00± 0,00	1**
Pozornosť	7,59± 0,61	7,73± 0,65	7,57± 0,61	7,59± 0,62	0,566**
Pamäť	22,15± 2,95	21,91± 3,11	22,36± 2,62	21,47± 4,00	0,784**
Verbálna fluencia	12,05± 1,83	12,00± 1,73	12,07± 1,88	12,00± 1,80	0,916**
Reč	25,75± 0,46	25,55± 0,69	25,75± 0,44	25,88± 0,33	0,269**
Vizuo-konštrukčné funkcie	15,55± 0,95	15,45± 1,04	15,61± 0,90	15,35± 1,12	0,461**
<small>BMI – body mass index, ESS – Epworthská škála spavosti, CMP – cievne mozgové príhody, % REM – percentuálne zastúpenie REM fázy počas celého spánku, %N1 - percentuálne zastúpenie N1 NREM fázy počas celého spánku, %N2 - percentuálne zastúpenie N2 NREM fázy počas celého spánku, %N3 - percentuálne zastúpenie N3 NREM fázy počas celého spánku, MMSE – Mini Mental State Examination, ACE-R – revidovaná verzia Addenbrookského kognitívneho testu</small>					
* - chi-kvadrát test nezávislosti, ** - Kruskal-Wallisov test					

Tabuľka č.3 Vyhodnotenie korelácií u podskupiny pacientov s doplneným kognitívnym testom

Patrik Karapin, Katarína Klobučníková, Branislav Kollár, Pavel Šiarnik, Peter Turčáni, Stanislav Šutovský: Poruchy kognitívnych funkcií u pacientov so spánkovými poruchami dýchania. Má vplyv zlá architektónika spánku na kogníciu? Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 207-212.

Korelácia*		% REM	% N1
MMSE	Korelačný koeficient	0,144	-0,171
	Hodnota p	0,164	0,098
ACE-R	Korelačný koeficient	0,230	-0,274
	Hodnota p	0,025	0,007
Pozornosť	Korelačný koeficient	-0,127	0,033
	Hodnota p	0,221	0,752
Pamäť	Korelačný koeficient	0,119	-0,208
	Hodnota p	0,252	0,043
Verbálna fluencia	Korelačný koeficient	0,278	-0,212
	Hodnota p	0,006	0,039
Rečové schopnosti	Korelačný koeficient	0,230	-0,146
	Hodnota p	0,025	0,159
Vizuo-konštrukčné funkcie	Korelačný koeficient	0,027	-0,137
	Hodnota p	0,792	0,184
* Výpočet Spearmanovho koeficientu korelácie			
V tabuľke č. 3 sú zaznamenané korelácie medzi sledovanými spánkovými parametrami a kognitívnymi funkciami v podskupine pacientov, u ktorých sme realizovali vyšetrenie kognície ACE-R testom.			
% REM – percentuálne zastúpenie REM fázy počas celého spánku, %N1 - percentuálne zastúpenie N1 NREM fázy počas celého spánku, MMSE – Mini Mental State Examination, ACE-R – revidovaná verzia Addenbrookského kognitívneho testu			

Diskusia

Výsledky našej štúdie naznačujú, že genotyp APOE môže súvisieť so zmenou architektóniky spánku u jedincov s SPD. Pri porovnávaní participantov na základe polymorfizmu APOE sa nám podarilo preukázať, že nosiči alely APOE $\epsilon 2$ majú redukovaný REM spánok a percentuálne väčšie zastúpenie N1 NREM fázy počas spánku. V našej práci sme však nepozorovali rozdiely v závažnosti spánkového apnoe medzi jednotlivými skupinami s rôznym genotypom APOE.

Naše závery podporujú aj výsledky predchádzajúcich štúdií. Niektoré práce poukazujú na zvýšené riziko vzniku spánkového apnoe u jedincov s alelou $\epsilon 4$ (15), ako aj u pacientov s $\epsilon 2$ alelou (16), napriek tomu asociácia medzi polymorfizmom APOE a spánkovým apnoe nie je plne vysvetlená. Recentná prierezová štúdia zahŕňajúca 73 pacientov poukázala na genetické riziko vzniku SPD, najmä u jedincov s aspoň jednou alelou APOE $\epsilon 2$ v porovnaní s ostatnými jedincami (OR = 9,37; 95% CI 1,13-77,7; p = 0.019) (17). Štúdia od Pellegriniho z roku 2011 poukazuje, že u nosičov alely APOE $\epsilon 2$, u ktorých bola potvrdená diagnóza OSA polysomnografickým vyšetrením, je pozorované predĺženie spánkovej latencie, horšia spánková efektívnosť, nosiči alely APOE $\epsilon 2$ majú vyššiu hodnotu arousal indexu a väčšie percentuálne zastúpenie N1 NREM fázy počas spánku (18).

Opisovaná redukcia REM spánku a percentuálne väčšie zastúpenie N1 NREM fázy počas spánku môže poukazovať na zhoršenie restoratívnej funkcie spánku s možným negatívnym vplyvom na kognitívne funkcie. Pre uvedenú skutočnosť svedčia aj dáta opisujúce vzťah medzi jednotlivými podskupinami dotazníka ACE-R a spánkovými charakteristikami. Nepodarilo sa nám preukázať signifikantnú koreláciu hodnoty žiadnej z podskupín s AHI (apnoe/hypopnoe index), arousal indexom, desaturačným indexom a ESS. Naopak, zaznamenali sme signifikantnú inverznú koreláciu medzi percentuálnym zastúpením N1 NREM fázy spánku, celkovou kogníciou, verbálnou fluenciou a taktiež aj s pamäťou. Signifikantné pozitívne korelácie sme pozorovali medzi percentuálnym zastúpením REM počas spánku a celkovou kogníciou (hodnota ACE-R) a verbálnou fluenciou.

Naše výsledky naznačujú, že v populácii jedincov s SPD je alterácia kognitívnych funkcií skôr asociovaná s redukciami REM spánku a vyšším zastúpením plytkého NREM spánku. Asociáciu so závažnosťou nočných desaturácií, fragmentáciou spánku či dennou spavosťou sa nám nepodarilo preukázať. Jedinci

Patrik Karapin, Katarína Klobučníková, Branislav Kollár, Pavel Šiarnik, Peter Turčáni, Stanislav Šutovský: Poruchy kognitívnych funkcií u pacientov so spánkovými poruchami dýchania. Má vplyv zlá architektúra spánku na kogníciu? Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 207-212.

s genotypom $\epsilon\epsilon\epsilon$ môžu mať vzhľadom na opísanú redukciu REM spánku a percentuálne väčšie zastúpenie N1 spánku väčšie riziko kognitívnych porúch. Túto hypotézu však budú musieť potvrdiť budúce prospektívne štúdie.

Zoznam použitej literatúry

1. Young T, et al. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(9):1217-39.
2. Klobučníková K, Šiarnik P, Čarnická Z, Kollár B. Poruchy spánku vo vybranej skupine neurologických ochorení. 1. vydanie. Bratislava, Berlina. 2018, 36.
3. Nieto FJ, Young TB, Lind BK, et al. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study: Sleep Heart Health Study. *JAMA.* 2000;283(14):1829-1836.
4. Rajan P, Greenberg H. Obstructive sleep apnea as a risk factor for type 2 diabetes mellitus. *Nat Sci Sleep.* 2015;7:113-125.
5. Haba-Rubio J, et al. Sleep characteristics and cognitive impairment in the general population: The HypnoLaus study. *Neurology.* 2017 Jan 31;88(5):463-469.
6. Lutsey PL, Bengtson LG, Punjabi NM, et al. Obstructive Sleep Apnea and 15-Year Cognitive Decline: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Sleep.* 2016;39(2):309-316.
7. Leng Y, McEvoy CT, Allen IE, Yaffe K. Association of Sleep-Disordered Breathing With Cognitive Function and Risk of Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-analysis [published correction appears in *JAMA Neurol.* 2018 Jan 1;75(1):133]. *JAMA Neurol.* 2017;74(10):1237-1245.
8. Devita M, Montemurro S, Ramponi S, et al. Obstructive sleep apnea and its controversial effects on cognition. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2017;39(7):659-669.
9. Seda G, Han TS. Effect of Obstructive Sleep Apnea on Neurocognitive Performance. *Sleep Med Clin.* 2020 Mar;15(1):77-85.
10. Cedernaes J, Osorio RS, Varga AW, Kam K, Schiöth HB, Benedict C. Candidate mechanisms underlying the association between sleep-wake disruptions and Alzheimer's disease. *Sleep Med Rev.* 2017 Feb;31:102-111.
11. Muñoz SS, Garner B, Ooi L. Understanding the Role of ApoE Fragments in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res.* 2019 Jun;44(6):1297-1305.
12. Thakre TP, Mamtani MR, Kulkarni H. Lack of association of the APOE epsilon 4 allele with the risk of obstructive sleep apnea: meta-analysis and meta-regression. *Sleep.* 2009 Nov;32(11):1507-11.
13. Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan SF. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specification. Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine, 2007.
14. Mioshi E, Dawson K, Mitchell J, Arnold R, Hodges RJ. The Addenbrooke's Cognitive Examination Revised (ACE-R): a brief cognitive test battery for dementia screening. *Int J Geriatr Psychiatry* 2006; 21(11): 1078-1085.
15. Gottlieb DJ, DeStefano AL, Foley DJ, et al. APOE epsilon4 is associated with obstructive sleep apnea/hypopnea: the Sleep Heart Health Study. *Neurology* 2004;63:664-8.
16. Larkin EK, Patel SR, Redline S, Mignot E, Elston RC, Hallmayer J. Apolipoprotein E and obstructive sleep apnea: evaluating whether a candidate gene explains a linkage peak. *Genet Epidemiol* 2006;30:101-10.
17. Uyrum E, Balbay O, Annakkaya AN, Gulec Balbay E, Silan F, Arbak P. The relationship between obstructive sleep apnea syndrome and apolipoprotein E genetic variants. *Respiration.* 2015;89(3):195-200.
18. Sforza E, Roche F, Thomas-Anterion C, Kerleroux J, Beauchet O, Celle S, Maudoux D, Pichot V, Laurent B, Barthélémy JC. Cognitive function and sleep related breathing disorders in a healthy elderly population: the SYNAPSE study. *Sleep.* 2010 Apr;33(4):515-21.

Miriam Pillerová, Diana Drobná, Emese Renczés, Ľubomíra Tóthová, Daniela Ostatníková, Peter Celec: Neurovývin v SHANK3 modeli autizmu u myši. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 213-217.

43. Neurovývin v SHANK3 modeli autizmu u myši

Mgr. Miriam Pillerová¹
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Diana Drobná¹, Emese Renczés¹, Ľubomíra Tóthová¹, Daniela Ostatníková², Peter Celec¹
Školiteľka: Doc. RNDr. Ľubomíra Tóthová, PhD.

¹Ústav Molekulárnej Biomedicíny Komenského v Bratislave, LFUK, Bratislava, Slovensko, ²Fyziologický Ústav, LFUK, Bratislava, Slovensko

Úvod

Porucha autistického spektra (ASD) zahŕňa heterogénnu skupinu porúch neurovývinu. Hlavnými behaviorálnymi príznakmi ASD sú komunikačné deficity, narušená sociálna interakcia a repetitívne správanie (1). Neurovývinový deficit a motorická dysfunkcia sú spoločnými znakmi ASD a môžu byť prvými príznakmi ešte pred samotnými behaviorálnymi prejavmi. Najtypickejšími postihnutiami súvisiacimi s narušeným neuromotorickým vývinom je tiež zlá koordinácia či problémy s učením komplexných motorických schopností. Tieto charakteristiky by mohli hrať dôležitú úlohu ako skoré markery pri vývoji autizmu či jeho diagnostike (2).

Jedným z hlavných faktorov prispievajúcich k vzniku ASD je pohlavie, pretože prevalencia je u mužov takmer 4-krát vyššia ako u žien, pričom pomer pohlavia mužov a žien je od 2,5: 1 do 4: 1 (3). Existujú stovky známych génov zodpovedných za príčinu ASD u ľudí. Jedným z najlepšie opísaných génov je vysoko konzervovaný gén „SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3“= *shank3* gén (4). SHANK3 proteín hrá dôležitú úlohu v postsynaptickej membráne pri glutamátergických synapsách ako proteín lešenia. Je dôležitý aj počas signalizácie pretože ovplyvňuje postsynaptickú excitačnú neurotransmisiu (5). Delécia alebo iné mutácie terminálneho konca génu *shank3* vedú k sérii rôznych, ale príbuzných symptómov vrátane širokej škály intelektuálnych a behaviorálnych deficitov (6).

Hoci je ASD diagnostikovaný v rannom detstve (do 3 roku života), väčšina experimentov sa uskutočňuje na dospelých autistických zvieracích modeloch (7). Pre účinné diagnostické a terapeutické stratégie v ASD je potrebný vhodný zvierací model so všetkými znakmi tejto neurovývinovej poruchy, vrátane zhoršeného neuromotorického vývinu. Predovšetkým v počiatočných vývinových štádiách, by sa na rôznych zvieracích modeloch ASD mali prejavovať autistické znaky, ako je neuromotorické a neurovývinové oneskorenie, tak ako je to typické pre deti s ASD (8). Viaceré štúdie ukázali, že rôzne delécie v odlišných doménach v géne *shank3* môžu mať za následok rôzne neurovývinové fenotypy (9). Navyše tento model autizmu s mutáciou v doméne PHZ (B6.129-Shank3^{tm2Gfng/J}), ktorý je často používaným zvieracím modelom autizmu, nebol doteraz analyzovaný. Naším hlavným cieľom bolo preto preskúmať, či mláďatá myši so Shank3^{-/-} genotypom majú v porovnaní s WT (*wild type*) myšami oneskorený neurovývin súvisiaci so sensoricko-motorickými zručnosťami a reflexmi. Ďalej sme sa zamerali na to, či je mužské pohlavie rizikovým faktorom, ktorý zosilňuje autistický fenotyp počas raného vývinu u Shank3^{-/-} myši.

Materiál a metódy

Táto štúdia bola vykonaná podľa pokynov EÚ pre vedecké experimenty na zvieratách (smernica 2010/63/EÚ) po schválení protokolu Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR a etickou komisiou Ústavu patofyziológie v Bratislave, Slovenská republika. V tomto experimente sme využili myši kmeňa C57BL/6 oboch pohlaví a rôznych genotypov – SHANK3 (B6.129-Shank3^{tm2Gfng/J}), tiež známy

Miriám Pillerová, Diana Drobná, Emese Renczés, Ľubomíra Tóthová, Daniela Ostatníková, Peter Celec: Neurovývin v SHANK3 modeli autizmu u myši. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 213-217.

ako Shank3^B; ♀ n=5, ♂ n=4) a WT (♀ n=11, ♂ n=3), ktoré podstúpili batériu neurovývinových testov, každý deň od narodenia až po 21. postnatálny deň.

Neurovývinové testy:

Vývinové míľniky: otvorenie očného viečka, rozvinutie ušného lalôčka, prerezanie zubov

Reflexy: pretočenie sa z chrbta na 4 labky, test dopadu na všetky 4 labky, úchop prednými a zadnými labkami, reflex na akustický podnet, taktilný reflex, reflex ušnic, reflex očného viečka

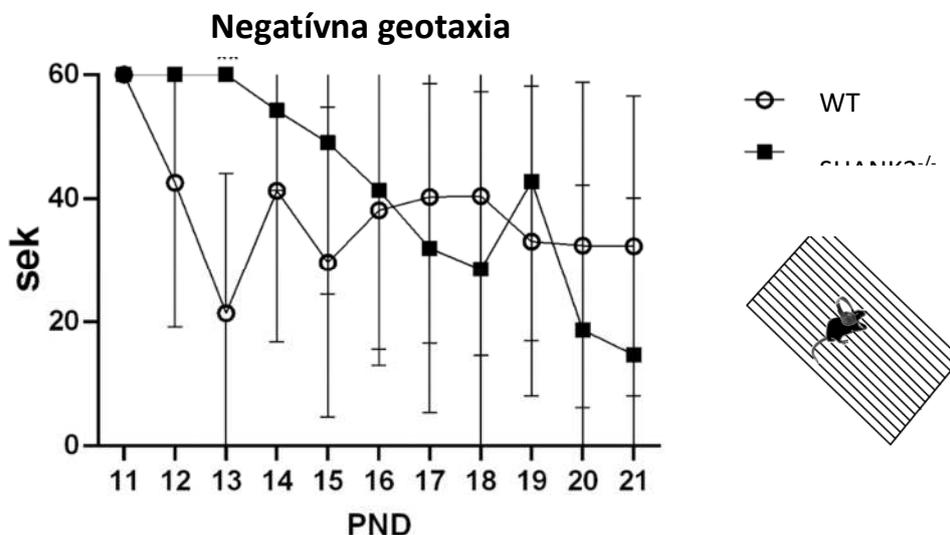
Motorické zručnosti: Iniciácia chôdze, negatívna geotaxia, udržanie sa na lane

Mláďatá boli so svojou matkou až do odstavenia, a boli držané za kontrolovaných podmienok: teplota miestnosti (21–24 ° C), vlhkosť (55%–65%) a cyklus svetlo/tma – 12/12 hodín. Hmotnosť všetkých zvierat bola meraná každý deň od PND = 1 do odstavenia (PND = 21).

Dáta boli analyzované jedno-faktorovou analýzou variancie (*One-way ANOVA*) na testovanie účinku genotypu (Shank3^{-/-}, WT) a pohlavia (GraphPad Prism 6.0 Software Inc., La Jolla, San Jose, CA, USA). Štatistickým testom dvoj-faktorovej (*two-way ANOVA*) s opakovanými meraniami sme vyhodnotili výsledky testu negatívnej geotaxie, testu pretočenia sa z chrbta, iniciáciu chôdze (GraphPad Prism 6.0 Software Inc., La Jolla, San Jose, CA, USA). V prípade, že výsledky zo štatistickej analýzy ANOVA boli štatisticky významné ($p < 0,05$), použili sme „*post-hoc*“ test – Bonferroniho analýzu. Výsledky boli vyjadrené ako priemer + SD.

Výsledky

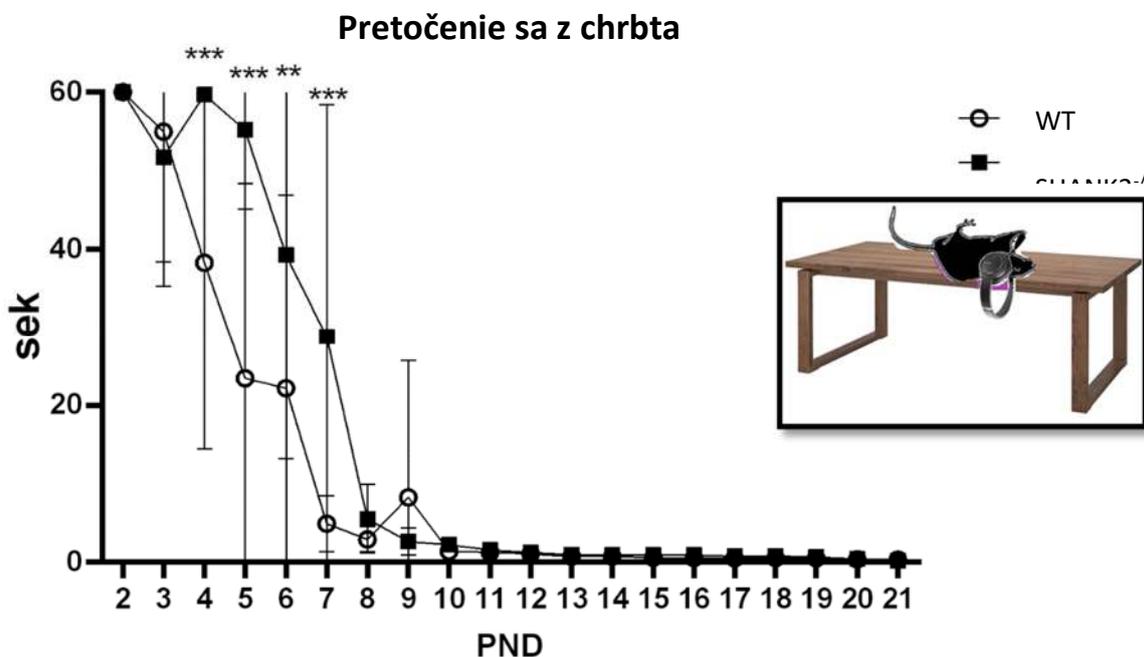
Od PND = 4 do PND = 7 potrebovali mláďatá oboch pohlaví s genotypom Shank3^{-/-} dlhší čas na otočenie sa z chrbta na labky v porovnaní s WT (oneskorenie Shank3^{-/-} na: PND = 4, bolo 21,4 sekundy, $p < 0,001$; na PND = 5 bolo 31,8 s, $p < 0,001$; na PND = 6 bolo 17,1 s, $p = 0,009$; PND = 7, 23,9 s, $p < 0,001$; Obr. 1).



Obr. 1: Test otočenia sa z chrbta na labky. PND=postnatálny deň; * označuje $p < 0,05$ ** označuje $p < 0,01$ *** označuje $p < 0,001$. Data sú prezentované ako priemer + SD. Shank3^{-/-}: ♀ n=5, ♂ n=4; Wild type: ♀ n=11, ♂ n=3.

V teste negatívnej geotaxie bol významný vplyv času ($F(9, 144) = 2,18$, $p < 0,05$), žiadny účinok genotypu ($F(1, 16) = 0,66$, $p = 0,43$) a významný účinok interakcie času a genotypu ($F(9, 144) = 2,4$, $p < 0,05$). Pri analýze rozdielov medzi jednotlivými skupinami boli Shank3^{-/-} myši, v porovnaní s WT, významne pomalšie pri otáčaní a stúpaní nahor na PND = 13 (oneskorenie Shank3^{-/-} 38,64 sekundy, $p < 0,05$, Obr. 2). V ďalších testoch motorickej koordinácie a pohybovej aktivity boli významné rozdiely len v čase ($p < 0,001$) - všetky zvieratá sa v týchto testoch v priebehu času rovnako zlepšovali z PND = 1 na PND = 21.

Miriám Pillerová, Diana Drobná, Emese Renczés, Ľubomíra Tóthová, Daniela Ostatníková, Peter Celec: Neurovývin v SHANK3 modeli autizmu u myší. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 213-217.



Obr 2. Test negatívnej geotaxie. PND=postnatalny deň; * označuje $p < 0.05$ ** označuje $p < 0.01$ and *** označuje $p < 0.001$. Data sú prezentované ako priemer + SD. *Shank3*^{-/-}: ♀ n=5, ♂ n=4; Wild type: ♀ n=11, ♂ n=3.

Medzi skupinami neboli nájdené signifikantné rozdiely v ostatných dňoch či testoch (test otvorenia očí, prerezania horných a dolných zubov, oddelenia ušnice a rozvinutie ucha, či test dopadu na všetky 4 labky).

Diskusia

V tejto štúdii sme sa zamerali na mílniky neurovývinu v široko používanom genetickom modeli ASD – *Shank3*^{-/-} s mutáciou v doméne PHZ (B6.129-*Shank3*^{tm2Gfng/J}), s osobitným zreteľom na pohlavné rozdiely. Výsledky naznačujú neurovývinové deficity u *Shank3*^{-/-} myší, avšak tieto deficity sú obmedzené na niektoré postnatálne dni. Neboli pozorované rozdiely v otváraní očných viečok, výrazke horného a dolného rezáka, rozvinutí ucha a očných viečok, usporiadaní vzduchu a reflexoch zášklbov uší. Navyše, ani v jednom teste sa nevyskytli žiadne účinky pohlavia. To naznačuje, že samotná mutácia – *Shank3*^{-/-} nemusí byť dostatočná na to, aby u mláďat spôsobila deficit v neurovývine, ktorý sa zvyčajne pozoruje u jedincov s ASD.

V našom experimente sme nehodnotili, či oneskorenie vývinu pretrváva až do dospelosti. No v našej štúdii bolo hlavným cieľom testovať neurovývin u myší so špecifickou mutáciou v *shank3* géne, ktorý je oneskorený u jedincov s ASD. Preto do budúca je naším cieľom doplniť tento experiment o údaje z behaviorálnych testov zameraných na autistické črty u dospelých jedincov s rovnakou mutáciou v *shank3* géne.

Ako vyplýva z predchádzajúcich štúdií, nezrovnalosti vo výsledkoch testovania neurovývinu na zvieracích modeloch ASD môžu byť spôsobené pôvodom samotného vývoja ASD. Napriek vysokej dedičnosti nie je genetický faktor jediný, ktorý hrá úlohu v etiopatogenéze ASD. Rôzne genetické mutácie v rovnakých génoch môžu viesť k rôznym fenotypom. Navyše je potrebné brať do úvahy vplyv environmentálnych faktorov, ktoré môžu spôsobiť ASD, ako je vysoká prenatálna expozícia

Miriám Pillerová, Diana Drobná, Emese Renczés, Ľubomíra Tóthová, Daniela Ostatníková, Peter Celec: Neurovývin v SHANK3 modeli autizmu u myši. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 213-217.

testosterónu alebo zápal u novorodencov. Prenatálna expozícia plodov vyššej koncentrácii androgénu ako je fyziologická koncentrácia, súvisela s vývojom ASD u ľudí (10), ale aj u zvierat (11). Zápal v prenatálnom štádiu môže byť ďalším environmentálnym faktorom, ktorý interaguje s genetickými predispozíciami v patogenéze autizmu (12). Oneskorenie motorickej koordinácie sa pozorovalo u iného mutantného kmeňa Shank3 (Shank3 Δ 4–22) a tiež u modelu autizmu indukovaného kyselinou valproovou (13) alebo kyselinou propiónovou (chemikálie spojené s ASD) (14).

Na otestovanie, či model Shank3 (B6.129-Shank3^{tm2Gfng/J}) spolu s faktormi prostredia môžu spôsobiť neurovývinové oneskorenie, a na to aby Shank3^{-/-} model mohol slúžiť na štúdium autizmu, sú potrebné ďalšie štúdie. Ďalej predpokladáme, že zvierací model ASD s tromi zásahmi môže byť relevantnejším modelom na napodobnenie syndrómov ASD. V takomto modeli by sa mali skúmať účinky mužského pohlavia, genetickej predispozície (napr. mutácia génu *shank3*) a prenatálneho poškodenia životného prostredia (napr. nadbytok perinatálneho androgénu, zápal, kyselina valproová, kyselina propiónová alebo nadmerný stres matky) na neurovývinové vlastnosti ASD. Na záver teda navrhujeme, že vyplývajú z našich dát, samotná Shank3^{-/-} mutácia pravdepodobne nestačí na vyvolanie konštantných neurovývinových deficitov u mláďat, ktoré sa zvyčajne pozorujú u jedincov s ASD. Optimalizácia a nájdenie zvieracieho modelu autizmu, ktorý by bol najviac podobný autizmu prebiehajúcemu o ľudí by posunul poznanie tejto poruchy dopredu nie len na molekulárnej úrovni ale aj na diagnostickej či terapeutickú úroveň.

Výskum bol podporený grantom APVV-15-0045 od Agentúry na podporu výskumu a vývoja Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky

Zoznam použitej literatúry

1. Mossa A, Pagano J, Ponzoni L: Developmental impaired Akt signaling in the Shank1 and Shank3 double knock-out mice. *Mol Psychiatry* 2021.
2. Moraes ÍAP, Massetti T, Crocetta TB, Silva TD, Menezes LDC, Monteiro CBM, a spol: Motor learning characterization in people with autism spectrum disorder: A systematic review. *Dement Neuropsychol* 2017; 11(3), 276-286.
3. Halladay AK, Bishop S, Constantino JN, Daniels AM, Koenig K, Palmer K, a spol: Sex and gender differences in autism spectrum disorder: summarizing evidence gaps and identifying emerging areas of priority. *Mol autism* 2020, 6, 36-36.
4. Mashayekhi F, Mizban N, Bidabadi E, Salehi Z: The association of SHANK3 gene polymorphism and autism. *Minerva pediatr* 2016.
5. Arons MH, Lee K, Thynne CJ, Kim SA, Schob C, Kindler S, a spol: Shank3 Is Part of a Zinc-Sensitive Signaling System That Regulates Excitatory Synaptic Strength. *The J neurosci* 2016; 36(35), 9124-9134.
6. Torossian A, Saré RM, Loutaev I, Smith CB: Increased rates of cerebral protein synthesis in Shank3 knockout mice: Implications for a link between synaptic protein deficit and dysregulated protein synthesis in autism spectrum disorder/intellectual disability. *Neurobiol Dis* 2021, 148.
7. Tatavarty V, Torrado Pacheco A, Groves Kuhnle C, Lin H, Koundinya P, Miska NJ, a spol: Autism-Associated Shank3 Is Essential for Homeostatic Compensation in Rodent V1. *Neuron* 2020; 106(5), 769-777.e764.
8. Xiao Z, Qiu T, Ke X, Xiao X, Xiao T, Liang F, a spol: Autism spectrum disorder as early neurodevelopmental disorder: evidence from the brain imaging abnormalities in 2-3 years old toddlers. *J Autism Dev Disord* 2014; 44(7), 1633-1640.
9. Drapeau E, Riad M, Kajiwara Y, Buxbaum J: Behavioral Phenotyping of an Improved Mouse Model of Phelan-McDermid Syndrome with a Complete Deletion of the Shank3 Gene. *eNeuro* 2018a; 5, 0046-0018.

Miriam Pillerová, Diana Drobná, Emese Renczés, Ľubomíra Tóthová, Daniela Ostatníková, Peter Celec: Neurovývin v SHANK3 modeli autizmu u myši. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 213-217.

10. Baron-Cohen S: The extreme male brain theory of autism. Trends in Cognitive Sciences 2002; 6(6), 248-254.
11. Auyeung B, Baron-Cohen S, Ashwin E, Knickmeyer R, Taylor K, Hackett G: Fetal testosterone and autistic traits. Brit J psych 2009; 100(1), 1-22.
12. Gardner RM, Lee BK, Brynne M, Sjöqvist H, Dalman C, Karlsson, H: Neonatal levels of acute phase proteins and risk of autism spectrum disorders. bioRxiv 2020; 2002.2013.947572.
13. Ruhela RK, Soni S, Sarma P, Prakash A, Medhi, B: Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. Ann Neurosci 2019; 26(1), 25-31.
14. Foley KA, Ossenkopp KP, Kavaliers M, Macfabe DF: Pre- and neonatal exposure to lipopolysaccharide or the enteric metabolite, propionic acid, alters development and behavior in adolescent rats in a sexually dimorphic manner. PloS one 2014; 9(1).

Rami Saade, Simona Humplíková, Vanda Repiská: Vplyv štatistického vyhodnocovania dát zo sekvenovania novej generácie na zefektívnenie neinvazívneho prenatalného testovania. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 218-224.

44.Vplyv štatistického vyhodnocovania dát zo sekvenovania novej generácie na zefektívnenie neinvazívneho prenatalného testovania

Mgr. Rami Saade¹
(patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Spoluautor: MUDr. Simona Humplíková¹
Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.¹

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava

Úvod

Trendom 21. storočia je oddaľovanie plánovania rodičovstva, čoho dôkazom sú aj demografické ukazovatele. Kým v roku 1985 bol priemerný vek prvorodičky na Slovensku 22,6 rokov, o generáciu neskôr, konkrétne v roku 2005 stúpol priemerný vek prvorodičky na 25,7 rokov (1) a v roku 2016 dosiahol tento ukazovateľ hodnotu 27,0 rokov. Na základe uvedeného trendu možno konštatovať, že priemerný vek prvorodičiek neustále rastie, a to nielen u nás ale aj v ostatných krajinách EÚ, v rámci ktorej bol v roku 2019 priemerný vek prvorodičiek žien 29,4 rokov (2). Zatiaľ čo sa vek rodičiek u nás neustále preukázateľne zvyšuje, biologická podstata ľudského druhu sa evolučne nestíha v tak krátkom čase prispôbovať súčasnému trendu. Následkom toho je čoraz častejšie vynárajúcou sa problematikou vplyv neskoršieho tehotenstva na vznik a vývin zdravého dieťaťa ako aj vplyv na zdravie samotnej matky. Zvyšujúci sa vek matiek so sebou prináša zvýšené riziko výskytu chromozomálnych aberácií u dieťaťa (3), ako aj vyššie riziko výskytu onkologických ochorení ženských reprodukčných orgánov v porovnaní so ženami, ktoré svoje prvé dieťa porodili v skoršom veku.

Vzhľadom na spomínané riziká narastá aj potreba spoľahlivej prenatalnej diagnostiky, ktorá by bola schopná detegovať prípadnú chromozomálnu aberáciu u vyvíjajúceho sa plodu s čo najvyššou senzitivitou a špecificitou. Zároveň by táto metóda mala byť aj cenovo dostupná pre možnosť jej využitia čo najširším spektrom obyvateľstva. Súčasnou najpresnejšou metódou prenatalného skríningu je neinvazívne prenatalné testovanie (NIPT), ktoré je založené na sekvenovaní cirkulujúcej voľnej fetálnej DNA, ktorá sa počas tehotenstva prirodzene nachádza v krvnej plazme tehotných žien. Dôležitým faktorom úspešnosti tejto metódy je správne nastavený laboratórny protokol spracovania vzorky, ako aj vhodné spracovanie výstupných sekvenačných dát a ich následná interpretácia.

Princípom NIPT je kvantifikácia jednotlivých fragmentov voľnej fetálnej DNA pochádzajúcich z trofoblastu placenty a správne určenie ich pôvodu, z ktorého chromozómu daný fragment pochádza, a aký je vzájomný pomer fragmentov pochádzajúcich z jednotlivých chromozómov. Tento pomer sa pomocou štatistického vyhodnotenia porovnáva s korešpondujúcimi hodnotami pochádzajúcimi z tehotenstiev, u ktorých bolo dané vyšetrenie uskutočnené, a u ktorých bolo potvrdené narodenie dieťaťa bez preukázanej chromozomálnej aberácie. Zlatým štandardom na takéto štatistické vyhodnotenie je výpočet z-skóre, ktoré vyjadruje mieru odlišnosti o násobok štandardných odchýlok od priemernej hodnoty pozorovaného javu. V úvahu pri kvantifikácii fragmentov je možné brať čítania pochádzajúce z jednotlivých autozómov ako aj gonozómov. Cieľom našej štúdie je navrhnúť postup, pomocou ktorého by bolo možné vhodne zvoliť iba jednotlivé autozómy, ktorých využitie by bolo v rámci štatistického vyhodnocovania výsledkov

Rami Saade, Simona Humpliková, Vanda Repiská: Vplyv štatistického vyhodnocovania dát zo sekvenovania novej generácie na zefektívnenie neinvazívneho prenatálneho testovania. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 218-224.

NIPT preukázateľne výhodnejšie oproti štandardnému prístupu, pri ktorom sa porovnáva pomer čítaní pochádzajúcich z chromozómu, ktorého trizómia spôsobuje niektorú z chromozomálnych aberácií (napr. chromozóm 21 pri Downovom syndróme), ku čítaniam pochádzajúcim zo všetkých ostatných chromozómov (4).

Materiál a metódy

Venózna krv bola ambulantne odobraná, do skúmavky obsahujúcej EDTA, 230 tehotným ženám rôzneho veku v rozličnom gestačnom týždni, avšak minimálne po 11. týždni tehotenstva. Dvojstupňovou centrifugáciou bola z krvných vzoriek oddelená krvná plazma, z ktorej bola následne vyizolovaná celková plazmatická DNA pomocou kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, DE). Vyizolovaná DNA bola spracovaná do fragmentovanej DNA knižnice s použitím kitu TruSeq Nano DNA Library Prep Kit (Illumina). Tieto vzorky vyizolovanej DNA boli následne sekvenované pomocou NGS sekvenátorov Illumina MiSeq. Sekvenačné dáta prebehli spracovaním podľa štandardnej analytickej pipeline využívanej na detekciu fetálnych aneuploidií, kvôli možnosti spätného porovnania výsledkov nášho navrhovaného postupu so zaužívaným postupom zavedeným v klinickej praxi. Pracovali sme s 200 vzorkami pochádzajúcimi z tehotenstiev, u ktorých pomocou NIPT nebola detegovaná prítomnosť trizómie 21. chromozómu a s 30 vzorkami, u ktorých bola trizómia 21. chromozómu po vyšetrení NIPT potvrdená aj následnou amniocentézou.

Sekvenačné dáta sme následne filtrovali na základe kvality čítania pomocou programu Trimmomatic a fragmenty s kvalitou čítania nižšou ako Phred=40 sme zahodili pre väčšiu hodnovernosť výsledkov. Všetky vzorky sme namapovali pomocou mapovacieho algoritmu Bowtie2 na ľudský referenčný genóm hg19 a pomocou nami navrhnutého programu sme vykonali LOESS korekciu pre odstránenie prípadného GC-bias.

Štatisticky sme vzorky vyhodnotili pomocou výpočtu z-skóre pre chromozóm 21 podľa metódy, ktorú publikoval Lau et al. (4):

$$p = \frac{\text{počet fragmentov chr21 v trénovacích vzorkách}}{\text{počet všetkých fragmentov v trénovacích vzorkách}}$$

$$t = \frac{\text{počet fragmentov chr21 v testovanej vzorke}}{\text{počet všetkých fragmentov v testovanej vzorke}}$$

$$z = \frac{t - \text{aritmetický priemer}(p)}{\text{štandardná odchýlka}(p)} \quad (4)$$

Ako trénovacie sme pritom použili 170 vzoriek pochádzajúcich zo zdravých plodov a ako testovacie 30 vzoriek zo zdravých plodov a 30 trizomických vzoriek s potvrdeným Downovým syndrómom. Týmto krokom sme overili, že pri spracovaní dát sme postupovali správne, pretože sme nezaznamenali žiadne falošne pozitívne ani falošne negatívne vzorky.

Následne sme vypočítali variačný koeficient pre jednotlivé chromozómy pričom sme brali v úvahu počet namapovaných čítaní, ktoré sa nám podarilo na nich namapovať v rámci nášho súboru vzoriek podľa vzorca:

$$CV = \frac{\text{štandardná odchýlka počtu fragmentov namapovaných na daný chromozóm}}{\text{aritmetický priemer počtu fragmentov namapovaných na daný chromozóm}} * 100$$

Rami Saade, Simona Humplíková, Vanda Repiská: Vplyv štatistického vyhodnocovania dát zo sekvenovania novej generácie na zefektívnenie neinvazívneho prenatalného testovania. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 218-224.

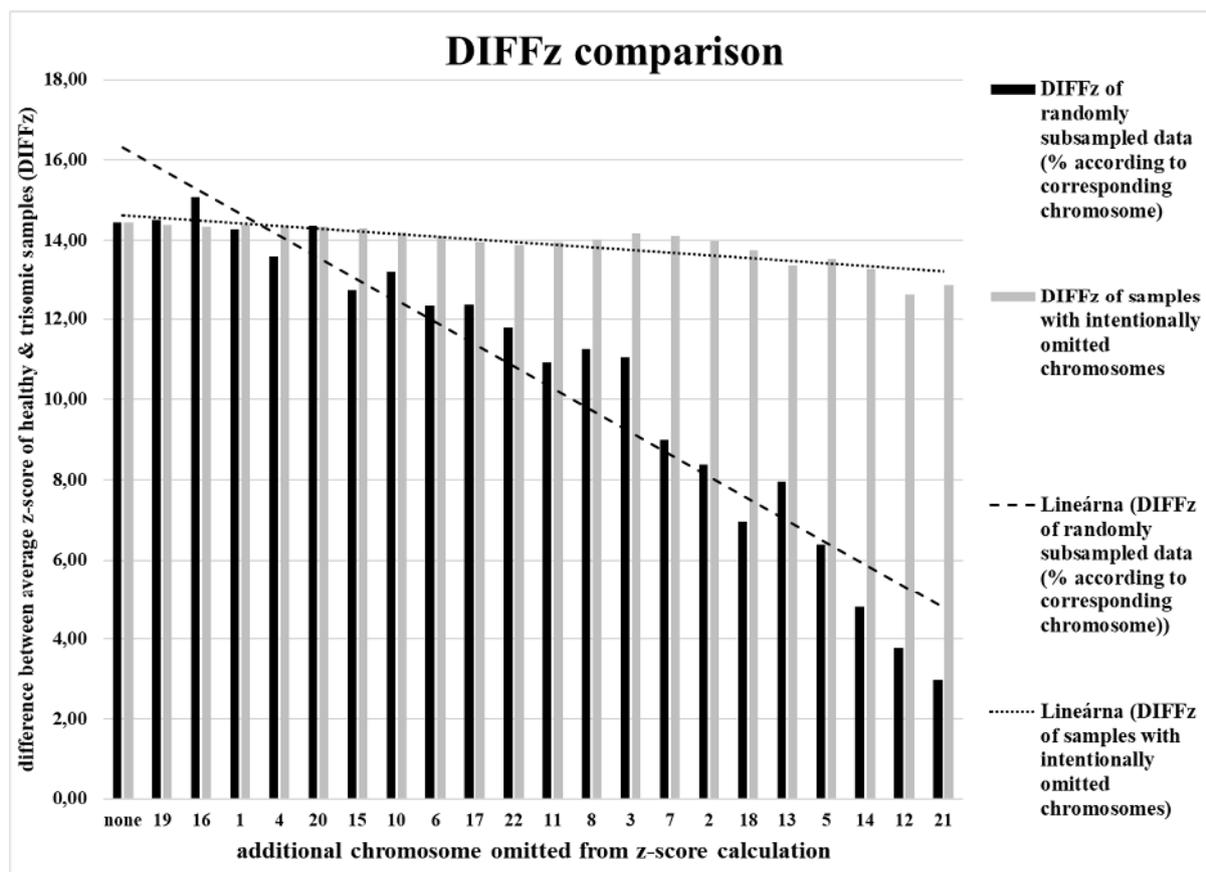
Variačné koeficienty jednotlivých chromozómov sme zoradili od najväčšieho po najmenší a vo výpočte z-skóre sme skúšali postupne vynechávať čítania namapované na chromozómy, ktorých variačný koeficient vyšiel ako najvyšší, inak povedané, ktorých početnosť zastúpená v jednotlivých vzorkách nie je v rámci nášho súboru 230 vzoriek stabilná, ale vykazuje variabilitu. Tento postup sme opakovali, až kým nám na dosadenie do vzorca neostali len čítania z chromozómu, ktorého variačný koeficient dosahoval najnižšiu hodnotu.

Výsledky

Tabuľka č.1: Jednotlivé chromozómy zoradené podľa variačného koeficientu počtu čítaní, ktoré sa na nich namapovali. Čím bol variačný koeficient vyšší, tým väčšie boli rozdiely medzi jednotlivými vzorkami v počte čítaní namapovaných na daný chromozóm. Pri jednotlivých chromozómoch v tomto prípade platí, že pre daný chromozóm nie je pri výpočte z-skóre dosadený do vzorca počet čítaní namapovaných na daný chromozóm ako aj na všetky ostatné chromozómy s vyšším variačným koeficientom. Napríklad, ak počítame z-skóre vzoriek bez započítania čítaní namapovaných na chromozóm 10, tak už nezaráčujeme ani čítania namapované na chromozómy 15, 20, 4, 1, 16 a 19. DIFFz sme vypočítali ako rozdiel priemerného z-skóre zdravých testovaných vzoriek a priemerného z-skóre trizomických vzoriek. Tu platí, že čím je DIFFz vyššie, tým sú výsledky danej metodiky signifikantnejšie. Vo všeobecnosti na to, aby sme vzorku označili ako trizomickú je hraničnou hodnotou z-skóre vyššie ako 3.

chromozóm	variačný koeficient (%)	DIFFz
všetky autozómy	-	14,45
chr19	3,542	14,39
chr16	2,327	14,33
chr1	2,090	14,38
chr4	1,891	14,35
chr20	1,752	14,33
chr15	1,749	14,29
chr10	1,731	14,20
chr6	1,716	14,09
chr17	1,586	13,95
chr22	1,564	13,87
chr11	1,532	13,95
chr8	1,516	14,01
chr3	1,455	14,17
chr7	1,386	14,10
chr2	1,373	13,98
chr18	1,356	13,74
chr13	1,354	13,36
chr5	1,295	13,54
chr14	1,280	13,29
chr12	1,225	12,65
chr21	1,216	12,88
chr9	1,159	-

Rami Saade, Simona Humplíková, Vanda Repiská: Vplyv štatistického vyhodnocovania dát zo sekvenovania novej generácie na zefektívnenie neinvazívneho prenatálneho testovania. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 218-224.



Graf č.1: Porovnanie DIFFz hodnôt po vynechaní jednotlivých chromozómov z výpočtu z-skóre. Pre overenie správnosti našich výsledkov sme v rámci jednotlivých výpočtov z-skóre testovaných a trizomických vzoriek odobrali náhodné čítania ktorých množstvo percentuálne korešpondovalo s percentuálnym úbytkom po odobratí daného chromozómu. Napríklad, ak čítania namapované na chromozóm 19 tvorili priemerne 1,8% všetkých čítaní namapovaných na autozómy, tak sme z pôvodnej vzorky odstránili 1,8% náhodných čítaní a výsledné DIFFz vypočítané z takýchto vzoriek (sivé stĺpčeky) sme navzájom porovnali s prípadom, kde sme cielene odstránili len čítania namapované na chromozóm 19 (čierne stĺpčeky). Ako sme už vysvetlili v predošlej tabuľke, ak sme odstránili napríklad všetky čítania namapované na chromozóm 2, tak sme odstránili aj čítania namapované na všetky chromozómy, ktoré mali variačný koeficient vyšší ako daný chromozóm. Takže ak sme odstránili z výpočtu všetky chromozómy namapované na už spomínaný chromozóm 2, odstránili sme aj čítania pochádzajúce z chromozómov 7, 3, 8, 11, 22, 17, 6, 10, 15, 20, 4, 1, 16, 19 a taktiež sme vypočítali percentuálne zastúpenie odstránených čítaní v rámci všetkých čítaní namapovaných na autozómy, v tomto prípade 73%, a náhodne sme z testovaných a trizomických vzoriek odstránili 73% čítaní a výsledné DIFFz sme znova porovnali s cieľeným odstránením čítaní namapovaných na dané chromozómy. Trendové čiary naznačujú, že zatiaľ čo pri cieľenom odstraňovaní čítaní z jednotlivých chromozómov nám kleslo DIFFz len zanedbateľne, pri náhodnom odstránení korešpondujúceho množstva čítaní sa zhoršil výsledok signifikantne.

Diskusia

Vyšetrenie NIPT je pre pacientku príjemnejšou a bezpečnejšou alternatívou k invazívnym prenatálnym diagnostickým metódam. Zatiaľ sa NIPT pokladá len za skriningovú metódu, čo v praxi znamená, že prípadný pozitívny výsledok takéhoto testu je indikáciou pre podstúpenie

Rami Saade, Simona Humplíková, Vanda Repiská: Vplyv štatistického vyhodnocovania dát zo sekvenovania novej generácie na zefektívnenie neinvazívneho prenatalného testovania. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 218-224.

amniocentézy, ktorá buď potvrdí, alebo vyvráti diagnózu. Autori udávajú rôznu senzitivitu a špecificitu vyšetrenia NIPT zhrnutú v tabuľke č.2, pričom mnohí z nich prirovnávajú spoľahlivosť NIPT ku amniocentéze, či k odberu choriových klkov.

Tabuľka č.2: Porovnanie jednotlivých vlastností prenatalných diagnostických a skríningových metód vytvorené na základe údajov z publikácií (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13)

metóda	obdobie výkonu (gestačný týždeň)	falošná pozitivita	senzitivita	špecificita	v SR výkon hrazený poisťovňou (údaj k 16.4.2021)	riziko potratu
amniocentéza	15.-20.	≈ 0%	≈ 99%*	≈ 99%	áno	1%
odber choriových klkov	11.-14.	≈ 0%	≈ 99%*	≈ 99%	áno	1,5%
triple test	14.-16.	5%	70%	90%	áno	žiadne
kombinovaný test	11.-12.	5%	90%	95%	áno	žiadne
NIPT	10.-22.	<0,1%	>99%**	>99%	nie	žiadne

* - sú známe prípady, kedy pri mozaicizme bola nesprávne vylúčená trizómia plodu (14)

** - pri detekcii trizómie 13. chromozómu je senzitivita nižšia, kvôli technickým problémom (6)

Problémom ostáva relatívne vysoká cena NIPT vzhľadom na či už technickú náročnosť, pretože samotné sekvenovanie prebieha na NGS sekvenátoroch, ktorých cena sa pohybuje rádovo v desiatkach až stovkách tisícov eur, nehovoriac o použitých reagentoch, ale taktiež súvisí cena takéhoto vyšetrenia aj s nárokmi na personál, ktorý si vyžaduje špeciálne zaškolenie nie len na samotné laboratórne spracovanie vzorky, ale aj na následné bioinformatické spracovanie dát, ako aj ich konečnú interpretáciu. V SR v súčasnosti nehradí takéto vyšetrenia žiadna z poisťovní, takže záujemkyne sú nútené si za vyšetrenie zaplatiť.

Jedným z riešení ako znížiť finančné nároky na vyšetrenie NIPT by bolo zmenšiť nároky na používané chemikálie, ako aj na výpočtové kapacity využívané pri analýze dát. V rámci nášho výskumu sme sa zamerali na vplyv zmien parametrov štatistického spracovania dát, pričom našou snahou bolo zachovať hodnovernosť výsledkov detekcie aneuploidií vo vzorke, kde sú dôležitými ukazovateľmi senzitivita a špecificita, ktoré sa nám podarilo udržať na 100%. Ďalším z ukazovateľov bol parameter DIFFz, ktorý vyjadruje rozdiel medzi priemerným z-skóre zdravých a trizomických vzoriek. Čím je DIFFz väčšie, tým je väčší rozdiel v zastúpení čítaní namapovaných na chromozóm 21 medzi zdravými a trizomickými vzorkami voči čítaniam namapovaným na ostatné chromozómy, čo je štandardom zaužívaným v klinickej praxi. Naším cieľom bolo nájsť spôsob, ktorým by sa dalo zredukovať množstvo potrebných čítaní pri súčasnom zachovaní už spomínaných parametrov kvality testu. Aby sme identifikovali chromozómy, ktorých percentuálne zastúpenie vo vzorke vykazuje čo najmenšiu variabilitu, vypočítali sme koeficienty variability pre všetky chromozómy z dát, ktoré sme získali spracovaním všetkých našich 230 vzoriek. Chromozómy sme zoradili na základe výsledkov výpočtu koeficientu variability a následne sme vypočítali z-skóre pre všetky vzorky, avšak vždy sme uberali postupne po jednom chromozóme v nasledujúcom výpočte, pričom sme neustále sledovali vplyv na senzitivitu, špecificitu, ako aj na DIFFz. Postupne sme tieto kroky

Rami Saade, Simona Humplíková, Vanda Repiská: Vplyv štatistického vyhodnocovania dát zo sekvenovania novej generácie na zefektívnenie neinvazívneho prenatálneho testovania. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 218-224.

zopakovali pre všetky chromozómy, čoho výsledok interpretujeme v tabuľke č.1 a grafe č.1. Aby sme overili, či naše výsledky nie sú čisto náhodné, pri každom vynechaní chromozómu z výpočtu z-skóre sme analogicky odstránili isté množstvo náhodných čítaní, ktorých počet korešpondoval s percentuálnym zastúpením už vynechaných chromozómov. Podarilo sa nám preukázať, že nami dosiahnuté výsledky neboli zapríčinené náhodne a že výsledok testu bol ovplyvnený len mierne – DIFFz pri výpočte so všetkými autozómami bol 14,45, zatiaľ čo pri zahrnutí čítaní pochádzajúcich len z chromozómu 9 bola hodnota DIFFz 12,28. V praxi by to mohlo znamenať, že v rámci NIPT by mohlo byť postačujúce vyšetřovať len pomer množstva fragmentov pochádzajúcich z chromozómu 21 ku množstvu fragmentov pochádzajúcich z chromozómu 9, pričom by výsledok testu nemal byť signifikantne rozdielny oproti prípadu, kedy by sa osekvenovali úplne všetky chromozómy. Chromozóm 9 tvorí len približne 4,5% celého genómu človeka a chromozóm 21 približne 1,5%, čo tvorí dokopy cca. 6%. V prípade, ak by sa cielene sekvenovali len spomínané chromozómy, bolo by možné teoreticky ušetriť náklady spojené s analýzou až 94% genómu, ktoré, ako ukazujú naše výsledky, nie sú nevyhnutne potrebné k správnej interpretácii výsledkov NIPT. Bolo by však potrebné našu metodiku otestovať na väčšom súbore vzoriek, predovšetkým trizomických, aby sa potvrdila 100% senzitivita a špecificita nášho prístupu a taktiež by bolo potrebné otestovať nami navrhovanú metodiku okrem Downovho syndrómu aj na ostatných aneuploidiách.

Podakovanie: Dovoľujeme si poďakovať Ministerstvu školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky za finančnú podporu na riešenie projektu VEGA 1/0570/21 s názvom Molekulárne perspektívy gestačnej trofoblastovej choroby - antická choroba v ére modernej medicíny.

Zoznam použitej literatúry

1. Potančoková M, Vanňo B, Pilinská V, Jurčová D: Fertility between tradition and modernity. Demographic Research 2008; 19: 973–1018.
2. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Fertility_statistics (navštívené 16.4.2021)
3. Grinshpun-Cohen J, Miron-Shatz T, Ries-Levavi L, Pras E: Factors that affect the decision to undergo amniocentesis in women with normal Down syndrome screening results: it is all about the age. Health Expectations 2015; 18: 2306-2317.
4. Lau T K, Chen F, Pan X, Pooh R K, Jiang F, Li Y, Jiang H, Li X, Chen S, Zhang X: Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 2012; 25: 1370-1374.
5. Alfirevic Z, Walkinshaw S A, Kilby M D: Amniocentesis and Chorionic Villus Sampling. Green-top Guideline No. 8 2010
6. Dey M, Sharma S, Aggarwal S: Prenatal Screening Methods for Aneuploidies. North American Journal of Medical Sciences 2013; 5, 182-190.
7. Heckerling P S, Verp M S: Amniocentesis or chorionic villus sampling for prenatal genetic testing: A decision analysis. Journal of Clinical Epidemiology 1991; 44, 657-670.
8. Huderer-Duric K, Skrablin S, Kuvacic I, Sonicki Z, Rubala D, Suchanek E: The triple-marker test in predicting fetal aneuploidy: a compromise between sensitivity and specificity. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2000; 88, 49-55.

Rami Saade, Simona Humplíková, Vanda Repiská: Vplyv štatistického vyhodnocovania dát zo sekvenovania novej generácie na zefektívnenie neinvazívneho prenatálneho testovania. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 218-224.

9. Minarik G, Repiska G, Hyblova M, Nagyova E, Soltys K, Budis J, Duris F, Sysak R, Gerykova Bujalkova M, Vlkova-Izrael B, Biro O, Nagy B, Szemes T: Utilization of Benchtop Next Generation Sequencing Platforms Ion Torrent PGM and MiSeq in Noninvasive Prenatal Testing for Chromosome 21 Trisomy and Testing of Impact of In Silico and Physical Size Selection on Its Analytical Performance. *PLoS One* 2015; 10, e0144811.
10. Mujezinovic F, Alfirevic Z: Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstetrics & Gynecology* 2007; 110, 687-694.
11. Ogilvie C, Akolekar R: Pregnancy Loss Following Amniocentesis or CVS Sampling—Time for a Reassessment of Risk. *Journal of Clinical Medicine* 2014; 3, 741-746.
12. Stenhouse E J, Crossley J A, Aitken D A, Brogan K, Cameron A D, Connor J M: First-trimester combined ultrasound and biochemical screening for Down syndrome in routine clinical practice. *Prenatal Diagnosis* 2004; 24, 774-780.
13. Swanson A, Sehnert A J, Bhatt S: Non-invasive Prenatal Testing: Technologies, Clinical Assays and Implementation Strategies for Women's Healthcare Practitioners. *Current Genetic Medicine Reports* 2013; 1, 113-121.
14. Uquillas K, Chan Y, King J R, Randolph L M, Incerpi M: CHORIONIC VILLUS SAMPLING FAILS TO CONFIRM MOSAIC TRISOMY 21 FETUS AFTER POSITIVE CELL-FREE DNA. *Prenatal Diagnosis* 2016; doi: 10.1002/pd.4992

Miroslav Tibenský, Andrej Tillinger, Boris Mravec: Propranolol pôsobí preventívne pri vzniku mamárneho karcinómu indukovaného karcinogénom. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 225-231.

45. Propranolol pôsobí preventívne pri vzniku mamárneho karcinómu indukovaného karcinogénom

MUDr. Miroslav Tibenský¹
(lekárske neurovedy)

Spoluautori: Ing. Andrej Tillinger, PhD²

Školiteľ: prof. MUDr. Boris Mravec, PhD¹

¹Fyziologický ústav LF UK, Bratislava ²Oddelenie neurovied, Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

Úvod

Nádorové choroby patria celosvetovo medzi jednu z hlavných príčin mortality, pričom mamárny karcinóm predstavuje najčastejšie diagnostikované onkologické ochorenie a druhú najčastejšiu príčinu smrti u žien (1). Výskum z posledných dvoch desaťročí preukázal, že nervový systém zohráva v etiopatogenéze nádorových chorôb významnú úlohu. Boli identifikované viaceré mechanizmy a dráhy, prostredníctvom ktorých nervový systém ovplyvňuje nádorový rast a vznik metastáz (2). Predpokladá sa, že významnú úlohu v patogenéze mamárneho karcinómu môže zohrávať aj sympatikový nervový systém, ktorý je vo zvýšenej miere aktivovaný napríklad počas stresu. Efektorové molekuly, ktorá sprostredkujú vplyv sympatikového nervového systému na vznik a progresiu mamárny karcinóm sú noradrenalín a adrenalín. Sympatikový nervový systému pôsobí aj na vznik metastáz a to prostredníctvom β 2 adrenergických receptorov nachádzajúcich sa na bunkách mamárneho karcinómu (3-5). Nedávno bolo preukázané, že propranolol (neselektívny blokátor β -adrenergických receptorov) má od dávky závislý anti-proliferatívny účinok na bunkové línie mamárneho karcinómu (6). Viaceré retrospektívne štúdie taktiež preukázali potenciálny benefit podávania propranololu u pacientiek s mamárnym karcinómom. Bolo pozorované, že pacientky s mamárnym karcinómom, ktoré dlhodobo užívali propranolol na liečbu hypertenzie, mali redukovanú nádorovú progresiu, mortalitu ale aj signifikantne zvýšený čas bez progresie oproti pacientkam, ktoré tento liek neužívali (7-9). Z vyššie uvedených prác vyplýva, že blokáda β -adrenergickej signalizácie v už vzniknutom mamárnom karcinóme má liečebný efekt v predklinických ale aj klinických štúdiách. Avšak vplyv propranololu na vznik nádorov je popísaný iba čiastočne a údaje sú nejednoznačné. Preto sme sa zamerali na skúmanie vplyvu propranololu, ktorý sme podávali ešte pred vznikom mamárneho karcinómu indukovanom prostredníctvom chemickej karcinogenézy. Experiment bol zameraný na určenie, či propranolol ovplyvní vznik mamárneho karcinómu a jeho progresiu.

Materiál a metódy

Experimentálne zvieratá. 88 samíc rodu Sprague-Dawley (Charles River, Nemecko) boli chované v klietkach za štandardných podmienok.

Experimentálny dizajn. Po 7 dňoch aklimatizácie, bol všetkým potkanom intraperitoneálne podaný karcinogén N-methyl-N-nitrozourea (MNU) a to na 50. a 52. deň života v dávke 50mg/kg. MNU bolo podávané vo fyziologickom roztoku, ktorého pH bola upravená na 4 a to pomocou kyseliny octovej. Následne boli zvieratá náhodne rozdelené do troch experimentálnych skupín: a) kontrolná skupina (MNU): zvieratám bolo intraperitoneálne podané MNU, žiadne ďalšie látky sa im už ale nepodávali (n=36); b) zvieratám bolo intraperitoneálne podané MNU a následne sa im podávalo vehikulum (fyziologický roztok) (MNU-veh), podávanie vehikula začalo po 12 dňoch od prvého podania MNU

Miroslav Tibenský, Andrej Tillinger, Boris Mravec: Propranolol pôsobí preventívne pri vzniku mamárneho karcinómu indukovaného karcinogénom. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 225-231.

a trvalo 10 týždňov (n=20); c) zvieratám bolo intraperitoneálne podané MNU a následne sa im podával propranolol (P0884 Sigma-Aldrich, (\pm)-Propranolol hydrochloride, \geq 99% (TLC), powder) (MNU-Prop), zvieratám bol propranolol podávaný v dávke 20mg/kg od 12. dňa od prvého podania MNU a táto aplikácia trvala 10 týždňov (n=32).

Publikované údaje dokladujú, že intraperitoneálne podanie MNU viedlo v prsnej žľaze k vývoju opúzdreného malígneho nádoru pevnej konzistencie. Prítomnosť hmatateľnej nádorovej hmoty v prsných oblastiach sme preto sledovali počas celej doby experimentu. Ihneď po usmrtení zvierat sme odobrali dreň nadobličiek a nádorové tkanivá, určila sa ich hmotnosť a vzorky sa zmrazili až do ďalšej analýzy.

Izolácia RNA a real-time PCR: RNA bola izolovaná využitím TRI Reagent®RT (MRC, Inc.) podľa inštrukcií výrobcu. Koncentrácia RNA bola zmeraná prostredníctvom NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Následne bola RNA prepísaná do DNA pomocou kitu RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) s využitím oligo dT primera podľa inštrukcií výrobcu. Semikvantitatívna real-time PCR bola vykonaná v objeme 25 μ L, obsahujúcom 30 ng templátovej cDNA, 12,5 μ L FastStart Universal SYBR Green Master Rox (Roche), 1 μ L páru špecifických primerov (sekvencie použitých primerov sú v tabuľke 1) a vodu. Vzorky boli analyzované na ABI7900HT Fast Real-Time PCR prístroji (Applied Biosystems) za nasledovných podmienok: 1 cyklus (2 min) pri 50°C, nasledovaný 1 cyklom (10 min) pri 95°C a 40 cyklami pri 95°C (15 s) a 60°C (1 min). Údaje boli normalizované podľa expresie GAPDH a vyjadrené ako relatívna fold change využívajúc $\Delta\Delta$ Ct metódu (10). Na potvrdenie špecificity amplifikovaných produktov sme použili analýzu disociačnej krivky.

Tab 1: Použité primery a ich sekvencie

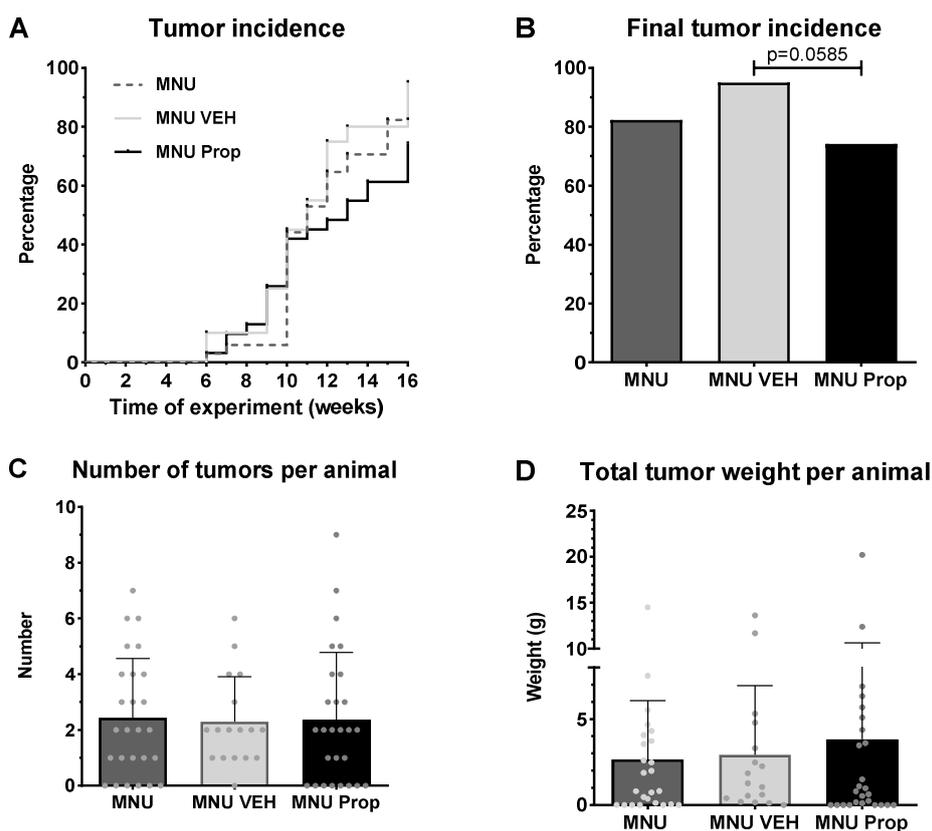
Gén	Sekvencia primerov
TH	For. 5'- CCGGTCTACTGTCCGCCCGT-3' Rev. 5'-TCATGGCAGCAGTCCGGCTC-3'
PNMT	For. 5'- GGTCCTCATTGACATCGGCT-3' Rev. 5'- GGACTCTCCCTTGCCTCGAT-3'
FosB	For. 5'- GTGAGAGATTTGCCAGGGTC-3' Rev. 5'- AGAGAGAAGCCGTCAGGTTG-3'
P53	For. 5'-CTTAAGATCCGTGGGCGTGAG-3' Rev. 5'-TTGGTCTTCGGGTAGCTGGA-3'
Bcl2	For. 5'-CACCCCTGGTGGACAACATC-3' Rev. 5'-ATAGTTCCACAAAGGCATCCCAG-3'
Casp3	For. 5'-CAGAGCTGGACTGCGGTATT-3' Rev. 5'-CAGGAATAGTAACCGGGTGCG-3'
IL-1 β	For. 5'-CAGCTTTCGACAGTGAGGAGA-3' Rev. 5'-TGTCGAGATGCTGCTGTGAG-3'
TNF- α	For. 5'-GATCGGTCCCAACAAGGAGG-3' Rev. 5'-GTTTGCTACGACGTGGGCTA-3'
IL-10	For. 5'-GTAGAAGTGATGCCCCAGGC-3' Rev. 5'-AATCGATGACAGCGTCGCA-3'
MMP2	For. 5'-ACTTTGGTCGATGGGAGCAT-3' Rev. 5'-AGAGTCCACAGCTCATCGTC-3'
GAPDH	For. 5'-TGGACCACCCAGCCAGCAAG-3' Rev. 5'-GGCCCTCCTGTTGTTATGGGGT-3'

Miroslav Tibenský, Andrej Tillinger, Boris Mravec: Propranolol pôsobí preventívne pri vzniku mamárneho karcinómu indukovaného karcinogénom. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 225-231.

Štatistická analýza. Všetky štatistické analýzy boli vykonané použitím programu GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego CA, USA). Štatistické rozdiely medzi skupinami boli určené prostredníctvom jednocestnej analýzy variancie (ANOVA). Čas detekcie novo vzniknutého nádoru palpáciou bol analyzovaný Kaplan-Meier-ovým testom a Log-rank test bol použitý pre určenie štatistických rozdielov. Rozdiely boli považované za signifikantné ak $P < 0.05$. Analyzované údaje sú vyjadrené ako priemer \pm SEM.

Výsledky

Vplyv propranololu na incidenciu a rast mamárneho karcinómu. Keď porovnáme čas palpačnej detekcie nádorov medzi experimentálnymi skupinami zistíme, že podávanie propranololu predĺžilo dobu kedy bol po prvý krát detekovateľný tumor na 13. týždeň v porovnaní so skupinami MNU a MNU-veh, v ktorých bol detegovaný nádor v priemere už v 11. týždni (Obr. 1A). Takisto incidencia nádorov v skupine, ktorej sa podával propranolol (74.2%) bola nižšia ako v skupine liečenej vehikulom (95.0%; MNU-Prop vs. MNU-Veh $P = 0.0585$). V skupine bez aplikácie vehikula alebo propranololu vyvinulo mamárny karcinóm 82% zvierat (Obr. 1B). Liečba propranololom ale neovplyvňovala počet nádorov u zvierat (Obr. 1C) ani hmotnosť nádorov (Obr. 1D).

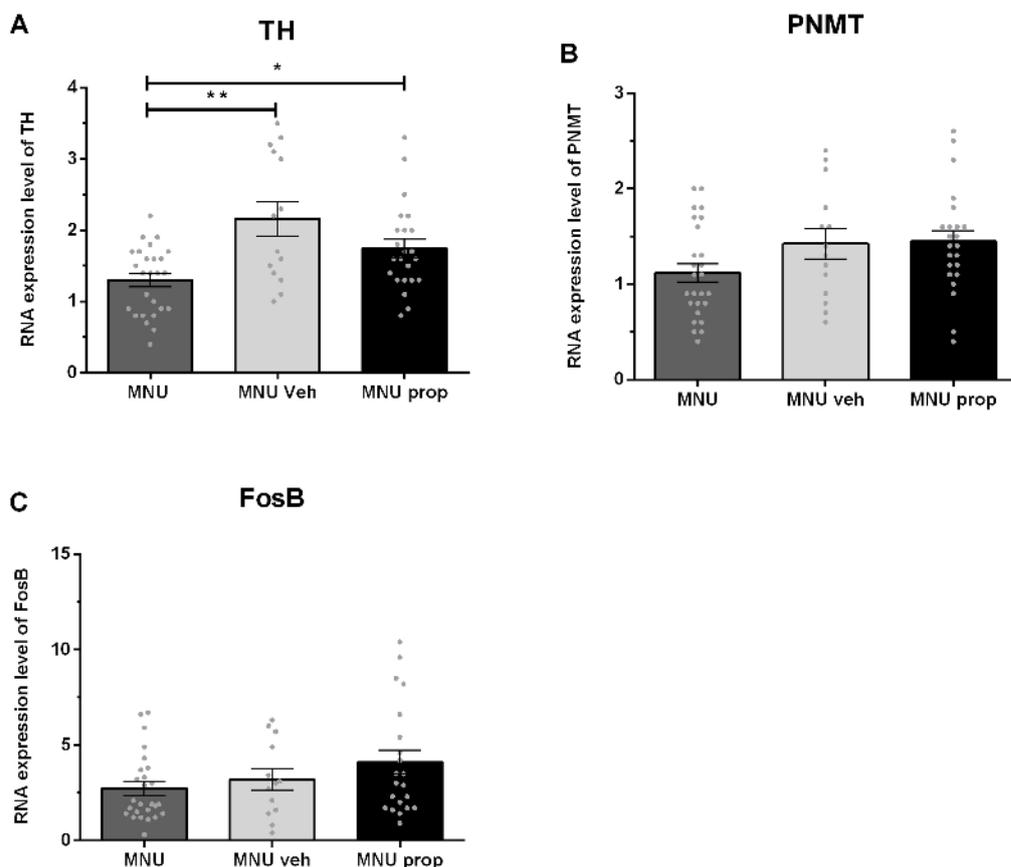


Obr. 1: Čas detekcie nádorov (A) a incidencia nádorov na konci experimentu (B), počet nádorov u zvierat detekovaných počas autopsie (C) a hmotnosť nádorov u zvierat (D).

Vplyv propranololu na adrenergickú signalizáciu. Aplikácia fyziologického roztoku alebo propranololu je sprevádzaná bolesťou, ktorá následne aktivuje neuroendokrinnú stresovú reakciu. Rozsah tejto aktivácie sme hodnotili na základe určenia gémovej expzie enzýmov biosyntézy katecholamínov,

Miroslav Tibenský, Andrej Tillinger, Boris Mravec: Propranolol pôsobí preventívne pri vzniku mamárneho karcinómu indukovaného karcinogénom. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 225-231.

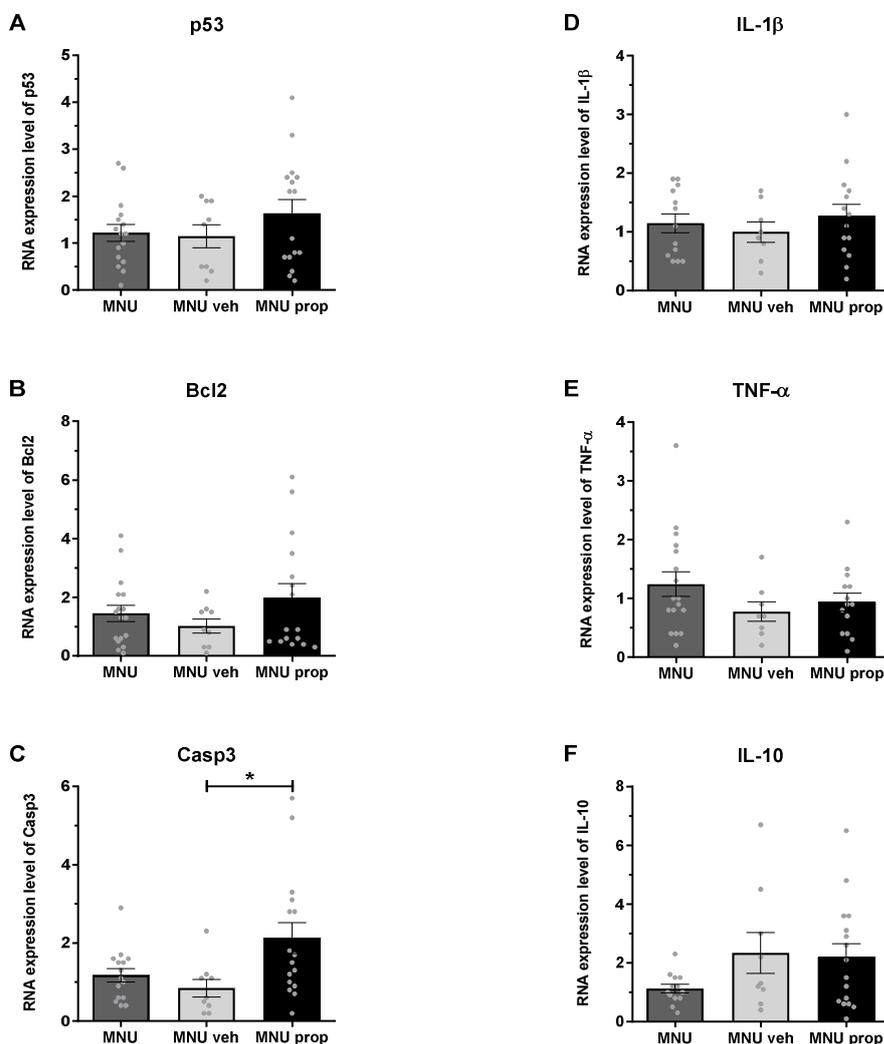
konkrétne tyrozín hydroxylázy (TH) a fenyletanolamín N-metyl transferázy (PNMT), ako aj markera aktivácie buniek FosB v tkanive drene nadobličiek. Zistili sme signifikantné zvýšenie expície TH v skupinách, ktorým sa podávalo vehikulum a propranololom (MNU vs. MNU-Veh $P < 0.01$; MNU vs. MNU-Prop $P < 0.05$; Obr. 2A). Génová expresia PNMT a FosB sa nelíšila medzi experimentálnymi skupinami (Obr. 2B, C).



Obr. 2: Génová expresia TH (A), PNMT (B) a FosB v dreni nadobličky.

Vplyv propranololu na progresiu nádoru. Viaceré práce preukázali, že signalizácia sprostredkovaná β -adrenergickými receptormi ovplyvňuje procesy súvisiace s karcinogéznou (11). Preto sme skúmali vplyv podávania propranololu na faktory súvisiace s apoptózou alebo zápalovým prostredím v nádore. Zistili sme, že expresia génov p53 a Bcl2 nebola signifikantne ovplyvnená podávaním propranololu (Obr. 3A, B) na rozdiel od expície kaspázy 3 (Casp3), ktorá bola signifikantne zvýšená v MNU-Prop skupine v porovnaní so skupinou, ktorej sa podávalo vehikulum ($P < 0.05$; Obr. 3C). Rozdiely v expresii génov pre zápalové cytokíny IL-1 β , TNF- α a pre proti-zápalový cytokín IL-10 neboli medzi skupinami štatisticky signifikantné (Obr. 3D-F).

Miroslav Tibenský, Andrej Tillinger, Boris Mravec: Propranolol pôsobí preventívne pri vzniku mamárneho karcinómu indukovaného karcinogénom. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 225-231.



Obr. 3: Génová expresia p53 (A), Bcl2 (B), Casp3 (C), IL-1 β (D), TNF- α (E) a IL-10 (F) v nádorovom tkanive.

Diskusia

V rámci našej experimentálnej štúdie sme zistili, že dlhodobé injekčné podávanie či už fyziologického roztoku alebo propranololu je sprevádzané aktiváciou drene nadobličky, konkrétne zvýšenou expresiou tyrozín hydroxylázy, rýchlosť limitujúceho enzýmu biosyntézy katecholamínov, čo poukazuje na to, že opakované injekčné podávanie látok vyvolalo u zvierat chronický stres. Je zrejmé, že u týchto zvierat došlo preto k zvýšenému uvoľňovaniu katecholamínov a tým aj k zvýšenej aktivácii adrenergických receptorov. V tejto súvislosti je potom dôležitým zistenie, že podávanie propranololu, ktorý obmedzuje aktiváciu beta-adrenergických receptorov, predĺžilo čas, kedy boli detekovateľné prvé nádoroy a znížilo aj celkovú incidenciu nádorov u zvierat. Na základe našich zistení predpokladáme, že sa na tomto preventívnom účinku propranololu podieľalo zvýšenie expresie dôležitého apoptotického faktora Casp3.

V našom experimente sme potvrdili, že MNU je veľmi účinný karcinogén, keďže už po dvoch dávkach tohto karcinogénu vyvinulo 82% zvierat bez ďalšej intervencie mamárny karcinóm. Zvieratá, ktorým bol podávaný po dobu 10 týždňov fyziologický roztok vykazovali incidenciu tohto karcinómu v 95%. Na druhej strane, skupina ktorej bol podávaný propranolol vykazovala incidenciu iba 74%. Keď sme

Miroslav Tibenský, Andrej Tillinger, Boris Mravec: Propranolol pôsobí preventívne pri vzniku mamárneho karcinómu indukovaného karcinogénom. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 225-231.

porovnali skupiny zvierat, ktorým sa podávalo vehikulum a propranolol Fisherovým exaktným testom, zistili sme hraničné štatistické zníženie incidencie v skupine, ktorej sa podával propranolol ($P = 0.0585$). Podávanie propranololu tiež mierne predĺžilo dobu vývoja karcinómu, konkrétne na 13. týždeň v porovnaní s 11. týždňom u kontrolných potkanov, ktorým bol injekčne podané iba MNU, alebo u potkanov, ktorým bol injekčne podaný MNU a neskôr fyziologický roztok (Obr. 1A). Predpokladáme, že zvýšená incidencia karcinómu prsníka u potkanov, ktorým bol injekčne podávaný fyziologický roztok (skupina MNU-Veh), odrážala účinok stresom vyvolanej neuroendokrinnéj reakcie aktivovanej počas opakovaného injekčného podávania fyziologického roztoku, čo dokumentuje zvýšená génová expresia enzýmu syntetizujúceho katecholamíny TH (obr. 2A). Tento stres spočíva v manipulácii so zvieratami počas podávania fyziologického roztoku a bolesti súvisiace s injekčnou aplikáciou látky. Predpokladáme, že propranolol obmedzil adrenergickú signalizáciu súvisiacu so stresom, a preto znížil stimulačný účinok noradrenalínu a adrenalínu na proliferáciu nádorových buniek. Tento účinok bol však iba mierny, nakoľko liečba propranololom neovplyvnila počet rozvinutých nádorov u potkanov ani celkovú hmotnosť nádoru u zvierat (Obr. 1C, D). Na základe toho že, liečba propranololom mierne znížila incidencia mamárneho karcinómu vyvolaného karcinogénom MNU, zamerali sme sa na skúmanie génovej expresie faktorov, ktoré môžu sprostredkovať účinok adrenergickej signalizácie na nádor. Údaje z posledných dvoch desaťročí jasne preukazujú, že sympatikový nervový systém sa podieľa na vzniku niekoľkých typov nádorov. Tento účinok je sprostredkovaný napríklad prostredníctvom zvýšenia počtu mutácií DNA a redukciou opravných procesov, ako aj cez aktiváciu protoonkogénov (12-14). Okrem skúmania parametrov súvisiacich s vývojom nádorov, vrátane faktorov spojených s apoptózou a zápalu sme zistili, že propranolol významne ovplyvnil génovú expresiu Casp3 v nádorovom tkanive (obr. 3C). Preto sa domnievame, že propranololom indukovaná expresia Casp3 môže byť zodpovedná za predĺženie vzniku a zníženie incidencie mamárneho karcinómu indukovaného MNU.

Na záver možno zhrnúť, že v kontexte dostupných údajov naše výsledky naznačujú, že propranolol má potenciál znižovať vznik nádorov. Samozrejme, pre prípadné klinické využitie propranololu v prevencii vzniku nádorových chorôb bude potrebné podrobnejšie preskúmanie vplyvu jeho podávania na incidencia nádorov v ďalších modeloch nádorových chorôb.

Práca bola vypracovaná s podporou projektu APVV-17-0090 a čiastočne aj s grantom UK/25/2020.

Zoznam použitej literatúry

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020; 70 (1): 7-30.
2. Mravec B, Gidron Y, Hulin I. Neurobiology of cancer: Interactions between nervous, endocrine and immune systems as a base for monitoring and modulating the tumorigenesis by the brain. *Semin Cancer Biol* 2008; 18 (3): 150-163.
3. Campbell JP, Karolak MR, Ma Y et al. Stimulation of host bone marrow stromal cells by sympathetic nerves promotes breast cancer bone metastasis in mice. *PLoS Biol* 2012; 10 (7): e1001363.
4. Chang A, Le CP, Walker AK et al. beta2-Adrenoceptors on tumor cells play a critical role in stress-enhanced metastasis in a mouse model of breast cancer. *Brain Behav Immun* 2016; 57:106-115.
5. Chen H, Liu D, Guo L, Cheng X, Guo N, Shi M. Chronic psychological stress promotes lung metastatic colonization of circulating breast cancer cells by decorating a pre-metastatic niche through activating beta-adrenergic signaling. *J Pathol* 2018; 244 (1): 49-60.
6. Montoya A, Amaya CN, Belmont A et al. Use of non-selective beta-blockers is associated with decreased tumor proliferative indices in early stage breast cancer. *Oncotarget* 2017; 8 (4): 6446-6460.

Miroslav Tibenský, Andrej Tillinger, Boris Mravec: Propranolol pôsobí preventívne pri vzniku mamárneho karcinómu indukovaného karcinogénom. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 225-231.

7. Barron TI, Connolly RM, Sharp L, Bennett K, Visvanathan K. Beta blockers and breast cancer mortality: a population- based study. *J Clin Oncol* 2011; 29 (19): 2635-2644.
8. Childers WK, Hollenbeak CS, Cheriya P. beta-Blockers Reduce Breast Cancer Recurrence and Breast Cancer Death: A Meta-Analysis. *Clin Breast Cancer* 2015; 15 (6): 426-431.
9. Spera G, Fresco R, Fung H et al. Beta blockers and improved progression-free survival in patients with advanced HER2 negative breast cancer: a retrospective analysis of the ROSE/TRIO-012 study. *Ann Oncol* 2017; 28 (8): 1836-1841.
10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25 (4): 402-408.
11. Tang J, Li Z, Lu L, Cho CH. beta-Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2013; 23 (6 Pt B): 533-542.
12. Hara MR, Kovacs JJ, Whalen EJ et al. A stress response pathway regulates DNA damage through beta2-adrenoreceptors and beta-arrestin-1. *Nature* 2011; 477 (7364): 349-353.
13. Armaiz-Pena GN, Allen JK, Cruz A et al. Src activation by beta-adrenoreceptors is a key switch for tumour metastasis. *Nat Commun* 2013; 4:1403.
14. Hara MR, Sachs BD, Caron MG, Lefkowitz RJ. Pharmacological blockade of a beta(2)AR-beta-arrestin-1 signaling cascade prevents the accumulation of DNA damage in a behavioral stress model. *Cell Cycle* 2013; 12 (2): 219-224.

Ján Mihalečko, Martin Boháč, Ivan Varga: *Histologické štúdium pseudo-synoviálnej membrány vznikajúcej okolo prsníkových implantátov. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 232-233.*

46. Histologické štúdium pseudo-synoviálnej membrány vznikajúcej okolo prsníkových implantátov

MUDr. Ján Mihalečko¹
(anatómia, histológia a embryológia)

Spoluautor: doc. MUDr. Martin Boháč, PhD., MPH, MHA, FEBOPRAS²

Školiteľ: prof. RNDr. Ivan Varga, PhD. et PhD.¹

¹ Ústav histológie a embryológie LF UK, ² 2. onkologická klinika LF UK v Bratislave

Úvod

Metapláziu možno definovať ako transformáciu jedného diferencovaného typu buniek / tkaniva, na iný diferencovaný typ buniek / tkaniva. Je to reverzibilný jav, ktorý je zvyčajne následkom chronického dráždenia a / alebo zápalu. Významom metaplázie je nahradenie buniek relatívne citlivých na okolité podnety, a to bunkami mechanicky odolnejšími (5). Medzi učebnicové príklady metaplázií patrí napríklad transformácia viacvrstvého dlaždicového epitelu pažeráka na jednovrstvový epitel pripomínajúci epitel žalúdka, či čreva, pri chronickom refluxe žalúdka - tzv. Barrettov pažerák (8), ako aj transformácia viacradového cylindrického epitelu s riasinkami v dýchacích cestách na mechanicky odolnejší viacvrstvový dlaždicový epitel u fajčiarov (4). Relatívne netradičnou metapláziou je vytvorenie nepravého kĺbového puzdra okolo implantátov (napr. prsníkových), pri ktorých dochádza ku treniu medzi väzivom a implantátom. Súčasťou takejto pseudokapsuly môže byť aj synoviálna membrána, ktorá vzniká pri tzv. synoviálnej metaplázii. V našej práci prinášame detailnejší histologický opis tejto pseudo-synoviálnej membrány.

Materiál a metódy

Z archívu Ústavu histológie a embryológie LF UK sme analyzovali vzorky tkaniva z okolia prsníkových implantátov (resp. silikónových expandérov), ktoré pochádzali od 22 žien (priemerný vek 48 rokov). Tieto ženy podstúpili tzv. odloženú rekonštrukciu prsníka, ktorá nasledovala po chirurgickej liečbe karcinómu prsníka na Klinike plastickej, rekonštrukčnej a estetickej chirurgie LF UK a UNB. Vzorky tkanív boli spracované klasickou formalínovo – parafínovou metódou. Rezy tkaniva hrubé 5 mikrometrov sme zafarbili jednak hematoxylinom a eozínom, čo je zlatým štandardom v rámci histológie, a následne sme použili paletu 7 monoklonových protilátok, ktoré sumarizujeme v tabuľke 1. Výsledný produkt reakcie antigén – protilátka sme vizualizovali diaminobenzidínom do hnedej farby.

Tab. 1. Stručná charakteristika monoklonových protilátok použitých v experimente

Vimentín	Bielkovina intermediárnych filamentov III. typu, exprimuje sa v mezenchýmových bunkách
Dezmín	Tvorí stavebné podjednotky intermediárnych filamentov III. typu vo svalovom tkanive
Hladko-svalový aktín	Aktínový proteín, podieľa sa na kontraktilem aparáte hladkého svalstva
Cytokeratíny	Bielkoviny tvoriace cytoskelet (intermediárne filamentá) epitelových buniek
S100 proteín	Bielkovina viažuca vápnik, súčasť buniek pochádzajúcich z neurálnej lišty
CD68	Proteín, ktorý je silno exprimovaný v monocytoch a makrofágoch
Ki67	Bunkový marker proliferácie

Ján Mihalečko, Martin Boháč, Ivan Varga: Histologické štúdium pseudo-synoviálnej membrány vznikajúcej okolo prsníkových implantátov. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 232-233.

Výsledky

Na rozhraní medzi silikónovým expandérom / implantátom a okolitým väzivom sme pozorovali 50 až 200 mikrometrov hrubú vrstvu buniek, ktoré boli na prvý pohľad „epiteloidne“ usporiadané. Aj keď bola hustota buniek vysoká, čo je typické pre epitelové tkanivo, tieto bunky boli negatívne na cytokeratíny. Navyše sme v rámci tejto vrstvy našli aj krvné cievy, čo znova nie je charakteristické pre epitelové tkanivá. Bunky okolo implantátov boli negatívne na dezmin a hladko-svalový aktín, preto tieto bunky nie sú ani myofibroblastmi, ktoré by mohli vznikáť počas hojenia jazvy granulačným tkanivom. Bunky okolo implantátov boli pozitívne na vimentín, preto majú mezenchýmový pôvod. Približne 50% buniek je CD68 pozitívnych, teda majú pôvod v monocytovo - makrofágovom systéme. Cytoplazmová pozitivita na S100 bielkovinu bola slabá. Približne 5-10% buniek malo jadrá ki67-pozitívne, teda boli mitoticky aktívne. Na základe histologického nálezu môžeme potvrdiť, že bunky lokalizované na povrchu sú rovnaké ako tie, ktoré vytvárajú synoviálnu membránu kĺbov. Predpokladáme, že vplyvom dlhodobého tlaku a trenia zo strany silikónových prsníkových implantátov na okolité väzivo, sa z väziva diferencovala pseudo-synoviálna membrána. Došlo teda k synoviálnej metaplázii kolagénového väziva.

Diskusia

Synoviálna metaplázia je výsledkom dlhotrvajúceho tlaku a trenia zo strany silikónových implantátov na okolité väzivo (7). Výsledkom je vznik (z histologického hľadiska) plnohodnotnej synoviálnej membrány, ktorá obsahuje rovnaké bunky ako synoviálna membrána kĺbov, t.j. polovica buniek má fagocytárnu aktivitu, druhá polovica buniek je odvodených od fibroblastov väziva (6). Takto vzniknutá pseudo-synoviálna membrána môže mať protektívny efekt pred vznikom kapsulárnej kontraktúry okolo implantátu, ktorá môže implantát deformovať, čo následne vyžaduje chirurgickú intervenciu (2). Zaujímavosťou je, že v odbornej literatúre sme našli aj zmienku o vzniku pseudo-synoviálnej membrány okolo tracheo-ezofageálnej hlasovej protézy (3), ako aj okolo silikónových implantátov semenníkov (1).

Zoznam použitej literatúry

1. Abbondanzo SL, Young VL, Wei MQ, Miller FW. Silicone gelfilled breast and testicular implant capsules: a histologic and immunophenotypic study. *Mod Pathol.* 1999; 12: 706-713.
2. Bassetto F, Scarpa C, Caccialanza E, Montesco MC, Magnani P. Histological features of periprosthetic mammary capsules: silicone vs. polyurethane. *Aesthet Plast Surg.* 2010; 34: 481-485.
3. Fowler MR, Nathan CO, Abreo F. Synovial metaplasia, a specialized form of repair. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126: 727-730.
4. Rigden HM, Alias A, Havelock T, O'Donnell R, Djukanovic R, Davies DE, Wilson SJ. Squamous metaplasia is increased in the bronchial epithelium of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2019; 11: e0156009.
5. Slack JM. Metaplasia and transdifferentiation: from pure biology to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 369-378.
6. Smith MD. The normal synovium. *Open Rheumatol J.* 2011; 5: 100-106.
7. Stone JL, Boost T. Cytological features of breast peri-implant synovial metaplasia. *Acta Cytol.* 2014; 58: 511-513.
8. Van der Wel MJ, Jansen M, Vieth M, Meijer SL. What makes an expert Barrett's histopathologist? *Adv Exp Med Biol.* 2016; 908: 137-159.

Štefan Harsányi, Radoslav Zamborský, Ľubica Krajčiová, Katarína Bevízová, Milan Kokavec, Daniel Böhmer, Ľuboš Danišovič: Analýza asociácie polymorfizmov IL6, GDF5 a PAPP2 s vývojovou dyspláziou bedrového kĺbu na Slovensku. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 234-237.

47. Analýza asociácie polymorfizmov IL6, GDF5 a PAPP2 s vývojovou dyspláziou bedrového kĺbu na Slovensku

MUDr. Štefan Harsányi¹
(patologická anatomia a súdne lekárstvo)

Spoluautori: Radoslav Zamborský², Ľubica Krajčiová¹, Katarína Bevízová³, Milan Kokavec², Daniel Böhmer¹

Školiteľ: doc. RNDr. Ľuboš Danišovič, PhD.¹

¹ Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK v Bratislave, Slovensko

² Ortopedická klinika LF UK a NÚDCH v Bratislave, Slovensko

³ Anatomický ústav LF UK v Bratislave, Slovensko

Úvod

Vývojová dysplázia bedrového kĺbu (DDH) je jednou z najčastejších vývojových porúch, s odhadovaným výskytom v rozsahu od 3 do 6 prípadov na 1000 živonarodených detí v európskych krajinách (1). DDH je sprevádzaná širokým spektrom anatomických abnormalít bedrového kĺbu, ako sú napríklad nekompletne vyvinuté acetabulum alebo laxita ligament, čo vedie k poruchám v kĺbovom puzdre, sekundárnym deformitám proximálneho femuru a k tvorbe neredukovateľnej dislokácie bedrového kĺbu (2). DDH je považované za patologický stav s polygénym základom, avšak významný vplyv majú aj environmentálne a mechanické faktory. Najčastejšie rizikové faktory sú pôrod koncom panvovým, rodinná anamnéza, ženské pohlavie, vysoká pôrodná hmotnosť, oligohydramnion a primiparita (3). rs1800796 je SNP (jednonukleotidový polymorfizmus) v géne IL6 (Interleukín 6). Jeho produkt je imunoregulačný cytokín IL-6, ktorý má účinky na metabolizmus vápnika a vitamínu D a v konečnom dôsledku ovplyvňuje aj metabolizmus spojivového tkaniva, najmä chrupiek a kostí. rs143383 je SNP v géne GDF5 (rastový /diferenciačný faktor 5). GDF5 proteín patrí do super rodiny TGF-beta (transformujúci rastový faktor-beta) a má úlohu v regulácii metabolizmu spojivového tkaniva, najmä vývoja kostí, kĺbov a v procese enchondrálnej osifikácie. rs726252 je SNP umiestnený v géne PAPP2 (s graviditou asociovaný plazmatický proteín-A2). Produkt je metaloproteináza (Pappalýzín 2) s vplyvom na metabolizmus kostného tkaniva (4).

Hlavným cieľom tejto štúdie bolo analyzovať vplyv SNP rs1800796 v IL6 géne, rs143383 v GDF5 géne a rs726252 v géne PAPP2 v asociácii s výskytom DDH v kaukazskej populácii.

Materiál a metódy

Študovanú skupinu tvorilo 45 pacientov s DDH - 38 žien (84,4%) a 7 (15,6) mužov. Kontrolná skupina obsahovala 85 pacientov, z ktorých 51 (60%) boli ženy a 34 (40%) boli muži. Medián veku v študovanej skupine bol 3 roky (rozsah 0-49 rokov) a 15 rokov v kontrolnej skupine (rozsah 1-27 rokov). Všetci pacienti boli vyšetrení na Ortopedickej klinike Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Národného ústavu detských chorôb v Bratislave v období od roku 2018 do roku 2020. Pacienti postihnutí systémovými aberáciami alebo paralelným izolovaným vrodeným defektom boli vylúčení zo študijnej skupiny. Jednotlivci v kontrolnej skupine nevykazovali žiadne príznaky DDH a nemali ani pozitívnu rodinnú anamnézu. Účastníci štúdie pochádzali zo všetkých regiónov Slovenska. Štúdia bola vykonaná

Štefan Harsányi, Radoslav Zamborský, Ľubica Krajčiová, Katarína Bevizová, Milan Kokavec, Daniel Böhmer, Ľuboš Danišovič: Analýza asociácie polymorfizmov IL6, GDF5 a PAPP2 s vývojovou dyspláziou bedrového kĺbu na Slovensku. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 234-237.

v súlade s Helsinskou deklaráciou a bola schválená lokálnou etickou komisiou. Informovaný súhlas bol získaný od všetkých účastníkov.

Genotypizácia polymorfizmov: Analyzovali sme celkovo 130 vzoriek. Izolácia DNA z periférnej krvi bola uskutočnená pomocou GeneJET Genomic DNA Purification Kitu (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, RA, USA), podľa protokolov poskytnutých výrobcom. Tri vybrané SNP: IL6 - rs1800796 (G>C), GDF5 - rs143383 (C>T) a PAPP2 - rs726252 (C>T) boli genotypizované s použitím ich príslušných testov (Taqman SNP Genotyping Assay) na systéme QuantStudio 3 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Analýzy sa uskutočnili v Ústave lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky (Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislave, Slovensku).

Štatistická analýza: na porovnanie distribúcií alel a genotypov bol použitý Pearsonov chí kvadrát test. Chí kvadrát test bol využitý aj na výpočet deviácie od Hardy-Weinbergovho equilibria (HWE). Distribúcia genotypov pre GDF5 a PAPP2 v našej štúdií bola porovnaná s očakávanou distribúciou pre kaukazské obyvateľstvo zaznamenané v databáze Applied Biosystems, kým očakávaná distribúcia pre IL6 bola vypočítaná s použitím údajov z databázy dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Všetky štatistické analýzy boli vykonané pomocou štatistického programu IBM SPSS verzie 26 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0, Armonk, NY). Výsledky štatistických analýz boli považované za významné, ak $p < 0,05$.

Výsledky

Zo 45 pacientov v skupine DDH, bolo podľa ultrasonografickej klasifikácie podľa Graafa iniciálne diagnostikovaných 10 (22,2%) pacientov ako stage II, 21 (46,7%) ako stage III a 14 (31,1%) ako stage IV. K postihnutiu ľavého bedra došlo v 31 (68,9%) prípadoch, pravého bedra v 10 (22,2%) prípadoch a 4 (8,9%) prípady boli bilaterálne. 16 (35,5%) pacientov malo pozitívnu rodinnú anamnézu pre DDH, 3 (6,7%) prípady mali rodinnú anamnézu spojenú s defektom v spojivovom tkanive a 26 (57,8%) pacientov bolo bez rodinnej anamnézy.

Distribúcie genotypov a alel v skupine DDH a kontrolnej skupine sú uvedené v tabuľkách 1-3. V tabuľke 1. môžeme vidieť distribúciu genotypov a alel v súvislosti s rs1800796 v géne IL6, kde sme nenašli žiadnu asociáciu medzi vyššie uvedeným polymorfizmom a distribúciou genotypov ($p = 0,363$). Distribúcia genotypov pacientov v prípade rs143383 v géne GDF5 je uvedená v tabuľke 2. V tomto prípade môžeme vidieť, že distribúcia T alel a TT genotypov v skupine DDH a kontrolnej skupine je významne odlišná, čo potvrdzuje aj štatistická významnosť tejto asociácie ($p = 0,047$). V prípade rs726252 v PAPP2 géne nebol zistený žiadny štatisticky významný vzťah. Rozdelenie alel a genotypov je uvedené v tabuľke 3.

Table 1. Distribúcia alel a genotypov v asociácii medzi rs1800796 v géne IL6 a DDH.

Skupina	DDH			Kontrola			χ^2 p-hodnota
Pohlavie	muž n (%)	žena n (%)	Σ	muž n (%)	žena n (%)	Σ	
Alely spolu	14	76	90	68	102	170	-
Alela	G 12 (13.4)	71 (78.9)	83	64 (40.0)	96 (60.0)	160	
	C 2 (2.2)	5 (5.5)	7	4 (40.0)	6 (60.0)	10	
Genotypy spolu	7	38	45	34	51	85	0.363
Genotyp	GG 6 (13.3)	33 (73.3)	39	32 (37.6)	45 (52.9)	77	
	GC - (0)	5 (11.1)	5	2 (2.4)	6 (7.1)	8	
	CC 1 (2.3)	- (0)	1	- (0)	- (0)	0	

Štefan Harsányi, Radoslav Zamborský, Ľubica Krajčiová, Katarína Bevízová, Milan Kokavec, Daniel Böhmer, Ľuboš Danišovič: Analýza asociácie polymorfizmov IL6, GDF5 a PAPA2 s vývojovou dyspláziou bedrového kĺbu na Slovensku. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 234-237.

Table 2. Distribúcia alel a genotypov v asociácii medzi rs143383 v géne GDF5 a DDH.

Skupina		DDH			Kontrola			χ^2 p-hodnota
Pohlavie		muž n (%)	žena n (%)	Σ	muž n (%)	žena n (%)	Σ	
Alely spolu		14	76	90	68	102	170	-
Alela	C	6 (6.7)	22 (24.4)	28	35 (20.6)	41 (24.1)	76	
	T	8 (8.9)	54 (60.0)	62	33 (19.4)	61 (35.9)	94	
Genotypy spolu		7	38	45	34	51	85	0.047
Genotyp	CC	1 (2.3)	2 (4.4)	3	11 (12.9)	7 (8.2)	18	
	CT	4 (8.9)	18 (40.0)	22	14 (16.5)	29 (34.1)	43	
	TT	2 (4.4)	18 (40.0)	20	9 (10.6)	15 (17.6)	24	

Table 3. Distribúcia alel a genotypov v asociácii medzi rs726252 v géne PAPA2 a DDH.

Skupina		DDH			Kontrola			χ^2 p-hodnota
Pohlavie		muž n (%)	žena n (%)	Σ	muž n (%)	žena n (%)	Σ	
Alely spolu		14	76	90	68	102	170	-
Alela	C	9 (10.0)	27 (30.0)	36	26 (15.3)	56 (32.9)	82	
	T	5 (5.5)	49 (54.5)	54	42 (24.7)	46 (27.1)	88	
Genotypy spolu		7	38	45	34	51	85	0.478
Genotyp	CC	3 (6.6)	5 (11.1)	8	5 (5.9)	17 (20.0)	22	
	CT	3 (6.6)	17 (37.8)	20	16 (18.8)	22 (25.9)	38	
	TT	1 (2.3)	16 (35.6)	17	13 (15.4)	12 (14.1)	25	

Diskusia

V tejto práci sme skúmali asociáciu SNP v IL6 (rs1800796), GDF5 (rs143383) a PAPA2 (rs726252) s etiopatogéznou DDH v kaukazskej populácii. Zistili sme významnú asociáciu jedného z troch študovaných polymorfizmov, zatiaľ čo zvyšné dva polymorfizmy môžeme označiť za nesúvisiace s DDH v našej populácii.

Pozitívna asociácia rs143383 v géne GDF5 ($p = 0,047$) bola prítomná v dôsledku nerovnováhy v distribúcii alel a genotypov, kde T alely a TT genotypy boli nadmerne zastúpené u jedincov postihnutých DDH. Tento polymorfizmus bol spájaný s DDH v prácach čínskych a francúzskych autorov (5, 6). V prípade štúdie na čínskej populácii bola zistená asociácia s DDH, ale vo francúzskej štúdií sa táto asociácia ukázala ako nevýznamná. V roku 2018 bola publikovaná štúdia autormi zo Saudskej Arábie, ktorí túto asociáciu označili tiež ako významnú (7).

Štúdie o rs1800796 v IL6 géne boli publikované chorvátskymi autormi, ktorí sa prvýkrát zamerali na vplyv izolovaných polymorfizmov IL6 a TGFB1 na DDH a neskôr na ich synergický účinok, ako rizikový faktor v DDH etiopatogéze, pri ktorom zistili významnú asociáciu (8, 9). Najnovšia štúdia o IL6 v čínskej populácii Han čiastočne podporuje záver predchádzajúcich prác o asociácii TGFB1 a IL6 s DDH (10). Výsledky našej práce ukazujú, že v slovenskej populácii neexistuje asociácia medzi rs1800796 v géne IL6 a DDH. Veľkým rozdielom v porovnaní s predchádzajúcimi prácami je aj distribúcia alel a genotypov, ktorá bola u nás významne odlišná.

Polymorfizmu v géne PAPA2 (rs726252) sa zatiaľ venovali iba dve práce, ktoré skúmali pacientov čínskej Han populácie a výsledky týchto prác boli protichodné. Kým prvá práca z roku 2008 prišla s výsledkom signifikantnej asociácie s DDH najmä u ženského pohlavia (11). Replikačná štúdia z roku 2014 tieto výsledky nepotvrdila ani po stratifikácii podľa veku alebo pohlavia (12). Naše výsledky

Štefan Harsányi, Radoslav Zamborský, Ľubica Krajčiová, Katarína Bevízová, Milan Kokavec, Daniel Böhmer, Ľuboš Danišovič: *Analýza asociácie polymorfizmov IL6, GDF5 a PAPP2 s vývojovou dyspláziou bedrového kĺbu na Slovensku. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 234-237.*

asociáciu medzi rs726252 v géne PAPP2 a DDH taktiež nepotvrdili. Avšak, pri stratifikácii podľa pohlavia sme pozorovali okrajovo významnú asociáciu medzi ženským pohlavím a DDH.

Hlavnými limitami našej štúdie sú malý počet jednotlivcov s DDH, spolu s malým zastúpením mužských pacientov, čo je spôsobené nízkou prevalenciou DDH u mužov. Ďalšou limitáciou je, že aj keď sa táto štúdia uskutočnila u pacientov z viacerých regiónov Slovenska, nie všetky regióny boli rovnomerne zastúpené, preto distribúcia alel a genotypov mohla byť odlišná.

Táto štúdia poskytuje prvé údaje získané genotypizáciou jednotlivcov s DDH na Slovensku. Na základe našich výsledkov je možné povedať, že v kaukazskej populácii existuje asociácia medzi rs143383 v géne GDF5 a etiopatogénou DDH. Avšak tieto zistenia sa nepotvrdili v prípade IL6 ani PAPP2. Ďalšie štúdie s rôznymi SNP a väčším počtom pacientov z rôznych regiónov našej krajiny sú potrebné na rozšírenie vedomostí o tomto ochorení a génoch súvisiacich s jeho výskytom.

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0255/17 a grantom UK/4/2021.

Referencie

1. Loder RT, Shafer C. The demographics of developmental hip dysplasia in the Midwestern United States (Indiana). *J Child Orthop.* 2015;9(1):93-8.
2. Gkias I, Boptsi A, Tserga D, Gelalis I, Kosmas D, Pakos E. Developmental dysplasia of the hip: a systematic literature review of the genes related with its occurrence. *EFORT Open Reviews.* 2019;4(10):595-601.
3. Pollet V, Percy V, Prior HJ. Relative Risk and Incidence for Developmental Dysplasia of the Hip. *The Journal of Pediatrics.* 2017;181:202-7.
4. Christians JK, Amiri N, Schipilow JD, Zhang SW, May-Rashke KI. Pappa2 deletion has sex- and age-specific effects on bone in mice. *Growth Hormone & IGF Research.* 2019;44:6-10.
5. Dai J, Shi D, Zhu P, Qin J, Ni H, Xu Y, et al. Association of a single nucleotide polymorphism in growth differentiate factor 5 with congenital dysplasia of the hip: a case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):R126.
6. Rouault K, Scotet V, Autret S, Gaucher F, Dubrana F, Tanguy D, et al. Evidence of association between GDF5 polymorphisms and congenital dislocation of the hip in a Caucasian population. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2010;18(9):1144-9.
7. Sadat-Ali M, Al-Habdan IM, Bubshait DA. Genetic Influence in Developmental Dysplasia of the Hip in Saudi Arabian Children Due to GDF5 Polymorphism. *Biochem Genet.* 2018;56(6):618-26.
8. Kolundžić R, Trkulja V, Mikolaučić M, Jovanić Kolundžić M, Pavelić SK, Pavelić K. Association of interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms with developmental hip dysplasia and severe adult hip osteoarthritis: A preliminary study. *Cytokine.* 2011;54(2):125-8.
9. Čengiĉ T, Trkulja V, Pavelić SK, Ratkaj I, Markova-Car E, Mikolaučić M, et al. Association of TGFB1 29C/T and IL6 -572G/C polymorphisms with developmental hip dysplasia: a case-control study in adults with severe osteoarthritis. *International Orthopaedics (SICOT).* 2015;39(4):793-8.
10. Ma W, Zha Z, Chen K, Chen H, Wu Y, Ma J, et al. Genetic association study of common variants in TGFB1 and IL-6 with developmental dysplasia of the hip in Han Chinese population. *Sci Rep.* 2017;7(1):10287.
11. Jia J, Li L, Zhao Q, Zhang L, Ru J, Liu X, et al. Association of a single nucleotide polymorphism in pregnancy-associated plasma protein-A2 with developmental dysplasia of the hip: a case-control study. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2012;20(1):60-3.
12. Shi D, Sun W, Xu X, Hao Z, Dai J, Xu Z, et al. A Replication Study for the Association of rs726252 in PAPP2 with Developmental Dysplasia of the Hip in Chinese Han Population. *BioMed Research International.* 2014;2014:1-5.

Jakub Janko, Michal Pastorek, Katarína Kmeťová, Katarína Šebeková: Neutrofilové extracelulárne pasce v stave horúčky. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 238-240.

48. Neutrofilové extracelulárne pasce v stave horúčky

Jakub Janko¹
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Michal Pastorek¹, Katarína Kmeťová¹

Školiteľ: doc. MUDr. Katarína Šebeková, DrSc.¹, práca bola vypracovaná pod vedením Michala Pastoreka¹

¹Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, Bratislava

Úvod

Neutrofilové pasce sú najpočetnejšími leukocytmi v ľudskom krvnom obeh. Na prítomnosť infekčného alebo aj sterilného zápalu odpovedajú rýchlo a po lokalizácii poškodeného miesta využívajú na boj s patogénmi množstvo stratégií akými sú fagocytóza, produkcia reaktívnych foriem kyslíka a antimikrobiálnych proteínov, či tvorba neutrofilových extracelulárnych pascí (NETs). NETs sú tvorené jadrovou a mitochondriálnou DNA neutrofilu, ktorá je posiatá antimikrobiálnymi peptidmi (katelicidín), enzýmami (neutrofilová elastáza, myeloperoxidáza) a citrulinizovanými histónmi a ich hlavnou úlohou je patogén zachytiť, znehybniť a zneškodniť (1). NETs samotné však môžu aktivovať ďalšie neutrofilové pasce, čo vedie k tvorbe nových NETs. V prípade, že v cirkulácii pretrvávajú príliš dlho a nie sú z nej odstránené, môžu poškodiť endotel, indukovať koaguláciu alebo podporovať udržanie zápalu a ich prítomnosť je významnou súčasťou patogenézy chorôb ako napríklad reumatoidná artritída či sepsa (2). Poznanie mechanizmu tvorby NETs a možnosti ich odstránenia je preto kľúčové pre aplikáciu vhodnej terapeutickú intervenciu.

Organizmus však na prítomnosť zápalu nereaguje len iniciáciou bunkovej zložky vrodenej imunitnej odpovede, ale aj aktiváciou podporných reakcií ako napríklad zvýšením telesnej teploty. Horúčka je jednou zo základných, evolučne konzervovaných odpovedí organizmu na infekciu a schopnosť rapídne zvýšiť teplotu tela je asociovaná s rýchlejšim prekonaním infekcie a lepším prežívaním (3). Zvýšenie telesnej teploty v rozsahu od 38-41°C zvýši priepustnosť cievného endotelu, čo uľahčuje neutrofilom preniknúť do miesta zápalu a zlepšuje ich antimikrobiálny účinok cez podporu produkcie reaktívnych foriem kyslíka (4). Doposiaľ existuje len jediná práca, ktorá ukázala zvýšenú tvorbu NETs ako reakciu na prítomnosť bakteriálnej infekcie pri horúčke, avšak dynamika ich tvorby v závislosti od teploty nebola zatiaľ popísaná (5). V tejto práci sme sa preto rozhodli skúmať nielen dynamiku tvorby, ale aj odstraňovania NETs pri teplotách siahajúcich od hypotermie až po vysokú horúčku. A keďže neutrofilové pasce odpovedajú tvorbou NETs nielen na infekčný, ale aj sterilný zápal, zamerali sa aj na porovnanie reakcie neutrofilov na prítomnosť Gram-pozitívnych (*S. Aureus*), Gram-negatívnych (*E. Coli*) baktérií a mitochondrií.

Materiál a metódy

Na izoláciu neutrofilov z krvi dobrovoľných darcov bol použitý protokol gradientovej centrifugácie pomocou roztoku Polymorphprep™, po ktorej nasledovala lýza erytrocytov a kvantifikácia izolovaných buniek.

Tvorba NETs bola sledovaná fluorometricky pomocou DNA-viažúcej, cez bunkovú membránu nepermeabilnej sondy SYTOX Green po dobu 3h. Testovanými stimulmi boli mitochondrie a baktérie *E. coli* a *S. aureus*, ktoré boli v pomere k neutrofilom aplikované pri násobku infekcie (MOI) 80. Ako pozitívna kontrola bol použitý známy induktor tvorby NETs, forbol-12 myristát 13-acetát (PMA) a

Jakub Janko, Michal Pastorek, Katarína Kmeťová, Katarína Šebeková: Neutrofilové extracelulárne pasce v stave horúčky. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 238-240.

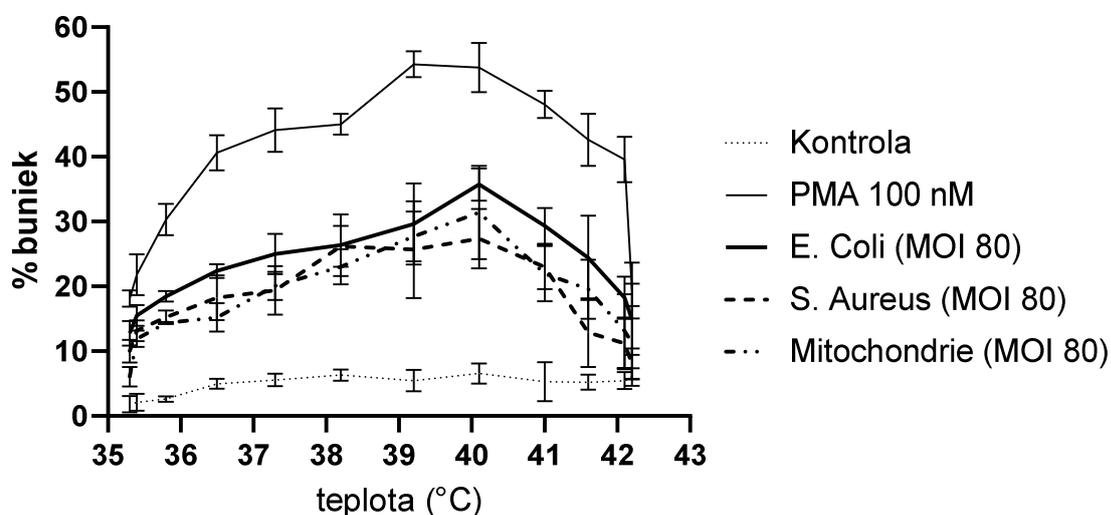
% podiel neutrofilov ktoré tvorili NETs bol vypočítaný normalizáciou na signál buniek permeabilizovaných 0,05% Tritonom X-100.

Pre stanovenie DNázovej aktivity ľudskej heparinizovanej plazmy bola použitá komerčne dostupná fluorescenčne značená DNA sonda so zhášačom, ktorej degradácia pri jednotlivých teplotách bola vyjadrená pomocou cT hodnôt.

Pri oboch metódach bol na odčítanie fluorescence použitý RT-PCR cyklér s teplotným gradientom od 35,3-42,2 °C.

Výsledky

Naše výsledky ukazujú, že tvorba NETs je závislá od teploty nielen v prítomnosti patogénov a mitochondrií, ale aj pri chemickom ovplyvnení pomocou PMA (Graf 1). Neutrofilové vystavené nízkym teplotám od ~35-36°C vytvárali v porovnaní s podmienkami normálnej telesnej teploty 37°C pri všetkých testovaných stimuloch v priemere o 20% menej NETs. S rastúcou teplotou sa tvorba NETs následne zvyšovala a maximum bolo pozorované pri teplotách od 39-40°C, pričom u všetkých stimulov bol po prekročení teploty 40°C viditeľný výrazný pokles ich tvorby na úroveň hodnôt získaných za hypotermických podmienok. Kontrolná skupina neutrofilov vytvárala spontánne NETs na úrovni pod 10% buniek. Analýza tvorby NETs v čase ukázala, že NETs sa s rastúcou teplotou tvorili skôr a po prekročení 40°C dochádzalo k spomaleniu ich tvorby. Pri stanovení DNázovej aktivity ľudskej plazmy sme pozorovali zvýšenie, ktoré bolo priamo úmerné rastúcej teplote bez pozorovaného plateau.



Graf 1. Tvorba NETs pri teplotách od 35,3-42,2°C po dobu 3h. Testovanými stimulmi boli mitochondrie (MOI 80), *E. coli* (MOI 80) *S. aureus* (MOI 80) a 100 nM PMA.

Diskusia a záver

V tejto práci sme sa zamerali na analýzu tvorby NETs za rôznych teplotných podmienok siahajúcich od hypotermie až po vysokú horúčku. Podarilo sa nám ukázať, že nezávisle na testovanom stimule bolo zvyšovanie teploty od 35°C až na 40°C pozitívne asociované s tvorbou NETs, pričom po dosiahnutí vyšších teplôt dochádzalo naopak k poklesu ich tvorby. Pri porovnaní infekčných a sterilných stimulov indukujúcich tvorbu NETs sme medzi jednotlivými stimulmi pozorovali rozdiely v množstve buniek

Jakub Janko, Michal Pastorek, Katarína Kmeťová, Katarína Šebeková: Neutrofilové extracelulárne pasce v stave horúčky. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 238-240.

ktoré NETs tvorili, avšak trend ich tvorby v závislosti od teploty zostal nezmenený, čo skôr poukazuje na univerzálnosť mechanizmu, akým zmena teploty vplýva na aktivitu neutrofilov. Napriek tomu, že sme priamo neskúmali, či sa molekulárny mechanizmus tvorby NETs líši v závislosti od teploty je pozorovaný výsledok možné vysvetliť práve analýzou nástupu ich tvorby v čase. Keďže s rastúcou teplotou bol pozorovaný skorší nástup ich tvorby a po dosiahnutí 40°C došlo k jej spomaleniu je možné predpokladať, že rozdiely pozorované po 3h inkubácie sú výsledkom akumulácie NETs počas kratšieho alebo dlhšieho časového intervalu.

S rastúcou teplotou sme pozorovali nielen skorší nástup tvorby NETs, ale aj zvýšenie DNázovej aktivity plazmy. Predpokladáme preto fyziologický mechanizmus, pri ktorom by po preniknutí patogénu do organizmu zvýšenie teploty spôsobilo aktiváciu neutrofilov a rýchlejšie vytvorenie antimikrobiálnych NETs, no zároveň by vďaka zvýšenej DNázovej aktivite dochádzalo k ich skoršiemu odstráneniu, ktoré je nevyhnutné pre reguláciu zápalovej odpovede a potlačenie pro-koagulačných vlastností NETs. Overenie tejto hypotézy však vyžaduje ďalšie skúmanie.

Práca bola podporená grantom VEGA č. 1/0716/20 a grantom Lekárskej fakulty UK č. XXZ/122/112

Zoznam použitej literatúry

1. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
2. Jorch SK, Kuberski P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017;23(3):279-87.
3. Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):335-49.
4. Sebag J, Reed WP, Williams RC, Jr. Effect of temperature on bacterial killing by serum and by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*. 1977;16(3):947-54.
5. Keitelman IA, Sabbione F, Shiromizu CM, Giai C, Fuentes F, Rosso D, et al. Short-Term Fever-Range Hyperthermia Accelerates NETosis and Reduces Pro-inflammatory Cytokine Secretion by Human Neutrophils. *Front Immunol*. 2019;10:2374.

Veronika Sivčová, Alexandra Bražinová: Čo vieme o duševnom zdraví obyvateľov Slovenskej republiky?. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 241-247.

49. Čo vieme o duševnom zdraví obyvateľov Slovenskej republiky?

Mgr. Veronika Sivčová
(hygienu)

Školiteľ: doc. MUDr. Alexandra Bražinová, PhD., MPH
Ústav epidemiológie, LF UK

Úvod

Stav duševného zdravia populácie ovplyvňuje mnohé aspekty fungovania spoločnosti. Duševné poruchy sú najčastejšou príčinou pracovnej absencie z dôvodu práceneschopnosti, častou príčinou invalidizácie. Vedú k veľkým hospodárskym, ekonomickým, sociálnym výdavkom spoločnosti. Najdôležitejšie však je, že spôsobujú veľkú mieru utrpenia na úrovni jednotlivca, jeho najbližšej rodiny, ako aj širšej spoločnosti (1).

Telesné a duševné zdravie spolu úzko súvisia a vzájomne sa ovplyvňujú. Starostlivosť o duševné zdravie sa však vo väčšine krajín sveta doposiaľ nerieši v rovnakom rozsahu ako starostlivosť o telesné zdravie, a z toho dôvodu zostáva veľa ľudí s duševnými poruchami neliečených (2).

Popísať stav duševného zdravia populácie nie je jednoduché. Vieme zmapovať počet ľudí, ktorí využívajú služby psychiatrickej zdravotnej starostlivosti, tento indikátor označujeme liečená prevalencia (z angl. treated prevalence) (3.). To je však vrchol ľadovca, v populácii je ešte množstvo ľudí, ktorí majú príznaky duševných porúch, tieto služby však nevyužívajú (toto označujeme medzera v liečbe, z angl. treatment gap). Je možné, že mnohí z nich využívajú poradenstvo psychológov či psychoterapeutov, takáto evidencia však nie je dostupná a v Slovenskej republike sa nerealizuje. Mnohí z týchto ľudí by s najväčšou pravdepodobnosťou z odbornej pomoci benefitovali v zmysle zvýšenej kvality života.

Najspoľahlivejším spôsobom, ako zistiť skutočný výskyt duševných porúch v populácii je populačný prieskum. Uskutočňuje sa na reprezentatívnej vzorke obyvateľstva pomocou diagnostického dotazníka realizovaného väčšinou osobným rozhovorom s respondentom. V medzinárodnom kontexte existujú mnohé diagnostické nástroje za týmto účelom. Pre celkové zhodnotenie stavu duševného zdravia populácie sú najvhodnejšie komplexné dotazníky realizované vyškolenými laikmi (4).

Neliečená duševná porucha má vážne následky na celkovom zdraví, rušivo pôsobí na každodenné fungovanie jednotlivca, čo je spojené so zníženou produktivitou, zvýšenými nákladmi na zdravotnú starostlivosť, so zlyhávaním v bežnom fungovaní (5). Zlyhanie alebo odklad pri hľadaní liečby môže mať vážne následky pre ľudí s duševnými poruchami. Medzinárodné štúdie ukazujú, že čím dlhšie trvá neliečená choroba, tým horšie sú výsledky liečby a dopady na zdravotný stav (6).

Cieľom našej štúdie bolo odhadnúť medzeru v liečbe v slovenskej populácii. Takéto informácie môžu slúžiť ako podklad pre nastavenie služieb starostlivosti o duševné zdravie, ako aj preventívnych aktivít zameraných na podporu dobrého duševného zdravia.

Materiál a metódy

Cieľom predloženej práce je popis a analýza stavu duševného zdravia populácie Slovenskej republiky z údajov o počte ľudí, ktorí sa liečia na duševnú poruchu v ambulantnej starostlivosti.

Údaje o využívaní služieb ambulantnej starostlivosti sú z databázy Národného centra zdravotníckych informácií. Pochádzajú z výkazov o činnosti poskytovaných zdravotníckymi zariadeniami v pravidelných intervaloch. Sú publikované v každoročných publikáciách Psychiatrická starostlivosť.

Z informácií o počte ľudí, ktorým bola poskytnutá zdravotná starostlivosť, sme urobili prehľad počtu ľudí, ktorí sa liečia na najčastejšie sa vyskytujúce duševné poruchy za obdobie 2015-2019. Vypočítali sme prevalenciu podľa pohlavia a veku.

Veronika Sivčová, Alexandra Bražinová: Čo vieme o duševnom zdraví obyvateľov Slovenskej republiky?. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 241-247.

Súbor sme rozdelili do troch skupín podľa veku, v každej skupine sme ešte špecifikovali podrobnejšie vekové skupiny a sledovali sme ich podľa pohlavia:

Deti a mládež: 0-19 roční (0-9, 10-19), dievčatá a chlapci

Dospelí: 20-59 roční (20-39, 40-59), ženy a muži

Starší dospelí: 60 a viac roční (60-79, 80+), ženy a muži

Pre zjednodušenie uvádzame skrátené názvy jednotlivých diagnostických skupín, ako ich používame v texte tejto štúdie (tab.1):

Tab.1 Názvy diagnostických skupín duševných porúch používané v texte, názvy a kódy podľa MKCH-10, príklad najčastejších diagnóz v danej skupine (7).

Názov v texte	Celý názov diagnostickej skupiny	Kód podľa MKCH-10	Príklady najčastejších diagnóz v danej skupine
Organické	Organické duševné poruchy vrátane symptomatických	F00.0 - F09	Demencia
Psychoaktívne látky	Poruchy psychiky a správania zapríčinené užitím psychoaktívnych látok	F10.0 - F19.9	Syndróm závislosti od alkoholu
Schizofrénia	Schizofrénia, schizotypové poruchy a poruchy s bludmi	F20.0 - F29	Schizofrénia
Depresívne	Afektívne poruchy	F30.0 - F39	Depresia
Úzkostné	Neurotické, stresom podmienené a somatoformné poruchy	F40.00 - F48.9	Úzkostná porucha
Poruchy správania s fyziol.funkciami	Poruchy správania súvisiace s fyziologickými poruchami a faktormi	F50.0 - F59	Mentálna anorexia
Poruchy vývinu	Poruchy psychického vývinu	F80.0 - F89	Dyslexia, Autizmus
Poruchy správania so zač.v detstve	Poruchy správania a emočné poruchy so začiatkom v detstve a dospievaní	F90.0-F98.9	Porucha aktivity a pozornosti

Ďalej sme uskutočnili medzinárodný prehľad skutočnej prevalencie najčastejších duševných porúch podľa štúdií uverejnených v databáze Pubmed, ktoré realizovali populačný prieskum výskytu duševných porúch prostredníctvom štandardizovaných diagnostických nástrojov.

Vychádzali sme z databázy Svetovej zdravotníckej organizácie (z angl.World Health Organization, WHO), Európskej komisie, Národného inštitútu pre duševné zdravie v U.S.A. (z angl.The National Institute of Mental Health, NIMH). Tento prehľad sme uskutočnili pre U.S.A. a Európu zvlášť.

Porovnaním údajov skutočnej prevalencie zistené v medzinárodných populačných prieskumoch s liečenou prevalenciou v daných diagnostických skupinách sme odhadli proporciu ľudí, ktorí sa na dané ochorenie liečia a naopak tých, ktorí služby starostlivosti napriek príznakom ochorenia nevyužívajú.

Veronika Sivčová, Alexandra Bražinová: Čo vieme o duševnom zdraví obyvateľov Slovenskej republiky?. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 241-247.

Výsledky

Slovenská republika

Deti a mládež 0-19 roční

Za sledované obdobie 2015-2019 sa v skupine 0-19 ročných ako najčastejšie liečené ochorenia vyskytovali nasledovné, podľa poradia frekvencie výskytu:

Dievčatá:

Poruchy správania so zač.v detstve (F90.0-F98.9) (prevalencia od 92 – 119 na 10000 obyvateľov)

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 59 – 96 na 10000 obyvateľov)

Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 29 – 44 na 10000 obyvateľov)

Chlapci:

Poruchy správania so zač.v detstve (F90.0-F98.9) (prevalencia od 158– 222 na 10000 obyvateľov)

Poruchy vývinu (F80.0 - F89) (prevalencia od 55 – 66 na 10000 obyvateľov)

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 38– 57 na 10000 obyvateľov)

Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 14 – 21 na 10000 obyvateľov)

Ďalej uvádzame poradie najčastejších liečených porúch v podrobnejších vekových skupinách:

0-9 ročné dievčatá

Poruchy správania so zač.v detstve (F90.0-F98.9) (prevalencia od 52 – 78 na 10000 obyvateľov)

Poruchy vývinu (F80.0 - F89) (prevalencia od 16 – 25 na 10000 obyvateľov)

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 8 – 25 na 10000 obyvateľov)

Poruchy správania s fyziol. funkciami (F50.0 - F59) (prevalencia od 3 – 10 na 10000 obyvateľov)

0-9 roční chlapci:

Poruchy správania so zač.v detstve (F90.0-F98.9) (prevalencia od 109 – 173 na 10000 obyvateľov)

Poruchy vývinu (F80.0 - F89) (prevalencia od 47 – 69 na 10000 obyvateľov)

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 7 – 17 na 10000 obyvateľov)

Poruchy správania s fyziol. funkciami (F50.0 - F59) (prevalencia od 3 – 4 na 10000 obyvateľov)

10-19 ročné dievčatá:

Poruchy správania so zač.v detstve (F90.0-F98.9) (prevalencia od 135 – 162 na 10000 obyvateľov)

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 114 – 174 na 10000 obyvateľov)

Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 60 – 88 na 10000 obyvateľov)

10-19 roční chlapci:

Poruchy správania so zač. v detstve (F90.0-F98.9) (prevalencia od 213 – 275 na 10000 obyvateľov)

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 72 – 101 na 10000 obyvateľov)

Poruchy vývinu (F80.0 - F89) (prevalencia od 57 – 64 na 10000 obyvateľov)

Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 28 – 41 na 10000 obyvateľov)

Dospelí 20-59 roční

Za sledované obdobie 2015-2019 sa v skupine 20-59 ročných ako najčastejšie liečené ochorenia vyskytovali nasledovné, podľa poradia frekvencie výskytu:

Veronika Sivčová, Alexandra Bražinová: Čo vieme o duševnom zdraví obyvateľov Slovenskej republiky?. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 241-247.

Ženy

Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 265 – 331 na 10000 obyvateľov)
Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 184 – 303 na 10000 obyvateľov)
Schizofrénia (F20.0 - F29) (prevalencia od 95 – 136 na 10000 obyvateľov)

Muži:

Psychoaktívne látky (F10.0 - F19.9) (prevalencia od 152 – 163 na 10000 obyvateľov)
Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 141 – 165 na 10000 obyvateľov)
Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 101 – 163 na 10000 obyvateľov)
Schizofrénia (F20.0 - F29) (prevalencia od 99 – 152 na 10000 obyvateľov)

Ďalej uvádzame poradie najčastejších liečených porúch v podrobnejších vekových skupinách:

20-39 ročné ženy:

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 221 – 239 na 10000 obyvateľov)
Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 148 – 189 na 10000 obyvateľov)
Schizofrénia (F20.0 - F29) (prevalencia od 92 – 111 na 10000 obyvateľov)

20-39 roční muži:

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 139 – 150 na 10000 obyvateľov)
Schizofrénia (F20.0 - F29) (prevalencia od 126 – 154 na 10000 obyvateľov)
Psychoaktívne látky (F10.0 - F19.9) (prevalencia od 131 – 138 na 10000 obyvateľov)
Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 93 – 111 na 10000 obyvateľov)

40-59 ročné ženy:

Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 463 – 531 na 10000 obyvateľov)
Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 348 – 364 na 10000 obyvateľov)
Schizofrénia (F20.0 - F29) (prevalencia od 155 – 182 na 10000 obyvateľov)

40-59 roční muži:

Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 212 – 252 na 10000 obyvateľov)
Psychoaktívne látky (F10.0 - F19.9) (prevalencia od 173 – 192 na 10000 obyvateľov)
Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 162 – 176 na 10000 obyvateľov)

Starší dospelí 60 a viac roční

Za sledované obdobie 2015-2019 sa v skupine 60 a viac ročných ako najčastejšie liečené ochorenia vyskytovali nasledovné, podľa poradia frekvencie výskytu:

Ženy:

Organické (F00.0 - F09) (prevalencia od 496 – 819 na 10000 obyvateľov)
Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 605 – 847 na 10000 obyvateľov)
Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 29 – 403 na 10000 obyvateľov)

Muži:

Organické (F00.0 - F09) (prevalencia od 350 – 384 na 10000 obyvateľov)
Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 230 – 241 na 10000 obyvateľov)
Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 22 – 116 na 10000 obyvateľov)

Ďalej uvádzame poradie najčastejších liečených porúch v podrobnejších vekových skupinách:

Veronika Sivčová, Alexandra Bražinová: Čo vieme o duševnom zdraví obyvateľov Slovenskej republiky?. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 241-247.

60-79 ročné ženy

Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 449 – 509 na 10000 obyvateľov)

Organické (F00.0 - F09) (prevalencia od 317 – 351 na 10000 obyvateľov)

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 235 – 264 na 10000 obyvateľov)

60-79 roční muži

Organické (F00.0 - F09) (prevalencia od 275 – 302 na 10000 obyvateľov)

Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 220 – 248 na 10000 obyvateľov)

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 107 – 121 na 10000 obyvateľov)

80 a viac ročné ženy:

Organické (F00.0 - F09) (prevalencia od 1350 – 1475 na 10000 obyvateľov)

Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 271 – 298 na 10000 obyvateľov)

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 88 – 127 na 10000 obyvateľov)

80 a viac roční muži:

Organické (F00.0 - F09) (prevalencia od 985 – 1050 na 10000 obyvateľov)

Depresívne (F30.0 - F39) (prevalencia od 168 – 184 na 10000 obyvateľov)

Úzkostné (F40.00 - F48.9) (prevalencia od 656 – 809 na 10000 obyvateľov)

Tab.2 Slovenská republika: priemerný počet ľudí liečených na jednotlivé skupiny diagnóz v ambulantnej psychiatrickej starostlivosti za sledované obdobie 2015-2019, vyjadrený ako proporcia populácie.

			Priemerný ročný počet liečených za sledované obdobie (% populácie)	
			Ženy	Muži
Deti	0-9	Poruchy správania so zač.v detstve	0,65	1,9
		Úzkostné poruchy	0,2	0,1
		Poruchy vývinu	0,2	0,6
	10-19	Poruchy správania so zač.v detstve	1,5	2,5
		Úzkostné	1,5	0,9
		Depresívne	0,7	0,3
		Poruchy vývinu	-	0,6
Dospelí	20-39	Úzkostné	2,3	1,5
		Depresívne	1,7	1,0
		Schizofrénia	1,0	1,4
		Psychoaktívne	-	1,4
	40-59	Depresívne	5,0	2,3
		Úzkostné	3,6	1,7
		Schizofrénia	1,7	-
		Psychoaktívne	-	1,8
St.dospelí	60-79	Depresívne	4,8	2,3
		Organické	3,3	2,9
		Úzkostné	2,5	1,1
	80+	Depresívne	2,9	1,8
		Organické	14,1	10,1
		Úzkostné	1,1	7,3

Veronika Sivčová, Alexandra Bražinová: Čo vieme o duševnom zdraví obyvateľov Slovenskej republiky?. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 241-247.

Tab.3 Porovnanie proporcie populácie, ktorá má príznaky jednotlivých diagnostických skupín duševných porúch podľa populačných prieskumov v U.S.A, Európe s proporciou populácie, ktorá sa na dané skupiny diagnóz lieči v Slovenskej republike v ambulantnej psychiatrickej starostlivosti.

		U.S.A. (% populácie)	Európa (% populácie)	Slovensko (% populácie)
Deti	Depresívne	13,3 (ťažká d. u 13-17r.)	2,6	0,25
	Úzkostné	-	6,5	0,6
	Poruchy správania so zač.v detstve	11,0 (ADHD 4-17r.)	3,4 (ADHD)	1,5
	Poruchy vývinu	17 (vývin.p. 3-17r.)	1,2 (p.aut.spektra)	1,4
Dospelá populácia	Depresívne	7,1 (ťažká d.)	6,9 (15 a viac r., chronická depresia) 7,8 (afekt.poruchy)	2,3
	Úzkostné	19,0 (akákoľvek ú.p.)	14,0 (akákoľvek ú.p.) 6,6 (aktuálna ú.p., UK)	3,2
	Schizofrénia	0,4	0,5	1,2
Starší dospelí	Depresívne	6,8	25 (65r.a viac, UK)	4,7
	Úzkostné	11,4	3,8 (WHO)	1,8
	Organické	13,9 (71r. a viac)	6 (WHO) 5,6 (Írsko)	5,1

p.= porucha, aut.spektra = autistického spektra, ú.= úzkostná, r.= rokov, ADHD = porucha pozornosti s hyperaktivitou, afekt.= afektívne

Diskusia a záver

Duševné zdravie je kľúčovou súčasťou celkového zdravia. Ľudia s duševnými poruchami majú častokrát pridružené telesné choroby a dožívajú sa priemerne o 10 rokov menej ako ostatná populácia (8,9).

Medzera v liečbe, t.j. fakt, že mnohí ľudia, ktorí majú v populácii príznaky duševných porúch, ale sa na ne neliečia, je spôsobená viacerými faktormi – stigmou, predsudkami, nedostatkom povedomia o duševných poruchách a možnostiach liečby. Poznanie tejto medzery umožňuje účinne osloviť a zachytiť populačné skupiny v riziku duševnej poruchy (10).

Z nášho odhadu vyplýva, že v každej sledovanej vekovej skupine v našej populácii dochádza k medzere v liečbe. Výnimkou je liečba schizofrénie a depresie v produktívnom veku a organických porúch u starších občanov.

Z údajov, ktoré sú momentálne k dispozícii je zrejmé, že väčšina ľudí v Slovenskej republike je diagnostikovaná a liečená neskôr, približne v 45.–64. roku života. Z medzinárodných populačných údajov však vyplýva, že duševné poruchy predstavujú najväčšiu záťaž u mladých ľudí, z dôvodu zhoršovania kvality prežívania a invalidizácie do ďalšieho života (11).

Limitáciou práce sú rôzne zaraďovacie kritériá použité v jednotlivých populačných prieskumoch výskytu duševných porúch v zahraničných štúdiách. Najvhodnejším postupom pre získanie uceleného obrazu o stave duševného zdravia slovenskej populácie je realizácia populačného prieskumu (12).

Veronika Sivčová, Alexandra Bražinová: Čo vieme o duševnom zdraví obyvateľov Slovenskej republiky?. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 241-247.

Psychiatrická starostlivosť je iba jednou súčasťou úspešnej cesty k uzdraveniu. Okrem nich by mala byť k dispozícii široká škála psychosociálnych zásahov ako napr. poradenstvo, mentorstvo, podporné skupiny, či už poskytované odborníkmi alebo nešpecializovanými zdravotníckymi pracovníkmi (2, 13). Vzhľadom na vysoký výskyt duševných porúch v populácii a na ich závažné dopady na jednotlivca a celú spoločnosť mali by ich predchádzanie, skorá diagnostika a účinná liečba byť prioritou každej spoločnosti.

Zoznam použitej literatúry

1. Polanczyk GV, Salum GA, Sugaya LS, Caye A, Rohde LA. Annual research review: a meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. *J Child Psychol Psychiatry*. 2015;56(3):345–365.
2. Bražinová, A., et al.: Mental health care gap: The case of the Slovak Republic. *Administration and Policy in Mental Health and Mental Health Services Research*, 2019, 46.6: 753-759.
3. Parron, DL.; Solomon, F.; Jenkins, CD. Behavior, Health Risks, and Social Disadvantage: Summary of a Conference. National Academy Press, 1982. 3.
4. Kogan, C. S., et al : The Classification of Anxiety and Fear-Related Disorders in the ICD-11. *Depression and Anxiety* 2016, 33(12), 1141–1154.
5. Chibanda D, Weiss HA, Verhey R, et al. Effect of a Primary Care–Based Psychological Intervention on Symptoms of Common Mental Disorders in Zimbabwe: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016;316(24):2618–2626.
6. Jorm AF: Mental health literacy: empowering the community to take action for better mental health. *Am Psychol*. 2012 Apr;67(3):231-43.
7. MKCH-10 Medzinárodná štatistická klasifikácia chorôb a príbuzných zdravotných problémov. 10. Revízia. NCZI. Stiahnuté dňa 15.4.2021 z <http://www.nczisk.sk/Standardy-v-zdravotnictve/Pages/MKCH-10-Revizia.aspx>
8. Daly, O. E.: Physical illness in those with mental illness: Psychiatric services need to change focus. *British Journal of Psychiatry* 2017, 210(01), 1–2.
9. Lucca et al. A Prospective observational study on psychotropic drug use in non psychiatric wards. *Indian Journal of Psychiatry* [online], 2019, 61(5)
10. Vigo, D., Thornicroft, G., Atun, R. Estimating the true global burden of mental illness. *The Lancet Psychiatry* 2016, 3(2), 171–178.
11. Steel, Z., Marnane, C., Iranpour, C., et al.: The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980-2013. *Int J Epidemiol* 43, 476-93.Study. *International Journal of Hospital Research* 2014, 3(3): 113-122
12. Kessler, RC., et al. Composite International Diagnostic Interview screening scales for DSM-IV anxiety and mood disorders. *Psychological medicine*, 2013, 43.8: 1625-1637.
13. Sylke, A. et al. Prevalence of mental disorders in elderly people: the European MentDis_ICF65+ study. *The British Journal of Psychiatry*, 2017, 210.2: 125-131.

Alena Potočárová, Barbora Konečná: Analýza odpadovej vody v Bratislavskom okrese za účelom sledovania šírenia koronavírusu posúdenie vlastností ľudskej DNA. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 248-251.

50. Analýza odpadovej vody v Bratislavskom okrese za účelom sledovania šírenia koronavírusu posúdenie vlastností ľudskej DNA

MVDr. Alena Potočárová¹

Školiteľ: Mgr. Barbora Konečná, PhD.¹

¹Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského Bratislava, Sasinkova 4

Úvod

Odpadová voda predstavuje zdroj mnohých biologických látok ľudského pôvodu. Dostávajú sa sem hlavne v podobe fekálií, moču ale aj slín. Vďaka tomu predstavuje odpadová voda nástroj na sledovanie populácie a je používaná v mnohých oblastiach, ako napríklad sledovanie výroby a spotreby nelegálnych psychotropných látok.

V momentálnej situácii rozsiahlej epidémie koronavírusu je potrebné efektívne sledovanie a zaznamenávanie infekčných jedincov. Momentálnym nástrojom na zachytenie ohnísk predstavuje trasovanie kontaktov pozitívne testovaných osôb a ich následné individuálne testovanie na prítomnosť koronavírusu antigénovými rýchlo-testami alebo dlhšie trvajúcimi ale presnejšími PCR testami. Koronavírus sa okrem dýchacích ciest môže nachádzať aj v tráviacej sústave, kde je ale po kontakte so žalúdočnými šťavami sa inaktivuje a vylučuje v stolici (1). Prítomnosť koronavírusu v stolici bola preukázaná už krátko po vzniku infekcie, čo môže byť aj týždne pred vypuknutím klinických príznakov. (2)

Vzhľadom na tieto skutočnosti predstavuje testovanie odpadovej vody dôležitú súčasť riešenia pandemickej situácie. Keďže v kratšom čase je možné sledovať väčšiu časť populácie, definovanú geografickým ohraničením. Viaceré publikácie už potvrdili výskyt koronavírusu v odpadovej vode v iných krajinách ako v Austrálii, Nemecku a iných. (3-5)

Okrem samotnej prítomnosti sa v týchto publikáciách uvádza aj korelujúca koncentrácia koronavírusu v odpadovej vode s počtom nakazených obyvateľov. No vzhľadom na rozdielne klimatické a geografické podmienky nie je možné automaticky predpokladať úspešnosť tejto metódy aj v našich podmienkach. V našom projekte sme sa z tohto dôvodu zamerali na prítomnosť koronavírusu v odpadovej vode v Bratislavskom okrese počas obdobia druhej vlny nákazy koronavírusom. Cieľom bolo preukázanie využitia tejto metódy aj v našich podmienkach.

V ďalšej časti nášho experimentu sme sa zamerali na množstvo a vlastnosti ľudskej DNA, prítomnej v odpadovej vode. Prítomnosť ľudskej DNA sa javí ako možný zdroj populačných informácií, avšak o pôvode, vlastnostiach a stabilite tejto DNA v odpadovej vode sa vie ešte veľmi málo.

Metódy

Odber vzorky:

Odpadová voda bola odoberaná z Ústrednej čistiarny odpadových vôd vo Vrakuni (n=11) a v Petržalke (n=10) v okrese Bratislava v období od októbra 2020 až do marca 2021. Jeden liter vzorky bol odoberaný počas 24 hodín vďaka spolupráci so Slovenskou technickou univerzitou. Vzorka bola následne transportovaná v chlade. Po príchode na naše pracovisko bola potenciálne infekčná vzorka inaktivovaná pomocou tepla na 60°C, 90 minút a skladovaná pri -40°C.

Spracovanie vzorky:

Päťdesiat mililitrov vzorky bolo ultrafiltrovaných (Amicon Stirred Cells a Ultracel 10 kDa Ultrafiltration Discs, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) alebo precipitovaných polyetylén glykolom (4g of

Alena Potočárová, Barbora Konečná: *Analýza odpadovej vody v Bratislavskom okrese za účelom sledovania šírenia koronavírusu posúdenie vlastností ľudskej DNA. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 248-251.*

Poly(ethylene) glycol, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a chloridom sodným (0,9ml NaCl, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Izolácia RNA a DNA:

RNA a DNA boli z odpadovej vody izolované použitím Trizolu (RNAzol® RT, Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA) a Dnazolu (DNAzol® GENOMIC DNA ISOLATION REAGENT, Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA) na základe protokolu od výrobcu. RNA a DNA boli eluované do 50 µl ultračistej vody. Koncentrácie vyizolovaných nukleových kyselín boli merané na prístroji Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Izolované nukleové kyseliny boli za účelom prečistenia od PCR inhibítorov precipitované alkoholom a purifikované butanolom. (6)

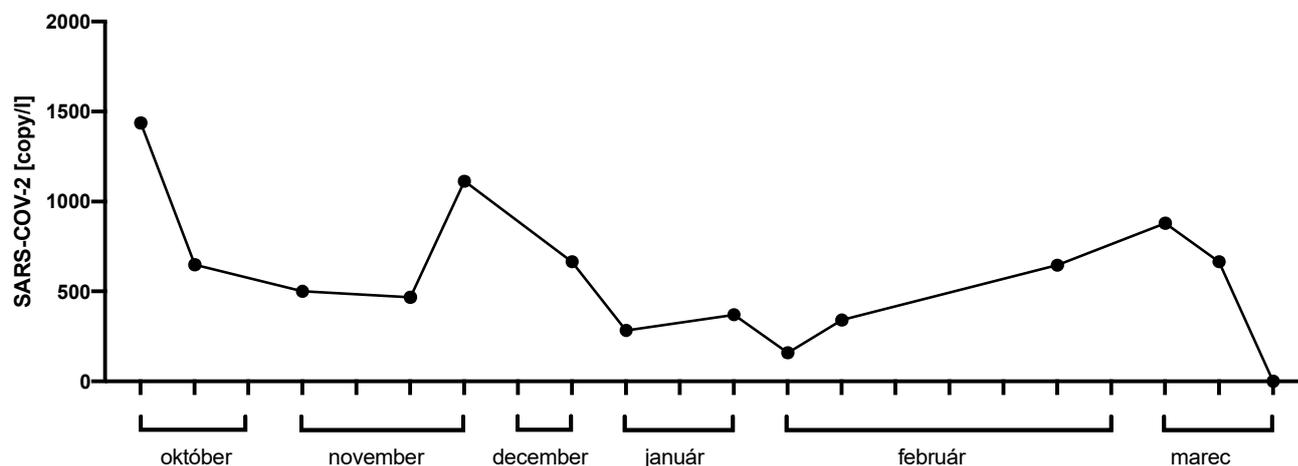
PCR

Na detekciu prítomnosti a kvantifikáciu vírusovej RNA SARS-COV-2 bola použitá metóda RT-PCR so zameraním na N1 a N3 gén. V prípade DNA sme pomocou RT-PCR kvantifikovali množstvo ľudskej chromozomálnej a mitochondriálnej DNA. Pri nukleárnej DNA sme sa zamerali na detekciu génu beta globínu a pri mitochondriálnej na gén oxidázy cytochróm c. Výsledky RT-PCR boli prepočítané podľa počtov kópií vo vzorkách na základe našej kalibračnej krivky.

Výsledky

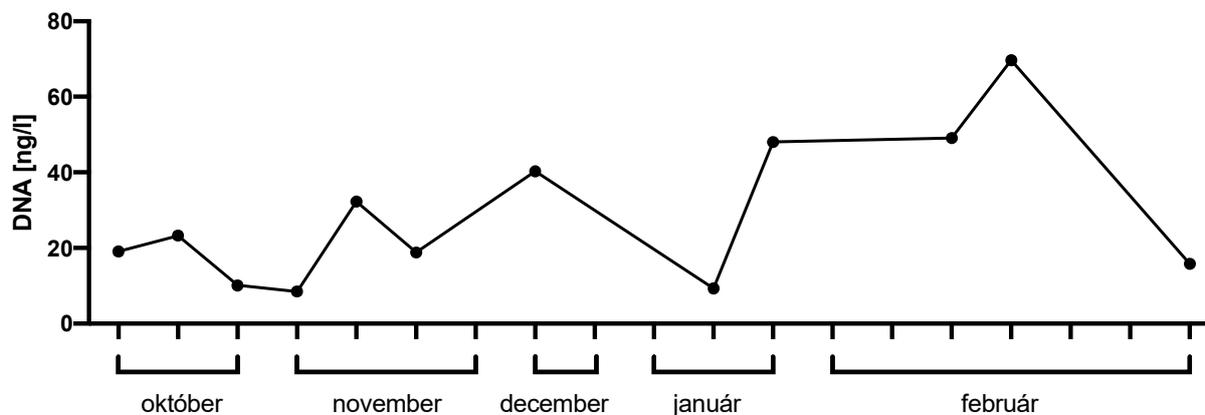
Izolácia RNA na detekciu vírusu SARS-COV-2 preukázala prítomnosť vírusovej RNA vo väčšine vzoriek odpadovej vody. Priemerné množstvo predstavovalo 8174 ± 377 kópií vírusu na liter odpadovej vody. Jednotlivé hodnoty v závislosti od dátumu odberu sú znázornené v grafe 1.

Izolácia DNA z odpadovej vody potvrdila prítomnosť celkovej DNA v priemernej koncentrácii $28,69 \pm 19,38$ ng DNA v jednom litri odpadovej vody. Jednotlivé hodnoty v závislosti od dátumu odberu sú znázornené v grafe 2. Na základe RT-PCR 83% ľudskej DNA bolo mitochondriálneho pôvodu a 17% nukleárneho pôvodu.



Graf 1.: Počet kópií vírusu SARS-COV-2 v 1 litri odpadovej vody, odobratej v rôznych dátumoch od októbra 2020 do marca 2021

Alena Potočárová, Barbora Konečná: Analýza odpadovej vody v Bratislavskom okrese za účelom sledovania šírenia koronavírusu posúdenie vlastností ľudskej DNA. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 248-251.



Graf 2.: Koncentrácia DNA 1 litri odpadovej vody, odobratej v rôznych dátumoch od októbra 2020 do februára 2021

Diskusia

V takmer všetkých vzorkách odpadovej vody odobratých medzi októbrom 2020 a marcom 2021 bol zachytený vírus SARS-COV-2. Pre porovnanie v grafe 3 uvádzame vývoj pozitívne testovaných obyvateľov v Bratislave. Vzhľadom na malý počet zanalyzovaných vzoriek odpadovej vody je ťažké posúdiť vzťah týchto dvoch hodnôt. Na základe našich výsledkov však vidíme, že analýza odpadovej vody bola schopná zachytiť vírus ešte v čase keď počet pozitívne testovaných nebol taký dramatický. Túto skutočnosť je možné odôvodniť aj na základe nedávnej štúdie publikovanej Amoahom et al., kedy v odpadovej vode bol zaznamenaný vírus SARS-COV-2 už dva týždne pred zaznamenaním klinických príznakov. (7)

Na základe našich výsledkov však môžeme potvrdiť, že aj v Bratislavskom okrese je možné zachytiť vírus, ktorý sa vylučuje v neaktívnej forme stolicou. Je preto možné predpokladať, že v prípade iných vírusových ochorení s podobným charakterom, prípadne vírusových ochorení gastrointestinálneho traktu, predstavuje analýza odpadovej vody vhodnú metódu, vďaka ktorej by bolo možné zachytiť ohniská nákazy v dostatočnom predstihu. V odbere vzoriek je dôležité pokračovať, aby sme zistili hranicu detekcie v odpadovej vode vzhľadom na počet infikovaných obyvateľov. Analýzu odpadovej vody je tiež možné zúžiť napríklad na vybranú mestskú časť, školu, či domov seniorov.

Čo sa týka prítomnosti ľudskej DNA v odpadovej vode, naša analýza nám ukázala pomerne veľkú variabilitu medzi jednotlivými odbermi, ktorá môže predstavovať rozdielnu mieru zriedenia vzorky vodou v závislosti od prietoku odpadovej vody. Pomer medzi nukleárnou a mitochondriálnou DNA nám hovorí o rovnakej stabilite chormozomálnej a mitochondriálnej DNA, keďže pomer týchto dvoch nukleových kyselín je v bunke približne 10-100:1 v prospech mitochondriálnej DNA.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že analýza odpadovej vody v Bratislavskom okrese predstavuje potenciónný nástroj na sledovanie šírenia koronavírusu. Odpadová voda je zároveň zdrojom DNA ľudskeho pôvodu, ktorá poskytuje významný zdroj informácií o genetickej výbave populácie.

Alena Potočárová, Barbora Konečná: *Analýza odpadovej vody v Bratislavskom okrese za účelom sledovania šírenia koronavírusu posúdenie vlastností ľudskej DNA. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 248-251.*



Graf 3.: Počet ľudí, pozitívne testovaných PCR a Antigénovým testom v Bratislavskom okrese v období od októbra 2020 do februára 2021. (zdroj <https://github.com/Institut-Zdravotnych-Analyz/covid19-data>)

Zoznam použitej literatúry

1. Chen Y, Chen L, Deng Q, Zhang G, Wu K, Ni L, Yang Y, Liu B, Wang W, Wei C, Yang J, Ye G, Cheng Z.: The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *J Med Virol.* 2020 Jul;92(7):833-840.
2. Foladori P, Cutrupi F, Segata N, Manara S, Pinto F, Malpei F, Bruni L, La Rosa G.: SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. *Sci Total Environ.* 2020 Nov 15;743:140444.
3. Haramoto E, Malla B, Thakali O, Kitajima M.: First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Sci Total Environ.* 2020 Oct 1;737:140405.
4. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, Choi PM, Kitajima M, Simpson SL, Li J, Tschärke B, Verhagen R, Smith WJM, Zaugg J, Dierens L, Hugenholtz P, Thomas KV, Mueller JF.: First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ.* 2020 Aug 1;728:138764.
5. Westhaus S, Weber FA, Schiwy S, Linnemann V, Brinkmann M, Widera M, Greve C, Janke A, Hollert H, Wintgens T, Ciesek S.: Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany - Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. *Sci Total Environ.* 2021 Jan 10;751:141750.
6. Krebs S, Fischaleck M, Blum H.: A simple and loss-free method to remove TRIzol contaminations from minute RNA samples. *Anal Biochem.* 2009 Apr 1;387(1):136-8.
7. Amoah ID, Kumari S, Bux F.: Coronaviruses in wastewater processes: Source, fate and potential risks. *Environ Int.* 2020 Oct;143:105962.

Nadja Ivašková, Július Hodosy, Ľubomíra Tóthová: Využitie sliny na detekciu prítomnosti SARS-CoV-2. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 252-256.

51.Využitie sliny na detekciu prítomnosti SARS-CoV-2

Mgr. Nadja Ivašková¹
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Július Hodosy^{1,2}
Školiteľ: doc. RNDr. Ľubomíra Tóthová, PhD.¹

¹Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, ²Centrálne prijímacie oddelenie pracovisko Ružinov, Univerzitná nemocnica, Bratislava

Úvod

Koronavírusové ochorenie prerástlo v pandémiu pár mesiacov po tom, ako bolo prvýkrát hlásené v roku 2019 z čínskeho mesta Wuhan. Zdravotnícke systémy sú značne preťažené veľkým množstvom pacientov s ochorením COVID-19. Z toho dôvodu sa neustále hľadajú rýchle a presné diagnostické testy, ktoré by urýchlili identifikáciu symptomatických aj asymptomatických prenášačov. Zlatým štandardom na potvrdenie prítomnosti vírusovej RNA je polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou (RT-qPCR), ktorá vyžaduje izoláciu RNA (1). PCR je základná metóda molekulárnej biológie, ktorá je založená na detekcii a amplifikácii požadovanej sekvencie nukleových kyselín. Pridaná reverzná transkripcia slúži na prepísanie izolovanej RNA do komplementárnej DNA (2). PCR produkty, tzv. amplikóny, vznikajú v cykloch v exponenciálnej reakcii. Pridaním fluorescenčného farbiva je možné sledovať nárast signálu v každom cykle a kvantitatívne vyhodnotiť množstvo RNA vo vzorke. PCR metóda má síce vysokú senzitivitu a spoľahlivo deteguje prítomnosť virálnej RNA, avšak prináša so sebou aj negatíva ako drahé laboratórne vybavenie a dlhý čas od spracovania vzoriek po výsledok (3). Štandardne sa vzorky získavajú výterom z nosohltana, čo je pre pacienta nekomfortné a stresujúce. Preto sa hľadajú alternatívne a rýchlejšie metódy, s použitím menej invazívnych spôsobov odberu vzoriek.

Slučkami sprostredkovaná izotermická amplifikácia s reverznou transkripciou (RT-LAMP) je alternatívou k štandardnej PCR, ktorá urýchľuje čas (20 – 45 minút) a zároveň nie je potrebné drahé prístrojové vybavenie (3). Výsledok je možné odčítať vizuálne vďaka prítomnosti farbiva citlivého na pH, prípadne pomocou gélovej elektroforézy alebo spektrofotometricky zaznamenávaním fluorescencie (4). Jednou z používaných možností je aj antigénový rýchlotest, ktorého benefitom je najmä rýchlosť (15 – 30 minút) a jednoduchosť výkonu testu pričom nie je potrebné laboratórne prostredie. Test funguje na princípe imunochromatografie, kde proteíny vírusu (antigény) prítomné vo vzorke tvoria komplexy antigén-protilátka. Nevýhodou je spôsob odoberania vzorky, ktorý je identický so štandardným typom odberu vzoriek ako pre RT-PCR. Do popredia sa preto dostáva aj využitie sliny ako odberového materiálu, kde sa po izolácii vírusovej RNA vzorka použije v RT-PCR alebo RT-LAMP metóde (3-7). Ľudské sliny ponúkajú niekoľko výhod pre klinickú diagnostiku, najmä neinvazívny a menej stresujúci odber a možnosť častého opakovania odberu.

V našej štúdii sme sa zamerali na priame využitie slín v RT-LAMP metóde čím odpadáva nevyhnutný krok izolácie RNA. Výhodou je aj rýchlosť metódy a neinvazívny zber vzoriek. Primárnym cieľom našej práce bolo overiť, či je možné potvrdiť prítomnosť vírusu SARS-CoV-2 pomocou RT-LAMP v sline od dobrovoľníkov, ktorí boli pozitívne testovaní na prítomnosť SARS-CoV-2 antigénovým rýchlotestom.

Nadja Ivašková, Július Hodosy, Ľubomíra Tóthová: Využitie sliny na detekciu prítomnosti SARS-CoV-2. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 252-256.

Materiál a metódy

Zber vzoriek a spracovanie

75 ľudí s pozitívnym výsledkom antigénového testovania (STANDARD Q COVID-19 Ag, SD Biosensor, Južná Kórea, v Mobilnom odberovom mieste A, Ružinovská 6, Bratislava) sme poprosili o odber celkovej nestimulovanej sliny. Vzorky slín sa odoberali bez obmedzenia času a príjmu potravy. Z iniciálnych 75 vzoriek sme vyradili 17 vzoriek pre ich nízky objem alebo problém so spracovaním vzoriek. Pred ďalším použitím boli vzorky inaktivované 5 minút pri 95 °C. Jedna alikvota slín bola použitá na izoláciu vírusovej RNA, druhá alikvota vzorky bola použitá priamo v RT-LAMP.

Izolácia vírusovej RNA zo slín

Na izoláciu vírusovej RNA sme použili 400µl slín. Použili sme kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Nemecko), pričom sme postupovali podľa odporúčaného protokolu od výrobcu.

Kvantitatívna RT-PCR

V kvantitatívnej RT-PCR metóde sme použili komerčne syntetizované forward a backward primery N1 a N3 génu SARS-CoV-2 (Microsynth AG, Rakúsko) (N1: fw-GACCCCAAATCAGCGAAAT, rev-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG; N3: fw-GGGAGCCTTGAATACACCAAAA, rev-TGTAGCAGATTGCAGCATTG). Reakčná zmes mala objem 10 µl a obsahovala 5 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 0,5 µl 500 nM forward a reverse primerov N1 alebo N3 génu, 0,1 µl QuantiTect RT Mix (Qiagen), 1,4 µl vody a 2,5 µl templátu (RNA izolovaná zo slín). Ako pozitívnu kontrolu sme použili vírusovú RNA izolovanú zo supernatantu bunkovej kultúry získaného z buniek Vero E6 infikovaných vírusovým kmeňom SARS-CoV-2. Jednokroková RT-PCR prebiehala na prístroji Eppendorf realplex⁴ Mastercycler egradient S (Eppendorf, Nemecko). Termocyklovanie bolo nastavené na 30 min a 50 °C pre reverznú transkripciu, 15 min a 95 °C pre počiatočnú denaturáciu a 45 cyklov amplifikácie, kde denaturácia prebiehala 15 s pri 95 °C, anelácia 30 s pri 55 °C a polymerizácia 30 s pri 65 °C.

RT-LAMP

Reakčnú zmes v celkovom objeme 20 µl sme pripravili v 2 variantoch (A/B). Reakčná zmes obsahovala 10 µl WarmStart® Colorimetric LAMP 2x Master Mix with UDG (New England Biolabs, Massachusetts), 3/2 µl zmesi primerov, 2/5 µl vody a 5/3 µl vzorky (slina). Zmes primerov bola pripravená v 10-násobnej koncentrácii pre S gén SARS-CoV-2 (8): FIP/BIP - 16 µM, F3/B3 - 2 µM, LF/LB - 4 µM). Primery boli komerčne syntetizované (Microsynth AG, Rakúsko) (FIP-CATTGAGTTGAATCACCACAAATGTGTGTTACCACAGAAATTCTACC, BIP-GTTGCAATATGGCAGTTTTGTACATTGGGTGTTTTGTCTTGTT, F3-TCTATTGCCATACCCACAA, B3-GGTGTTTTGTAAATTTGTTTGAC, LF-ACTGATGTCTTGGTCATAGACT, LB-TAAACCGTGCTTTAACTGGAATAGC). Ako pozitívnu kontrolu sme použili SARS-CoV-2. Reakčnú zmes sme inkubovali po dobu 30 minút pri 65 °C, následne sme vizuálne vyhodnocovali farebnú zmenu reakcie ako na obrázku 1 (pozitívny-žltá/oranžová farba alebo negatívny-magenta/ružová farba).



Obr. 1 Kolorimetricky odčítateľný test RT-LAMP. V reakcii je pozitívna kontrola (+) a negatívna kontrola (-) pred a po inkubácii 30 minút pri 65 °C. Prítomnosť vírusu SARS-CoV-2 spôsobila reakciu v pH-senzitívnej reakčnej zmesi a zmenu z ružovej farby na žltú.

Nadja Ivašková, Július Hodosy, Ľubomíra Tóthová: Využitie sliny na detekciu prítomnosti SARS-CoV-2. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 252-256.

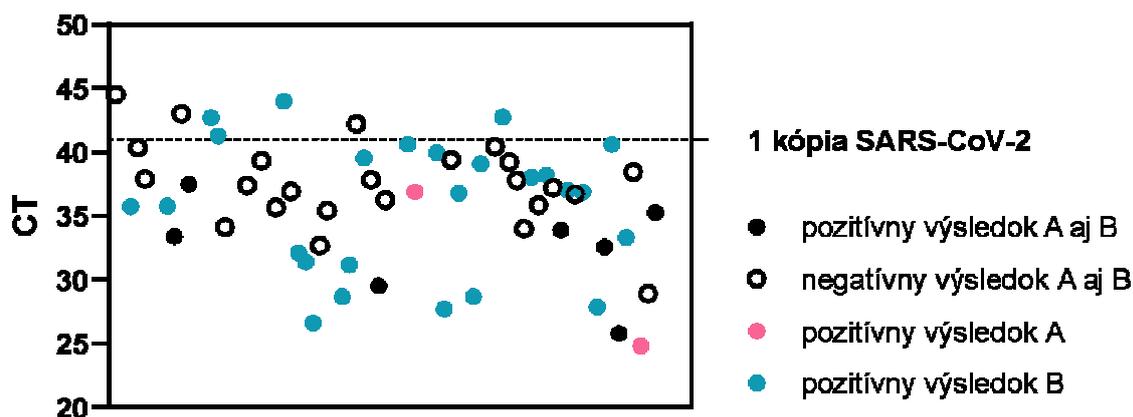
Štatistické spracovanie

Výsledky a grafy sme spracovali v programe GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., Kalifornia, USA). Na popísanie výkonnosti testov sme zvolili parametre: skutočne pozitívny, skutočne negatívny, falošne pozitívny, falošne negatívny. Na základe týchto parametrov sme vyhodnotili senzitivitu a špecificitu skúmaných variantov RT-LAMP. Ako podklad sme použili CT (prahový cyklus) hodnoty získané z RT-PCR v ktorej ako templát bola použitá vzorka RNA izolovaná zo slín vzhľadom na to, že nemáme k dispozícii výsledky štandardizovaného RT-PCR testu z nosohltanového výteru.

Výsledky

Pomocou metódy RT-qPCR sme potvrdili prítomnosť vírusovej RNA u 87,9 % vzoriek (51/58). Pri metóde RT-LAMP sme potvrdili prítomnosť SARS-CoV-2 u 15,5 % (variant A, 9/58), resp. 55,2 % (variant B, 32/58) vzoriek.

Vplyv zloženia reakčnej zmesi metódy RT-LAMP je znázornený na grafe 1. Výsledky metódy v prípade použitia vyššieho objemu vzorky a primerov (variant A) poukazujú na nižšiu presnosť diagnostického testu.



Graf.1 Porovnanie výsledkov RT-LAMP oboch testovaných variantov A a B. V metóde bola ako vzorka použitá slina jednotlivých dobrovoľníkov. A – 5 μ l sliny a B – 3 μ l sliny, CT – prahový cyklus

Porovnanie výkonnosti oboch variantov je zhrnuté v tabuľke 1. Skutočne pozitívni pacienti reprezentujú zhodu pozitívneho výsledku v oboch metódach, pre skutočne negatívne označenie to platí analogicky. Falošne pozitívny výsledok znamená negatívny výsledok v RT-PCR a pozitívny v RT-LAMP, falošne negatívny výsledok platí v opačnom prípade.

Tab.1: Porovnanie výkonnosti variantov A a B metódy RT-LAMP na základe CT hodnôt z RT-qPCR.

Parameter	Variant A	Variant B	Antigen test
skutočne pozitívni	9	28	51
skutočne negatívni	7	3	0
falošne pozitívni	0	4	7
falošne negatívni	42	23	0
senzitivita	17,6 %	54,9 %	-
špecificita	100 %	42,9 %	-
presnosť testu	27,6 %	53,4 %	-

Nadja Ivašková, Július Hodosy, Ľubomíra Tóthová: Využitie sliny na detekciu prítomnosti SARS-CoV-2. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 252-256.

Diskusia

Aj keď boli predstavené rôzne metódy na identifikáciu vírusovej RNA, zlatým štandardom je stále RT-PCR z nazofaryngeálneho steru. Vzhľadom na šírenie ochorenia COVID-19 a pomerne invazívny zber vzoriek sa hľadajú rýchlejšie metódy ideálne použiteľné aj na menej invazívne odbery vzoriek akými sú sliny. V práci sme sa zamerali na identifikáciu SARS-CoV-2 v slinách dobrovoľníkov pomocou metód RT-qPCR a RT-LAMP, pričom práve RT-LAMP metóda je rýchlejšia ako PCR metóda. Okrem toho, že odber slín je jednoduchý a menej nepríjemný, je možné ho absolvovať aj doma, čím sa redukuje riziko nákazy ostatných ľudí. Ukázalo sa, že slina by mohla byť porovnateľnou diagnostickou tekutinou pre nosohltanový ster pri identifikácii SARS-CoV-2 v RT-qPCR (9, 10). Práve z tohto dôvodu sme sa sústredili na použitie celej sliny v metóde RT LAMP, čím sme spojili nielen využitie neinvazívne získaných vzoriek, ale aj finančne menej náročnej metódy. Vzhľadom na to, že sa jedná o neštandardizovanú metódu bude potrebné ešte pred zavedením do klinickej praxe popísať faktory vplývajúce na výkonnosť testu. Ako prvé sme sa rozhodli otestovať vplyv objemu sliny, ktorý sa použije v teste.

Nakoľko pozitivita dobrovoľníkov nebola potvrdená štandardným spôsobom a pre účely posúdenia výkonnosti to bolo nevyhnutné, tak sme pozitivitu overovali metódou RT-PCR za využitia RNA izolovanej zo slín. Takto sme boli schopní potvrdiť prítomnosť infekcie u 87,9 % vzoriek. To poukazuje na možný vplyv faktorov ako sú napr. načasovanie zberu vzoriek, virálna nálož pacientov, či samotné zloženie slín. Vírusová nálož väčšiny pacientov bola nízka, CT hodnoty sa pohybovali nad CT 25. Keďže sa jedná o dobrovoľníkov pozitívne testovaných antigénovým rýchlotestom, citlivosť týchto testov je nižšia najmä pri nízkej vírusovej náloži (11, 12). V našej štúdii tak môžeme pozorovať možný efekt vylúčovania vírusu do slín, pričom sa dokázali nižšie prahové hodnoty CT v sline oproti výterom nosohltana (13).

Metódou RT-LAMP sme boli schopní potvrdiť SARS-CoV-2 u 17,6 % (variant A), resp. 54,9 % (variant B) vzoriek. Paradoxne, vyšší objem slín nevykazoval vyššiu senzitivitu testu, práve naopak, senzitivita klesla o 37,3 %. To by mohlo byť spôsobené práve menším objemom vody v reakcii (variant B – 2 µl, variant A – 5 µl), ktorá by mohla slúžiť na riedenie sliny a jej komponentov, ktoré by pri menej riedenej vzorke mohli inhibovať reakciu, čo potvrdili aj iní (14).

Samotná výkonnosť testu mohla byť do určitej miery ovplyvnená aj zvolením vzorky, keďže mohla byť prítomná zvýšená miera výskytu infikovaných osôb (15). Ďalším limitujúcim faktorom je aj použitie slinnej vzorky ako podklad pre izoláciu RNA potrebnú pre PCR metódu, pričom štandardným odberovým materiálom je nazofaryngeálny ster. Doteraz nie je úplne známe presné vylúčovanie SARS-CoV-2 do slín a taktiež predpokladáme variabilitu vo vylučovaní vírusu do slín ako aj v načasovaní odberu vzoriek (13).

Keďže SARS-CoV-2 vírus osídľuje najmä dýchacie cesty, je prirodzené, že sa prvé testy zamerali na známy zdroj šírenia vírusu. Zároveň bolo jednoduchšie využiť štandardizovanú metodiku, ktorá funguje aj pri infekciách dýchacích ciest inými vírusmi ako napr. chrípka. Teraz, počas pandémie, je však dôležitá aj samotná bezpečnosť testovania, jednoduchosť, neinvazívnosť, rýchlosť odberu a finančná náročnosť, a preto je aktuálnym aj testovanie SARS-CoV-2 zo slín. Záverom môžeme potvrdiť, že je možné identifikovať prítomnosť vírusu SARS-CoV-2 v slinách. Pre využitie v klinickej praxi je nevyhnutná optimalizácia pre zvýšenie diagnostickej výkonnosti testu.

Práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV) grantom PP-COVID-20-0017.

Zoznam použitej literatúry

1. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A: Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA 2020; 323 (22): 2249-2251.
2. Bustin SA, Benes V, Garson JA a spol: The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 2009; 55 (4): 611-22.

Nadja Ivašková, Július Hodosy, Ľubomíra Tóthová: Využitie sliny na detekciu prítomnosti SARS-CoV-2. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 252-256.

3. Dao Thi VL, Herbst K, Boerner K a spol: A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med.* 2020; 12 (556): eabc7075.
4. Mohon AN, Oberding L, Hundt J a spol: Optimization and clinical validation of dual-target RT-LAMP for SARS-CoV-2. *J Virol Methods* 2020; 286: 113972.
5. Jiang M, Pan W, Arasther A a spol: Development and Validation of a Rapid, Single-Step Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System Potentially to Be Used for Reliable and High-Throughput Screening of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; 10: 331.
6. Kashir J, Yaqinuddin A: Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Med Hypotheses* 2020; 141: 109786.
7. Janíková M, Hodosy J, Boor P, Klempa B, Celec P: Loop-mediated isothermal amplification for the detection of SARS-CoV-2 in saliva. *Microb Biotechnol* 2021; 14 (1): 307-316.
8. Yan C, Cui J, Huang L a spol: Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect* 2020;26 (6): 773-779.
9. Pasomsub E, Watcharananan SP, Boonyawat K a spol: Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect* 2021; 27 (2): 285.e1-285.e4.
10. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F a spol: Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect* 2020; 81 (1): e45-e50.
11. Oh SM, Jeong H, Chang E a spol: Clinical Application of the Standard Q COVID-19 Ag Test for the Detection of SARS-CoV-2 Infection. *J Korean Med Sci.* 2021; 36 (14): e101.
12. Ristić M, Nikolić N, Čabarkapa V, Turkulov V, Petrović: Validation of the STANDARD Q COVID-19 antigen test in Vojvodina, Serbia. *PLoS One* 2021; 16 (2): e0247606.
13. Rao M, Rashid FA, Sabri FSAH a spol: Comparing nasopharyngeal swab and early morning saliva for the identification of SARS-CoV-2. *Clin Infect Dis.* 2020: ciae1156.
14. Lalli MA, Langmade JS, Chen X a spol: Rapid and Extraction-Free Detection of SARS-CoV-2 from Saliva by Colorimetric Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Clin Chem.* 2021; 67 (2): 415-424.
15. Nagura-Ikeda M, Imai K, Tabata S a spol: Clinical Evaluation of Self-Collected Saliva by Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR), Direct RT-qPCR, Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification, and a Rapid Antigen Test To Diagnose COVID-19. *J Clin Microbiol* 2020; 58 (9): e01438-20.

Kristína Bartakovičová, Ivan Belica, Petra Keményová, Žofia Szapuová, Katarína Stebelová, Iveta Waczulíková, Katarína Babinská: Poruchy spánku a ich vzťah k adaptívnemu správaniu a k hladinám 6-sulfatoxymelatonínu v moči v súbore detí s poruchami autistického spektra. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 257-261.

52. Poruchy spánku a ich vzťah k adaptívnemu správaniu a k hladinám 6-sulfatoxymelatonínu v moči v súbore detí s poruchami autistického spektra

MUDr. Kristína Bartakovičová¹

Spoluautori: Ivan Belica¹, Petra Keményová¹, Žofia Szapuová¹, Katarína Stebelová², Iveta Waczulíková³, Katarína Babinská¹

Školiteľ: Doc. MUDr. Katarína Babinská, PhD.¹

¹ Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

² Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, ³ Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Univerzita Komenského v Bratislave

Úvod

Poruchy autistického spektra (PAS) sú skupinou neurovývinových ochorení charakterizovanou narušením v oblasti sociálnej interakcie, komunikácie a úzko vymedzenými, repetitívnymi vzorcami správania a záujmov (1). Poruchy spánku sú u detí s PAS častou komorbiditou s prevalenciou až 50-80% (2). Najčastejšie sú uvádzané problémy so zaspávaním, častejšie nočné prebúdzania, výskyt parasomnií, ktoré ovplyvňujú celkové trvanie i kvalitu spánku (3). Adaptívne správanie je charakterizované ako miera samostatnosti pri plnení každodenných aktivít. Zahŕňa oblasť komunikačných, sociálnych zručností, ako aj zručnosti pri starostlivosti o seba a prostredie (4). Podľa doterajších výskumov nedostatok spánku môže zhoršovať jadrové príznaky PAS, vedie k frustrácii, podráždenosti, hyperaktivite, ktoré významnou mierou ovplyvňujú adaptívne správanie u týchto detí (5-7). Okrem toho sú poruchy spánku spojené s vyšším výskytom problémového správania (8). Melatonín je hormón, ktorý hrá významnú úlohu v regulácii spánkového cyklu (9). Viaceré štúdie potvrdili jeho zníženu sekréciu u detí s PAS, ako aj menšie cirkadiánne rozdiely v jeho plazmatickej koncentrácii (10). Metabolitom melatonínu je 6-sulfatoxymelatonín (aMT6s), ktorý je vylučovaný do moču. pričom prvý ranný moč dobre odzrkadľuje nočnú produkciu melatonínu.

Cieľom našej štúdie bolo vyhodnotiť poruchy spánku u detí s PAS a koncentráciu 6-sulfatoxymelatonínu vo vzorke ranného a poobedného moču. Následne sme analyzovali ich korelácie s adaptívnym správaním a behaviorálnymi ukazovateľmi jadrových príznakov PAS.

Materiál a metódy

Výskumný súbor tvorilo 46 detí s PAS, z toho 42 chlapcov. Priemerný vek bol 5,6 roku s vekovým rozpätím 2,8 – 13,3 roka.

Spánkové dáta: Prevalenciu porúch spánku sme hodnotili štandardizovaným dotazníkom spánkových návykov dieťaťa (The Children's Sleep Habits Questionnaire – CSHQ). Je vyplňaný rodičom dieťaťa, ktorý pri každom výroku odpovedá na základe frekvencie výskytu daného správania, zvyčajne (5–7 nocí za týždeň), niekedy (2–4 noci týždenne), nikdy/zriedka (0–1 noc za týždeň). Celkové skóre od 33 do 99 bodov je založené na 45 položkách, hranica pre poruchy spánku je minimálne 41 bodov (11,12).

Biologické parametre: Vzorky prvého ranného moču odobrali rodičia v domácom prostredí. Poobedné vzorky sa odoberali v skorých popoludňajších hodinách po vyšetrení behaviorálnych parametrov.

Kristína Bartakovičová, Ivan Belica, Petra Keményová, Žofia Szapuová, Katarína Stebelová, Iveta Waczulíková, Katarína Babinská: Poruchy spánku a ich vzťah k adaptívnemu správaniu a k hladinám 6-sulfatoxymelatonínu v moči v súbore detí s poruchami autistického spektra. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 257-261.

Vzorky moču sa až do analýzy skladovali pri -18°C . Hladiny aMT6s v moči boli stanovené metódou ELISA prostredníctvom setu pre melatonínsulfát (DRG Instruments, Germany). Test sa uskutočňoval podľa odporúčania výrobcu. Hladina kreatinínu v moči bola stanovená prostredníctvom enzymatickej metódy (Erba, Lachema, CZ). Súprava bola použitá podľa pokynov výrobcu. Pre presnejšiu interpretáciu výsledkov bol aMT6s v moči štandardizovaný na hladiny kreatinínu (aMT6s/kreatinín). Prezentujeme ranné hodnoty aMT6s/kreatinín odrážajúce nočnú produkciu melatonínu, ako aj rozdiel medzi rannou a popoludňajšou hodnotou aMT6s/kreatinín (aMT6s/kreatinín rozdiel) vyjadrujúcu cirkadiálne kolísanie hladín.

Tab. 1: Charakteristika súboru.

		priemer	medián	SD	min.	max.
	vek	5,6	5,1	2,5	2,8	13,3
	poruchy spánku	44,4	44,5	6,5	33,0	58,0
	aMT6s/kreatinín - ranný	169,2	152,1	81,2	49,3	368,2
	aMT6s/kreatinín - rozdiel	133,6	119,5	68,1	18,5	312,2
ADI-R	abnormality v socializácii	0,5	0,4	0,2	0,1	0,9
	abnormality v komunikácii	0,5	0,5	0,2	0,1	0,9
	stereotýpia	0,3	0,3	0,2	0,1	0,8
ADOS-2	sociálny afekt	7,2	7,0	1,4	5,0	10,0
	stereotýpia	8,7	9,0	1,4	4,0	10,0
	celkovo	7,9	8,0	1,4	6,0	10,0
adaptívne správanie	celkovo	71,6	71,0	10,7	51,0	98,0
	komunikácia	69,9	71,0	17,9	38,0	113,0
	zručnosti každodenného života	76,4	76,0	10,7	54,0	98,0
	socializácia	69,0	66,0	14,9	38,0	98,0
	maladaptívne správanie - internalizované	18,2	19,0	2,6	12,0	22,0
	maladaptívne správanie - externalizované	17,6	18,0	2,4	11,0	22,0

Adaptívne správanie: Vinelandská škála, 3. verzia (4) – je dotazník pre rodiča alebo opatrovateľa, v ktorom hodnotí úroveň adaptívneho správania, t.j. ako sa dieťa správa v bežnom každodennom živote. Hodnotené položky sa zoskupujú do nasledovných oblastí: komunikácia (počúvanie a porozumenie, hovorenie, čítanie a písanie), zručnosti každodenného života (starostlivosť o seba, starostlivosť o domácnosť, život v spoločnosti) a sociálne vzťahy a socializácia (vzťahy s druhými, hra a oddych, coping). Dotazník ponúka aj celkové skóre adaptívneho správania. Okrem toho dotazník

Kristína Bartakovičová, Ivan Belica, Petra Keményová, Žofia Szapuová, Katarína Stebelová, Iveta Waczulíková, Katarína Babinská: Poruchy spánku a ich vzťah k adaptívnemu správaniu a k hladinám 6-sulfatoxymelatonínu v moči v súbore detí s poruchami autistického spektra. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 257-261.

mapuje aj maladaptívne správanie v dvoch oblastiach: internalizované (problémy so spánkom, jedlom, emocionálne rozladenie, a pod.) a externalizované (slovné alebo fyzické negatívne prejavy voči ľuďom alebo veciam a pod.).

V ďalších tabuľkách uvádzame korelácie aMT6s/kreatinín a porúch spánku s mierou príznakov PAS (tab. 2) a adaptívnym a maladaptívnym správaním (tab. 3).

Behaviorálne parametre: Na diagnostiku autizmu sme použili štandardné metódy. ADOS-2 (Autism Diagnostic Observation Schedule – second version) je štandardizovaná metóda na hodnotenie sociálneho afektu (SA) a úzko vymedzených repetitívnych vzorcov správania (UVRZ), ktorými sa získava celkové skóre (SA+UVRZ). ADI-R (Autism Diagnostic Interview – revised) je štruktúrovaný rozhovor s rodičom dieťaťa, ktorý nám poskytuje informácie o kvalitatívnych abnormalitách v oblasti recipročnej sociálnej interakcii (suma A), sociálnej komunikácii (suma B) a úzko vymedzených, repetitívnych vzorcoch správania a záujmov (suma C) (13).

Štatistické spracovanie: Pre testovanie normality rozloženia dát sme použili Shapiro-Wilkov test. V prípade normálneho rozloženia sme použili Pearsonov korelačný koeficient, v prípade non-normálneho rozloženia sme použili Spearmanov korelačný koeficient.

Výsledky

V tabuľke č.1 uvádzame charakteristiku súboru. Poruchu spánku zistenú prostredníctvom dotazníka CSHQ má 67% detí. Deti mali v priemere stredne závažnú až závažnú mieru príznakov podľa ADOS-2. Celková úroveň adaptívneho správania dosahuje takmer úroveň 2 SD pod priemerom bežnej populácie. Výskyt internalizovaného maladaptívneho správania je v súbore zvýšený, podobne i úroveň externalizovaného maladaptívneho správania, ktorá takmer dosahuje hranicu 1 SD nad priemerom.

Tab. 2: Korelácie medzi hladinami aMT6s/kreatinín v moči a poruchami spánku s mierou príznakov PAS

		ADOS-2			ADI-R		
		sociálny afekt	stereotypia	celkové skóre	sociálna interakcia	komunikácia	stereotypia
aMT6s/kreatinín ranný	rho	-0,314*	-0,221	-0,354*	0,040	0,105	0,033
	p	0,034	0,140	0,016	0,792	0,486	0,827
aMT6s/kreatinín rozdiel	rho	-0,308*	-0,100	-0,337*	-0,021	0,092	-0,020
	p	0,037	0,509	0,022	0,889	0,543	0,896
spánok	rho	-0,107	-0,087	-0,089	0,089	0,014	0,122
	p	0,480	0,565	0,556	0,556	0,929	0,419

Kristína Bartakovičová, Ivan Belica, Petra Keményová, Žofia Szapuová, Katarína Stebelová, Iveta Waczulíková, Katarína Babinská: Poruchy spánku a ich vzťah k adaptívnemu správaniu a k hladinám 6-sulfatoxymelatonínu v moči v súbore detí s poruchami autistického spektra. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 257-261.

Tab. 3: Korelácie medzi hladinami aMT6s/kreatinín a poruchami spánku s adaptívnym a maladaptívnym správaním

		adaptívne správanie				maladaptívne správanie	
		celkové	komunikácia	zručnosti	socializácia	internalizované	externalizované
aMT6s/kreatinín ranný	rho	-0,132	-0,138	-0,064	-0,065	-0,159	-0,195
	p	0,389	0,368	0,678	0,672	0,314	0,215
aMT6s/kreatinín rozdiel	rho	-0,104	-0,150	-0,018	-0,016	-0,145	-0,156
	p	0,496	0,324	0,908	0,917	0,359	0,323
spánok	rho	-0,153	-0,079	-0,045	-0,318*	0,529**	0,564**
	p	0,317	0,608	0,769	0,034	0,000	0,000

Nezistili sme vzťah spánkových problémov s rannou hladinou aMT6s/kreatinín ($p = 0,464$) ani s rozdielom rannej a poobednej hodnoty aMT6s/kreatinín ($p = 0,630$). Vyššia hladina ranného aMT6s/kreatinín a väčší rozdiel rannej a popoludňajšej koncentrácie aMT6s/kreatinín boli spojené s menšou závažnosťou narušenia sociálneho afektu a s poklesom celkovej miery príznakov podľa ADOS-2. Vyššia miera spánkových problémov korelovala s nižšou úrovňou socializácie a s vyššou mierou maladaptívneho správania.

Diskusia

Prevalencia porúch spánku u detí s PAS v našej štúdií bola 67%, teda nachádza sa v rozmedzí 50-80%, zistených aj v iných štúdiách (2). Viacerí autori uvádzajú ako jednu z príčin spánkových porúch pri PAS abnormálne vylučovanie melatonínu (14-16). V našej predchádzajúcej štúdií sme tiež potvrdili znížené vylučovanie aMT6s/kreatinín v rannej vzorke moču, ako aj menší rozdiel medzi rannými a popoludňajšími hladinami aMT6s/kreatinínu u detí s PAS v porovnaní s neurotypickými jedincami naznačujúce abnormality v cirkadiálnom rytme vylučovania melatonínu (17).

Zistené hodnoty aMT6s v prezentovanej štúdií naznačujú, že vyššia nočná sekrécia melatonínu a väčšie cirkadiálne kolísanie v sekrécií melatonínu sa spája s menšou závažnosťou narušenia sociálneho afektu a s poklesom celkovej miery príznakov PAS podľa ADOS-2. Tieto výsledky podporujú hypotézu, podľa ktorej abnormality v sekrécií melatonínu môžu zohrávať úlohu v patomechanizmoch PAS. Podobne i Tordjman a kol. (16) uvádzajú negatívnu asociáciu medzi hladinou melatonínu a psychologickými ukazovateľmi - verbálnou komunikáciou a hrou. V ďalšej štúdií sa preukázala negatívna korelácia medzi hladinou melatonínu a spontánnym napodobňovaním činností, symbolickou hrou a repetitívnym používaním predmetov u detí s PAS (18).

Korelácie 6-sulfatoxymelatonínu s poruchami spánku ani adaptívnym správaním sme nepotvrdili. Jedna z možných príčin je použitie subjektívnej metódy na zisťovanie porúch spánku a adaptívneho správania, kým meranie 6-sulfatoxymelatonínu je metóda objektívna. Poruchy spánku však negatívne korelovali s adaptívnym správaním v oblasti socializácie a pozitívne s výskytom maladaptívneho správania. Tieto zistenia korešponujú so štúdiími iných autorov (6,8). Adaptívne správanie je jedným z prediktorov funkčnosti dieťaťa v budúcnosti. Naše výsledky zdôrazňujú potrebu efektívnych intervencií zameraných na zlepšenie kvality spánku ako faktora ovplyvňujúceho adaptívne správanie.

Podporené grantmi APVV 15-0085, APVV 15-0045, APVV 18-0174, VEGA 1/0141/17

Kristína Bartakovičová, Ivan Belica, Petra Keményová, Žofia Szapuová, Katarína Stebelová, Iveta Waczulíková, Katarína Babinská: Poruchy spánku a ich vzťah k adaptívnemu správaniu a k hladinám 6-sulfatoxymelatonínu v moči v súbore detí s poruchami autistického spektra. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 257-261.

Zoznam použitej literatúry

1. American Psychiatric Association, Association AP: Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Arlington: American Psychiatric Publishing. 2013.
2. Mazzone L, Postorino V, Siracusano M, Riccioni A, Curatolo P: The relationship between sleep problems, neurobiological alterations, core symptoms of autism spectrum disorder, and psychiatric comorbidities. *Journal of Clinical Medicine* 2018; 7:102.
3. Goldman SE, Richdale AL, Clemmons T, Malow BA: Parental sleep concerns in autism spectrum disorders: Variations from childhood to adolescence. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 2012; 42:531–538.
4. Sparrow SS, Cicchetti D, Saulnier CA. Vineland Adaptive Behavior Scales, Third Edition (Vineland-3). San Antonio, TX:Pearson 2016.
5. Mayes SD, Calhoun SL: Variables related to sleep problems in children with autism. *Research in Autism Spectrum Disorders* 2009; 3: 931–941.
6. Taylor MA, Schreck KA, Mulick JA: Sleep disruption as a correlate to cognitive and adaptive behavior problems in autism spectrum disorders. *Research in Developmental Disabilities* 2012; 33:1408–1417.
7. Cohen S, Conduit R, Lockley SW, Rajaratnam SM, Cornish KM: The relationship between sleep and behavior in autism spectrum disorder (ASD): a review. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 2014; 6:44.
8. Sikora DM, Johnson K, Clemons T, Katz T: The relationship between sleep problems and daytime behavior in children of different ages with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 2012; 130:S83–S90.
9. Zisapel N: New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *British Journal of Pharmacology* 2018; 175:3190–3199.
10. Gagnon K, Godbout R: Melatonin and comorbidities in children with autism spectrum disorder. *Current Developmental Disorders Reports* 2018; 5:197-206.
11. Owens JA, Spirito A, McGuinn M: The Children's Sleep Habits Questionnaire (CSHQ): psychometric properties of a survey instrument for school-aged children. *Sleep* 2000; 23:1043-1051.
12. Moore M, Evans V, Hanvey G, Johnson C. Assessment of sleep in children with autism spectrum disorder. *Children (Basel)* 2017; 4:72.
13. Lord C, Rutter M, Le Couteur A. Autism Diagnostic Interview-Revised: A revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *Journal of autism and developmental disorders* 1994; 24:659-85.
14. Nir I, Meir D, Zilber N, Knobler H, Hadjez J, Lerner Y: Brief report: Circadian melatonin, thyroid-stimulating hormone, prolactin, and cortisol levels in serum of young adults with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 1995; 25: 641–654.
15. Kulman G, Lissoni P, Rovelli F, Roselli MG, Brivio F, Sequeri P: Evidence of pineal endocrine hypofunction in autistic children. *Neuro Endocrinology Letters* 2000; 21:31–34.
16. Tordjman S, Anderson GM, Pichard N, Charbuy H, Touitou Y. Nocturnal excretion of 6-sulphatoxymelatonin in children and adolescents with autistic disorder. *Biological Psychiatry* 2005; 57:134–138.
17. Babinska K, Siklenkova L, Stebelova K, Waczulikova I, Celusakova H, Vidosovicova M, Bartakovicova K, Szapuova Z, Kemenyova P: Urinary levels of 6-sulphatoxymelatonin and their associations with sleep disorders and behavioural impairments in children with autism spectrum disorder. *Bratislavské Lekárske Listy* 2019; 120:849-855.
18. Tordjman S, Anderson GM, Bellissant E, Botbol M, Charbuy H, Camus F, Gaignic R, Kermarrec S, Fougereou C, Cohen D, Touitou Y: Day and nighttime excretion of 6- sulphatoxymelatonin in adolescents and young adults with autistic disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37:1990–1997.

Barbora Gromová, Katarína Kmeťová, Michal Pastorek, Peter Celec, Roman Gardlík: *Nekonjugovaný bilirubín ako modulátor tvorby neutrofilových extracelulárnych pascí. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 262-266.*

53. Nekonjugovaný bilirubín ako modulátor tvorby neutrofilových extracelulárnych pascí.

Mgr. Barbora Gromová¹
(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Katarína Kmeťová¹, Michal Pastorek¹, Peter Celec¹
Školiteľ: doc. RNDr. MUDr. Roman Gardlík, PhD.¹

¹Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta UK, Bratislava

Úvod

Neutrofilý zohrávajú kľúčovú úlohu v prvej línii antimikrobiálnej obrany. Ich aktivácia a infiltrácia do miesta zápalu môže vyústiť do tvorby neutrofilových extracelulárnych pascí (NETov) ako výsledok špecifickej bunkovej smrti – NETózy (1). Okrem imunoprotektívnych funkcií NETov, v súčasnosti prevládajú dôkazy o ich prozápalovom charaktere. Z dostupnej literatúry je známe, že NETy tvorené majoritne DNA sa v rôznych patologických stavoch zapájajú do amplifikácie zápalových kaskád (2, 3, 4). Odstraňovanie NETov inhibítormi neutrofilových proteínov kľúčových v ich formovaní či štiepenie prítomnej DNA DNázami bolo pozorované zmiernenie zápalu v reumatoidnej artritíde, sepse alebo ulceróznej kolitíde (5, 6, 7). Zatiaľ čo eliminácia NETózy je do značnej miery účinná, prípadná prevencia jej vzniku by mohla byť rozhodujúca pre budúcu terapiu chorôb asociovaných s prozápalovým charakterom NETov. Uvoľňovanie veľkého množstva reaktívnych foriem kyslíka (ROS) generovaných pri NETóze (8), ako nevyhnutnej súčasti tvorby NETov, sa vynára ako potenciálny cieľ terapie zameranej na prerušenie nežiadúcej zápalovej kaskády.

Nekonjugovaný bilirubín je produkt katabolizmu hému. Vysoké systémové koncentrácie v určitých chorobných stavoch vedú k poškodeniu bazálnych ganglií a neurónom (9). Naopak, fyziologické koncentrácie tohto metabolitu majú imunomodulačné účinky, ako napríklad imunitné odpovede regulačných alebo pomocných Th-17 lymfocytov cez arylhydrokarbónovú signalizáciu (10) alebo antioxidantná kapacita vychytávania voľných radikálov vznikajúcich pri ROS. Práve bilirubín ako antioxidant predstavuje potenciálny inhibítor procesu ROS-závislej NETózy, čím môže redukovať tvorbu NETov a prispievať k zmierneniu zápalu. Cieľom tejto práce bolo popísať modulačný účinok bilirubínu na tvorbu NETov na neutrofiloch izolovaných od zdravých jedincov.

Materiál a metódy

Izolácia neutrofilov

Zdravé ľudské neutrofilý boli izolované z čerstvej krvi od šiestich zdravých probandov pomocou gradientovej centrifugácie (30min, 550g pri 22°C) v 1-Step Polymorphs 1:1 (Accurate Chemical & Scientific Corp, USA). Odobraná fáza neutrofilov sa inkubovala v 0,45% NaCl počas 5min a následne sa objem doplnil RPMI-1640. Po nasledovnej centrifugácii (10min, 400g pri 22°C) sa pelet rozsuspendoval 20s v 20ml 0,2% NaCl, doplnilo sa 20ml 1,6% NaCl a scentrifugovalo (10min, 400g pri 22°C) za účelom lýzy erytrocytov. Získaný pelet sa rozsuspendoval v 1ml RPMI-1640 + 10% FBS.

Detekcia tvorby NETov

Barbora Gromová, Katarína Kmeťová, Michal Pastorek, Peter Celec, Roman Gardlík: Nekonjugovaný bilirubín ako modulátor tvorby neutrofilových extracelulárnych pascí.. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 262-266.

Detekcia tvorby NETov v prítomnosti stimulov bola pozorovaná a vyhodnotená analýzou Life Cell Technology s využitím Sytox Green dye (ThermoFisher, Nemecko) a Hoechst dye (ThermoFisher, Nemecko). K stanoveným stimulom - 100nM forbol-12-myristát-13-acetát (PMA) a *Escherichia coli* s MOI 20 bolo pridávaných 20 000 neutrofilov na jamku, ktoré boli predinkubované s farbičkami a troma rôznymi koncentraciami bilirubínu (600 μ M, 60 μ M, 6 μ M) 30min a 37°C. Neutrofilové sily so stimulmi boli inkubované 3 hodiny pri 5% CO₂ a 37°C. NETóza neutrofilov bola stanovená ako suma plochy vzniknutých NETov počas 3 hodín predelená počtom žijúcich neutrofilov v 90min merania.

Antimikrobiálna aktivita

Na stanovenie antimikrobiálnej aktivity sa použili všetky jamky s *E.coli* s MOI 20 z platne na detekciu NETov po skončení merania a vysievali sa Petriho misky s LB médiom v desiatkovom riedení a boli inkubované pri 37°C cez noc. Na druhý deň ráno sa spočítali kolónie a vypočítala sa antimikrobiálna aktivita.

Produkcia ROS

V prítomnosti rovnakých stimulov ako pri detekcii tvorby NETov (PMA, *E.coli* s MOI 20) bola stanovená ROS produkcia pomocou DHR 123 dye (ThermoFisher, Nemecko). Neutrofilové sily boli predinkubované s tromi koncentraciami bilirubínu (600 μ M, 60 μ M, 6 μ M) 30min a 37°C, na posledných 15 minút sa pridával roztok s DHR123 dye (1:10000). Nasledovala centrifugácia (300g, 10min pri 4°C), pelet bol rozsuspendovaný opäť v jednotlivých koncentraciách bilirubínu a pridaný do čiernej platne k stimulom (PMA, *E.coli* s MOI 20). Flouescencia bola meraná pri 488/525nm v 15 minútových intervaloch počas 2 hodín.

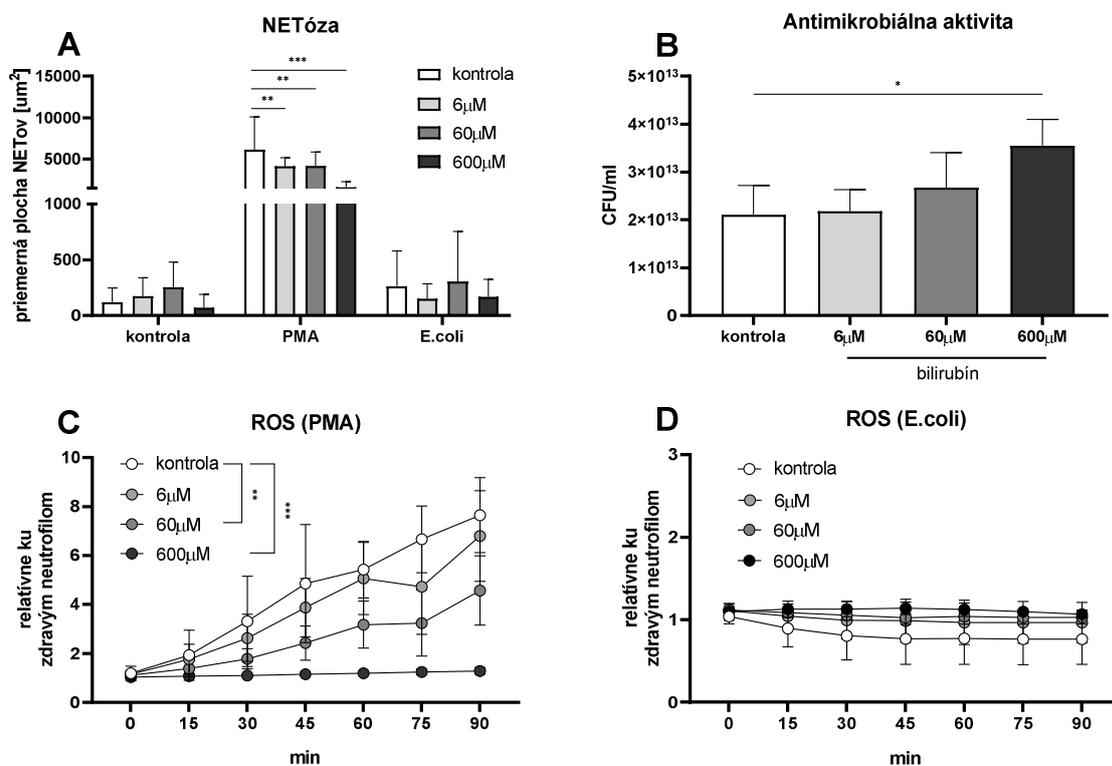
Štatistická analýza bola vykonaná pomocou GraphPad Prism 8.(GraphPad Software, USA) využitím one-way alebo two-way ANOVA.

Výsledky

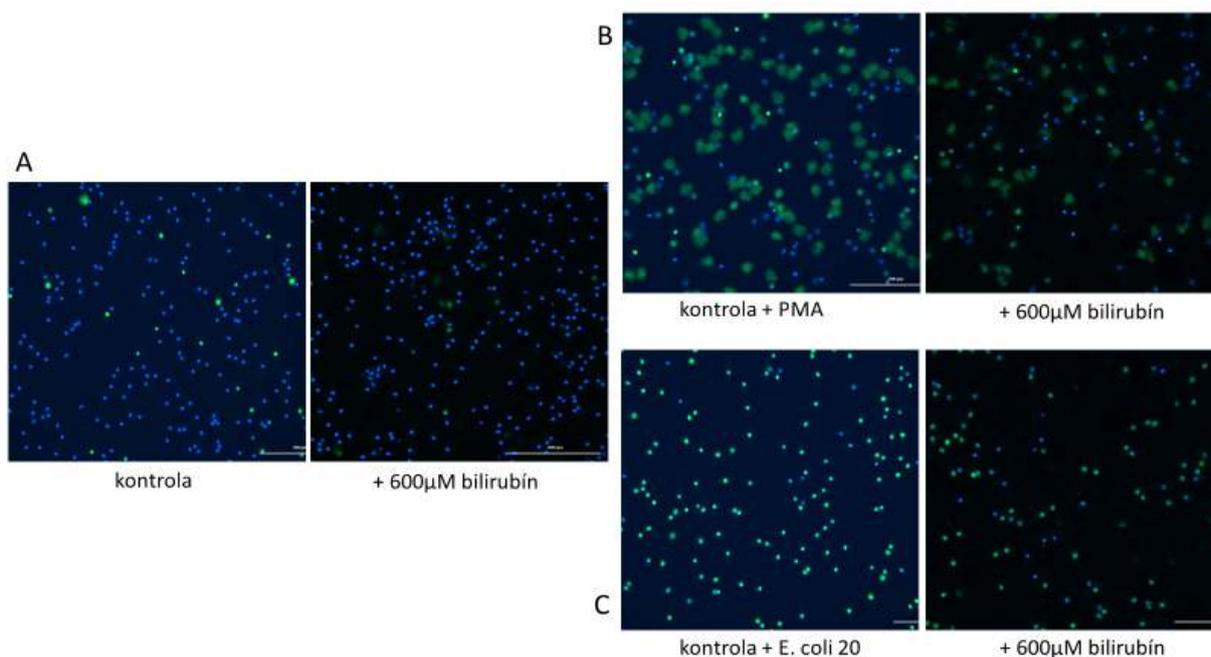
Najväčšia tvorba NETov bola zaznamenaná v prítomnosti induktora PMA v porovnaní s nestimulovanými neutrofilmi a neutrofilmi stimulovanými *E.coli* (Obr. 1.A), čomu nasvedčuje aj grafická dokumentácia pomocou Live Cell Imageru v poslednom bode merania (180. minúta) (Obr. 2). Prítomnosť všetkých troch koncentrácií bilirubínu v skupinách neutrofilov vystavených stimulom PMA spôsobila signifikantný pokles v tvorbe NETov v závislosti od zvyšujúcej sa koncentrácie bilirubínu ($p < 0,001$). Tento podmienený pokles koncentrácie bilirubínu sme nezaznamenali v prítomnosti stimulu *E.coli* (obrázok 1.A), čo je rovnako graficky zdokumentované (Obr. 2). Antimikrobiálna aktivita neutrofilov + *E.coli* bola priamoúmerná narastajúcim koncentraciám, najvyššia bola pri použití 600 μ M bilirubínu (Obr. 1.B) ($p < 0,03$).

Dynamika produkcie ROS bola stanovená po stimule PMA a *E.coli*. V prípade stimulu PMA bola zaznamenaná signifikantne nižšia produkcia ROS u neutrofilov liečených najvyššou koncentraciou bilirubínu (600 μ M) v porovnaní s kontrolnými neutrofilmi (obrázok 1.C) ($p < 0,001$). V prítomnosti *E.coli* neboli pozorované signifikantné rozdiely v ROS produkcii medzi jednotlivými skupinami rôznych koncentrácií bilirubínu (obrázok 1.D).

Barbora Gromová, Katarína Kmeťová, Michal Pastorek, Peter Celec, Roman Gardlík: Nekonjugovaný bilirubín ako modulátor tvorby neutrofilových extracelulárnych pascí. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 262-266.



Obr.1. Odpovede neutrofilov vystavených jednotlivým stimulom v prítomnosti rôznych koncentrácií bilirubínu. A – priemerná tvorba NETov; B – antimikrobiálna aktivita; C – produkcia ROS po PMA stimule; D – produkcia ROS po *E.coli* s MOI 20. Neutrofily boli pred stimuláciou 30min inkubované s koncentraciami bilirubínu (600 μ M, 60 μ M, 6 μ M). * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.



Obr.2. Grafické zobrazenie neutrofilov vystavených jednotlivým stimulom v poslednom bode merania (180. minúta) A – kontrolná skupina neutrofilov a neutrofilov + 600 μ M bilirubín ; B – kontrolná skupina

Barbora Gromová, Katarína Kmeťová, Michal Pastorek, Peter Celec, Roman Gardlík: Nekonjugovaný bilirubín ako modulátor tvorby neutrofilových extracelulárnych pascí. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 262-266.

neutrofilily s PMA a neutrofilily + 600 μ M bilirubín; C – kontrolná skupina neutrofilily s *E. coli* MOI 20 a neutrofilily + 600 μ M bilirubín. Neutrofilily boli pred stimuláciou 30min inkubované s bilirubínom. Jadrá neutrofilov boli farbené farbičkou Hoechst (modrá) a mŕtve bunky alebo NETujúce neutrofilily farbičkou Sytox Green (zelená).

Diskusia

V predloženej práci sme ukázali, že všetky použité koncentrácie bilirubínu spôsobili zostup NETózy stimulovanej PMA. Rovnaký pokles závislý od koncentrácie bilirubínu sme zaznamenali aj v dynamike produkcie ROS. Keďže PMA je induktor predovšetkým ROS-závislej NETózy, obe zistenia simultánne poukazujú na možnosti využitia bilirubínu ako potenciálneho terapeutika. Naše výsledky naznačujú, že bilirubín svojou antioxidantnou kapacitou vychtával vznikajúce voľné radikály, ktoré môžu byť súčasťou kaskády spúšťajúcej tvorbu imunogénnych NETov, a tak pomôže predísť opätovnej aktivácii imunitného systému.

V rámci výskumu sme pozorovali aj vplyv koncentrácií bilirubínu na tvorbu NETov pri nesterilnom zápale. Z dostupnej literatúry (11) vieme, že bilirubín prispieva k zníženiu neutrofilovej baktericídnej aktivity, čo bolo pozorované aj v našom prípade. Pri najvyššej koncentrácií bilirubínu (600 μ M) sme pozorovali najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu.

Na druhej strane, neutrofilily v prítomnosti baktérie *E. coli* uprednostňovali eliminovanie patogénu iným spôsobom ako tvorbou NETov, čo potvrdzujú aj obrázky z Live Cell Imageru (Obr.2). Jedným z potenciálnych no zatiaľ nepotvrdených spôsobov jeho odstraňovania môže byť fagocytóza. Pri odbúravaní sme nepozorovali ani nárast produkcie ROS.

Na základe pozorovaných výsledkov je možné vytvoriť hypotézu, že bilirubín má vo fyziologických koncentráciách inhibičný efekt na ROS-závislú NETózu a tak dokáže zmierňovať zápal. Výnimku môžu predstavovať jedinci s nadprodukciou a hromadením bilirubínu, keďže v týchto prípadoch bolo pozorované, že bilirubín indukoval tvorbu NETov prostredníctvom akumulácie mitochondriálnych ROSov, čo viedlo k hyperkoagulačnému a protrombotickému stavu (12). Objasnenie protektívnej úlohy bilirubínu a jeho pôsobenia na neutrofilily si pre jeho využitie v chorobách asociovaných s prozápalovým charakterom NETov vyžaduje detailnejšiu analýzu ako súčasť budúcich výskumov.

Zoznam použitej literatúry

1. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303(5663):1532-5.
2. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al.: Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011; 3(73):73ra20.
3. Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, Carmona-Rivera C, De Ravin SS, Smith CK, et al.: Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med*. 2016; 22(2):146-53.
4. Rohm M, Grimm MJ, D'Auria AC, Almyroudís NG, Segal BH, Urban CF.: NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. *Infect Immun*. 2014; 82(5):1766-77.
5. Pérez-Sánchez C, Ruiz-Limón P, Aguirre MA, Jiménez-Gómez Y, Arias-de la Rosa I, Ábalos-Aguilera MC, et al.: Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity,

Barbora Gromová, Katarína Kmeťová, Michal Pastorek, Peter Celec, Roman Gardlík: Nekonjugovaný bilirubín ako modulátor tvorby neutrofilových extracelulárnych pascí. Zborník vedeckých prác doktorandov LF UK v Bratislave, Univerzita Komenského v Bratislave, 2021: 262-266.

atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J Autoimmun.* 2017; 82:31-40.

6. Lauková L, Konečná B, Bábíčková J, Wagnerová A, Melišková V, et al.: Exogenous deoxyribonuclease has a protective effect in a mouse model of sepsis. *Biomed Pharmacother.* 2017; 93:8-16.

7. Li T, Wang C, Liu Y, Li B, Zhang W, et al.: Neutrophil Extracellular Traps Induce Intestinal Damage and Thrombotic Tendency in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis.* 2020; 10;14(2):240-253.

8. Neeli I, Dwivedi N, Khan S, Radic M.: Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun.* 2009;1(3):194-201.

9. Brites D. The evolving landscape of neurotoxicity by unconjugated bilirubin: role of glial cells and inflammation. *Front Pharma-col.* 2012; 3:88.

10. Longhi MS, Vuerich M, Kalbasi A, Kenison JE, Yeste A, et al.: Bilirubin suppresses Th17 immunity in colitis by upregulating CD39. *JCI Insight.* 2017; 2(9):e92791.

11. Arai T, Yoshikai Y, Kamiya J, Nagino M, Uesaka K, Yuasa N, Oda K, Sano T, Nimura Y. Bilirubin impairs bactericidal activity of neutrophils through an antioxidant mechanism in vitro. *J Surg Res.* 2001; 96(1):107-13.

12. Zhang J, Yu M, Liu B, Zhou P, Zuo N, Wang Y, Feng Y, Zhang Y, Wang J, He Y, Wu Y, Dong Z, Hong L, Shi J. Neutrophil extracellular traps enhance procoagulant activity and thrombotic tendency in patients with obstructive jaundice. *Liver Int.* 2021; 41(2):333-347.

